

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

INSTITUTO HISPANOLUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE



TESIS DOCTORAL

Caracterización molecular y funcional de biofertilizantes bacterianos, y análisis de su potencial para mejorar la producción de cultivos de maíz, guisante, lechuga, fresa y zanahoria

Memoria presentada por **José David Flores Félix** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Fdo. José David Flores Félix

Salamanca, 2018

Dr. Eustoquio Martínez Molina, Catedrático del área de Microbiología, Dra. M^a de la Encarnación Velázquez Pérez, Catedrática del área de Microbiología, y Dr. Raúl Rivas González, Profesor Titular del área de Microbiología.

AUTORIZAN:

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización molecular y funcional de biofertilizantes bacterianos, y análisis de su potencial para mejorar la producción de cultivos de maíz, guisante, lechuga, fresa y zanahoria”, elaborada por Don José David Flores Félix y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del grado de Doctor.

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 14 de Junio de 2018.

Fdo. Dr. D. Eustoquio Martínez Molina Fdo. Dra. D^a. M^a de la Encarnación Velázquez Pérez Fdo. Dr. D. Raúl Rivas González

“Todos somos ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas”

Albert Einstein

Agradecimientos

En primer lugar, a mis tres directores, comenzando por la Catedrática M^a de la Encarnación Velázquez sin cuya inestimable ayuda esta tesis no hubiera sido posible, por ser una infinita fuente de conocimientos, por su esfuerzo y dedicación en una etapa que ha durado más de lo que debería, pero menos de lo que desearía. Tu capacidad de esfuerzo y tesón son y serán una inspiración.

Al Dr. Raúl Rivas, por la magnífica oportunidad que me brindó allá por un ya lejano año 2009, permitiéndome conocer la microbiología y sumergirme en el fantástico mundo de la investigación donde cada día es un reto y una meta en sí mismo. Por enseñarme que no hay más límite que el que uno se marca, buscando incansablemente una manera de demostrar al mundo las virtudes de la microbiología

Al Catedrático Eustoquio Martínez, por todos y cada uno de los consejos y enseñanzas que siempre han llegado en el momento más oportuno, por aportar cuando más se ha necesitado esa sabiduría salomónica que ha dado calma y tranquilidad en tanto momentos de desesperación que ha tenido esta etapa.

No menos importante ha sido la ayuda y guía del Catedrático Pedro Mateos, por cada uno de tanto consejos y momentos, tanto académicos como gastronómicos que durante esta tesis he tenido el placer de disfrutar. Por presentarme al Dr. Andrea Squartini, “il caro professore”, al que no puedo menos de agradecerle eternamente la oportunidad que me dio para, bajo su tutela, descubrir el mundo del Quorum sensing.

A mis compañeros del grupo de batalla, a los que están, a los que se fueron y a los que han vuelto, Alexandra, Alex, Lorenas (Carro y Celador), Marta, Xavier, Sergio, Pilar, Esther, Zaki, Pepín, Rebeca, Lina, Marta Robledo. Por todas y cada una de las vivencias que hemos compartido en este camino, congresos, ratos de invernadero, radio, talleres y sobre todo ensayos de campo.

Especial agradecimiento al grupo del IRNASA de la Unidad Asociada, Álvaro, Mariano y Helena por todo el apoyo y disposición para solucionar cualquier adversidad haciendo de este camino mucho más agradable. Gracias por prestarnos las instalaciones siempre que las hemos necesitado aportando como el resto su granito de arena.

Por supuesto, gracias a todos aquéllos que durante este largo camino han hecho de él, un viaje inolvidable en nuestro departamento, Inma, Luis, Nieves, Mamen, Pilar, Ricardo, Manolo y Fernando. A la gente de la Universidad de León, Fernando, Rebeca, Raquel, Daniel, Cesar y Juan.

A mis compañeros de Agripolis, Jesus, Vincius, Armin, Junior, Sabrina, Laura, los Lorenzos, Madiha, Guilherme, mil gracias por aceptarme y hacerme sentir tan querido, por todos y cada uno de los baccaros, por el comedor y por todos los buenos ratos, que no fueron pocos.

A mis amigos, a todos y cada uno, a los que acaban de llegar y a los que están por llegar, gracias por vuestro apoyo y comprensión, por estar ahí siempre, por esas cervezas que sirven para detener el mundo y resetear. Por esas noches de billar y diana, y porque el Carro (con mayúsculas, que se lo ha ganado) nos aguante muchos años, que menos que un beso a la derecha para celebrarlo. Una mención para Pablo por tantas tardes aguantando mis penas y pesares.

No puedo menos que agradecerle infinitamente a mis padres por todo su apoyo y ayuda, por preocuparse y darme todo para llegar hasta donde he llegado, por preocuparse en tantos momentos de desesperación. Esta tesis también es mérito vuestro y lleva un pedacito de ambos.

Por supuesto a Natalie, por haber sufrido todos y cada uno de los momentos que han llevado hasta este día, por la comprensión y por la ayuda que tanto me ha hecho falta, por darme alegría todos los días porque no han sido pocos los momentos en los que he necesitado un empujón, una sonrisa y un beso.

Índice

Índice

Introducción

1.	Agricultura en el siglo XXI.....	3
1.1.	Técnicas agrícolas sostenibles	4
2.	La agricultura en España.....	7
2.1.	Alubia.....	9
2.2.	Guisante.....	10
2.3.	Maíz.....	11
2.4.	Fresa.....	12
2.5.	Zanahoria.....	13
2.6.	Lechuga.....	14
3.	Microorganismos en agricultura.....	15
3.1.	Rizosfera y endosfera.....	15
3.2.	Interacciones planta-microorganismo.....	16
3.3.	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	17
3.3.1.	Diversidad microbiana.....	17
3.3.1.1.	Bacterias endófitas.....	18
3.3.1.1.1.	Bacterias endófitas de nódulos de leguminosas.....	19
3.3.1.2.	Aplicaciones de las bacterias endófitas.....	22
3.3.2.	Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.....	23
3.3.2.1.	Mecanismos directos.....	24
3.3.2.1.1.	Fijación de nitrógeno.....	24
3.3.2.1.1.1.	Los <i>rhizobia</i>	28
3.3.2.1.1.2.	Proceso de infección.....	30
3.3.2.1.1.3.	Simbiovariedades.....	34
3.3.2.1.2.	Solubilización de fosfato.....	36
3.3.2.1.3.	Producción de sideróforos.....	38
3.3.2.1.4.	Síntesis de fitohormonas.....	40
3.3.2.2.	Mecanismos indirectos.....	42
4.	Taxonomía y filogenia bacteriana.....	43
4.1.	Criterios fenotípicos y quimiotaxonómicos.....	44
4.2.	Criterios genotípicos.....	45

Objetivos

Materiales y métodos

1.	Aislamiento de bacterias a partir de nódulos de leguminosas.....	53
2.	Mantenimiento y conservación de las cepas.....	54
3.	Caracterización genotípica.....	54
3.1.	Extracción y purificación de ADN.....	54
3.2.	Amplificación de ADN mediante PCR.....	54

3.3. Electroforesis.....	55
3.4. Obtención de perfiles de RAPD.....	55
3.5. Análisis matemático de los perfiles de RAPD.....	56
3.6. Amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S.....	56
3.7. Amplificación y secuenciación de genes housekeeping.....	57
3.8. Amplificación y secuenciación del gen <i>nodC</i>	57
3.9. Análisis de las secuencias de ADN.....	57
3.10. Secuenciación genómica y análisis de información genómica.....	57
3.11. Análisis taxonómico de la cepa PEPV15.....	58
3.11.1. Análisis de genes.....	58
3.11.2. Determinación del contenido en G+C.....	58
3.11.3. Hibridación ADN total.....	58
3.11.4. Tinción de Gram.....	59
3.11.5. Crecimiento a diferentes temperaturas, pH y concentraciones salinas.....	59
3.11.6. Resistencia a antibióticos.....	59
3.11.7. Asimilación de fuentes de carbono y/o nitrógeno utilizando sistemas miniaturizados.....	60
3.12. Análisis quimiotaxonómicos.....	60
4. Análisis de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	60
4.1. Solubilización de fosfato.....	60
4.2. Producción de sideróforos.....	60
4.3. Síntesis de ácido indól acético.....	62
4.4. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.....	62
4.5. Estudio de la capacidad de colonización.....	62
4.5.1. Producción de celulosa.....	62
4.5.2. Producción de celulasas.....	63
4.5.3. Estudio cuantitativo de la capacidad de producción de biofilms.....	63
4.6. Determinación de la capacidad para producción moléculas implicadas en <i>Quorum sensing</i>	64
4.7. Estudio de inhibición y antibiosis.....	64
5. Métodos de transformación de bacterias.....	64
5.1. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	64
5.2. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico.....	65
5.3. Transformación de <i>Rhizobium</i> y <i>Phyllobacterium</i>	65
6. Análisis de la colonización de nódulos de leguminosas y de raíces de no leguminosas.....	67
6.1. Microscopia óptica y de fluorescencia.....	67
6.2. Microscopia confocal de fluorescencia.....	67
6.3. Métodos de inmunodetección.....	67
7. Ensayos en planta.....	68
7.1. Esterilización de semillas.....	68
7.2. Inoculación de bacterias en <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Pisum sativum</i>	68
7.3. Análisis de la dinámica de nodulación.....	69
7.4. Ensayos en plántulas de lechuga, fresa, zanahoria, guisante y maíz.....	69

7.5. Ensayos en invernadero.	69
7.6. Ensayos de campo.	70
7.6.1. Lechuga.	70
7.6.2. Zanahoria.	71
7.6.3. Fresa.	71
7.6.4. Guisante y maíz.	71
8. Análisis químico elemental de muestras vegetales.	72

Resultados y discusión

Capítulo 1

1. Cepas de <i>rhizobia</i> aisladas a partir de nódulos de <i>Pisum sativum</i> y <i>Phaseolus vulgaris</i>	77
2. Análisis de la diversidad genética de las cepas de <i>rhizobia</i>	77
3. Identificación de las cepas de <i>rhizobia</i>	80
3.1. Análisis de la cepa PEPV15	87
3.1.1. Actividades enzimáticas y utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.	92
3.2. Análisis de los genes simbióticos.	92
4. Estudio de los mecanismos PGPB	94
4.1. Solubilización de fosfato.	95
4.2. Producción de sideróforos.	97
4.3. Producción de ácido indól acético	97
5. Análisis del potencial de colonización de las raíces	99
5.1. Producción de celulosa.	99
5.2. Producción de celulasas	101
5.3. Estudio de la capacidad para producir biofilms	102
5.3.1. Determinación cuantitativa de la producción de biofilms.	103
5.3.2. Determinación cualitativa de producción de biofilms	104
5.4. Quorum sensing	106
6. Ensayos de efectividad simbiótica	108
6.1. Ensayos en alubia.	108
6.2. Ensayos en guisante	111

Capítulo 2

1. Cepas de bacterias endófitas aisladas a partir de nódulos de <i>Pisum sativum</i>	117
1.1. Análisis de la diversidad genética.	118
1.2. Identificación de las cepas de bacterias endófitas.	120
2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.	124
2.1. Solubilización de fosfato.	124

2.2.	Producción de sideróforos.....	127
2.3.	Producción de ácido indol acético	127
2.4.	Crecimiento en medios libres de nitrógeno.....	128
3.	Compatibilidad de las cepas de endófitos y de <i>Rhizobium</i>	128
4.	Determinación de la capacidad para formar biofilms.....	129
4.1.	Determinación cuantitativa de la producción de biofilms.....	130
4.2.	Determinación cualitativa de la producción de biofilms.....	132
5.	Estudio de la colonización de guisante y maíz.	134
5.1.	Estudio de la estructura de los nódulos de guisante.....	134
5.2.	Estudio de inmunohistoquímica.....	136
5.2.1.	Nódulos de guisante.....	136
5.2.2.	Raíces de maíz.....	137
6.	Ensayos de efectividad.....	140
6.1.	Ensayos en guisante.....	140
6.2.	Dinámica de nodulación.....	144
6.3.	Ensayos en maíz.....	145
7.	Ensayos en invernadero.....	148
7.1.	Ensayos en guisante.....	149
7.2.	Ensayos en maíz.....	152

Capítulo 3

1.	Descripción general de los genomas.....	159
2.	Estudio de genes de interés para la promoción del crecimiento vegetal.....	160
2.1.	Síntesis de fitohormonas.....	161
2.2.	Metabolismo del fósforo.....	162
2.3.	Nodulación y fijación de nitrógeno.....	163
2.4.	Metabolismo del hierro.....	163
2.5.	Inducción de resistencia sistémica.....	165
3.	Genes implicados en colonización e interacción en la rizosfera.....	166
3.1.	<i>Quorum sensing</i>	166
3.2.	Genes implicados en colonización y formación de biofilms.....	167
4.	Otros genes de interés en bacterias PGPB.....	169
5.	Análisis genómico mediante programas específicos. Búsqueda de producción de sustancias.....	174

Capítulo 4

1.	Ensayos en plántulas de lechuga, zanahoria y fresa.....	179
2.	Análisis de la capacidad de colonización	181
2.1.	Estudio mediante microscopía óptica de fluorescencia	181
2.2.	Estudio mediante microscopía confocal.....	187
3.	Ensayos en microcosmos	191

3.1. Ensayos en lechuga	191
3.2. Ensayos en zanahoria	192
3.3. Ensayos en fresa	194

Capítulo 5

1. Ensayos en lechuga	199
2. Ensayos en zanahoria	202
3. Ensayo en fresa	206
4. Ensayo en guisante	208
5. Ensayo en maíz	210

Discusión general

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Summary

Conclusions

Introducción

1. Agricultura en el siglo XXI

Antes del comienzo de la agricultura, el estilo de vida cazador-recolector sustentaba a unos 4 millones de personas en todo el mundo. En la actualidad, la agricultura moderna alimenta a más 6.000 millones de personas debido a una mejora significativa de las condiciones de producción, que han permitido que la producción mundial de cereales se haya duplicado en los últimos 40 años, principalmente por el aumento de los rendimientos, como resultado de mayor aplicación de fertilizantes, agua y pesticidas, nuevos cultivares y otras tecnologías de la denominada “Revolución Verde”. Esto ha aumentado el suministro global de alimentos per cápita, reduciendo el hambre, mejorando la nutrición, y por lo tanto la capacidad de las personas para alcanzar mejor su potencial mental y físico, y preservando los ecosistemas naturales de los procesos de conversión a la agricultura (Roy 2017).

Para el año 2050, se estima que la población mundial pueda llegar a ser un 50% mayor que la actual y, por tanto, que la demanda mundial de alimentos se duplique. Esta duplicación será el resultado de un aumento proyectado de 2,4 veces en el consumo real per cápita, además de producirse cambios en la dieta hacia una mayor proporción de carne, en gran parte alimentada con cereales y legumbres, asociada con una mejora de los ingresos económicos de la población. Aumentos adicionales en la producción agrícola son, por lo tanto, esenciales para la estabilidad, la equidad política y social a nivel mundial. Duplicar nuevamente la producción de alimentos y mantenerla a este nivel son los principales desafíos para la agricultura del futuro (Tilman et al. 2002; Valin et al. 2014).

Uno de los pilares sobre los que se sustenta la actual producción agrícola es la utilización de abonos de síntesis química o abonos minerales. Su utilización se extendió durante la “Revolución Verde” permitiendo reducir la fracción de las personas en condiciones de hambruna en el mundo, de la mitad, a menos de una sexta parte, incluso cuando la población se duplicó de 3 a 6 mil millones. Estos logros le dieron a Borlaug un bien merecido Premio Nobel, aunque las consecuencias ambientales del uso indiscriminado de pesticidas, herbicidas y abonos inorgánicos ha generado un importante rechazo en la sociedad (Olivares et al. 2013; Fedoroff 2015; Lamine 2015). En la actualidad, Estados Unidos, China e India son los principales consumidores de abonos inorgánicos, tanto nitrogenados como fosfatados, utilizando entre estos tres países entre el 65 y el 50% de la producción, que actualmente se encuentra en 120 millones de toneladas para los abonos nitrogenados y 17 millones de toneladas para los abonos fosfatados (Fig 1) (Lu y Tian 2017). Su utilización genera problemas asociados a la sobredosificación y a la pérdida de eficiencia por lixiviación a sistemas acuáticos y, además, la producción de abonos nitrogenados precisa de importantes cantidades de energía con la consiguiente producción de CO₂ (Albiac et al. 2017). En el caso del fósforo, la problemática radica en el agotamiento de los yacimientos mineros que permiten la obtención de fosfato de roca utilizado como sustrato para la producción de abonos (Schnug y De Kok 2016). Los modelos demográficos y productivos auguran un

incremento en la utilización de estos productos, si no se modifican los parámetros productivos. por lo que parece ser necesaria la incorporación de mejoras en los sistemas agrícolas para poder incrementar la eficiencia sin reducir la capacidad de producción y así alimentar a una población cada vez mayor (Altieri et al. 2017; Bruinsma 2017).

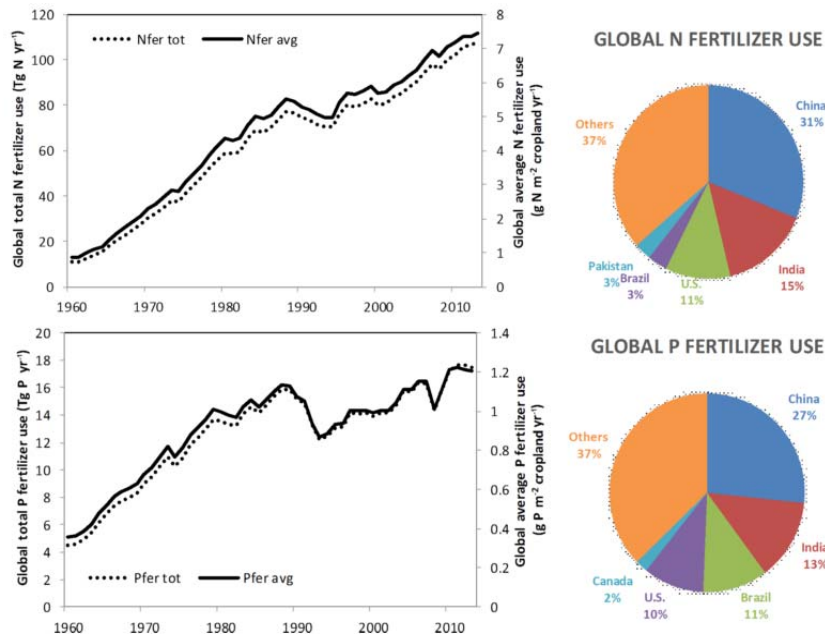


Figura 1. Evolución del consumo anual de fertilizantes nitrogenados y fosfatado, y consumo sectorizado por países adaptado de Lu y Tian (2017)

1.1. Técnicas agrícolas sostenibles

Las corrientes actuales pretenden mejorar la eficiencia de los sistemas agrícolas mediante la implementación de técnicas de cultivo y la diversificación de los insumos aplicados, permitiendo la reutilización de subproductos de otras actividades humanas como la ganadería. Una de estas prácticas agrarias consiste en la reducción o eliminación de la labranza, algo que se ha aplicado desde hace varios milenios en los sistemas agrícolas de las civilizaciones egipcias en África o incas en Sudamérica a un tipo de agricultura basado en la inserción directa de las semillas sobre el lecho sin labrar en espacios donde la pendiente era excesiva y no permitía realizar el labrado, o la ausencia de fuerzas de tracción imposibilitaban llevar a cabo este proceso de una manera eficaz. El principal efecto positivo potencial sobre la fertilidad es el incremento del porcentaje de carbono orgánico disponible en el suelo que, a su vez, repercute en la creación de complejos húmico-fúlvicos que actúan reteniendo los iones de los diferentes nutrientes. A su vez, suelos con alta concentración de carbono orgánico influyen de manera positiva en la actividad microbiana y en la diversidad de los mismos (Raphael et al. 2016). En los sistemas de no labranza se aplica una eliminación de prácticas de

cultivo que rompan o produzcan inversiones en los horizontes superficiales (Lienhard et al. 2013), de esta manera la siembra suele llevarse a cabo mediante siembra directa (Nascente et al. 2013). Sin embargo, estos sistemas tienen tendencia a ser deficitarios en potasio y fósforo ya que existe un flujo extractivo con los cultivos, por lo que la mayoría de los estudios se centran en conocer cómo influyen las diferentes prácticas en estos nutrientes (Gadermaier et al. 2011; Zikeli et al. 2013; Lourenzi et al. 2015; Rodrigues et al. 2016). Este flujo se puede compensar en parte mediante rotación de cultivos, pero suele ser necesario realizar enmiendas externas (Rosolem y Calonego 2013). Una práctica agrícola muy conservadora, pero no tan restrictiva como la ausencia de labranza, es la denominada labranza mínima, consistente en realizar la labranza de los primeros centímetros, normalmente no más de 20 cm, manteniendo el suelo una estructura más cercana a la natural (Bogužas et al. 2015).

Otra técnica agrícola utilizada son los cultivos de cobertera, que de una forma sencilla y breve se podría definir como cultivos en rotaciones cortas, con una duración, en la mayoría de los casos, inferior un ciclo de cultivo natural. La principal aplicación de los cultivos de cobertera es la defensa de los recursos edáficos, evitando mediante la presencia de materia vegetal viva, la pérdida de sólidos y nutrientes por erosión. Estos cultivos actúan reduciendo la energía cinética del agua o del viento y, por tanto, reduciendo la agresión que éstos ocasionan sobre los sistemas agrícolas. De esta manera se consigue mantener la fracción más fina de material edáfico, que es la más sensible a la erosión, pero también se consigue reducir las pérdidas de nutrientes solubles por escorrentía. Estos tipos de cultivos, además, pueden ser utilizados en primavera o verano en función de las necesidades de los mismos (Kim et al. 2012; Almeida y Rosolem 2016).

El denominado *intercropping* en inglés, y que podría traducirse como co-cultivo, es quizás una de las técnicas con mayor auge en los últimos años en la agricultura comercial, y es ampliamente utilizado en los sistemas agrícolas tropicales como también lo era en Europa en siglos anteriores. Esta técnica consiste en el cultivo simultáneo de dos o más especies de vegetales con el fin de conseguir el aprovechamiento de todos ellos, buscando la sinergia entre las especies vegetales y evitando la competencia, tanto a nivel foliar y radicular, como nutricional. Todos los cultivos se llevan a cabo en un mismo lugar y en un mismo periodo (Chapagain y Riseman 2014). Las asociaciones más comunes suelen ser entre un cereal y una leguminosa permitiendo maximizar el uso del suelo, incrementando las cosechas a través de un uso más eficiente de los recursos del suelo y reduciendo la dependencia externa que sufren los agricultores del precio de los productos, lo cual conduce a una mejora de las posibilidades de éxito del cultivo (Beedy et al. 2010; Miao et al. 2016; Journet et al. 2014).

La rotación de cultivo es quizás una de las técnicas más antiguas utilizadas por la agricultura, datando en Europa de épocas prerromanas, aunque fue la civilización romana la que desarrolló de manera más amplia esta técnica utilizando el sistema “food-feed-fallow”. Este sistema implica la división de los terrenos cultivables en tres partes

iguales, en una de ellas se cultivaban vegetales aprovechables por el hombre, en el segundo tercio aquéllos destinados a la alimentación animal y en el último lugar, se dejaba un año con pasto para el ganado con el fin de recuperar la fertilidad. Este sistema era rotativo, y después del pasto, dónde pacía el ganado comenzaba la rotación otra vez (White 1970; Altieri y Nicholls 2012). En la época romana ya encontramos tratados sobre cómo utilizar los cultivos en estos sistemas rotacionales, así como sus aportes a la fertilidad del suelo, como destacan los textos del escritor y agrónomo Columela (54 d.C.). En este tratado ya se pone de manifiesto la utilidad del género *Vicia* y *Lupinus* en el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Columela y Álvarez de Sotomayor y Rubio 2012).

Bajo el concepto de rotación de cultivos se encuadran todo tipo de sucesiones temporales de cultivos en un mismo campo. Esta sucesión se ha de realizar teniendo en cuenta no sólo las características ambientales como clima y sustrato, sino también las necesidades agronómicas de los cultivos de acuerdo a las posibilidades (Brankatschk y Finkbeiner 2015). Entre los beneficios que se obtienen están el control de malas hierbas (Anderson 2015), la mejora de las cualidades físicas e hídricas del suelo (Liu et al. 2016), y principalmente, un mayor rédito en cuanto a fertilidad del suelo (Stolarski et al. 2014). Las asociaciones suelen corresponder a una leguminosa con un cereal (Scalise et al. 2015), aunque también pueden introducirse cultivos como la colza por su capacidad de fitoextracción de nutrientes de los horizontes edáficos inferiores (Bernard et al. 2014). Una de las rotaciones más utilizadas, como se refleja en la bibliografía, es la asociación de maíz y soja (Riedell et al. 2009; Karlen et al. 2013; Souza et al. 2013; Tomer y Liebman 2014; Sindelar et al. 2015; Zhou et al. 2015; Al-Kaisi et al. 2016; Duval et al. 2016), aunque esta leguminosa también ha sido combinada con otros cultivos de monocotiledóneas, como el trigo o el arroz (Riedell et al. 2009; Souza et al. 2013), y el maíz a su vez, con otras leguminosas, como la alubia, el altramuz, guisante o alfalfa (N'Dayegamiye et al. 2015)

Otra de las técnicas que está tomando un auge considerable es la utilización de los denominados abonos verdes, práctica que consiste en la utilización de un cultivo determinado, principalmente una leguminosa, que será cultivada bien durante el periodo de descanso del cultivo principal, o bien durante un periodo estándar de cultivo, es decir, una temporada (Hwang et al. 2015). Este cultivo se establece con el objetivo de ser incorporado de nuevo a la tierra sin proceder a la recogida del material vegetal o, al menos, de la biomasa aérea, pudiendo en algunos casos realizarse la obtención del fruto. Este hecho hace que los efectos sean visibles tras una cantidad de ciclos de cultivos determinados, cuando se alcanza un equilibrio entre la entrada y salida de nitrógeno en el suelo. En condiciones normales es fácil alcanzar aportes medios de 100 kg N/ha (Talgre et al. 2012; Dabin et al. 2016), valores considerables que aseguran un buen rendimiento del cultivo al que precedan; sin embargo, si este es llevado a cabo en ciclos cortos o periodos invernales, la productividad total del cultivo se verá reducida, mermándose de esta manera la fijación de nitrógeno (Kim et al. 2012).

Además, algunas corrientes como la agricultura ecológica surgida en la década de los 50 del pasado siglo están tomando fuerza. La agricultura ecológica pretende mantener unos niveles de producción acordes con el ecosistema donde se enmarca, actuando de manera racional de acuerdo a los límites inherentes a la región. Se busca además, la diversificación de las enmiendas aplicadas, siempre y cuando esta no generen un problema ambiental asociado, como puede ser la emisión de dióxido de carbono. En la producción de fertilizantes nitrogenados. Este tipo de agricultura se basa en una visión holística de los sistemas agropecuarios, teniendo en cuenta cada una de las partes que integran el sistema agroganadero, como el suelo y su microbiota, el clima o las plantas y animales que forman parte de este sistema (Struik y Kuyper 2017) (Fig. 2).

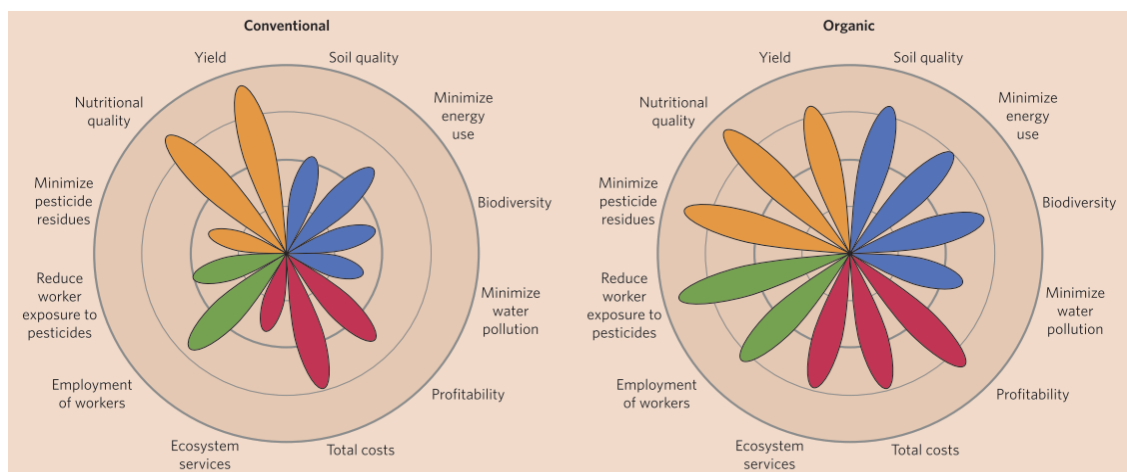


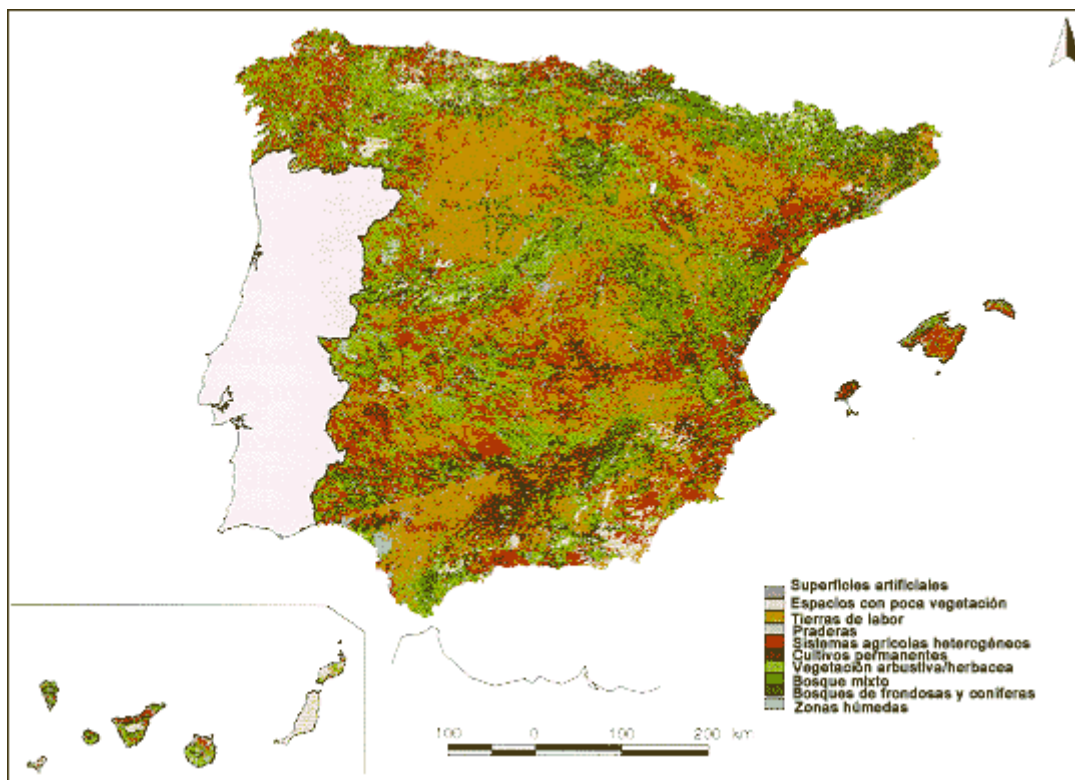
Figura 2. Comparativa entre la importancia relativa de los distintos factores considerados en la agricultura convencional y ecológica Adaptado de Reganold et al., (2016).

Por lo tanto, la agricultura moderna busca la diversificación de las técnicas agrícolas mediante la inclusión de sistemas pasivos de aporte de nutrientes. Por esta razón, y teniendo en cuenta que las leguminosas son una pieza clave en la agricultura moderna y las políticas europeas comunitarias, la utilización en la agricultura de microorganismos que forman simbiosis fijadoras de nitrógeno con estas plantas, es una pieza clave con perspectivas futuras esperanzadoras.

2. La agricultura en España.

El sector agrícola en España tiene una importancia estratégica a nivel económico, social y ecológico. De los 505.991 km² de superficie que ocupa el país, el 50% están dedicados a actividades agrarias, con la peculiaridad de presentar un sector agrícola heterogéneo (Fig. 3), pudiendo encontrar sistemas de producción modernizados de agricultura de precisión y sistemas extensivos de bajo rendimiento debido a las condiciones climáticas (Comunidad Europea 2016). Estas condiciones climáticas están caracterizadas por un clima mediterráneo en la mayor parte del país, con precipitaciones de moderadas a bajas en la mayor parte del territorio, salvo su extremo norte, con

precipitaciones abundantes. Sin embargo, las características geográficas y climáticas hacen que las regiones de climas más benignos presenten mejores características agrícolas, lo que ha estimulado el desarrollo de políticas importantes en torno al agua y su aprovechamiento, así como la transformación de millones de hectáreas hacia cultivos de regadío modernizados de alta eficiencia (Laínez et al. 2018). Son estas condiciones climáticas las que permiten realizar producciones prácticamente constantes, permitiendo la exportación de miles de toneladas de productos agrícolas y jugando, de esta manera, un papel clave en la economía estatal, con un rendimiento de más de 46.000 millones de euros que ha aumentado a ritmo constante desde la última década, fruto de la modernización y la producción de productos agrícolas de alto valor añadido debido al



incremento de la superficie que dedica a la agricultura ecológica (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016).

Figura 3. Usos del suelo en España. Sig-pac 2018.

La agricultura española presenta la peculiaridad de ser altamente diversa, incluyendo cultivos herbáceos de cereales, hortícolas, legumbres o plantas ornamentales, y cultivos leñosos de fruto de pepita, cítricos, olivares o viñedos. Además de esta diversidad, la producción de algunos de estos productos agrícolas es más que destacable, encabezando la producción europea como primer productor de fresa, calabacín, naranjas y aceituna, y como segundo productor de tomate y otras hortalizas (Unión Europea. Comisión Europea y EUROSTAT 2013). Algunos cultivos tienen especial relevancia tanto por su significación geográfica como por su interés económico.

Además, las últimas reformas de la Política Agraria Comunitaria (PAC) instan a los agricultores a incluir en los ciclos de cultivo de leguminosas debido a su capacidad para fijar nitrógeno. En España, la extensión de estos cultivos fue mayor en el siglo pasado reduciéndose paulatinamente a favor de cultivos más rentables como el maíz (Zander et al. 2016; Stagnari et al. 2017). Sin embargo, en España, el consumo de legumbres tiene especial relevancia debido su rol en la dieta mediterránea, que ha propiciado que amplias regiones sigan cultivando variedades tradicionales sumamente apreciadas como, por ejemplo, la alubia con sus múltiples indicaciones geográficas protegidas, permitiendo que su cultivo no sufra reducciones tan drásticas como en otras regiones europeas (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016; Tosti et al. 2018). Además, otros cultivos como el guisante están atrayendo el interés de los agricultores por su rentabilidad del cultivo y las ventajas que aporta su incorporación a los sistemas de rotación de cultivos en consonancia con la Política Agraria Comunitaria (Anglade et al. 2015; Watson et al. 2017).

2.1 Alubia.

Phaseolus vulgaris L. es una planta de la familia Fabaceae, conocida con múltiples nombres como alubias, judías, caraotas, chícharos, fabas, frijoles, frijones, habichuelas. Es una planta anual, de crecimiento rápido. El sistema radicular es muy ligero y poco profundo y está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación. El tallo principal es herbáceo. En variedades enanas presenta un porte erguido y una altura aproximada de 30 a 40 cm, mientras que en las judías de enrame alcanza una altura de 2 a 3 m, siendo voluble y dextrógiro (se enrolla alrededor de un soporte o tutor en sentido contrario a las agujas del reloj).

La hoja es trifoliada, lanceolada y acuminada, de tamaño variable según la variedad. y las flores, que pueden presentar diversos colores, únicos para cada variedad, aunque en las variedades más importantes son blancas, se presentan en racimos en número de 4 a 8, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos. El fruto es una legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen de 4 a 6 semillas. Existen frutos de color verde, amarillo jaspeado o rojo sobre verde, etc., aunque los más demandados por el consumidor son los verdes y amarillos con forma tanto cilíndrica como aplastada. En estado avanzado, las



Figura 4. *Phaseolus vulgaris* L.

paredes de la vaina o cáscara se refuerzan por tejidos fibrosos (Fig. 4).

Es una planta de clima húmedo y suave, dando las mejores producciones en climas cálidos. Cuando la temperatura oscila entre 12-15°C la vegetación es poco vigorosa y por debajo de 15°C, la mayoría de los frutos quedan en forma de “ganchillo”. Por encima de los 30°C también aparecen deformaciones en las vainas y se produce el aborto de flores.

Es una planta de día corto, aunque en las condiciones de invernadero no le afecta la duración lumínica. No obstante, la luminosidad condiciona la fotosíntesis, soportando temperaturas más elevadas cuanto mayor es la luminosidad, siempre que la humedad relativa sea adecuada. Aunque admite una amplia gama de suelos, los más indicados son los suelos ligeros, de textura silíceo-limosa, con buen drenaje y ricos en materia orgánica. Los valores de pH óptimos oscilan entre 6 y 7,5; aunque en suelo enarenado se desarrolla bien con valores de hasta 8,5.

En España se cultivan numerosas variedades con diferentes denominaciones de origen e indicaciones geográficas protegidas como son el judi3n, blanca redonda, blanca ri3n3n, morada redonda, morada larga, arrocina, de la Virgen, canela, etc. La producci3n de alubia en Espa3a se destina principalmente para consumo humano, produci3ndose 17.000 toneladas, de las cuales 9.000 se producen en Castilla y Le3n donde cuenta con indicaciones geogr3ficas protegidas como la Alubia de la Ba3eza y la Judia del Barco de 3vila en esta comunidad.

2.2 Guisante.

Pisum sativum L. pertenece a la familia Fabaceae, al igual que la alubia, y es una planta anual con un sistema radicular pivotante. El sistema a3reo puede ser erguido o rastrero con una altura m3xima de 2 m, siendo m3s comunes las variedades de porte bajo de entre 90 y 150 cm. Los tallos son delgados y presentan hojas compuestas terminadas en zarcillo con est3pulas gran tama3o en la base de las hojas. En la axila de las hojas salen las flores de fecundaci3n aut3gama que pueden estar aisladas o en racimos de 3 o 4 flores de colores entre blanco o morado (Romero Zarco 2000). El fruto, como en todas especies integrantes de la familia Fabaceae, es una legumbre



Figura 5. *Pisum sativum* L.

compuesta por un número variable de semillas, normalmente de color verde, aunque algunas variedades producen semillas de color blanco e incluso negro (Fig. 5). Es una planta insensible al fotoperiodo, pudiéndose sembrar en otoño o primavera, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 14 y 26°C, viéndose afectada la floración cuando las temperaturas sobrepasan los 30°C. Prefiere suelos ligeros o medios, bien drenados con pH entre 6 y 6,5, pudiendo tolerar un cierto grado de salinidad, pero soporta mal la caliza.

El guisante es la leguminosa producida en mayor cantidad en España, dedicándose principalmente a la producción de alimentos para consumo animal. Anualmente se producen alrededor de 193.000 toneladas de esta legumbre, dedicando tan sólo 7.000 toneladas a consumo humano. Sin embargo, el 82% de la producción se dedica a exportación por lo que su cultivo presenta especial importancia en el mantenimiento de la economía agraria española. Anualmente se producen 43.000 toneladas en Castilla y León, con una clara tendencia al alza, fruto de la necesidad de incorporar leguminosas a los ciclos de cultivo debido a las exigencias de la Política Agraria Comunitaria.

2.3 Maíz.

Zea mays es una especie de planta herbácea de la familia Poaceae de gran porte, pudiendo alcanzar el tallo en algunos casos los 3 m de altura, está formado por un interior esponjoso y con múltiples entrenudos de los que nacen las hojas. Éstas cubren el tallo, son alargadas y anchas con un nervio central muy marcado. Presenta un sistema radicular superficial formado por numerosas raíces de hasta 50 cm, junto con una serie de raíces secundarias adventicias que nacen de los entrenudos más cercanos al suelo. Es una planta monoica, apareciendo la inflorescencia masculina en el extremo terminal del tallo que presenta aspecto plumoso y se denomina panícula. La inflorescencia femenina se conoce como mazorca y nace en la axila de la hoja, presentando estilos de gran tamaño que sobresalen de la vaina. El fruto es una cariósipide que se inserta sobre un raquis cilíndrico denominado olote (Fig. 6). Las condiciones óptimas de crecimiento incluyen temperaturas de entre 20 y 30°C, agua abundante, aunque tolera mal el encharcamiento, no es exigente en cuanto al tipo de suelo, pero no tolera el frío ni la



Figura 6. *Zea mays* L.

sequía.

La dinámica seguida a nivel español es similar a Europa, con un gran incremento de la producción girando en torno a los 4,5 millones de toneladas anuales, y llegando la producción hasta los 4,9 millones. Castilla y León es la principal productora de este cereal a nivel nacional con 1,4 millones de toneladas, seguida de Aragón con casi 1 millón de toneladas producidas anualmente. La mayoría de la producción castellano leonesa se localiza en las provincias del oeste, acaparando León la mitad de la producción de la comunidad autónoma (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016).

2.4 Fresa.

Los actuales cultivares utilizados son híbridos de la fresa salvaje (*Fragaria vesca* L.) y especies americanas, dando como resultado cultivares híbridos de fruto grande o fresón (*Fragaria x ananassa*). Pertenece a la familia Rosaceae y es una planta perenne de crecimiento en roseta, que se va lignificando año a año. Las hojas son compuestas, generalmente con tres folíolos al final de un peciolo en cuya base encontramos estípulas membranosas. El sistema radicular es fasciculado, se compone de raíces y raicillas. La profundidad del sistema radicular es muy variable, dependiendo entre otros factores, del tipo de suelo y de la presencia de patógenos en el mismo. En condiciones óptimas, el sistema radicular puede alcanzar los 2 m, aunque lo normal es que no sobrepasen los 40 cm, encontrándose la mayor parte (90%) en los primeros 25 cm. Las inflorescencias se pueden desarrollar a partir de una yema terminal de la corona, o de yemas axilares de las hojas. La flor tiene 5-6 pétalos, de 20 a 35 estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso. Cada óvulo fecundado da lugar a un fruto de tipo aquenio (Fig. 7).

La producción de fresa presenta la peculiaridad de estar sumamente polarizada al suroeste peninsular, donde se producen cerca del 94% de las 400.000 toneladas anuales, siendo la provincia de Huelva donde se centra la mayor parte de esta producción, con 388.000 toneladas anuales. Sin embargo, la fase productiva viene precedida por una fase de propagación,



Figura 7. *Fragaria x ananassa*

que se realiza en las zonas del sur del río Duero, donde los inviernos fríos favorecen el desarrollo de estolones que posteriormente serán trasplantados a las zonas de

producción en el suroeste peninsular (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016).

2.5 Zanahoria.

Daucus carota L. es una planta anual o bienal cultivada como anual, alógama autocompatible de hasta 1,6 m de altura, con la raíz napiforme o fusiforme cilíndrica, cónica o redondeada, blanquizca, amarillo rojiza o anaranjada, con los tallos solitarios, cilíndricos, erectos, estriados e hispídos y muy ramificados. Hojas oblongas con los segmentos lineares lanceolados y pecíolos ensanchados en la base y de 3-10 cm. Cada segmento tiene entre 3 y 7 pares de folíolos más uno terminal. Flores con pedicelos de 3-10 mm en umbelas con hasta 20 umbélulas sobre un pedúnculo de 25-60 cm. Pétalos blancos, amarillos, rosados o púrpúreos y acuminados. Las semillas ovoideas, de pequeño tamaño, espinosas y de color amarillo grisáceo o pardo grisáceo, son aromáticas y puede obtenerse de ellas un aceite esencial (Fig. 8). El cultivo se puede realizar durante todo el año siendo independiente del fotoperiodo y precisando 75 y 220 días para completar su ciclo. Presenta sensibilidad a temperaturas bajas después de la nascencia y al final del ciclo, produciendo anomalías en la raíz o induciendo la floración, siendo las temperaturas óptimas de desarrollo entre 20 y 27°C. La raíz lignifica cuando se produce la subida de la flor por lo que pierde su valor comercial (Stein y Nothnagel 1995).

España es uno de los principales exportadores de esta hortaliza a nivel europeo, su producción supera las 400.000 toneladas anuales, repartida principalmente entre Castilla y León y Andalucía que acaparan el 90% de la producción nacional, de la que cerca del 95% se destina a exportación en fresco. La producción en Castilla y León se localiza en la zona al sur del río Duero en las provincias de Segovia y Valladolid, donde los suelos arenosos de la Tierra de Pinares posibilitan unas condiciones óptimas de cultivo.



Figura 8. *Daucus carota*

2.6 Lechuga.

Lactuca sativa L. es una planta anual y autógama, perteneciente a la familia *Compositae*. La raíz es pivotante, corta y con ramificaciones, y no suele sobrepasar los 25 cm de profundidad. Las hojas están colocadas en roseta, desplegadas al principio y manteniéndose así durante todo su desarrollo en las denominadas variedades romanas, o acogollándose, más tarde, en otras variedades. El borde de los limbos puede ser liso, ondulado o aserrado (Fig. 9). Presenta tallo cilíndrico y ramificado con inflorescencia en capítulos florales amarillos dispuestos en racimos o corimbos. Las semillas están provistas de un vilano plumoso. La lechuga es un cultivo de interés culinario, y aunque su cultivo comercial cada vez se lleva a cabo más en invernaderos utilizando técnicas como el cultivo hidropónico, en muchos lugares se produce al aire libre, por lo que existen diversos trabajos que se centran en solventar los efectos producidos por estreses abióticos, como la sequía o la salinidad excesiva del suelo para mejorar su producción. De esta manera, el cultivo en invernaderos necesita el aporte de fertilizantes químicos, siendo una faceta sujeta a mejoras con la utilización de biofertilizantes.



Figura 9. *Lactuca sativa*.

La producción anual de lechuga en España ha sufrido importantes variaciones en función de la demanda exterior, variando entre 1 millón y 800.000 toneladas, con una tendencia alcista en los últimos años, situándose en 930.000 toneladas. La producción se encuentra muy dispersa por todo el país, permitiendo los diferentes climas escalonar la producción durante el año completo y dedicar cerca del 90% de la producción a la exportación. Las comunidades de Andalucía y Murcia acaparan más de dos terceras partes de la producción. En el caso de Castilla y León, se producen anualmente 15.000 toneladas, parte de ellas en etapas tempranas de desarrollo, para consumo en fresco y preparados refrigerados (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016).

3. Microorganismos en agricultura.

La agricultura es una de las actividades humanas con mayor dependencia de las condiciones ambientales y donde el suelo representa una parte determinante. Sin embargo, éste es un medio especialmente heterogéneo e influenciado por factores abióticos y bióticos (Alegria Terrazas et al. 2016). Además, desde el punto de vista de la microbiología, la biodiversidad de este bioma es extremadamente alta, siendo estimada en 20.000 especies de bacterias por gramo (Roesch et al. 2007), aunque esta cifra varía mucho en función del ecosistema y su estado de desarrollo (Fierer 2017). Han sido muchos los autores que han considerado la importancia de los microorganismos en la agricultura, algunos sin conocer su presencia, como Teofrasto (372-287 a.C), que consideraba que la mezcla de diferentes suelos mejoraba las deficiencias y sanaba el corazón del suelo (Tisdale et al. 1985). Sin embargo, su utilización y producción quedó ensombrecida con la aplicación de fertilizantes químicos durante la denominada Revolución Verde (Roy 2017), y no ha sido hasta las últimas décadas cuando el interés por los microorganismos en la agricultura ha tenido un repunte, fruto de las consecuencias ambientales que la producción y aplicación masiva de insumo químicos ha tenido en los ecosistemas (Bhardwaj et al. 2014). Actualmente la microbiota del suelo ya ha empezado a considerarse dentro del análisis global de los sistemas agropecuarios demostrando que un suelo con una correcta microbiota favorece el desarrollo de plantas más sanas capaces de captar mejor los nutrientes y hacer frente a distintas enfermedades (García-Fraile et al. 2015; Mueller y Sachs 2015). A este respecto, tienen gran importancia las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que son capaces de interactuar de forma positiva con las plantas, promoviendo el desarrollo de las mismas de forma directa e indirecta, siendo el mejor ejemplo la nodulación de leguminosas por las bacterias denominadas genéricamente *rhizobia* que llevan a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (Saleem et al. 2007; Gouda et al. 2018). En la actualidad, la utilización de biofertilizantes en agricultura es un hecho y su aplicación se encuentra extendida (Bhattacharyya y Jha 2012), aunque no todos los microorganismos son susceptibles de ser utilizados como biofertilizantes, ya que deben tener una serie de características, la primera de ellas, ser capaces de interactuar con las plantas en que se denomina rizosfera y endosfera, y, la segunda no ser patógenos para el hombre, los animales ni las plantas.

3.1. Rizosfera y endosfera.

El concepto de rizosfera comienza a utilizarse en 1904 (Hitlner, 1904) y hace referencia al volumen de suelo circundante de la raíz de las plantas y que se encuentra bajo su influencia (Kumar et al. 2013). Esta influencia se manifiesta en una serie de cambios físicos y bioquímicos, así como en la actividad de los microorganismos debido a la producción de diferentes metabolitos (Badri et al. 2009). Este fenómeno de establecimiento de una microbiota rica en la rizosfera bajo la influencia de nutrientes secretados por la raíz se conoce como “efecto rizosfera” (Sethia et al. 2015).

La comunidad microbiana en la rizosfera alberga miembros que ejercen efectos nocivos o beneficiosos en las plantas. Los microorganismos que afectan adversamente el crecimiento y la salud de las plantas son los hongos patógenos, los oomicetos, las bacterias patógenas y los nematodos, mientras que los microorganismos beneficiosos incluyen los hongos endo- y ectomicorrícicos y las rizobacterias estimulantes del crecimiento vegetal (PGPR o PGPB) (Mendes et al. 2013; Schmid et al. 2018).

La rizosfera es un medio dinámico y su microbiota depende de múltiples factores como es la edad de la planta, encontrándose en edades tempranas del desarrollo un predominio de microorganismos de crecimiento rápido que utilizan sustratos simples y que paulatinamente van siendo sustituidos por microorganismos de crecimiento más lento con capacidad para degradar compuestos más complejos (Verbon y Liberman 2016). También puede verse afectada por características propias del suelo (Ibekwe et al., 2010), cambios estacionales y diferentes prácticas agronómicas como el riego, la labranza o la fertilización (Pérez-Jaramillo et al. 2016; Yu et al. 2015). De cualquier manera, el número de especies microbianas asociados a la rizosfera es muy elevado y aunque se han llevado a cabo numerosos estudios a lo largo del tiempo, el conocimiento de estas poblaciones se ha incrementado considerablemente en los últimos años debido a la utilización de técnicas que no precisan del aislamiento y cultivo de los microorganismos, como ocurre con el análisis de ácidos grasos o la secuenciación masiva de ADN (Schmid et al. 2018). Estas técnicas han permitido conocer la estructura y composición de las comunidades de la rizosfera, así como estudiar las variaciones asociadas a los cambios de vegetación o usos del suelo entre otros (Wen et al. 2016; Sun et al. 2016).

3.2. Interacciones planta-microorganismo.

Como se deduce fácilmente de lo anteriormente expuesto, la diversidad y complejidad de la rizosfera se sustenta sobre una compleja red molecular de interacciones que variarán si se atiende a interacciones planta-mutualistas, planta-patógenos o microorganismo-microorganismo (Larsen et al. 2017).

En primer lugar, las interacciones planta-mutualistas podrían dividirse en dos subgrupos, planta-micorriza y planta-rizobacteria. El establecimiento de las simbiosis planta-micorriza comienza con la colonización de una raíz compatible mediante hifas producidas por los propágulos de hongos micorrícicos del suelo, las esporas asexuales o las raíces micorrícicas. A esto le sucede la formación de apresorios, la colonización del córtex radicular y la formación de arbusculos. Todo este proceso está mediado por un intercambio de señales moleculares que regulan el proceso, por lo que se ha sugerido que las señales derivadas de la planta se conservan en todo el reino vegetal o que se trata de una amplia gama de compuestos relacionados. Los compuestos liberados por las plantas, como los azúcares y los aminoácidos, son posibles estímulos fúngicos, pero los compuestos fenólicos, en particular los flavonoides, se conocen como componentes clave de señalización en muchas interacciones planta-microbio (Rasmann y Turlings

2016). Los flavonoides también juegan un papel determinante en la colonización planta rizobacteria, como es el caso de los *rhizobia*, que regulan la quimiotaxis y la síntesis de los genes *nod* (Peix et al. 2014). También las estrigolactonas, un grupo de lactonas sesquiterpénicas, secretadas por la planta pueden funcionar como inductores de la colonización por microorganismos (Akiyama, Matsuzaki y Hayashi, 2005; Delaux et al. 2013) y ser un factor determinante en la quimiotaxis (Sbrana y Giovannetti, 2005). Además, las bacterias de la rizosfera se relacionan entre sí a través de la síntesis de diferentes compuestos que regulan la expresión de diferentes genes en lo que se denomina *Quorum sensing* (Hartmann et al. 2014). Esta comunicación permite realizar de forma combinada diferentes acciones como la colonización o la respuesta a condiciones ambientales (Garg et al. 2014). Las señales de *Quorum sensing* difieren entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, ya que, en las primeras, las moléculas implicadas en esta comunicación son acil-homoseril-lactonas, mientras que en las segundas son polipéptidos o péptidos cíclicos (Mamani et al. 2016).

En cuanto a las interacciones planta-patógeno, éstas son mucho más complejas, respondiendo los microorganismos a estímulos mucho más variados, como diferentes azúcares, aminoácidos o lípidos (Badri et al. 2009; Berendsen et al. 2012), aunque una parte de esta interacción está compuesta por los esfuerzos de las plantas para defenderse de la infección a través de la producción de fitoanticipinas, fitoalexinas, ácido salicílico o jasmonatos (Vidhyasekaran 2015).

3.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Dentro las interacciones beneficiosas planta-microorganismo cabe destacar las que involucran a bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (del inglés Plant Growth Promotion Rhizobacteria). Este término fue acuñado en 1978 por Kloepper y Schroth (1978) para describir las bacterias del suelo que colonizan la rizosfera de las plantas, que crecen en, sobre o alrededor de los tejidos vegetales y que estimulan el crecimiento de las plantas mediante varios mecanismos. Desde ese momento, la investigación encaminada a comprender cómo estas bacterias realizan su efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas se ha incrementado constantemente, lo que ha dado lugar a la publicación de numerosos artículos. Estas bacterias ejercen su actividad mediante mecanismos muy variados, que incluyen la producción de fitohormonas, la solubilización de nutrientes o la supresión de patógenos (Pérez-Montaña et al. 2014; Santoyo et al. 2016), por lo que su empleo en agricultura presenta grandes expectativas de futuro para lograr la reducción del uso de fertilizantes químicos y el establecimiento de sistemas de producción agrícolas más sostenibles (Ahemad y Kibret 2014).

3.3.1. Diversidad microbiana.

Los ambientes rizosféricos han sido desde los inicios de la Microbiología una prolífica fuente de bacterias con capacidad para promover el desarrollo vegetal. Aunque en los últimos años el conocimiento de estas comunidades ha aumentado, las cepas de

microorganismos asociadas a la promoción del crecimiento deben presentar la cualidad de ser cultivables, permitiendo su manejo como biofertilizantes (Herrmann y Lesueur 2013). Algunos de los géneros que han demostrado tener excelentes capacidades como PGPB se muestran en la tabla 1. Además, es previsible que en los próximos años nuevos géneros y sobre todo, nuevas especies PGPB sean descubiertas, si tenemos en cuenta la tendencia seguida en los últimos años en la que el número de bacterias rizosféricas con potencial para promover el desarrollo vegetal no ha dejado de incrementarse (Carro et al. 2013; Ramírez-Bahena et al. 2014; Ramírez-Bahena et al. 2015; Liu et al. 2016; Jeong et al. 2017; Menéndez et al. 2017).

3.3.1.1. Bacterias endófitas.

Actualmente se considera que las plantas pueden “seleccionar” su microbioma para tener colonizadores bacterianos beneficiosos, incluidos los que viven en los tejidos de las plantas (Hardoim et al. 2008; Rashid et al. 2012). Desde 1884, se conoce que algunas bacterias son capaces de colonizar el interior de los tejidos vegetales desarrollando parte de su ciclo vital sin afectar al hospedador o, al menos, sin hacerlo de manera negativa (Venugopalan y Srivastava 2015). En términos históricos, esta asociación prácticamente se remonta a los inicios de la colonización terrestre por parte de las plantas, habiéndose detectado indicios de colonización micorrízica de raíces de protoplasmas en el chert de Rhynie, un yacimiento del periodo Devónico con más de 400 millones de años, lo que unido a los paralelismos entre la colonización fúngica y bacteriana, hace suponer que ambas interacciones aparecieron a la par (Parniske 2000; Tacon 2014). Aunque no hay muchas evidencias que pongan de manifiesto claramente cuáles son las ventajas que ofrece el crecimiento en el interior de la raíz en vez de hacerlo en las zonas colindantes de la misma (Rosenblueth y Martínez-romero 2006), lo que sí parece claro es que los endófitos bacterianos pueden ofrecer varios beneficios a la planta huésped, en particular la promoción del crecimiento y la protección contra los patógenos. Además, bajo ciertas condiciones ambientales, los endófitos bacterianos son capaces de comunicarse e interactuar con la planta de manera más eficiente que las bacterias rizosféricas (Mano y Morisaki 2008; Dudeja et al. 2012).

El análisis de las comunidades endofíticas ha sido objeto de estudio desde los inicios de la Microbiología con el aislamiento y obtención del primer cultivo de *Rhizobium* a partir de nódulos de leguminosas por Beijerinck, que forma parte del grupo de bacterias endófitas por antonomasia, especializadas en la simbiosis mutualista estricta con leguminosas (Peix et al. 2014). Sin embargo, los avances realizados en los siguientes años fueron pequeños y la comprensión de la verdadera naturaleza de los endófitos no comenzó hasta finales del siglo XX, cuando los estudios comenzaron a centrarse en el aislamiento dirigido de estas poblaciones que antes se consideraban residuales (Ryan et al. 2008). En la actualidad, la gran cantidad de estudios realizados, primero mediante estudios de culturómica y después, completando el conocimiento mediante estudios de metagenómica, han ayudado a entender la gran diversidad que habita en este nicho ecológico (Santoyo et al. 2016).

3.3.1.1.1. Bacterias endófitas de nódulos de leguminosas.

Tradicionalmente el nódulo de las leguminosas ha sido considerado un órgano vegetal donde las poblaciones microbianas eran si no dominadas, sí monopolizadas por los endosimbiontes fijadores de nitrógeno del grupo de los *rhizobia*. Sin embargo, en los últimos años, se ha comprobado que el nódulo contiene muchas otras bacterias y es una importante fuente de PGPB (Dudeja et al. 2012). Numerosos estudios se han centrado en el estudio de estas poblaciones, intentando dilucidar las implicaciones que tienen en el nódulo, incluyendo el proceso de fijación de nitrógeno (Lei et al. 2008; Palaniappan et al. 2010; Pini et al. 2012; Trujillo et al. 2015). En la actualidad se conoce que las especies bacterianas endofíticas acompañantes de los endosimbiontes inductores de la nodulación están dominadas por las Proteobacterias, variando el porcentaje y la proporción de alfa, beta o gamma, aunque los Firmicutes y las Actinobacterias también representan una parte importante en estas comunidades (Tabla 1) (Velázquez et al. 2013; De Meyer et al. 2015; Leite et al. 2017). Además, estas poblaciones tienen estructuras completamente diferentes a los suelos circundantes, por lo que el nódulo está actuando como factor selectivo frente a las poblaciones de la rizosfera, reduciendo el número total de géneros presentes, así como la proporción en la que se encuentran (Trabelsi et al. 2017; Xiao et al. 2017). La estructura poblacional del nódulo también está relacionada con la especie de leguminosa, que muestra un carácter selectivo frente a los géneros que habitan en los nódulos, por lo que se puede deducir que la interacción entre las bacterias endófitas nodulares y la planta es sumamente compleja, dependiendo de factores como el suelo, la planta y el clima (De Meyer et al. 2015; Beghalem et al. 2017; Bouchiba et al. 2017).

Tabla 1. Endofitos aislados a partir de diferentes nódulos de leguminosas

Phyllum Firmicutes	Hospedador	Autores
Clase Bacilli		
Familia Bacillaceae		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017)
<i>Bacillus flexus</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Sphaerophysa salsula</i>	(Nhu 2017; Deng et al. 2011)
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Vicia faba</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Arachis hypogea</i>	(Saïdi et al. 2013; Nhu 2017; Khalifa y Almalki 2015; Subramanian et al. 2015; Hossain y Lundquist 2016)
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017)
<i>Bacillus muralis</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013)
<i>Bacillus safensis</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	(Manohari y Yogalakshmi 2016)
<i>Bacillus simplex</i>	<i>Crotolaria incana</i> , <i>Caragana jubata</i> , <i>Oxytropis ochrocephala</i>	(Aserse et al. 2013; Xu et al. 2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Cicer arietinum</i>	(Nhu 2017; Egamberdieva et al. 2017; Zhao et al. 2018)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Cicer arietinum</i>	(Egamberdieva et al. 2017; Zhao et al. 2018)
<i>Exiguobacterium indicum</i>	<i>Arachis hypogea</i>	(Wang et al. 2013)
Familia Lactobacillaceae		
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Hedyrasum naudinianum</i>	(Torche et al. 2014)
Familia Paenibacillaceae		
<i>Brevibacillus nitrificans</i>	<i>Acacia seyal</i>	(Zineb et al. 2016)
<i>Cohnella ferri</i>	<i>Caragana jubata</i> , <i>Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)

<i>Cohnella lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	(Flores-Félix et al. 2014)
<i>Fontibacillus phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(José David Flores-Félix et al. 2013)
<i>Paenibacillus castaneae</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Paenibacillus endophyticus</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Carro et al. 2013)
<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	<i>Acacia tortilis, Acacia seyal, Vigna radiata</i>	(Zineb et al. 2016; Pandya et al. 2015)
<i>Paenibacillus humicus</i>	<i>Acacia tortilis, Acacia seyal</i>	(Zineb et al. 2016)
<i>Paenibacillus lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	(Carro et al. 2014)
<i>Paenibacillus medicaginis</i>	<i>Medicago sativa</i>	(Lai et al. 2015)
<i>Paenibacillus sepulcri</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Vigna radiata</i>	(Pandya et al. 2015)
Familia Planococcaceae		
<i>Sporosarcina thermotolerans</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
Familia Staphylococcaceae		
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017)
Phylum Proteobacteria		
Clase β-proteobacteria		
Familia Alcaligenaceae		
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Egamberdieva et al. 2017)
<i>Advenella kashmirensis</i>	<i>Acacia tortilis</i>	(Zineb et al. 2016)
Familia Burkholderiaceae		
<i>Burkholderia caledonica</i>	<i>Adesmia emarginata</i>	(Gerding et al. 2017)
Familia Comamonadaceae		
<i>Diaphorobacter ruginosibacter</i>	<i>Glycine max</i>	(Wei et al. 2015)
<i>Variovorax paradoxus</i>	<i>Sulla capitata, Crotonaria incana</i>	(Beghalem et al. 2017; Aserse et al. 2013)
Familia Oxalobacteraceae		
<i>Herbaspirillum putei</i>	<i>Calopogonium mucunoides</i>	(Bautista et al. 2017)
Clase γ-Proteobacteria		
Familia Enterobacteraceae		
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Glycine max, Calopogonium mucunoides</i>	(Nhu 2017; Zhao et al. 2018; Bautista et al. 2017)
<i>Enterobacter ludwigii</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017)
<i>Enterobacter siamensis</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	(Leite et al. 2017)
<i>Enterobacter soli</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	(Leite et al. 2017)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Glycine max, Vigna mungo</i>	(Nhu 2017; Hossain y Lundquist 2016)
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
Familia Erwiniaceae		
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Vicia faba, Hedysarum spinosissimum, Sesbania sesban, Mimosa pudica, Desmodium scorpiurus</i>	(Saïdi et al. 2013; Sbabou et al. n.d.; Hossain y Lundquist 2016; Bautista et al. 2017)
<i>Pantoea brenneri</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013)
Familia Moraxallaceae		
<i>Acinetobacter baylyi</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017; Zhao et al. 2018)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Acinetobacter junii</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Glycine max</i>	(Nhu 2017)
<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Hedysarum naudinianum</i>	(Torche et al. 2014)
Familia Pseudomonadaceae		
<i>Pseudomonas baetica</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis</i>	(Xu et al. 2014)

<i>ochrocephala</i>		
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		
<i>Pseudomonas brenneri</i>	<i>Scorpiurus muricatus</i>	(Bouchiba et al. 2017)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Sulla capitata, Sulla pallida</i>	(Beghalem et al. 2017;)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala, Hedysarum spinosissimum</i>	(Xu et al. 2014; Sbabou et al. 2016)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Glycine max</i>	(Zhao et al. 2018)
<i>Pseudomonas salomonii</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
Familia Yersiniaceae		
<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013; Bahroun et al. 2018)
<i>Serratia odorifera</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013)
<i>Serratia proteamaculans</i>	<i>Hedysarum spinosissimum</i>	(Sbabou et al. 2016)
Familia Xanthomonadaceae		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Acacia nilotica, Alysicarpus nummularifolius</i>	(Zineb et al. 2016; Bautista et al. 2017)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Glycine max</i>	(Egamberdieva et al. 2016)
<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013)
Clase α-Proteobacteria		
Familia Brucellaceae		
<i>Ochrobacterium haematophilum</i>	<i>Glycine max</i>	(Zhao et al. 2018)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Acacia ehrenbergiana</i>	(Zineb et al. 2016)
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	<i>Acacia ehrenbergiana</i>	(Zineb et al. 2016)
Familia Methylobacteraceae		
<i>Methylobacterium oryzae</i>	<i>Glycine max</i>	(Subramanian et al. 2015)
Familia Rhizobiaceae		
<i>Agrobacterium albertimagni</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013)
<i>Agrobacterium deltaense</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	(Yan, Li, et al. 2017)
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala, Scorpiurus muricatus</i>	(Xu et al. 2014; Bouchiba et al. 2017)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Hedysarum spinosissimum, Acacia nilotica, Sesbania sesban</i>	(Sbabou et al. n.d.; Zineb et al. 2016; Hossain y Lundquist 2016)
<i>Rhizobium massiliae</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Rhizobium nepotum</i>	<i>Vicia faba, Scorpiurus muricatus, Sulla capitata, Sulla pallida</i>	(Saïdi et al. 2013; Bouchiba et al. 2017; Beghalem et al. 2017)
<i>Rhizobium oryzae</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
<i>Rhizobium puerariae</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2016)
<i>Rhizobium pusense</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013)
<i>Shinella granulii</i>	<i>Vicia charca</i>	(Lei et al. 2008)
<i>Shinella kummerowiae</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi et al. 2013)
<i>Shinella zoogloides</i>	<i>Enterolobium saman</i>	(Bautista et al. 2017)
Familia Phyllobacteraceae		
<i>Phyllobacterium brassicacearum</i>	<i>Hedysarum perrauderianum</i>	(Torche et al. 2014)
<i>Phyllobacterium endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Scorpiurus muricatus</i>	(J.-D. Flores-Félix et al. 2013; Bouchiba et al. 2017)
<i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	<i>Scorpiurus muricatus, Sulla capitata</i>	(Beghalem et al. 2017; Bouchiba et al. 2017)
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	<i>Caragana jubata, Oxytropis ochrocephala</i>	(Xu et al. 2014)
Familia Rhodospirillaceae		
<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Hedysarum spinosissimum</i>	(Sbabou et al. 2016)
<i>Inquillinus limosus</i>	<i>Arachis hipogea</i>	(Hossain y Lundquist 2016)
Familia Xanthobacteraceae		
<i>Labrys methylaminiphilus</i>	<i>Adesmia emarginata, Sesbania sesban</i>	(Gerding et al. 2017; Hossain y Lundquist 2016)
<i>Starkeya novella</i>	<i>Scorpiurus muricatus</i>	(Bouchiba et al. 2017)
Phyllum Bacteroidetes		
Clase Flavobacteria		
Familia Flavobacteriaceae		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Vigna radiata</i>	(Dhole et al. 2017)

<i>Flavobacterium anhuiense</i>	<i>Arachis hypogea</i>	(Wang et al. 2013)
Phyllum Actinobacteria		
Clase Actinobacteria		
Familia Corynebacteraceae		
<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i>	<i>Hedyrasum naudinianum</i>	(Torche et al. 2014)
Familia Micromonosporaceae		
<i>Micromonospora auratinigra</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
<i>Micromonospora luteifusca</i>	<i>Pisum sativum</i>	(Carro et al. 2016)
<i>Micromonospora luteiviridis</i>	<i>Pisum sativum</i>	(Carro, Veyisoglu, et al. 2018)
<i>Micromonospora phytophila</i>	<i>Pisum sativum</i>	(Carro, Veyisoglu, et al. 2018)
<i>Plantactinospora mayteni</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
<i>Verrucosipora lutea</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
Familia Micrococcaceae		
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	<i>Arachis hypogea</i>	(Wang et al. 2013)
<i>Arthrobacter tumbae</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	(Manohari y Yagalakshmi 2016)
Familia Streptosporangiaceae		
<i>Microbispora siamensis</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
Familia Steptomycetaceae		
<i>Streptomyces chartreusis</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
<i>Streptomyces luteosporus</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
<i>Streptomyces nanshensis</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)
<i>Streptomyces rapamycinicus</i>	<i>Pueraria candollei</i>	(Boonsongcheep et al. 2017)

Como se ha mencionado esta diversidad es elevada y podemos encontrar numerosos géneros asociados *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, o *Streptomyces* que son aislados con frecuencia (Palaniappan et al. 2010; Dudeja et al. 2012; Narula et al. 2013; De Meyer et al. 2015; Xiao et al. 2017). Algunos estudios de metagenómica muestran que las especies normalmente asociadas al suelo con funciones biológicas muy estudiadas, como son las bacterias sulfatoreductoras (*Desulfovibrio*, *Halothiobacillus*, *Desulfatimicrobium* o *Chlorobium*) o las metanoxidadoras (*Methylosarcina*, *Methylomonas* o *Methylobacter*) pueden encontrarse en el nódulo, pero casi como un carácter residual (Trabelsi et al. 2017). Además, aunque alguna de las bacterias encontradas presentan potencial como patógeno de plantas o humanos (Mendes et al. 2013), su número es inferior al detectado en otros ambientes como la rizosfera o el suelo en general, por lo que este nicho se postula como una excelente fuente de endófitos en la búsqueda de nuevos microorganismos con potencial PGPB (Mendes et al. 2013; Chou et al. 2017).

3.3.1.2. Aplicaciones de las bacterias endófitas.

Las posibilidades de los endófitos como bacterias PGPB son amplias y los distintos mecanismos posibles hacen que puedan ser utilizados en multitud de situaciones, sin embargo, la búsqueda de nuevos endófitos con capacidades multifuncionales no cesa y es uno de los objetivos más importantes del estudio de las comunidades endófitas de las plantas (Santoyo et al. 2016). El número de estudios se ha incrementado considerablemente en los últimos años originando una gran cantidad de

conocimiento acerca de cómo interaccionan y cuáles son los mecanismos que determinan el éxito de estas interacciones (Hardoim et al. 2008; Sessitsch et al. 2012; Menéndez, Mulas, et al. 2016), determinando así, que la inoculación con bacterias endófitas crea relaciones más estrechas con el hospedador y genera mejores resultados (Etesami y Maheshwari 2018). Las experiencias se han centrado tanto en la utilización de géneros con potencial conocido como *Azospirillum*, *Rhizobium* o *Bacillus* como en otros géneros que en los últimos años han demostrado buenas cualidades. *Azospirillum* ha mostrado ser capaz de promover el desarrollo vegetal y mejorar la producción principalmente en cultivos cereales como trigo, arroz o maíz debido a su condición de diazotrofo (Wisniewski-Dyé et al. 2011; Silveira et al. 2016). *Rhizobium* ha sido utilizado tradicionalmente como inoculante en cultivos de leguminosas, sin embargo, el efecto de su inoculación puede ser positivo en otros cultivos a través de diversos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, como cereales (Yanni y Dazzo 2015; Çakmakçı et al. 2017; Mohanty et al. 2016), hortofrutícolas (García-Fraile et al. 2012; José D. Flores-Félix et al. 2013; Flores-Félix, Marcos-García, et al. 2015; de Souza et al. 2016) o cultivos forrajeros de interés agroganadero (Gobelak et al. 2015). Las posibles interacciones de diferentes especies del género *Bacillus* con las plantas han sido ampliamente estudiadas, ya que más allá del carácter de algunas cepas como agentes de biocontrol, se ha empezado a ahondar en su capacidad para promover el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos. Estos estudios han determinado que su inoculación puede generar buenos resultados, tanto en los primeros estadios de maíz (Szilagyi-Zecchin et al. 2014) y zanahoria (Surette et al. 2003), como en etapas de producción de remolacha (Shi et al. 2010), melón (Zhao et al. 2011) y albahaca (Murugappan et al. 2013). Otros géneros como *Brevibacillus*, *Enterobacter*, *Sphingomonas* o *Paenibacillus* también han demostrado tener un efecto destacable sobre el desarrollo radicular y foliar en maíz (Mohanty et al. 2016; Szilagyi-Zecchin et al. 2014). También se ha utilizado la coinoculación de varios endófitos compatibles con el objetivo de complementar los mecanismos de ambas cepas, como por ejemplo aplicando *Pseudomonas* y *Rhizobium leguminosarum* sobre *Pisum sativum*, lo que mejora la capacidad de absorción de fósforo e incrementa la producción de biomasa aérea (Oteino et al. 2015). Resultados similares han sido observados en *Pisum sativum* y *Lens culinares* al realizar la coinoculación de *Bacillus thuringiensis* junto con *Rhizobium leguminosarum*, con incrementos en la nodulación cercanos al 80% con respecto de la inoculación simple con el endosimbionte (Mishra et al. 2009). La coinoculación de *Streptomyces* junto con *Ensifer meliloti* en alfalfa produce un incremento en la eficiencia de fijación de nitrógeno y un aumento en el número de nódulos, que se traduce en una mejora de la productividad (Le et al. 2016). Todos estos trabajos ponen de manifiesto el potencial que presenta la utilización de endófitos como biofertilizantes junto con cepas de *rhizobia*.

3.3.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

Las bacterias son capaces de promocionar el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos que implican mejora en la captación de nutrientes, puesta a

disposición de nutrientes no disponibles para la planta, producción de metabolitos secundarios, competición con bacterias patógenas u otras bacterias de la rizosfera, o la modificación de estado general de la planta (Hardoim et al. 2008; Bhattacharyya y Jha 2012). Estos mecanismos tradicionalmente se agrupan en directos o indirectos, aunque la diferencia entre ambos no es tan clara como *a priori* puede parecer. Los mecanismos indirectos, por regla general, son aquéllos que ocurren fuera de la planta, mientras que los mecanismos directos engloban aquéllos que ocurren dentro de la planta y afectan directamente el metabolismo de la misma (Goswami et al. 2016).

3.3.2.1. Mecanismos directos

3.3.2.1.1. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es el componente mayoritario de la atmósfera, pero se encuentra en forma de nitrógeno molecular (N_2) y esta forma química no es asimilable por las plantas. El cambio químico de nitrógeno molecular a formas asimilables por los seres vivos se denomina fijación biológica de nitrógeno. Este proceso requiere de la enzima nitrogenasa, que en realidad es un complejo enzimático, que está compuesto por dos melanoproteínas, una ferroproteína o nitrogenasa reductasa, y una molibdoferroproteína o nitrogenasa. La nitrogenasa es sumamente sensible a la presencia de oxígeno, que inactiva su función, por ello muchas bacterias sólo sintetizan esta enzima a tensiones de oxígeno bajas. Los microorganismos que poseen nitrogenasa y son capaces de utilizarla se denominan diazotrofos y fijan nitrógeno atmosférico.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que tan solo algunos organismos procariontes pueden llevar a cabo. Puede ocurrir en organismos fotótrofos de vida libre como las cianobacterias *Nostoc* y *Anabaena*, capaces de fijar nitrógeno en estructuras especializadas denominadas heterocistos (Santi et al. 2013) y algunas bacterias de los géneros *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas* (Upadhyay et al. 2012; Kantachote et al. 2016). También tiene lugar en organismos quimiótrofos diazotrofos, que pueden ser anaerobios, como *Clostridium* o *Desulfovibrio*, anaerobios facultativos como *Citrobacter* y *Enterobacter* (Bellenger et al. 2014), que fijan nitrógeno únicamente cuando se encuentran en condiciones de anaerobiosis, o en aerobiosis estricta, como *Azotobacter* y *Azospirillum*, que fijan nitrógeno en aerobiosis y están presentes en el suelo y asociadas con la rizosfera de cereales (Wisniewski-Dyé et al. 2011; Kalaiarasi y Dinakar 2015).

La diazotrofia también es llevada a cabo por organismos en simbiosis, en las que las bacterias entran en el interior de la planta, colonizándola como endófitos o endosimbiontes. Por norma general, el hospedador es una Espermatofita, pero en el caso de la asociación *Azolla-Anabaena* el macrosimbionte o anfitrión es una Pteridofita, y el organismo fijador de nitrógeno es una cianobacteria (Peter, 1977). La importancia de esta asociación ha sido relevante a lo largo de la historia del planeta en el denominado evento *Azolla*, un enfriamiento global que tuvo lugar a mediados del periodo Eoceno,

hace unos 48,5 millones de años, por el crecimiento descontrolado de este helecho, (Speelman *et al.*, 2009). Actualmente esta asociación es aprovechada por el ser humano, ya que *Azolla* crece en los campos de arroz, y tras su muerte, los restos se depositan en los campos suministrando nitrógeno a la cosecha de arroz del año siguiente (Yadav *et al.* 2014).

En la fijación biológica de nitrógeno por bacterias en plantas podemos distinguir la que se lleva a cabo en dos tipos diferentes de asociaciones. Una simbiosis no estricta en la que las bacterias se introducen en los espacios intercelulares comportándose como endófitos y fijando allí el nitrógeno atmosférico, como ocurre con múltiples especies de bacterias en las raíces de arroz, como es el caso de *Acetobacter peroxydans*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azoarcus indigens*, *Azorhizobium caulinodans*, *Bulkholderia cepacia*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fulva* y *Sphingomonas paucimobilis* (Hironobu y Hisao, 2008). Este tipo de asociación también ha sido descrita en especies de vegetales como en la piña y el plátano con una especie de *Burkholderia* (Cruz *et al.*, 2001). También se han aislado de raíces de trigo cepas del género *Azorhizobium* capaces de fijar nitrógeno (Sabry *et al.*, 1997). Otro ejemplo es la caña de azúcar, donde se han encontrado varias especies de bacterias como *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum sp.*, habiéndose encontrado este último género también formando asociación con alubia, sorgo y palmeras (James, 1999; Pereira *et al.*, 1988; Reis *et al.*, 2000; Valverde *et al.*, 2001; Monteiro *et al.* 2012)).

El otro tipo de asociación, más estricto, es la simbiosis mutualista donde las plantas forman unas estructuras especializadas denominadas nódulos. Este tipo de simbiosis es la que se establece entre los *rhizobia* y las leguminosas (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995), *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y la no leguminosa *Parasponia* (Trinick, 1979), el género *Frankia* con las plantas actinorrícicas (Wall, 2000), y las cianobacterias con las cicadáceas y el género *Gunnera* (Lindblad *et al.*, 1991; Guevara *et al.*, 2002) (Figura 10).

En la asociación entre cianobacterias y *Gunnera*, el género responsable de la fijación de nitrógeno es *Nostoc*, ocurriendo esta fijación en unas glándulas especiales de los rizomas de la planta (Santi *et al.* 2013). En las Cicadáceas, los géneros con capacidad para establecer relación simbiótica con cianobacterias, son *Bowenia*, *Cycas*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Macrozamia*, *Stangeria*, *Zamia* y las cianobacterias involucradas en esta simbiosis son *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Spirulina*, *Oscillatoria* y *Rivularia*. La infección provoca la formación de unas estructuras especiales en las raíces de las Cicadáceas, denominadas raíces coraloides (Figura 11), dentro de las cuales crecen las cianobacterias (Kulasooriya y Magana-Arachchi 2016).



Figura 10. Algunos ejemplos de diazotrofia simbiótica planta-microorganismo. a) *Gunnera*-cianobacterias, b) *Cycadaceae*-cianobacterias, c) Plantas actinorrícicas-*Frankia* y d) *Rhizobia*-leguminosa.

El modelo de la nodulación de *Parasponia* por parte de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es singular, ya que el género *Parasponia* es filogenéticamente próximo a los géneros de plantas actinorrícicas, sin embargo, puede ser nodulado por especies del género *Rhizobium*, que a su vez tienen capacidad para nodular a diferentes especies de leguminosas, y *Bradyrhizobium*. Se ha demostrado que cuando es *Rhizobium* quien nodula, la actividad de la enzima nitrogenasa es inferior (en torno a 2 ó 3 veces) a la que muestran las mismas cepas en plantas leguminosas, y en el caso de *Bradyrhizobium* se generan nódulos de morfología anormal, que en muchos casos no tienen capacidad para fijar nitrógeno (Vessey et al. 2005; Sprent et al. 2013; Sprent et al. 2017).



Figura 11. a) Raíces coraloideas de *Cycas revoluta*. b) Corte transversal de una raíz coraloide.

En la simbiosis establecida entre el género de actinobacterias *Frankia* y las plantas actinorrícicas, se pueden formar tres tipos de estructuras celulares: filamentos, esporangios multiloculares y vesículas, y es en estas últimas estructuras donde ocurre la fijación de nitrógeno. Habitualmente las plantas actinorrícicas son árboles o arbustos pertenecientes a las familias Myricaceae, Betulaceae, Casuarinaceae, Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariaceae y Datisceae siendo el género *Datisca* la única planta actinorrícica conocida de porte herbáceo. La infección ocurre de dos formas, dependiendo de la especie de la planta, de manera intracelular, causando deformación en los pelos radicales, o de forma intercelular, de manera que los filamentos de *Frankia* crecen a través de las células de la epidermis hasta llegar al parénquima de la planta. En ambos casos la infección produce divisiones celulares a nivel del periciclo, donde se forma un órgano nuevo de organización similar a la de una raíz lateral, el nódulo actinorrícico. Filamentos de *Frankia* procedentes del prenódulo o de la zona de infección colonizan algunas células del córtex del nódulo, provocando un crecimiento de estas células y una posterior colonización de la bacteria.

El crecimiento de los nódulos es indeterminado y el meristemo apical produce continuamente nuevas células que progresivamente se diferencian y son colonizadas por *Frankia*. Los nódulos también se ramifican, formando estructuras esféricas. Anatómicamente, estos nódulos se pueden diferenciar de los nódulos de leguminosas, además de por el tamaño, porque existe un tejido vascular central y un tejido infectado periférico, al contrario que en leguminosas (Pawlowski y Demchenko 2012).

El último tipo de simbiosis diazotrófica es la establecida entre los *rhizobia* y las leguminosas. En este caso la morfología del nódulo es diferente a la de las plantas actinorrícicas pues se organiza en torno a un tejido central donde se ubican los simbiosomas, unos orgánulos donde se realiza la fijación de nitrógeno, y a su alrededor se desarrolla el tejido vascular. Así la formación del primordio nodular ocurre de

diversas formas originándose nódulos determinados e indeterminados (Vessey *et al.*, 2005).

La familia Leguminosae o Fabaceae se divide en tres subfamilias donde la mayoría de las especies de las subfamilias *Faboideae* y *Mimosoideae* en las que se ha estudiado la capacidad de nodulación, son capaces de establecer simbiosis con *rhizobia* (Afkhami *et al.* 2018) formando nódulos radicales, generalmente, y caulinares, ocasionalmente. En la subfamilia *Caesalpinoideae* se han encontrado nódulos en pocos de los géneros estudiados, aunque se desconoce cuál es la razón, si la ausencia de *rhizobia* compatibles o la ausencia de capacidad por parte de la planta (Kumar *et al.* 2013).

3.3.2.1.1.1. Los *rhizobia*.

La familia *Rhizobiaceae* ha incluido tradicionalmente a los géneros de bacterias capaces de formar nódulos en leguminosas, desde el aislamiento de *Bacillus radicola* por Beijerinck en 1888, que posteriormente fue reclasificado en el género *Rhizobium*. La edición de 1984 del Manual de Bacteriología de Bergey incluía 4 géneros dentro de esta familia, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Phyllobacterium*. Sin embargo, el empleo de técnicas moleculares basadas en la amplificación del gen ribosómico 16S supuso un cambio en la organización y número de familias que incluyen bacterias capaces de formar nódulos en leguminosas. Actualmente la familia *Rhizobiaceae* incluye a los géneros *Rhizobium*, *Ensifer* y *Shinella*, *Hyphomicrobiaceae* al género *Azorhizobium*, *Bradyrhizobiaceae* al género *Bradyrhizobium* y *Phyllobacteraceae* a los géneros *Phyllobacterium* y *Mesorhizobium* (Velázquez *et al.* 2017). La taxonomía de *rhizobia* ya no se basa en caracteres incluidos en regiones móviles del genoma y se apoya sobre genes universalmente utilizados en la taxonomía de bacterias, evitando así los problemas que se plantearon cuando se empezaron a aislar bacterias de este grupo que no presentaban capacidad para nodular (Ormeño-Orrillo *et al.* 2015). Este ha sido el caso de los recientemente descritos *Pseudorhizobium*, aislado a partir de ambientes marinos (Kimes *et al.* 2015) y *Ciceribacter*, aislado a partir de la rizosfera de *Cicer arietinum* en la India, que no han mostrado capacidad para nodular (Kathiravan *et al.* 2013).

La familia *Rhizobiaceae* ha sufrido numerosos cambios en los últimos años con la división del género *Rhizobium* en varios géneros (Tabla 2), tras la descripción de los nuevos géneros *Pararhizobium* y *Neorhizobium* y la recuperación de antiguos géneros como *Agrobacterium* y *Allorhizobium*. Todos ellos junto a *Ensifer* y *Shinella* conforman hoy día la familia *Rhizobiaceae* (Velázquez *et al.* 2017). La familia *Phyllobacteraceae* actualmente está formada por varios géneros entre los cuales sólo *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium* y *Aminobacter* incluyen especies con la capacidad de nodular leguminosas (Tabla 2) (Carareto Alves *et al.* 2014; Jiao *et al.* 2015). La familia *Bradyrhizobiaceae* (cuyo nombre válido es *Nitrobacteraceae*) comprende varios géneros siendo *Bradyrhizobium* el que engloba a las especies capaces de nodular

leguminosas (Jordan 1982; Velázquez et al. 2017). Finalmente, la familia *Hyphomicrobiaceae* también incluye un solo género, *Azorhizobium*, que establece simbiosis fijadoras de nitrógeno (Velázquez et al. 2017). En la tabla 2 se recogen las nuevas especies descritas en los últimos años.

Tabla 2. Últimas especies descritas de *rhizobia*.

Especies	Fuente de aislamiento	Autores
Familia <i>Rhizobiaceae</i>		
Género <i>Rhizobium</i>		
Especies aisladas a partir de nódulos de leguminosas		
<i>R. acidisoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Román-Ponce et al. (2016)
<i>R. aegyptiacum</i>	<i>Trifolium alexandrinum</i>	Shamseldin et al. (2016)
<i>R. altiplani</i>	<i>Mimosa pudica</i>	Baraúna et al. (2016)
<i>R. ecuadorensis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribeiro et al. (2015)
<i>R. esperanzae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cordeiro et al. (2017)
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Tian et al. (2008)
<i>R. favelukesii</i>	<i>Medicago sativa</i>	Torres Tejerizo et al. (2016)
<i>R. hedysari</i>	<i>Hedysarum multijugum</i>	Xu et al. (2017)
<i>R. hidalgonense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Yan et al. (2017)
Especies aisladas a partir de otras fuentes		
<i>R. albus</i>	Aguas de lago	Li et al. (2017)
<i>R. arenae</i>	Arena	Zhang et al. (2017)
<i>R. gei</i>	Tallo <i>Geum aleppicum</i>	Shi et al. (2016)
<i>R. ipomoeae</i>	Campo de convolvulus de agua	Sheu et al. (2016)
<i>R. oryziradicis</i>	Raíces de arroz	Zhao et al. (2016)
<i>R. rhizosphaerae</i>	Rizosfera de arroz	Zhao et al. (2017)
<i>R. wenxiniae</i>	Raíces de maíz	Gao et al. (2017)
<i>R. zea</i>	Raíces de maíz	Celador-Lera et al. (2017)
Género <i>Ensifer</i> (formalmente <i>Sinorhizobium</i>)		
Especies aisladas a partir de nódulos de leguminosas		
<i>E. alkalisoli</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	Li et al. (2016)
<i>E. glycinis</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Astragalus mongholicus</i>	Yan et al. (2016)
<i>E. shofinae</i>	<i>Glycine max</i>	Chen et al. (2017)
Especies aisladas a partir de otras fuentes		
<i>E. collicola</i>	Suelo	Jan et al. (2017)
Género <i>Pararhizobium</i>		
Especies aisladas a partir de otras fuentes		
<i>P. antarcticum</i>	Agua	Naqvi et al. (2017)
<i>P. haloflavum</i>	Suelo	Shen et al. (2018)
<i>P. polonicum</i>	Agallas de portainjertos de <i>Prunus</i>	Puławska et al. (2016)
Familia <i>Phyllobacteriaceae</i>		
Género <i>Mesorhizobium</i>		
Especies aisladas a partir de nódulos de leguminosas		
<i>M. delmotii</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Mohamad et al. (2017)
<i>M. helmanticense</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Marcos-García et al. (2017)
<i>M. japonicum</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Martínez-Hidalgo et al. (2016)
<i>M. kowhainii</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al. (2016)
<i>M. newzealandense</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al. (2016)
<i>M. olivaresii</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Lorite et al. (2016)
<i>M. prunaredense</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Mohamad et al. (2017)
<i>M. sophorae</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al. (2016)
<i>M. waitakense</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al. (2016)
<i>M. wenxiniae</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang et al. (2018)
Especies aisladas a partir de otras fuentes		
<i>M. oceanicum</i>	Aguas marinas	Fu et al. (2017)
<i>M. sediminum</i>	Sedimentos marinos	Yuan et al. (2016)
<i>M. zhangyense</i>	<i>Thermopsis lanceolata</i>	Xu et al. (2018)
Familia <i>Nitrobacteriaceae</i> ('<i>Bradyrhizobiaceae</i>')		
Género <i>Bradyrhizobium</i>		
Especies aisladas a partir de nódulos de leguminosas		
<i>B. americanum</i>	<i>Centrosema macrocarpum</i>	Ramírez-Bahena et al. (2016)

<i>B. cajani</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Araújo et al. (2017)
<i>B. centrolobii</i>	<i>Centrolobium paraense</i>	Michel et al. (2017)
<i>B. centrosemae</i>	<i>Centrosema molle</i>	Ramírez-Bahena et al. (2016)
<i>B. macuxiense</i>	<i>Centrolobium paraense</i>	Michel et al. (2017)
<i>B. mercantei</i>	<i>Deguelia costata</i>	Helene et al. (2017)
<i>B. namibiense</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Grönemeyer et al. (2017)
<i>B. stylosanthis</i>	<i>Stylosanthes</i>	Delamuta et al. (2016)
<i>B. vignae</i>	<i>Vigna subterranea, Arachis hypogaea</i>	Grönemeyer et al. (2016)
Especies aisladas a partir de otras fuentes		
<i>B. brasilense</i>	Suelo	Martins da Costa et al. (2017)
<i>B. sacchari</i>	Raíces de caña de azúcar	de Matos et al. (2017)

Existen, además, una serie de géneros distribuidos en distintas familias de las clases alfa y beta Proteobacteria con capacidad para nodular como *Devosia* (*Hyphomicrobiaceae*), *Methylobacterium* y *Microvirga* (*Methylobacteraceae*), *Ochrobactrum* (*Brucellaceae*), *Burkholderia* y *Cupriavidus* (*Burkholderaceae*). Esta capacidad está demostrada y confirmada mediante la amplificación de genes simbióticos, particularmente aquéllos involucrados en el proceso de nodulación (Velázquez et al. 2017b).

3.3.2.1.1.2. Proceso de infección.

Los *rhizobia* tienen la peculiaridad de entablar simbiosis mutualistas con distintas plantas leguminosas que culminan en la formación de órganos especializados donde se fija nitrógeno atmosférico (Gualtieri y Bisseling 2000). Este proceso precisa de una serie de mecanismos moleculares de reconocimiento e interacción sumamente específicos que determinan el rango de hospedador y de simbionte, generando también una serie de peculiaridades inherentes al proceso de reconocimiento, colonización y simbiosis (Broughton y Perret 1999; Peix et al. 2014). Esta etapa de simbiosis culmina en la formación de simbiosomas, estructuras específicas donde la bacteria se engloba dentro de las estructuras celulares y se especializa en la función de fijar nitrógeno atmosférico. En el caso de plantas actinorrícicas, este proceso no alcanza tal grado de complejidad y termina en la creación de invaginaciones o canales dentro del interior de las células de las plantas donde se localizan las bacterias (Wall 2000; Remigi et al. 2016). Distintos estudios han analizado el grado de evolución de esta interacción mostrando que los primeros estadios evolutivos pueden observarse en las plantas actinorrícicas, con un desarrollo nodular más básico, seguido por las de la familia Caesalpinoideae con *Rhizobium*, donde no todas las especies han mostrado poder ser noduladas, y las de la subfamilia Mimosoidae que presenta un rango de endosimbiontes más amplio y, siendo las más evolucionadas las de la familia Fabaceae, donde existen diferentes organizaciones nodulares (Andrews y Andrews 2017).

El proceso de infección se inicia en la etapa de reconocimiento entre la planta y la bacteria, que comienza con la producción de flavonoides por parte de la planta, que inducen la transcripción de los genes *nod*. Los exudados de raíces de leguminosas tales como isoflavonoides y compuestos relacionados inducen específicamente la transcripción de genes de nodulación (*nod*, *nol*, *noe*) de los *rhizobia* estimulando la activación transcripcional de los genes *nodD* (Fig. 12). Los productos de los genes *nod* están implicados en la síntesis de factores de nodulación (factores Nod, NF) que son oligómeros de N-acetil-glucosamina unidos por enlaces β 1-4 (Streng et al. 2011). La estructura química de los factores de nodulación es crítica para el reconocimiento entre ambos componentes simbióticos, añadiendo especificidad más allá de la composición de los exudados de la raíz. Los factores Nod son reconocidos por quinasas tipo LysM de la membrana de las células epidérmicas de la raíz (LysM-RLK). Esto desencadena una vía de señalización constituida por un módulo de señalización llamado ruta simbiótica común (CSP). Esta vía fue probablemente reclutada de la simbiosis micorrízica más antigua (Parniske 2000) e incluye receptores quinasa rica en leucina (SYMRK), nucleoporinas (NUP133, NUP85 y NENA), canales iónicos (CASTOR y POLLUX), proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CCaMK), una proteína que contiene dominio de espiral en espiral (CYCLOPS), y el factor de transcripción de la familia GRAS NSP1 (Smit et al. 2005; Ibáñez et al. 2017).

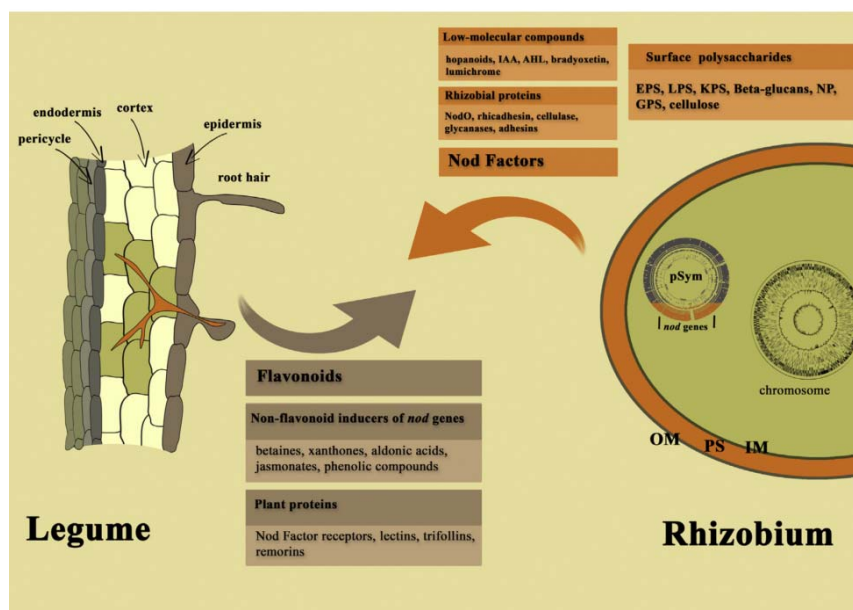
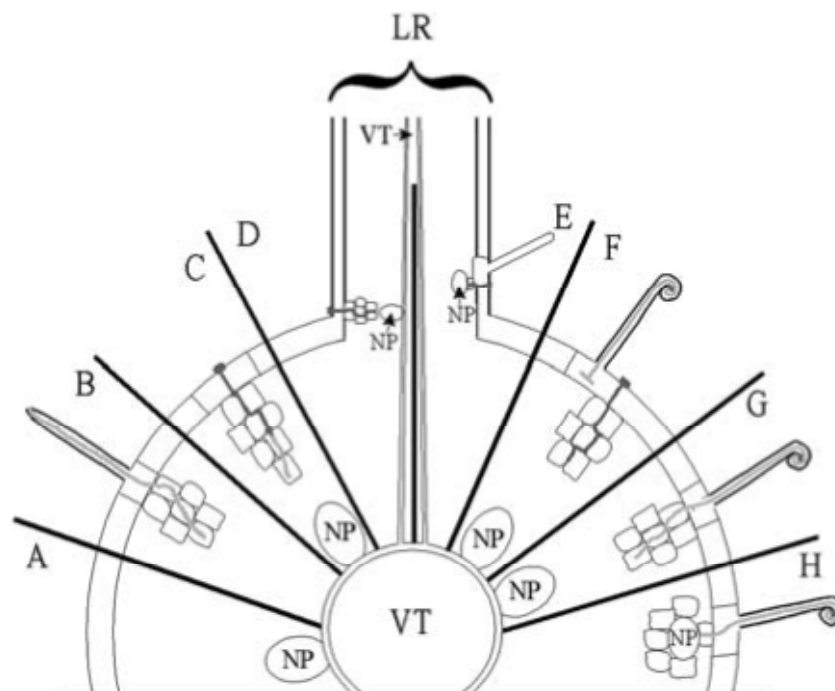


Figura 12. Proceso de reconocimiento simbiótico entre hospedador y endosimbionte mutualista. Adaptado de Janczarek et al., (2014)

También se ha sugerido el papel de la superficie celular bacteriana en el desarrollo de la simbiosis, ya que los mutantes afectados en la producción de exopolisacáridos de superficie (EPS) y lipopolisacáridos (LPS) tienen fenotipos de infección defectuosos. Se propuso que estas moléculas pueden suprimir la defensa de las plantas durante la infección (Gourion et al. 2015). Entre los EPS encontramos succinoglicanos y glucanos cíclicos que juegan un papel fundamental, pues mutantes deficientes en la producción de succinoglicano son capaces de adherirse pero no de iniciar el proceso de colonización intracelular (Kelly et al. 2013). Otro polímero que tiene un papel relevante es la celulosa, que participa activamente en la adhesión, pero al contrario que el anterior no influye en la nodulación como muestran mutantes defectivos en *celA* y *celB* implicados en la síntesis de celulosa (Williams et al. 2008). También existen una serie de proteínas implicadas en la adhesión, como las ricadhesinas, las proteínas flagelares y las lectinas



que juegan un papel determinante en la unión permanente a la raíz (Cao et al. 2017). Una vez establecida la adhesión, comienza el proceso de infección que permite a los *rhizobia* la colonización del interior de la raíz para hacer efectiva la simbiosis. Esta colonización puede llevarse a cabo utilizando los cracks o heridas, aprovechando los espacios intercelulares o creando canales de infección en los pelos radicales, pudiendo aparecer distintos mecanismos de colonización en una misma planta (Vessey et al. 2005) (Fig. 13).

Figura 13. Diferentes mecanismos de entrada de *rhizobia* en el primordio nodular.
A) Nodulación espontánea en ausencia de *rhizobia*, ocurre en algunas especies de *Medicago*. B) En algunas especies de la subfamilia Caesalpinoidae no se produce nódulo, a pesar de su permanencia de forma intracelular. C) En especies de la familia *Mimosaceae*, la infección ocurre de forma intercelular. D) Entrada por el método denominado “*crack entry*”, en las zonas de crecimiento de las raíces laterales. E) En la *Arachis hipogea*, la entrada ocurre de forma intercelular, formándose el primordio nodular en la zona exterior del cortex. F) Ocurre en dos fases, una primera donde aparece la típica

morfología de “cayado de pastor” que acaba abortando, y una segunda fase en la que la bacteria entra por vía intercelular. Es típica de especies leñosas. G) Produce morfología de “cayado de pastor” en los pelos radicales, la infección ocurre de forma intracelular y se generan nódulos de morfología indeterminada en el cortex interior de la raíz. Propio de los géneros *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium*. H) Genera una morfología similar a la anterior en los pelos radicales, sin embargo, la infección intracelular se detiene en la parte exterior del cortex donde se forman nódulos con morfología del tipo determinado (Vessey et al., 2005).

La vía canónica es aquella en la que la infección se produce a través de pelos radicales y comienza mediante la curvatura del extremo apical del pelo radical en lo que se denomina fenotipo Hac o Hair curling, también conocido como cayado de pastor (Shaw et al. 1997; Debelle et al. 1986). Este proceso está inducido por los factores Nod y da lugar a la retención de los *rhizobia* en una pequeña cavidad, comenzándose la formación del canal de infección (Li et al. 2009). Este canal de infección no es otra cosa que un compartimento tubular creado por el hospedador hacia el interior de la célula donde el endosimbionte comienza dividirse y a avanzar hacia el interior de la célula hasta atravesarla y llegar al córtex (Mateos et al. 2011^a). El proceso de elongación del canal de infección parece estar controlado tanto por la planta como por la bacteria mediante la síntesis de enzimas líticas, aunque aún no se ha determinado el grado de implicación de cada una (Mateos et al. 2011^b; Robledo et al. 2008; Robledo et al. 2012; Ferguson y Mathesius 2014). Una vez que el canal de infección llega al córtex y se forma el primordio nodular, la bacteria es exocitada del canal de infección quedando rodeada de una membrana periplasmática (Fig. 14) (Jones et al. 2007). En este punto las bacterias pasan a estado de bacteroide en un orgánulo especializado denominado simbiosoma. Es quizás este uno de los puntos donde se diferencian en mayor medida los procesos de infección de las diferentes leguminosas, en el caso de la subfamilia Caesalpinodeae al igual que en *Parasponia* no se liberan los simbiosomas, y los bacteroides quedan recubiertos de pared celular (Andrews y Andrews 2017). En el caso de aquéllos que llevan a cabo la colonización canónica, su liberación en el simbiosoma implica cambios morfológicos y genéticos como el cambio de morfología y la expresión de genes *nif* (Franche et al. 2009).

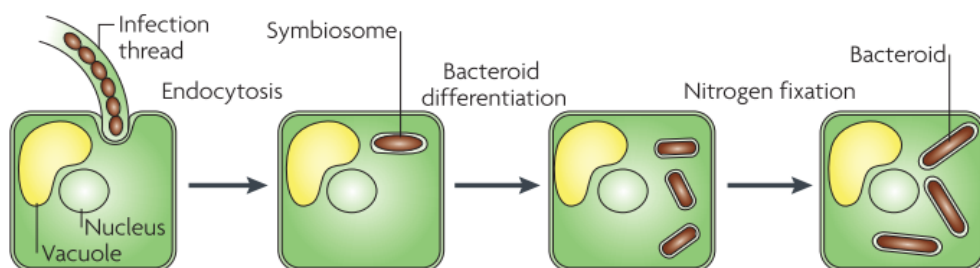


Figura 14. Diferenciación celular en bacteroides a partir del canal de infección. Adaptado de Jones et al., (2007).

A partir de este momento, la bacteria pasa a depender de las condiciones impuestas por la planta que regulará el transporte de nutrientes, la concentración de

oxígeno mediante la síntesis de leghemoglobina y el desarrollo de las estructuras nodulares (Lugtenberg 2015; Cao et al. 2017). Así en la subfamilia Fabaceae, que engloba a la mayoría de las leguminosas de climas templados, encontramos dos tipos de nódulos, nódulos determinados e indeterminados. Los nódulos indeterminados se originan a partir de las divisiones celulares en la corteza interna y tienen un meristemo persistente en su ápice. Debido a la actividad continua de este meristemo, las células de los nódulos forman un gradiente de desarrollo desde el meristemo distal hasta la inserción de la raíz proximal. Las diferentes zonas de desarrollo se pueden caracterizar por la expresión de genes vegetales específicos que pueden servir como marcadores moleculares. El tipo de nódulo determinado se origina a partir de divisiones en la corteza externa y no tiene un meristemo persistente. El meristemo de este tipo de nódulo deja de dividirse en una etapa temprana de desarrollo. Como resultado, las células de los nódulos se encuentran en una etapa de desarrollo bastante similar, aunque se ha demostrado cierta zonificación del desarrollo mediante el uso de marcadores moleculares (Gualtieri y Bisseling 2000).

3.3.2.1.1.3. Simbiovariedades

La capacidad de nodulación de las diferentes especies de los *rhizobia* estuvo ligada en un principio a la definición de especie, de modo que las especies eran definidas y nombradas en función de la leguminosa que nodulaban (Jordan y Allen, 1974). Sin embargo, el descubrimiento de que los genes simbióticos de *Rhizobium* se albergaban en plásmidos autoconjugables, que permitían su intercambio entre distintas especies, desembocó en la definición de biovar o biovariedad (Zurkowski y Lorkiewicz 1979; Jordan 1984). Fue Jordan quién utilizó por primera vez el concepto de biovar como “un grupo de cepas con capacidad para nodular unas leguminosas, pero no otras”. Esta situación se mantuvo hasta que se impuso la identificación basada en secuencia de genes ribosómicos, fundamentalmente el gen 16S, para definir las especies y géneros de los *rhizobia*. Fue en el año 2001, cuando Laguerre et al., (2001) mostraron por primera vez que las diferentes biovariedades se podían distinguir mediante el análisis filogenético del gen *nodC* y mostraron las diferencias existentes entre las filogenias construidas utilizando el gen ribosómico 16S y el gen *nodC*. Este gen está claramente relacionado con la capacidad simbiótica de los *rhizobia* debido a que codifica para una N-acetilglucosamiltransferasa involucrada directamente en la síntesis de los factores de nodulación (Chen et al. 2015). Este gen *nodC* está localizado en megaplásmidos en los *rhizobia* de crecimiento rápido, sin embargo, en los de crecimiento lento normalmente se localiza en islas simbióticas dentro del genoma y en ambos casos pueden sufrir procesos de transferencia horizontal (Rogel et al. 2011; Flores et al. 2005; Nakatsukasa et al. 2008). Por ello una misma especie puede contener diferentes biovariedades, como por ejemplo *R. leguminosarum*, que contiene tres biovariedades, *viciae*, *trifolii* y *phaseoli* (Jordan 1984; Laguerre et al. 2001; Garcia-Fraile et al. 2010), o *R. etli*, que contiene los biovares *phaseoli* y *mimosae*, que se diferencian en la habilidad para nodular diferentes hospedadores (Wang et al. 1999.), *R. pisi* y *R. bangladeshense* pueden contener los biovares *viciae* y *trifolii* (Robledo et al. 2012; Marek-Kozaczuk et

al. 2013; Shamseldin et al. 2016) y *Ensifer meliloti* los biovares meliloti, medicaginis y rigiduloides (Villegas et al. 2006; Gubry-rangin et al. 2013). El gen *nodC* se convirtió en la herramienta fundamental para estudiar el rango de hospedador de los *rhizobia* y el grado de promiscuidad de las leguminosas (Peix et al. 2014; Velázquez et al. 2017), pero sobre todo en la herramienta más utilizada para la definición de simbiovariedades, que es como actualmente se conoce a las antiguas biovariedades (Rogel et al. 2011), Aunque también se han descrito simbiovariedades en base al análisis filogenético del gen *noda* (Bailly et al. 2007), el gen *nifH* (Rincon-Rosales et al. 2013) o en la determinación de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico con leguminosas específicas (Gubry-rangin et al. 2013), actualmente las simbiovariedades se definen mayoritariamente de acuerdo a los resultados del gen *nodC* (Peix et al. 2014).

El concepto de promiscuidad de una leguminosa está relacionado directamente con el concepto de simbiovariedad y la capacidad de cada leguminosa para ser nodulada por un mayor o menor número de simbiovares (Peix et al. 2014). Las leguminosas consideradas restrictivas son aquellas que son noduladas por una única simbiovariedad como por ejemplo *Cicer*, *Pisum*, *Trifolium* o *Vicia*. Por el contrario, las leguminosas consideradas promiscuas son aquellas que son noduladas por 2 o más simbiovariedades como *Macroptilium* o *Phaseolus* (Mart 2003; Zurdo-Piñeiro et al. 2009; García-Fraile et al. 2010). Por su parte, las cepas de *rhizobia* pueden tener un rango de hospedador más o menos amplio, por ejemplo la cepa *Ensifer* sp. NGR234 es capaz de nodular más de 100 leguminosas, además de la no leguminosa *Parasponia* (Pueppke y Broughton 1999). Esto es debido principalmente a la presencia en el genoma de la bacteria de diferentes copias de los genes *nod* que permiten responder ante diferentes flavonoides y permitir la infección de distintos hospedadores (Pueppke y Broughton 1999; González y Marketon 2003; Ormeño-Orrillo et al. 2012).

El concepto antiguo de los grupos de inoculación cruzada está relacionado con el concepto actual de simbiovariedad de *los rhizobia* y de promiscuidad de las leguminosas. Por ejemplo, *Trifolium* y *Vicia* son dos leguminosas restrictivas que no pertenecían al mismo grupo de inoculación cruzada porque no podían ser noduladas por las mismas bacterias (Baldwin y Fred 1928; Velázquez et al. 2017). En efecto, las bacterias que nodulan *Trifolium* pertenecen a la simbiovariedad trifolii y las que nodulan *Vicia* a la simbiovariedad viciae. Sin embargo, *Phaseolus*, que es una leguminosa promiscua, puede ser nodulada por una simbiovariedad que sólo puede nodular *Phaseolus*, la simbiovariedad phaseoli, pero también por muchas otras simbiovariedades. Por esta razón, y conociendo la implicación de los genes *nodC* en la capacidad de nodulación de los *rhizobia* actualmente se considera el análisis de estos genes como el criterio más acertado para definir las simbiovariedades, ya que existe una base genética para diferenciarlas y existe una correlación con las leguminosas noduladas, pudiendo considerarse el mínimo estándar para la definición de una nueva simbiovariedad (Peix et al. 2014). En la actualidad el estudio de las simbiovariedades ha tomado especial relevancia debido a la información que nos aporta el estudio del gen *nodC*, ya que muestra un alto grado de conservación siendo relativamente fácil

establecer la capacidad de un aislado para determinar la capacidad de nodulación de una leguminosa en función de este gen (Ramírez-Bahena et al. 2016; Shamseldin et al. 2016; Delamuta et al. 2017). La descripción de simbiovariedades basada en el análisis del gen *nodC* es actualmente la práctica común en todos los géneros con capacidad para nodular leguminosas, y se inició en el género *Bradyrhizobium* con la definición de las primeras simbiovariedades, *genisterarum* y *glycinearum* que nodulan respectivamente, leguminosas de la tribu Genisteae y de la sub-tribu Glycineae (Vinuesa et al. 2005). Más tarde se definieron simbiovariedades en *Mesorhizobium* basándose en el análisis del gen *nodC* como ocurrió en el caso de la simbiovariedad *ciceri* (R Rivas et al. 2007). No obstante, fue en el género *Rhizobium* en el que primero se demostró, como ya se ha mencionado previamente, que el análisis del gen *nodC* permitía diferenciar las antiguas biovariedades *viciae*, *trifolii* y *phaseoli* (Jordan 1984) dentro de la especie *R. leguminosarum* (Laguerre et al., 2001). Estas simbiovariedades no están adscritos a una única especie, por ejemplo la simbiovariedad *trifolii* existe no sólo en la especie *R. leguminosarum*, sino también en *R. bangladeshense* y *R. aegyptiacum* (Shamseldin et al. 2016) y en *R. pisi* (Marek-Kozaczuk et al. 2013). La simbiovariedad *viciae* existe además en *R. pisi*, *R. anhuiense* y *R. laguerreae* (Zhang et al. 2015; Sánchez et al. 2014; Taha et al. 2018; Saïdi et al. 2014). Finalmente, la simbiovariedad *phaseoli* existe en numerosas especies del género *Rhizobium*, algunas de ellas de reciente descripción como *R. acidisoli*, *R. hidalgonense* y *R. esperanzae*, todas ellas descritas en América y aisladas a partir de nódulos de *P. vulgaris* (Román-Ponce et al. 2016; Yan, Yan, et al. 2017; Cordeiro et al. 2017). Además esta leguminosa es nodulada por otros simbiovares que se describieron también hace muchos años, como las simbiovariedades *giardinii* y *gallicum* (Amarger et al. 1997). En los últimos años se han descrito más de veinte simbiovariedades en prácticamente todos los géneros de *rhizobia* siendo actualmente tan relevante la descripción de una simbiovariedad como de una especie (Velázquez et al. 2017).

3.3.2.1.2. Solubilización de fosfato.

La mayoría de los suelos son deficientes en formas solubles de fósforo, siendo el segundo nutriente más utilizado por las plantas, por detrás del nitrógeno. Incluso en suelos ricos en fósforo, la porción utilizable por las plantas es sumamente baja (0,1%) (Stevenson and Cole 1999). Por ello, los fertilizantes químicos contienen formas solubles de fósforo, que son incorporadas a los cultivos con la intención de maximizar su productividad. Sin embargo, una gran parte de las formas solubles incorporadas con los fertilizantes precipita en el suelo a formas poco solubles como CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, en suelos básicos, y FePO_4 y AlPO_4 , en suelos ácidos, que pueden ser consideradas como no disponibles para las plantas. Debido a esto, los agricultores añaden fertilizantes en exceso, lo que crea problemas de índole medioambiental y económica por la liberación al medio natural de grandes cantidades de nutrientes y por el sobrecosto que los agricultores soportan. Además, el proceso tradicional de producción de fertilizantes fosfatados requiere un gran consumo de energía, por dos motivos principales, por la

utilización de ácido sulfúrico en su producción y porque durante dicha producción se mantiene una temperatura elevada (Vassilev y Vassileva 2003).

Las bacterias que solubilizan fosfato se conocen comúnmente como PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria). El principal mecanismo utilizado por los microorganismos para solubilizar fósforo mineral es la producción de ácidos orgánicos, como el ácido acético, glutámico, succínico, málico o 2-ketoglucónico (Goswami et al. 2016) (Fig. 15) y otros ácidos como el sulfídrico, nítrico y carbónico, mientras que las fosfatasas ácidas como fosfodiesteras y fosfotriesterasas, juegan un papel importante en la mineralización del fósforo orgánico en el suelo (Meelbod *et al.* 2009). De esta manera, el fosfato del suelo pasa a iones monobásico (H_2PO_4^-) y dibásico (HPO_4^{2-}) de fosfato soluble.

Los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* se conocen desde hace años por ser PSB (Rodríguez et al. 2006), pero hay que tener en cuenta que *Pseudomonas* se ha dividido en muchos géneros posteriormente, y por lo tanto muchos de estos géneros son también solubilizadores de fosfato. Uno de los ejemplos más significativos es *Burkholderia vietnamitensis*, tiene capacidad para generar formas solubles de fosfato en espacios de tiempo relativamente cortos superando con creces a otras bacterias solubilizadoras como *Pseudomonas agglomerans*, y también para generar las mismas formas utilizables en casos de estrés salino, pudiendo generar hasta 600 mg de fósforo soluble por litro, en diferentes condiciones de salinidad (Park *et al.*, 2010). Y uno de los más activos solubilizadores de fosfato es el género *Acinetobacter*, más estudiado como acumulador de fosfato y muy utilizado en bioreactores para eliminar fosfatos del agua (Marra et al. 2015; Moreno-Ramírez et al. 2015; Kaur y Ghosh 2015). En los últimos años, las bacterias ácido lácticas han mostrado tener un importante potencial en la solubilización de fosfato debido a su metabolismo acidogénico como *Lactobacillus paracasei* (Giassi et al. 2016; Lamont et al. 2017)

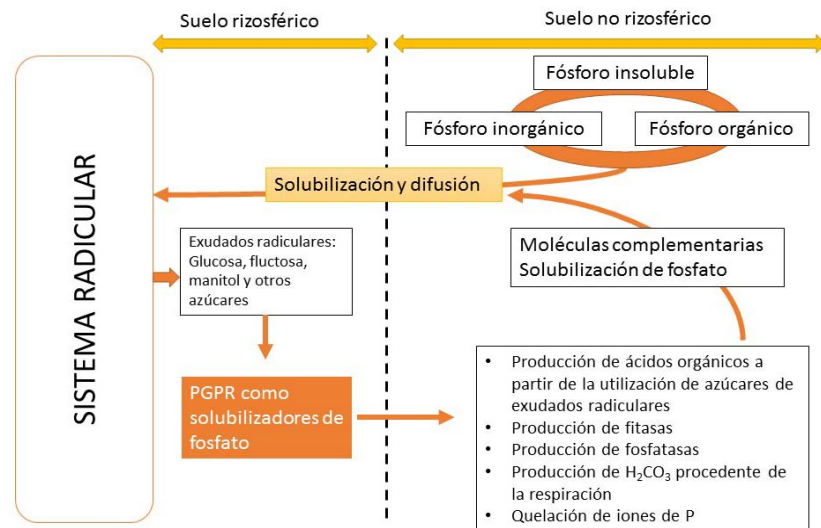


Figura 15. Mecanismos de solubilización de fósforo en la rizosfera. Adaptado de Goswami et al. (2016).

Muchos de los experimentos realizados en plantas con bacterias solubilizadoras de fósforo se han llevado a cabo utilizando coinoculaciones de dos bacterias diferentes en leguminosas, una de ellas con capacidad para formar nódulos y fijar nitrógeno atmosférico, y otra, con capacidad para solubilizar fósforo. Por ejemplo, la coinoculación de soja con *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas striata* incrementa el peso seco de los nódulos generados y el rendimiento en materia seca (Wasule *et al.*, 2003). También la coinoculación de *Medicago sativa* con *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* y *Bacillus sp.* o *Pseudomonas sp.* incrementaron sensiblemente el peso seco de las raíces y los tallos, la superficie de las raíces, así como la cantidad de nódulos y la actividad de la enzima nitrogenasa (Guiñazú *et al.* 2010).

3.3.2.1.3. Producción de sideróforos.

El hierro es un elemento requerido por las plantas en la síntesis de clorofila y forma parte también de los citocromos, que participan en la respiración celular, siendo un importante co-factor en múltiples reacciones enzimáticas. Su deficiencia causa zonas amarillentas o blanquecinas entre los nervios foliares, que conducen a la muerte de los tejidos de las hojas y su exceso causa el bronceado de las hojas, caracterizado por la aparición de pequeñas manchas marrones (Epstein y Bloom, 2005). Normalmente, en ambientes en presencia de oxígeno y a pH adecuado para el desarrollo de la mayoría de las plantas, el hierro es insoluble y se encuentra en forma de oxihidróxidos de hierro, siendo el Fe³⁺ disponible insuficiente para satisfacer la demanda de las plantas. También en suelos con pH básico, el el Fe³⁺ disponible es insuficiente para mantener un desarrollo óptimo de las plantas (Masalha *et al.*, 2000). De esta manera, en la mayoría de los suelos, a pesar de que la cantidad de hierro es alta, éste se encuentra en forma de

óxidos e hidróxidos insolubles (hematita, goethita), por lo que la mayoría del hierro que las plantas consiguen es mediante la formación de quelatos (Mehboob *et al.* 2009).

Lankford (1937) fue el primero en nombrar y describir a los sideróforos como una familia de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (500-1000 D) excretados por microorganismos con capacidad para unirse fuertemente a iones de hierro cuya función es eliminar sus deficiencias nutricionales en lo que se refiere a este elemento (Neilands, 1981). Los grupos más comunes que se acomplejan con el hierro son los basados en el ácido hidroxámico y en el anión catecol (Raymond *et al.*, 1984), aunque hay otros compuestos como los carboxilatos, el citrato y los aminoácidos (Guerinot *et al.*, 1990, Rioux *et al.*, 1986 a, b). Algunas bacterias y hongos excretan citrato para evitar la deficiencia de hierro, pero el citrato y otros ácidos con baja afinidad por metales no deben ser considerados como sideróforos pues no existe un sistema específico de transporte de estos compuestos cuando se acomplejan con el hierro a nivel de membrana celular en los microorganismos, a diferencia de lo que ocurre con los sideróforos (Figura 16).

La secreción de sideróforos ha sido descrita en numerosas bacterias y hongos, tanto aerobios como anaerobios facultativos (Neilands *et al.*, 1987, Neilands, 1991). Las cianobacterias y las diatomeas también han sido descritas como productoras de sideróforos (Armstrong y Van Baalenc, 1979, Trick *et al.*, 1983). Algunas plantas también tienen capacidad para producir los denominados fitosideróforos, como el trigo en condiciones de deficiencia de Fe (Crowley *et al.*, 1991). Éstos fitosideróforos pertenecen a la familia del ácido mugineico y son asimilados por las células radiculares mediante un sistema específico de transporte de moléculas con alta afinidad por el Fe a nivel de membrana (Takagi, 1993).

La enterobactina es un sideróforo modelo del tipo catecol, está formada por un catecol cíclico y es producido por numerosas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Hofte, 1993). A pH inferiores a 7, su afinidad con respecto al catión Fe^{3+} disminuye en relación a los sideróforos del tipo hidroxamato. Sin embargo, a valores bajos de pH es más probable que se unan los sideróforos del tipo catecol a iones de Fe^{2+} siendo igualmente asimilables. Las micobactinas son compuestos liposolubles producidos por *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* con alta afinidad por el Fe^{3+} en el interior de la célula. Están implicados en el almacenamiento y transporte de hierro (Ratledge, 1982), por lo que al no contribuir a disminuir las deficiencias de este elemento para el microorganismo no se consideran auténticos sideróforos. Lo mismo ocurre con la agrobactina de *Agrobacterium tumefaciens* (Winkelmann, 1991) y la anguibactina de *Vibrio anguillarum* (Fig. 16) (Actis *et al.*, 1986).

Los sideróforos del tipo hidroxamato contienen uno, dos o tres grupos N-hidroxiaminoácido acílicos que forman mono, di o trihidroxamatos. En la formación del hidroxamato férrico el protón del ácido hidroxámico es desplazado por el ión Fe^{3+} (Emery, 1978), por lo que el pH determinará el número de grupos ligando activos para

unirse con el Fe (Neilands, 1981). Se han descrito numerosos sideróforos de este tipo habiéndose detallado además subgrupos en función de su estructura química, siendo los principales los ferricromos, los coprogenos, las fusarininas y las ornibactinas, producidos tanto por hongos como *Penicillium* (Emri et al. 2013) como por bacterias como *Burkholderia* (Deng et al. 2017).

Las pioverdinas o pseudobactinas son sideróforos complejos que emplean tres diferentes ligandos para unirse al Fe^{3+} . Todos ellos contienen un cromóforo unido a una cadena peptídica. El grupo catecol del cromóforo, junto con el grupo hidroxamato y otro más, que puede ser otro hidroxamato o un grupo hidróxido, proporcionan el trío de ligandos que unen al Fe^{3+} (Hofte, 1993). Este tipo de sideróforos son producidos principalmente por el género *Pseudomonas* como *P. fluorescens* (Trapet et al. 2016).

Los sideróforos del grupo carboxilato emplean estos compuestos, denominándose policarboxilatos, como agentes quelantes. Como ejemplos representativos podemos citar a la rhizobactina de *Ensifer meliloti* (Smith et al., 1985) o la staphyloferrina de *Staphylococcus hyicus* (Konetschny-Rapp et al., 1990).

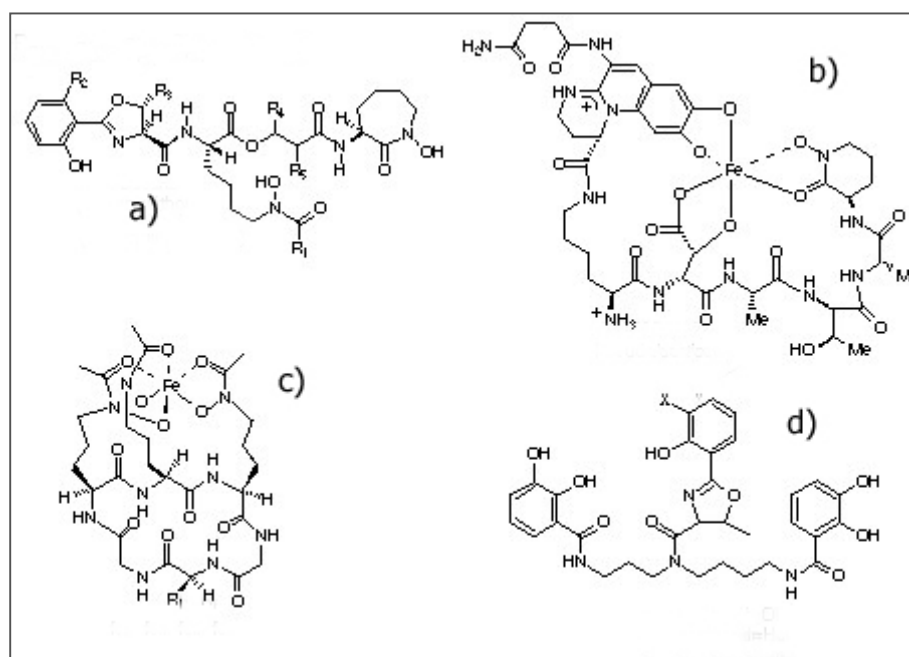


Figura 16. Tipos de sideróforos descritos. a) Micobactina. b) Pseudobactina. c) Ferricromo. d) Agrobactina (x=OH), parabactina (x=H).

3.3.2.1.4. Síntesis de fitohormonas.

La idea de unas sustancias químicas capaces de regular, coordinar y modificar la fisiología vegetal, así como su metabolismo, fue expuesta por Julius von Sachs en el siglo XIX. Propuso que estas sustancias eran capaces de actuar como mensajeros químicos, siendo responsables de la formación y crecimiento de diferentes órganos de la planta, pudiendo ciertos factores externos afectar a su distribución. Sin embargo, no conocía la identidad de estas sustancias (Kopriva 2015; Wong et al. 2015).

En la actualidad se sabe que las fitohormonas son sustancias químicas producidas en pequeñas cantidades en los tejidos vegetales y que desempeñan funciones de regulación de diversos mecanismos fisiológicos de la planta, no solo en los órganos en los que se producen, sino también en otras partes de la planta. Los procesos controlados por este tipo de moléculas, suelen depender de mecanismos de sinergia, antagonismo o de un determinado balance entre diferentes fitohormonas, y, del mismo modo, una fitohormona puede intervenir en diversos fenómenos (Wong et al. 2015). Hay cuatro grupos principales de fitohormonas, auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno, aunque no son las únicas, ya que otras como el ácido abscísico o el jasmonato tienen importantes papeles en la regulación del ciclo vegetal (Figura 17).

En lo que se refiere a las auxinas, se trata de un grupo de fitohormonas cuya cualidad esencial es provocar la elongación celular en los coleoptilos y algunas secciones del tallo. De ellas, la más importante es el ácido indol-acético (IAA), que en la planta se sintetiza en los meristemas, en las hojas jóvenes, en los frutos y en las semillas. Esta sustancia tiene la capacidad de inducir la producción de raíces adventicias, produciendo el entorno necesario para el desarrollo de las bacterias de la rizosfera, por lo que numerosas rizobacterias han adquirido la capacidad de producir ácido indol-acético. Entre ellas encontramos la mayoría de las especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y algunas especies de los géneros *Azorhizobium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus* y *Burkholderia*, así como otros géneros de bacterias que habitan en la rizosfera (Basharat et al., 2009; Mehboob et al., 2009; Tsavkelova et al., 2006; Taiz y Zeiger, 2006).

Las giberelinas son derivados del ent-giberelano, y cumplen funciones muy diversas en las plantas. Pueden actuar en diferentes momentos del desarrollo, desde iniciar la germinación de la semilla, pasando por el cambio de etapa juvenil a adulta, hasta promover el desarrollo de los frutos. Estas fitohormonas son capaces de cambiar el fenotipo de las plantas de tallo enano, o con crecimiento en roseta, y promover la elongación del tallo. Son utilizadas comercialmente para aprovechar el incremento de frutos y la cantidad de azúcar (Taiz y Zeiger, 2006). Este tipo de fitohormonas son sintetizadas por algunas especies de *rhizobia* como *R. leguminosarum* sv. *phaseoli*, *B. japonicum* y *E. meliloti* (Melboob et al., 2009), y por algunas bacterias endófitas como *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *Bacillus pumilus* y *B. licheniformis* (Rademacher, 1994).

Las citoquininas son un conjunto de compuestos con estructura similar o derivada de la trans-zeatina, que es la citoquinina más abundante en la naturaleza. Su función en las plantas es regular la división celular en tallos y raíces, siendo capaces de regular las distintas fases en el ciclo vegetativo y reproductor de una célula, interviniendo en la fase S y en la fase G1, así como en la mitosis. Tienen estrecha relación con las auxinas, pues en función del *ratio* entre sus concentraciones se induce el crecimiento del tallo o de las raíces. Reducen también la senescencia de las hojas, favorecen el movimiento de nutrientes y el desarrollo de cloroplastos (Taiz y Zeiger,

2006). En bacterias presentes en la rizosfera, los casos estudiados no son muchos, el más conocido es la presencia en el plasmido Ti de *Agrobacterium* de una región que codifica para la biosíntesis de citoquininas. En *Bacillus megaterium* se ha demostrado su actividad utilizando distintos mutantes de *Arabidopsis thaliana*, donde utilizando dobles y triples mutantes de esta planta modelo, se demostró la promoción del crecimiento por parte *B. megaterium*, y la existencia para ello de un sistema de señalización de citoquininas exacto (Ortiz-Castro *et al.*, 2008). Timmusk *et al.* (1999) probaron la capacidad de *Paenibacillus polymyxa* para producir citoquininas en distintos medios de cultivo y optimizar su producción en planta.

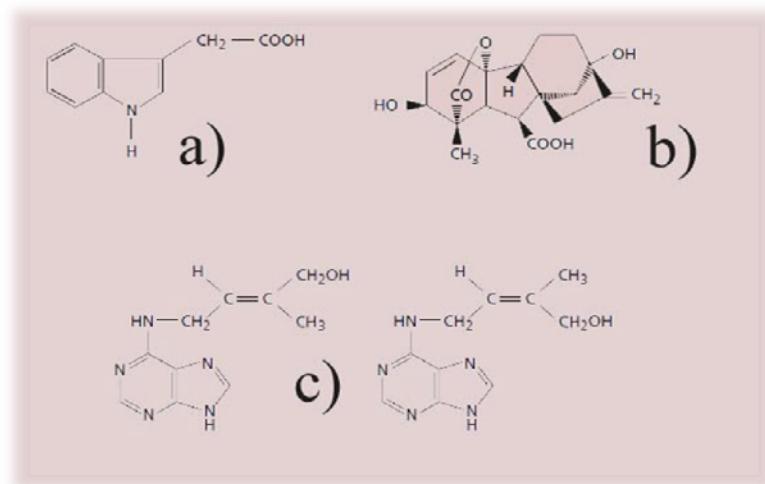


Figura 17. Ejemplo de cada uno de los principales grupos de fitohormonas sintetizados por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. a) Ácido indol-acético b) Ácido giberelínico c) trans- y cis-zeatina.

3.3.2.2. Mecanismos indirectos.

Además de los ya mencionados mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal, las PGPB pueden ejercer su acción a través de mecanismos indirectos que, sin actuar directamente sobre el desarrollo de la planta, influyen en el mismo. Estos mecanismos son el biocontrol, la reducción de la susceptibilidad a estreses, la interacción con otros microorganismos y los cambios en propiedades fisicoquímicas de la rizosfera. Muchas de las bacterias consideradas PGPB presentan mecanismos de biocontrol capaces de inhibir el crecimiento de otros organismos mediante la síntesis de metabolitos secundarios como antibióticos (Vessey y Buss 2002) o el ácido cianhídrico (HCN) (Berendsen *et al.* 2012). Estos mecanismos son comunes entre bacterias de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* o *Streptomyces*, siendo el primero un género donde numerosas especies han sido utilizadas con este fin debido a su importante potencial en la lucha frente a plagas de insectos (Armada *et al.* 2016). En la actualidad, el estudio de sustancias como los poliketidos o los péptidos no ribosomales han mostrado tener una importancia destacable en las interacciones en la rizosfera, siendo producidos por numerosos géneros de bacterias (Pratheepa *et al.* 2016; Carro, Nouioui, *et al.* 2018). Estas bacterias también son capaces de influir en el

desarrollo de otros microorganismos mediante la síntesis de diversas enzimas implicadas en la degradación de polímeros estructurales constituyentes de paredes celulares como celulasas, quitinasas o proteasas. Estas enzimas son capaces de atacar la pared celular de otros microorganismos del suelo reduciendo su crecimiento o matándolos. Estos mecanismos son comunes entre bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Sphingomonas* (Patel et al. 2012; Lugtenberg 2015). Además, el establecimiento de biofilms y la competición directa por el espacio y los nutrientes son un factor que hay que tener en cuenta, ya que la producción de exopolisacáridos, la tasa de crecimiento y la capacidad para producir sustancias quelantes de diferentes nutrientes determinan el éxito de una bacteria en la rizosfera, haciendo de su inoculación un evento exitoso o no (Goswami et al. 2016). A este respecto, la producción de exopolisacáridos es capaz de modificar las propiedades del suelo, puesto que algunos estudios han demostrado que la adición de polisacáridos bacterianos al suelo es capaz de mejorar la estabilidad y la estructura del mismo (Mehboob et al. 2009). Además, la síntesis de sideróforos puede jugar un papel destacable en la competición con hongos patógenos debido a la reducción en la concentración de hierro disponible en la rizosfera, siendo considerado por algunos autores como un mecanismo de biocontrol en sí mismo (Ahemad y Kibret 2014; Saha et al. 2016; Pan et al. 2017).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal también tienen mecanismos capaces de cambiar el estado inmune de la planta y la respuesta de la planta frente a amenazas y estreses bióticos y abióticos. Uno de estos mecanismos es la síntesis de ACC-desaminasa, una enzima involucrada en la degradación del ácido 1-aminociclopropano-2-carboxílico, precursor en la síntesis del etileno. En condiciones normales, esta fitohormona se sintetiza en condiciones de estrés abiótico, como sequía, inundación, etc., produciendo el decaimiento de los tejidos y la muerte celular. La ACC desaminasa actúa eliminando el precursor y, por tanto, evitando la síntesis del etileno (Kawasaki 2015). Este enzima parece estar presente en la mayoría de los géneros más comunes con los que se diseñan biofertilizantes, como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Rhizobium*, así como en otros géneros, cuyo interés como PGPB empieza a ser destacable como ocurre con *Paenibacillus* o *Rhodococcus* (Schwartz et al. 2013; Serova et al. 2017; Fan et al. 2012; Francis et al. 2016; Nobahar et al. 2017). Las bacterias PGPB producen sustancias capaces de producir cambios en los sistemas fisiológicos de defensa denominados Inducción de Resistencia Sistémica (ISR del inglés Induction of Systemic Resistance). Por ejemplo, algunos géneros de bacterias de la rizosfera como *Bacillus* o *Rhizobium* son capaces de producir 2,3-butanodiol, que es capaz de elicitar estados de defensa inducida en diferentes plantas, protegiéndolas frente al ataque de áfidos y patógenos vegetales (Ruzzi y Aroca 2015). Este es un ejemplo de ISR, cuyas bases moleculares no se entienden muy bien, pero están relacionadas con una mejora en la respuesta a un amplio rango de patógenos y plagas. Las rutas de adquisición de ISR pueden ser dependientes de la producción de ácido salicílico o ácido jasmónico (Glaeser et al. 2016; Grady et al. 2016), pero los cambios observados en la transcripción de los genes involucrados en la producción de

estos compuestos suelen estar relacionada con la síntesis de compuestos volátiles como dimetilhexadeciamina o 2-pentilfurano (Huang et al. 2015).

4. Taxonomía y filogenia bacteriana

Al igual que en otras disciplinas biológicas como la Botánica y la Zoología, la Microbiología precisa de la Taxonomía, que se define como la ciencia de la clasificación de los diferentes taxones o grupos de individuos que comparten una serie de características de acuerdo a dichas características. Esta clasificación hace uso de la Sistemática que, a través del estudio de múltiples factores, determina aquéllos comunes o discordantes para permitir la clasificación (Cowan, 1964). La clasificación permite la agrupación de unidades amplias de individuos que presentan características similares, facilitando su nomenclatura e identificación. En el caso de los Procariotas no existe una clasificación oficial, aunque la clasificación más aceptada es el “Esquema taxonómico de los Procariotas”, que comenzó a principios de la década de 1990 en la oficina editorial del Manual de Bergey como paso preliminar para organizar el contenido de la segunda edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Parte, 2013). De tal manera que se utilizan ciertos criterios comunes a diferentes grupos bacterianos y otros, por el contrario, propios de cada grupo particular, con un enfoque polifásico que incluye criterios genotípicos, quimiotaxonómicos y fenotípicos (Tindall et al. 2010) al igual que la secuenciación de genomas, que está demostrando ser una herramienta eficaz y avanzada que permite estandarizar la taxonomía bacteriana (Chun y Rainey 2014; Ormeño-Orrillo et al. 2015).

4.1. Criterios fenotípicos y quimiotaxonómicos.

Los criterios fenotípicos constituyen una herramienta utilizada de forma rutinaria en la clasificación de microorganismos desde los principios de la taxonomía bacteriana, ya que el fenotipo es un expresión observable del genotipo (Rossello-Mora y Amann 2001). Se basan en la descripción de caracteres como la morfología macro y microscópica, en tests fisiológicos, que determinan la capacidad para asimilar diferentes fuentes de C y/o N, en tests bioquímicos, que determinan la expresión de diversas enzimas y en el crecimiento en condiciones variables de pH, salinidad o temperatura. Algunos de estos criterios, como la movilidad de las células o la presencia de flagelos precisan de aparatos especializados y en muchos casos difíciles de interpretar por lo que es necesario establecer métodos claros y sencillos con el fin de estandarizar las diferentes pruebas bioquímicas, por ejemplo mediante la utilización de sistemas miniaturizados como los sistemas Api (Biomérieux, FR) (Tindall et al. 2010). La clasificación basada en pruebas fenotípicas, aunque útil y capaz de aportar una gran cantidad de información, puede resultar simplista en el panorama actual con miles de especies descritas. Como características complementarias también se recurre a aspectos relacionados con la composición bioquímica de la célula y sus estructuras como la composición de la pared celular o de la membrana celular, los ácidos grasos, los lípidos polares, las lipoquinonas respiratorias, el perfil de poliaminas o la composición de

ácidos micólicos (Schleifer 2009). Estas últimas características son englobadas en lo que se denominan criterios quimiotaxonómicos y tienen un alto poder de discriminación entre géneros e incluso entre especies como señalan Tindall et al. (2010), sin embargo, presentan el grave inconveniente de que dependen de las condiciones de cultivo, que han de ser cuidadosamente estandarizadas para que sean realmente útiles.

4.2. Criterios genotípicos.

Aunque los criterios fenotípicos y quimiotaxonómicos fueron utilizados durante muchos años para clasificar las diferentes especies bacterianas, el desarrollo de técnicas basadas en la utilización de ácidos nucleicos permitió mejorar notablemente la fiabilidad de las descripciones y la rapidez con la que realizaban las mismas. El desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN supuso un punto de inflexión en la taxonomía bacteriana posicionando el gen ribosómico 16S como la herramienta fundamental para la clasificación bacteriana, disponiéndose actualmente de bases de datos completas y amplias que permiten la identificación de aislados de forma rápida (Yoon et al. 2017). Este gen es universal y su grado de evolución no es muy elevado, ya que codifica un ARN esencial para la célula que tiene la misma función en todos los seres vivos. Además, la técnica de amplificación basada en la PCR y la posterior secuenciación eran relativamente fáciles de implementar (Schleifer 2009). El límite de discriminación entre distintas especies quedó marcado entre un 98,7% y un 99%, sin embargo, de acuerdo con un enfoque polifásico utilizando criterios fenotípicos, bioquímicos y genotípicos, algunas cepas parecían pertenecer a especies diferentes, por lo que se implementó el análisis de secuencias multilocus (MultiLocus Sequences Analysis, MLSA) en taxonomía bacteriana (Ramamany et al. 2014). De esta manera, la clasificación a nivel de género normalmente se lleva a cabo utilizando el gen ribosómico 16S, y a continuación se utiliza MLSA para obtener una mayor resolución entre las especies dentro de un género. Los fragmentos internos de los genes que codifican proteínas se secuencian y posteriormente se usan para construir árboles filogenéticos (Gevers et al. 2005). Dado que cada filogenia de un único gen solo refleja la evolución de este gen, puede no reflejar la relación filogenética “verdadera” de las bacterias, por ello en el MLSA las secuencias de varios genes se concatenan y los árboles filogenéticos se calculan sobre esta secuencia global. Se admite que los árboles basados en las secuencias alineadas concatenadas reflejan con mayor fiabilidad las relaciones de los taxones bacterianos. Los genes utilizados pueden ser aquéllos que codifican subunidades de enzimas ubicuas, tales como la subunidad beta de ADN girasa (*gyrB*), la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*), el factor sigma 70 (Sigma D) de la ARN polimerasa (*rpoD*), la recombinasa A (*recA*), la subunidad beta de ATP sintasa F0F1 (*atpD*), el factor de iniciación de traducción IF-2 (*infB*) y la chaperonina GroEL (*groEL*), entre otros (Glaeser y Kämpfer 2015). El número de genes utilizado varía entre 2 y 7, con tamaños de secuencias de cada gen de entre 400 y 600 pares de bases, para conseguir una resolución adecuada, siendo 97% el límite de diferenciación entre distintas especies (Aserse et al. 2012; Mousavi et al. 2014; Glaeser y Kämpfer 2015). Además, las normas actuales indican que cuando la homología del gen

ribosómico 16S es superior al 97% debe realizarse la hibridación ADN-ADN con las especies más cercanas. La diferenciación de especies precisa de que los valores de hibridación sean inferiores al 70% para que dos taxones puedan ser considerados diferentes (Rossello-Mora y Amann 2001).

En la actualidad, el desarrollo de las técnicas masivas de secuenciación genómica ha supuesto una revolución en el concepto de especie, permitiendo sustituir la técnica de hibridación de ADN-ADN por técnicas de comparación *in silico* y haciendo más eficiente el análisis de MLSA. Para ello se utilizan los Overall Genome Relatedness Indices (OGRI) dentro de los que se engloban una serie de herramientas que nos permiten hacer comparaciones utilizando la mayor información disponible dentro del genoma. Entre ellos se encuentran el Average Nucleotide Identity (ANI), la hibridación ADN-ADN digital (dDDH) o el Maximal Unique Matches (MUM), siendo los dos primeros los más utilizados (Rosselló-Móra y Amann 2015). El ANI generalmente se calcula como una identidad media de todas las coincidencias de BLASTN entre dos secuencias de genoma en las que solo se consideran coincidencias cuando hay al menos 30% de identidad en la secuencia global. Resultados de hibridación ADN-ADN superiores al 70% suelen corresponderse con valores de ANI superiores al 94-95%, situándose en este límite las especies diferentes (Kim et al. 2014; Chun y Rainey 2014). Sin embargo, al igual que las comparaciones de genes individuales, se precisa de secuencias que cubran la mayor parte del gen, siendo recomendable el gen completo. Esta técnica precisa de genomas secuenciados al menos en un 99% de su tamaño para poder aportar resultados reales, ya que de otra manera podremos encontrar desviaciones en los porcentajes de similitud que no se correspondan con la realidad (Tindall et al. 2010; Rosselló-Móra y Amann 2015). Otra técnica utilizada y requerida para la descripción de nuevas especies es la dDDH o hibridación digital de ADN-ADN. Esta técnica permite la comparación de múltiples secuencias utilizando algoritmos que calculan índices de forma homóloga a la hibridación ADN-ADN convencional, permitiendo además una alta estandarización de los datos, como el manejo de una gran cantidad de información (Auch et al. 2010).

Objetivos

Objetivos

En este estudio se ha planteado como objetivo global la identificación y el análisis de la diversidad de las cepas de *rhizobia* y de bacterias endófitas aisladas a partir de nódulos de *P. sativum* y *P. vulgaris* en dos suelos de Castilla y León y de sus capacidades para promover el crecimiento de diferentes plantas. Para cumplir este objetivo se abordaron los siguientes objetivos concretos:

1. Aislamiento de cepas de *rhizobia* y de bacterias endófitas a partir de nódulos de *Pisum sativum* cultivado en un suelo de Valladolid y de *Phaseolus vulgaris* utilizados como planta trampa en un suelo de Salamanca donde no se cultiva esta leguminosa.
2. Análisis de la biodiversidad de las cepas aisladas utilizando perfiles de RAPD e identificación a nivel de especie mediante el análisis del gen ribosómico 16S, y en el caso de las cepas de *rhizobia* de los genes “housekeeping” *recA* y *atpD*, y a nivel de simbiovariedad, en el caso de las cepas de *rhizobia*, mediante el análisis del gen simbiótico *nodC*.
3. Estudio de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de cepas seleccionadas en base al análisis de perfiles de RAPD, incluyendo producción de ácido indol acético y sideróforos, solubilización de fosfato y, en el caso de las bacterias endófitas, crecimiento en medios libres de nitrógeno.
4. Análisis de la capacidad de producción de moléculas implicadas en la colonización de las raíces de las plantas y producción de biofilms por las cepas de *rhizobia* y de las bacterias endófitas.
5. Estudio mediante técnicas de microscopía óptica de fluorescencia y confocal de la capacidad para colonizar las raíces de lechuga, fresa, zanahoria, guisante y maíz por cepas seleccionadas.
5. Análisis en condiciones axénicas en cámara climatizada y en condiciones de microcosmos en invernadero de la promoción del crecimiento de las plantas por parte de cepas seleccionadas, tanto con inoculaciones simples como con coinoculaciones de *rhizobia* y bacterias endófitas.
6. Análisis de los genomas de cepas de *Rhizobium* y *Phyllobacterium* aisladas a partir de nódulos de *P. vulgaris*.
7. Ensayos en condiciones de campo de las cepas individuales y consorcios seleccionados en el objetivo anterior sobre plantas de lechuga, fresa, zanahoria, guisante y maíz.

Materiales y métodos

1. Aislamiento de bacterias a partir de nódulos de leguminosas

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron aislados de nódulos efectivos de dos leguminosas, *Pisum sativum* L. y *Phaseolus vulgaris* L. Las plantas de guisante (*P. sativum* L.) se recolectaron en la localidad de Aldea de San Miguel (Valladolid), en la que esta leguminosa se cultiva tradicionalmente (Fig. 18). Para el aislamiento a partir de plantas de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) se utilizó la variedad “pinta” como planta trampa debido a su elevada capacidad para nodular y se utilizó suelo procedente de Pedrosillo el Ralo en la zona de la Armuña (Salamanca), con una importante tradición en la producción de legumbres como la lenteja y el garbanzo, pero donde no se siembra alubia. Las semillas de alubia se esterilizaron en superficie con hipoclorito sódico al 5% durante 20 min y se pregerminaron en vermiculita estéril durante 3 días. Las plántulas se trasplantaron a recipientes de plástico de 1 l de capacidad conteniendo el suelo recogido en Pedrosillo y se mantuvieron cuatro semanas en cámara iluminada con mezcla de luz incandescente y fluorescente (cantidad de luz de $400 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y longitud de onda de 400 a 700 nm), con un 60% de humedad relativa y programada para un fotoperiodo de 16 horas de luz diarias y temperaturas de 25°C y 17°C durante el día y la noche, respectivamente.



Figura 18. Localización de Pedrosillo el Ralo (SA) y Aldea de San Miguel (VA).

A partir, tanto de de las plantas cultivadas en el laboratorio como de las plantas recolectadas en el campo, se realizó una selección de nódulos efectivos (color interno rosado). Los nódulos se lavaron con agua para eliminar los restos de suelo, tras lo que se esterilizaron en superficie sumergiéndolos durante 2 min en una solución de HgCl_2 al 2,5%. Después, y manteniendo las condiciones asépticas, se realizaron cinco lavados con agua estéril para eliminar los restos de HgCl_2 . Posteriormente, 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 1) (Vincent, 1970). Las placas se inocularon a 28°C durante siete 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.

2. Mantenimiento y conservación de las cepas.

Las cepas para su uso rutinario se mantuvieron en YMA y/o TSA (Anexo I, tabla 2) conservándolas a 4°C. La conservación de las cepas se llevó a cabo por criopreservación a -80°C, utilizando una solución crioprotectora estéril de glicerol al 25% en criotubos de 1ml.

3. Caracterización genotípica.

3.1. Extracción y purificación de ADN.

Con el fin de extraer el ADN total, los aislados se cultivaron en medio TY líquido (Anexo I, tabla 3) durante 48 horas a 28°C. Se pasó 1 ml en un tubo eppendorf que se centrifugó a 9.000 rpm durante 3 min en una centrífuga 5417C (Eppendorf™, Alemania) a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las células se lavaron con una solución acuosa de Sarkosyl al 1%, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. Para la extracción de ADN para la amplificación de perfiles de RAPD se utilizó el método tradicional de extracción con NaOH. Las células se resuspendieron en 200 µl de una solución de NaOH al 0,05% y se incubaron durante 4 min a 95°C en termoblock (J.P-Selecta™, España) para que se produjera la lisis celular, a continuación, se añadieron 300 µl de agua destilada esteril y se centrifugaron las muestras a 6000 rpm durante 4 min, recogiendo 200 µl del sobrenadante. Para la extracción del ADN para la amplificación de genes, se utilizó el kit de extracción REDExtract-N-Amp Plant PCR kit (Sigma™). Las células se resuspendieron en 100 µl de la solución de extracción y tras una agitación en vortex, los tubos se incubaron durante 10 min a 95°C en termoblock (J.P-Selecta™, España). Transcurrido este tiempo se añadieron 100 µl de la solución de dilución y se centrifugó a 6.000 rpm durante 4 minutos. Se recogieron 100 µl del sobrenadante, libres de restos celulares, y se pasaron a un nuevo tubo eppendorf, añadiéndose 400 µl de agua destilada estéril a cada tubo. La solución se conservó a -20°C.

3.2. Amplificación de ADN mediante PCR.

Los reactivos y las concentraciones utilizadas variaron en función del tipo de PCR, dependiendo de que se pretendiera obtener perfiles RAPD o amplificar diferentes genes. Los reactivos y concentraciones se muestran en la Tabla 3 y las condiciones de PCR en la Tabla 4.

Tabla 3. Concentraciones de los reactivos de PCR para cada una de las técnicas utilizadas.

Reacción de PCR			
Perfiles de RAPD		Amplificación de genes	
Dream Taq (Thermo-fisher™)	12,5 µl	Red mix PCR (Sigma™)	10 µl
Primer M13	2,5 µl	Primer (x2)	2,5 µl
H ₂ O	8,5 µl	H ₂ O	5 µl
ADN molde	2 µl	ADN molde	2 µl

Tabla 4. Condiciones de PCR utilizadas.

Método	Obtención de Perfiles RAPD	de Amplificación del gen 16S	Amplificación de genes housekeeping	Amplificación del gen <i>nodC</i>
Predesnaturalización		95 °C 9'		
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C 1'		
	Anillamiento	45 °C 1'	55 °C 1' 30''	54 °C 1'
	Extensión	72 °C 2'		72 °C 1' 10''
Extensión final		72 °C 7'		

3.3. Electroforesis.

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% cuando el objetivo fue la obtención de bandas de ADN para secuenciar y al 1,5% cuando se analizaron perfiles de RAPD. El tampón utilizado para la preparación de los geles, así como para la electroforesis fue TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8,0, Millipore). Como marcador de pesos moleculares se utilizó el “GeneRuler 1kb ladder” (ThermoFisher™) en las proporciones que marca el fabricante. La electroforesis se llevó a cabo durante dos horas aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm y utilizando una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad™, EEUU). Los geles se tiñeron con una disolución de bromuro de etidio (Sigma™, EEUU), conteniendo 0,5 µg/ml, durante 30 minutos y se fotografiaron con luz U.V. utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad™, EEUU).

3.4. Obtención de perfiles de RAPD.

Para la obtención de perfiles de RAPD, se utilizó el primer M13 (5' CAGGGTGGCGGTTCT 3') diseñado a partir de la región central del fago del mismo nombre (Schonian *et al.*, 1993). Los reactivos y condiciones de PCR utilizados en la realización de este análisis son los especificados en el apartado 3.2, en las tablas 3 y 4.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis, bajo las condiciones descritas en el apartado 3.3, para separar las diferentes bandas amplificadas y obtener los perfiles de RAPD.

3.5. Análisis matemático de los perfiles de RAPD.

El análisis matemático de los perfiles se llevó a cabo con el programa Bionumerics (Applied Maths™, Nv; EEUU), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de construcción de dendrogramas UPGMA.

3.6. Amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S

La amplificación del gen se llevó a cabo con los primers 27F y 1522R (Rivas *et al.*, 2002) y el kit Red mix PCR (Sigma™) en las condiciones de PCR que se muestran en el apartado 3.2, en las tablas 3 y 4.

La electroforesis de los productos de PCR obtenidos y la tinción de los geles se llevó a cabo según lo indicado en el apartado 3.3. Las bandas correspondientes al gen ribosómico 16S se cortaron del gel y se purificaron utilizando el Kit “QIAquick de QUIAGEN®” siguiendo una modificación del protocolo comercial. Las modificaciones consistieron en una centrifugación adicional tras la utilización del buffer de limpieza y la reducción del volumen en el que se resuspende el producto final de 50 a 40 µl, precalentandolo a 60°C con el fin de concentrar el ADN obtenido en la amplificación y facilitar su desorción de la membrana.

La secuenciación de los genes se llevó a cabo en el servicio Nucleus de la Universidad de Salamanca utilizando el kit “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” y utilizando un equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem®, EEUU). Los fragmentos se ensamblaron mediante el programa SeqMan II. Para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico rARN 16S se utilizaron diferentes primers mostrados en la tabla 5 junto con su secuencia.

Tabla 5. Primers utilizados.

Primer	Secuencia	Posición	Autores
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8-27*	(R. Rivas et al. 2007)
1522R:	5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3'	1503-1522*	(R. Rivas et al. 2007)
SR2	5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'	501-519	(Carro et al. 2012)
SR3	5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT- 3'	887-907	(Carro et al. 2012)
SR4	5'-GGGTTGCGCTCGTTG- 3'	1085-1100	(Carro et al. 2012)
atpD-Rh-1F	5'-SCTGGGSCGYATCMTGAACGT- 3	273-294	(Gaunt et al. 2001)
atpD-Rh-3R	5'-GCCGACACTCCGAACNGCCTG- 3'	771-794	(Gaunt et al. 2001)
recA-Rh-1F	5'-CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA- 3'	6-32	(Gaunt et al. 2001)
recA-Rh-	5'-CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT- 3'	555-581	(Gaunt et al. 2001)

4R			
nodCF	5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3'	251-269	(Laguerre et al. 2001)
nodCI	5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3'	1160-1181	(Laguerre et al. 2001)

(*) Las posiciones de los primers empleados tanto para la amplificación como la secuenciación corresponden al gen ribosómico 16S de *Escherichia coli* ATCC 8739 (NC010468).

3.7. Amplificación y secuenciación de genes housekeeping.

La secuenciación de los genes *housekeeping atpD* y *recA* se llevó a cabo utilizando los primers descritos por Gaunt et al. (2001). La secuencia de los primers se muestra en la tabla 5 y las condiciones de PCR en la tabla 4 del apartado 3.2. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados utilizando los reactivos y las condiciones descritas en el apartado 3.3. Para llevar a cabo la secuenciación de los genes se utilizaron los mismos primers empleados para la amplificación.

3.8. Amplificación y secuenciación del gen *nodC*.

La amplificación de los genes *nodC* se llevó a cabo utilizando los primers descritos por Laguerre et al. (2001). La secuencia de los primers se muestra en la tabla 5 y las condiciones de PCR en la tabla 4 del apartado 3.2. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.3. Los primers utilizados para amplificar el gen se utilizaron también para secuenciarlo.

3.9. Análisis de las secuencias de ADN.

El análisis de las secuencias del gen ribosómico 16S se llevó a cabo utilizando el programa Ezbiocloud (www.ezbiocloud.net), que contiene una base de datos con las secuencias de este gen depositadas en Genbank para todas las cepas tipo de bacterias descritas hasta el momento (Kim et al., 2012). La comparación de las secuencias de los genes cromosómicos *atpD* y *recA* y del gen simbiótico *nodC* se llevó a cabo utilizando el programa BLASTn, versión 2.0, que compara cada una de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de genes y nos ofrece un listado de aquellas que presentan una mayor similitud (Brenner, 1995). Para el análisis filogenético, las secuencias de las cepas del estudio junto con las de las cepas de referencia próximas a estas cepas, se alinearon mediante el programa Clustal X (Jeanmougin et al., 1998; Thompson et al., 1997) y, con el programa Mega 7.0 (Kumar et al. 2016), se construyeron los árboles filogenéticos, utilizando el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987), y el coeficiente de Kimura 2 parameters (Kimura, 1980), seleccionando un “bootstrap” de 1000.

3.10. Secuenciación genómica y análisis de información genómica

La secuenciación genómica precisa de ADN puro de alta calidad para cuya extracción se utilizó el kit “ZR Fungal/Bacterial ADN MiniPrep (Zymo Research™) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN se conservó a -20°C. La secuenciación se llevó cabo utilizando la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas mediante Velvet 1.2.10 en base Linux y la anotación fue llevada a cabo utilizando el programa RAST 4.0 que permite la anotación automática de los genomas obtenidos. Se utilizó la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) para clasificar la funcionalidad de los genes e interpretar las rutas metabólicas en las que estaban involucrados los genes y enzimas anotados, añadiéndose la referencia en la base de datos.

También se utilizaron programas informáticos de análisis automatizados para la búsqueda y detección de genes y operones con funciones específicas. En primer lugar se utilizó la herramienta dbCAN que es una base de datos especializada en la anotación de enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos permitiéndonos dirigir la búsqueda y centralizarla en la misma (Yin et al. 2012). También se utilizó antiSMASH, que permite detectar una amplia gama de metabolitos secundarios estructurados en una base de 1172 clústeres genéticos de productos finales conocidos (Weber et al. 2015).

3.11. Análisis taxonómico de la cepa PEPV15

3.11.1. Análisis de genes

El análisis de los genes ribosómicos y housekeeping se llevó a cabo utilizando los reactivos y condiciones de PCR utilizados en la realización de este análisis son los especificados en el apartado 3.2, en las tablas 3 y 4. Los primers utilizados fueron los que se indican en la tabla 5.

3.11.2. Determinación del contenido en G+C

El cálculo del porcentaje de G+C de la cepa PEPV15 se realizó empleando el método de Mandel y Marmur (1968). Una solución conteniendo ADN de cada cepa se diluyó en tampón SSC 1x (1:9), que se utilizó como blanco. La absorbancia de las muestras se midió desde 50°C hasta 80°C en intervalos de 5°C y, posteriormente, en intervalos de 1°C hasta los 98°C. Las absorbancias se midieron a 260 nm en un espectrofotómetro de luz U.V. (Gene Quant, Pharmacia Biotech™, EEUU).

La fórmula que relaciona el porcentaje de de G+C y la Tm es la siguiente:

$$\%G + C = K \cdot (Tm - 69,3) \cdot 2,44$$

3.11.3. Hibridación ADN total.

La hibridación de ADN total fue llevada a cabo mediante el método de Ezaki *et al.* (1989) siguiendo las recomendaciones de Willems *et al.* (2001). Las cepas incluidas

en los experimentos de hibridación fueron PEPV15^T, *P. brassicacearum* LMG 22836^T, *P. bourgognense* LMG 22837^T y *P. trifolii* PETP02^T.

3.11.4. Tinción de Gram.

Se realizó según la modificación de Hucker (Doetsch, 1981). En un portaobjetos se preparó una extensión de la bacteria, desecándola y fijándola a la llama. Posteriormente, se cubrió durante 2 min con una solución de cristal violeta (PanreacTM, España). A continuación, se retiró el cristal violeta y se añadió una solución de lugol durante 1 min (PanreacTM, España). Después se añadió etanol al 95% durante 1 min, lavando posteriormente con agua destilada. Finalmente, se tiñó con una solución de safranina (PanreacTM, España) durante 1 minuto; se lavó y se dejó secar. La preparación se examinó en un microscopio Nikon Eclipse 80i con aceite de inmersión.

3.11.5. Crecimiento a diferentes temperaturas, pH y concentraciones salinas.

Para analizar la capacidad de la cepa PEPV15 para crecer a diferentes temperaturas, se inoculó en placas de YMA que fueron incubadas a: 4°C, 12°C, 20°C, 37°C y 45°C.

La capacidad de las cepas para crecer a diferentes pHs se analizó utilizando como medio base YMB (Anexo I, tabla 1), que se ajustó a diferente pH, 4,4; 5,4; 6,4; 8 y 9, utilizando diferentes tampones (Anexo II, tablas 2 y 3). Para ajustar el medio a pH ácido, se utilizó tampón PCA obtenido mezclando en diferentes proporciones Na₂HPO₄ 0,4M y ácido cítrico monohidrato 0,2M (Anexo II, tabla 2). Para ajustar los medios de cultivo a pH básico se utilizó tampón Tris clorhídrico conteniendo en diferentes proporciones, según el pH deseado, una solución de Tris 0,2M y otra solución de HCl 0,2M (Anexo II, tabla 3). Los tampones y el medio, a doble concentración, se esterilizaron en autoclave por separado durante 15 min a 121°C. Una vez esterilizados, se mezclaron en proporción 1:1 antes de servir las placas.

La capacidad de las cepas para crecer en presencia de cloruro sódico al 2,5%, 5% y 10% (p/v) se analizó utilizando como medio base caldos YMB (Anexo I, tabla 1) a los que se añadió NaCl en los porcentajes correspondientes. La presencia/ausencia de crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días. Se utilizaron como referencia en los análisis fenotípicos las cepas *P. brassicacearum* LMG 22836^T, *P. bourgognense* LMG 22837^T y *P. trifolii* PETP02^T

3.11.6. Resistencia a antibióticos.

Para evaluar la resistencia natural de la cepa PEPV15 a diferentes antibióticos se utilizó el método de difusión en placa y se utilizaron discos conteniendo los diferentes antibióticos a concentraciones conocidas (BBL, DifcoTM). Se utilizó medio YMA (Anexo I, tabla 1) y la inoculación se llevó a cabo utilizando hisopos estériles. Se

considera que una cepa es sensible a aquellos antibióticos alrededor de los cuales aparece un halo de inhibición de más de 1 mm. Los antibióticos utilizados y las concentraciones por disco fueron ampicilina (2µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloxaciclina (1µg), eritromicina (2µg), gentamicina (10µg), neomicina (5µg), tetraciclina (30µg), penicilina (10U.I.) y polimixina B (300 U.I.).

3.11.7. Asimilación de fuentes de carbono y/o nitrógeno utilizando sistemas miniaturizados.

La determinación de la capacidad para utilizar distintas fuentes de carbono y nitrógeno se llevó a cabo utilizando los sistemas miniaturizados Api 32GN y Api 20NE (Biomérieux TM), siguiendo las indicaciones del fabricante, y el medio de cultivo proporcionado por el mismo. Se partió de cultivos en medio YMA incubados durante 2 días a 28°C.

3.11.8. Análisis quimiotaxonómicos.

Para llevar a cabo estos análisis la cepa PEPV15 se incubó en placas de TSA a 28°C durante 48h. Las células se recogieron con agua estéril y se centrifugaron a 8000 rpm en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X22R (Beckman CoulterTM) durante 10 min. Se retiraron los sobrenadantes y las células se congelaron a -80°C y posteriormente se liofilizaron. Los análisis de quinonas y de ácidos grasos se llevaron a cabo en el Servicio de Identificación de la DSMZ (Colección Alemana de Cultivos Tipo). Las quinonas se analizaron utilizando la metodología de Tindall (1990) y los ácidos grasos utilizando el sistema MIDI (Microbial Identification System) Sherlock 6.1 y la base de datos RTSBA6 de acuerdo con las instrucciones técnicas de este sistema (Sasser, 1990).

4. Análisis de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*.

4.1. Solubilización de fosfato.

La capacidad de solubilización de fosfato inorgánico se estudió utilizando el medio Pikovskaya como medio base (Anexo I, tabla 4) (Pikovskaya, 1948), utilizando fosfato bicálcico (Ca₂PO₃) y fosfato tricálcico (Ca₃(PO₃)₂). Además, se utilizó el índice de solubilización de fosfato (Phosphate Solubilization Index PSI) para determinar la eficiencia de cada una de las cepas mediante la fórmula indicada (Pande, Pandey, Mehra, et al. 2017).

$$PSI = \frac{\text{Diámetro del halo de solubilización (cm)}}{\text{Diámetro de la colonia (cm)}}$$

4.2. Producción de sideróforos.

La capacidad de producir sideróforos se evaluó en el medio de cultivo M9-CAS-AGAR, que es una modificación del medio utilizado por Schwyn y Neilands (1987), donde se observan halos de distintas tonalidades del amarillo al naranja. La modificación consiste en la adición de un disolvente catiónico, HDTMA, que estabiliza el complejo Fe-CAS y le da un color azul característico (Alexander y Zuberer, 1991). Al medio M9 en el que se incluye un indicador de color (HDTMA) y un agente quelante del hierro (EDTA). Este medio M9 CAS agar modificado se prepara partiendo de cuatro soluciones diferentes, esterilizadas de forma individual, y mezcladas posteriormente.

Solución 1

Para preparar esta solución, se mezclan 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 (1.21 mg ml^{-1}) obteniendo una solución acuosa de intenso color púrpura, que se mezclará posteriormente con 40 ml de una solución acuosa de HDTMA (1.82 mg ml^{-1}). La solución resultante tiene un color azul marino denso, y se esteriliza en autoclave independientemente del resto. La solución se mezcla con las restantes cuando su temperatura baja a 50°C .

Solución 2

Esta solución se prepara obteniendo en primer lugar una solución salina resultante de la mezcla de KH_2PO_4 , NaCl, NH_4Cl y H_2O , a la que después se añade PIPES (piperazina-N,N'-bis[ácido 2-ethanesulfónico]) ajustando el pH a 6.8 (Anexo I, tabla 5)).

Solución 3

Para obtener esta solución se disuelven en 70 ml de H_2O destilada los compuestos detallados en el anexo I, tabla 6.

Solución 4

La solución 4 contiene 30 ml de cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de caseína) al 10% p/v esterilizada mediante filtración por una membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore™, Amicon, EEUU).

Una vez preparadas todas las soluciones, se esterilizan en autoclave, excepto la solución 4, y se mezclan cuando adquieran una temperatura de 50°C , añadiéndose en último lugar la solución 4.

Las placas se incubaron a 28°C . El crecimiento y la producción de halos que revelan la producción de sideróforos se observan a lo largo del tiempo que suele oscilar entre 3 días y 2 semanas. Se utilizó una fórmula similar a la utilizada para determinar la eficacia de solubilización de fosfato, pero cambiando los parámetros por los halos de cambio de color.

4.3. Síntesis de ácido indolacético.

La capacidad de las diferentes cepas para producir ácido indolacético fue evaluada utilizando el medio JMM (Graham *et al.*, 1989) para *rhizobia* o JMM-DF sales (Anexo I, tabla 7) para endófitos al que se añadió triptófano a una concentración de 0,165 g/l. Las cepas se inocularon en placas de YMA o TSA (Anexo I, tablas 1 y 2) que se incubaron durante 5 días a 28°C y a partir de ellas se obtuvieron suspensiones en agua destilada estéril a una densidad aproximada de $1 \cdot 10^6$ UFC/ml inoculándose 2 ml del medio JMM con 200 µl de estas suspensiones.

Una vez inoculados, cada uno de los medios finales (uno conteniendo triptófano y otro glutamato) se incubaron a 28°C durante 72 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante mediante filtración utilizando filtros de un tamaño de poro de 22µm (Millipore™, Amicon, EEUU). Se añadió 1 ml de reagente Salkowsky (Anexo II, tabla 4) a 2 ml de sobrenadante. Una vez añadido el reagente Salkowsky, los medios tornan a color rosado o rojizo en función de la concentración de ácido indolacético presente en el medio. La intensidad de color se midió utilizando un espectrofotómetro de absorción ATI Unicam 8625 (Mattson™, EEUU) a una longitud de onda de 550 nm.

4.4. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.

La capacidad de los endófitos de crecer en medios libres de nitrógeno se llevó a cabo utilizando el medio JMM-DF sales (Anexo I, tabla 7) sin añadir ninguna fuente de nitrógeno, eliminando la solución de vitaminas y añadiendo 1 ml de una solución de elementos traza (Anexo I, tabla 9), que incluyó metales que son cofactores de las diferentes nitrogenasas. El medio se dispensó en tubos que se inocularon con 1/10 de su volumen con las suspensiones de cada cepa en agua estéril a una concentración aproximada de $1 \cdot 10^6$ UFC/ml. En paralelo se inocularon controles positivos a los que se añadieron 0,4 g/l de NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno. A partir de los tubos donde se observó crecimiento se transfirieron 70 µl a un nuevo tubo y de éste a un tercero, tomándose como positivos los que crecieron tras este tercer paso de cultivo.

4.5. Estudio de la capacidad de colonización.

4.5.1. Producción de celulosa.

La capacidad para producir celulosa fue evaluada utilizando el medio de cultivo YMA suplementado con 25mg/l de Rojo Congo. Este compuesto 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.* 1995). Sobre la superficie del medio se depositaron 10 µl de una suspensión de cada cepa de conteniendo $1 \cdot 10^6$ UFC/ml y las placas se incubaron durante 3 días a 28°C. Un resultado positivo se observa cuando las colonias absorben el Rojo Congo adquiriendo tonalidades que van del rosa al rojo intenso.

4.5.2. Producción de celulasas.

Los ensayos para determinar la actividad celulolítica se llevaron a cabo utilizando el sistema de doble capa, una de YMA en la base y otra capa superior conteniendo agarosa y carboximetilcelulosa (CMC). La capa inferior está formada por 15 ml de YMA que se dejan solidificar en cada placa. Para preparar la segunda capa se preparó una solución de CMC (Sigma™) al 1% que se disolvió lentamente con agitación en agua y se esterilizó en autoclave. A 5 ml de esta solución se le añadió agarosa (Seakem™) al 0,5% disuelta en tampón PCA 100mM pH5 (Anexo II, tabla 2) y esterilizada en autoclave. Sobre la superficie del medio se depositaron 10 µl de una suspensión de cada cepa de conteniendo $1 \cdot 10^6$ UFC/ml y las placas se incubaron durante 3 días a 28°C. Al cabo de este tiempo se retiraron las colonias con agua destilada y las placas se tiñeron con una Solución de Rojo de Congo (Sigma™) al 0.1% durante 30 minutos. Se lavó varias veces con NaCl 1M hasta que se se visualizaron bien los halos de lisis que ponen de manifiesto la presencia de celulasas. Las placas pueden colocarse a 4°C durante 12 horas para mejorar la visibilidad del halo.

4.5.3. Estudio cuantitativo de la capacidad de producción de biofilms.

La determinación de la formación de biofilms se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Fujishige et al. (2006). Este protocolo utiliza placas multipocillo, lo que permite realizar múltiples medidas de forma rápida y sencilla. Se utilizó medio TY líquido (Anexo I, tabla 2) para realizar un precultivo de cada una de las cepas incubándolo a 28°C y 180 rpm hasta alcanzar una concentración de 10^6 UFC/ml. Este medio se inoculó en una dilución 1:5 en medio nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una concentración de 10^5 UFC/ml.

Se inocularon 100 µl de las suspensiones de las cepas en cada pocillo y se dejaron las filas superior e inferior como controles negativos, rellenándolas con medio de cultivo estéril. Además, los pocillos rellenos con las cepas deben quedar también rodeados de pocillos conteniendo medio de cultivo estéril. Las placas se sellaron una vez rellenas y se incubaron a 28°C. Al cabo de este tiempo, el medio se eliminó de los pocillos por aspiración y se añadieron 100 µl por pocillo de una solución de cristal violeta (0,3% peso/volumen) incubándose durante 10 min al cabo de los cuáles se eliminó la solución de cristal violeta por aspiración y el exceso se retiró lavando 3 veces con agua destilada durante 5 min cada una. Las placas se secaron en campana con flujo laminar eliminándose los restos de cristal violeta que no están dentro de los pocillos. Se añadieron 100 µl por pocillo de una solución de 80% de etanol y 20% de acetona para solubilizar el cristal violeta que ha quedado unido al biofilm. Se incubaron las placas durante 15 min y se midió la absorbancia a una densidad óptica de 575 nm a las 24, 48 y 72 h con el fin de estudiar la evolución del biofilm.

4.6. Determinación de la capacidad para producción moléculas implicadas en *Quorum sensing*.

La determinación de la producción de moléculas implicadas en la producción de señales de *Quorum sensing* y, en concreto, N-acil-homoserin-lactonas (AHL) se llevó a cabo en placas multipocillo utilizando como marcador *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 que porta el plásmido pZRL4. Este plásmido contiene el operon *traCDG* que actúa como autoinductor del gen *lacZ*, activándose a partir del denominado umbral de *quorum*, o concentración de AHL que la expresión del operón *tra*.

La cepa *A. tumefaciens* NTL4 se inoculó en 20 ml de medio AB (Anexo I, tabla 10) (Chilton et al. 1974) suplementado con 30 µg/ml de gentamicina (Sigma™) incubándose 24 h a 37°C con agitación orbital a 120 rpm. Una vez crecida la cepa de *A. tumefaciens* NTL4, se añadieron 10 ml de este preinóculo a 100 ml de medio LB (Anexo I, tabla 11) conteniendo gentamicina 30 µg/ml que se incubaba en las mismas condiciones. Una vez crecida la cepa, 10 ml de este cultivo se mezclaron con 20 ml de medio AB conteniendo agarosa (10g/l) a una temperatura de 43°C y se agregaron 150 µl X-gal (Sigma™) a una concentración de 40 µg/ml, disuelto en N,N-dimetilformamida (Sigma™).

En los pocillos de las placas se dispensaron 200 µl de esta mezcla y sobre cada pocillo, una vez solidificada la mezcla, se añadieron 10 µl del sobrenadante de un cultivo de 48 h de las cepas analizadas. Se monitorizó la formación de una coloración azul a las 12h, 24h, 36h y 48h.

4.7. Estudio de inhibición y antibiosis

El diseño de consorcios bacterianos precisa del estudio de compatibilidad entre las cepas que formarán el mismo, para lo que se analizó si alguno de los aislados era capaz de producir sustancias que inhibieran el crecimiento del otro componente del consorcio. De esta manera, los microorganismos seleccionados se cultivaron durante 72 h en medio líquido YMB (Anexo I, tabla 1) o TSB (Anexo I, tabla 2), en función del microorganismo, en agitación a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, se recogieron 5 ml del cultivo y se filtraron utilizando un filtro de 0,22µm (Millipore™) para eliminar las células del cultivo. La cepa sobre la que se quería estudiar la inhibición se sembró en superficie utilizando un hisopo estéril en su medio rutinario de crecimiento. En pocillos de metal estériles se colocaron 200µl del medio filtrado, se incubó a 28°C durante 48h.

5. Métodos de transformación de bacterias.

5.1. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*.

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron utilizando células competentes obtenidas según el método descrito por Hanaha *et al.* (1991). Se preparó un preinóculo con una colonia de la cepa S17.1 de *E. coli* en 5 ml de medio LB (Anexo I, tabla 11)

que se incubó en agitación a 150 rpm overnight a 37 °C. Este cultivo se utilizó para inocular 500 a 650 ml de medio ϕ (Anexo I, tabla 12) ajustado a pH 7,6 con KOH 10N (Panreac™). El inóculo se incubó a 37°C con agitación vigorosa (250-300 rpm) hasta que alcanzó una D.O. de 0,48 a 550 nm. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Las células se resuspendieron en 150 ml del tampón TFB1 frío (Anexo II, tabla 5), manteniéndolas en hielo y con agitación manual suave hasta su completa resuspensión. Después de mantenerlas en hielo durante 5 min, las células fueron centrifugadas a 2.000 rpm durante 15 min a 4 °C y se resuspendieron en un volumen de 20 ml de tampón TFB2 frío (Anexo II, tabla 5). La suspensión se mantuvo en hielo durante 15 minutos y se distribuyeron alícuotas de 100 μ l en tubos eppendorf que se almacenaron a -80 °C.

5.2. Transformación de *E. coli* mediante choque térmico.

Para realizar las transformaciones se utilizaron alícuotas de 100 μ l de células competentes obtenidas por el procedimiento explicado anteriormente. Las células fueron descongeladas en hielo y a continuación se añadieron unos 10-200 ng de ADN plasmídico y llevándose todo a un volumen de 40 μ l de H₂O. La mezcla se mantuvo en hielo durante 20 min tras los cuales se sometió a un choque térmico de 2 min a 42°C y de 2 min en hielo. Se añadieron 800 μ l de medio LB (Anexo I, tabla 11) y la mezcla se incubó a 50 rpm a 37°C durante 45 minutos.

Transcurrido este tiempo, las células se inocularon en medio LB sólido (Anexo I, tabla 11) con los correspondientes marcadores y se añadió al medio el antibiótico marcador de resistencia correspondiente. Para seleccionar los clones portadores de plásmidos recombinantes derivados de vectores de clonación que portan el gen *lacZ* de *E. coli*, por un lado se extendió en cada placa Petri el sustrato cromogénico X-Gal (40 μ l de una solución al 2 % de N,N-dimetilformamida (p/v)) antes de añadir la mezcla de transformación.

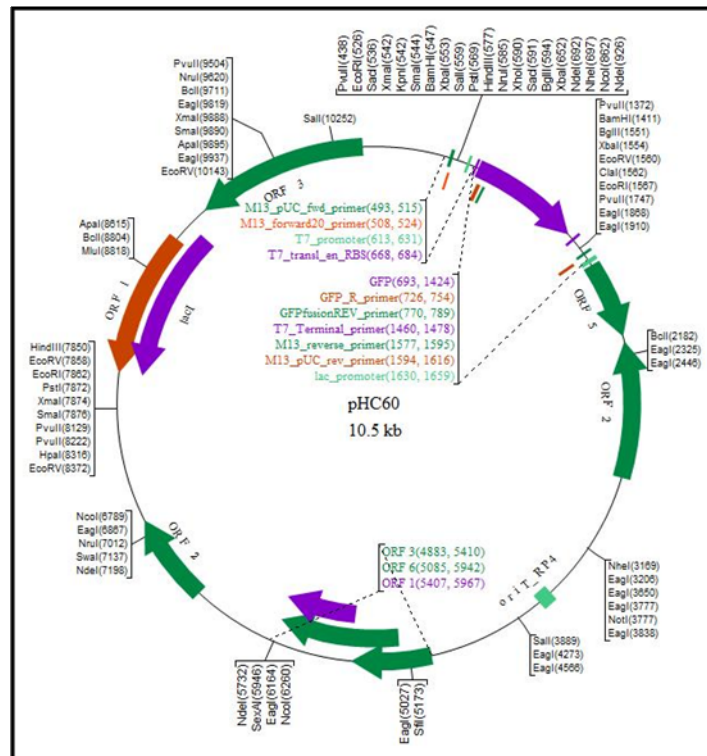
Las placas se incubaron una noche a 37°C. Para diferenciar mejor las colonias azules de las blancas, las placas se dejaron a 4°C durante 1-2 horas. Posteriormente se seleccionaron las colonias blancas, ya que son las que tienen interrumpido el gen *lacZ* por la inserción y, por lo tanto, no hidrolizan la X-Gal y no liberan el cromóforo azul. Estas colonias seleccionadas se inocularon en LB con el antibiótico correspondiente y se comprobó la presencia del plásmido introducido mediante extracción del ADN plasmídico, digestión con los correspondientes enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

5.3. Transformación de *Rhizobium* y *Phyllobacterium*.

La transformación de las cepas obtenidas en este estudio se realizó utilizando la cepa silvestre de *E. coli* S17.1 (Spr/Smr) (Simon et al., 1983) para la replicación y transferencia del plásmido pHC60 (Figura 19) (Cheng y Walker, 1998) por medio de

conjugación biparental. Este plásmido contiene los genes necesarios para su transferencia por conjugación y un fragmento que expresa constitutivamente una proteína fluorescente (GFP) y como marcador tiene un gen de resistencia a tetraciclina (Tc).

Para llevar a cabo la conjugación se tomaron cultivos de 24 h de las cepas crecidas en medios sólidos (*Rhizobium* y *Phyllobacterium* en TY y *E. coli* pHC60 en LB con Tetraciclina 10 µg/ µl). Con un asa de siembra se mezclaron pequeñas porciones de cada cultivo en medio TY sólido, por este orden: cepa receptora (*Rhizobium* o *Phyllobacterium*) y cepa donadora (*E. coli* pHC60) en proporción 2:1, realizando movimientos circulares. Estas placas se incuban “overnight” a una temperatura de 28°C. Al día siguiente se sembró por agotamiento en estría en Medio mínimo para *Rhizobium* (Anexo I, tabla 13) (O’Gara y Shanmugan, 1976) suplementado con tetraciclina (5 µg/µl).



Las placas se incubaron a una temperatura de 28°C hasta que aparecieron colonias aisladas con la morfología característica de *Rhizobium* y *Phyllobacterium* (5-7 días). Una vez seleccionadas las colonias adecuadas, se sembraron simultáneamente en medio mínimo sólido suplementado con tetraciclina (5 µg/µl) y en medio VRB (Violet Red Agar, Scharlab™), incubándose el primero a 28°C y el VRB a 37°C. Este último medio de cultivo se utiliza para determinar la posible presencia de coliformes y facilitar la selección de cepas transformadas. Cuando se ha comprobado que las cepas seleccionadas están libres de coliformes se siembran en YMA suplementado con tetraciclina (5 µg/µl).

Figura 19. Representación del plásmido pHC60.

6. Análisis de la colonización de nódulos de leguminosas y de raíces de no leguminosas.

6.1. Microscopía óptica y de fluorescencia.

El estudio de la interacción en planta se llevó a cabo utilizando raíces y nódulos de los cultivos indicados inoculados con las cepas transformadas con el plásmido pHC60 o inmunolocalizadas mediante anticuerpos específicos, observándose las bacterias utilizando el filtro de GFP (472 nm). Además, en las preparaciones directas de raíces se utilizó Blanco de Calcofluor como colorante diferencial para la tinción de paredes celulares vegetales, añadiendo una gota de la solución de Blanco de Calcofluor (Sigma™) sobre la muestra y a continuación una gota de una solución de KOH (0,1 M) para mejorar el contraste (Flores-félix et al. 2015). Se esperó un 1 min y se observó la muestra utilizando el filtro DAPI (420 nm).

El estudio de cualitativo de los biofilms precisó de la observación mediante técnicas de microscopía de fluorescencia ya que estas estructuras habían sido teñidas con Naranja de Acridina. Este compuesto precisa de la excitación a una longitud de onda de 510 nm. La realización de los ensayos de microscopía óptica y de fluorescencia se llevaron a cabo utilizando un microscopio Nikon Eclipse i80 con lámpara halógena de xenón-mercurio que emite luz ultravioleta. Este microscopio lleva asociado una serie de filtro para polarizar la radiación y así poder modificar la longitud de onda que incide sobre la muestra.

6.2. Microscopía confocal de fluorescencia.

Las bacterias marcadas con GFP unidas a los pelos radicales y a la raíz se observaron mediante microscopía confocal laser de fluorescencia con un microscopio TSL Leica SP5 de Zeiss aplicando una longitud de onda de 480 nm mediante el laser de argón y un filtro de emisión de banda ancha centrado en una longitud de onda de 500 nm, permitiendo a su vez, en su caso, la observación de la raíz en rojo al añadiendo 5 µl de una solución de 10 µM de yoduro de propidio (Sigma™). Las proyecciones se llevaron a cabo tomando imágenes individuales cada 1-2 µm y ajustándolos con el software del sistema.

6.3. Métodos de inmunodetección.

Para la inmunodetección de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* se utilizaron anticuerpos policlonales comerciales anti-uricasa (Novus Biologicals Ltd™), enzima muy conservada en estos géneros. Se realizaron ensayos de aglutinación para comprobar la eficacia de los anticuerpos y se titularon dichos anticuerpos mediante la técnica ELISA, seleccionándose una dilución del anticuerpo de 1:2000. Se realizaron cortes histológicos de las raíces de maíz y guisante inoculadas con cepas de *Bacillus* y

Paenibacillus que se localizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas que se llevaron a cabo en el Servicio de Patología Molecular Comparada (CIC-IBMCC, USAL-CSIC). Para ello se utilizó un anticuerpo secundario que lleva acoplado un fluoróforo que emite en verde, en la longitud de onda de la GFP (488nm). Los cortes fueron observados utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse i80) y las bacterias se observaron de color verde fluorescente dentro de los tejidos.

7. Ensayos en planta.

7.1. Esterilización de semillas.

La esterilización de las semillas utilizadas en este trabajo se llevó a cabo de diferentes formas dependiendo de la planta utilizada. Los protocolos de esterilización se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Protocolos de esterilización de semillas utilizados en cada cultivo.

Cultivo	Etanol	Na ₂ ClO ₃	H ₂ O desionizada	Imbibición
Lechuga	30''	2'	x5 lavados	1 hora
Zanahoria	30''	5'	x5 lavados	1 hora
Fresa	30''	5'	x5 lavados	3 horas
Alubia	30''	20'	x5 lavados	3 horas
Guisante	30''	12'	x5 lavados	3 horas
Maíz	30''	10'	x5 lavados	3 horas

7.2. Inoculación de bacterias en *Phaseolus vulgaris* y *Pisum sativum*

Los ensayos se llevaron a cabo en cámara iluminada utilizando recipientes de 1 l con vermiculita estéril. La vermiculita se esterilizó en autoclave durante 1 h a 120°C y tres días consecutivos. Siguiendo el protocolo de esterilización indicado en la tabla 7, se esterilizaron las semillas de ambos cultivos. Se utilizaron semillas de la variedad Pinta de alubia y de la variedad Rondo de guisante. Se colocaron 2 plántulas por recipiente en el caso de la alubia y 3 en el caso del guisante. El número total de plantas por tratamiento fue de 15 plantas. Además de los tratamientos de inoculación, se incluyeron controles negativos sin inocular y sin aporte de nitrógeno, que se regaron con solución de Rigaud y Puppo (1985) libre de nitrógeno (Anexo I, tabla 15). Los controles positivos que se regaron con la misma solución suplementada con 0,4 g/l de NH₄NO₃, y controles positivos inoculando la cepa tipo de *Rhizobium phaseoli* sv. *phaseoli* para alubia, y *Rhizobium pisi* sv. *viciae* para guisante. Cada planta fue inoculada con 1 ml de una suspensión de cada cepa que contenía aproximadamente 1x10⁸ UFC/ml, obtenidas a partir de cultivos crecidos en medio YMA incubado a 28°C durante 5 días.

Las plantas se mantuvieron durante 40 días en cámara iluminada con mezcla de luz incandescente y fluorescente (cantidad de luz de 400 μ Einsteins. m⁻². s⁻¹ y longitud de onda de 400 a 700 nm), con un 60% de humedad relativa y programada para un

fotoperiodo de 16 horas de luz diarias y temperaturas de 25 y 17°C durante el día y la noche, respectivamente. Al cabo de 40 días, se recogieron las plantas, se contaron los nódulos y se obtuvieron los pesos fresco y seco de la parte aérea. Además, se analizó el análisis elemental determinando la concentración en nitrógeno de la parte aérea.

7.3. Análisis de la dinámica de nodulación.

Para realizar estos ensayos se utilizaron matraces de 250 ml en los que se colocaron 130 ml de medio Faraheüs (Anexo I, tabla 16) conteniendo agarosa al 0,8% p/v. Las semillas se esterilizaron siguiendo el protocolo indicado en la tabla 6 y se colocaron en los matraces que se recubrieron con bolsas negras de plástico para evitar la luz y facilitar así la germinación de las semillas. A los 4 días comenzó la germinación y las plántulas se inocularon con 1 ml de una suspensión de cada cepa conteniendo aproximadamente 1×10^8 UFC/ml, obtenida a partir de cultivos crecidos en medio YMA incubado a 28°C durante 5 días. Los matraces se mantuvieron en cámara en las condiciones descritas en el apartado anterior. El recuento de nódulos se llevó a cabo cada 2 días hasta 35 días después de la inoculación.

7.4. Ensayos en plántulas de lechuga, fresa, zanahoria, guisante y maíz.

Los ensayos de interacción y los estudios de microscopia se llevaron a cabo utilizando placas Petri cuadradas de 140x140 mm para permitir el adecuado desarrollo del sistema radicular. Las semillas de cada cultivo se esterilizaron siguiendo los protocolos indicados en la tabla 6 y, a continuación, se germinaron en placas Petri con medio agar-agua (0,7% p/v). Una vez germinadas se colocaron las en placas Petri con medio Rigaud-Puppo (Anexo I, tabla 15) suplementado con 0,7% de agar (p/v), colocando las plántulas sobre un papel Whatman, e inoculándose con una suspensión de cada cepa que contenía aproximadamente 1×10^8 UFC/ml, obtenidas a partir de cultivos en medio YMA incubados a 28°C durante 5 días. La parte inferior de las placas se cubrió con papel de aluminio para evitar la incidencia directa de la luz sobre el sistema radicular. Las placas se mantuvieron en cámara iluminada en las condiciones descritas en el apartado 7.2.

7.5. Ensayos en invernadero.

Los ensayos en invernadero se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) y el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) adecuando el diseño experimental a las necesidades del cultivo y utilizando diferentes sustratos.

Para los ensayos en lechuga se utilizaron semillas de la variedad Romana (Tabla 6) y macetas de 3,5 litros que se rellenaron con una mezcla de turba:vermiculita 3:1. Las semillas se esterilizaron siguiendo el protocolo indicadado (Tabla 6) y se germinaron en vermiculita, trasplantándose 2 días después de su germinación a razón plántula por

maceta. Se inocularon 2 días después con 1 ml de una suspensión de cada cepa que contenía aproximadamente 1×10^8 UFC/ml obtenidas a partir de cultivos en medio YMA incubados a 28°C durante 5 días. Se incluyó un tratamiento sin inocular como control negativo. Se utilizaron 30 plántulas por tratamiento que se distribuyeron de manera aleatoria en el invernadero. Trascorridos 45 días, se recogieron procediendo al pesado de la parte aérea, que posteriormente se secó en estufa para obtener el peso seco.

Para los ensayos con zanahoria se utilizó el mismo diseño y desarrollo experimental que en el caso de la lechuga y se utilizaron semillas de la variedad Nantesa. La recolección se hizo a los 60 días para obtener un mejor desarrollo radicular. Se evaluaron el peso fresco y seco de la raíz y de la parte aérea de las plantas igual que en el caso anterior.

Para llevar a cabo los ensayos en fresa se utilizaron plantones comerciales de la variedad Camarosa que se cultivaron en bandejas conteniendo una mezcla de turba:vermiculita 3:1 como sustrato. Se utilizaron 15 plantones por tratamiento incluyéndose un tratamiento control sin inocular como control negativo. La inoculación se realizó utilizando 10 ml por plantón de una suspensión de cada cepa a una concentración aproximada de 10^7 UFC/ml obtenidas a partir de cultivos en medio YMA incubados a 28°C durante 5 días. El incremento en el volumen inoculado estaba dirigido a favorecer la correcta irrigación de las raíces de los plantones sin incrementar la cantidad de bacterias. Se evaluaron diferentes parámetros vegetativos y productivos como indicadores del posible efecto de la inoculación. La recolección de frutos se llevó a cabo durante 4 meses en el momento óptimo de maduración, al igual que el recuento de flores por planta. La medida y el recuento de estolones se realizaron al final del periodo productivo.

7.6. Ensayos de campo.

7.6.1. Lechuga.

Los ensayos de campo para la lechuga se llevaron a cabo en la localidad de Ciudad Rodrigo (Salamanca) (40°35'02.6"N 6°31'55.9"O) en una finca de regadío. La preparación de cultivo consistió en dos pases con cultivador y abonado orgánico de 10 Tn/ha. Las plántulas de lechuga se sembraron en semillero durante 4 semanas hasta que alcanzaron 8 cm de altura y presentaron 5 hojas y se trasplantaron al campo de cultivo a una densidad equivalente de 6 plantas por metro cuadrado. Los riegos se llevaron a cabo por gravedad en función de las necesidades fisiológicas de las plantas. Se sembraron 45 plantas por tratamiento alternando líneas de cada tratamiento. La inoculación se realizó con 10 ml de una suspensión de cada una de las cepas conteniendo aproximadamente 1×10^7 UFC/ml. Las plantas se recolectaron al cabo de 60 días, procediéndose a la obtención de los pesos fresco y seco de la parte aérea, así como el análisis elemental de la misma.

7.6.2. Zanahoria.

El ensayo de campo para la zanahoria se llevó a cabo en la localidad de Remondo (Valladolid) (41°20'01.1"N 4°29'31.4"O) en una finca de producción de zanahoria. La siembra se realizó de manera mecanizada en tablas de 1 m de ancho, a una densidad de 50 plantas por m², llevándose a cabo tres réplicas por tratamiento de una superficie de 0,33 m² cada una. Los tratamientos consistieron en un tratamiento control, un tratamiento con *P. endophyticum* PEPV15 y un último tratamiento con *R. laguerreae* PEPV16. La inoculación se realizó aplicando 1 l/m² de una suspensión de cada cepa conteniendo aproximadamente 1x10⁷ UFC/ml. La recolección se realizó en el momento óptimo, cuando se empezaron a observar procesos de floración. Se analizaron parámetros vegetativos y productivos como pesos fresco y seco del sistema foliar y radicular, y producción por hectárea. También se realizó el calibrado de acuerdo a la normativa vigente (Comisión Europea 1999).

7.6.3. Fresa.

El ensayo de campo se desarrolló en Rociana del Condado (37 ° 17 '7.094' 'N, 6 ° 37' 0.285 " O), ubicado en la provincia de Huelva, que es la zona productora de fresas más grande de España. El cultivar de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) utilizado en estos experimentos fue "Splendor" y la siembra tuvo lugar a mediados de octubre. Las plántulas de fresa utilizadas en este estudio fueron plantas certificadas. Éstas se plantaron manualmente en caballones, con un 40 cm de espacio entre cada caballón y 30 cm entre cada plantón. Se utilizó fertirrigación siguiendo los procedimientos habituales empleados en el área. Se establecieron 3 tratamientos, tratamiento control, tratamiento inoculado con *P. endophyticum* PEPV15 y tratamiento inoculado con *R. laguerreae* PEPV16. Cada tratamiento consistió en 30 plantones, seleccionado tres caballones contiguos en el centro de un túnel, para eliminar posibles interferencias de los bordes. Para evitar procesos de contaminación cruzada entre tratamientos, cada tratamiento se localizó en un caballón independiente. Los tratamientos biofertilizados se inocularon con 10 ml de una suspensión bacteriana que contenía 10⁷ UFC/ml. Se realizaron 2 recolecciones a etapas intermedias del cultivo, determinando peso fresco y seco de los frutos, así como el calibrado de los mismos de acuerdo a la normativa europea (Comisión Europea 2002).

7.6.4. Guisante y maíz.

Los ensayos de campo se llevaron a cabo en las instalaciones de la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria de la Universidad de León. El diseño experimental para ambos cultivos, guisante y maíz fue similar debido a que estos cultivos son planteados como posibles unidades de rotación en sistemas de cultivo. El diseño consistió en un diseño aleatorizado de microparcels con tres réplicas por tratamiento distribuidas en tres bloques. El tamaño de cada microparcels elemental fue de 3 m x 2 m, con una distancia entre parcelas elementales de 2 m, para evitar que los

movimientos horizontales del agua produjeran desplazamientos de los microorganismos de unas parcelas a otras. Para el guisante, se fertilizó con una cantidad equivalente de N de 120 kg/ha, 40 kg/ha de P (P_2O_5) y 88 kg/ha de K (K_2O) para los controles positivos. Los tratamientos y los controles negativos no se fertilizaron con nitrógeno, y el abonado fosfórico y potásico siguió los mismos criterios descritos. En el caso del maíz, los tratamientos fueron abonados con un 80% del nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) extraído por el cultivo, extracción que se calculó en base a la producción esperada, utilizando las tablas de referencia empleadas en España, incorporando testigos negativos sin fertilizar y positivos al 100% de fertilización con unas cantidades equivalente de N de 220kg/ha, 100 kg/ha de P (P_2O_5) y 180 kg/ha de K (K_2O).

Al alcanzar la madurez comercial del cultivo, se determinó el rendimiento y sus componentes. En el caso del maíz se determinaron el número de mazorcas por m^2 , peso seco de grano por mazorca, y el rendimiento de g/m^2 (materia seca). Por extrapolación se determinaron kg de grano comercial por ha. En el caso del guisante se determinaron plantas por metro cuadrado, número de vainas por planta, y peso seco de vainas completas por m^2 . Por extrapolación se calcularon kg de vainas comerciales por ha. En ambos casos se determinó el índice de cosecha como representación del rendimiento del cultivo entre biomasa del grano producido y biomasa de la planta.

8. Análisis químico elemental de muestras vegetales.

Se determinó el contenido de nitrógeno total empleando un analizador elemental Leco Truspec (Truspec™, Mi, EEUU), así como del contenido Ca, Mg, K, P y Fe, empleando un espectrofotómetro ICP-OES ICAP 6500 DUO THERMO (Thermo Electron Corporation™, UK). Los análisis fueron llevados a cabo por el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CEBAS).

Resultados y Discusión

Capítulo I

En este capítulo se abordará la identificación de las bacterias aisladas a partir de nódulos de plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) cultivadas en la localidad de Aldea de San Miguel en Valladolid y a partir de nódulos de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en la localidad de Pedrosillo el Ralo en Salamanca. De ambas plantas se aislaron cepas de *rhizobia* y cepas de bacterias endófitas que se identificaron mediante secuenciación del gen ribosómico 16S después de agruparlas utilizando perfiles de RAPD. Esta fase es común para todas las cepas y nos permitió diferenciar aquellas pertenecientes al género *Rhizobium* de las pertenecientes a otros géneros, no obstante, para una mayor claridad en la exposición de los resultados se van a exponer por separado los resultados obtenidos para las cepas de *rhizobia* y aquéllos obtenidos para el resto de las bacterias endofíticas.

1. Cepas de *rhizobia* aisladas a partir de nódulos de *Pisum sativum* y *Phaseolus vulgaris*

En la Tabla 7 se recogen las cepas de *rhizobia* aisladas a partir de nódulos de plantas de *Pisum sativum* cultivadas en la localidad de Aldea de San Miguel (Valladolid), donde esta leguminosa es comúnmente cultivada, y a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* en la localidad de Pedrosillo el Ralo (Salamanca), donde no se ha cultivado esta leguminosa. En el caso de los nódulos de *P. sativum* se obtuvieron varios tipos de colonias, mientras que a partir de los nódulos de *P. vulgaris*, dado que el medio de aislamiento contenía cristal violeta como agente selectivo, sólo se obtuvieron colonias de aspecto mucoso típicas de *rhizobia* de crecimiento rápido.

Tabla 7. Cepas de *rhizobia* aisladas a partir de nódulos de las dos leguminosas de este estudio.

Cepa	Localidad	Hospedador
AMPS01, AMPS02, AMPS04, AMPS05, AMPS08, AMPS10, AMPS13, AMPS14, AMPS15, AMPS16, AMPS17, AMPS18, AMPS20, AMPS21, AMPS22, AMPS23, AMPS25, AMPS26, AMPS27, AMPS28, AMPS29, AMPS33, AMPS34, AMPS35	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
PEPV01, PEPV02, PEPV03, PEPV04, PEPV05, PEPV06, PEPV07, PEPV08, PEPV09, PEPV10, PEPV11, PEPV12, PEPV13, PEPV14, PEPV15, PEPV16, PEPV17, PEPV18, PEPV19, PEPV22, PEPV23, PEPV24, PEPV25, PEPV28, PEPV29, PEPV30, PEPV31, PEPV32, PEPV33, PEPV34, PEPV36, PEPV37, PEPV38, PEPV40, PEPV41, PEPV42	Pedrosillo el Ralo	<i>Phaseolus vulgaris</i>

2. Análisis de la diversidad genética de las cepas de *rhizobia*

El análisis de perfiles de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) destaca entre las técnicas utilizadas actualmente para el análisis de la diversidad genética bacteriana como una de las más útiles, ya que nos permite estudiar genomas complejos sin un conocimiento previo de los mismos. La utilización de un solo primer (Mulcahy et al., 1995) puede ser suficiente para analizar la variabilidad entre cepas, como ocurre en el caso de los perfiles de RAPD que se obtienen utilizando un primer de longitud corta que anilla a bajas temperaturas, normalmente el primer denominado M13 (Williams et

al., 1990). Este es un primer de pequeño tamaño y con alto contenido en G+C, lo que, unido a unas condiciones de amplificación poco restrictivas, hace que se produzcan amplificaciones inespecíficas generando un perfil de bandas característico de cada cepa. Esta técnica destaca por su facilidad de aplicación que permite procesar el gran volumen de muestras que se maneja en procesos de aislamiento de microorganismos de manera no selectiva, permitiéndonos determinar la diversidad infraespecífica y reducir de manera efectiva el volumen de cepas con el que trabajar. Los perfiles de RAPD han sido utilizados en numerosos trabajos para el estudio de la diversidad de los *rhizobia* (Corich et al., 2001; Kimes et al. 2015, Moschetti et al., 2005; Valverde et al., 2006), particularmente de las cepas aisladas a partir de *P. sativum* y *P. vulgaris* (Santillana et al. 2008; Díaz-Alcántara et al. 2014).

Los resultados obtenidos después del análisis matemático de los perfiles de RAPD obtenidos para las 61 cepas de *rhizobia* aisladas en este estudio mostraron la existencia de 13 grupos y 7 cepas independientes con valores de similitud menores del 80% (Figura 20 y Tabla 8).

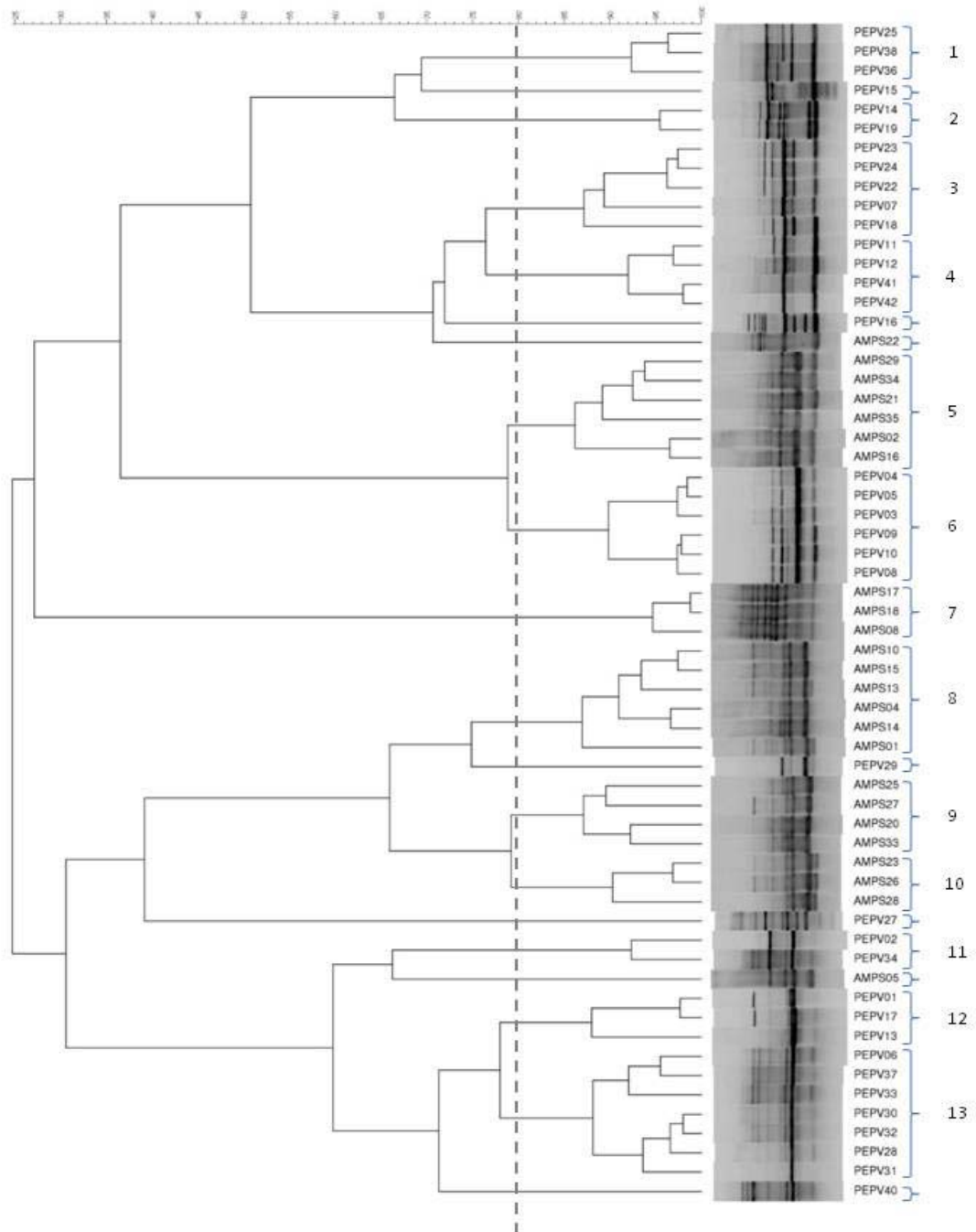


Figura 20. Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas del estudio utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA.

Tabla 8. Grupos de RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos. En negrita, cepas seleccionadas como representantes de cada grupo.

RAPD	Cepas
Grupo 1	PEPV25, PEPV36, PEPV38
rama independiente	PEPV15
Grupo 2	PEPV14 , PEPV19
Grupo 3	PEPV07, PEPV18 , PEPV22, PEPV23, PEPV24
Grupo 4	PEPV11 , PEPV12, PEPV41, PEPV42
rama independiente	PEPV16
rama independiente	AMPS22
Grupo 5	AMPS02, AMPS16, AMPS21, AMPS29, AMPS34 , AMPS35
Grupo 6	PEPV03, PEPV04, PEPV05, PEPV08 , PEPV09, PEPV10
Grupo 7	AMPS08, AMPS17 , AMPS18
Grupo 8	AMPS01, AMPS04 , AMPS10, AMPS13, AMPS14, AMPS15
rama independiente	PEPV29
Grupo 9	AMPS20 , AMPS25, AMPS27, AMPS33
Grupo 10	AMPS23 , AMPS26, AMPS28
rama independiente	PEPV27
Grupo 11	PEPV02 , PEPV34
rama independiente	AMPS05
Grupo 12	PEPV01 , PEPV13, PEPV17
Grupo 13	PEPV06, PEPV28, PEPV30, PEPV31, PEPV32, PEPV33, PEPV37
rama independiente	PEPV40

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la diversidad genética de las cepas analizadas y muestran que las cepas aisladas en Valladolid y en Salamanca se distribuyeron en grupos o ramas diferentes. La diversidad fue mayor, con 8 grupos y 5 cepas independientes en el caso de las cepas aisladas a partir de nódulos de *P. vulgaris* en el suelo de Salamanca, que en el caso de las cepas aisladas a partir de nódulos de *P. sativum* en el suelo de Salamanca, con 5 grupos y 2 cepas independientes. Estos resultados pueden estar relacionados con varios factores dependientes del suelo, ya que son dos suelos diferentes y con diferentes historias de cultivo, y/o de las plantas, ya que tienen diferente grado de promiscuidad y además el cultivo de una leguminosa de manera reiterada en un suelo puede provocar una presión de selección sobre las poblaciones de *Rhizobium* del suelo. En cualquier caso, las cepas de *rhizobia* aisladas mostraron una elevada diversidad genética, lo cuál coincide con los resultados de otros estudios que muestran que cepas aisladas de estas leguminosas presentan perfiles de RAPD diferentes en el mismo y en diferentes suelos (Santillana et al. 2008; Díaz-Alcántara et al. 2014).

3. Identificación de las cepas de *rhizobia*

Se seleccionó un representante de cada grupo de RAPD para llevar a cabo la identificación mediante la secuenciación del gen ribosómico rARN 16S, que es actualmente el gen de referencia para la clasificación de bacterias (Chun et al. 2018). Los resultados de la identificación del gen ribosómico 16S se muestran en la tabla 9. La mayoría de las cepas, excepto la cepa PEPV15, fueron próximas a las especies del grupo

de *R. leguminosarum* que poseen secuencias idénticas en sus genes ribosómicos 16S, *R. leguminosarum*, *R. indigoferae*, *R. laguerreae*, *R. anhuiense*, *R. acidisoli*, *R. sophorae* y *R. hidalgonense*. Sin embargo, las cepas aisladas en el presente trabajo no tienen idénticos genes ribosómicos 16S (Tabla 9). De hecho, solo las cepas PEPV11 y PEPV18 presentaron un 100% de similitud con la secuencia de las cepas tipo de las especies mencionadas, el resto de cepas presentaban porcentajes variables entre el 99,93% y el 99,70%. La cepa PEPV15 presentó un porcentaje de similitud del 98,9% con respecto a *Phyllobacterium brassicacearum* STM196^T, por lo que su análisis se llevó a cabo de forma independiente.

Tabla 9. Relación de las secuencias del gen rARN 16S cepas seleccionadas y su similitud con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas.

Cepa	Especie más próxima	Nº de acceso	Identidad (%)
AMPS04	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
AMPS05	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,70
AMPS17	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
AMPS20	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
AMPS22	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,93
AMPS23	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
AMPS34	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
PEPV01	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,78
PEPV02	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,78
PEPV03	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,70
PEPV11	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	100,00
PEPV14	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
PEPV16	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,93
PEPV18	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	100,00
PEPV27	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
PEPV29	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
PEPV37	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
PEPV38	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,85
PEPV40	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	MRDM01000018	99,78

El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S para las cepas de *Rhizobium* mostró 5 tipos de secuencias diferentes (figura 21). La secuencia de las cepas del tipo I, PEPV11 y PEPV18, fue idéntica a las de las cepas tipo de las especies *R. leguminosarum*, *R. indigoferae*, *R. laguerreae*, *R. anhuiense*, *R. acidisoli*, *R. sophorae* y *R. hidalgonense*. Las secuencias de las cepas del tipo II, AMPS22 y PEPV16 presentaron 1 diferencia en la secuencia del gen ribosómico 16S con respecto a esas mismas especies. La mayoría de las cepas del estudio presentaron el tipo III con 2 diferencias con respecto a esas especies y las secuencias de las cepas PEPV01, PEPV02 y PEPV40 que presentaron el tipo IV mostraron 3 diferencias con respecto a dichas especies. Finalmente, las cepas del tipo V, AMPS05 y PEPV08 presentaron 4 diferencias en la secuencia del gen, con respecto a las cepas tipo de las especies ya

mencionadas además de un inserto de 70 pb que presentan en el inicio de la secuencia del gen.

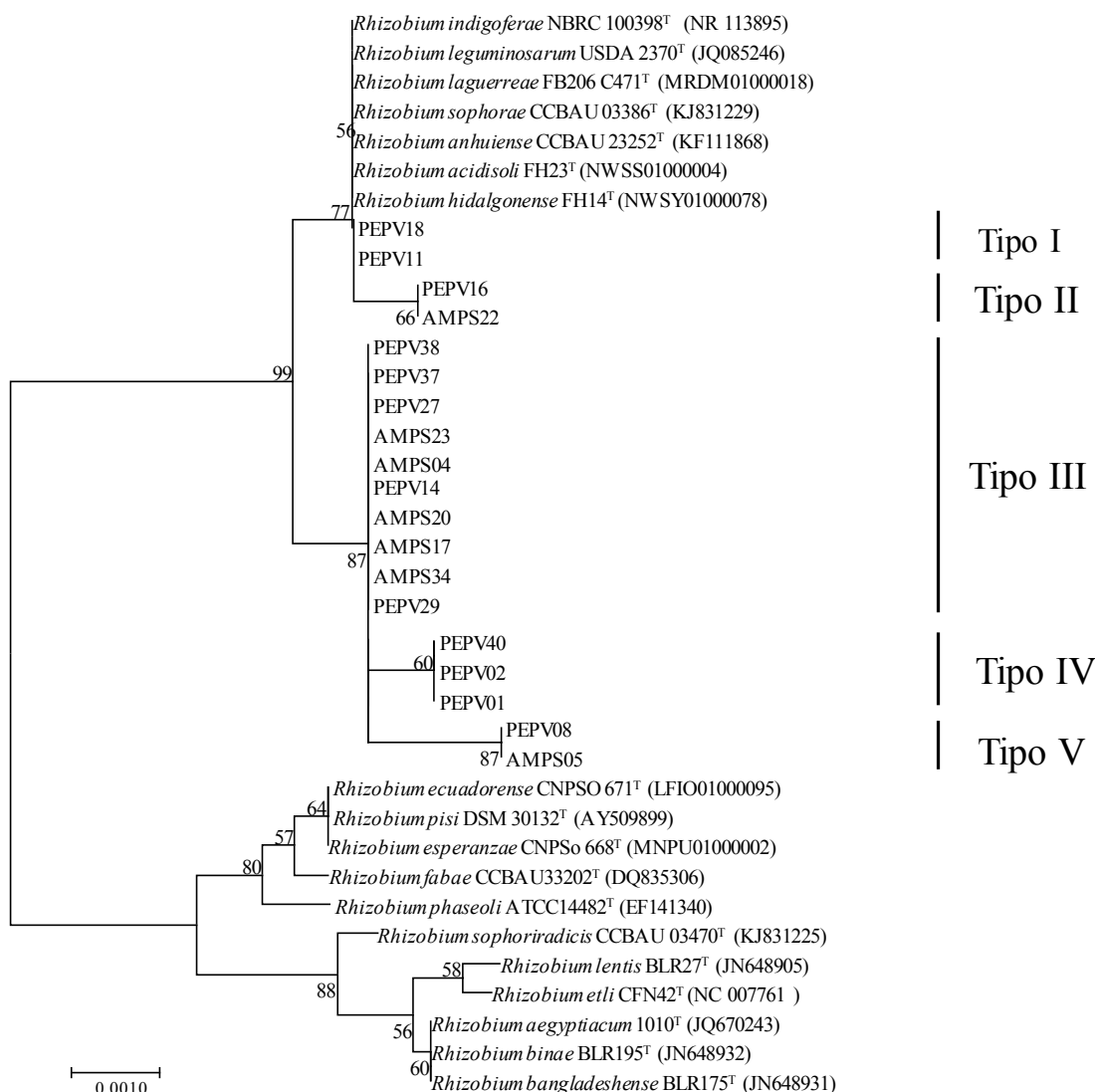


Figura 21. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al género *Rhizobium* y de las especies más cercanas descritas en el género. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

Hay que destacar que el inserto, o *intervening sequence* (IVS), localizado en algunas de las cepas del estudio fue descrito inicialmente por Willems y Collins (1993) en la secuencia del gen ribosómico 16S de *R. tropici* CFN299, que posteriormente se reclasificó en una especie diferente denominada *R. leucaenae*. Para conocer las posibles implicaciones a nivel filogenético de este tipo de inserciones en el gen ribosómico 16S se realizó una búsqueda en Genbank que puso de manifiesto que estos IVS están ampliamente distribuidos en el orden *Rhizobiales*, en especies de los géneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium* y *Ochrobactrum*. En todas ellas los sitios de inserción en el gen son los mismos y presentan secuencias idénticas al inicio (7 pb) y al final (8 pb) del inserto. La mayoría de las cepas cuyo gen 16S contiene un IVS

corresponden a cepas del género *Rhizobium* (Fig. 22). En estas cepas la secuencia del IVS es muy variable, a pesar del pequeño tamaño, y por ello las cepas se distribuyen en varios grupos, algunos de ellos próximos a los formados por cepas de géneros pertenecientes a las familias *Phyllobacteraceae* (*Mesorhizobium*) y *Brucellaceae* (*Ochrobactrum*). Los IVS del gen ribosómico 16S se ha demostrado que no se transcriben (Rainey et al. 1996) y se han propuesto en algunos grupos bacterianos como marcadores filogenéticos a nivel de especie o cepa. por ejemplo, el IVS del género *Faecalibacterium* se ha propuesto para detectar contaminación fecal en aguas (Shen et al. 2016). Sin embargo, la utilidad del IVS de las cepas del orden *Rhizobiales* como marcador filogenético no está clara, ya que las cepas pertenecientes al mismo género (*Rhizobium*) o géneros afines (*Neorhizobium* y *Pararhizobium*) presentan una alta variabilidad, mientras que algunas cepas pertenecientes a familias diferentes presentan IVS de altísima homología (*Mesorhizobium* y *Ochrobactrum*). No obstante, el análisis de algunos IVS puede ser útil para estudios de biogeografía, ya que todas las cepas de la especie *R. leucaenae* presentan idénticas secuencias de genes 16S y de IVS, con independencia de su sitio de aislamiento, lo que indica un origen geográfico común desde el que se han dispersado. En cambio, las cepas de *R. galegae* y *R. huautlense* aisladas en China presentan secuencias del gen ribosómico 16S divergentes, pero IVS similares, al igual que ocurre en algunas cepas del grupo de *R. leguminosarum* aisladas en Europa, Asia y América. En cuanto a las cepas aisladas en este estudio, tienen diferentes genes ribosómicos con respecto a las restantes cepas analizadas, incluyendo pero IVS idéntico (Figuras 22). En todos estos casos, está claro que el IVS tiene un origen filogenético común, pero no es posible dilucidar si se insertó en genes ribosómicos 16S ya diferentes o si las diferencias en los genes ribosómicos se deben a eventos evolutivos posteriores. Por esta razón, es difícil sacar conclusiones en estos momentos acerca de la utilidad del IVS como marcador filogenético en el caso de las especies orden *Rhizobiales*.

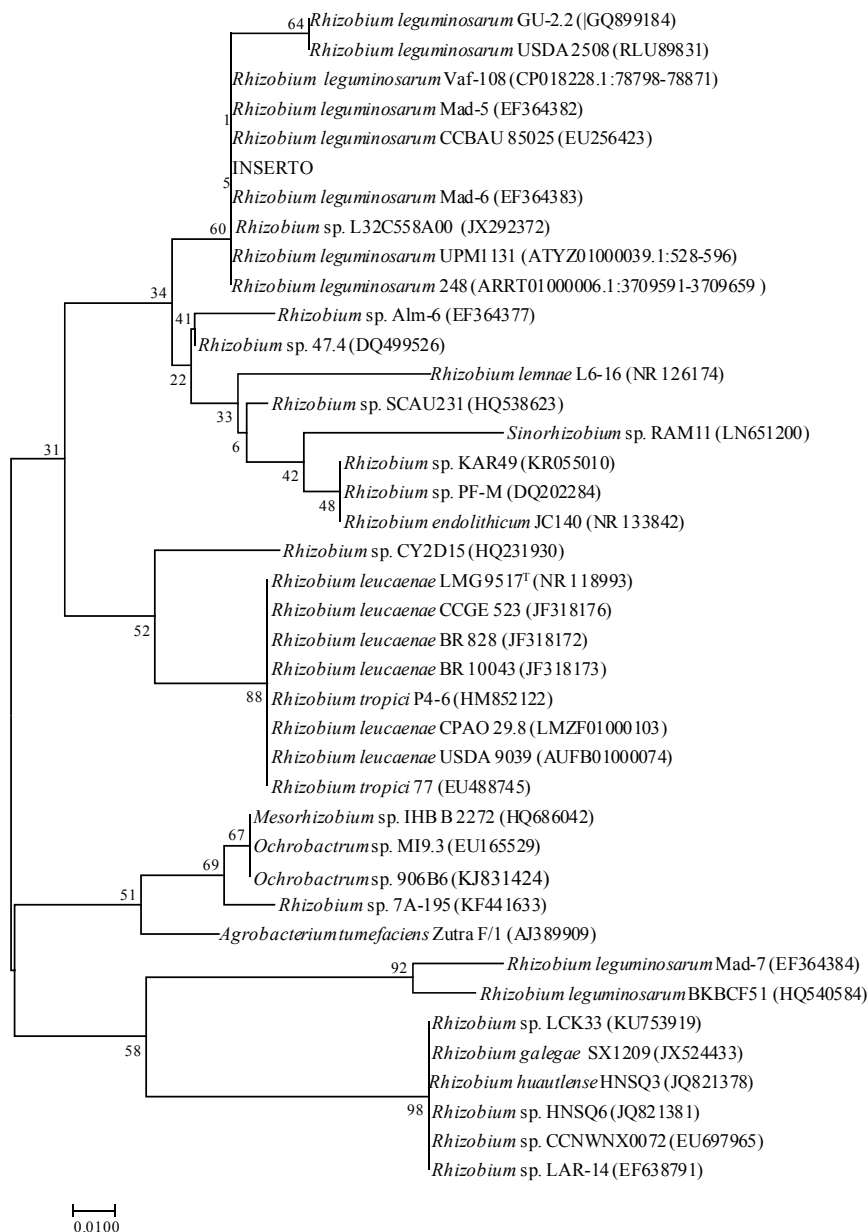


Figura 22. Análisis filogenético del inserto de las cepas PEPV08 y AMPS05 y de las cepas del orden *Rhizobiales* que lo portan. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

Debido a la variabilidad encontrada en el gen ribosómico 16 entre las cepas aisladas y con respecto a las cepas del grupo filogenético de *R. leguminosarum*, para poder identificar la especie a la que pertenecen es necesario analizar otros genes y, dentro de ellos, los más utilizados en el género *Rhizobium* son los genes *atpD* y *recA*, que codifican la subunidad beta de la ATP-sintasa y la recombinasa A (Ribeiro et al. 2015; Yan, Yan, et al. 2017; Cordeiro et al. 2017). Estos dos genes *housekeeping* tienen la ventaja de estar secuenciados en todas las cepas tipo de las especies indistinguibles en base a las secuencias del gen ribosómico 16S del grupo de *R. leguminosarum* (Villadas

et al. 2017). Actualmente se estima que el porcentaje de similitud mínimo de homología en la secuencia de los genes *housekeeping* para asignar una cepa a una especie es del 97% (Saïdi et al. 2014). En nuestro caso, el gen *atpD* mostró una mayor similitud con la secuencia de la cepa tipo de *R. laguerreae* que osciló entre 97,9 y 100% (Tabla 10). El gen *recA* mostró resultados más variables, ya que la mayoría de las cepas fueron más próximas a la cepa tipo de *R. leguminosarum* con similitudes de alrededor de 97%, y sólo el gen *recA* de 6 de las cepas presentaron mayor similitud con respecto a la cepa tipo de *R. laguerreae*, con valores de similitud situados entre el 99,7 y el 100% (Tabla 10).

Tabla 10. Resultado del análisis de las secuencias de los genes *atpD* y *recA* de las cepas seleccionadas.

	<i>atpD</i>		<i>recA</i>	
	Especie más próxima	Similitud (%)	Especie más proxima	Similitud (%)
AMPS04	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	98,31
AMPS05	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,38	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	98,31
AMPS17	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,80
AMPS20	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	97,60
AMPS22	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	97,92	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	97,60
AMPS23	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	97,60
AMPS34	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,36	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	98,31
PEPV01	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00
PEPV02	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00
PEPV08	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,31	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	98,27
PEPV11	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,79
PEPV14	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,11	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	97,47
PEPV16	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	98,51	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	98,52
PEPV18	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	96,93	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00
PEPV27	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,02	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	97,31
PEPV29	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	99,11	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	98,49
PEPV37	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	98,06
PEPV38	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	97,89
PEPV40	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	100,00

Estos resultados muestran que las cepas deben asignarse a la especie *R. laguerreae* aunque algunas de ellas pertenecen a grupos relativamente divergentes de la cepa tipo de esta especie, lo que se puede apreciar claramente tras el análisis de ambos genes, *recA* y *atpD*, concatenados (Fig. 23). Los resultados de este análisis muestran que las cepas se distribuyen en 5 grupos y un linaje (Fig. 23). Como se observa en el árbol filogenético, algunas de las cepas que presentaron el mismo tipo de gen ribosómico 16S se encuentran en diferentes grupos y linajes tras el análisis de los genes concatenados y viceversa. Por ejemplo, las cepas que presentaron el tipo III en el análisis del gen ribosómico 16S se distribuyeron en tres grupos (3, 4 y 6) y un linaje (5) tras el análisis de los genes *recA* y *atpD*. Por el contrario cepas presentaron tipos de genes 16S diferentes, tras el análisis de los genes *recA* y *atpD*, se agruparon juntas, como ocurre con las cepas que forman los grupos 1 y 6. Normalmente los genes *housekeeping* son más variables que el gen ribosómico 16S y su análisis muestra una

mayor divergencia filogenética (Rosselló-Móra y Amann 2015). Esto es lo que ocurre con la cepa tipo de *R. laguerreae* con respecto a la cepa tipo de *R. leguminosarum*, que se consideran especies diferentes, aunque sus genes ribosómicos 16S son iguales debido a la divergencia presentada por sus genes *housekeeping* (Saïdi et al. 2014). Sin embargo, en este trabajo hemos encontrado resultados inversos ya que las cepas PEPV01, PEPV02 y PEPV40 presentan genes *recA* y *atpD* idénticos a los de la cepa tipo de *R. laguerreae* y, sin embargo, sus genes ribosómicos 16S no son iguales. Estos resultados muestran claramente que el análisis del gen ribosómico 16S debe ser complementado con el de otros genes para la identificación a nivel de especie, algo que se está imponiendo en la actualidad en todos los grupos bacterianos. No obstante, establecer los límites entre especies va a resultar igualmente complicado porque existen muchas cepas que ocupan posiciones filogenéticas intermedias entre dos o más especies y su asignación a una de ellas resulta muy difícil. De hecho, algunas de las cepas aisladas en este estudio, tras el análisis de los dos genes *housekeeping*, se localizan en grupos divergentes de la cepa tipo de *R. laguerreae*, aunque los valores de similitud superiores al 97% muestran claramente que deben asignarse a esta especie (Saïdi et al. 2014). En cualquier caso, nuestros resultados muestran que la variabilidad genética de la especie *R. laguerreae* es muy alta como se ha demostrado en otros estudios recientes en cepas aisladas a partir de diferentes leguminosas en el norte de Africa (Saïdi et al. 2014; Belhadi et al. 2018; Taha et al. 2018, Benidire et al., 2018).

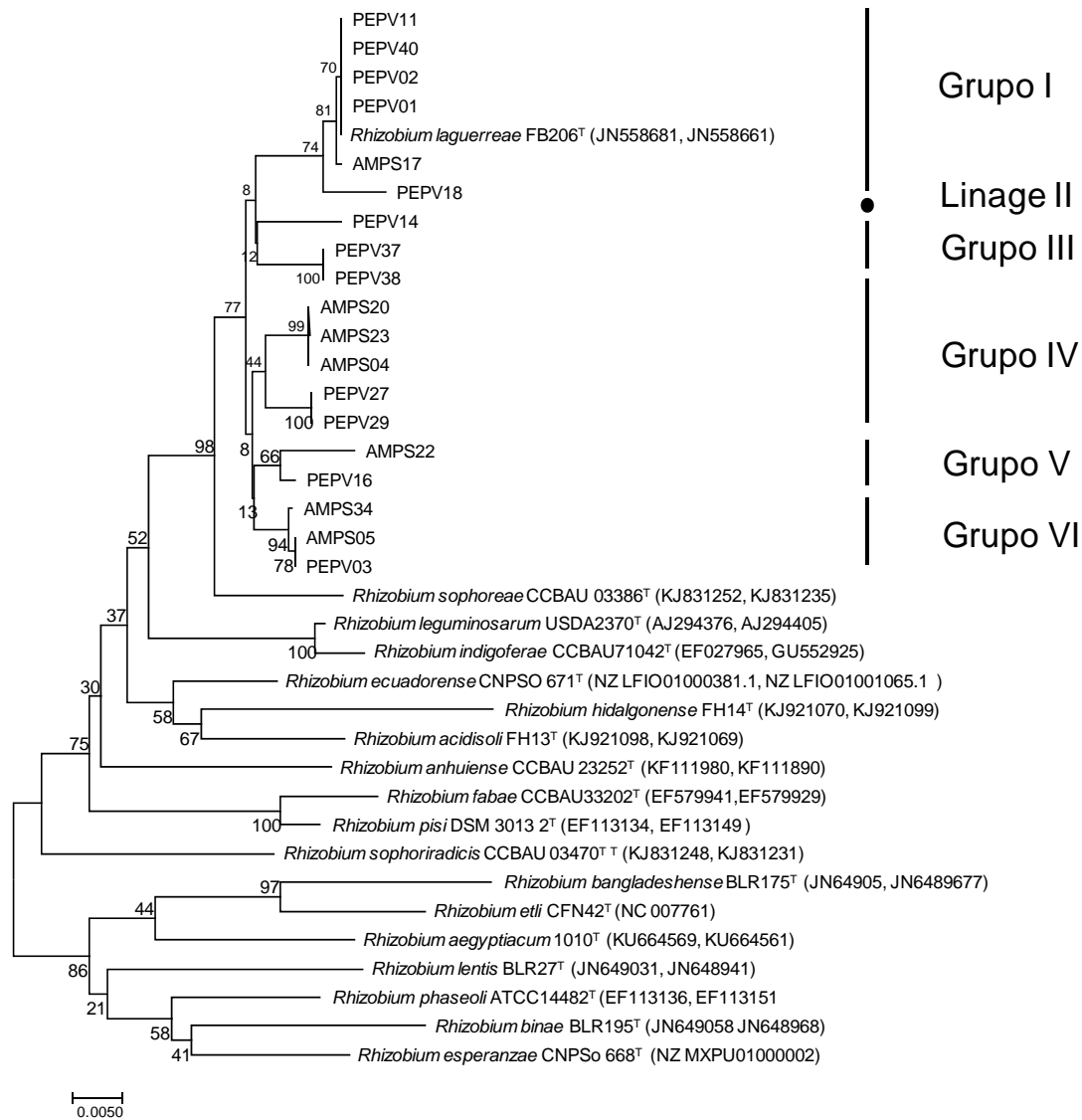


Figura 23. Análisis filogenético de la concatenación de los genes *recA* y *atpD* concatenados de las cepas de este estudio y de sus especies más cercanas descritas en el género. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

3.1. Análisis de la cepa PEPV15

Como ya se ha mencionado anteriormente, la cepa PEPV15 no era próxima a las especies del género *Rhizobium*, sino a las del género *Phyllobacterium* y el análisis filogenético de este gen mostró que esta cepa PEPV15 formaba un cluster con las especies *P. brassicacearum* y *P. burgnonense* (Flores-Félix et al. 2013). El porcentaje de similitud con respecto a las dos especies próximas *P. brassicacearum* y *P. burgnonense* era menor del 99%, por lo que la cepa PEPV15 no pertenecía a ninguna de ellas y se describió una especie nueva del género *Phyllobacterium* que denominamos *Phyllobacterium endophyticum* (Flores-Félix et al. 2013).

La descripción de una nueva especie bacteriana debe de cumplir una serie de mínimos estándar que difieren entre los diversos grupos de bacterias pero que siempre comprenden la caracterización fenotípica, quimiotaxonómica y genotípica. Para todos los grupos de bacterias, la caracterización genotípica debe incluir el análisis filogenético del gen ribosómico 16S, la hibridación de ADN total cuando el nuevo aislado presenta una similitud en la secuencia de este gen superior al 97%, y el cálculo del contenido en G+C. En el caso del género *Phyllobacterium*, además es necesario el análisis filogenético del gen *atpD*. La caracterización quimiotaxonómica de las nuevas especies depende mucho del grupo de bacterias del que se trate, en el caso concreto de *Phyllobacterium* se exige el análisis de ácidos grasos. Y finalmente, la caracterización fenotípica incluye para todas las bacterias pruebas de asimilación de fuentes de carbono, producción de enzimas y crecimiento en diferentes condiciones de cultivo, aunque las pruebas concretas pueden variar para cada grupo bacteriano.

El análisis de la secuencia del gen ribosómico 16S de la cepa PEPV15 en el momento de la descripción de las especies presentaba un 98,9% de similitud con respecto a *Phyllobacterium brassicacearum* LMG 22836, un 98,6% de similitud con respecto a *P. bourgognense* LM22837 y un 98,4% de similitud con *P. trifolii* PETP02, siendo estas las especies más próximas como se muestra en el árbol filogenético de la figura 24, que se incluyó en la publicación de la nueva especie. Por esta razón, estas fueron las especies seleccionadas para incluirlas en el resto de los análisis necesarios para dicha descripción.

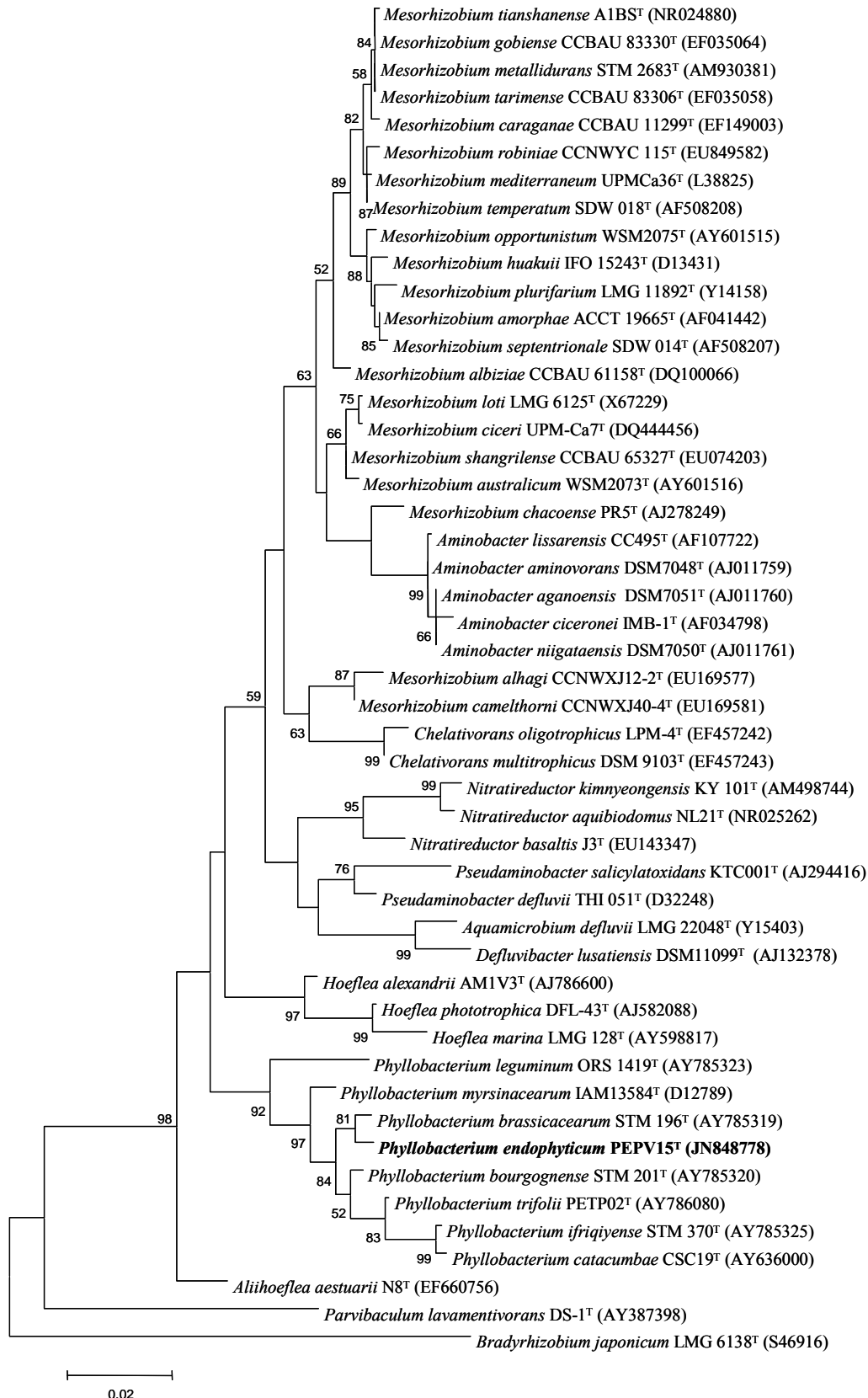


Figura 24. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de la cepa PEPV15 junto a las especies del género *Phyllobacterium* y otros géneros de la familia *Phyllobacteriaceae*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

El análisis filogenético del gen *atpD* mostró que los géneros *Phyllobacterium* y *Mesorhizobium* formaban dos clados separados en la familia *Phyllobacteraceae*. La secuencia obtenida presentaba porcentajes de similitud menores del 88% con otras especies del género *Phyllobacterium*, siendo las especies que presentaban porcentajes de similitud más cercanos las mismas que en el caso del gen ribosómico 16S (Fig. 25).

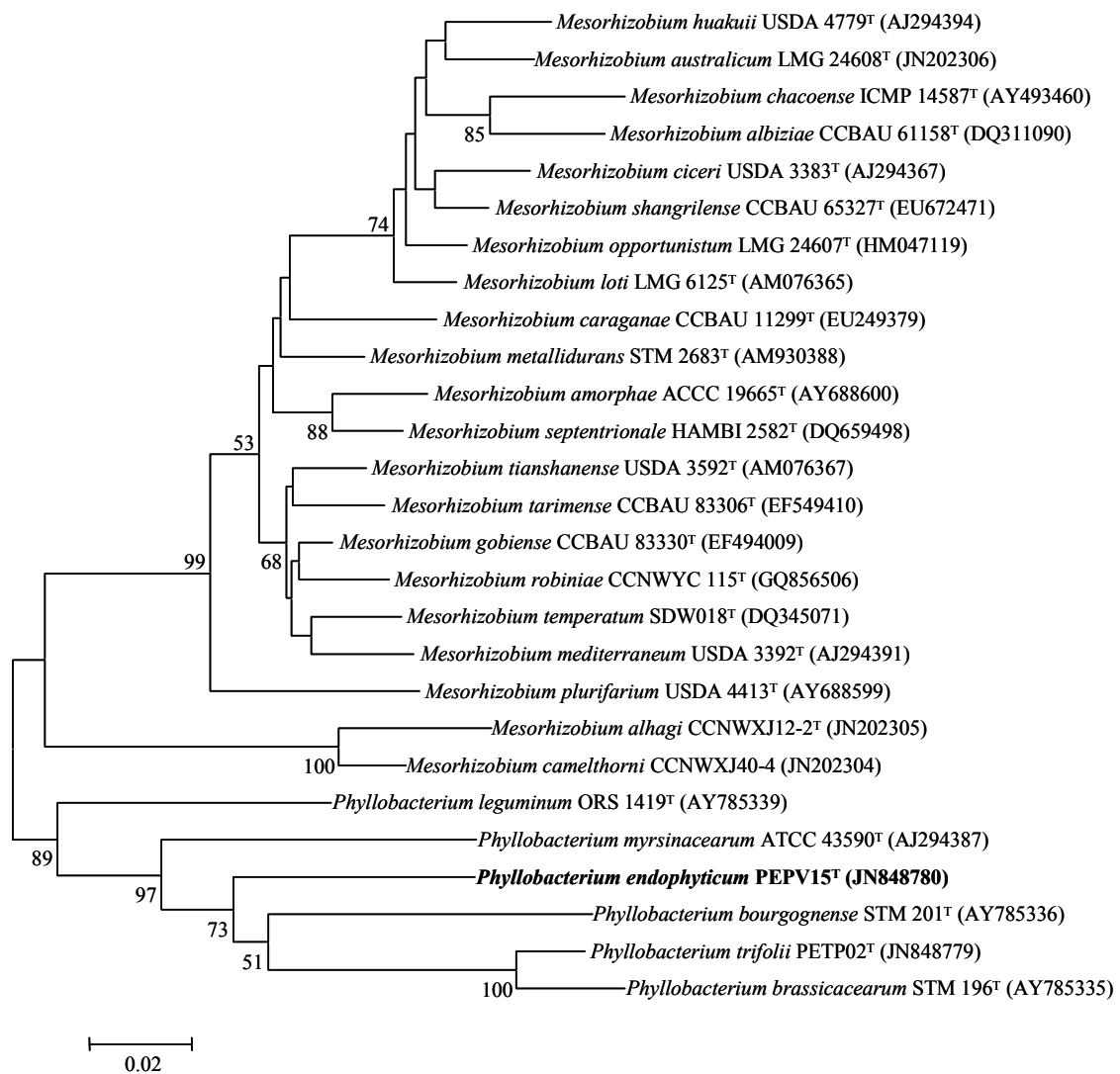


Figura 25. Análisis filogenético del gen *atpD* de la cepa PEPV15 junto con las secuencias de las cepas tipo pertenecientes a la familia *Phyllobacteraceae*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

Aunque los resultados del análisis del gen *atpD* indicaban claramente que la cepa PEPV15 representaba una nueva especie de *Phyllobacterium*, teniendo en cuenta que los valores de similitud en el gen 16S fueron superiores al 97%, fue necesario llevar a cabo la hibridación de ADN total. Para ello, la cepa PEPV15 se hibridó con *P.*

brassicacearum LMG 22836^T, *P. bourgognense* LMG 22837^T y *P. trifolii* PETP02^T y los resultados mostraron 37, 11 y 10% de hibridación, respectivamente. Todos estos valores son inferiores al 70% que es el valor límite para la definición de especies bacterianas y que confirmaron definitivamente que la cepa PEPV15 pertenecía a una especie diferente. El contenido en G+C de esta cepa es 52 mol %, un valor que está dentro del rango de los obtenidos para otras especies del género *Phyllobacterium* (Mantelin et al. 2006).

El análisis de quinonas mostró que la cepa PEPV15 contiene Q-10 como quinona mayoritaria (88%) y pequeñas cantidades de Q-9 (12%). Los análisis de ácidos grasos se llevaron a cabo en las cepas PEPV15, *Phyllobacterium brassicacearum* LMG 22836^T, *Phyllobacterium bourgognense* LMG 22837^T y *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T (Tabla 11). Los resultados obtenidos mostraron que los ácidos grasos mayoritarios fueron C_{16:0} con un 22,6%, C_{19:0} ciclo ω8c con un 13.9% y el conjunto denominado *summed feature 8* (C_{18:1} ω 6c/C_{18:1} ω 7c) con un 39,1%. La cepa PEPV15 difiere del resto de cepas estudiadas en la presencia minoritaria de C_{18:12} OH. La cantidad de C_{16:0} fue diferente con respecto a las cepas tipo de *Phyllobacterium brassicacearum* y *Phyllobacterium trifolii*. Con respecto a la cepa tipo de *Phyllobacterium brassicacearum*, se diferenció también en los ácidos grasos de la *summed feature 8* (C_{18:1} 6c/C_{18:1} 7c y con respecto a la cepa tipo de *Phyllobacterium bourgognense* en la cantidad de C_{18:1} (Tabla 12).

Tabla 11. Composición de ácidos grasos de la cepa PEPV15 y las especies tipo más cercanas del género *Phyllobacterium*. 1, PEPV15^T; 2, *Phyllobacterium brassicacearum* LMG 22836^T; 3, *Phyllobacterium bourgognense* LMG 22837^T; 4, *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T. nd, No Detectado. *Summed features*: 2, C₁₄: 1 3-OH/C₁₆: 1 iso-1; 3, C₁₆: 1v6c/C₁₆: 1v7c; 8, C₁₈: 1v6c/C₁₈: 1v7c

	1	2	3	4
<i>C13:1 at 12-13</i>	nd	nd	1.6	nd
<i>C14:0</i>	0.71	nd	1.4	nd
<i>C16:0</i>	22.6	15.8	22.1	12.3
<i>C18:0</i>	1.9	1.5	6.4	1.8
<i>C16:0 3OH</i>	1.6	2.3	1.6	1.3
<i>C18:1 2OH</i>	1.7	nd	nd	nd
<i>C18:0 3OH</i>	0.6	0.7	nd	nd
<i>C17:0 ciclo</i>	2.2	0.4	1.4	nd
<i>C19:0 ciclo ω 8c</i>	13.9	5.4	10.7	6.4
<i>C20:2 ω 6,9c</i>	nd	0.4	nd	0.7
<i>C18:1 ω 7c 11-metilo</i>	9.2	9.7	9.9	10.7
<i>Summed feature 2</i>	3	3.1	1.4	1.5
<i>Summed feature 3</i>	3.6	2.6	4.3	2.5
<i>Summed feature 8</i>	39.1	58.3	39.3	62.9

3.1.1. Actividades enzimáticas y utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.

Los resultados de la caracterización fenotípica mostraron que la cepa PEPV15 es un bacilo Gram negativo aerobio con un rango de crecimiento entre 5°C y 39°C y pH 6 y 8 y toleró hasta un 2% de NaCl (p/v). La cepa PEPV15 hidroliza la esculina, pero no produce β -galactosidasa, arginina dehidrolasa, indol, ureasa ni gelatinasa y no reduce los nitratos. Esta cepa utiliza como fuente de carbono D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, malato, L-ramnosa, D-ribosa, inositol, lactato, L-alanina, L-fucosa, D-sorbitol, 3-hidroxi-butirato y L-prolina y no utiliza sacarosa, maltosa, itaconato, suberato, glucógeno, 3-hidroxi-benzoato, L-serina, salicina, melobiosa, propionato, caprato, valerato, citrato y 4-hidroxi-benzoato. En cuanto a la resistencia natural a antibióticos, la cepa PEPV15 es resistente a ampicilina, penicilina, cefuroxima, cloxacilina y eritromicina y sensible a ciprofloxacina, gentamicina, neomicina, polimixina B y tetraciclina. Las diferencias en las características fenotípicas entre las cepas PEPV15, *Phyllobacterium brassicacearum* LMG 22836^T, *Phyllobacterium bourgognense* LMG 22837^T y *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Diferencias fenotípicas encontradas entre las cepas PEPV15 y las especies tipo más cercanas del género *Phyllobacterium*. Cepas: 1, PEPV15^T; 2, *Phyllobacterium brassicacearum* LMG 22836^T; 3, *Phyllobacterium bourgognense* LMG 22837^T; 4, *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T. +, Positivo; -, negativo; W, débil. *Datos obtenidos en API 20NE. †Datos obtenidos en API ID32GN. ‡ Estos datos difieren de los descritos en

Característica	1	2	3	4
Crecimiento a 37 °C	+	-	-	+
Crecimiento en presencia de 2% NaCl	+	w	-	+
Asimilación de:				
Maltosa*†	-	+	+	+
Gluconato†	-	-‡	-‡	+
Sacarosa†	-	+	+	+
Malonato†	w	+	-	-
Valerato†	-	+	+	+
L-alanina†	+	+‡	-	w
4-hydroxi-benzoato†	-	+	-	-
Resistencia a:				
Cefuroxima	+	+	-	+
Polimixina B	-	+	-	-

3.2. Análisis de los genes simbióticos

Dentro de los genes denominados simbióticos, el gen *nodC* ha sido estudiado extensamente en *Rhizobium* y está relacionado con el rango de hospedador y con el grado de promiscuidad de las leguminosas y por ello, se utiliza para la diferenciación de

simbiovariedades (sv.) (Mulas et al. 2011; Díaz-Alcántara et al. 2014). Este gen se secuenció en todos los representantes de los grupos de RAPD obtenidos, excepto en la cepa PEPV15 en la que no se observó amplificación. Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en Genbank y los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas, tanto las aisladas de *Pisum sativum* como las aisladas de *Phaseolus vulgaris*, pertenecían a la simbiovariedad viciae, dado que sus secuencias del gen *nodC* presentaron más del 95% de similitud con respecto a las secuencias de este gen en cepas de dicha simbiovariedad. Los resultados del análisis filogenético de estas secuencias se muestran en la figura 26, observándose una elevada variabilidad en las secuencias del gen *nodC* de las cepas de la simbiovariedad viciae. Las cepas aisladas en este estudio se distribuyeron en cuatro grandes grupos y sólo uno de ellos contiene cepas aisladas en los dos hospedadores estudiados. Sólo dos de estos grupos contienen además cepas tipo, concretamente el grupo A las de *R. laguerreae*, *R. binae* y *R. fabae* y el grupo D las de *R. lentis* y *R. bangladeshense*. Las cepas tipo de las especies *R. leguminosarum* y *R. pisi* formaron un grupo aparte. Los resultados del análisis del gen *nodC* son los esperados en el caso de *P. sativum*, una leguminosa estricta que es nodulada por la simbiovariedad viciae en todo el mundo, pero son más interesantes en el caso de *P. vulgaris*, una leguminosa americana que es nodulada habitualmente por la simbiovariedad phaseoli (Velázquez et al. 2017a). Esto se debe a que esta leguminosa no se ha sembrado en la región analizada, donde la leguminosa tradicionalmente cultivada es la lenteja al igual que el guisante (*P. sativum*) que es nodulada, por la simbiovariedad viciae. Por lo tanto, estos resultados en primer lugar confirman que la simbiovariedad phaseoli, que nodula *P. vulgaris* en sus centros de distribución americanos, llegó a España con las semillas de esta leguminosa y sus plásmidos simbióticos se transfirieron a especies europeas (García-Fraile et al. 2010; Mulas et al. 2011). En segundo lugar, ponen de manifiesto que la alta promiscuidad de *P. vulgaris*, en ausencia de su endosimbionte natural, le permite nodular con las simbiovariedades locales, en este caso con la simbiovariedad viciae. Estos resultados son muy interesantes desde el punto de vista de la biogeografía de la simbiosis *Phaseolus-Rhizobium*, ya que muestran la necesidad de analizar las poblaciones de *Rhizobium* que nodulan en otros suelos europeos, africanos y asiáticos con diferentes historias de cultivo para *P. vulgaris*.

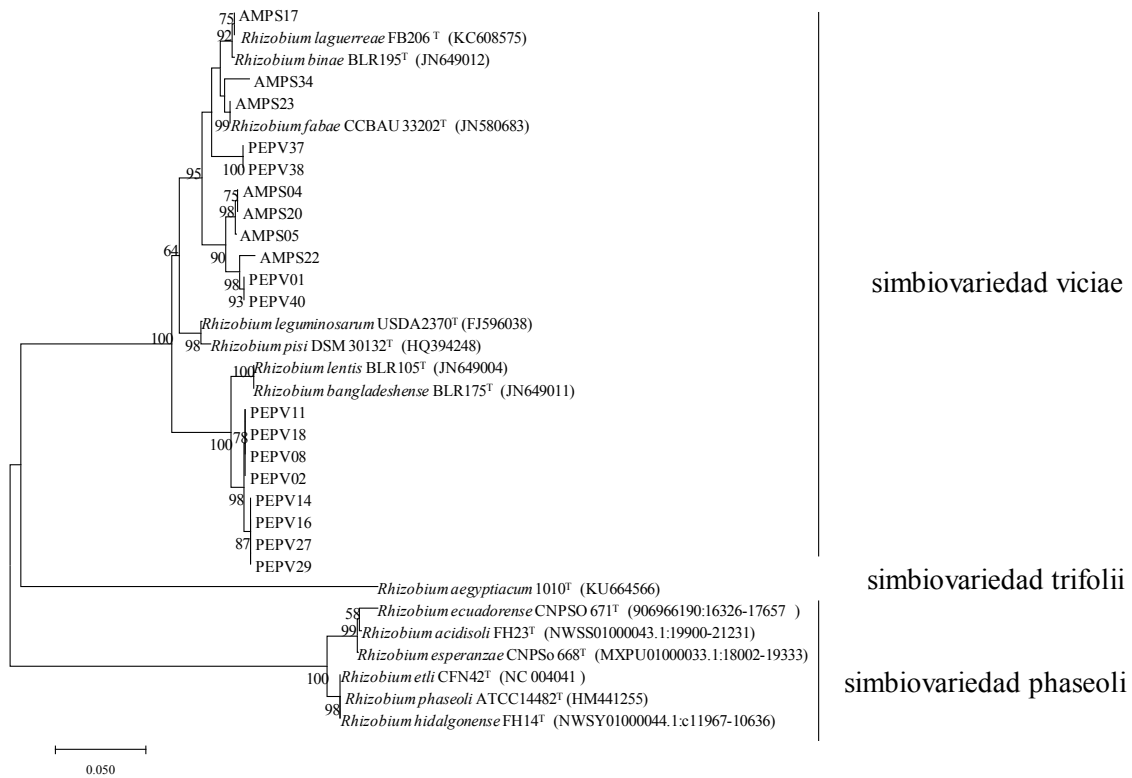


Figura 26. Análisis filogenético del gen *nodC* de los aislados de este estudio pertenecientes y las cepas tipo más cercanas del género *Rhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

4. Estudio de los mecanismos PGPB

La selección de bacterias con el fin de diseñar un biofertilizante precisa del estudio de sus características de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, entre los cuáles cabe destacar la solubilización de fosfato, la producción de sideróforos y la síntesis de fitohormonas (Zandi y Basu 2016). El estudio de estos mecanismos, que permite realizar un *screening* de los aislados cuando el número de cepas es alto, debe ir acompañado del análisis de la capacidad de colonización de las raíces de las plantas, un aspecto muy estudiado en el caso de *Rhizobium* tanto en leguminosas (Robledo et al. 2012) como en no leguminosas (García-Fraile et al. 2012; José D. Flores-Félix et al. 2013; Flores-Félix, Silva, et al. 2015; Flores-Félix, Marcos-García, et al. 2015).

En este estudio se han analizado 3 mecanismos de promoción del crecimiento en plantas, la producción de indol acético, la producción de sideróforos y la solubilización de fosfato bi y tricálcico y los resultados se muestran en la tabla 13

Tabla 13. Solubilización de fosfato (PSI), producción de sideróforos, producción de ácido indol acético (mg/l)

Cepa	PSI		Sideróforos	IAA (mg/l)
	Ca ₂ PO ₃	Ca ₃ (PO ₃) ₂		
AMPS04	0,00	0,00	+	82
AMPS05	0,00	0,00	+	81
AMPS17	0,00	0,00	+	40
AMPS20	0,00	0,00	-	24
AMPS22	0,00	0,00	-	23
AMPS23	1,33	0,00	+	23
AMPS34	1,17	0,00	++	79
PEPV01	1,17	0,00	+	78
PEPV02	0,00	0,00	-	39
PEPV08	1,33	0,00	w	97
PEPV11	0,00	0,00	-	63
PEPV14	1,30	0,00	+	80
PEPV15	2,25	2,14	++	19
PEPV16	2,00	1,88	+	77
PEPV18	0,00	0,00	++	59
PEPV27	1,40	0,00	+	17
PEPV29	1,40	0,00	+	63
PEPV37	1,50	0,00	++	33
PEPV38	1,33	0,00	+	43
PEPV40	1,33	0,00	+	54

4.1.Solubilización de fosfato

El fósforo es, tras el nitrógeno, el nutriente más limitante para la producción agrícola, ya que su disponibilidad suele ser limitada en el suelo y aunque su déficit trata de ser paliado mediante la aplicación de fertilizantes inorgánicos, su aplicación redonda únicamente en un rendimiento parcial, ya que las condiciones de pH de los suelos determinan que este elemento no se encuentre en formas solubles (Giassi et al. 2016). No obstante, aunque la cantidad de fósforo soluble suele ser muy limitada, la concentración de fósforo en formas insolubles en el suelo es, con frecuencia, muy elevada (Merlin et al. 2013). Por esta razón, la búsqueda de microorganismos solubilizadores de fosfato debe ser uno de los pilares fundamentales en el diseño de biofertilizantes eficaces, teniendo en cuenta que la solubilización de fosfato es una característica muy extendida entre diferentes grupos bacterianos como *Pseudomonas* (y muchos otros géneros que se han separado de él a lo largo del tiempo), *Bacillus* y *Enterobacter* (Anand et al. 2016) y dentro de los *rhizobia*, principalmente *Mesorhizobium* (Imen et al. 2015; Zaidi y Khan 2006). No obstante, recientemente se ha publicado que la solubilización de fosfato varía mucho con el tipo de sustrato utilizado (Bashan et al. 2013) y, por ello, en este estudio se han probado dos tipos diferentes de fosfato, fosfato bicálcico (Ca₂PO₃) y fosfato tricálcico (Ca₃(PO₃)₂).

Para facilitar la comparación de los resultados se utilizó el índice de solubilización de fosfato o PSI (Phosphate Solubilization Index) y se obtuvieron resultados muy diferentes cuando se utilizó uno u otro fosfato, ya que, en el caso del fosfato bicálcico, la mayoría de las cepas analizadas fue capaz de solubilizarlo, pero sólo las cepas *R. laguerreae* PEPV16 y *P. endophyticum* PEPV15 fueron capaces de solubilizar fosfato de forma destacable (Tabla 13). Como en ambos casos el índice de solubilización fue superior a 1,7, que se puede considerar un valor elevado, estas dos cepas pueden considerarse buenos solubilizadores de fosfato (Fig. 26). Varios estudios muestran que la habilidad de solubilizar fosfato es común en las cepas del género *Rhizobium*, aunque puede presentar grandes variaciones, que van desde el 10 al 70%, entre aislados de diferentes suelos, por lo que esta habilidad podría depender de las condiciones del suelo en las que han evolucionado las bacterias (Alikhani et al. 2006; Sridevi y Mallaiiah 2009; Taktek et al. 2015). Concretamente, la cepa PEPV16 presentó valores de PSI similares a los descritos para cepas de la especie *Rhizobium leguminosarum* (Alikhani et al. 2006).

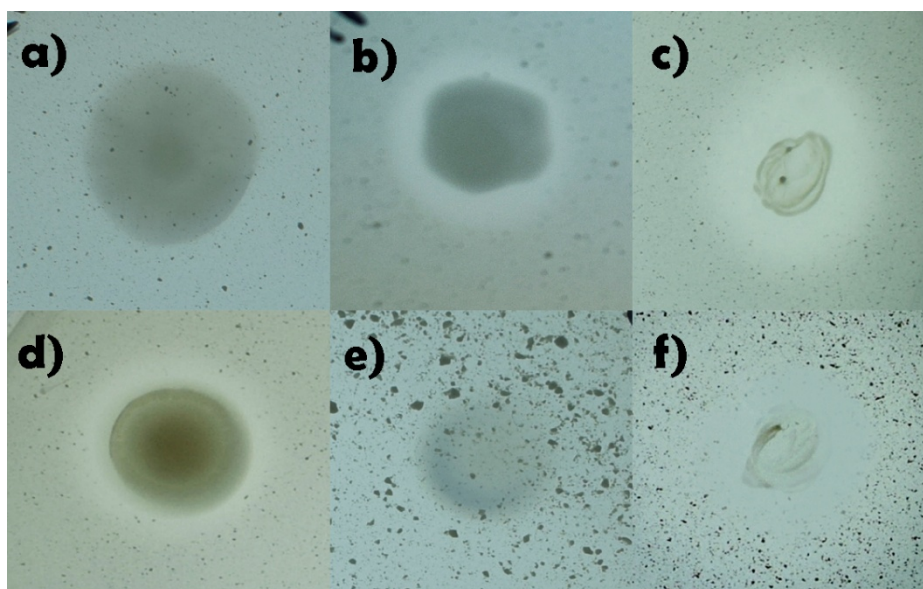


Figura 26. Solubilización de fosfato en fosfato bicálcico a) AMPS05 (negativa), b) AMPS23 c) PEPV15 d) PEPV38 y fosfato tricálcico e) AMPS20 (negativo) y f) PEPV15

. En cuanto a la cepa *P. endophyticum* PEPV15, que presentó la mayor capacidad para solubilizar fosfato, es un buen candidato para ser utilizado como biofertilizante ya que, además es bien conocida la capacidad del género *Phyllobacterium* para interactuar positivamente con las plantas (Kerstens y Montagu 1990; Contesto et al. 2010; Jiao et al. 2015; Lei et al. 2008; Xu et al. 2014). Es destacable que presentó una capacidad similar para solubilizar tanto fosfato bicálcico como fosfato tricálcico y presentó PSI similares a los descritos para cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Armada et al. 2016; Pereira et al. 2016) e incluso de bacterias acidolácticas, que son grandes productoras de ácido y por tanto suelen presentar actividades de solubilización de fosfato muy elevadas (Giassi et al. 2016; Lamont et al. 2017).

4.2. Producción de sideróforos

El hierro es uno de los elementos más importantes en el metabolismo bacteriano y tiene un papel fundamental en los cultivos vegetales actuando como cofactor de gran cantidad de rutas metabólicas. Se puede encontrar en concentraciones destacables en el suelo y puede presentarse en dos formas de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}), siendo la forma Fe^{3+} la más abundante, y la que sería la menos disponible para las plantas al formar óxidos e hidróxidos que limitan su biodisponibilidad (Radzki et al. 2013). La forma Fe^{2+} es mucho más disponible para las plantas, pero sólo se encuentra en ambientes anóxicos pues en presencia de oxígeno rápidamente se oxida a Fe^{3+} (Chu et al. 2010). Para paliar este déficit, los microorganismos han desarrollado un sistema eficiente de captación de hierro a través de la síntesis de compuestos orgánicos capaces de quelar el Fe^{3+} , que se denominan sideróforos, y presentan bajo peso molecular, entre 200 y 2000 Da, pudiendo interactuar con otros metales pesados como Mg^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} (Złoch et al. 2016).

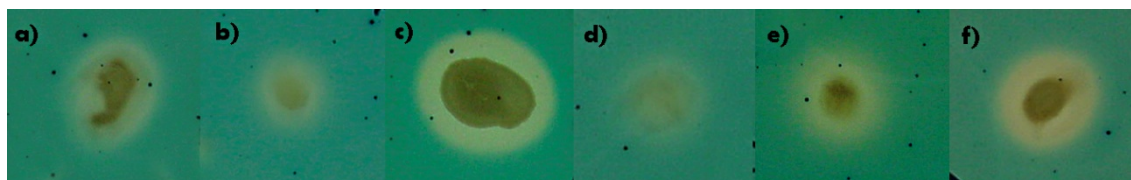


Figura 27. Producción de sideróforos en medio M9-CAS-agar de diferentes cepas observándose distintas actividades. a) PEPV01, b) PEPV08, c) PEPV15, d) AMPS22, e) AMPS23 y f) AMPS34.

El análisis de la capacidad de producción de sideróforos mostró que la mayoría de las cepas analizadas originaban halos en medio CAS (Tabla 13), aunque sólo tres cepas, AMPS34, PEPV15, PEPV18 y PEPV37 presentaron una capacidad de producción de sideróforos considerable. En la figura 27 se muestran varios ejemplos de la producción de sideróforos por las cepas de *Rhizobium* y *Phyllobacterium* aisladas en este estudio. Aunque los principales géneros estudiados en cuanto a la producción de sideróforos han sido *Pseudomonas* y *Bacillus* (Hayat et al. 2010; Paul y Lade 2014), algunos estudios han destacado la capacidad de los géneros *Rhizobium* y *Phyllobacterium* de producir sideróforos, aunque éste no sea un mecanismo muy común en el primero de estos géneros (Saïdi et al. 2013; Vejan et al. 2016), por lo que los datos de este estudio confirman el gran potencial del género *Rhizobium* para producir este tipo de compuestos.

4.3. Producción de ácido indól acético

La producción de fitohormonas, que juegan un papel fundamental en el desarrollo de las plantas, es otro de los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal. Entre ellas cabe destacar el ácido indol acético, una fitohormona del grupo de las auxinas, producida de forma natural por las plantas, y a cuyos niveles

contribuyen activamente numerosos microorganismos de la rizosfera (Dudeja et al. 2012; Narula et al. 2013). Esta fitohormona juega un papel fundamental en el desarrollo de la plantas influyendo en la elongación de los tallos, el desarrollo radicular y de raíces secundarias, aunque también tiene un papel clave en la colonización de bacterias patógenas como *Agrobacterium* (Spaepen et al. 2007). La síntesis bacteriana de ácido indol acético se lleva a cabo mayoritariamente a partir de L-triptófano, un aminoácido presente en los exudados de las raíces de las plantas, produciendo un efecto positivo cuando el producto vuelve a ser absorbido por las raíces (Ali y Nasim 2010). En el caso del género *Rhizobium*, se ha visto cómo la adición al medio de este aminoácido multiplica por 10 la cantidad de ácido indol acético sintetizado (Bhattacharjee et al. 2011), siendo éste un claro reflejo de la asociación de este género con las plantas.

Todas las cepas aisladas en este estudio fueron capaces de sintetizar ácido indol acético en concentraciones que oscilaron entre valores inferiores a 20 mg/l, con la producción mínima en la cepa PEPV27 (17 mg/l), hasta valores cercanos a 100 mg/l en la cepa PEPV08 (97 mg/l). Los resultados para todas las cepas de *Rhizobium* aisladas en este estudio se muestran en la tabla 13 y en la figura 28.

Se ha mostrado en estudios previos una relación directa entre la masa radicular y aérea de las plantas y la concentración de ácido indol acético producida por las bacterias hasta concentraciones de 90 µg/ml (Gumiere et al. 2014), rango en el que se encuentran la mayoría de las cepas aisladas en este estudio. Se deben seleccionar, por tanto, como biofertilizantes cepas que no superen estas concentraciones para no causar problemas en las plantas, ya que concentraciones elevadas de esta auxina son producidas por bacterias patógenas como *Pseudomonas savastanoi* o *Agrobacterium tumefaciens* durante el proceso de colonización de las plantas, más concretamente, durante la creación de agallas (Spaepen et al. 2007; Gohlke y Deeken 2014).

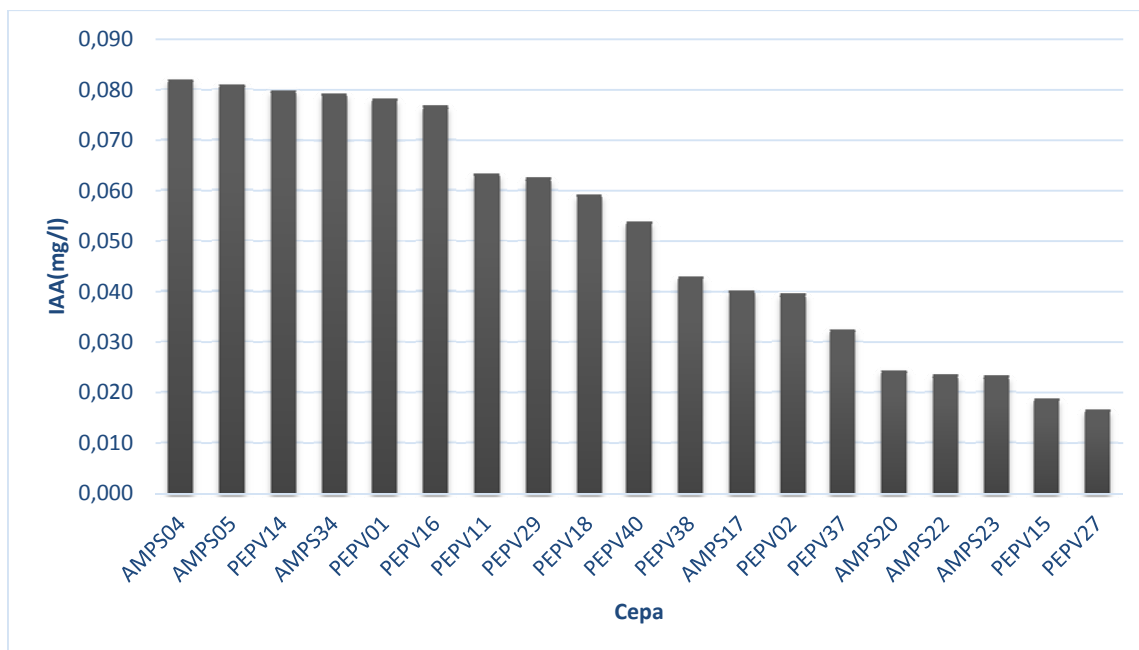


Figura 28. Valores de producción de ácido indol acético ordenados de mayor a menor por las cepas estudiadas.

Teniendo en cuenta los resultados globales del estudio de los mecanismos de promoción *in vitro* de las cepas aisladas, se concluyó que las cepas *R. laguerreae* PEPV16 y *P. endophyticum* PEPV15 son las cepas con mejor potencial como posibles biofertilizantes, aunque en los estudios de colonización de las raíces se incluyeron todas las cepas.

5. Análisis del potencial de colonización de las raíces

La interacción de las bacterias con el medio está determinada por su capacidad para colonizar superficies de forma activa y, aunque existen múltiples factores implicados en este proceso, las características de la bacteria a nivel de producción tanto de exopolisacáridos como de enzimas reguladoras, tienen un papel fundamental (Robledo et al. 2012; Janczarek et al. 2015). También tiene un papel determinante la capacidad para formar biofilms, comunidades organizadas donde la comunicación bacteria-bacteria juega un rol determinante modulando el desarrollo de individuos para coordinar la expresión génica de la colonia (Dixit et al. 2017). En nuestro caso hemos estudiado la capacidad para sintetizar celulosa, de producir celulasas, la formación de biofilms y la producción de señales de *Quorum sensing*.

5.1. Producción de celulosa

La capacidad de las bacterias rizosféricas, y principalmente de los *rhizobia*, para adherirse a superficies biológicas o inorgánicas está determinada por su habilidad para sintetizar diferentes polisacáridos, entre los que destaca la celulosa (Janczarek et al. 2014). Este polisacárido ha mostrado tener especial relevancia en los procesos de adhesión, aglutinación celular y estabilización de biofilms debido a su capacidad para

crear extensas redes tridimensionales entre las fibrillas (Kumar et al. 2007). En nuestro caso, se estudió la capacidad de las cepas aisladas para producir celulosa en medio suplementado con Rojo Congo (25mg/l) de acuerdo con Robledo et al. (2012). La intensidad de la coloración roja de las colonias está relacionada con la cantidad de celulosa que forma parte del polisacárido que aglutina sus células, debido a la afinidad del Rojo Congo por los enlaces β 1-4 que unen las moléculas de glucosa en la celulosa. Como puede observarse en la figura 29 podemos encontrar una gradación del color según el tipo de polisacárido generado por cada uno de los aislados analizados, incluyendo cepas cuyas colonias presentaron una coloración roja intensa (AMPS22, PEPV15, PEPV37 y PEPV38) y cepas cuyas colonias presentaron una coloración intermedia con dos fenotipos observables, que denominaremos como fenotipo I1 (intermedio 1), representado por las cepas AMPS05, AMPS17, AMPS23, PEPV01, PEPV03 y PEPV27 y que indica una producción de celulosa homogénea pero no muy intensa, y fenotipo I2 (intermedio 2) con una producción intermedia, pero no homogénea, dentro de las colonias, representado por las cepas AMPS34, PEPV11, PEPV14, PEPV16, PEPV18, PEPV29 y PEPV40. En último lugar, encontramos cepas cuyas colonias presentan una coloración prácticamente blanca, AMPS01, AMPS20 y PEPV02. Las coloraciones observadas parecen indicar que la producción de celulosa en *Rhizobium* presenta una elevada variación a nivel de cepa, y sólo dos cepas del mismo grupo filogenético, PEPV37 y PEPV38 presentaron la misma intensidad de color. También varió mucho la intensidad del color entre las cepas de los géneros *Rhizobium* y *Phyllobacterium* obteniéndose unos resultados concordantes con los de Robledo et al. (2012). Adicionalmente, también se encontró variabilidad en el aspecto de las colonias, lo que puede ser debido a la gran variedad de monómeros empleados en la síntesis de exopolisacárido, para la cual monosacáridos como glucosa, manosa, galactosa, maltosa, arabinosa o ramnosa pueden ser utilizados (Ghosh y Maiti 2016; Ribeiro y Burkert 2016), y, además, a los cambios estructurales debido a la existencia de diferentes sustituyentes y ramificaciones que hacen que su estructura sea sumamente compleja (Janczarek et al. 2014). Cabe destacar que la textura de los aislados *Rhizobium* parece relacionarse con la producción de celulosa, reduciéndose su viscosidad a medida que se incrementa la presencia de celulosa. Por ejemplo, la cepa *P. endophyticum* PEPV15, cuyas colonias presentan una intensa coloración rojiza, posee un polisacárido muy acuoso y mucho menos viscoso que el de las cepas de *Rhizobium*.

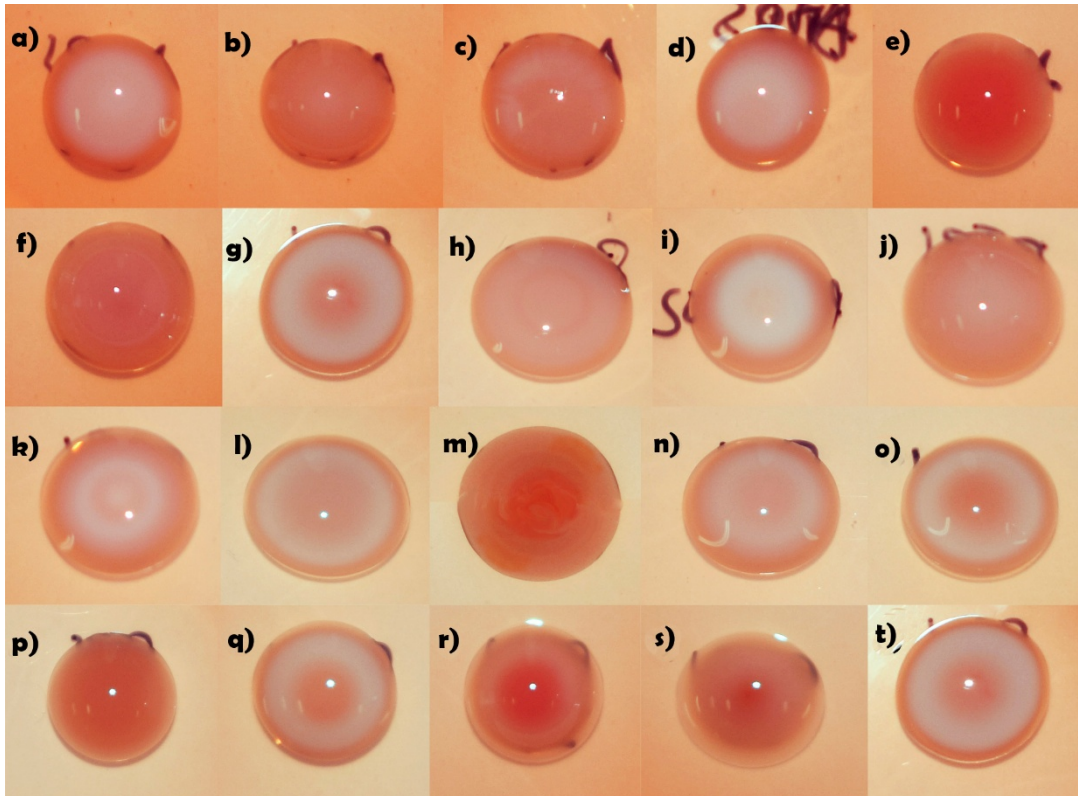


Figura 29. Fotografía de las colonias de cada uno de los representantes seleccionados creciendo en medio YMA suplementado con rojo congo. La coloración rojiza indica la abundancia relativa de polisacárido rico en enlace β 1-4. El orden de la cepas es a) AMPS04, b) AMPS05, c) AMPS17, d) AMPS20, e) AMPS22, f) AMPS23, g) AMPS34, h) PEPV01, i) PEPV02, j) PEPV08, k) PEPV11, l) PEPV14, m) PEPV15, n) PEPV16, o) PEPV18, p) PEPV27, q) PEPV29, r) PEPV37, s) PEPV38 y t) PEPV40.

5.2. Producción de celulasas

La producción de enzimas líticas juega un papel fundamental en la biología de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y sus implicaciones van, desde la capacidad de competición en la rizosfera y la utilización de diferentes sustratos, hasta la capacidad de interacción con las plantas (Grady et al. 2016; Sreevidya et al. 2016). La producción por *Rhizobium* de celulasas capaces de degradar la pared del hospedador juega un papel fundamental en el establecimiento de la simbiosis con leguminosas (Robledo y Martínez-Molina E 2008; Robledo et al. 2011; Menéndez, Díez-Méndez, et al. 2016), ya que se producen de una manera controlada y dirigida hacia regiones tan específicas como el extremo de los pelos radicales (Robledo et al., 2008). La capacidad de los aislados de este estudio para producir celulasas se evaluó empleando el método en doble capa descrito por Mateos et al., (1992) y los resultados obtenidos muestran que la producción de estos enzimas fue variable con halos más o menos transparentes (Fig 30). La mayoría de las cepas analizadas presentaron actividad celulolítica y tan sólo 3 cepas, AMPS04, AMPS05, AMPS17 y PEPV02, no mostraron esta actividad enzimática en las condiciones utilizadas. Además, se comprobó que las cepas aisladas a partir de nódulos de *P. vulgaris* presentaron, en general, mayor actividad que aquéllas

aisladas a partir de nódulos de *P. sativum*, observándose las mayores actividades en las cepas PEPV11, PEPV14, PEPV15, PEPV37 y PEPV18.

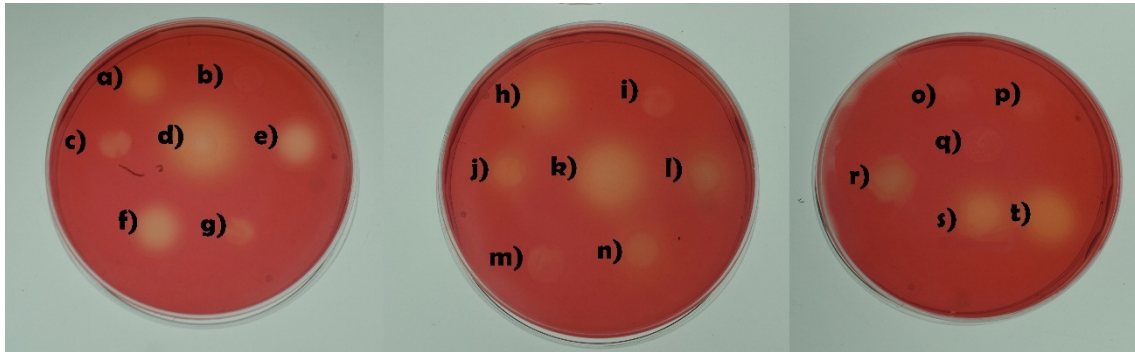


Figura 30. Fotografía en la que se muestra el halo producido por cada una de las cepas indicadas. La ausencia de coloración rojiza indica ausencia de celulosa en el medio y por tanto actividad celulolítica por parte de la cepa en cuestión. El orden de las cepas es a) PEPV01, b) PEPV02, c) PEPV08, d) PEPV11, e) PEPV14, f) PEPV15, g) PEPV16, h) PEPV18, i) PEPV27, j) PEPV29, k) PEPV37, l) PEPV38, m) PEPV40, n) AMPS04, o) AMPS05, p) AMPS17, q) AMPS20, r) AMPS22, s) AMPS23 y t) AMPS34.

5.3. Estudio de la capacidad para producir biofilms

La formación de biofilms es la principal estrategia de interacción empleada por las bacterias para colonizar ambientes y perdurar en los mismos, habiendo evolucionado esta capacidad desde el inicio de la vida, por lo que la adhesión a superficies presenta una alta especificidad evolutiva (Romero y Kolter 2011). Esta habilidad permite a las bacterias colonizar superficies de muy diversa naturaleza en función de sus nichos ecológicos de preferencia, estando implicados una batería de genes involucrados en la síntesis de proteínas específicas, como adhesinas, y exopolisacáridos (Wijman et al. 2007). A partir de adhesión, comienza la replicación clonal de la bacteria para formar una colonia sobre una superficie determinada que, paulatinamente irá desarrollándose en el espacio, hasta conseguir una configuración tridimensional (Robledo et al. 2012). Este aspecto tiene especial relevancia en la interacción planta-microorganismo debido a que condiciona en mayor o menor medida el éxito de este proceso y en el caso de *Rhizobium* donde la colonización es una fase determinante, la formación de biofilms ha sido bastante estudiada. Esta capacidad no sólo está relacionada con la interacción *Rhizobium*-leguminosa, sino que aporta importantes ventajas en la interacción con plantas no leguminosas donde la especificidad microorganismo-hospedador es mucho menor (Bhattacharyya y Jha 2012). La capacidad para formar biofilms y colonizar activamente la superficie radicular supone una ventaja para la bacteria, ya que es capaz de competir por el espacio, relegando a otras bacterias de su zona de acción; a su vez, la planta es capaz de aumentar su radio de interacción directo debido al contacto con el biofilm (Lugtenberg 2015).

El análisis de la capacidad para formar biofilms de los aislados de este estudio fue llevado a cabo utilizando dos metodologías diferentes y complementarias, un método cuantitativo que permite evaluar la capacidad de los aislados para formar

biofilms (Fujishige et al. 2006), que permite la determinación indirecta de la capacidad para formar biofilms sobre superficies abióticas y su cuantificación y un método cualitativo para determinar visualmente la estructura del biofilm (Wentland et al. 1996).

5.3.1. Determinación cuantitativa de la producción de biofilms

Se estudió la producción de biofilms en cepas representativas de los grupos de RAPD obtenidos y se hallaron grandes diferencias entre los aislados, tanto a nivel de producción total, como de dinámica de crecimiento. La mayoría de los aislados alcanzaron absorbancias entre 0,4 y 0,7, siendo superada esta cifra únicamente por la cepa *R. laguerreae* PEPV16 con un valor superior a 0,8. La cepa *P. endophyticum* PEPV15 estuvo entre los aislados con una capacidad más reducida para producir biofilms (Fig.31).

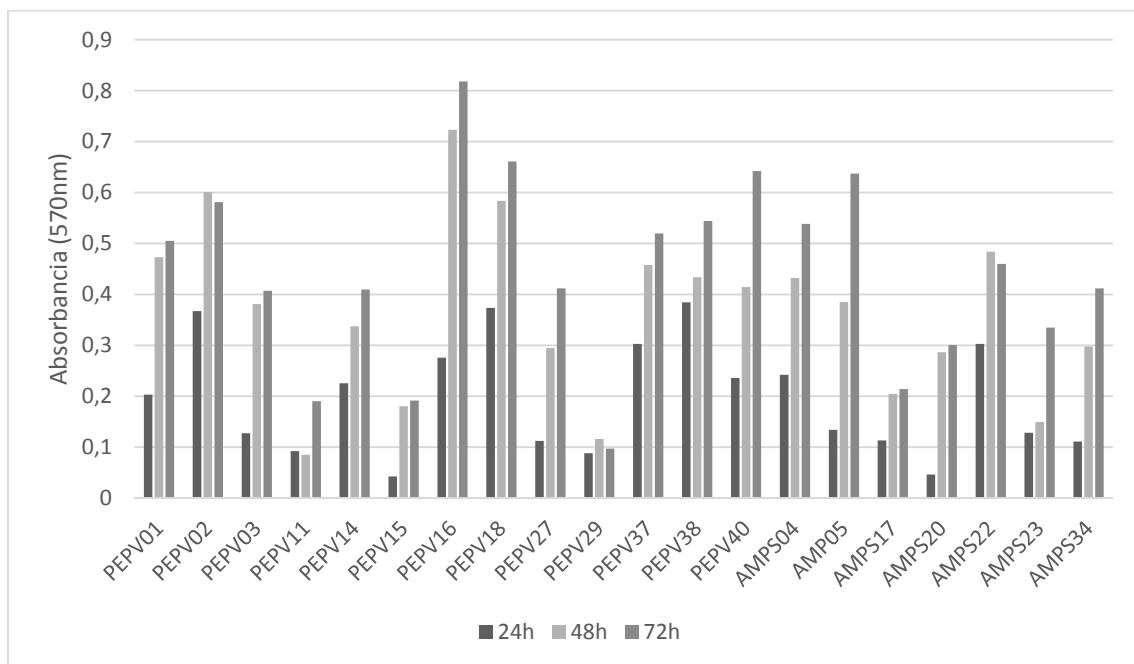


Figura 31. Producción de biofilms a 24, 48 y 72 horas en placas multipocillo. La producción de biofilm se expresa de manera relativa en unidades de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Con respecto a la dinámica de crecimiento del biofilm se encontraron cuatro dinámicas bien diferenciadas entre los aislados. Una dinámica con un desarrollo lineal hasta las 72h en las cepas PEPV14, PEPV16, PEPV18, PEPV27, PEPV37, PEPV40, AMPS04, AMPS05 y AMPS34, una segunda, en la que el biofilm alcanza su máximo desarrollo a las 48h y se mantiene después, en la cepas PEPV01, PEPV02, PEPV03, AMPS17, AMPS20, AMPS22 de *R. laguerreae* y en la cepa *P. endophyticum* PEPV15, una tercera que consistió en un desarrollo inicial lento con un gran incremento, duplicando los valores previos, a partir de las 48h como ocurrió en las cepas PEPV11, PEPV38 y AMPS23 y una cuarta en la que la progresión del biofilm es mínima y se encontró en la cepa PEPV29. Estas diferencias en la dinámica y la capacidad para producir biofilms están estrechamente relacionadas con la producción de

exopolisacárido y la naturaleza del mismo (Robledo et al. 2012). Ya se comentó previamente la existencia de grandes diferencias entre la cantidad de celulosa presente en los exopolisacáridos de las cepas y en el aspecto del polisacárido entre las diferentes cepas aisladas, lo que puede condicionar la capacidad para adherirse a superficies abióticas, que se puede estudiar *in vitro* utilizándose materiales naturales, como arena, y artificiales, como vidrios o polímeros plásticos (Wijman et al. 2007; Li et al. 2011; Robledo et al. 2012).

5.3.2. Determinación cualitativa de producción de biofilms

Para estudiar con más detalle la formación y desarrollo de los biofilms bacterianos se pueden utilizar técnicas microscópicas y tinción con naranja de acridina (Wentland et al. 1996; Raaijmakers y Paulitz 2009). El naranja de acridina se une a los ácidos nucleicos y, al ser excitado con luz ultravioleta, emite fluorescencia verde en las células en fase de división activa y fluorescencia naranja en las células que están en reposo multiplicativo, lo que nos permite localizar las células vivas y observar la estructura del biofilm.

En nuestro caso, el biofilm se encontró mayoritariamente adherido a la superficie del portaobjetos, ya que en esta fase se encuentran las mejores condiciones de desarrollo para los microorganismos aerobios, como ocurre en el caso de *Rhizobium* y *Phyllobacterium*. Se encontraron dos patrones de colonización diferentes, el primero de ellos consistía en un patrón difuso de gran extensión que podía asimilarse a un velo con múltiples pliegues como se puede observar en la figura 32 a) y b). El segundo patrón consistió en una colonización más intensa, con un gran desarrollo tridimensional y la creación de numerosas imbricaciones y canales a través de los que circula el líquido. Esta estrategia genera un aumento de la superficie efectiva del sustrato y, por tanto, de la superficie útil de intercambio de nutrientes (Figura 32 c) y d). Si observamos más en detalle estas estructuras, podemos determinar que estas grandes masas se extienden en el plano vertical a partir de una fina capa que cubre el portaobjetos, cubriendo con gran intensidad el sustrato sobre el que se afianza el biofilm (Figura 32 e) y f).

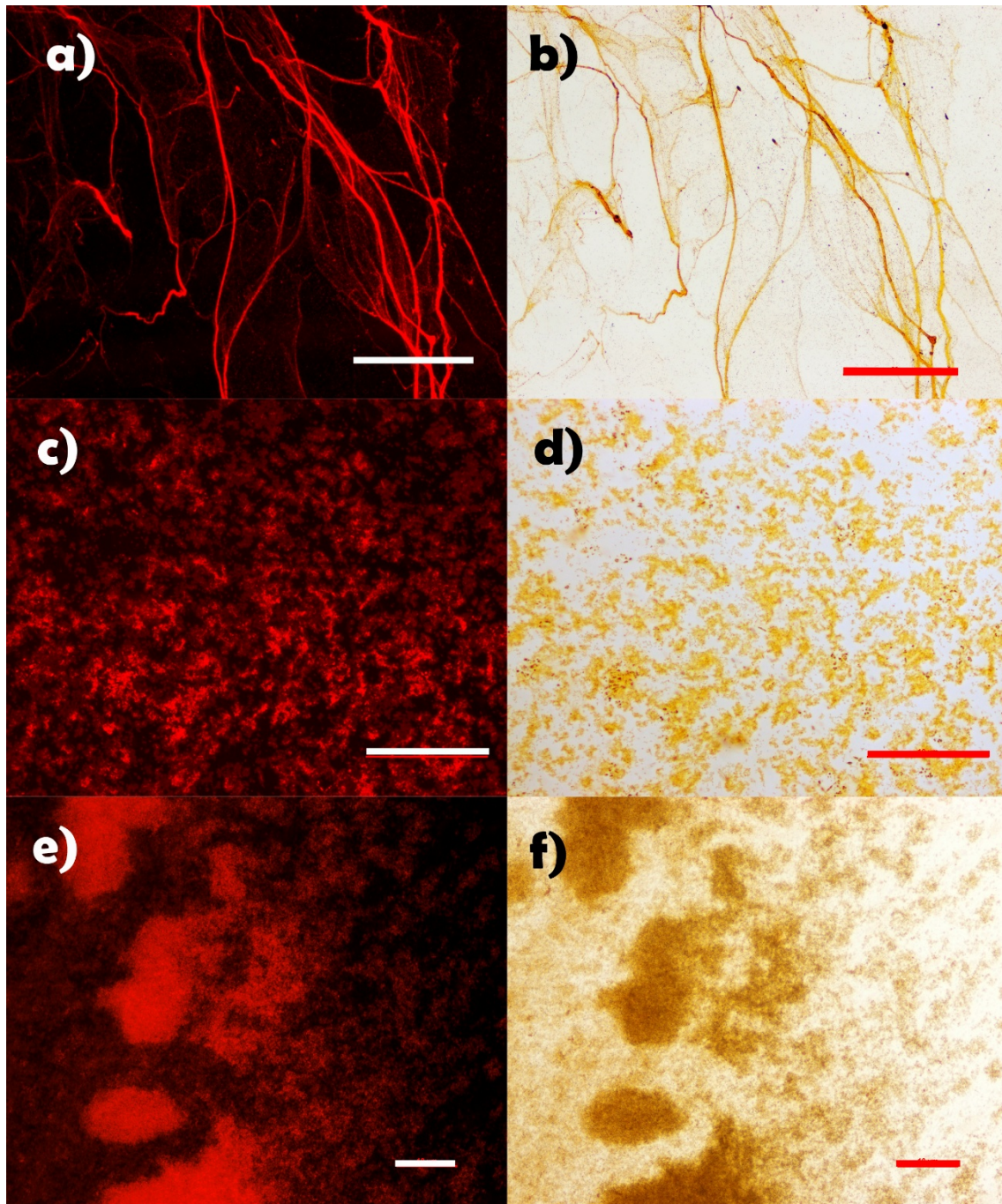


Figura 32. Imagen de microscopía óptica y de fluorescencia de los patrones de colonización mostrados por las cepas seleccionadas. a) y b) Microscopía de fluorescencia y óptica, respectivamente, de la fase de velo o colonización más cercana al portaobjetos; c) y d) Microscopía de fluorescencia y óptica, respectivamente, de la fase de acumulación; e) y f) Microscopía de fluorescencia y óptica, respectivamente, de la fase de acumulación donde se observan las múltiples imbricaciones y se aprecia el desarrollo tridimensional de este tipo de colonización. El tamaño de las barras es a) 20 μ m, b) 20 μ m, c) 20 μ m, d) 20 μ m, e) 5 μ m y f) 5 μ m.

5.4. Quorum sensing

Las bacterias son capaces de desarrollarse en comunidades relativamente complejas, como hemos observado en el apartado anterior, con la formación de biofilms permitiendo colonizar superficies abióticas. Estas acciones coordinadas suelen estar reguladas por la presencia en el medio de sustancias secretadas por las propias bacterias y que actúan como moduladoras de la expresión génica (Daniels et al. 2004). Estas sustancias son captadas por receptores de membrana específicos o atraviesan la membrana celular y desencadenan la síntesis o supresión de determinados genes, en función de la densidad de dichas moléculas. En el caso de las bacterias Gram negativas, como es el caso de los *rhizobia*, las principales responsables de estas acciones son las acil-homoserin-lactonas (AHL) (González y Marketon 2003). Estas moléculas son producidas por la mayoría de los *rhizobia* y que comprenden una amplia gama de moléculas diferentes en las que varía el grupo acilo, que puede estar constituido por cadenas de entre 4 y 18 carbonos (Sanchez-Contreras et al. 2007). Estas moléculas, incluida la AHL, parecen empezar a actuar a partir de una determinada concentración y la activación de los sistemas regulados por *Quorum sensing* va a depender de la fase de crecimiento, en función de que los microorganismos se encuentren en medio líquido y fases bentónicas o en medio sólido y fases sésiles (Alberghini et al. 2009; Trovato et al. 2014). Estas condiciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de estudiar las relaciones en la rizosfera donde los procesos de *Quorum sensing* juegan un papel fundamental, tanto a nivel de regulación positiva denominada *Quorum sensing* estricto, o negativa denominada *Quorum quenching*, que comprende aquellos procesos en los que se suprime la presencia de AHL en el medio mediante la síntesis de enzimas hidrolíticas (Dong y Zhang 2005; Bogino et al. 2015). La concentración de AHL puede determinar la formación de biofilms y la dinámica de los mismos, como se ha observado en microorganismos marinos (Garg et al. 2014) y que es esperable que suceda también en *Rhizobium*.

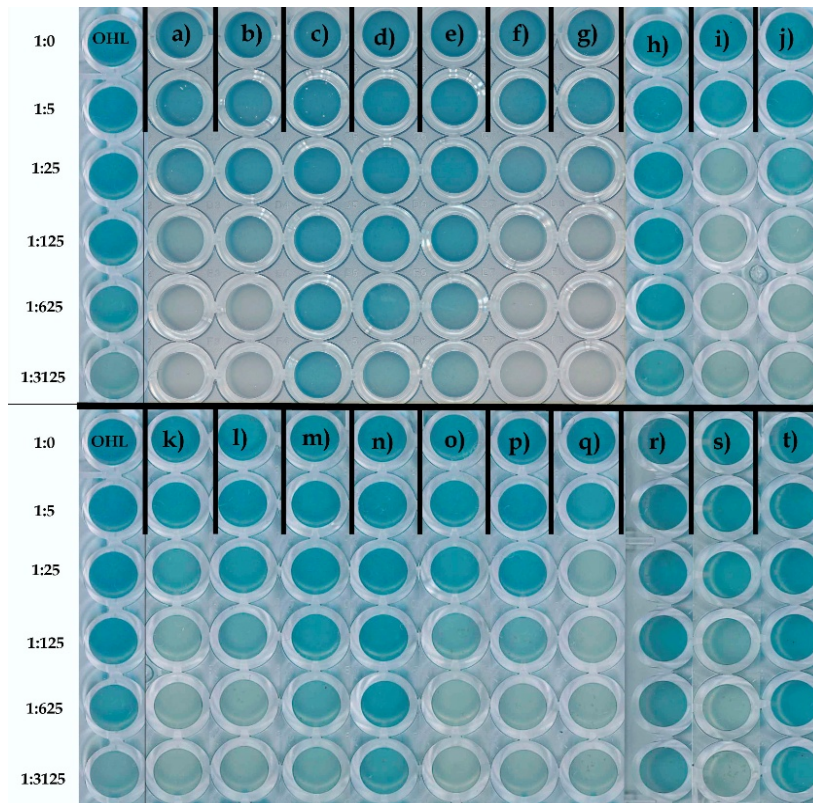


Figura 33. Resultado de la evaluación de la capacidad de las cepas de este estudio para producir AHL. Las columnas de la izquierda (OHL) son el control con octanoil-homoseril lactona y las diluciones que se indican al borde. El resto de columnas corresponden con las cepas de este estudio, desde el sobrenadante sin diluir (superior) hasta la dilución 1:3125, a) AMPS04, b) AMPS05, c) AMPS17, d) AMPS20, e) AMPS22, f) AMPS23, g) AMPS34, h) PEPV01, i) PEPV02, j) PEPV08, k) PEPV11, l) PEPV14, m) PEPV15, n) PEPV16, o) PEPV18, p) PEPV27, q) PEPV29, r) PEPV37, s) PEPV38 y t) PEPV40

Conociendo la capacidad de la mayoría de los aislados de este estudio para producir biofilms y su relación con la producción de enzimas líticas y polisacáridos implicados en la creación de matrices extracelulares, se estudió la producción de moléculas implicadas en el establecimiento de relaciones poblacionales o *Quorum sensing*. Para ello, se utilizó como marcador una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 transformada con el plasmido pZRL4, que permite detectar la presencia de estas moléculas en el medio induciendo la síntesis de la enzima β -galacturonasa que hidroliza el compuesto X-gal produciendo un compuesto azul observable en el medio. Se observó que existía una gran disparidad entre cada uno de los aislados estudiados, con variaciones de varios órdenes de magnitud desde aquéllos que mostraron producciones elevadas hasta aquéllos que apenas producían. Para poder realizar una cuantificación de la cantidad producida se utilizó un patrón de OHL (octanoil-homoseril-lactona) partiendo de 10 mg/ml y realizando diluciones de 1:5 hasta alcanzar concentraciones de 3,2 μ g/ml, una concentración cercana al límite de detección de la cepa utilizada como marcador (Trovato et al. 2014). Se observó que las cepas AMPS17, PEPV01, PEPV16, PEPV37 y PEPV40 alcanzaban concentraciones de AHL en el medio en torno a 10

mg/ml, reduciéndose considerablemente la concentración en el resto de las cepas (Fig. 33). Aunque no se halló una relación directa con la cantidad de biofilm producida, sí se observó que las cepas que presentaban dinámicas de desarrollo rápido del biofilm y mantenimiento a partir de las 48 horas presentaron valores más elevados de AHL, sin embargo, cuanto menor era la concentración de AHL detectada más estable parecía ser la dinámica. Esto parece indicar que existe una regulación a nivel poblacional de la producción de biofilms mediada por procesos de *Quorum sensing*. Aquellas cepas que alcanzaron una concentración de AHL mayor detienen a etapas más tempranas el desarrollo del biofilm, y aquellas que no producen estas moléculas a una velocidad tan elevada mantienen la producción de biofilm con la consiguiente síntesis de biopolímeros estructurales, como se ha observado en *Agrobacterium*, donde la síntesis de succinoglicano está regulado por genes *luxR* (Wu et al. 2016).

6. Ensayos de efectividad simbiótica

Por último, se evaluó la efectividad de las cepas aisladas en sus hospedadores respectivos. En ambos casos, se utilizaron como controles positivos de nodulación las cepas tipo de las especies con la simbiovariedad que nodula comúnmente cada una de las dos leguminosas, *Rhizobium phaseoli* sv. *phaseoli* ATCC14400^T para alubia y *Rhizobium pisi* sv. *viciae* DSM 30132^T para guisante.

6.1. Ensayos en alubia

Los resultados obtenidos para los tres parámetros analizados, número de nódulos por planta, peso seco de la parte aérea por planta y porcentaje de nitrógeno se muestran en la Tabla 14

Tabla 14 Resultados del experimento de inoculación en alubia

Tratamiento	Nódulos/ planta	Peso seco aérea (g)/ planta	Nitrógeno (%)
Control sin N		0,61±0,01 ^f	1,35±0,03 ^e
Control con N		1,02±0,03 ^a	3,02±0,11 ^a
<i>R. phaseoli</i> ATCC14400 ^T	110±4,79 ^b	0,94±0,02 ^b	2,54±0,04 ^b
PEPV01	87±4,20 ^{bc}	0,82±0,02 ^c	2,18±0,03 ^c
PEPV02	26±2,66 ^g	0,77±0,01 ^d	2,25±0,08 ^c
PEPV03	36±5,91 ^f	0,73±0,02 ^d	2,16±0,06 ^c
PEPV11	74±3,89 ^d	0,80±0,04 ^{cd}	2,17±0,09 ^c
PEPV14	81±2,73 ^{cd}	0,82±0,02 ^c	2,29±0,03 ^c
PEPV16	93±2,37 ^c	0,86±0,02 ^c	2,32±0,03 ^c
PEPV18	68±4,73 ^e	0,71±0,02 ^d	2,21±0,06 ^c
PEPV27	81±2,06 ^d	0,75±0,02 ^d	2,28±0,05 ^c
PEPV29	86±3,21 ^c	0,74±0,02 ^d	2,31±0,08 ^c
PEPV37	124±6,15 ^a	0,67±0,03 ^e	2,01±0,07 ^d
PEPV38	92±4,34 ^c	0,78±0,02 ^d	2,25±0,08 ^c
PEPV40	82±2,08 ^{cd}	0,81±0,03 ^c	2,29±0,06 ^c

En el número de nódulos por planta, los resultados fueron muy variables, con valores que oscilaron desde 26 hasta 124 (Fig. 34). Salvo la cepa PEPV37, el resto de aislados presentaron un número de nódulos inferior al control positivo inoculado con la cepa tipo de *Rhizobium phaseoli*.

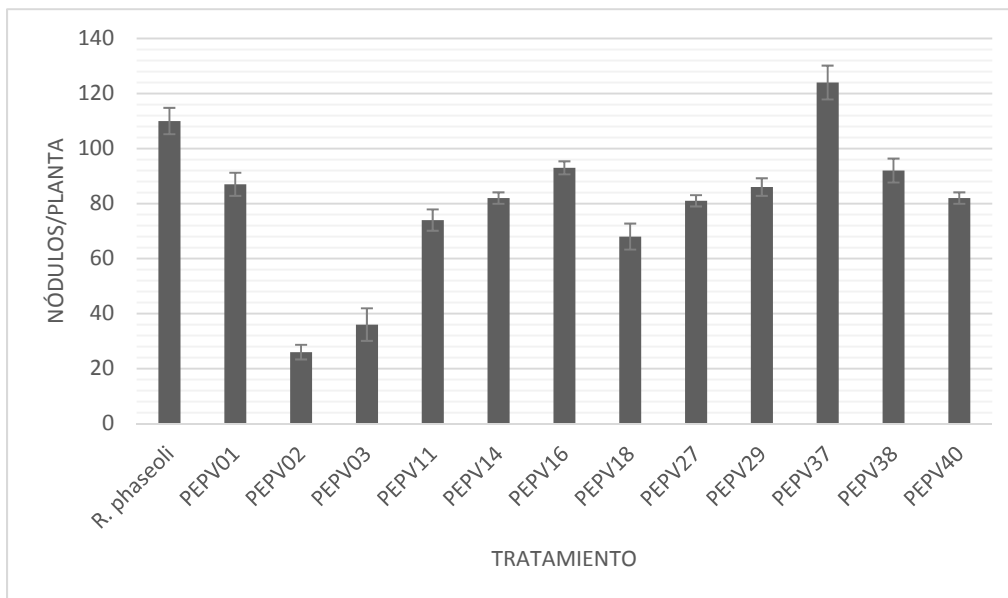


Figura 34. Numero de nódulos por planta en alubia

En cuanto al peso seco de la parte aérea por planta, en todos los tratamientos de inoculación con las cepas de este estudio fueron significativamente menor que en el correspondiente a la cepa tipo de *Rhizobium phaseoli* (Tabla 35). No obstante, también se encontraron diferencias significativas entre algunos tratamientos inoculados con las cepas de este estudio, destacando las cepas PEPV01, PEPV14, PEPV16 y PEPV40, cuya inoculación originó plantas de alubia con mayores pesos secos de la parte aérea (Fig 35).

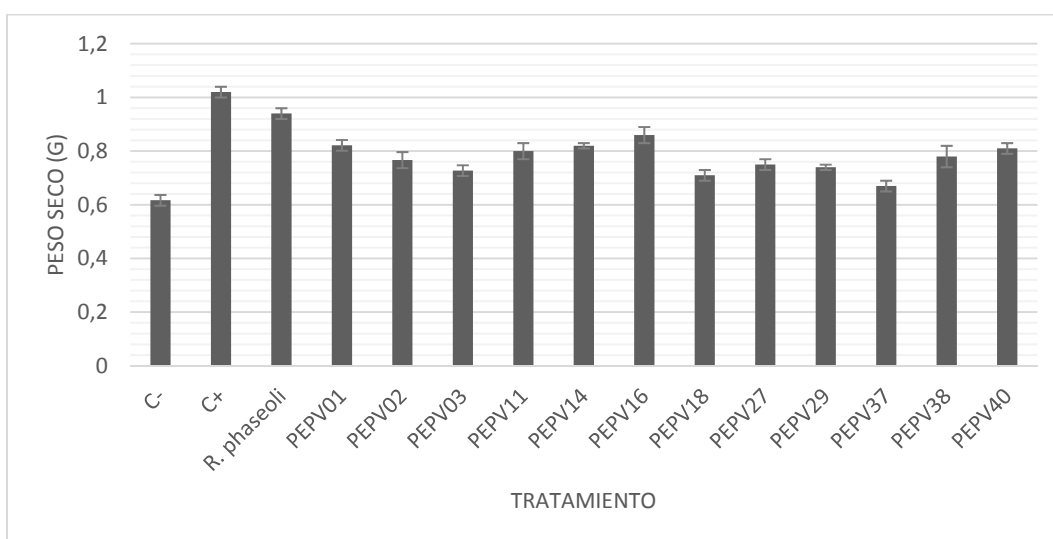


Figura 35. Peso seco por planta en alubia.

Finalmente, el porcentaje de nitrógeno en la parte aérea de la alubia, en todos los tratamientos fue inferior que, en el control positivo con nitrógeno, seguido del control positivo inoculado con la cepa tipo de *R. phaseoli*, que nuevamente mostró valores significativamente más altos que el resto de tratamientos de inoculación (Fig. 36). Entre las cepas del estudio, sólo en las plantas inoculadas con la cepa PEPV37 se redujo significativamente el porcentaje de nitrógeno, en alrededor de un 25%, con respecto al resto. No obstante, todas las cepas fueron capaces de fijar N en los nódulos de alubia con valores significativamente más altos que el del control negativo sin nitrógeno y sin inocular.

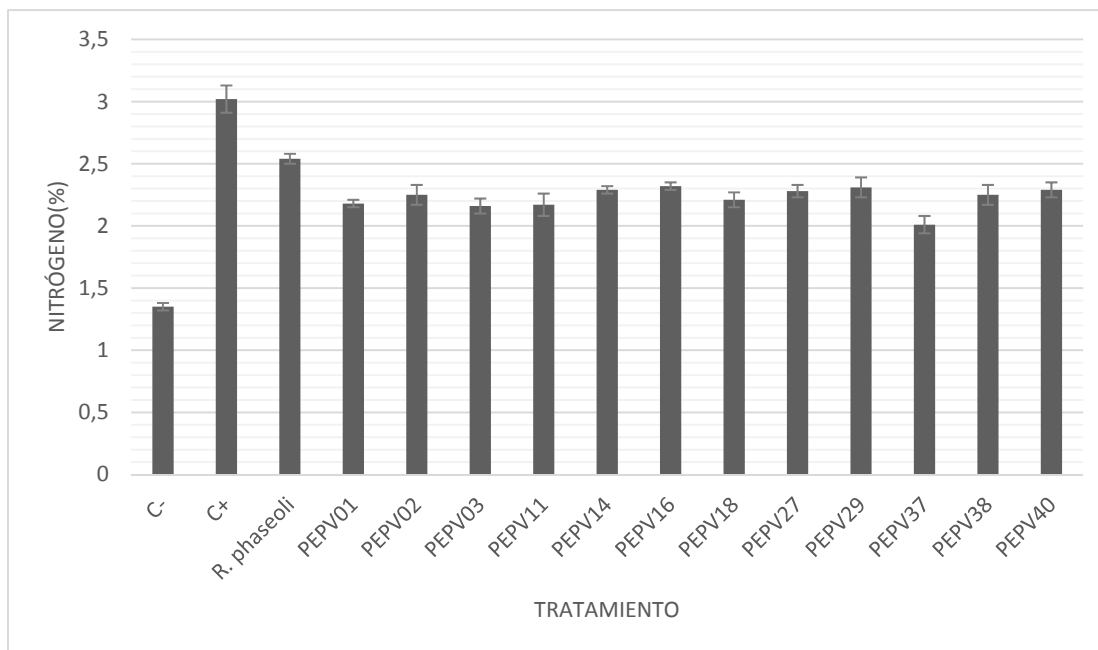


Figura 36. Porcentaje de nitrógeno en las plantas de alubia.

Por lo tanto, las cepas aisladas en el suelo de Salamanca a partir de alubia no presentan las mejores características para ser utilizadas como biofertilizantes de esta leguminosa, lo cual no es sorprendente ya que todos ellos pertenecen a la simbiovariedad *viciae*, que no es el endosimbionte típico *P. vulgaris*, mientras que la cepa tipo de *R. phaseoli* pertenece a la simbiovariedad *phaseoli*, que sí es el endosimbionte típico de *P. vulgaris* en sus centros de distribución americanos. Sin embargo, debido a la elevada promiscuidad de *P. vulgaris*, éste es capaz de establecer simbiosis más o menos eficientes con muchas simbiovariedades (Velázquez et al. 2017 a y b). En el caso de los suelos en el que su cultivo no ha sido introducido, como es el caso del suelo de Salamanca, puede nodular con simbiovariedades típicas de las leguminosas locales, en este caso la lenteja que nodula con la simbiovariedad *viciae*, y aunque no alcance las tasas de nodulación y de eficiencia simbiótica alcanzadas con su endosimbionte típico, *phaseoli*, podría ser cultivado en esos suelos, ya que alcanza una eficacia de fijación de nitrógeno que duplica la del control negativo sin nitrógeno y el porcentaje de N en planta no es muy inferior al de las plantas inoculadas con la cepa tipo de *R. phaseoli*. Estos datos muestran cómo *P. vulgaris* se adapta a las condiciones

disponibles, pudiendo ser esta una adaptación evolutiva para mejorar la adaptación a nuevos ambientes (Servín-Garcidueñas et al. 2014).

6.2. Ensayos en guisante

Los resultados obtenidos para los tres parámetros analizados, número de nódulos por planta, peso seco de la parte aérea por planta y porcentaje de nitrógeno se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados del experimento de inoculación en guisante

Tratamiento	Nódulos/ planta	Peso seco aérea (g)/ planta	Nitrógeno (%)
Control sin N		0,21±0,02 ^b	2,80±0,08 ^c
Control con N		0,45±0,03 ^a	4,30±0,12 ^a
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	52±4,23 ^b	0,42±0,03 ^a	4,12±0,09 ^a
AMPS04	63±3,34 ^a	0,38±0,04 ^a	4,07±0,10 ^a
AMPS05	53±4,33 ^b	0,39±0,03 ^a	4,10±0,13 ^a
AMPS17	49±3,27 ^b	0,41±0,03 ^a	4,09±0,07 ^a
AMPS20	52±2,84 ^b	0,38±0,02 ^a	4,07±0,09 ^a
AMPS22	58±4,22 ^{ab}	0,36±0,05 ^a	4,03±0,05 ^{ab}
AMPS23	51±2,19 ^b	0,38±0,03 ^a	4,07±0,11 ^a
AMPS34	50±3,52 ^b	0,42±0,04 ^a	4,11±0,08 ^a

El número de nódulos por planta osciló en un rango comprendido entre 49 y 63, con diferencias significativas en algunos de los tratamientos, especialmente en el caso de la cepa AMPS04, que originó el número de nódulos más alto, por encima incluso del control positivo inoculado con la cepa tipo de *R. pisi* (Fig.37). El resto de las cepas originó un número de nódulos similar a los de esta especie, coincidiendo con el hecho de que todas ellas pertenecen a la misma simbiovariedad *viciae* de acuerdo con el análisis de sus genes *nodC* que se ha mostrado previamente.

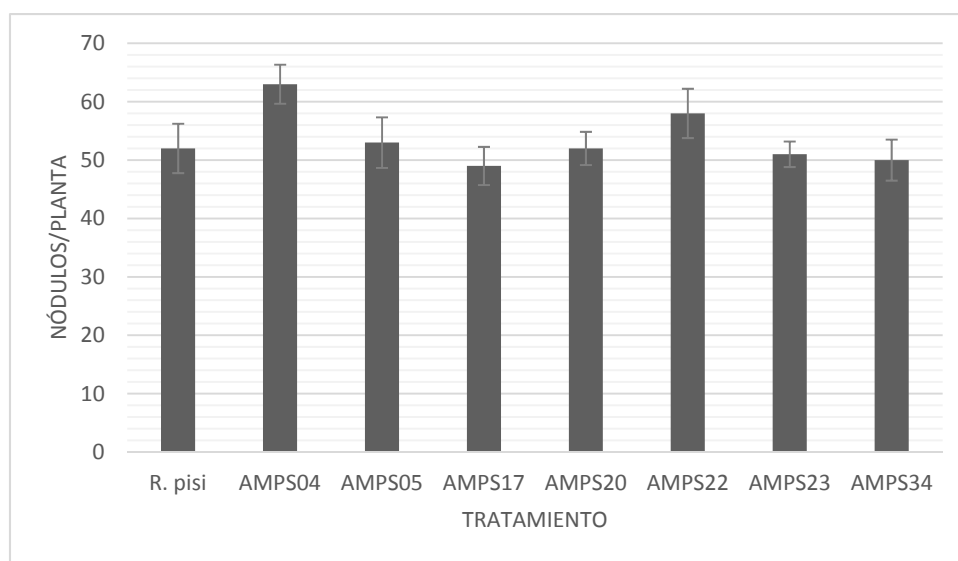


Figura 37. Numero medio de nódulos por planta en guisante

En cuanto al peso seco de la parte aérea, sólo se observaron ligeras variaciones entre los tratamientos de inoculación, incluyendo el de la cepa tipo de *R. pisi*, que no fueron significativas en ningún caso. Todos los valores fueron significativamente más altos que el del control negativo y muy próximos al del control positivo con N y sin inocular con el que no mostraron diferencias significativas (Fig. 38).

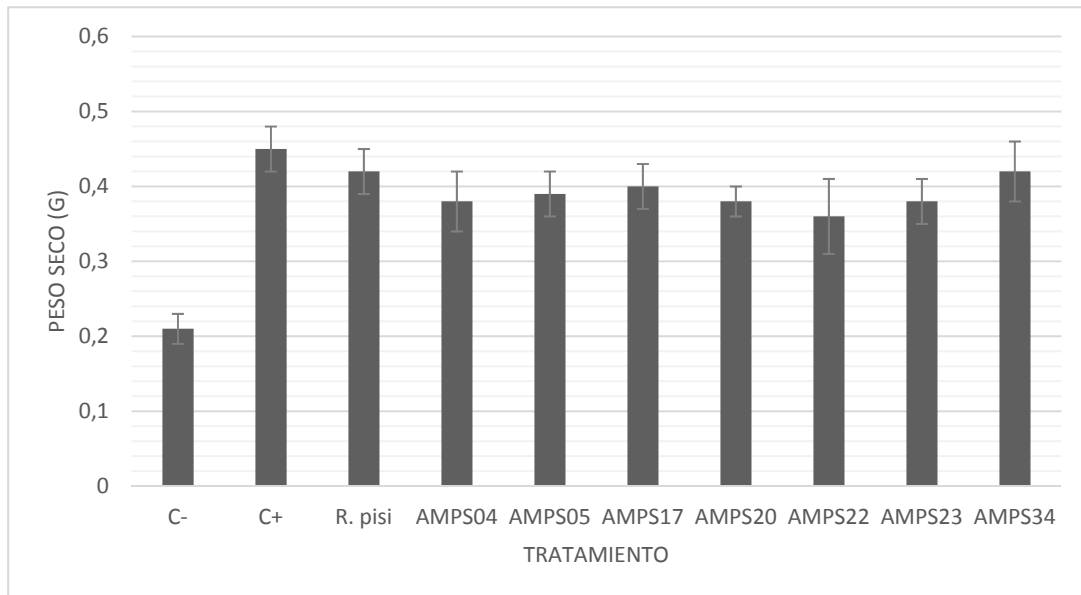


Figura 38. Peso seco por planta en el guisante

Finalmente, en lo que se refiere al porcentaje de N se observaron las mismas tendencias que en el caso del peso seco, con diferencias significativas de todos los tratamientos de inoculación con respecto al control negativo sin nitrógeno y sin inocular y sin diferencias significativas entre las cepas y con respecto al control positivo con nitrógeno que presentaba un porcentaje un poco más alto que el de los tratamientos de inoculación (Fig. 39).

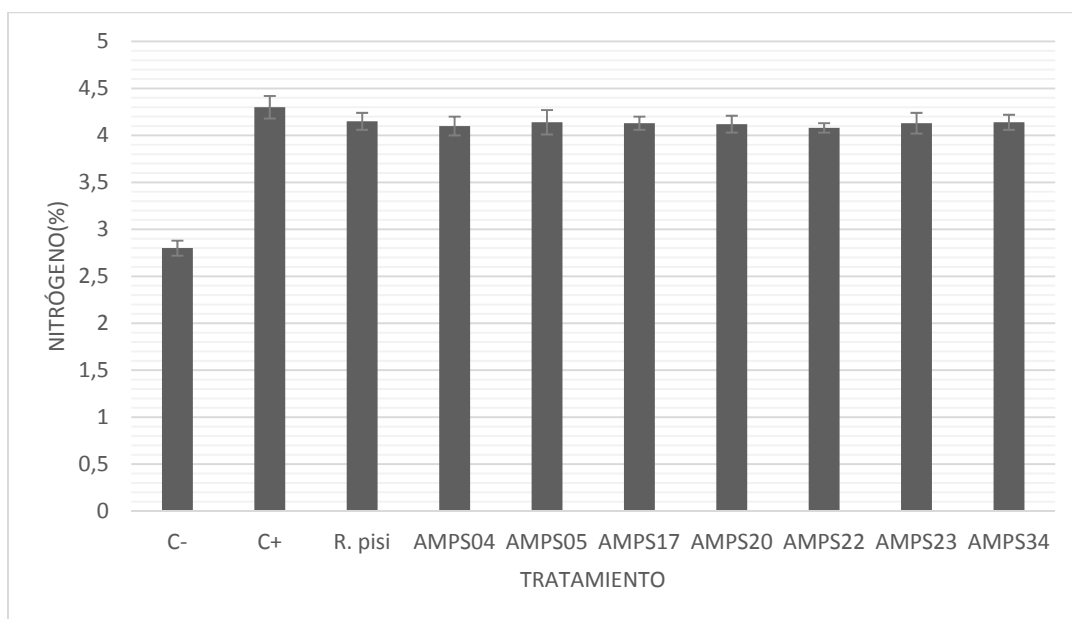


Figura 39. Porcentaje de nitrógeno en plantas de guisante.

Los resultados obtenidos en los estudios de efectividad en guisante muestran que las cepas autóctonas de suelos de Valladolid, en los que se siembra habitualmente esta leguminosa, poseen unas características simbióticas mejores que los de la cepa tipo de *R. pisi* debido a que han coevolucionado durante mucho tiempo con las plantas de guisante o de otros hospedadores del mismo grupo de inoculación cruzada y que desde antes de la época romana se vienen cultivando, o bien forman parte de la flora silvestre, de esta zona y de toda Castilla y León, como son las vezas. Todos estos hospedadores, al contrario de lo que ocurría en el caso de *P. vulgaris*, son muy restrictivos para la nodulación y su presencia constante en los suelos de la zona estudiada ha ejercido una presión de selección decisiva sobre las poblaciones de estos microorganismos seleccionándose las cepas más efectivas, como se desprende de los resultados de este estudio.

De los resultados obtenidos en ambos hospedadores, se desprende que, en el caso de la alubia, la inoculación con cepas autóctonas de la simbiovariedad phaseoli mejoraría el rendimiento de esta leguminosa en suelos en los cuáles no se ha cultivado, aunque podría alterar la composición de la microbiota de esos suelos si las cepas presentes de modo natural en los mismos no pertenecen a la misma especie. Por ejemplo, las cepas más abundantes en los nódulos de alubia en el suelo no cultivado son de la especie *R. laguerreae*, una especie que no se ha aislado en suelos tradicionalmente cultivados con alubia en León, una región no muy alejada geográficamente de Salamanca (García-Fraile et al. 2010; Mulas et al. 2011). Si introdujéramos cepas seleccionadas en León como inóculos de alubia en Salamanca durante un tiempo suficiente podría ocurrir que los plásmidos simbióticos de simbiovariedad phaseoli se transfirieran a cepas de *R. laguerreae*, o bien que las especies introducidas como inoculantes desplazaran en mayor o menor medida las cepas de *R. laguerreae* sv *viciae* del suelo, que podría ser problemática para el rendimiento de otros hospedadores como el guisante. Esto podría paliarse inoculando el guisante con una de las cepas autóctonas de la simbiovariedad *viciae* más eficaces en esta leguminosa. En cuanto al guisante en las zonas en que se siembra habitualmente, también podría mejorar su producción si se inocula con la cepa adecuada de la simbiovariedad *viciae*, pero en este caso la selección de la cepa debería tener en cuenta, no sólo la capacidad para fijar nitrógeno de las cepas seleccionadas, sino la competitividad en el suelo de esa/s cepas (Bourion et al. 2018).

Capítulo II

Los nódulos de leguminosas son entornos diversos que albergan poblaciones importantes de bacterias endófitas que acompañan a *Rhizobium* (Velázquez et al. 2013). Su diversidad puede ser elevada con bacterias de familias y géneros muy diversos, muchos de ellos con un potencial para promover el crecimiento vegetal aún por descubrir con múltiples actividades que pueden mejorar o complementar los mecanismos mostrados por los *Rhizobium* (De Meyer et al. 2015). En este capítulo se estudiará la diversidad de los nódulos de *P. sativum* y se evaluará la capacidad de los mismos para inocularse en consorcio con el endosimbionte nodular *R. laguerreae* AMPS34, que fue la cepa que mejores eficiencias mostró en el capítulo anterior.

1. Cepas de bacterias endófitas aisladas a partir de nódulos de *P. sativum*.

El aislamiento de bacterias endófitas se llevó a cabo a partir de nódulos de *Pisum sativum* cultivado en Aldea de San Miguel en Valladolid utilizando las mismas condiciones y medio de cultivo que para el aislamiento de *Rhizobium* (Tabla 16).

Tabla 16. Endófitos aislados a partir de nódulos de *Pisum sativum*.

Cepa	Localidad	Hospedador
AMPSE 01	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 02	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 03	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 04	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 05	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 06	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 07	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 08	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 10	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 11	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 13	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 14	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 15	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 16	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 17	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 18	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 19	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 20	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 21	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 22	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 23	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 24	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 25	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 26	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 27	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 28	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 29	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 30	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE 32	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE2PSE01	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
AMPSE18PSE04	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
PSE5PSE03	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>
PSE3PSE02	Aldea de San Miguel	<i>Pisum sativum</i>

1.1. Análisis de la diversidad genética

Al igual que en el caso de las cepas de *Rhizobium*, la diversidad genética de las bacterias endófitas se analizó utilizando los perfiles de RAPD obtenidos con la misma metodología. Estos perfiles se han utilizado en estudios de poblaciones de bacterias endófitas aisladas a partir de diferentes plantas para agrupar las cepas antes de llevar a cabo la identificación mediante secuenciación del gen ribosómico 16S (Narula et al. 2013; Xu et al. 2014; Celador-Lera et al. 2016; Pereira et al. 2016; Calheiros et al. 2017; Xiao et al. 2017)

Los resultados obtenidos mostraron que los perfiles de RAPD de las cepas de bacterias endófitas contienen menos bandas que los de las cepas de *Rhizobium*. Los resultados del análisis matemático de los perfiles obtenidos se muestran en la figura 40. En esta figura se observa que las cepas se distribuyeron en 6 grupos y 15 ramas independientes, considerando un 80% de similitud igual que en el caso de las cepas de *Rhizobium*. Tres de los grupos estaban formados por 2 cepas, y los otros tres estaban formados por 3, 4 y 4 cepas respectivamente (Tabla 16).. Estos resultados muestran que la diversidad genética fue también elevada, considerando que todos los aislados procedían del mismo suelo y del interior de los nódulos de la misma leguminosa. La elevada variabilidad en los perfiles de RAPD se había observado en otros trabajos de identificación de endofitoscuál coincide con los resultados de otros estudios que muestran que cepas aisladas de nódulos de leguminosas presentan perfiles de RAPD diferentes (Benhizia et al. 2004).

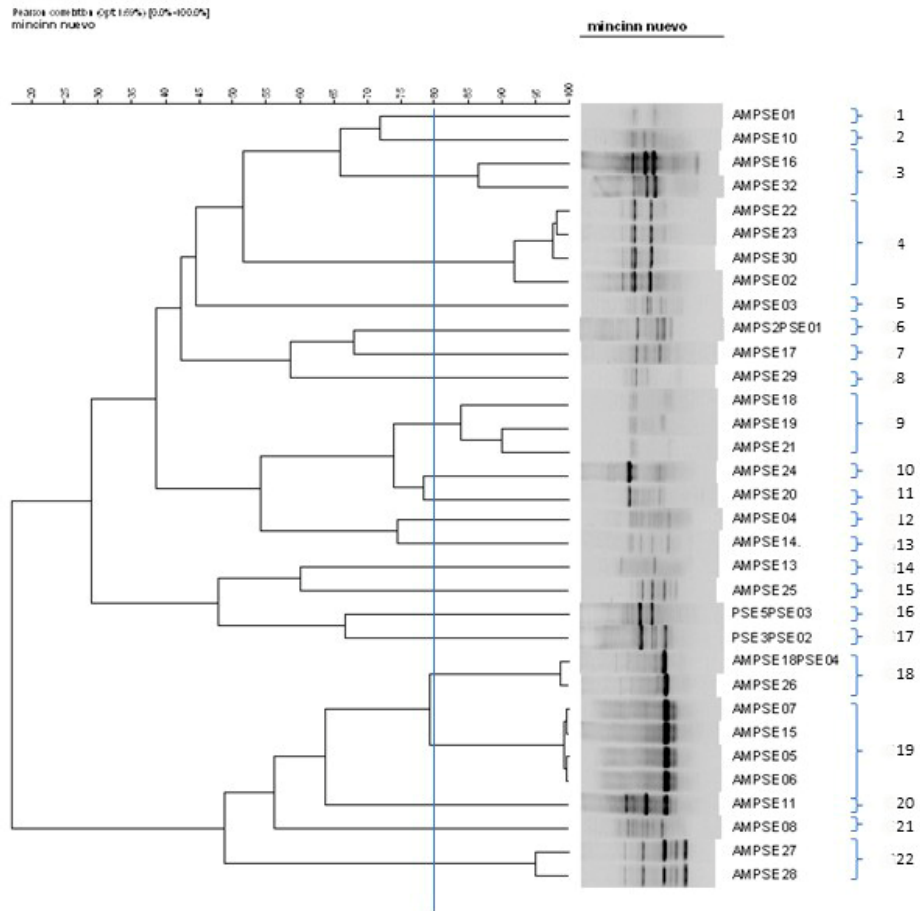


Figura 40. Dendrograma de las cepas analizadas por M13-RAPD basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson.

Tabla 17. Distribución de cepas según los tipos de perfiles M13-RAPD. En negrita, cepas seleccionadas como representantes de cada tipo.

Grupo de RAPD	Nombre de las cepas
Grupo 1	AMPSE01
Grupo 2	AMPSE10
Grupo 3	AMPSE16, AMPSE32
Grupo 4	AMPSE10, AMPSE02, AMPSE22, AMPSE23, AMPSE30
Grupo 5	AMPSE03
Grupo 6	AMPS02PSE01
Grupo 7	AMPSE17
Grupo 8	AMPSE29
Grupo 9	AMPSE18, AMPSE19, AMPSE21
Grupo 10	AMPSE24
Grupo 11	AMPSE20
Grupo 12	AMPSE04
Grupo 13	AMPSE14
Grupo 14	AMPSE13
Grupo 15	AMPSE25
Grupo 16	PSE5PSE03
Grupo 17	PSE3PSE02
Grupo 18	AMPS18PSE04, AMPSE26
Grupo 19	AMPSE05, AMPSE06, AMPSE07, AMPSE15
Grupo 20	AMPSE11
Grupo 21	AMPSE08
Grupo 22	AMPSE27, AMPSE28

1.2. Identificación de las cepas de bacterias endófitas

La secuenciación del gen ribosómico 16S se realizó utilizando un representante de cada uno de los tipos de RAPD encontrados. En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos, observándose un gran dominio de bacterias Gram positivas del Phylum Firmicutes sobre todo del género *Bacillus*, y una menor representación de cepas de los géneros *Domibacillus*, *Psychrobacillus*, *Terribacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* o *Paenisporosarcina*. Curiosamente sólo se encontró un género del Phylum Actinobacteria, *Dermacoccus*, y dos géneros del Phylum Proteobacteria, uno de ellos de la clase α -Proteobacteria, *Agrobacterium*, y otro de la clase β -Proteobacteria, *Massilia*. Los resultados de la identificación se muestran en la Tabla 18 y los de los análisis filogenéticos en las figuras 41 y 42. De acuerdo con los resultados obtenidos, dentro del género *Bacillus* se identificaron 4 especies, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus tequilensis*. Entre ellas, la especie más abundante fue *B. simplex*, con 9 cepas que presentaron, en su mayoría, una similitud del 99,9% en la secuencia del gen ribosómico 16S con respecto a la de la cepa tipo de esta especie. Sólo la cepa AMPSE13 presentó una similitud menor, del 99,2%, lo que indica que esta cepa probablemente no pertenece a la especie *B. simplex*, ya que en el género *Bacillus* las distancias en el gen ribosómico 16S entre especies diferentes son muy pequeñas (figura 41). Los cuatro aislados que presentaron un 99,9% con respecto a la cepa tipo de la especie *B. tequilensis* probablemente pertenecen a esta especie. Y, finalmente, dos

cepas presentaron 99,9 y 99,3% de similitud, respectivamente, con respecto a las cepas tipo de *B. aryabhatai* y *B. idriensis*. Estas similitudes y los resultados del análisis filogenético de este gen sugieren que la cepa AMPSE08 podría pertenecer a una especie no descrita al igual que en el caso de la cepa AMPSE13 (figura 41).

Tabla 18. Resultado del análisis de secuencias del gen ribosómico 16S.

Cepas	Especie más próxima	N° de acceso Genbank	Identidad (%)
AMPSE01	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	CP017704.1	99,9
AMPSE03	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> DSM 20448 ^T	X87757	99,8
AMPSE04	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	CP017704.1	99,9
AMPSE05	<i>Bacillus tequilensis</i> 10b ^T	HQ223107	99,9
AMPSE08	<i>Bacillus idriensis</i> SMC 4352-2 ^T	AY904033	99,3
AMPSE10	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99,9
AMPSE11	<i>Domibacillus robiginosus</i> WS 4628 ^T	HE577175	99,0
AMPSE13	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	CP017704.1	99,2
AMPSE14	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	CP017704.1	99,9
AMPSE16	<i>Agrobacterium skirniwicense</i> Ch11 ^T	HQ823551	99,6
AMPSE17	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	CP017704.1	99,9
AMPSE18	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	CP017704.1	99,9
AMPSE20	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	EF114313	99,9
AMPSE22	<i>Massilia suwonensis</i> 5414S-25 ^T	FJ969487	99,6
AMPSE24	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> DSM 11713 ^T	AJ277984	99,4
AMPSE25	<i>Psychrobacillus lasiicapiti</i> NEAU-3TGS17 ^T	KP219721	98,4
AMPSE27	<i>Terribacillus goriensis</i> CL-GR16 ^T	DQ519571	100
AMPSE29	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	AM747813	99,9
PSE3PSE02	<i>Paenibacillus tundrae</i> A10b ^T	EU558284	99,6
PSE5PSE03	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 ^T	CP017704.1	99,9
AMPSE2PSE01	<i>Oceanobacillus sojiae</i> Y27 ^T	AB473561	99,8
AMPSE18PSE04	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i> SK 55 ^T	DQ333897	98,9

En el género *Psychrobacillus* se identificaron dos especies, *Psychrobacillus psychrodurans* y *Psychrobacillus lasiicapiti*, que incluyeron una sola cepa en ambos casos. La cepa AMPSE24 que fue próxima a la cepa tipo de *P. psychrodurans* con un 99,4% de similitud y la cepa AMPSE25 que, con un 98,4% de similitud, fue próxima a la cepa tipo de *P. lasiicapiti*. Ambas cepas, particularmente la cepa AMPSE25, representan especies no descritas del género *Psychrobacillus* teniendo en cuenta que este género también contiene especies con genes ribosómicos 16S muy próximos filogenéticamente (figura 41). Lo mismo ocurre con la cepa AMPSE11 cuya secuencia mostró un 99% de similitud con respecto a la cepa tipo de *Domibacillus robiginosus*. Las cepas PSE3PSE02, AMPSE27, AMPSE2PSE01 y AMPSE03 se identificaron como *Paenibacillus tundrae*, *Terribacillus goriensis*, *Oceanobacillus sojiae* y *Dermacoccus nishinomiyaensis* con similitudes superiores al 99,5% con respecto a las cepas tipo de estas especies. Finalmente, dentro de los Gram positivos, la cepa AMPSE18PSE04 con una similitud inferior al 99% con respecto a la cepa tipo de *Paenisporosarcina quisquiliarum*, pertenece a una especie no descrita del género *Paenisporosarcina*.

Las dos cepas de bacilos Gram negativos, AMPSE16 y AMPSE22, fueron identificadas con *Agrobacterium skirniawicense* y *Massilia suwonensis* con un 99,6% de similitud con respecto a las cepas tipo de estas especies (Fig 42).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios dirigidos a la identificación de bacterias endófitas de raíces de diferentes plantas, incluyendo tanto leguminosas como no leguminosas (Velázquez et al. 2013, Velázquez et al. 2017a). En muchos de estos estudios se han hallado algunas de las especies identificadas en este estudio, como *Bacillus simplex* que se aisló de *Sphaerophysa salsula* (Deng et al. 2001), *B. aryabhatai* aislada de soja (Ramesh et al. 2014) y otras leguminosas silvestres de los géneros *Caragana* y *Oxytropis* (Xu et al. 2014) y cepas de *Massilia* aisladas a partir de nódulos de *Medicago lupulina* (de Mayer et al. 2015). Los géneros *Paenibacillus* y *Agrobacterium* se aíslan habitualmente a partir de nódulos de leguminosas (Velázquez et al. 2013, Velázquez et al. 2017), sin embargo, las dos especies aisladas en este estudio, *P. tundrae* y *A. skirniawicense* no se han reportado hasta el momento como endófitos de nódulos de leguminosas al igual que ocurre con los géneros *Domibacillus*, *Psychrobacillus*, *Terribacillus*, *Paenisporosarcina* y *Dermacoccus*.

Estos datos corroboran que los nódulos de leguminosas constituyen nichos ecológicos muy diferentes que albergan a *Rhizobium*, que inducen la organogénesis nodular, y a un gran número de otras especies bacterianas que dependen no sólo del suelo, sino también del hospedador (Narula et al. 2013; Xu et al. 2014; De Meyer et al. 2015; Busby et al. 2016). Los nódulos de leguminosas también son una fuente muy importante de nuevas especies de bacterias (Velázquez et al. 2017 a y b).

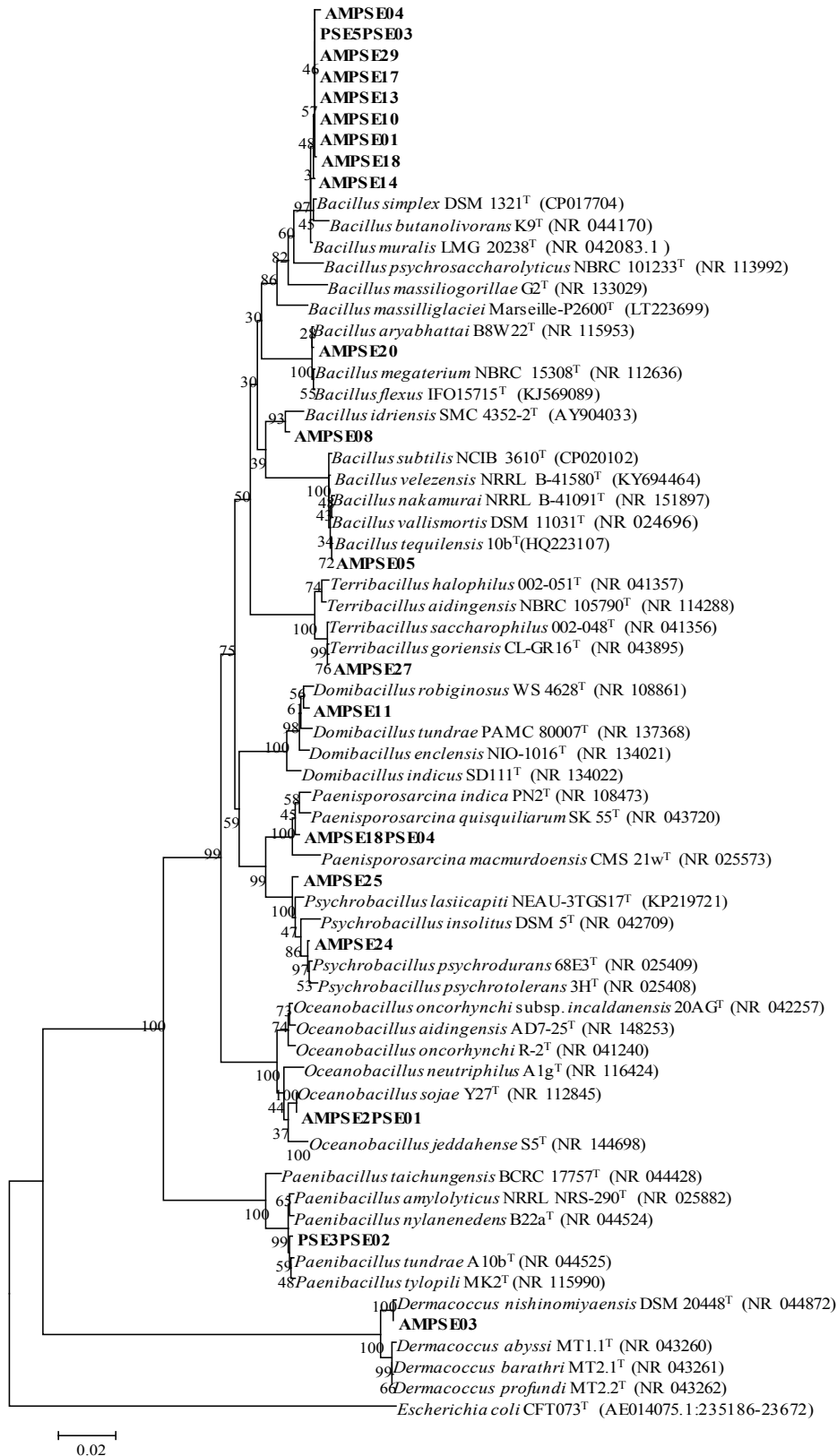


Figura 41. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas Gram positivas aisladas en este estudio. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y test Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas.

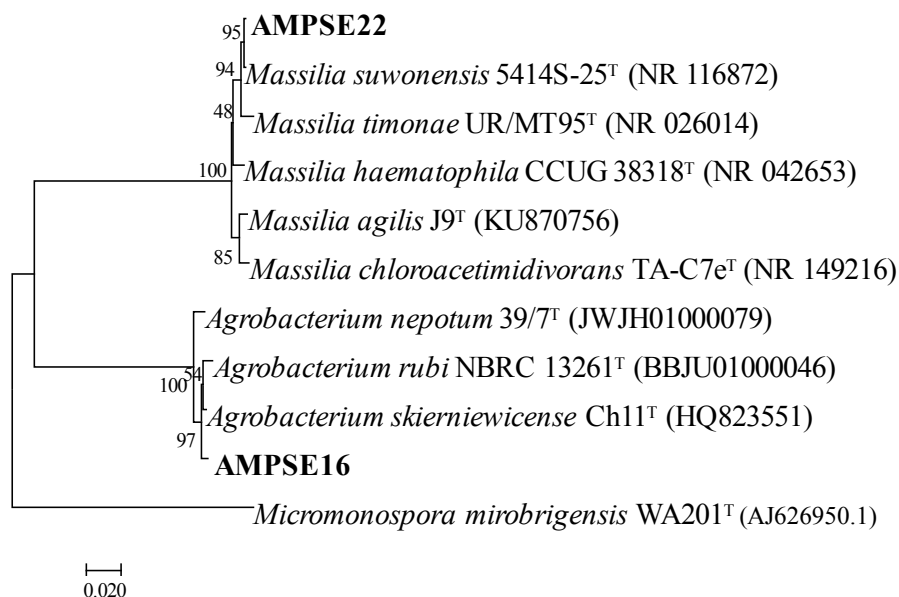


Figura 42. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas Gram negativas aisladas en este estudio. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y test Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas.

2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

El interés de estudiar la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de las bacterias endofíticas radica en su posible aplicación como biofertilizantes, ya sea solas o en forma de consorcios en los que pueden incluirse cepas de *Rhizobium*. Para elaborar consorcios en el que las cepas presenten efectos sinérgicos en la promoción del crecimiento de las plantas, se han buscado cepas endófitas de nódulos de leguminosas y se han analizado sus mecanismos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*. Se ha descrito que la mayoría de estos endófitos son capaces de producir mecanismos de promoción del crecimiento vegetal como la solubilización de fosfato, producción de sideróforos, producción de fitohormonas o la fijación de nitrógeno en vida libre (Celador-Lera et al. 2016) En este estudio se han analizado los mismos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que en las cepas de *Rhizobium*, como son la solubilización de fosfato y la producción de sideróforos y ácido indol acético, pero además su capacidad para crecer en medios libres de nitrógeno que nos indica el potencial para fijar nitrógeno atmosférico.

2.1. Solubilización de fosfato.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de las cepas aisladas para solubilizar fosfatos bicálcico y tricálcico. Los resultados obtenidos mostraron que, igual que en el caso de las cepas de *Rhizobium*, la solubilización de fosfato bicálcico era mucho más común y estaba más extendida con un 42% (n=14) de los aislados capaces de solubilizarlo mostrando índices de solubilización muy variados (Tabla 19). En el caso del fosfato tricálcico, tan sólo 2 de las cepas, AMPSE20 y PSE3PSE02, presentaron

capacidad para solubilizarlo, destacando que la cepa PSE3PSE02 presentó un mayor PSI para el fosfato tricálcico que para el fosfato bicálcico (Fig. 43). En cualquier caso, los resultados son consistentes con los recopilados en algunas revisiones que indican que entre el 20% y el 40% de los microorganismos del suelo presentarían capacidad para solubilizar fosfato (Goswami et al. 2016).

Se observó una gran heterogeneidad en las cepas de género *Bacillus*, con diferencias marcadas entre especies, entre las que *B. simplex* presentó pocas cepas con actividad solubilizadora, mientras que todos los aislados de *B. tequilensis* presentaron actividades discretas, con índices similares entre las cepas identificadas en esta especie (tabla 19). Cabe destacar a la cepa *B. aryabhatai* AMPSE20 que presentó la mayor capacidad de solubilización de fosfato entre los aislados. Estos resultados muestran que, aunque el género *Bacillus* siempre ha sido considerado como un buen solubilizador de fosfato (Meena et al. 2017), esta capacidad no es igual en todas sus especies. El género *Paenibacillus* está representado en este estudio sólo por la cepa PSE3PSE02, que es una buena solubilizadora de fosfato bicálcico y tricálcico, y pertenece a la especie *P. tundrae*. Las cepas *D. nishinomiyaensis* AMPSE03, *O. sojajae* AMPSE01, *A. skierniwickense* AMPSE16 y AMPSE32, y *P. psychrodurans* AMPSE24 también mostraron ser capaces de solubilizar fosfato bicálcico, aunque en cantidades más discretas que las cepas de *Bacillus* y *Paenibacillus*.

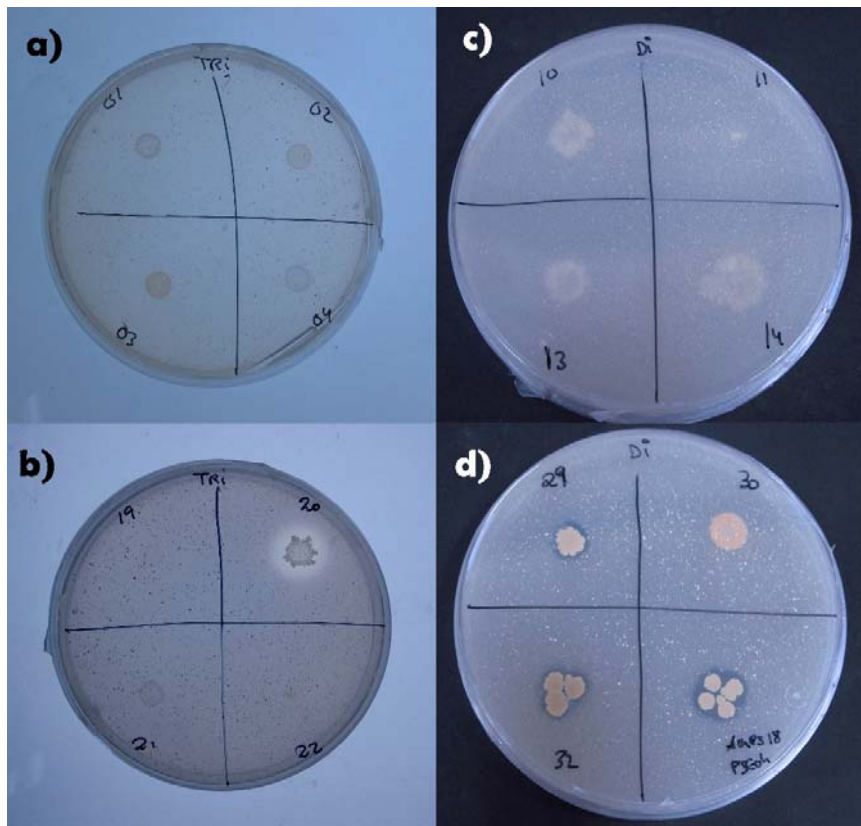


Figura 43. Solubilización de fosfato en medio Pikovskaya de diferentes cepas en a) y b) fosfato tricálcico, c) y d) fosfato bicálcico.

Tabla 19. Solubilización de fosfato (PSI), producción de sideróforos, producción de ácido indol acético (mg/l) y crecimiento en medio libre de nitrógeno.

Cepa	Especie más próxima	PSI		Sideróforos	IAA (mg/l)	Crecimiento en medio sin N
		Ca ₂ PO ₃	Ca ₃ (PO ₃) ₂			
AMPSE 01	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	+	14	-
AMPSE 02	<i>Bacillus simplex</i>	1,40	0,00	+	75,9	-
AMPSE 03	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	1,40	0,00	+	14,3	+
AMPSE 04	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	+	117,6	-
AMPSE 05	<i>Bacillus tequilensis</i>	1,13	0,00	+	34,1	-
AMPSE 06	<i>Bacillus tequilensis</i>	1,14	0,00	+	32,5	+
AMPSE 07	<i>Bacillus tequilensis</i>	1,13	0,00	+	28,5	-
AMPSE 08	<i>Bacillus idriensis</i>	0,00	0,00	+	64,1	-
AMPSE 10	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	42,2	
AMPSE 11	<i>Domibacillus robiginosus</i>	0,00	0,00	+	35,3	-
AMPSE 13	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	38,6	-
AMPSE 14	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	++	137,8	+
AMPSE 15	<i>Bacillus tequilensis</i>	1,13	0,00	+	27,2	+
AMPSE 16	<i>Agrobacterium skierniwickense</i>	1,31	0,00	-	396	-
AMPSE 17	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	++	25,2	+
AMPSE 18	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	49,1	-
AMPSE 19	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	+	75,1	-
AMPSE 20	<i>Bacillus aryabhatai</i>	2,29	1,44	++	217,3	w
AMPSE 21	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	69,4	-
AMPSE 22	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	109,9	+
AMPSE 23	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	88,4	+
AMPSE 24	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	1,33	0,00	-	37,8	w
AMPSE 25	<i>Psychrobacillus lasiicapiti</i>	0,00	0,00	-	28	+
AMPSE 26	<i>Paenisporsarcina quisquiliarum</i>	1,60	0,00	-	13,4	w
AMPSE 27	<i>Terribacillus goriensis</i>	0,00	0,00	-	39	w
AMPSE 28	<i>Terribacillus goriensis</i>	0,00	0,00	-	37	+
AMPSE 29	<i>Bacillus simplex</i>	1,29	0,00	-	42,4	-
AMPSE 30	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	80,7	-
AMPSE 32	<i>Agrobacterium skierniwickense</i>	1,22	0,00	-	165	-
AMPSE2PSE01	<i>Oceanobacillus sojiae</i>	1,75	0,00	-	17,9	+
AMPSE18PSE04	<i>Paenisporsarcina quisquiliarum</i>	1,33	0,00	+	8,6	+
PSE5PSE03	<i>Bacillus simplex</i>	0,00	0,00	-	30,1	+
PSE3PSE02	<i>Paenibacillus tundrae</i>	1,29	1,40	-	16,7	w

2.2. Producción de sideróforos.

Los resultados de producción de sideróforos mostraron esta capacidad para un 50% (n=16) de los aislados, entre los que cabe destacar la capacidad de las cepas AMPSE14, AMPSE17 y AMPSE20 (Tabla 19), todas pertenecientes al género *Bacillus*, que contiene muchas especies productoras de estos compuestos (Yu et al. 2011; Saha et al. 2016). Las dos primeras cepas, AMPSE14 y AMPSE17 (Fig. 44), pertenecen a *B. simplex*, una especie que mostró gran variabilidad intraespecífica con grandes productores de sideróforos como la cepa AMPSE14 y otras cepas que no presentan esta capacidad (Tabla 19) y la cepa AMPSE20 pertenece a *B. aryabhatai*. También produjeron sideróforos cepas de *Dermacoccus*, *Domibacillus* y *Paenisporosarcina*, aunque de manera más discreta que las pertenecientes al género *Bacillus*. El resto de las cepas, tanto de géneros Gram positivos, *Terribacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Psychrobacillus*, como Gram negativos, *Agrobacterium* y *Massilia*, no produjeron sideróforos.

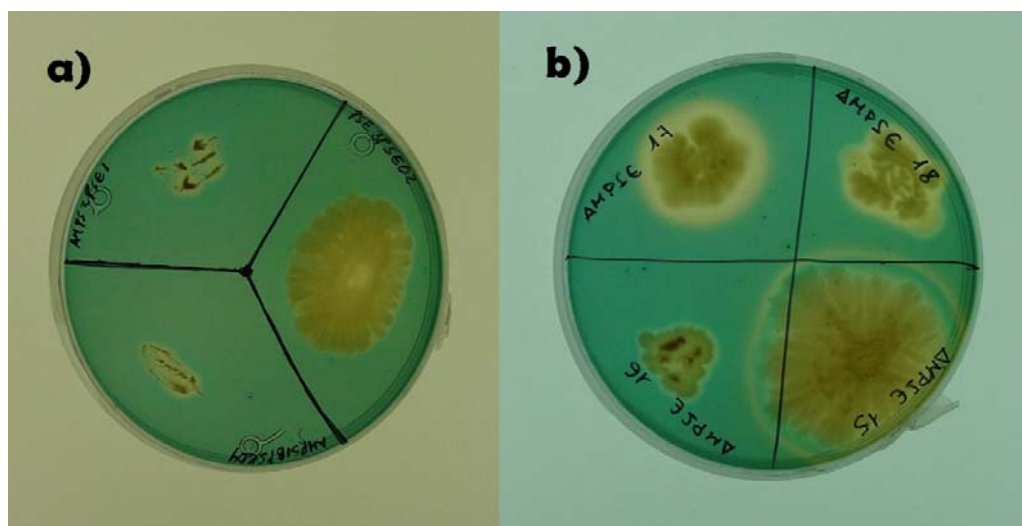


Figura 44. Producción de sideróforos en medio M9-CAS-agar por diferentes cepas aisladas en este estudio. a) cepas AMPSE01, PSE3PSE02 y AMPSE18PSE04, y b) AMPSE16, AMPSE17 y AMPSE18.

2.3. Producción de ácido indol acético

Todos los aislados mostraron ser capaces de producir ácido indol acético, encontrándose la mayoría de ellos entre 25 y 80 mg/l (Fig. 45), aunque algunas cepas produjeron cantidades inferiores a 15 mg/l como AMPSE01 o AMPSE18PSE05 y otras superiores a 100 mg/l como *M. suwonensis* AMPSE22 con 109,9 mg/l. Valores altos se observaron también en las cepas *B. aryabhatai* AMPSE20 con 207 mg/l, *B. simplex* AMPSE14 con 137,8 mg/l y *B. simplex* AMPSE04 con 117,6 mg/l. La producción de ácido indol acético es una cualidad extendida entre bacterias del género *Bacillus* como ponen de manifiesto numerosos estudios (Palaniappan et al. 2010; Giassi et al. 2016; Yadav y Verma 2014), sin embargo, las concentraciones detectadas son sumamente variables, desde muy pocos mg/l hasta más de 100 mg/l. Las cepas pertenecientes a los

géneros *Dermaococcus*, *Terribacillus*, *Ocenaibacillus*, *Psycrobacillus* y *Domibacillus* presentaban producciones de esta fitohormona muy discretas, siempre inferiores a 40 mg/l. Las cepas *A. skierniewicense* AMPSE16 y AMPSE32 produjeron elevadas cantidades de ácido indol acético, 396 mg/l y 165 mg/l, respectivamente, algo esperable puesto que las especies del género *Agrobacterium* suele presentar elevadas producciones de esta fitohormona (Vidhyasekaran, 2015).

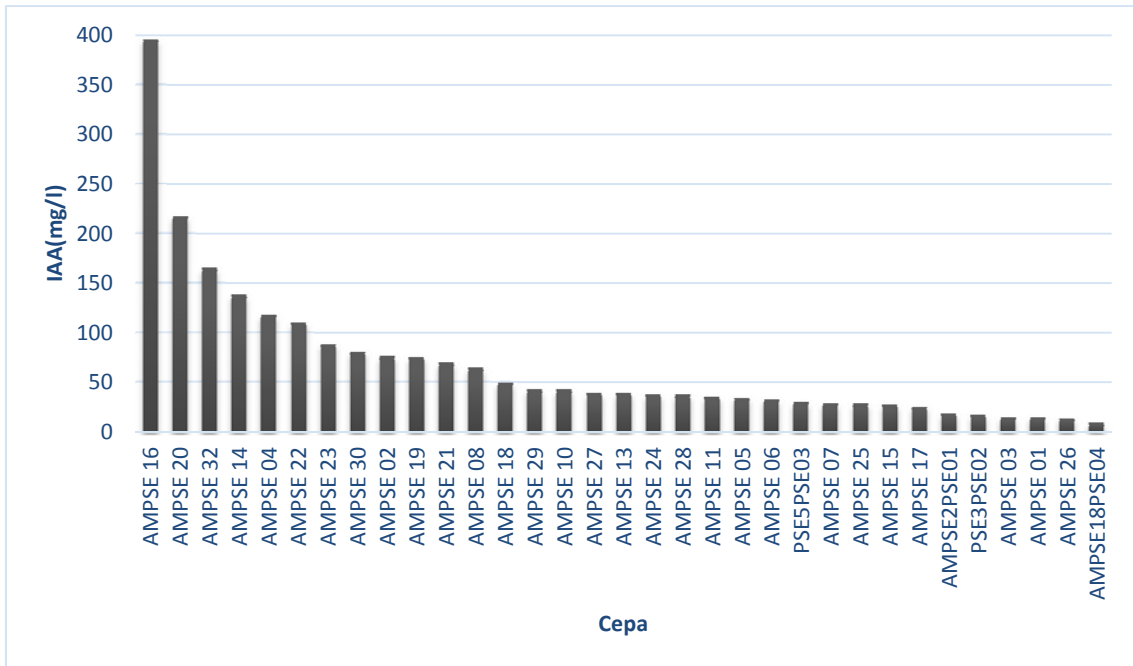


Figura 45. Producción de ácido indol acético

2.4. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.

Aunque sólo es una estimación presuntiva, el crecimiento en medios libres de nitrógeno es una cualidad presentada por las bacterias que fijan nitrógeno en vida libre y utilizan nitrógeno atmosférico para sintetizar amonio y posteriormente compuestos orgánicos. En este estudio se observó que 12 de los aislados presentaban un crecimiento claro tras tres pasos por el medio de cultivo libre de nitrógeno y 5 lo hacían de forma débil. Las cepas que crecieron en este medio se identificaron como *B. simplex*, *B. aryabhatai*, *D. nishinoviayensis*, *P. psychrodurans*, *T. goriensis*, *O. sojae*, *P. quisquiliarum*, *P. tundrae* y *M. suwonensis*. *Bacillus* es un género asociado tradicionalmente a la fijación biológica de nitrógeno en vida libre, aunque esta propiedad no la presentan todas las especies al ser un muy extenso (Huang et al. 2015). También se ha detectado la presencia de nitrogenasa en las especies *P. psychrodurans* (Xu et al. 2018), pero el género fijador por excelencia es *Paenibacillus*, muchas de cuyas especies poseen esta facultad (Grady et al. 2016).

3. Compatibilidad de las cepas de endófitos y de *Rhizobium*.

De las cepas de bacterias endófitas aisladas a partir de nódulos de *Pisum sativum* en la localidad de Aldea de San Miguel que presentaron varios mecanismos de

promoción del crecimiento vegetal, se seleccionaron 3 cepas, *B. simplex* AMPSE14, *Bacillus aryabhatai* AMPSE20 y *P. tundrae* PSE3PSE02 para estudios posteriores. La cepa AMPSE14 mostró ser buena productora de sideróforos, produjo niveles medios de ácido indol acético y creció en medio libre de nitrógeno, y además pertenece a la especie más común entre los aislados a partir de nódulos de *P. sativum* en esta localidad. La cepa AMPSE20 presentó buena solubilización de fosfato, producción de sideróforos, producción importante de ácido indol acético y, aunque de forma más débil que en el caso de la cepa AMPSE14, fue capaz de crecer en medio libre de nitrógeno. La cepa PSE3PSE02, presentó buena solubilización de fosfato sobre las dos formas químicas analizadas, y una moderada producción de ácido indol acético. Otra de las razones fundamentales para la selección de estas cepas son las ventajas tecnológicas de las bacterias esporuladas a la hora de producir biofertilizantes, sin embargo, las especies del género *Bacillus* pueden producir antibióticos y bacteriocinas (Paterson et al. 2017). Teniendo en cuenta este hecho y que el objetivo de este estudio era diseñar consorcios de bacterias endófitas de nódulo y cepas de *Rhizobium*, es preciso evaluar la compatibilidad de las cepas seleccionados con la cepa *R. laguerreae* AMPS34, que fue seleccionada en ensayos de efectividad en *P. sativum*. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de antagonismo en placa y también se analizó el efecto de los sobrenadantes de cada una de las cepas endófitas sobre la cepa de *Rhizobium* y viceversa.

En la figura 46 se muestra cómo en ninguno de los casos se observa una inhibición del crecimiento de la cepa AMPS34 en el test de antagonismo, observándose un desarrollo normal tanto de los endófitos como del endosimbionte. Tampoco se observó inhibición del crecimiento de la cepa AMPS34 utilizando los sobrenadantes de cultivo de cada uno de los endófitos (Fig. 46), ni a la inversa (Fig. 46).

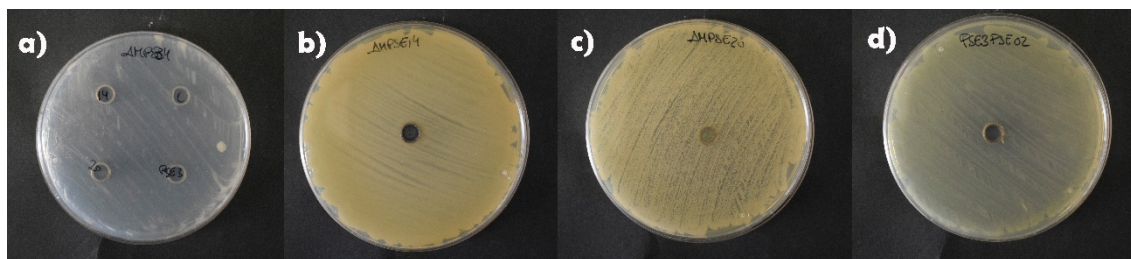


Figura 46. Ensayo de compatibilidad a) Efecto del sobrenadante de los endófitos sobre el desarrollo de AMPS34; y efecto del sobrenadante de AMPS34 sobre el desarrollo de b) AMPSE14, b) AMPSE20 y d) PSE3PSE02.

4. Determinación de la capacidad para formar biofilms.

La formación de biofilms ha demostrado ser una importante cualidad a la hora de desarrollar un inoculante bacteriano, ya que mejora la eficiencia en las primeras etapas, permitiendo una interacción más directa del desarrollo de las plantas (Lin et al. 2012), además de reducir la incidencia de patógenos y sustancias tóxicas mediante la creación de una barrera física que actúa de manera selectiva y en la que se expresan

multitud de enzimas líticas (Kumar et al. 2013). La capacidad para formar biofilms depende en gran medida de la especie e incluso del género bacteriano, por ejemplo, en el caso del género *Bacillus* numerosos estudios han puesto de manifiesto la capacidad para formar biofilms de alta densidad y estructura compacta (Branda et al. 2001; Morikawa et al. 2006; Wijman et al. 2007), habiéndose estudiado ampliamente los de *B. subtilis* (Mielich-Süss y Lopez et al. 2015) y *B. cereus* (Majed et al. 2016). Este tipo de estructuras determinan en gran medida sus aplicaciones y actividades tanto en el caso de las especies beneficiosas como en el de las patógenas. En este estudio se analizó la capacidad de las cepas endófitas seleccionadas AMPSE14, AMPSE20 y PSE3PSE02 solas y mezcladas con la cepa de *R. laguerreae* AMPS34 en diferentes proporciones.

4.1. Determinación cuantitativa de biofilms

Se utilizaron las mismas condiciones, medios y metodologías que en el caso de las cepas de *Rhizobium*. En estas condiciones todos los endofitos analizados *B. simplex* AMPSE14, *B. aryabhatai* AMPSE20 y *P. tundrae* PSE3PSE02 presentaban capacidad de formar biofilms, destacando la cepa AMPSE20 con valores de absorbancia muy elevados, cercanos a 2,5, seguida de la cepa AMPSE14 con valores máximos un poco superiores a 1 y de la cepa PSE3PSE02, que presentó valores de absorbancia en torno a 0,8. La dinámica de desarrollo de biofilms que presentó la cepa AMPSE14 indicó una colonización muy activa desde los primeros momentos de la inoculación, superando a las 24 h de la inoculación los valores observados en la cepa PSE3PSE02 al cabo de 72 h de la misma. También es destacable la dinámica seguida por la cepa AMPSE20 que, a pesar de comenzar en valores discretos, al cabo de 48 h fue capaz de generar un biofilm sumamente importante que siguió desarrollándose hasta las 72 h (Fig. 47).

Como se ha mencionado antes, se estudió la evolución de biofilms mixtos entre la cepa *R. laguerreae* AMPS34 y cada una de las cepas endófitas seleccionadas. Los biofilms mixtos han sido estudiados ampliamente en el ámbito sanitario donde tiene especial relevancia en la cavidad oral y en las enfermedades hospitalarias desarrolladas por patógenos como *Staphylococcus aureus* o *K. pneumoniae* (Bridier et al. 2012; Lee et al. 2014), pero hay pocos ensayos en vegetales en los que se ha ensayado, por ejemplo, la influencia de biofilms generados por especies patogénicas de *Salmonella* (Jahid et al. 2015). Por esta razón el estudio de biofilms mixtos de bacterias endófitas puede aportar nuevos datos, ya que en los últimos años se han empezado a dilucidar las múltiples implicaciones que tienen estos sistemas ecológicos en los ecosistemas (Elias y Banin 2012; Flemming et al. 2016).

En este estudio se analizaron cultivos mixtos en distintas proporciones, 1:1, 1:10 y 1:100, siempre en concentraciones decrecientes del endófito, por presentar tasas de replicación más elevadas que la cepa de *Rhizobium*. En todos los casos, los valores obtenidos en este estudio fueron inferiores a aquéllos obtenidos cuando las cepas endófitas se encontraban en cultivo puro. También se observó una relación similar entre las distintas proporciones de cada uno de los endófitos, la proporción 1:1 *Rhizobium*-endófito producía biofilms más intensos, fruto de la mayor concentración del endófito,

sin embargo, los valores de absorbancia registrados disminuían a medida que disminuía la concentración del endófito.

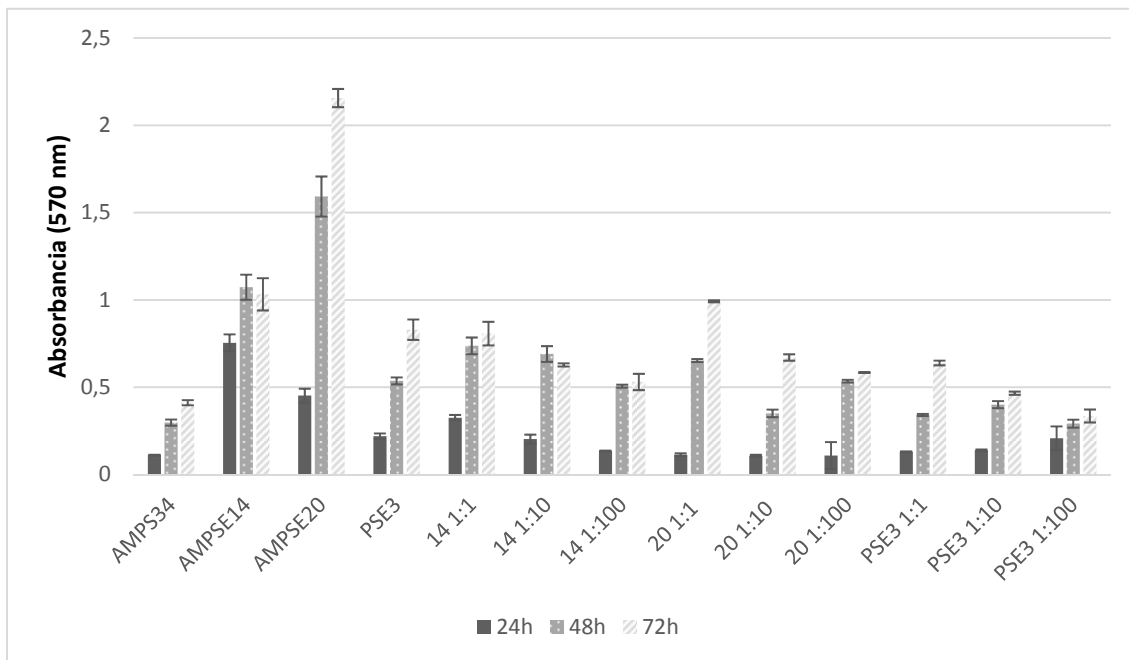


Figura 47. Producción de biofilms a 24, 48 y 72 horas en placas multipocillo. La producción de biofilm se expresa en unidades de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

En los cultivos mixtos, la mezcla de las cepas AMPSE20 y AMPS34 mostró los valores de absorbancia más elevados, observándose en la proporción 1:1 una tendencia similar a la seguida por la cepa AMPSE20 cuando crece de en cultivo puro, aunque con absorbancias mucho menores. Sin embargo, en la proporción mayor de la cepa AMPS34 la dinámica de formación de biofilms se aproxima a la observada en esta cepa. En el caso de la mezcla de AMPSE14 y AMPS34, aunque las absorbancias son menores que en el cultivo puro de la cepa AMPSE14, la dinámica de la formación de biofilms es similar a la del cultivo puro de esta cepa. En el caso de la cepa PSE3PSE02, sólo la proporción 1:1 presentó más absorbancia que la cepa de *R. laguerreae* AMPS34 en cultivo puro y la dinámica de la formación de biofilms se fue pareciendo más a la de esta cepa hasta ser casi estática en el caso de la proporción 1:100. Aunque existen algunas referencias en la bibliografía de formación de biofilms por cultivos mixtos que involucran a cepas de *Bacillus* en determinadas superficies (Morikawa 2006), no se han descrito aún en tejidos de plantas, por lo que se desconocen tanto su influencia en el crecimiento de las mismas como su regulación, aunque es posible que estén basados en sistemas de *Quorum sensing* (Dong y Zhang 2005; Sanchez-Contreras et al. 2007; Garg et al. 2014).

4.2. Determinación cualitativa de biofilms

En la observación directa de los biofilms mediante tinción con naranja de acridina se comprobó que los elevados datos de absorbancia obtenidos en el experimento anterior para las cepas del género *Bacillus*, AMPSE14 y AMPSE20, coincidían con una colonización densa y con un polisacárido mucho más escaso que en el caso de las cepas del género *Rhizobium* (Fig. 48 a, b, e y f). Los biofilms formados por la cepa AMPSE14 presentó numerosas acanaladuras (Fig. 48 a y c) con una extensión tridimensional menos evidente que la que se observó en la cepa AMPSE20 (Fig. 48 e y g). En las imágenes se aprecia cómo esta última cepa produce biofilms muy densos y con gran cantidad de imbricaciones, lo que es concordante con los datos observados en la determinación cuantitativa en la que mostró unos valores de absorbancia muy elevados. La cepa PSE3PSE02 presentó un patrón diferente a los anteriores, con grandes superficies y acumulaciones, observándose formas globosas con una alta densidad de células (Fig. 48 i y k). Estas estructuras coinciden con las descritas en otras especies del género *Bacillus*, donde el biofilm se estructura en grandes masas acanaladas que mejoran la aireación y la difusión de nutrientes (Wilking et al. 2013). Además la utilización de cepas de este género en fase sésil parece presentar un mejor resultado sobre cultivos hortícolas, mejorando la colonización y los parámetros vegetativos como el desarrollo aéreo y radicular (Galelli et al. 2015).

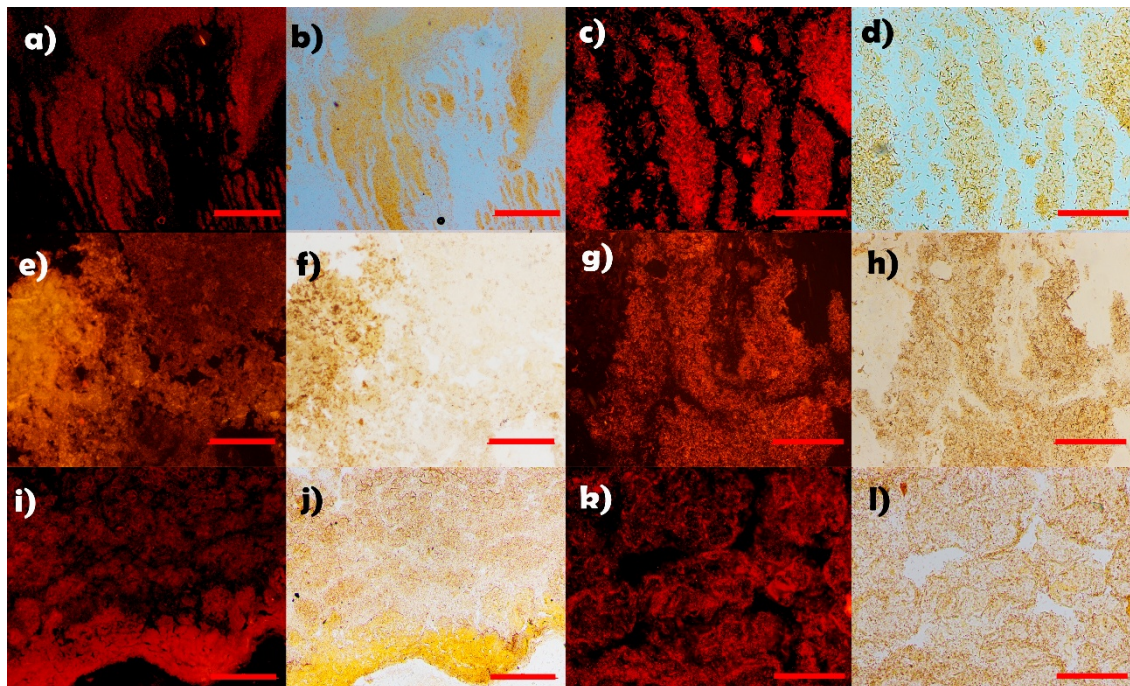


Figura 48. Imagen de microscopía óptica y de fluorescencia de las morfologías de colonización mostradas por las cepas seleccionadas. Microscopia de fluorescencia a) y c), y óptica b) y d) de las estructuras observadas en AMPSE14. Microscopia de fluorescencia e) y g), y óptica f) y h) de la cepa AMPSE20; y microscopia de fluorescencia i) y k), y óptica j) y l) de la morfología del biofilm formado por la cepa PSE3PSE02. El tamaño de las barras es a), b), e), f), i) y j) 50 μm , y c), d), g), h), k) y l) 10 μm .

En cuanto a los cultivos mixtos de *Rhizobium* y bacterias endófitas, se observó que en las diferentes proporciones entre ambos los patrones de colonización no variaban, simplemente se observó una variación en la densidad del endófito en las zonas más alejadas de la interfase aire: líquido. En la figura 49 se pueden observar los distintos patrones de colonización obtenidos. Las mezclas de las cepas *R. laguerreae* AMPS34 y *B. simplex* AMPSE14 presentaron unos patrones de colonización que alternaban las acumulaciones mixtas de ambas cepas y las estructuras similares a velos que se habían visto en los biofilms formados por la cepa de *R. laguerreae* AMPS34 sola (Fig 49 a). En estas últimas estructuras se podían distinguir los bacilos de gran tamaño coincidentes con la morfología de *Bacillus*, integradas en las grandes masas de polisacárido donde aparecían pequeños bacilos identificables con *R. laguerreae* AMPS34 (Fig. 49 d). Estas estructuras difusas producidas por *R. laguerreae* AMPS34 no aparecían cuando se mezcló con la cepa *B. aryabhattai* AMPSE20, aunque sí aparecían grandes masas de células de morfología mixta como se muestra en la Fig. 49 e) y zonas de intensa colonización con numerosas acanaladuras (Fig. 49 g).

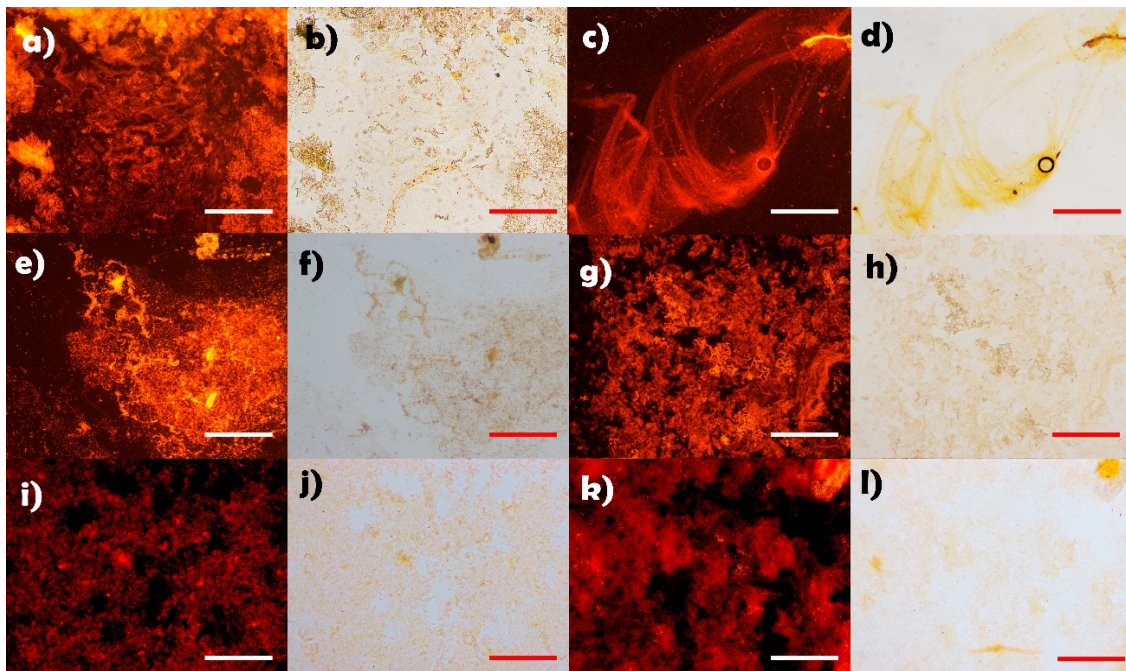


Figura 49. Imagen de microscopía óptica y de fluorescencia de los patrones de colonización mostrados por las cepas seleccionadas. Microscopía de fluorescencia a) y c), y óptica b) y d) del biofilm mixto entre AMPS34 y AMPSE14 en cada una de las fases observadas. Microscopía de fluorescencia e) y g), y óptica f) y h) del biofilm mixto de AMPS34 y AMPSE20; y microscopía de fluorescencia i) y k), y óptica j) y l) de la morfología del biofilm mixto de AMPS34 y PSE3PSE02. El tamaño de las barras es a), b), e), f), g), h), i), j), k) y l) 20 μm , y c), d) 50 μm .

Los biofilms formados por las mezclas de las cepas AMPS34 y PSE3PSE02 presentaron una morfología similar a la que había presentado la cepa PSE3PSE02 sola, con una extensión importante cubriendo amplias zonas de manera muy densa y numerosas estructuras tridimensionales de aspecto globoso (Fig. 49 i y k). Sin embargo,

en este caso, las grandes acumulaciones eran mixtas, destacando claramente las zonas donde dominaba el endófito en las que se observó una coloración mucho más intensa, debido a la mayor cercanía entre las células (Fig. 49 k). Ciertos autores señalan la dificultad de estudiar este tipo de interacción ante la casi imposibilidad de discernir la influencia de cada participante (Røder et al. 2016), por lo que no existen muchas referencias acerca de cuáles son las condiciones que determinan el dominio de una u otra cepa sobre el desarrollo del biofilm (Bridier et al. 2012; Jahid et al. 2015), sobre todo cuando el biofilm está formado por bacterias cuyos sistemas de *Quorum sensing* son, *a priori*, diferentes y, por tanto, la regulación de la expresión de genes que determinan los cambios entre vida bentónica y planctónica es más difícil (Garg et al. 2014; Hartmann et al. 2014; Paul et al. 2018).

5. Estudio de la colonización de guisante y maíz.

El siguiente paso fue el estudio de la colonización *in vivo* de las raíces de guisante y de maíz, un cereal habitualmente cultivado en rotación de cultivo con esta leguminosa. En ambas plantas se utilizaron las cepas *B. simplex* AMPSE14, como modelo del género *Bacillus*, y *P. tundrae* PSE3PSE02, como modelo del género *Paenibacillus*. En primer lugar, se estudió la estructura de los nódulos de guisante mediante técnicas histológicas, después de teñir los nódulos con azul de toluidina, y de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos policlonales contra la enzima uricasa, muy conservada en el género *Bacillus* y otros géneros próximos como *Paenibacillus*. Se realizaron los ensayos de aglutinación para determinar que los anticuerpos eran eficaces contra nuestras cepas y se realizó la titulación mediante la técnica ELISA, relacionándose la dilución 1:2000 del anticuerpo. Se obtuvieron cortes histológicos ultrafinos de nódulos y raíces tratados con un anticuerpo secundario que llevaba acoplado un fluoróforo que permitió localizar las bacterias debido a que emite a una longitud de onda 488nm (color verde).

5.1. Estudio de la estructura de los nódulos de guisante.

La evaluación de la morfología del nódulo aporta una información esencial acerca del desarrollo del proceso de infección y de cómo afecta la inoculación de consorcios bacterianos a la morfología del nódulo utilizando técnicas histológicas después de teñir los nódulos con azul de toluidina (Lieben 2017).

En la figura 50 a) se muestra un corte de un nódulo de una planta inoculada con *R. laguerreae* AMPS34, en el cual se observa la morfología típica de los nódulos indeterminados con cuatro zonas bien diferenciadas, zona meristemática (I), zona de colonización (II), zona de fijación de nitrógeno (III) y zona de senescencia (IV), con un (Serova et al. 2017). A su vez, en la figura 50 b) y d) podemos observar la morfología de los nódulos de plantas de guisante coinoculadas con las cepas endofíticas, que presentaron las mismas zonas observadas en los nódulos originados por la cepa AMPS34. No se apreciaron diferencias en la forma, desarrollo, estructura ni ocupación de los tejidos por parte de la cepa endosimbionte en ninguno de los casos, lo que está de

acuerdo con lo que ya se había observado a nivel macroscópico. Estas imágenes nos muestran que, la inoculación combinada de *Rhizobium* con las cepas endófitas de *B. simplex* AMPSE14 y *P. tundrae* PSE3PSE02 no afectó al desarrollo nodular, a la ocupación por parte de *Rhizobium* de las células del nódulo ni a la formación de simbiosomas, permitiendo un desarrollo nodular normal como el que se observó en la inoculación simple con *Rhizobium* (Fig. 50 b, d y f).

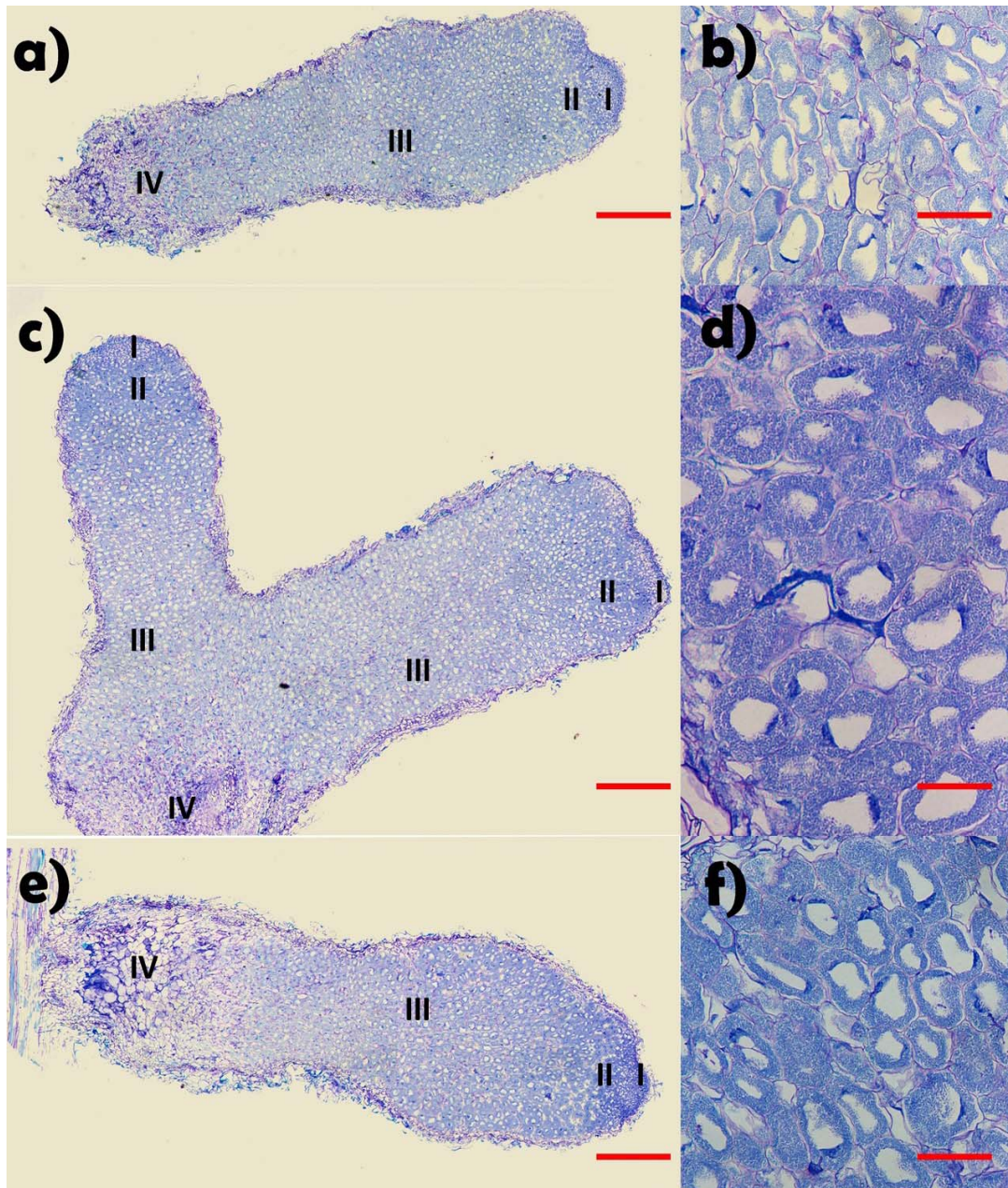


Figura 50. Cortes histológicos de nódulos de *Pisum sativum* teñidos con azul de toluidina donde se indican las zonas del nódulo, zona meristemática (I), zona de colonización (II), zona de fijación de nitrógeno (III) y zona de senescencia (IV). A la derecha una imagen en detalle de la zona de fijación de nitrógeno. a) y b) inoculación simple con AMPS34, b) y c) coinoculación con AMPS34 y AMPSE14 y e) y f) coinoculación con AMPS34 y PSE3PSE02. El tamaño de las barras es a), c) y e) 500 μm , y d), b), y f) 50 μm .

5.2. Estudio de inmunohistoquímica

5.2.1. Nódulos de guisante

En los ensayos de inmunolocalización en los nódulos de guisante de las cepas AMPSE14 y PSE3PSE02, se observó que la colonización era muy variable encontrando zonas con un bajo porcentaje de ocupación por parte de ambas cepas y otras zonas donde existía una mayor ocupación. En la figura 51 se observan los diferentes patrones de colonización de ambas cepas. La cepa AMPSE14 colonizó los tejidos del nódulo de forma bastante homogénea, ocupando las zonas intercelulares y observándose células de forma individual o en parejas, pero no se encontraron grandes racimos o zonas de desarrollo conjunto. En diferentes zonas superficiales del nódulo se podían distinguir importantes acumulaciones de bacterias que destacaban sobre el resto de la superficie del nódulo (Fig. 51 a). Además, parecían localizarse en las invaginaciones de las células superficiales, en lo que podrían ser las zonas de menor energía y menos expuestas, como las observadas en arroz inoculado con *Azospirillum brasilense* (Aguilar-Flores et al. 2001). La cepa PSE3PSE02 mostró también una colonización difusa, más localizada en las primeras capas de células del nódulo y con menor concentración de células a medida que se profundizaba en el mismo (Fig. 51 b y d). Esto es esperable ya que el nódulo es un nicho poblado por numerosas especies de bacterias endófitas que acompañan al endosimbionte principal y se distribuyen de manera diferente en el nódulo (Palaniappan et al. 2010; Narula et al. 2013; Peix et al. 2014; Trabelsi et al. 2017). De esta manera se asegura una colonización por distintas especies sin producirse una competición por el espacio, lo que explicaría la alta diversidad de bacterias de diferentes géneros y familias diferentes que habitan en los nódulos (Trabelsi et al. 2017). La colonización por ambas cepas de los nódulos de guisante coincide con las observaciones de que distintas cepas bacterianas pueden presentar respuestas quimiotácticas diferentes a los exudados de diferentes plantas, teniendo preferencia por aquella de la que han sido aislados (Pereg et al. 2016). Claramente, la capacidad de colonización del endosimbionte no puede ser comparada con la que pueda presentar un endófito, ya que el nódulo es un órgano vegetal inducido por el endosimbionte que domina los diálogos moleculares establecidos con la planta. Sin embargo, el hallazgo de tal diversidad de bacterias endófitas en los nódulos de leguminosas abre nuevas perspectivas acerca de la ecología del nódulo, del papel de las bacterias endófitas en la simbiosis y de las implicaciones de las mismas en el diseño de estrategias para la formulación de biofertilizantes.

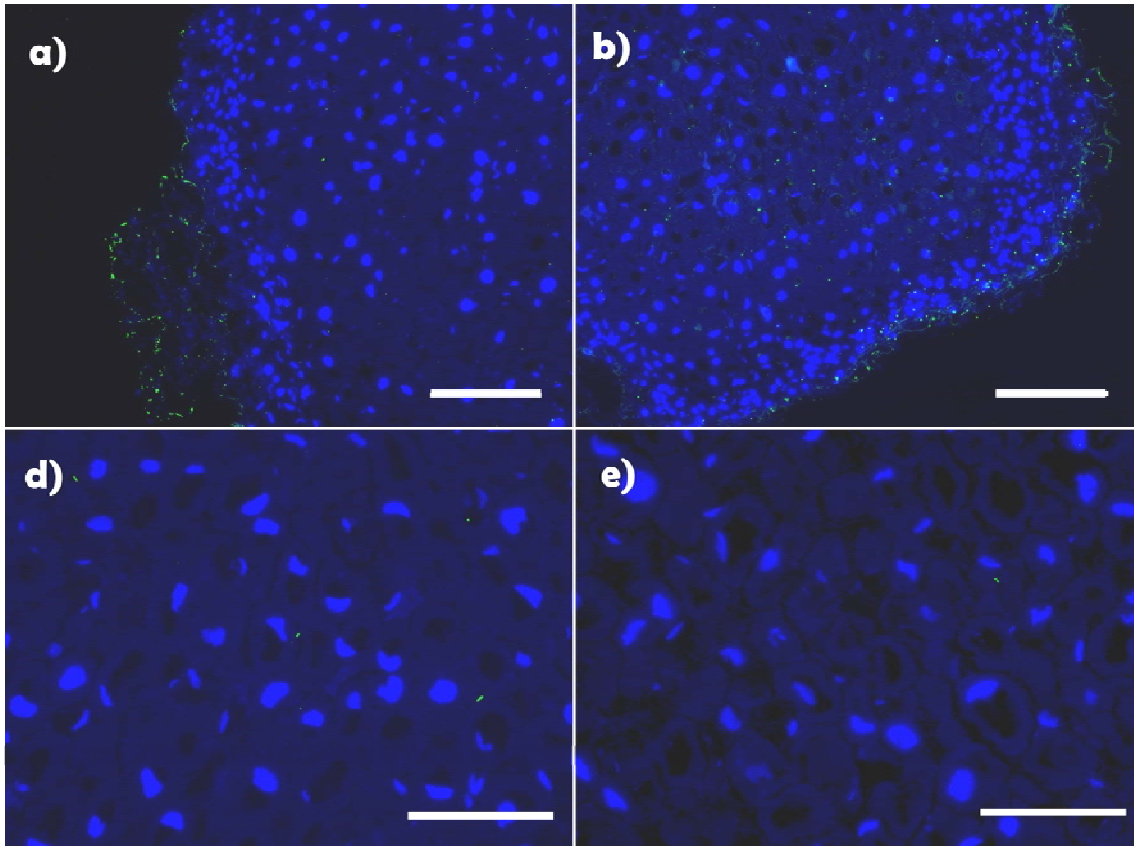


Figura 51. Microscopía de fluorescencia de nódulos de *P. sativum* donde se observa en verde las bacterias de las cepas AMPSE14 y PSE3PSE02 y en azul membranas y orgánulos celulares teñidos con DAPI. a) y b) vista general del nódulo de *P. sativum* donde se observan en verde las bacterias de AMPSE14 y PSE3PSE02 respectivamente, c) y d) detalle de la zona de fijación de los nódulos de cada tratamiento respectivamente. El tamaño de las barras es a) y b) 100 μ m, b) y c) 50 μ m.

5.2.2. Raíces de maíz

En el caso del maíz, ambas cepas mostraban un patrón de colonización dispersa de las raíces, pero más abundante que lo que se había observado en guisante. La cepa AMPSE14 mostraba una colonización generalizada en toda la sección de la raíz (Fig. 52 a), aunque también se observaron zonas donde aparecía colonización superficial muy localizada en los primeros estadios de colonización (Fig. 52 b). En algunas zonas se distinguían células y, en otras, estructuras globosas que podían ser secciones transversales de las células o esporas que se acumulaban en puntos de la superficie.

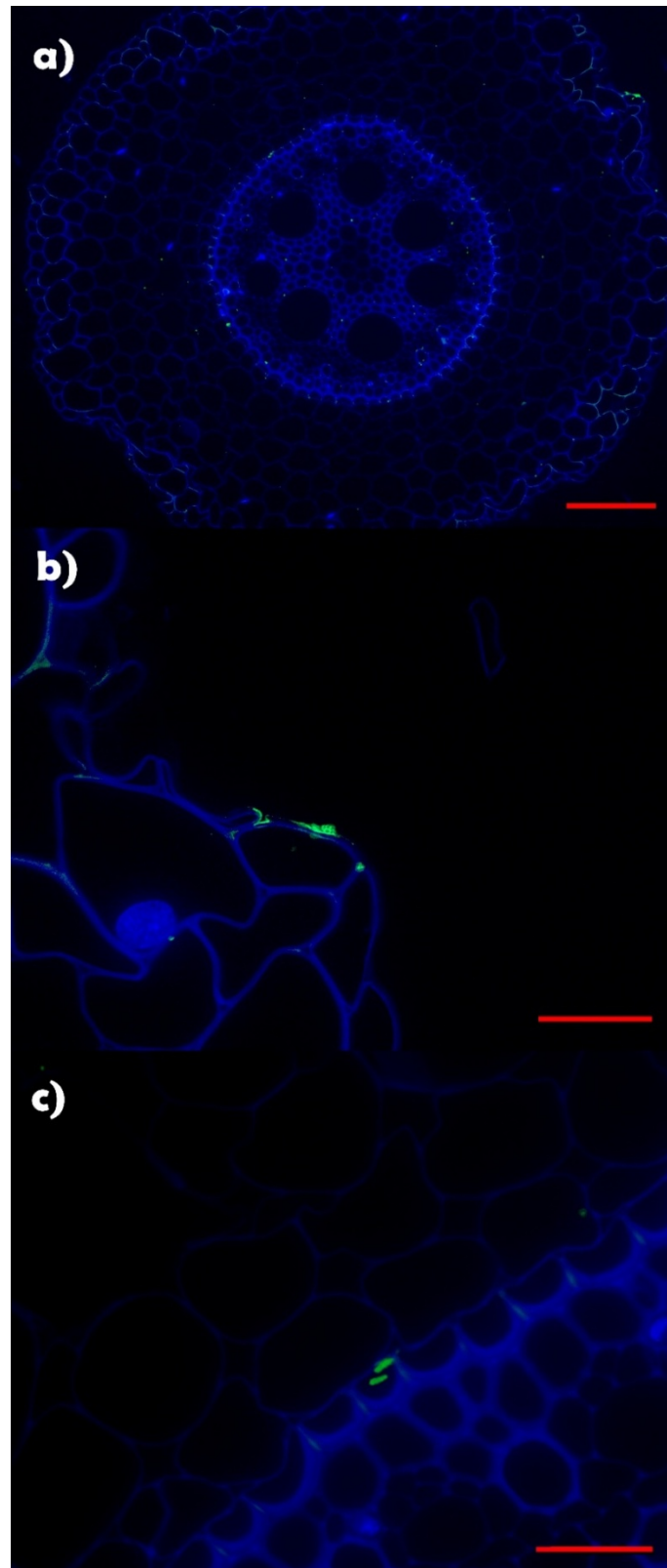


Figura 52. Microscopía de fluorescencia de raíces de *Zea mays* donde se observan en verde las células de la cepa AMPSE14 y en azul membranas y orgánulos celulares teñidos con DAPI. a) vista general de la raíz donde se observan en verde las bacterias, b) detalle de la zona exterior donde se observa una agrupación de bacterias y c) detalle de la zona exterior de los haces vasculares donde se observan claramente 2 células. El tamaño de las barras es a) 50 μ m, b) y c) 10 μ m.

El patrón de colonización observado para la cepa PSE3PSE02 presenta analogías con el observado en nódulos de guisante, donde la colonización de las células epiteliales y las zonas adyacentes es más intensa, reduciéndose conforme nos acercamos al interior (Fig. 53) y ocupando las células de la bacteria los espacios intercelulares (Fig. 53 b).

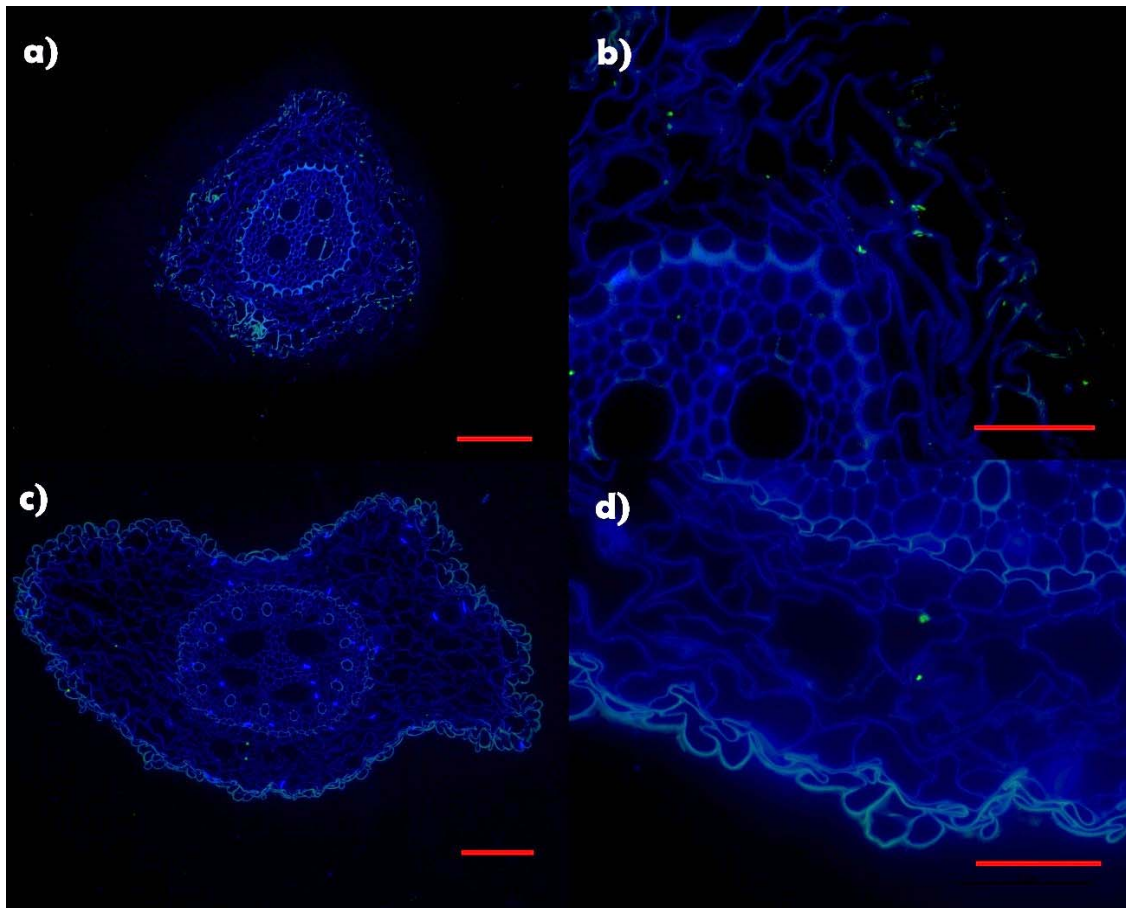


Figura 53. Microscopía de fluorescencia de raíces de *Zea mays* donde se observan en verde las células de la cepa PSE3PSE02 y en azul membranas y orgánulos celulares teñidos con DAPI. a) y c) vista general de raíces de *Zea mays*, y b) y d) detalle de la colonización endófitas de la cepa PSE3PSE02. El tamaño de las barras es a) y c) 50 μ m, b) y d) 10 μ m.

De acuerdo con lo observado en estos estudios ambas bacterias parecen tener diferentes estrategias de colonización, por lo que este tipo de estudios son muy útiles para determinar las capacidades de colonización de los posibles inoculantes seleccionados, teniendo en cuenta la gran diversidad de bacterias endofíticas asociadas a nódulos de leguminosas (Xu et al. 2014; Trabelsi et al. 2017) y raíces de otras plantas (Zhang et al. 2013; Szymńska et al. 2016; Matos et al. 2017). La diferencia de estrategias de colonización explicaría cómo tan altos ratios de diversidad bacteriana se mantienen en un ambiente tan limitado como son los tejidos vegetales, que precisan de una maquinaria molecular especializada para no producir reacciones adversas en el hospedador (Pereira et al. 2011; Johnston-Monje y Raizada 2011; Pereira et al. 2016).

6. Ensayos de efectividad

El desarrollo de biofertilizante debe estar basado en la selección de microorganismos capaces de colonizar e interactuar con las plantas de una manera eficiente (Sivasakthivelan y Saranraj 2013). En el caso de las leguminosas, los estudios de eficiencia son primordiales para seleccionar aquellos microorganismos capaces de interactuar con mayor eficiencia con el hospedador, más aún cuando el objetivo es la selección de consorcios cuyo comportamiento es desconocido, ignorándose como la mezcla de estos microorganismo puede afectar al reconocimiento entre simbiote y hospedador (Zgadżaj et al. 2015). Por esta razón, en este estudio se evaluará la influencia de los diferentes consorcios bacterianos seleccionados sobre la nodulación y el desarrollo de guisante y el crecimiento de maíz.

6.1. Ensayos en guisante.

Después de seleccionar las cepas de bacterias endófitas para ser utilizadas en las coinoculaciones con la cepa de *Rhizobium* AMPS34, se inocularon los diferentes consorcios en *P. sativum*, analizando su efecto sobre la tasa de nodulación, el peso fresco y seco de la parte aérea y la concentración de nitrógeno en planta. Para las coinoculaciones se utilizaron las mismas proporciones usadas en el estudio de producción de biofilms. Los datos obtenidos se encuentran en la tabla 20

Tabla 20. Resultados del experimento de coinoculación guisante en condiciones axénicas.

Tratamiento	Nódulos	Peso seco	Nitrógeno
Control sin N		0,17±0,01 ^d	1,45±0,01 ^d
Control con N		0,41±0,01 ^b	3,99±0,02 ^b
AMPS34	50±2,15 ^b	0,40±0,02 ^b	3,92±0,01 ^b
AMPSE14		0,16±0,01 ^d	0,77±0,16 ^e
AMPS34+AMPSE14 1:1	62±3,96 ^a	0,53±0,02 ^a	4,16±0,07 ^a
AMPS34+AMPSE14 1:10	55±2,27 ^{ab}	0,53±0,02 ^a	3,69±0,23 ^c
AMPS34+AMPSE14 1:100	56±2,84 ^{ab}	0,49±0,01 ^a	3,99±0,15 ^b
AMPSE20		0,25±0,03 ^c	1,41±0,02 ^d
AMPS34+AMPSE20 1:1	35±1,99 ^{cd}	0,29±0,01 ^c	3,52±0,02 ^c
AMPS34+AMPSE20 1:10	33±2,69 ^d	0,33±0,03 ^{bc}	3,40±0,05 ^c
AMPS34+AMPSE20 1:100	31±2,69 ^d	0,36±0,03 ^b	3,90±0,10 ^b
PSE3PSE02		0,24±0,01 ^c	1,25±0,24 ^d
AMPS34+PSE3PSE02 1:1	55±2,50 ^{ab}	0,52±0,02 ^a	3,87±0,04 ^b
AMPS34+PSE3PSE02 1:10	42±1,92 ^c	0,51±0,04 ^a	3,59±0,13 ^c
AMPS34+PSE3PSE02 1:100	40±4,73 ^c	0,49±0,02 ^a	3,50±0,10 ^c

Con respecto a la tasa de nodulación, los resultados muestran que la inoculación conjunta de *R. laguerreae* AMPS34 y *B. simplex* AMPSE14 mostró una tendencia a incrementar el número de nódulos por planta, aunque las diferencias no fueron significativas, observándose un incremento del 24% en el número de nódulos por planta en el caso de la proporción 1:1. Un efecto contrario se observó cuando se coinoculó la cepa *B. aryabhatai* AMPSE20, reduciéndose la tasa de nodulación significativamente,

pasando de medias de 50 nódulos/planta en el tratamiento con la cepa AMPS34 a medias de entre 34 y 30 nódulos/planta en los tratamientos de coinoculación (Tabla 20). Aunque ambas cepas pertenecen al género *Bacillus*, las especies son diferentes, siendo *B. simplex* (AMPSE14) dominante en los nódulos de *P. sativum* analizados frente a la especie *B. aryabhatai* (AMPSE20) por lo que los resultados obtenidos parecen indicar una mejor interacción de *B. simplex* con *Rhizobium*. La mezcla en proporción 1:1 es la que mostró mejores resultados, que concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios con las mismas especies (Schwartz et al. 2013). La cepa *P. tundrae* PSE3PSE02 mostró resultados dispares, pues en proporción 1:1 se produjo un ligero incremento, no significativo, en el número de nódulos por planta con respecto a la cepa AMPS34 sola y, sin embargo, al reducir la proporción del endófito se produjo una reducción significativa en el número de nódulos. En todos los casos de coinoculación se observó mayor número de nódulos por planta en la proporción 1:1 (Tabla 20, Fig 54). En otras leguminosas, la coinoculación con bacterias endófitas de nódulos pertenecientes a los géneros estudiados ha mostrado efectos similares sobre la tasa de nodulación en *P. vulgaris*, siendo el género *Bacillus* el que mejor resultado generó (Korir et al. 2017), a pesar de que el género *Paenibacillus* ha mostrado ser también un excelente promotor del crecimiento vegetal (Grady et al. 2016).

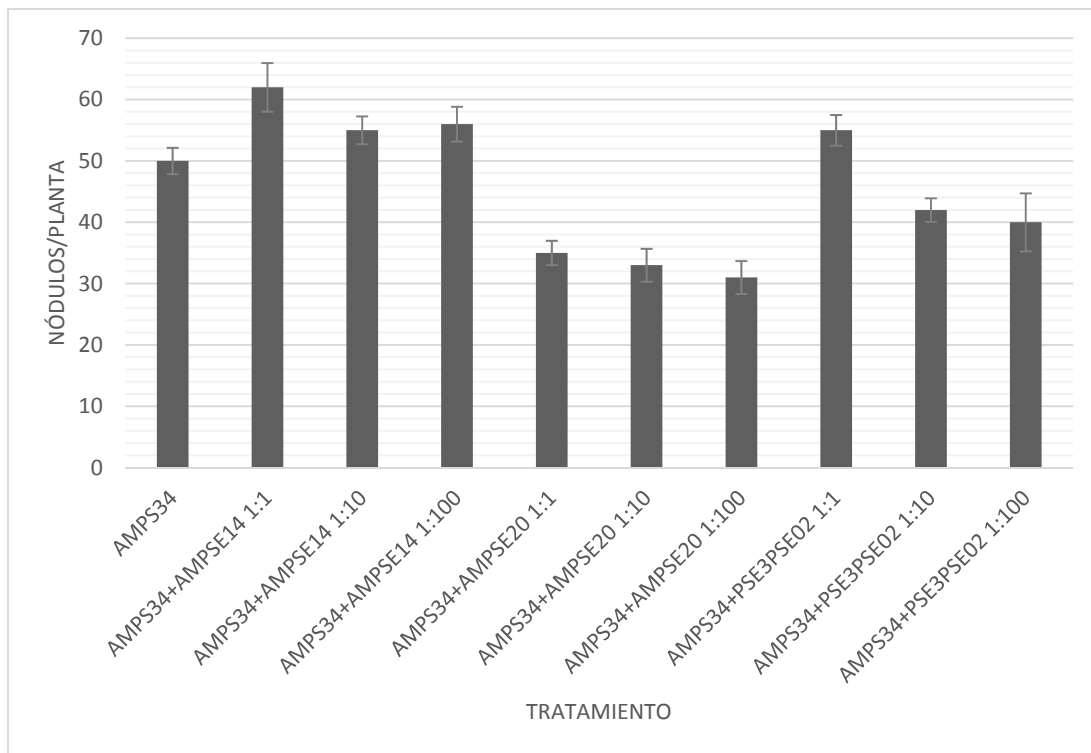


Figura 54. Número de nódulos por planta en guisante.

En la figura 55 se puede observar la morfología de los nódulos originados en *P. sativum* con cada uno de los tratamientos utilizados. Los nódulos presentaron la morfología piriforme típica de los nódulos indeterminados que forma *P. sativum*. A pesar de las variaciones en el número de nódulos por planta, no se apreciaron diferencias morfológicas macroscópicas entre los nódulos de las plantas inoculadas sólo

con la cepa de *Rhizobium* (Fig. 55 a, b y c) y los nódulos de las plantas coinoculadas. En todos los casos se observaron nódulos efectivos de color rosado debido a la expresión de la leghemoglobina, lo que indica que la coinoculación con las cepas de bacterias endófitas seleccionadas no provoca cambios en la morfología del nódulo en contraste con los resultados de otros autores que han reportado que la coinoculación con distintos endófitos puede afectar a la morfología nodular (Schwartz et al. 2013) y a su distribución en la raíz (Masciarelli et al. 2014).

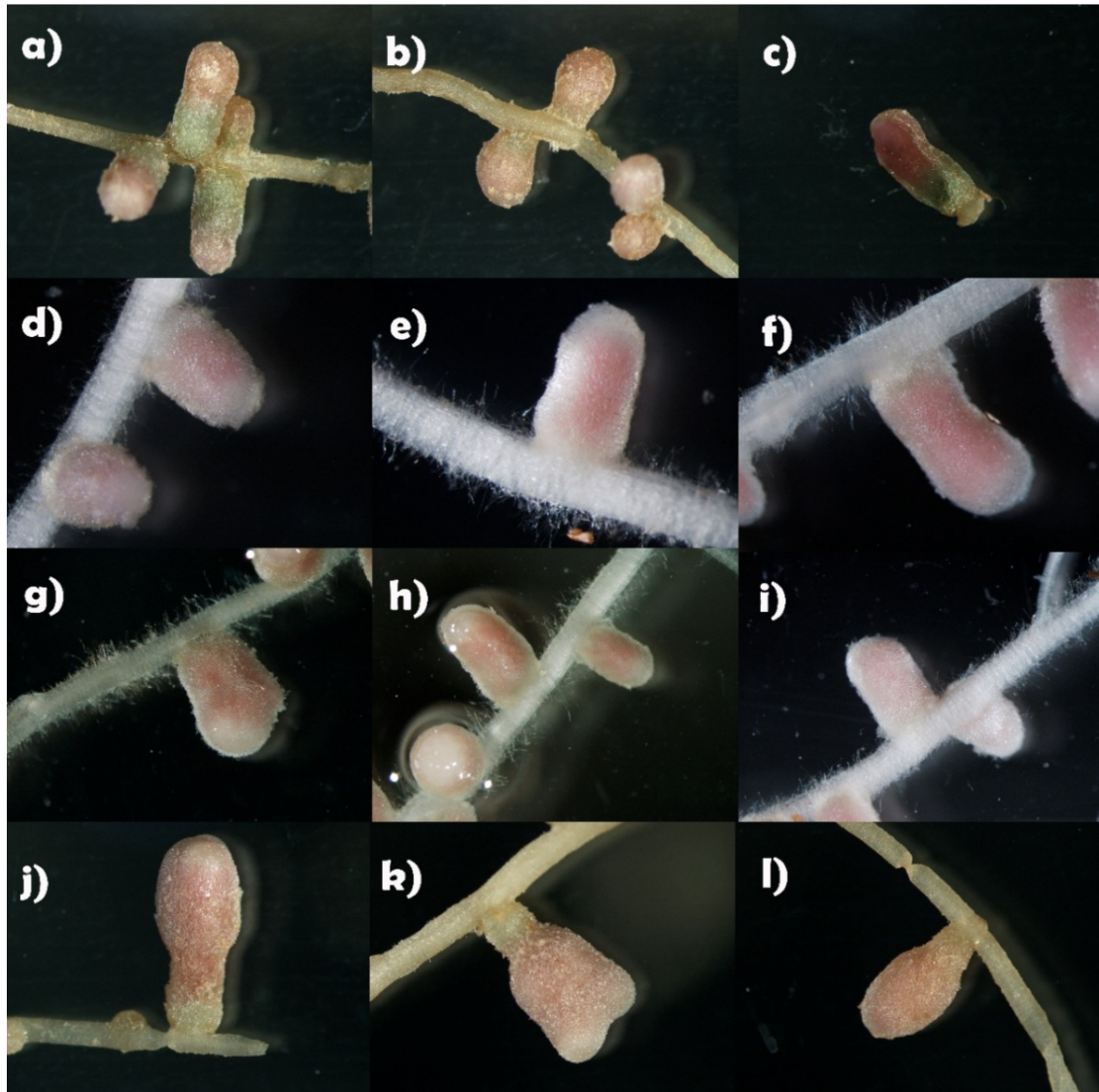


Figura 55. Morfología macroscópica de los nódulos de guisante de los tratamientos a), b) y c) de inoculación simple con AMPS34; coinoculación de las cepas AMPS34 y AMPSE14 en distintas proporciones d)1:1, e)1:10, f)1:100; coinoculación de las cepas AMPS34 y AMPSE20 en distintas proporciones g)1:1, h)1:10, i)1:100, coinoculación de las cepas AMPS34 y PSE3PSE02 en distintas proporciones j)1:1, k)1:10 y l)1:100.

Los resultados del peso seco por planta mostraron valores más bajos en las inoculaciones simples con las tres cepas de bacterias endófitas que en la inoculación simple con la cepa de *Rhizobium* AMPS34. En el caso de la cepa AMPSE14, los valores

fueron similares a los del control negativo sin nitrógeno, y significativamente más altos en los otros dos tratamientos de inoculación simple con endófitos (Fig. 56). Sin embargo, con respecto a la inoculación simple con la cepa AMPS34, los pesos secos se incrementaron significativamente en todas las proporciones en los tratamientos de coinoculación con las cepas AMPSE14 y PSE3PSE02 y se mantuvieron iguales o disminuyeron significativamente en el caso de la coinoculación con la cepa AMPSE20. Los tratamientos de coinoculación con las cepas AMPSE14 y PSE3PSE02 superaron significativamente el peso seco del control positivo con nitrógeno sin inocular (Tabla 20).

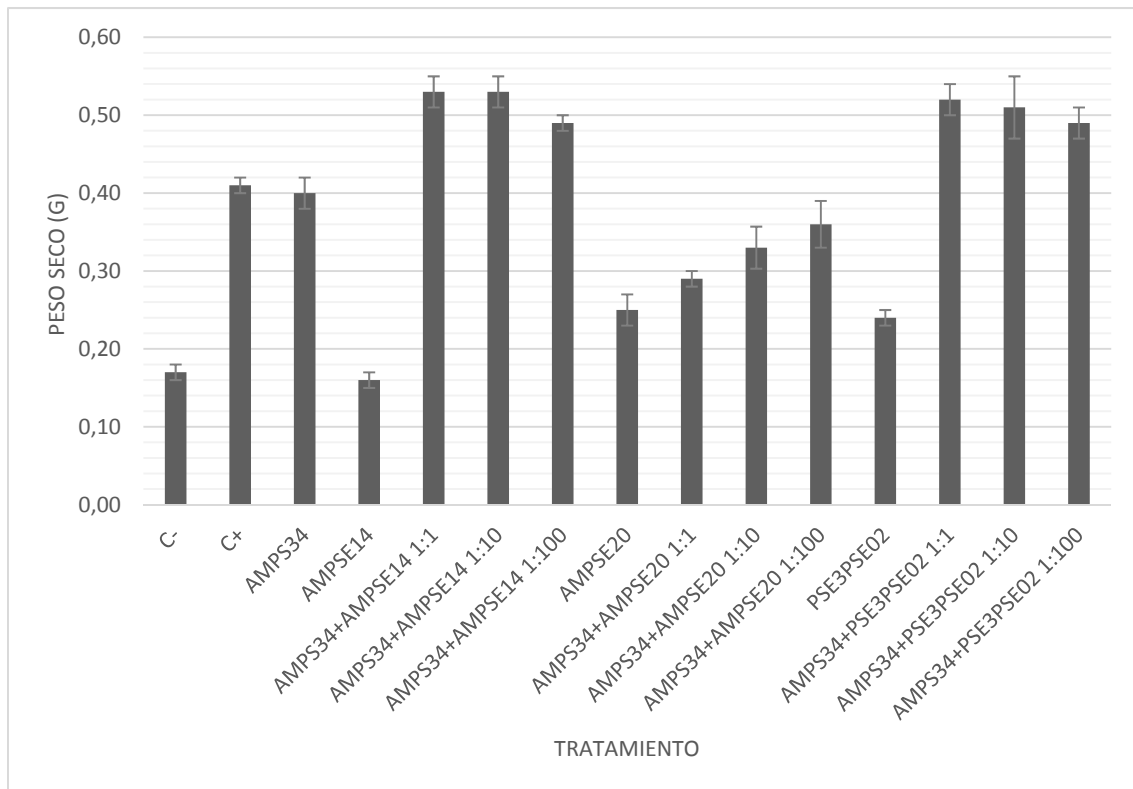


Figura 56. Peso seco por planta en guisante sometido a diferentes tratamientos de inoculación.

Por último, se analizó la concentración de nitrógeno de las plantas de guisante inoculadas con los distintos tratamientos (Tabla 20). Los resultados obtenidos mostraron, en concordancia con los del peso seco, que los porcentajes de nitrógeno en las plantas sometidas a los tratamientos de inoculación simple con las tres cepas endófitas tenían significativamente menos porcentaje de nitrógeno que las inoculadas con la cepa de *R. laguerreae* AMPS34. En el caso de la inoculación simple con la cepa AMPSE14 el porcentaje fue significativamente menor que el control negativo sin nitrógeno y sin inocular. En cambio, al igual que ocurría en el caso del peso seco, las plantas sometidas a los tratamientos de coinoculación con las cepas AMPSE14 y PSE3PSE02 presentaron porcentajes similares o incluso mayores que las inoculadas sólo con la cepa AMPS34. No obstante en el caso de las plantas coinoculadas con las cepas AMPSE20 y AMPSE34 no hubo grandes diferencias con respecto al resto de

tratamientos de coinoculación. Todos los tratamientos de coinoculación, el de la inoculación simple, y el control con nitrógeno sin inocular mostraron en general valores similares de porcentaje de nitrógeno. Sin embargo, uno de los tratamientos, la coinoculación con la cepa AMPSE14 1:1 superó significativamente el porcentaje de nitrógeno en planta, lo cual sugiere que la cepa AMPSE14 contribuye a la fijación de nitrógeno en el nódulo (Fig. 57). Esto coincide con otros estudios en los que la inoculación con algunas cepas endofíticas fijadoras de nitrógeno mejoró la actividad nitrogenasa en el nódulo incrementándose la cantidad de nitrógeno fijado, aunque en algunos casos, como en la coinoculación de *R. leguminosarum* con *K. pneumoniae*, la capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno se vieron afectadas negativamente (Tsigie et al. 2011). En general, muchos estudios demuestran que la inoculación tanto de cepas de *Bacillus* como de *Paenibacillus* producen un efecto positivo mejorando la producción y la capacidad de fijación de nitrógeno de diferentes leguminosas como garbanzo (Verma et al. 2013), trébol (Latif et al. 2013) y alubia (Mishra et al. 2009; Korir et al. 2017).

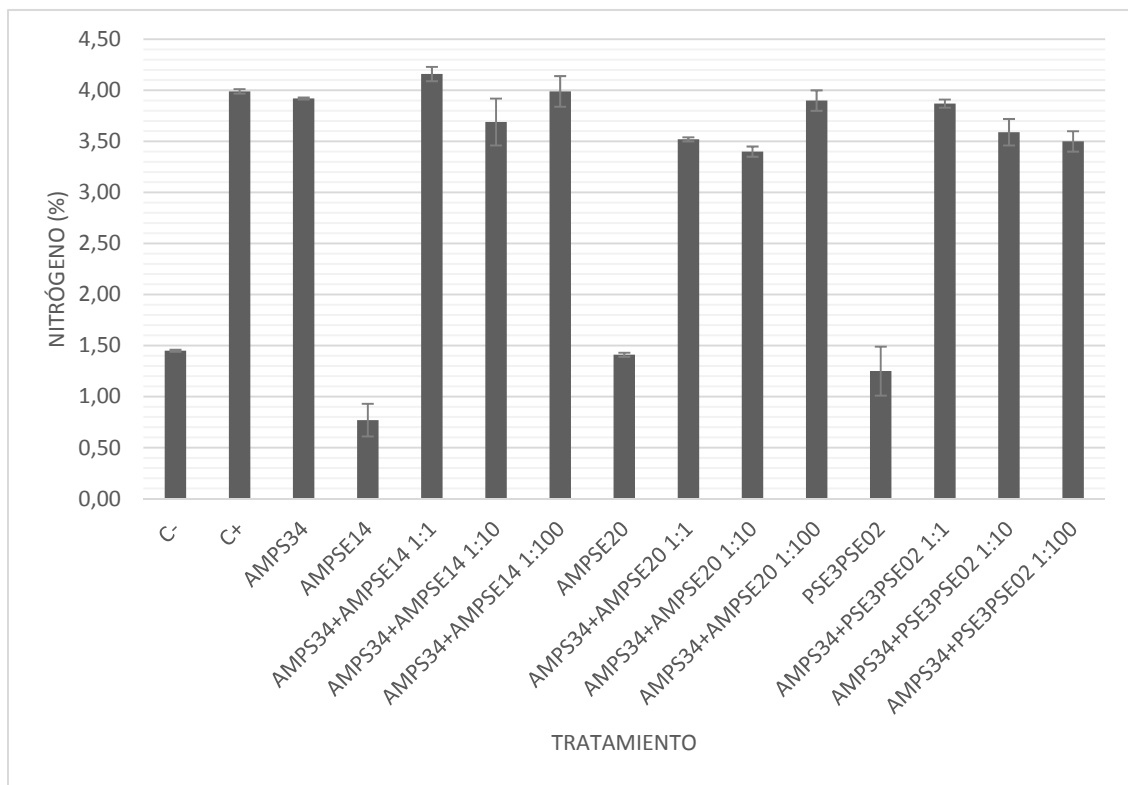


Figura 57. Porcentaje de nitrógeno por planta en guisante sometido a diferentes tratamientos de inoculación.

6.2. Dinámica de nodulación.

Una vez establecido que la mejor proporción entre las cepas de *Rhizobium* y de bacterias endofíticas era la 1:1, se estudió la dinámica de la nodulación. El ensayo se llevó a cabo en cámara iluminada y se realizaron recuentos periódicos del número de nódulos en plantas de *P. sativum* germinadas en matraces utilizando agarosa como

agente gelificante, para evitar en lo posible las contaminaciones con hongos y otras bacterias. En estas condiciones los primeros nódulos comenzaron a ser observables en todos los casos a partir del día 14 después de la inoculación. Se observó que las cepas *R. laguerreae* sv *viciae* AMPS34 y *Rhizobium pisi* sv. *viciae* DSM 30132^T presentaron dinámicas de nodulación similares (fig 58). Sin embargo, la coinoculación con algunas de las cepas endófitas originó algunas diferencias en la dinámica de nodulación (Fig 58). La inoculación con dos de las cepas, AMPSE14 Y PSE3PSE02 afectó al número de nódulos total por planta, particularmente entre los días 14 y 20 postinoculación, disminuyendo en el primer caso el número de nódulos por planta e incrementándolos en el segundo caso. En el caso de la coinoculación con la cepa AMPSE20 se observó un efecto negativo sobre la dinámica de nodulación reduciéndose en un 36% el número de nódulos por planta.

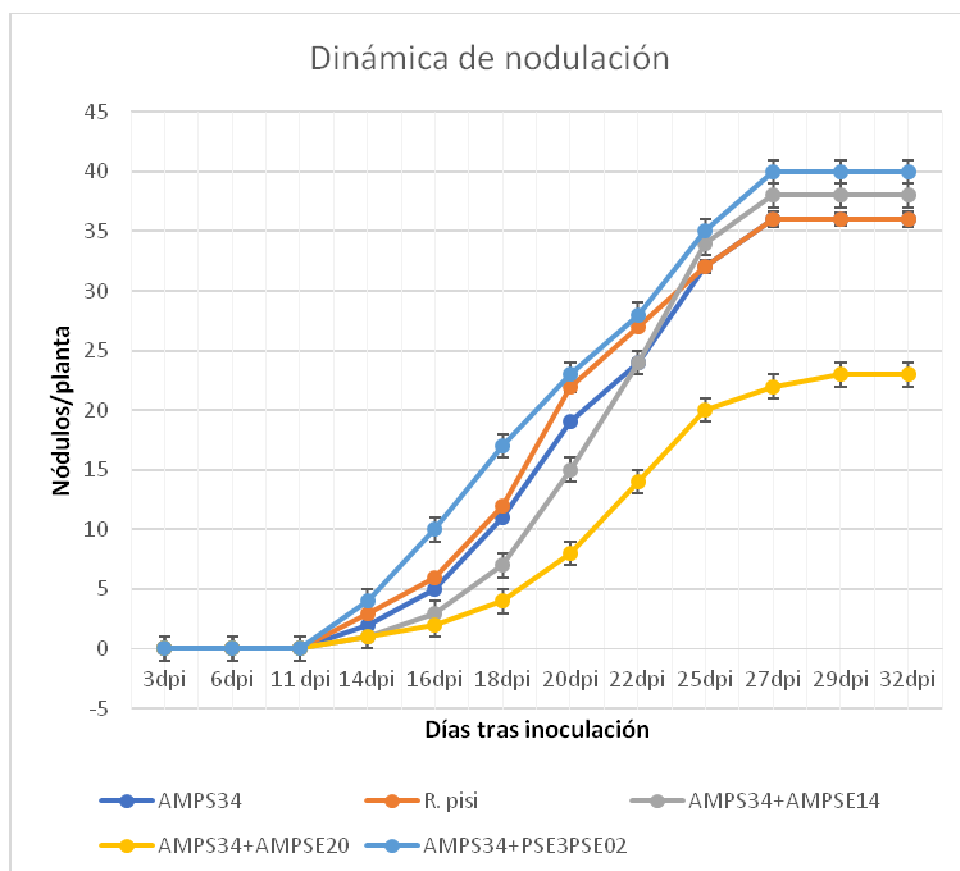


Figura 58. Dinámica de nodulación de cada uno de los tratamientos durante 32 días después de la inoculación.

6.3. Ensayos en maíz.

El maíz es el cereal más cultivado en la zona en la que se tomaron las muestras de los nódulos de guisante en la zona de Valladolid y ambas plantas se utilizan en rotación de cultivo. Por esta razón, y habiendo seleccionado la proporción 1:1 como aquella que mostró mejores resultados en guisante, se aplicaron en maíz los mismos tratamientos que en guisante en experimentos en cámara iluminada.

Al cabo de 30 días de la siembra se midió en este caso la longitud de las plantas y los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento que produjo mejores resultados fue la coinoculación de las cepas *R. laguerreae* AMPS34 y *B. simplex* AMPSE14 (Tabla 21). Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control sin nitrógeno y las inoculaciones simples con las cepas AMPS34, AMPSE14 ni AMPSE20. El tratamiento simple con la cepa PSE3PSE02 y las coinoculaciones con esta cepa y con la cepa AMPSE20 originaron plantas significativamente más pequeñas. Sólo la coinoculación con la cepa AMPSE14 originó plantas significativamente más altas (Fig. 59).

Tabla 21. Resultados de la inoculación en maíz en condiciones de cámara iluminada.

Tratamiento	Longitud parte aérea (cm)/ planta	Peso seco(g)/ planta	N (%)
Control sin N	43,87±2,04 ^c	0,12±0,01 ^c	0,8±0,03 ^c
Control con N	53,42±2,07 ^a	0,20±0,03 ^a	1,5±0,06 ^a
AMPS34	41,50±2,74 ^c	0,13±0,01 ^c	0,9±0,03 ^b
AMPSE14	40,40±2,31 ^{cd}	0,15±0,01 ^b	1,4±0,05 ^a
AMPSE20	44,40±1,79 ^c	0,12±0,01 ^c	0,9±0,04 ^b
PSE3PSE02	38,78±1,43 ^d	0,16±0,01 ^a	0,9±0,03 ^{bc}
AMPS34+AMPSE14	47,33±2,33 ^b	0,17±0,03 ^{ab}	1,0±0,04 ^b
AMPS34+AMPSE20	38,81±1,54 ^d	0,12±0,01 ^c	0,9±0,03 ^{bc}
AMPS34+PSE3PSE02	37,11±0,47 ^d	0,17±0,01 ^a	1,0±0,03 ^b

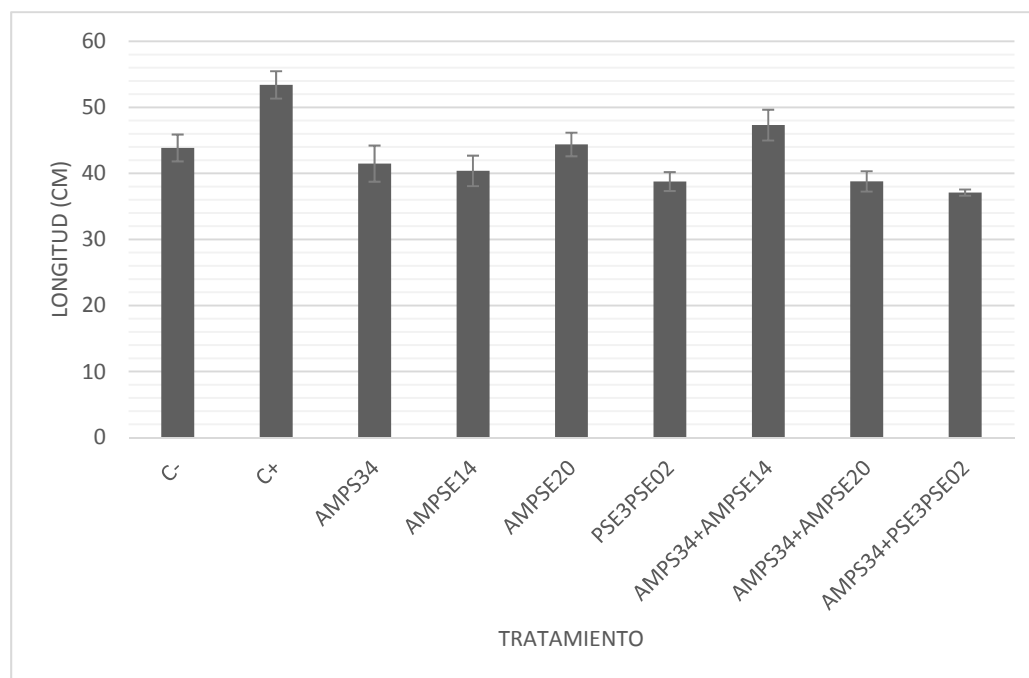


Figura 59. Longitud (cm) por planta en maíz sometido a diferentes tratamientos de inoculación.

En cuanto al peso seco, los tratamientos de inoculación simple de las cepas AMPS34 y AMPSE20 y de coinoculación con ambas cepas y AMPS34 mostraron prácticamente los mismos resultados que el control sin nitrógeno y sin inocular. El resto de los tratamientos originaron plantas con significativamente mayor peso seco que dicho control, siendo nuevamente el tratamiento de coinoculación con la cepa AMPSE14 uno de los que mejores resultados produjo, con un peso seco similar al del control positivo con nitrógeno (Fig. 60). Sin embargo, en maíz también produjo resultados similares al del control positivo con nitrógeno el tratamiento simple y en coinoculación con la cepa PSE3PSE02. Estos tres tratamientos produjeron mejoras de entre 33% y 42% con respecto del control sin nitrógeno y sin inocular.

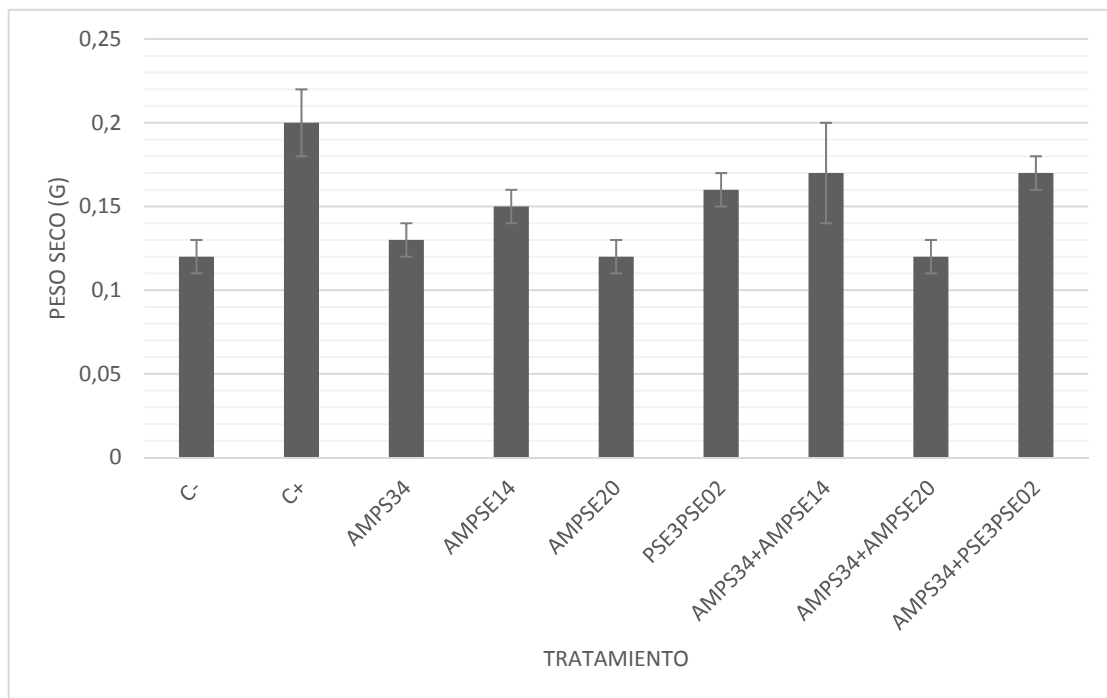


Figura 60. Peso seco (g) por planta en maíz sometido a diferentes tratamientos de inoculación.

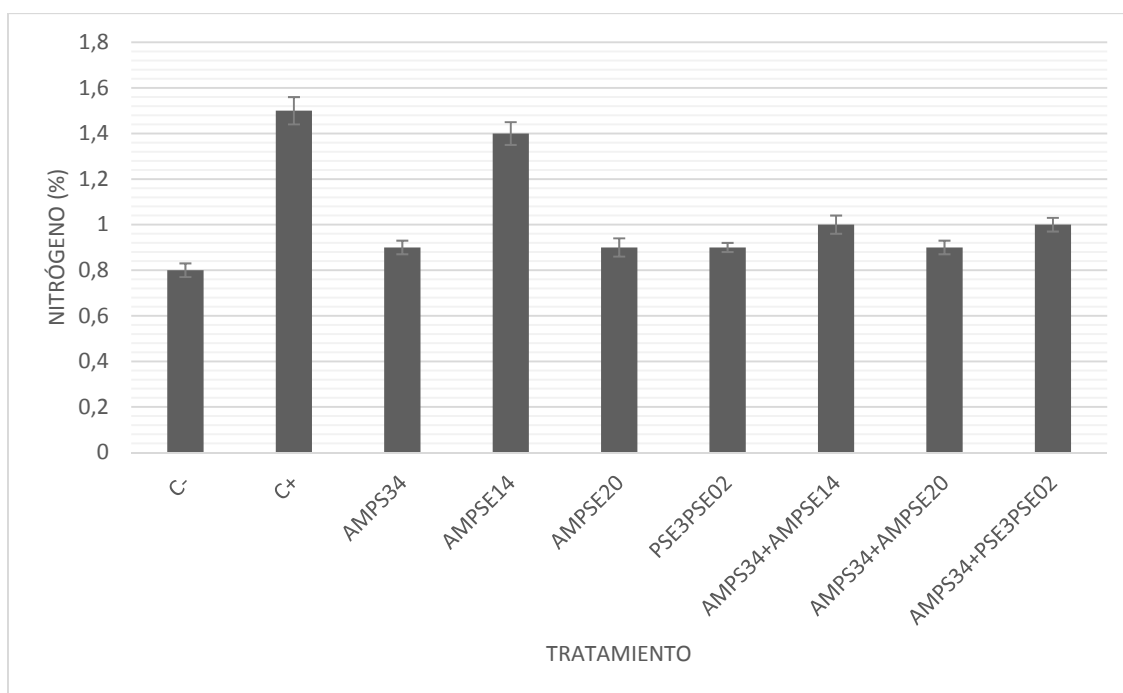


Figura 61. Porcentaje en nitrógeno por planta en maíz sometido a diferentes tratamientos de inoculación.

En lo que respecta al porcentaje de nitrógeno, cabe destacar que la inoculación simple con la cepa AMPSE14 incrementó el porcentaje de N en planta de manera significativa con respecto al control sin nitrógeno y sin inocular, alcanzándose unos valores similares a los del control sin inocular y fertilizado con N (Fig. 61).

Otras experiencias con bacterias PGPB, particularmente activas en la producción de ácido indol acético han demostrado ser sumamente efectivas en la promoción del crecimiento de maíz, como por ejemplo *Pseudomonas* o *Stenotrophomonas* (Mehnaz et al. 2010). La mayoría de las experiencias con maíz y biofertilizantes están asociadas a la utilización de fertilizantes químicos mejorando su eficiencia a través de la aplicación del biofertilizante bacteriano o de micorrizas, por lo que determinar la efectividad de la inoculación suele no ser considerada debido a los requerimientos nutricionales de este cultivo (Mohamed et al. 2014; Chu et al. 2013). A pesar de que los resultados obtenidos únicamente presentan valores destacables en el peso seco, hay que considerar el propósito final del diseño de consorcios bacterianos para la utilización como biofertilizante multifuncional en sistemas rotacionales leguminosa/cereal, por lo que los buenos resultados obtenidos en guisante hacen que su utilización se factible, permitiendo mejorar la productividad a través de prácticas como el intercropping o la rotación de cultivo (Hödtke et al. 2016).

7. Ensayos en invernadero.

En los esquemas tradicionales de escalado de los ensayos en planta, tras los ensayos en vermiculita, se llevan a cabo ensayos en invernadero en condiciones de microcosmos utilizando suelo como sustrato y las cepas seleccionadas en dichos

ensayos. En este estudio se seleccionaron para coinocular con la cepa *R. laguerreae* AMPS34, las cepas de bacterias endófitas *B. simplex* AMPSE14 y *P. tundrae* PSE3PSE02, la primera por los buenos resultados obtenidos en ambas plantas, y la segunda por los resultados obtenidos en maíz.

7.1. Ensayos en guisante.

Los resultados obtenidos en los ensayos en invernadero y condiciones de microcosmos en el caso del guisante se recogen en la Tabla 22. En estas condiciones el tratamiento que presentó mayor número de nódulos por planta fue la inoculación simple con la cepa *R. laguerreae* AMPS34, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto a los tratamientos de coinoculación con las cepas *B. simplex* AMPSE14 y con *P. tundrae* PSE3PSE02. El control sin inocular y los tratamientos de inoculación simple de ambos endófitos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero el número de nódulos fue significativamente menor al del resto de tratamientos. (Fig. 62). Estos datos indican, que para que no se afecte el número de nódulos producido por *Rhizobium* es necesario que el biofertilizante sea un consorcio de esta bacteria con los otros endófitos, incluso en suelos donde existen poblaciones autóctonas de *Rhizobium* compatibles con la leguminosa como ocurre en este caso.

Tabla 22. Resultados de la inoculación en guisante en condiciones de microcosmos.

Tratamiento	Nódulos/ planta	Peso seco (g)/ planta
Control negativo	29±2,95 ^b	0,64±0,04 ^b
AMPS34	58±2,68 ^a	0,78±0,04 ^a
AMPSE14	32±2,47 ^b	0,73±0,04 ^a
AMPS34+AMPSE14	54±2,27 ^a	0,63±0,06 ^b
PSE3PSE02	28±2,69 ^b	0,82±0,06 ^a
AMPS34+PSE3PSE02	53±3,28 ^a	0,79±0,04 ^a

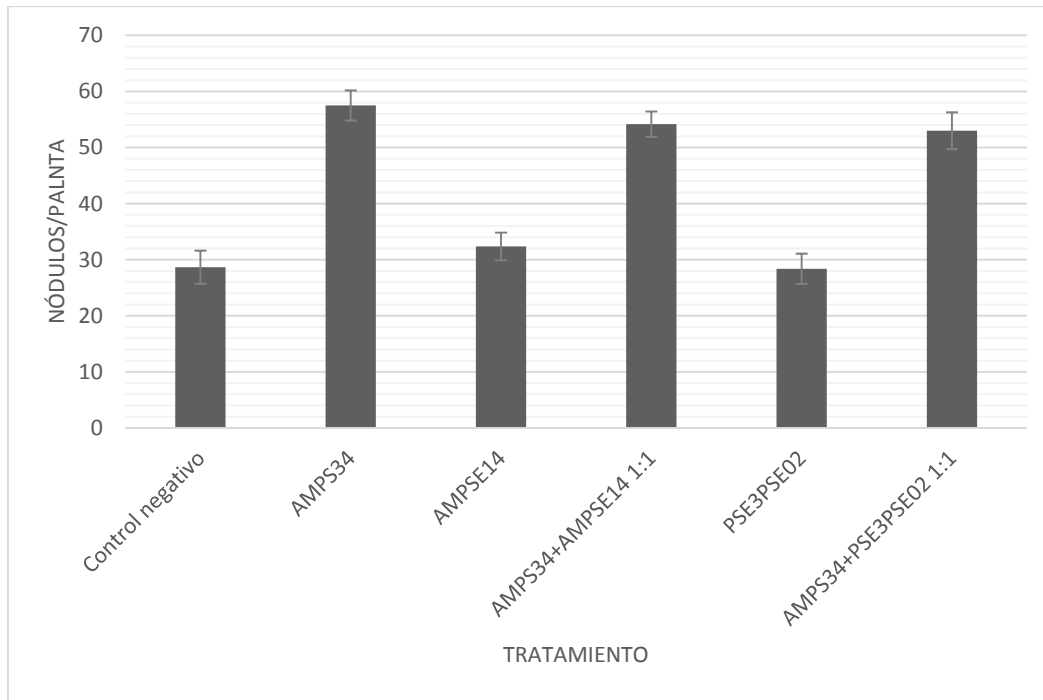


Figura 62. Número de nódulos por planta en guisante en condiciones de microcosmos.

En cuanto al peso seco de la parte aérea y la eficiencia, los resultados obtenidos mostraron valores significativamente mayores que el control sin inocular para las inoculaciones simples con las cepas AMPS34, AMPSE14 y PSE3PSE02 y para las coinoculación con la cepa PSE3PSE02 (Fig. 63). Los valores fueron ligeramente inferiores en las plantas inoculadas con los consorcios de AMPS34 y AMPSE14, que no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento control sin inocular. Estos resultados indican que la coinoculación con las bacterias endófitas origina resultados variables en cuanto al peso de las plantas, y por tanto, la eficiencia del tratamiento depende de la cepa coinoculada. Estos resultados muestran que la interacción con la microbiota del suelo y las variables ambientales pueden hacer fracasar la inoculación en algunos casos (Guiñazú et al. 2010; Verma et al. 2013). Aunque en el caso de *P. tundrae* (PSE3PSE02) los resultados de la inoculación no hayan mostrado una mejora del peso seco de las plantas de guisante, otras especies del mismo género como *P. polymyxa* es capaz de mejorar la producción de otras leguminosas (Korir et al. 2017).

Estos datos indican que las inoculaciones simples de cada uno de los aislados seleccionados generan los mejores resultados de peso seco, aunque los resultados de nodulación indican que los tratamientos de inoculación simple de *R. laguerreae* AMPS34 y las coinoculaciones con ambos endófitos genera los mejores resultados. Estos resultados deberán ser confrontados con los datos en maíz para seleccionar los tratamientos más eficientes.

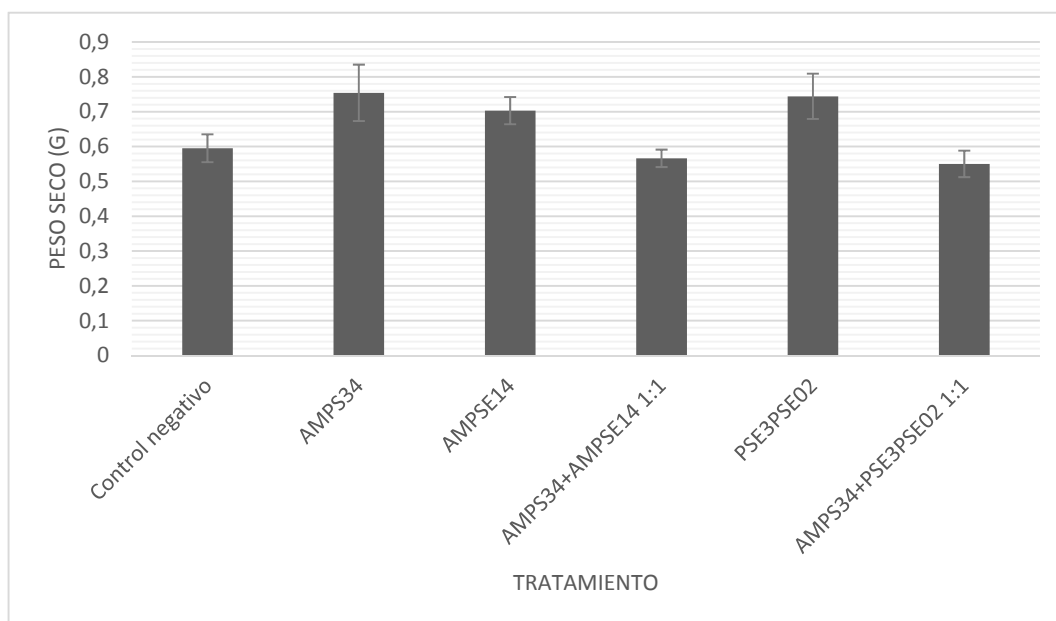


Figura 63. Peso seco por planta en guisante sometido a diferentes tratamientos de inoculación en condiciones de microcosmos.

Tabla 23. Resultados de la parte aérea de las plantas de guisante en condiciones de microcosmos.

Elemento	Control negativo	AMPS34	AMPSE14	AMPS34+AMPSE14	PSE3PSE02	AMPS34+PSE3PSE02
N (%)	3,64±0,02 ^b	3,86±0,12 ^a	3,85±0,02 ^a	3,66±0,02 ^b	3,57±0,06 ^b	3,82±0,01 ^a
P (%)	1,57±0,06 ^c	1,78±0,07 ^a	1,63±0,01 ^b	1,53±0,06 ^c	1,45±0,10 ^d	1,43±0,05 ^d
K (%)	1,33±0,02 ^b	1,45±0,04 ^a	1,36±0,02 ^b	1,35±0,06 ^b	1,40±0,03 ^{ab}	1,44±0,07 ^a
Mg (%)	0,18±0,01 ^c	0,20±0,01 ^a	0,18±0,01 ^c	0,19±0,01 ^{bc}	0,20±0,01 ^a	0,20±0,01 ^b
Ca (%)	0,12±0,02 ^c	0,14±0,01 ^b	0,12±0,01 ^c	0,12±0,01 ^c	0,16±0,01 ^a	0,13±0,01 ^c
Fe (mg/Kg)	139,38±11,16 ^b	169,65±3,26 ^a	111,02±2,43 ^c	123,63±4,17 ^b	136,21±5,16 ^b	130,22±5,27 ^b

En la Tabla 23 se muestran los resultados del análisis químico mineral de las plantas. En cuanto al contenido en N, los mayores porcentajes se alcanzaron en el tratamiento de inoculación simple con las cepas AMPS34 y AMPSE14 y el de coinoculación con la cepa PSE3PSE02 y, a pesar de que los demás tratamientos fueron significativamente menores, el porcentaje se mantuvo entre 3,6% y 3,9% en todos los casos. El porcentaje de P, que se mantuvo entre 1,4% y 1,8%, también mostró variaciones entre tratamientos, con el valor más alto para la inoculación simple con la cepa AMPS34, que fue significativamente diferente al resto de tratamientos. Similares resultados se obtuvieron para el K que se mantuvo entre 1,3% y 1,5%, con valores significativamente más altos para la inoculación simple con la cepa AMPS34 y la coinoculación con la cepa PSE3PSE02. En el caso del Mg, que se mantuvo entre 0,18% y 0,20%, los valores más altos con diferencias significativas, frente al resto de tratamientos fueron las inoculaciones simples con las cepas AMPS34 y PSE3PSE02. En

estos mismos tratamientos se obtuvieron los valores significativamente más altos para el porcentaje de Ca, que osciló entre 0,12% y 0,16%, pero entre ellos también se encontraron diferencias significativas siendo el valor más alto el correspondiente al tratamiento con la cepa PSE3PSE02. En cuanto a los valores del Fe, que oscilaron entre 111 y 140 mg/Kg, los más altos se encontraron en las plantas tratadas con la cepa AMPS34, que fueron significativamente diferentes a los del resto de tratamientos. Estos resultados muestran que, en conjunto, el mejor perfil de los elementos analizados, lo presentaron las plantas tratadas con la inoculación simple de la cepa de *Rhizobium* AMPS34.

De todos estos resultados cabe destacar los obtenidos para el nitrógeno, ya que las plantas del tratamiento de inoculación simple con la cepa de *Bacillus* AMPSE14 presentaron el mismo contenido en N que las inoculadas con la cepa de *Rhizobium* AMPS34. Puesto que las plantas inoculadas con la cepa AMPSE14 presentaron casi un 50% menos de nódulos por planta, esto indica que en esos nódulos la tasa de fijación de N es mucho mayor, lo cual sólo se explica si otras cepas diferentes a la AMPS34 también están fijando N en el nódulo, sin descartar a la cepa AMPSE14, ya que en la proporción 1:1 en los ensayos en vermiculita las plantas tenían un porcentaje en N superior significativamente a las inoculadas sólo con la cepa de *Rhizobium*. No obstante, teniendo en cuenta las diferencias existentes entre los ensayos en condiciones axénicas y los ensayos en microcosmos, no se pueden establecer conclusiones definitivas acerca de la contribución de la cepa AMPSE14 a la fijación de N en los nódulos de guisante, algo que precisaría de otro tipo de experimentos. En otros ensayos donde se combina un *Rhizobium* con otros endófitos como *Azospirillum*, *Bacillus* o *Pseudomonas* se produce un ligero incremento en la concentración de nitrógeno en planta (Verma et al. 2013), como también se ha observado en alfalfa al coinocular *Bacillus* con su endosimbionte habitual (Guiñazú et al. 2010). También se ha observado que la utilización de cepas de *Bacillus* capaces de solubilizar fosfato pueden mejorar el aprovechamiento de este elemento por parte de las leguminosas (Babu et al. 2015). No obstante, nuestros resultados ponen claramente de manifiesto que la inoculación de guisante con *Rhizobium* es la mejor opción para la mejora de la producción de los cultivos de guisante, si bien la coinoculación con algunos endófitos de nódulos de esta planta, como la cepa de *Bacillus* AMPSE14 pueden contribuir a mejorar la fijación de N del cultivo incrementando el rendimiento de las cosechas de esta leguminosa.

7.2. Ensayos en maíz.

Se ha publicado que el maíz es muy sensible a la inoculación con diferentes endófitos, mostrando capacidad para ser colonizado y reaccionar de manera positiva ante la inoculación de cepas bacterianas de géneros muy diversos (Mohanty et al. 2016), y se utiliza como planta modelo para testar la capacidad de promoción del crecimiento por diversos endófitos (Posada et al. 2016). Los ensayos de biofertilización en maíz con diferentes cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal han mostrado que los resultados suelen ser muy destacables, sobre todo cuando el microorganismo actúa

paliando directamente los déficit nutricionales del suelo, por mínimos que sean, como ocurre con la aplicación de *Azospirillum* o *Herbaspirillum* en suelos deficientes en nitrógeno, o de *Pseudomonas* en suelos con bajas concentraciones de fósforo (Pérez-Montaño et al. 2014).

En este estudio, siguiendo la misma metodología que en el caso del guisante se aplicaron los mismos tratamientos en maíz en condiciones de microcosmos. El primero de los parámetros estudiados fue la longitud de la parte aérea de las plantas y los resultados mostraron que las coinoculaciones simples de todas las cepas originaron plantas con una mayor longitud de la parte aérea que el tratamiento control, pero sólo en el caso de las plantas inoculadas con las cepas AMPSE14 y PSE3PSE02 las diferencias fueron significativas (Tabla 24). En cuanto a las coinoculaciones, aunque los valores fueron significativamente inferiores a los alcanzados en los tratamientos de inoculaciones simples, fueron ligeramente superiores a los del control al igual que ocurrió con la inoculación simple con la cepa de *Rhizobium* AMPS34 (Tabla 24 y Fig. 64). La longitud foliar del maíz se incrementó con los tratamientos con las cepas endófitas AMPSE14 y PSE3PSE02 con respecto a la inoculación con la cepa AMPS34 entre un 29% y un 12%, respectivamente, y esas diferencias fueron un poco más elevadas con respecto al control sin inocular. En otros estudios se ha observado que en inoculaciones de *Burkholderia* y *Alcaligenes*, los resultados mejores se obtuvieron en las inoculaciones simples (Pande, Pandey y Kaushik 2017).

Tabla 24. Resultados de la inoculación en guisante en condiciones de microcosmos.

Tratamiento	Longitud parte aérea (cm)/ planta	Peso seco parte aérea (g)/ planta
Control negativo	47,75±1,68 ^{cd}	0,38±0,03 ^c
AMPS34	48,90±2,63 ^c	0,41±0,05 ^c
AMPSE14	63,33±1,74 ^a	0,78±0,01 ^a
AMPS34+AMPSE14	52,17±2,05 ^c	0,64±0,03 ^b
PSE3PSE02	55,13±1,01 ^b	0,63±0,01 ^b
AMPS34+PSE3PSE02	50,5±3,43 ^{cd}	0,56±0,07 ^b

En cuanto al peso seco de las plantas, la inoculación simple con *B. simplex* AMPSE14 originó plantas con el mayor valor de peso seco y las diferencias fueron significativas con respecto al resto de los tratamientos (Fig. 65). No obstante, todos los tratamientos de inoculación, excepto la inoculación simple con la cepa de *Rhizobium* AMPS34, originaron plantas con mayores pesos secos que el control, aunque el consorcio de las cepas AMPS34 y PSE3PSE02 originó plantas con valores de peso seco ligeramente menores. La inoculación simple con la cepa AMPS34 generó resultados similares al control sin inocular confirmando que su inoculación en condiciones de microcosmos no produce un efecto positivo sobre las plantas de maíz, en contraste con los resultados observados en guisante. Similares resultados se han obtenido en plántulas de maíz inoculando distintas cepas del género *Bacillus*, donde se incrementó notablemente el peso seco (Posada et al. 2016).

Figura 64. Longitud por planta en maíz sometido a diferentes tratamientos de inoculación en condiciones de microcosmos.

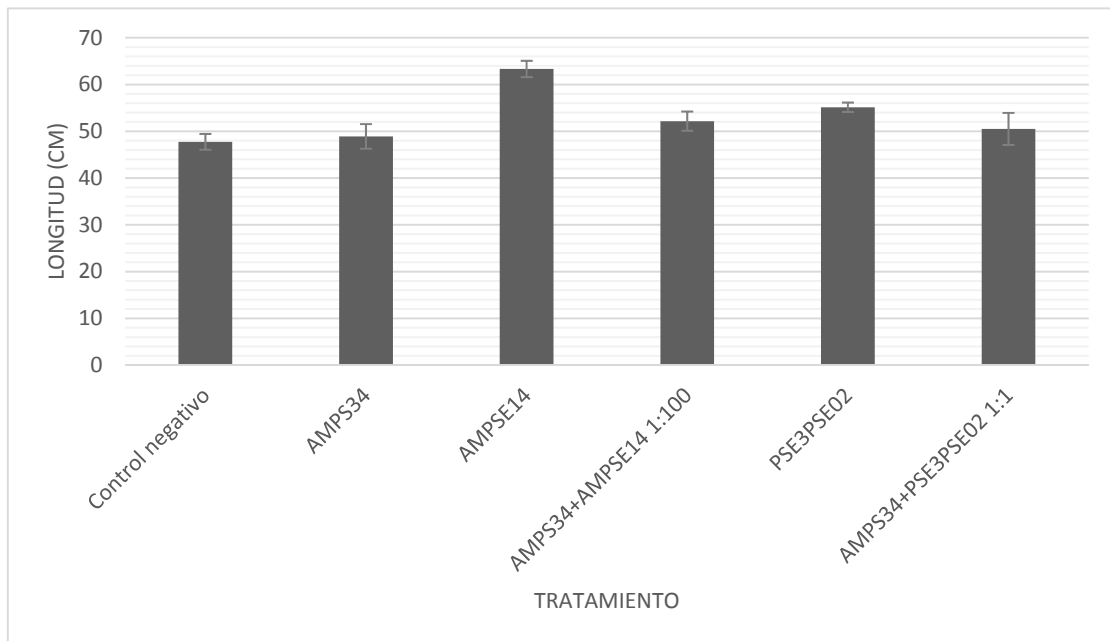
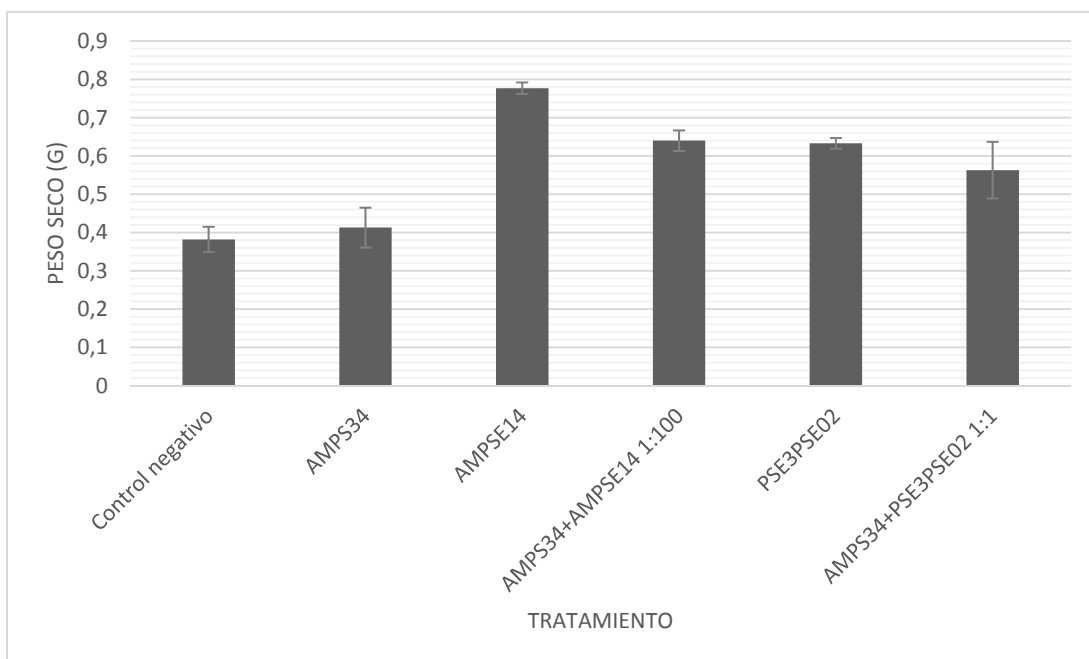


Figura 65. Peso seco por planta en maíz sometido a diferentes tratamientos de inoculación en condiciones de microcosmos.



Los datos obtenidos en los experimentos en microcosmos indican que el tratamiento más adecuado es la coinoculación de *R. laguerreae* AMPS34 y *B. simplex* AMPSE14, tanto para guisante como para maíz. No obstante, estos resultados han de ser confirmados en ensayos de campo ya que las condiciones en campo son muy diferentes a las condiciones de microcosmos.

Los resultados del análisis químico mineral del maíz se recogen en la Tabla 25. Obviamente, al no ser una leguminosa, los resultados para el porcentaje de N en los distintos tratamientos fueron muy diferentes. En este caso destacó la inoculación simple con la cepa endófito AMPSE14 que originó plantas con los contenidos significativamente más altos, seguida por el tratamiento de coinoculación de esta cepa con la de *Rhizobium* AMPSE34. Todos los demás tratamientos, independientemente de que las diferencias fueran significativas en algunos casos, se quedaron en valores más cercanos a los del tratamiento control que al de estos dos tratamientos mencionados (Tabla 25).

Tabla 3. Resultados de la parte aérea de las plantas de maíz en condiciones de microcosmos.

Elemento	Control negativo	AMPS34	AMPSE14	AMPS34+ AMPSE14	PSE3PSE0 2	AMPS34+ PSE3PSE0 2
N (%)	0,95±0,01 ^c	0,91±0,01 ^d	1,35±0,02 ^a	1,05±0,02 ^b	0,91±0,01 ^d	0,97±0,01 ^c
P (%)	1,55±0,05 ^c	1,81±0,08 ^a	1,88±0,08 ^a	1,71±0,04 ^b	1,85±0,01 ^a	1,78±0,01 ^a
K (%)	1,45±0,02 ^c	1,61±0,01 ^b	1,61±0,01 ^b	1,95±0,01 ^a	1,61±0,04 ^b	1,96±0,03 ^a
Mg (%)	0,33±0,01 ^b	0,36±0,01 ^a	0,34±0,01 ^{ab}	0,36±0,01 ^a	0,34±0,01 ^{ab}	0,34±0,02 ^{ab}
Ca (%)	0,74±0,02 ^a	0,78±0,01 ^a	0,65±0,02 ^b	0,74±0,01 ^a	0,69±0,01 ^b	0,72±0,01 ^a
Fe (mg/Kg)	97,66±29,1 6 ^c	157,55±0,94 a	99,64±3,16 ^c	97,68±1,53 ^c	130,56±2,80 b	104,58±7,24 c

En cuanto al P, cuyos valores estuvieron entre el 1,5 y 1,9%, fueron significativamente más altos en los tres tratamientos de inoculaciones simples, pero para esta planta todos los tratamientos de inoculación superaron significativamente el porcentaje de las plantas control. En el caso del K, los valores se mantuvieron en el rango entre 1,5% y 2%, con incrementos significativos en los dos tratamientos de coinoculación con respecto a todos los demás tratamientos, si bien las inoculaciones simples también mostraron valores significativamente más altos que las plantas control. En cuanto al Mg, los resultados fueron muy similares en todos los casos manteniéndose en torno al 0,3%, siendo más altos en todos los tratamientos de inoculación que en el control, aunque en algunos casos las diferencias no fueron significativas. Los porcentajes de Ca se mantuvieron entre el 0,6% y el 0,8% con descensos estadísticamente significativos en el caso de las coinoculaciones simples con los dos endófitos con respecto al control. Finalmente, las concentraciones de Fe se incrementaron notablemente con respecto al control en las inoculaciones simples con las cepas AMPS34 y PSE3PSE02 y en el caso de la coinoculación de esta última cepa con la cepa AMPS34, aunque hubo diferencias significativas entre estos tres tratamientos alcanzándose los valores más altos en la inoculación simple con la cepa AMPS34.

Por lo tanto, al igual que ocurrió en el caso del guisante, cabe destacar los resultados obtenidos para el N. En maíz la cepa AMPSE14 destaca por mejorar la concentración de N en planta al mismo tiempo que incrementa su biomasa aérea. Resultados similares se han encontrado para otras bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Paenibacillus*, teniendo el primero una larga tradición de aplicación al cultivo de maíz

debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Kalaiarasi y Dinakar 2015). En otros cultivos de cereales como el trigo se ha observado que la inoculación de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno y solubilizar fosfato como las enterobacterias pueden mejorar el contenido en nitrógeno y fósforo del grano en condiciones de invernadero (Kumar et al. 2017), sin embargo, sus características patogénicas imposibilitan su utilización. En este caso, y obviamente sin tener en cuenta el N, el mejor perfil de los elementos analizados, lo presentaron las plantas tratadas con la inoculación simple de la cepa de *Rhizobium* AMPS34. En cuanto al N, obviamente esta cepa que no fija en vida libre, se vio superada por la cepa AMPSE14 que, cuando se coinoculó con la cepa AMPSE34, originó unas plantas más ricas en N, P, K y Mg que las plantas control.

Por lo tanto, la coinoculación con las cepas *Rhizobium* AMPS34 y *Bacillus* AMPSE14 es la mejor opción para mejorar la producción del maíz y, teniendo en cuenta que este tratamiento también mejoró la fijación de N en guisante, podemos concluir que este tratamiento es muy adecuado para ambas plantas en condiciones de microcosmos.

Capítulo III

Los datos obtenidos en planta muestran que las cepas *P. endophyticum* PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16 presentan unas cualidades excepcionales para interaccionar con cultivos hortofrutícolas produciendo la promoción del crecimiento de cultivos de hoja, raíz y fruto, por lo que su utilización como bioinoculantes multifuncionales es prometedora. Por esta razón, se decidió analizar el genoma de estas bacterias para conocer más a fondo sus características genéticas, así como buscar una relación con las propiedades como PGPB observadas en ambas cepas. Esta estrategia no sólo busca explicar los datos obtenidos, sino tratar de describir las características genómicas de microorganismos con potencial en el desarrollo de biofertilizantes y poder desarrollar estrategias de minado genómico para la selección de biofertilizantes.

1. Descripción general de los genomas.

El genoma de *P. endophyticum* PEPV15 tiene 5.505.940 pares de bases, distribuidas en 40 *contigs* y un 57% en contenido en G+C (Tabla 27), un porcentaje ligeramente más elevado que el obtenido durante la caracterización utilizando la metodología convencional, que mostraron valores del 52% (J.-D. Flores-Félix et al. 2013). El programa RAST consiguió descifrar la función del 28% de los genes encontrados de manera automática, encontrándose 5.628 regiones codificantes (CDS) (Tabla 26). En la figura 66 a) podemos ver la representación gráfica del genoma y los subsistemas a los que el programa RAST ha conseguido asignar una función.

Tabla 26. Características de los genomas obtenidos para las cepas analizadas

Característica	<i>Phyllobacterium endophyticum</i> PEPV15	<i>Rhizobium sp.</i> PEPV16
Tamaño (nt)	5,505,940	7,187,254
Contenido en G+C (%)	57	60,9
Nº de contigs	40	607
Genes anotados (%)	28	29
Nº de CDSs	5658	7652
rRNAs	48	47

El genoma de *R. laguerreae* PEPV16 presentó 7.187.245 pares de bases y un contenido en G+C del 60,9%. En este caso, el número de *contigs* fue mayor, 607, que en el caso de la cepa anterior y el número de genes anotados y asignados a subsistemas por el programa RAST fue de un 29%, con 7.625 regiones codificantes detectadas. Estos datos nos indican que, en ambos casos, la mayoría de los genes del genoma no han podido ser clasificados automáticamente, por lo que la búsqueda de genes deberá ser realizada de manera manual para no perder información.

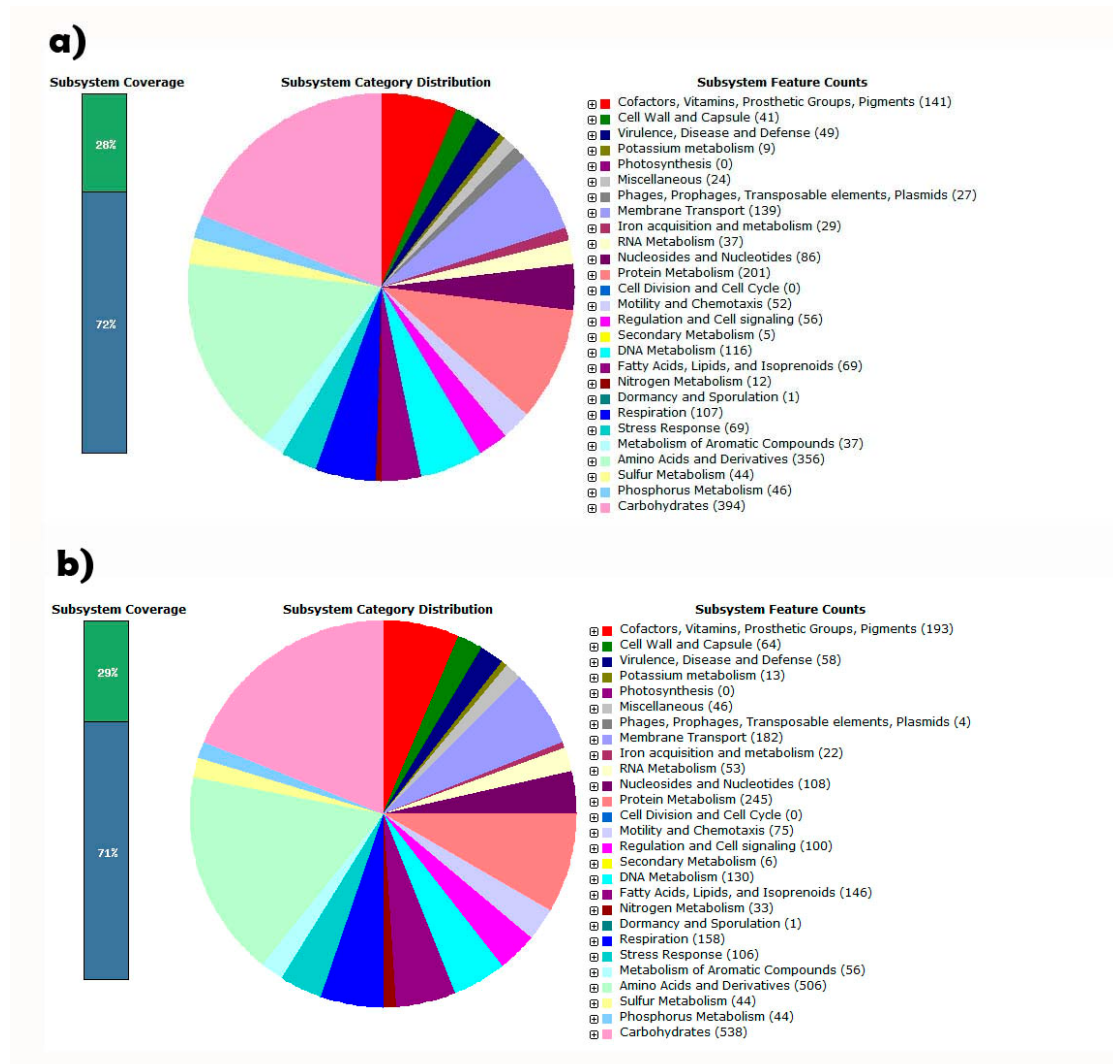


Figura 66. Anotación automática mediante RAST de los genomas obtenidos en el presente estudio mostrando las funciones predichas para las distintas regiones codificantes. a) *P. endophyticum* PEPV15 y b) *R. laguerreae* PEPV16.

2. Estudio de genes de interés para la promoción del crecimiento vegetal.

La utilización de técnicas de secuenciación masiva nos permite analizar una gran cantidad de información genética que puede ser utilizada para realizar estudios *in silico* de los procesos empleados por las bacterias para promocionar el crecimiento vegetal (Belbahri et al. 2017). Además, estas técnicas permiten conocer el potencial de nuestros aislados sin la dependencia directa de la determinación mediante ensayos *in vitro*, pudiendo analizar el genoma mediante el denominado minado de genes, utilizando programas específicos para este fin o mediante la búsqueda dirigida de genes de interés (Carro, Nouiou, et al. 2018). En nuestro caso se estudió el potencial de las cepas

PEPV15 y PEPV16 a través del análisis de los genes implicados en la producción de mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal, así como otros mecanismos implicados en la interacción con los hospedadores vegetales.

2.1. Síntesis de fitohormonas.

Uno de los principales mecanismos a través de los que las bacterias PGPB ejercen su acción sobre las plantas es la síntesis de fitohormonas, siendo las síntesis de auxinas uno de los mecanismos más extendidos y cuyo efecto genera mejores resultados (Zandi y Basu 2016). La síntesis de ácido indol acético (IAA) está mediada por una serie de enzimas que pueden estructurarse en diferentes rutas metabólicas partiendo de triptófano como sustrato. En ambos genomas encontramos una serie de enzimas relacionadas directamente con la síntesis de estas fitohormonas como la indol-3-glicerol fosfato sintetasa o indol-3-acético transferasa. La primera de ellas, la enzima indol-3-glicerol fosfato sintetasa, está involucrada en la síntesis de IAA en una de las rutas denominadas triptófano independiente. También se han encontrado acetamidases homólogas del gen *iaaH* (EC 3.5.1.4) que están involucradas en la síntesis de ácido indol-3-acético a partir de indol-3-acetamida (Fig. 67). Este gen está involucrado en la síntesis de esta fitohormona a partir de IAA por la denominada ruta del indol-3-acetamida, aunque puede ser sintetizado utilizando la ruta del indolpiruvato relacionada con la presencia en el genoma del gen *ipdC* (Xie et al. 2016). Sin embargo, este gen no ha sido localizado en ninguno de los dos genomas analizados. También se han detectado varios sistemas transportadores de membrana de auxinas en ambos genomas, lo que unido a los genes ya mencionados y a aquéllos involucrados en la síntesis de triptófano, como los que codifican las triptófano-sintasas (EC 4.2.1.20), así como su transporte, podemos deducir que ambos microorganismos son capaces de sintetizar auxinas a partir de fuentes exógenas y endógenas, además de exportarlo al exterior celular (Vidhyasekaran 2015).

glucosa deshidrogenasa (*gdh*) (Wagh et al. 2014). Estos sistemas se han observado en ambas bacterias, pero la cepa *P. endophyticum* PEPV15 presenta un mayor número de genes *gdh* u homólogos.

Además, en el genoma de ambas bacterias podemos encontrar genes *pst* involucrados en el transporte transmembrana de fósforo inorgánico (Zhang et al. 2007), lo que puede permitir a la bacteria manejar los stocks de fósforo, tanto en el exterior como en el interior de la célula, permitiendo la incorporación de este elemento al ciclo biológico (Xie et al. 2016).

2.3. Nodulación y fijación de nitrógeno.

El estudio realizado en el capítulo anterior fue dirigido a la amplificación y secuenciación del gen *nodC*, utilizado como marcador para la clasificación de *Rhizobium* a nivel de simbiovariedad y para estudiar la diversidad genética dentro de ella (Villadas et al. 2017). Sin embargo, la secuenciación masiva permite obtener los operones de nodulación completos sin las limitaciones propias de la PCR convencional, identificándose, como ocurre en el caso de la cepa PEPV16 los genes *nodABCDEFGHIJ* involucrados en el proceso de nodulación. En el genoma de la cepa PEPV15, por el contrario, no se localizó ningún gen que mostrara homología con los genes implicados en la nodulación de leguminosas, corroborando los resultados obtenidos por PCR convencional y su naturaleza endofítica (J.-D. Flores-Félix et al. 2013).

Otro aspecto asociado con el establecimiento de relaciones simbióticas entre las bacterias PGPB y las plantas es la capacidad de fijar nitrógeno, que viene determinada por la presencia en el genoma de los genes que codifican para la enzima nitrogenasa, entre otros el gen *nifH* (Silveira et al. 2016). Este gen, junto con el resto del operón de fijación de nitrógeno *nifHDK*, sólo se localizó en la cepa PEPV16 y está previsiblemente incluido en un plásmido simbiótico. En la cepa PEPV16 también se localiza los genes *fixABCX*, que juegan un papel en el equilibrio redox durante la fijación de nitrógeno (Masson-Boivin et al. 2009). En el genoma de la cepa PEPV15 no se localizó ningún gen *nif*, tan sólo un inductor transcripcional *fixJ*, cuya función posiblemente haya sido anotada por homología de la secuencia, pero cuya función real puede no estar relacionada con la fijación de nitrógeno.

2.4. Metabolismo del hierro.

El hierro es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre y presenta concentraciones muy variables en el suelo fruto de sus dos estados de oxidación, Fe^{2+} y Fe^{3+} . El primero es muy soluble y puede lixiviarse con el agua produciéndose una pérdida de este elemento, sin embargo, el Fe^{3+} es muy insoluble y su presencia en el suelo no es rara, pero su disponibilidad es muy baja (Chu et al. 2010). Además, este elemento tiene especial relevancia en la biología de los organismos actuando como cofactor de múltiples enzimas y como componente esencial de numerosas moléculas que juegan un papel fundamental, como los citocromos (Cornelis 2010). Por esta razón,

las bacterias presentan importantes sistemas metabólicos de manipulación y obtención del hierro evitando situaciones limitantes por déficit de este metal. En ambas cepas el sistema automático de anotación del RAST identificó 29 genes diferentes relacionados con el metabolismo del hierro en *P. endophyticum* PEPV15 y 22 en *R. laguerreae* PEPV16. Ambas cepas presentan similitudes en los genes relacionados con el metabolismo y transporte de los grupos hemo, como los genes implicados en la síntesis de transportadores de membrana *siaA*, *siaB*, *isdA*, *isdD* e *isdE*. También se han encontrado una serie de transportadores de membrana tipo ABC especializados en la captación de hierro y los operones *piaABC*, *pitABC* y *piuABC* que codifican para cada una de las subunidades que forman este sistema y que se encontró en ambas cepas. En concreto *piaA*, *pitA* y *piuA* codifican para lipoproteínas que se unen a los grupos hemo, ferricromos o iones de hierro. Éstas transfieren los iones hierro a las permeasas *piaB*, *pitB* y *piuB*, que atraviesan las membranas utilizando energía a través de la hidrólisis de ATP aportado por *piaC*, *pitC* y *piuC* (Yang et al. 2014). En ambas cepas también se han encontrado sistemas de transporte específicos de ferricromos *fhuA*, *fhuB*, *fhuC*.

Sin embargo, existen múltiples diferencias asociadas principalmente con el nivel de captación. Como se había observado *in vitro*, ambas cepas presentaban capacidad para producir sideróforos, aunque estos eran producidos en distinta cantidad. El estudio genómico nos indica que cada una de las cepas analizadas es capaz de producir un sideróforo diferente, lo que también podría explicar la diferente afinidad de cada cepa por el hierro. La cepa *P. endophyticum* PEPV15 presenta los genes *siderX1*, *siderX2*, *siderX3*, *siderX4* y *siderX5* implicados en la síntesis de antraquelina (Fig. 68 a), un sideróforo de la familia de los hidraxamatos descritos en primera instancia asociada a *Bacillus anthracis* (Cendrowski et al. 2004). También encontramos un sistema de transporte de hierro específico. Éste consta de tres componentes proteicos (*EfeUOB*) y actúa principalmente a pH bajo. Los sistemas homólogos están presentes en muchas otras bacterias. El operón *efeUOB* se induce a pH bajo tras la fosforilación del componente *CpxR* del regulador de respuesta de dos componentes *CpxAR* (para cobre). La expresión aumenta en respuesta a las condiciones de déficit de hierro siendo dependiente de Fe^{2+} . También puede verse reprimido por receptores de *Quorum sensing luxS*. (Große et al. 2006).

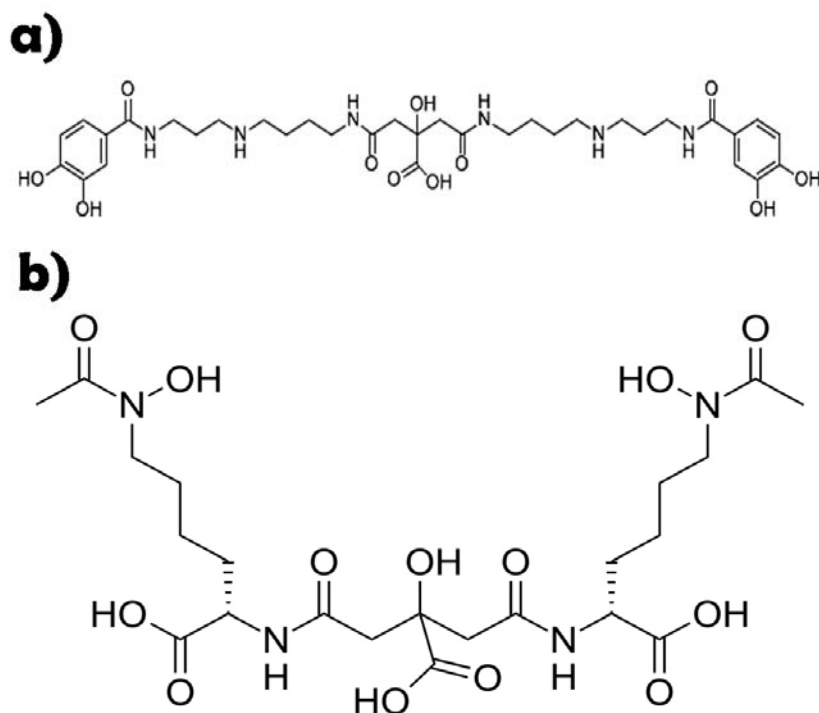


Figura 68. Representación molecular de los sideróforos cuya síntesis ha sido predicha en función de los genes encontrados en ambos genomas. a) antraquelina y b) aerobactina.

La cepa *R. laguerreae* PEPV16 presentó genes implicados en la síntesis y captación de aerobactina (Fig 68 b). Esta cepa presentaba el operón completo para la síntesis de este sideróforo de la familia de los hidroxamatos, el operon *iucABCD*, en el que en concreto el gen *iucC* es el que codifica para la enzima aerobactina sintasa. La aerobactina es un dihidroxamato que comprende dos moléculas de N6-acetil-N6-hidroxisilina y una molécula de ácido cítrico. Este compuesto se aisló por primera vez de *Enterobacter aerogenes* (Braun et al. 1983). Este grupo a menudo incluye el quinto gen (*iutA*) que codifica la proteína del receptor. El transporte de aerobactina a través de la membrana externa está mediado por *IutA*, un receptor dependiente de *TonB* altamente específico. Está muy conservado y es fácilmente identificable en la mayoría de los microorganismos capaces de llevar a cabo la biosíntesis de aerobactina, así como en aquéllos que parecen utilizarlo como un sideróforo heterólogo (en ausencia de síntesis interna de aerobactina). Por otro lado, el transporte de aerobactina férrica (y otros hidroxamatos de hierro (III)) a través de la membrana interna al citoplasma parece ser mucho menos específico, y se entiende mucho menos (Ishimaru y Loper 1992).

2.5.Inducción de resistencia sistémica

Diferentes estudios ponen de manifiesto que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de promover el crecimiento de la planta hospedadora no sólo por mecanismos directos, sino también mediante otros mecanismos indirectos como, por ejemplo, la inducción de resistencia sistémica (ISR). Uno de los mecanismos por los que las bacterias PGPB inducen esta respuesta en las plantas es la síntesis de

compuestos volátiles como 2-3-butanediol o acetoína (Rudrappa et al. 2010). La síntesis de estos compuestos está asociada a la presencia en el genoma de los genes *budC/butA* o *alsD* que codifican para butanediol dehidrogenasa y acetolactato descarboxilasa, respectivamente. En nuestro caso, tan sólo se ha encontrado butanediol deshidrogenasa en el genoma de la cepa *R. laguerreae* PEPV16, con dos unidades en el genoma. Otras cepas con gran potencial como PGPB presentan estos genes en su genoma (Maymon et al. 2015) e incluso algunos autores indican que puede ser una cualidad extendida entre los microorganismos de la rizosfera (Gupta et al. 2015), aunque en nuestro caso, se localizó sólo una de las cepas analizadas.

3. Genes implicados en colonización e interacción en la rizosfera.

3.1. *Quorum sensing*.

Ya hemos observado que las bacterias son capaces de producir moléculas implicadas en la comunicación célula-célula. Estas moléculas son capaces de inducir o reprimir la transcripción de diferentes genes en función de la densidad de las poblaciones, como la síntesis de flagelos, la formación de biofilms o la transferencia de plásmidos (Zheng et al. 2015). Este proceso se denomina *Quorum sensing* y se conoce desde la década de los años 80 del pasado siglo, habiéndose identificado una serie de moléculas como tiolactonas cíclicas, furanosilborato, ácido metil-dodecinoico y las acil-homoserina-lactonas (Dong y Zhang 2005). Estas últimas son las más estudiadas y las que mayor influencia han mostrado tener en los sistemas de *Quorum sensing* de las bacterias Gram negativas donde *rhizobia* no es una excepción (Wisniewski-Dyé y Downie 2002; González y Marketon 2003). Las dos cepas analizadas presentaron los genes básicos de los operones implicados en la regulación de los circuitos de *Quorum sensing*. Estos sistemas de *Quorum sensing* están formados por los genes *lux*, donde los denominados *luxI* codifican para una acil-homoserina-lactona sintasa encargada de sintetizar las moléculas implicadas, y suelen ir asociados a otro tipo de genes, los denominados *luxR*, que actúan como reguladores transcripcionales. Éstos pueden estar asociados a otros operones como es el caso de los genes *luxA*, que son reguladores transcripcionales autoinducibles. En ambos casos, se detectaron genes *luxA* en operones implicados en la síntesis de flagelos como los genes *FliFNMA*, que codifican las diferentes proteínas que conforman la estructura de los flagelos. Esto nos indica que los cambios entre fase bentónica y planctónica están determinados por cambios en la concentración de AHL en el medio. Este tipo de organizaciones génicas ya se ha detectado en otras cepas de *Rhizobium* y se conoce cómo son capaces de autoregularse y retroalimentarse (Zheng et al. 2015). Como genes adicionales al sistema básico de producción-regulación encontramos transportadores de membrana de homoserina-lactonas en ambos genomas, además de genes implicados en el silenciamiento y regulación de la concentración de estas moléculas que estarían asociados a los denominados procesos de *Quorum quenching*, las N-acil homoserina lactona hidrolasas encargadas de degradar estas moléculas (Kalia 2013).

3.2. Genes implicados en colonización y formación de biofilms.

Otro de los requerimientos necesarios para el diseño de un buen biofertilizante debe ser la capacidad de colonización elevada de las superficies vegetales, con posibilidad de crear biofilms y competir activamente con los microorganismos ya establecidos (Zhao et al. 2011). Ya se ha observado *in vitro* la capacidad de ambos aislados para formar biofilms y producir determinados enzimas, sin embargo, la producción de exopolisacáridos implicados en la formación de biofilms y la colonización de superficies tiene una importante base genética (Janczarek et al. 2015; Liu et al. 2017). En el caso de *Rhizobium* y otros géneros afines, la producción de biofilms es muy variable y puede presentar una naturaleza muy diversa en lo que a monómeros se refiere, pudiendo estar compuestos por galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, xilosa, ácido galacturónico o ácido glucurónico, entre otros (Ribeiro y Burkert 2016).

La síntesis de exopolisacáridos y de la matriz extracelular precisa de una parte muy determinada de la maquinaria celular, desde genes de síntesis de polímeros y proteínas transportadoras específicas de estos polímeros, a liasas especializadas en la creación de polímeros de estructuras complejas con múltiples sustituyentes (Ghosh y Maiti 2016). En muchos *Rhizobium*, este exopolisacárido está compuesto por succinoglicano y otros polisacáridos, como celulosa o glucanos. El succinoglicano es un exopolisacárido compuesto por glucosa y galactosa en proporción 7:1 y en cuya síntesis los genes *exo* tienen un papel destacable (Schmid et al. 2015). En las dos cepas analizadas encontramos genes *exoQ* encargados de la síntesis de exopolisacáridos de alto peso molecular (Anon 2015) y los genes *exoF* y *exoI*, que son reguladores transcripcionales negativos y positivos de la síntesis de succinoglicano, respectivamente (Janczarek y Skorupska 2004; Wu et al. 2016). Además, se encontró la enzima β 1-2 glucano cíclico sintasa (EC 2.4.1.-) codificada por genes homólogos del gen *ndvB*, junto con *ndvA*, que codifica para un transportador de membrana específico de este compuesto, que conforma parte de los polisacáridos extracelulares en numerosas especies de *Rhizobium* (Venkatachalam et al. 2013; Janczarek et al. 2014). También, en los genomas de las dos cepas se localizaron una serie de genes diferentes. En el caso de la cepa *P. endophyticum* PEPV15 se localizó el gen *exoM* implicado en la elongación de la cadena de residuos de glucosa que conforman el succinoglicano, además de los genes *exoD* y *exoR* que también actúan como reguladores transcripcionales (Halder et al. 2017). En suma, se detectaron genes implicados en la síntesis de ácido colánico, un polímero sintetizado en el género *Pseudomonas* como matriz extracelular (Schmid et al. 2015). En el genoma de la cepa *R. laguerreae* PEPV16 se encontraron diferentes unidades del gen *exoZ*, implicado en la acetilación de las cadenas de succinoglicano (Cheng y Walker 1998).

En ambas cepas encontramos genes involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos de distinta naturaleza, como *wadB* y *wadC* con actividad glicosiltransferasa y manosiltransferasa, respectivamente (Gil-Ramírez et al. 2014;

Fontana et al. 2016). También encontramos genes *pssD*, *pssE* que conforman las dos subunidades de una glucuronosil-(β 1-4)-glucosil transferasa que añade dos residuos de ácido glucurónico a los extremos lipídicos de estos polisacáridos (Williams et al. 2008; Janczarek et al. 2014). De esta manera, estos aislados muestran la capacidad de producir una amplia variedad de exopolisacáridos. Sin embargo, la síntesis de estos polímeros precisa de sistemas de transporte que permitan localizar las moléculas en su zona de acción, el exterior celular. Por otra parte, también encontramos sistemas de transporte específicos de exopolisacáridos y lipopolisacáridos como por ejemplo el gen *wzxC*, que codifica para una f-lipasa que permite la translocación del lipopolisacárido a través de la membrana interna (Schmid et al. 2015). Además, hay numerosas proteínas cuya función está asignada al transporte de polisacáridos de diferente naturaleza para completar la función biológica desempeñada por estas moléculas, y que aparecen en clústeres de genes, como en el caso de *R. laguerreae* PEPV16, en la que muestran alta homología con distintos genes de transporte de exopolisacáridos de la cepa *Rhizobium leguminosarum* 3841 (Fig. 69) y entre los que se encuentran los genes *exoP*, *pssO* y *pssT*, todos ellos involucrados en sistemas de transporte extracelular de exopolisacáridos (Mazur et al. 2005; Marczak et al. 2008).

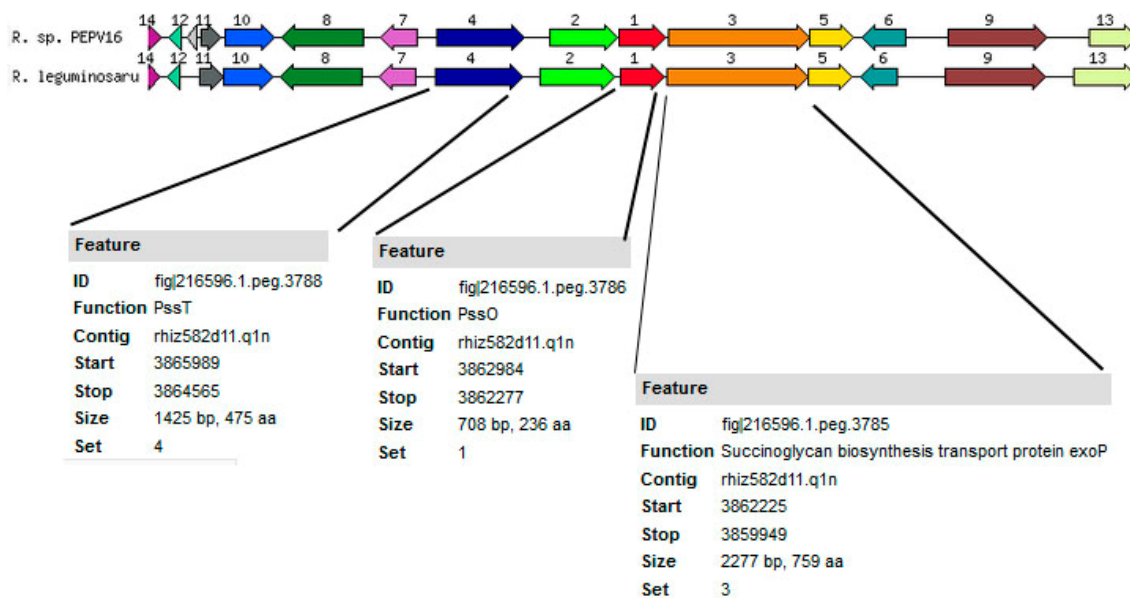


Figura 69. Posible operón de síntesis y exportación de exopolisacárido detectado en *R. laguerreae* PEPV16 en comparación con el detectado en *R. leguminosarum* 3841.

En ambos casos encontramos el operón *celABC* o *bcsABC* implicado en la biosíntesis de celulosa, donde *celA* o *bcsA* codifica una celulosa sintasa y alberga un dominio glicosiltransferasa. El gen *celB* o *bcsB* codifica para el complejo B de la celulosa sintasa y esta subunidad posee un dominio de unión a di-GMP cíclico, que actúa como un regulador de la biosíntesis de celulosa. Por último, el gen *celC* o *bcsC* codifica β 1-4 glucanasas, también denominadas celulasas (EC 3.2.1.4). Estos genes se encontraban anotados por su función, pero la estructura del operón es fácilmente reconocible, además de encontrarse repetido en el genoma de ambas cepas. Este operón

está ampliamente distribuido entre *Rhizobium* y géneros afines, mostrando una importante implicación en los procesos de adhesión y colonización radicular, así como los procesos de infección y nodulación (Robledo et al., 2008; Robledo et al. 2012).

4. Otros genes de interés en bacterias PGPB.

Además de los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal y de la síntesis de diversos compuestos, las bacterias PGPB son capaces de influir en el desarrollo de la planta a través de la síntesis de diversas enzimas que, o bien actúan de manera indirecta sobre la planta, o son capaces de mejorar la colonización del hospedador.

Una de las enzimas con interés en promoción del crecimiento vegetal, y que ha sido estudiada con mayor asiduidad, es la enzima ACC-desaminasa implicada en la degradación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, que es el precursor directo del etileno, una fitohormona implicada en numerosos procesos como la maduración de los frutos, la senescencia y caída de las hojas, la germinación o la floración (Saleem et al. 2007; Duan et al. 2009). Su presencia en microorganismos endófitos no es muy común, apareciendo asociada a géneros como, por ejemplo, *Rhizobium* o *Pseudomonas* (Rashid et al. 2012). Las dos cepas estudiadas presentan el gen *acdS* que codifica para esta enzima (EC 3.5.99.7), por lo que presuntivamente son capaces de expresarla y actuar sobre las plantas en momentos de estrés. Esta acción ocurre cuando las bacterias se encuentran en entornos rizosféricos y endofíticos, y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico difunde a los entornos de la raíz como parte de los exudados radiculares y, de esta manera, las bacterias actúan reduciendo la cantidad total disponible para metabolizarse en forma de etileno (Glick 2014). Este efecto ha sido puesto en duda en biofertilizantes de aplicación general cuya interacción con las plantas no está demostrada empíricamente y su efecto está asociado a la colonización radicular (Glick 2015), por lo que es muy posible que las cepas *P. endophyticum* PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16 sean capaces de generar este efecto sobre las plantas debido a su naturaleza endofítica y rizosférica, respectivamente. También se ha encontrado en los genomas de ambas cepas la enzima succinato semialdehído deshidrogenasa codificada por el gen *gabT*, que está implicada en la supresión de la síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA). Su presencia en los genomas está asociado con la supresión o disminución de la incidencia de distintas plagas o enfermedades en las plantas (Belbahri et al. 2017). La cepa *R. laguerreae* PEPV16 presenta genes implicados en la síntesis de fenacina, un compuesto con actividad antifúngica producida por muchas *Pseudomonas* y otros géneros presentes en la rizosfera (Gupta et al. 2014). En concreto, se encontró el gen *phzF*, que ha sido descrito como la pieza clave del operón de síntesis de fenazina en *Pseudomonas*. Este compuesto presenta actividad frente muchos de los patógenos radiculares y ha demostrado tener un importante papel en la represión de infecciones fúngicas (Lichens-park y Gross Ann, 2014). Estos genes parecen indicar que además de los mecanismos de promoción del crecimiento directos observados *in vitro* y aquéllos localizados en el genoma, ambas cepas presentan un importante potencial debido a la

presencia de numerosos mecanismos indirectos como promotoras del crecimiento vegetal que pueden mejorar el desarrollo de las plantas en condiciones de estrés.

En los genomas de ambas cepas encontramos otro tipo de genes relacionados no con la capacidad de la bacteria para influir sobre el desarrollo de la planta, sino para adaptarse y desarrollarse en entornos rizosféricos. Encontramos diversos genes que codifican para proteínas relacionadas con la tolerancia a estreses, como por ejemplo estreses térmicos por frío o calor. Se detectaron genes de síntesis de proteínas de aclimatación a frío denominadas Csp (Cold shock protein) cuya presencia en los genomas de *Rhizobium* se ha relacionado con la adaptación a climas fríos (Drouin et al. 2000). A su vez, ambas cepas presentaban homologías en los sistemas encargados de la respuesta a estreses térmicos por calor. Se encontraron genes implicados en la reparación del ADN como los genes *dnaK* que codifican para una chaperona y además se han utilizado en estudios filogenéticos porque son considerados genes *housekeeping*, al igual que los genes *recA* y *atpD* (Wang et al. 2018). También se encontraron proteínas involucradas en la respuesta directa a *shock* por calor codificadas por el gen *grpE* que actúa como gen accesorio del *DnaK* (D'aes et al. 2009), y el gen *hrcA*, que codifica para un represor transcripcional asociado a los genes anteriores (Wiegert et al. 2004). No sólo se localizaron en los genomas de las dos cepas analizadas genes implicados en la síntesis de proteínas y enzimas implicadas en la respuesta a *shocks* térmicos, sino también otros relacionados con la respuesta a diversos estreses como el estrés oxidativo. En ambos casos encontramos genes *ahpD* que codifican para una peroxiredoxina implicada en la reducción del estrés oxidativo (Hillas et al. 2000; Nunn et al. 2002). Estos genes están ampliamente distribuidos en procariotas y eucariotas, y además de estar altamente conservados son el único antioxidante enzimático conocido responsable de metabolizar hidróperóxido de alquilo, utilizando electrones donados por NADPH a través de tiorredoxina u otros productos intermedios que contienen tiol (Shrivastava et al. 2015). También se localizaron genes *sodM*, que codifican para superóxido dismutasas y presentan una función biológica similar a la de las enzimas anteriores (Jones et al. 2007).

Otros genes codifican proteínas que están implicadas en la degradación de polímeros vegetales y pueden ser utilizadas tanto con fines nutricionales como para colonizar los tejidos vegetales (Gopalakrishnan et al. 2014). Entre ellas, y localizadas a lo largo del genoma, se encontraron β 1-4 glucanasas, también denominadas celulasas (EC 3.2.1.4), además de las incluidas en el operón *celABC*, cuya actividad había sido observada *in vitro*. También se localizaron α -amilasas (EC 3.2.1.1) y glucoamilasas (EC 3.2.1.3), que catabolizan distintos polímeros glucosídicos (Zhang et al. 2016). También se han encontrado enzimas implicadas en la degradación de polímeros que conforman la pared celular de las plantas como β -ketoalifático enol-lactona hidrolasa (EC 3.1.1.24) implicada en la degradación de lignina (Anon 2015) y 1-4 xiloxidasa en la del xilano (EC 3.2.1.37). Además, en el genoma de *R. laguerreae* PEPV16 se encontraron una serie de genes implicados en la degradación de xilano como endo 1-4 xiloxidasa (EC 3.2.1.8) y α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55). La función de la primera es cortar las

cadena de xilano por el interior de la cadena y la de la segunda hidroliza el enlace entre el arabinofuranósido y el extremo no reductor del arabinoxilano (Cooper 2013).

Respecto al estudio de la capacidad enzimática potencial podemos utilizar bases de datos especializadas en la anotación de enzimas, permitiéndonos clasificar las enzimas por su función y así permitirnos una búsqueda más dirigida. Por ejemplo, dbCAN es una base de datos especializada en la anotación de enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos permitiéndonos dirigir la búsqueda y centralizarla en la misma (Yin et al. 2012). Esta base de datos, además, nos provee la información catalítica de las mismas al estar referencia con la base de datos CAZy, especializada en el análisis genómico, estructural y bioquímico de enzimas especializadas en el metabolismo y catabolismo de carbohidratos (Lombard et al. 2014). Esta base de datos clasifica las enzimas en glucosidohidrolasas, glucosiltransferasas, polisacaridoliasas, carbohidratoliasas y otras enzimas con actividades auxiliares. El análisis de ambos genomas empleando dbCAN mostró que la cepa PEPV15 presentaba 209 enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos frente a las 290 que mostraba tener la cepa PEPV16.

Concretamente, en el genoma de la cepa PEPV15 se localizaron 63 enzimas clasificadas como glucosidohidrolasas tras el análisis con dbCAN frente a las 17 que se habían localizado utilizando el sistema de anotación automática del RAST. En el caso de las glucosiltransferasas se localizaron 70 frente a 35, y en el de las carbohidratoesterasas, 36 frente a 2. También detectó 2 polisacaridoliasas que no habían sido detectadas mediante la búsqueda en RAST. Este programa detectó 26 enzimas auxiliares entre las que se encontraban, por ejemplo, las pirroquinolona quinona oxidoreductasas codificada por los genes *pqq*, que sí se habían detectado mediante RAST y están implicadas en el metabolismo del fosfato.

Al igual que en el caso anterior, en la cepa PEPV16, el número de enzimas asociadas a cada una de las funciones biológicas reconocibles por el programa de anotación dbCAN es superior al obtenido con RAST. En este caso, con dbCAN se localizaron en el genoma 128 glucosidohidrolasas frente a las 48 detectadas con RAST, 79 glucosiltransferasas frente a 43, y 46 carbohidratoliasas frente a 6. También se detectaron 5 polisacaridoliasas, la mayoría de ellas identificadas como oligogalacturonatoliasa o poligalacturonatoliasa. El número de enzimas auxiliares es inferior que en la cepa PEPV15, concretamente 22 frente a las 26 localizadas en la cepa PEPV15.

Tabla 27. Tabla resumen de genes detectados en el genoma de ambas cepas.

Mecanismo general	Función del gen descrito	Nombre del gen anotado en RAST	PEPV15	PEPV16
Fosfato	Pirroloquinolone sintasa	Pqq-Pirroquinolona sintasa		
		Glucosa deshidrogenasa, dependiente de PQQ (EC		

		1.1.5.2)		
		Oxidoreductasa dependiente de PQQ, familia <i>gdhB</i>		
	Exopolifosfatasas	Exopolifosfatasa (EC 3.6.1.11)		
	Transporte de fosforo	Transportador ABC de fosfato, proteína de unión periplasmática <i>PstS</i> (TC 3.A.1.7.1) <i>pstSCAB</i>		
	Fosfatasas	Trifosfatasa inorgánica (EC 3.6.1.25)		
		Pirofosfatasa inorgánica (EC 3.6.1.1)		
		Fosfatasa putativa (3)		
Síntesis de fitohormonas	Indol acético	Indol-3-glicerol fosfato sintasa (EC 4.1.1.48)		
		Ácido indol-3-acético acetiltransferasa		
		Triptófano sintasa cadena alfa (EC 4.2.1.20)		
		Triptófano sintasa cadena beta (EC 4.2.1.20)		
Quorum sensing	Síntesis de AHL	Acil-homoserina-lactona sintasa <i>LuxI</i>		
	Degradación	N-acil homoserina lactona hidrolasa		
	Captación/exportación	Homoserina/homoserina lactona proteína de exportación		
		Regulador transcripcional de dos componentes, familia <i>LuxR</i>		
		Regulador transcripcional autoinducible, familia <i>LuxR</i>		
		Regulador transcripcional, familia <i>LuxA</i>		
Enzimas	Degradación ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (EC 3.5.99.7)		
	Celulasas	beta-1,4-glucanasa (celulasa) (EC 3.2.1.4)		
	Degradación lignina	Beta-ketoadipato enol-lactona hidrolasa (EC 3.1.1.24)		
		Ácido polihidroxicarboxílico sintasa		
	Amilasas	Alfa amilasa (EC 3.2.1.1)		
		Glucoamilasa (EC 3.2.1.3)		
	Xilanasas	Xilano 1,4-beta-xilosidasa (EC 3.2.1.37)		
		Endo-1,4-beta-xilanasas (EC 3.2.1.8)		
		Alfa-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)		
Síntesis de compuestos	Acetoina, butanodiol	2,3-butanediol deshidrogenasa, (EC 1.1.1.4) / Acetoina		

volátiles		(diacetil) reductasa (EC 1.1.1.304)		
		2,3-butanediol deshidrogenasa (EC 1.1.1.76)		
Producción de antibióticos	Síntesis de 4-hidroxibenzoato	Aminodesoxicorismato liasa (EC 4.1.3.38)		
	Fenacina	Proteína de síntesis de fenacina <i>PhzF</i>		
Nodulación		Proteína de nodulación A		
		Proteína de nodulación B		
		Proteína de nodulación C		
		Proteína de nodulación D		
		Transportador ABC de la secreción de oligosacáridos de lipoquitina, permeasa <i>NodJ</i>		
		Proteína de nodulación putativa X (probable acetilasa)		
		Transportador ABC de secreción de oligosacáridos de lipocitina, proteína de unión a ATP <i>NodI</i>		
		Proteína de nodulación N		
Fijación de nitrógeno		Nitrogenasa (molibdeno-hierro) <i>NifH</i>		
		Nitrogenasa cofactor FeMo <i>NifE</i>		
		Nitrogenasa cofactor FeMo <i>NifN</i>		
		Regulador transcripcional de nitrogenasa, específico de hierro molibdeno <i>NifA</i>		
		Cofactor de síntesis de nitrogenasa dependiente de FeMo <i>NifB</i>		
Supresión GABA		Succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+] (EC 1.2.1.16) <i>gabT</i>		
Resistencia a estreses	Estrés térmico (frío)	Proteína de choque frío de la familia CSP (x8)		
	Estrés térmico (calor)	Chaperona <i>DnaK</i>		
		Proteína de shock térmico <i>GrpE</i>		
		Represor de transcripción inducible por calor <i>HrcA</i>		
	Estrés oxidativo	4-carboximuconolactona descarboxilasa /alquilhidroperoxidasa <i>AhpD</i> family proteína de centro de dominio		
		superóxido dismutasa <i>SodM</i>		
Polisacáridos	exopolisacáridos	<i>exoD</i>		
		<i>exoF</i>		
		<i>exoI</i>		

		<i>exoM</i>		
		<i>exoQ</i>		
		<i>exoR</i>		
		<i>exoZ</i>		
	lipopolisacaridos	<i>Wzx</i>		
		<i>WadC</i>		
		Biosíntesis de LPS glicosiltransferasa <i>WadB</i>		
		<i>pssE, pssD,</i>		
		Beta-(1-->2) glucano exportador, proteína de unión a ATP /permeasa <i>NdvA</i> (EC 3.6.3.42)		

5. Análisis genómico mediante programas específicos. Búsqueda de producción de sustancias.

En la actualidad, el minado de genes en genomas ha evolucionado hacia la automatización en la búsqueda de clústeres de genes, que por homología con otros ya descritos, puedan estar implicados en la síntesis de metabolitos secundarios como polipéptidos, antibióticos, péptidos ribosomales y rutas especializadas (homoserina lactonas, fenacinas o ectoínas) (Paterson et al. 2017). Para ello existen diferentes programas bioinformáticos especializados en la búsqueda dirigida de cada uno de estos metabolitos como por ejemplo Prediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM), Global Alignment for natural products chemInformatiCs (GARLIC), Generalized Retrobiosynthetic Assembly Prediction Engine (GRAPE) o IMG/ ABC (Palazzotto y Weber 2018) y antiSMASH, que permite detectar una amplia gama de metabolitos secundarios estructurados en una base de 1172 clústeres genéticos de productos finales conocidos (Weber et al. 2015).

En nuestro caso, el análisis de los genomas se llevó a cabo utilizando el programa antiSMASH que es capaz de analizar un mayor número de operones asociados a la síntesis de distintos metabolitos secundarios sin tener que utilizar diferentes herramientas bioinformáticas (Weber et al. 2015; Carro, Nouiou, et al. 2018). Los resultados obtenidos para la cepa PEPV15 mostraron un total de 49 potenciales clústeres de genes con diferente actividad, de los cuáles 33 no presentaban una actividad reconocible y habían sido predichos en función de la estructura de los genes que los articulaban debido a la existencia de genes reguladores, de transporte o accesorios. Sin embargo, los 16 restantes sí presentaron una actividad predicha, como aquéllos implicados en la síntesis de homoserina lactonas, terpenos, bacteriocinas, poliketido sintasas de tipo III, NRPS o péptidos no ribosomales, sacáridos y ácidos grasos. Sin embargo, la mayoría era una predicción teórica y tan sólo algunos presentaban alta homología genética con otros clústeres previamente descritos. Entre ellos encontramos clústeres con homologías inferiores al 20% con los genes de clústeres ya descritos e implicados en la síntesis de asukamicina, ácido colanoico, galactoglucano y un clúster inespecífico de síntesis de lipopolisacáridos. Uno de los clústeres localizados presentó

un 44% de los genes homólogos en un clúster de síntesis de galactoglucano (fig. 70) que está formado por varias glucosiltransferasas y un polisacaridosintasa que teóricamente actuarían en la síntesis del galactoglucano.

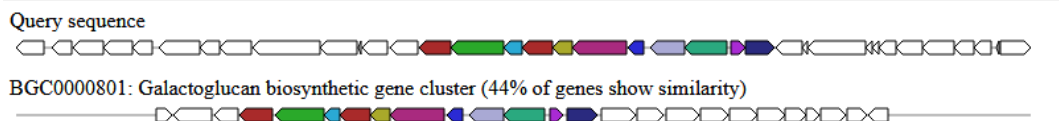


Figura 70 Operón de síntesis de galactoglucano predicho en *P. endophyticum* PEPV15 mediante ANTIsmash.

Otro clúster detectado que presenta un alto número de genes conservados sería el que se muestra en la figura 71 implicado en la síntesis de salecano, un β -glucano descrito recientemente en *Agrobacterium* sp. ZX09 y cuyas propiedades físico-químicas han despertado gran interés en la industria agroalimentaria y en Medicina ya que se comporta como un hidrogel capaz de actuar como espesante presentando nula toxicidad (Hu et al. 2014). En este caso podemos observar que la estructura del clúster es similar en la cepa PEPV15 aunque presenta un mayor número de genes accesorios implicados en la síntesis del salecano.

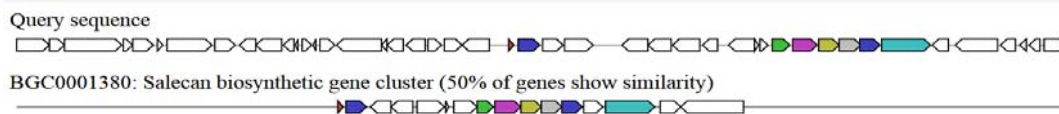


Figura 71. Operón de síntesis de salecano predicho en *P. endophyticum* PEPV15 mediante ANTIsmash.

El último de los clústeres cuya función predicha presenta es altamente probable está implicado en la síntesis de un NRPS, un péptido no ribosomal, la vicibactina, que es un sideróforo de la familia de los hidroxamatos descrito con frecuencia en *Rhizobium leguminosarum* (Dilworth et al. 1998; Carter et al. 2002) y que presenta la peculiaridad de presentar una estructura cíclica (Fig. 72). En este caso, el clúster encontrado en el genoma de la cepa PEPV15 presenta una elevada similitud con el clúster patrón, encontrándose que los genes principales están presentes, por lo que el clúster localizado en nuestra cepa debería ser funcional. Curiosamente las enzimas implicadas en la síntesis de este sideróforo no habían sido detectadas en la anotación del genoma, mientras que sí se habían detectado las enzimas necesarias para síntesis de otros sideróforos de tipo hidroxamato, como la antraquenina. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de programas específicos para la búsqueda de clústeres implicados en la síntesis de metabolitos secundarios, siendo una herramienta esencial en el minado de genomas.

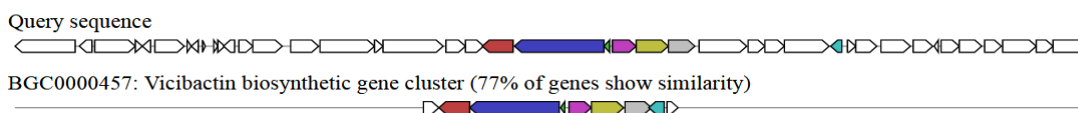


Figura 72. Operón de síntesis de vicibactina predicho en *P. endophyticum* PEPV15 mediante ANTIsmash.

La síntesis de vicibactina está asociada con la presencia en el genoma de los genes *vbs* que actúan polimerizando tres lactonas para conseguir un sistema trilactonado triangular con actividad quelante. Su síntesis presenta gran número de homologías con la de otros sideróforos, como la turnerbactina donde actúa de forma repetida la misma enzima hasta sintetizar el metabolito final (Fig. 73) (Reitz et al. 2017).

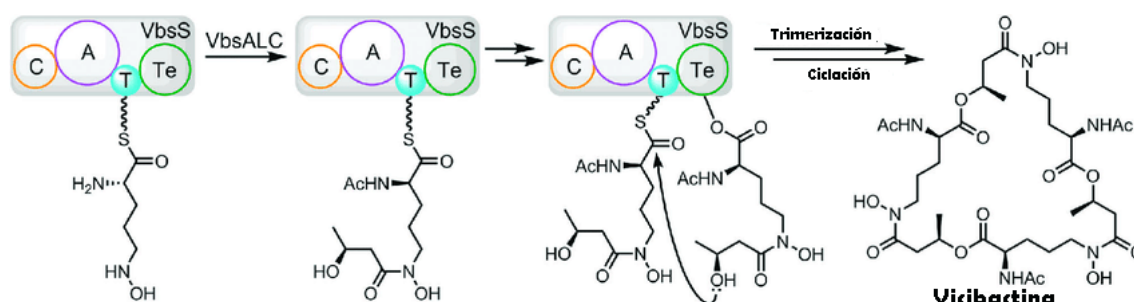


Figura 73. Ruta de síntesis de vicibactina a partir de turnerbactina según Reitz et al., (2017).

El análisis del genoma de la cepa *R. laguerreae* PEPV16 utilizando el programa bioinformático antiSMASH detectó un número significativamente inferior de posibles clústeres implicados en la síntesis de metabolitos secundarios. En este caso, sólo 10 clústeres fueron detectados y ninguno de ellos mostró una homología elevada entre los genes que conformaban cada uno de los clústeres con otros descritos en la bibliografía. Estos eran por tanto clústeres teóricos basados en la presencia o disposición de enzimas cuya función está implicada en la síntesis del metabolito indicado. Este bajo número de clústeres detectados puede estar relacionado con la falta de continuidad en el genoma debido a que para esta cepa se obtuvieron 607 contigs frente a los 40 que conformaban el genoma de la cepa PEPV15 en la que se han detectado 49 clústeres implicados en diferentes actividades metabólicas. Los clústeres detectados en la cepa PEPV16 parecían estar implicados en la síntesis de NRPS (1), T3pks (1), bacteriocinas (1), proteusina (1), acilpolieno (1) y ácidos grasos (5). Sin embargo, ninguno de los clústeres propuestos presentaba el número suficiente de genes y por tanto alcanzar una homología elevada con otros descritos.

Capítulo IV

La búsqueda de biofertilizantes multifuncionales es una tarea que no siempre acaba de la manera deseada ya que usualmente, una misma cepa no suele presentar capacidad para promover el crecimiento en diferentes plantas debido a la incapacidad para interactuar correctamente con ellas (Grobela et al. 2015). Por ello se seleccionaron dos cepas de diferentes géneros y especies, *P. endophyticum* PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16, que presentaron el perfil más completo de mecanismos de promoción de crecimiento *in vitro*, con producción de sideróforos, síntesis de indol acético y capacidad para solubilizar fosfato tanto bicalcico como tricálcico para llevar a cabo estudios de promoción del crecimiento en plantas de fresa, zanahoria y lechuga tras la inoculación con estas dos cepas.

1. Ensayos en plántulas de lechuga, zanahoria y fresa

En primer lugar, se estudió el efecto de la inoculación de estas dos cepas sobre el crecimiento de las plántulas en las primeras etapas del desarrollo, tanto de la parte aérea, como de la radicular, a través de varios parámetros que incluyeron la longitud aérea y radicular y el número de raíces secundarias. La longitud de la parte aérea y de la raíz se midió a los 7 y 14 días postinoculación, y el número de raíces secundarias por planta, a los 14 días. La valoración general fue muy positiva para las dos cepas ensayadas, observándose un incremento estadísticamente significativo en todos los parámetros evaluados en las plantas inoculadas frente a aquellas sin inocular (Tabla 28).

En el caso de la lechuga, se observó un incremento tanto en la longitud de la parte aérea como de la raíz a los 7 y a los 14 días en las plántulas inoculadas con ambas cepas, PEPV15 y PEPV16. En el caso de la parte aérea, los incrementos de longitud se encontraban entorno al 40% a los 7 días y entorno al 70% a los 14 días. En el caso de la longitud de la raíz, el incremento observado en ambos tratamientos rondaba el 40%, pero las medidas observadas a los 14 días de la inoculación arrojaron incrementos menores, en torno al 25%.

En el caso de la zanahoria, la inoculación de ambas cepas, PEPV15 y PEPV16, originó incrementos más discretos en la parte aérea, que variaron entre un 25% y un 30% en las dos tomas de muestras sucesivas. Sin embargo, en lo que se refiere a las raíces, 7 días tras la inoculación, las plántulas inoculadas con las cepas PEPV15 y PEPV16 presentaban incrementos en del 130% y del 116%, respectivamente, con respecto al control sin inocular. A los 14 días los incrementos con respecto al control sin inocular fueron más bajos, del 49% y 45%, respectivamente, para las mismas cepas.

Las plántulas de fresa presentaron tendencias de desarrollo distintas las de las dos plantas anteriores, con diferencias más discretas a los 7 días y una respuesta muy destacable a los 14 días tras la inoculación. A los 7 días, tan sólo las plántulas inoculadas con la cepa PEPV15 mostraron incrementos estadísticamente significativos frente al control sin inocular, sin embargo, tras 14 días, ambos tratamientos mostraban tener un efecto positivo, con incrementos estadísticamente significativos del 79% y del 75% en las plantas inoculadas con las cepas PEPV15 y PEPV16, respectivamente, con

respecto al tratamiento control. En lo que se refiere a las raíces, a los 14 días se observó que el tratamiento con la cepa PEPV15 presentaba los mejores resultados con diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento control (con un 75% de incremento) y al tratamiento con la cepa PEPV16 (con un 25% de incremento). Este último tratamiento también presentó diferencias significativas con respecto al tratamiento control, con un incremento del 41% en la longitud de la raíz.

El efecto de la inoculación de ambas cepas sobre el número de raíces secundarias se evaluó a los 14 días debido que se observan mal a los 7 días post inoculación. Tanto en lechuga como en zanahoria, el tratamiento con la cepa PEPV15 mostró los mejores resultados, con incrementos estadísticamente significativos frente al tratamiento control sin inocular y frente al tratamiento con la cepa PEPV16. En el caso de la zanahoria, además, ambos tratamientos produjeron un desarrollo más temprano de raíces secundarias frente al tratamiento control, en el cuál no se observaron raíces secundarias. Las plántulas de fresa respondieron de manera similar a la inoculación tanto con PEPV15 como con PEPV16 presentando un número similar de raíces secundarias, con diferencias estadísticamente significativas frente al tratamiento control.

Tabla 28. Resultado de la inoculación de las cepas PEPV15 y PEPV16 sobre plántulas de lechuga, zanahoria y fresa.

Cultivo	Tratamiento	Aérea		Raíz		Nº raíces secundarias
		7 días	14 días	7 días	14 días	14 días
Lechuga	Control	1,81±0,20 ^b	3,63±0,32 ^b	4,36±0,26 ^b	9,66±0,32 ^b	5,44±0,12 ^c
	PEPV15	2,62±0,28 ^a	5,33±0,52 ^a	7,80±0,33 ^a	11,90±0,21 ^b	9,14±0,13 ^a
	PEPV16	2,49±0,09 ^a	5,19±0,38 ^a	7,56±0,49 ^a	12,09±0,41 ^b	8,14±0,16 ^b
Zanahoria	Control	0,81±0,12 ^b	1,82±0,10 ^b	1,76±0,15 ^b	6,78±0,32 ^b	0±0 ^c
	PEPV15	1,01±0,10 ^a	2,35±0,08 ^a	3,82±0,13 ^a	9,85±0,40 ^a	2,29±0,10 ^a
	PEPV16	1,00±0,10 ^a	2,42±0,10 ^a	4,04±0,21 ^a	10,12±0,17 ^a	1,50±0,12 ^b
Fresa	Control	0,68±0,08 ^b	0,96±0,091 ^b	0,74±0,11 ^b	2,62±0,16 ^c	0,80±0,06 ^b
	PEPV15	0,74±0,07 ^a	1,73±0,12 ^a	1,14±0,11 ^a	4,56±0,125 ^a	2,57±0,10 ^a
	PEPV16	0,70±0,12 ^b	1,69±0,13 ^a	1,08±0,08 ^a	3,70±0,18 ^b	2,40±0,11 ^a

Algunos autores relacionan directamente la producción de fitohormonas como el ácido indol acético con un incremento en el tamaño de las raíces utilizando cepas del género *Rhizobium* (Kurepin et al. 2014). Otros autores destacan el papel de *Rhizobium* en la mejora del tamaño radicular y aéreo, así como en la disponibilidad de nutrientes, relacionada no sólo con la producción de ácido indol acético, sino de otras fitohormonas (Yadav y Verma 2014; Uyanöz y Karaca 2011; Abd-Alla et al. 2014; Mohanty et al. 2016; Jiménez-Gómez et al. 2016). También se ha descrito que la inoculación de *Phyllobacterium* es capaz de incrementar el desarrollo de raíces secundarias en *Arabidopsis thaliana* (Contesto et al. 2010). Todos estos resultados confirman que la selección de biofertilizantes debe atender a ensayos en planta desde las etapas iniciales, ya que en muchos cultivos hay una primera fase de obtención de plantones y una

segunda fase de obtención del producto final, y por lo tanto, es necesario procurar un adecuado desarrollo de las plantas en fases tempranas, ya que el posterior enraizamiento es determinante para el éxito del cultivo.

2. Análisis de la capacidad de colonización

Al mismo tiempo que se analizó el efecto sobre el crecimiento de las plántulas, se estudió la colonización de la raíz por parte de las cepas PEPV15 y PEPV16. Para ello, las cepas se marcaron con GFP que permite localizar *in situ* las bacterias en la superficie radicular mediante técnicas de microscopía óptica de fluorescencia y confocal.

2.1. Estudio mediante microscopía óptica de fluorescencia

El estudio mediante técnicas de microscopía óptica de fluorescencia permite la observación directa de las bacterias marcadas con GFP, que emiten fluorescencia verde, y se incrementa el contraste utilizando blanco de calcofluor para teñir las paredes celulares en la raíz de la planta (Flores-Félix et al. 2015).

En el caso de la cepa *P. endophyticum* PEPV15 cuando se inoculó en lechuga mostró una colonización localizada en ciertas zonas de la raíz, principalmente aquellas donde aparecían raíces secundarias o las zonas de desarrollo de pelos radicales. En las zonas basales de las raíces secundarias aparecían importantes acumulaciones de bacterias (Fig 74 a), aunque la colonización era irregular y concentrada en ciertos puntos, sin cubrir grandes espacios de la raíz hasta pasados los 7 días (Fig 74 b). A partir de los 7 días, la colonización se hacía más extensa y tendente a un patrón definido, localizándose en los espacios entre las células de las raíces, en las depresiones formadas entre las mismas generando un característico patrón geométrico como se observa en la figura 74 c). También se encontraban estructuras tridimensionales similares a biofilms (Fig 74 d) que se desarrollaban sobre los pelos radiculares y los englobaba dentro de los mismos.

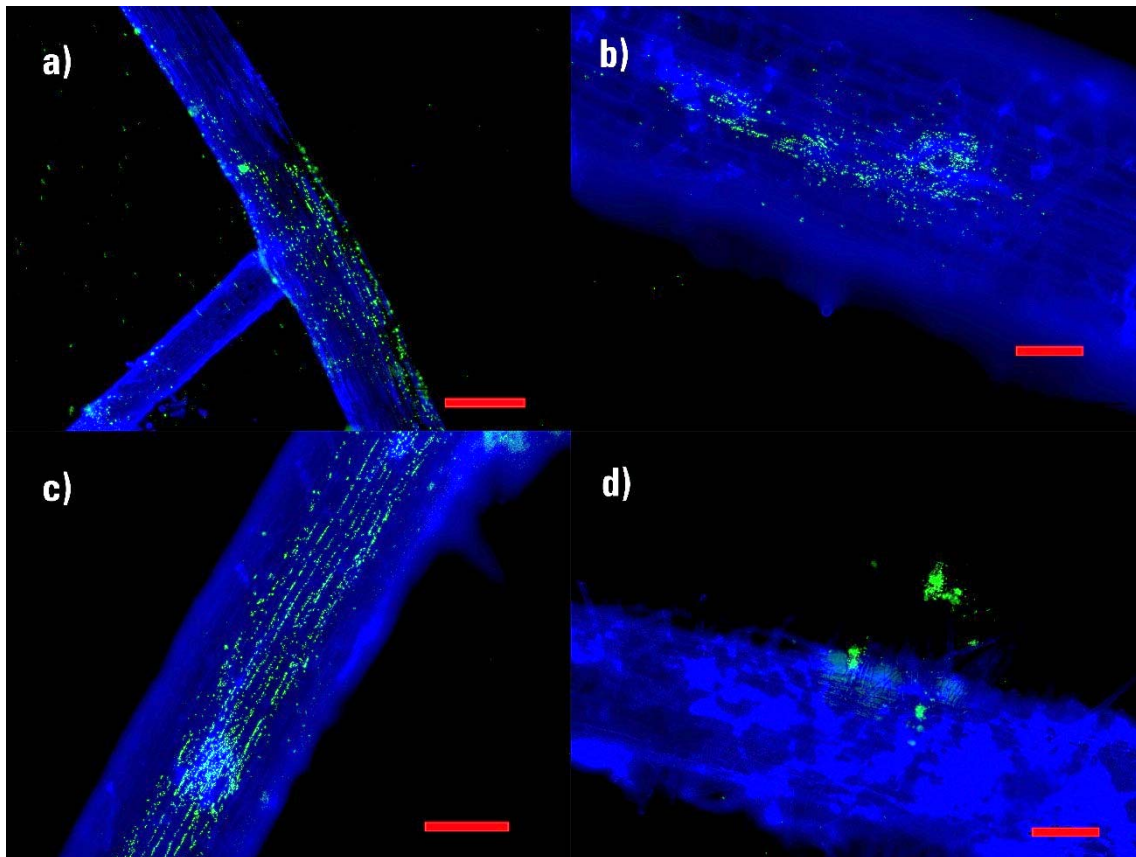


Figura 74. Microscopía de fluorescencia de raíces de lechuga inoculada con *P. endophyticum* PEPV15 a) y b) 5 dpi, c) y d) 10 dpi.

En el caso de la zanahoria, el patrón de colonización seguido por la cepa PEPV15 fue similar, sin embargo, en las primeras etapas se observaba una colonización más intensa, aunque más dispersa con grandes acumulaciones (Fig. 75 a). También se observó en etapas más tempranas cómo esta cepa empezaba a formar aparentes estructuras sobre la superficie radicular, incluyendo en su interior a los pelos radicales, que en el caso de la zanahoria tienen un menor tamaño que en la lechuga (Fig 75 b). Esta colonización, al igual que ocurría en la lechuga, derivaba en una colonización a lo largo de toda la raíz siguiendo el patrón geométrico de las células epidérmicas de la raíz, sin embargo, las acumulaciones eran mucho más grandes, apareciendo un patrón punteado de microcolonias (Fig. 75 c). También se observó que, tras 10 días, aquellas pequeñas acumulaciones sobre los pelos radicales habían derivado en importantes estructuras tridimensionales, que eran capaces de incluir en su estructura amplias cantidades de pelos radicales (Fig. 75 d)

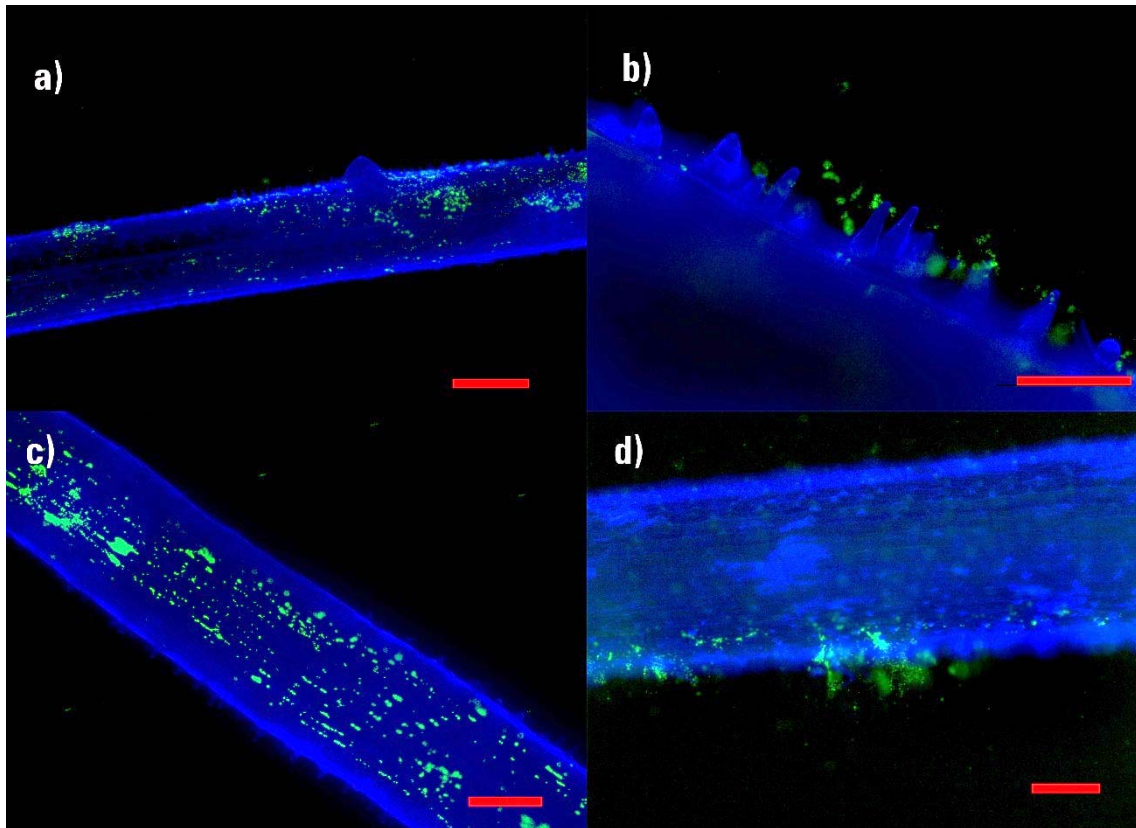


Figura 75. Microscopía de fluorescencia de raíces de zanahoria inoculada con *P. endophyticum* PEPV15 a) y b) 5 dpi, c) 10 dpi y d) 12 dpi.

En el caso de la fresa, la cepa PEPV15 iniciaba la colonización de una manera muy localizada y poco intensa, observándose acumulaciones en la base de las raíces secundarias, como ocurría en los otros cultivos estudiados, aunque lo hacía de manera menos intensa (Fig. 76 a). Esta colonización podría definirse como bipolar con acumulaciones de células tanto en la zona superior de la raíz donde se desarrollaban los pelos radicales como en el extremo apical (Fig. 76 b). La morfología de la raíz de fresa presenta la peculiaridad de tener una zona superior con gran cantidad de pelos radicales en la que se observaban estas acumulaciones. En la zona apical se produce el alargamiento de la raíz y hasta los 10 días después de la inoculación no se comenzó a observar la presencia de bacterias. Fruto de esta colonización bipolar, tras 10 días se observaban grandes acúmulos bacterianos en los extremos apicales de la raíz principal y las raíces secundarias que cubrían la cápsula (Fig. 76 c). En la zona superior de la raíz, las pequeñas acumulaciones observadas evolucionaron hasta conjuntos de células en estructuras tridimensionales sobre la superficie de la raíz que englobaban en su interior los pelos radicales (Fig. 76 d). Estas estructuras similares a biofilms rodeaban la raíz y se encontraban en la parte superior de la misma, desapareciendo y dando lugar a una colonización superficial localizada, a medida que desaparecían los pelos radicales.

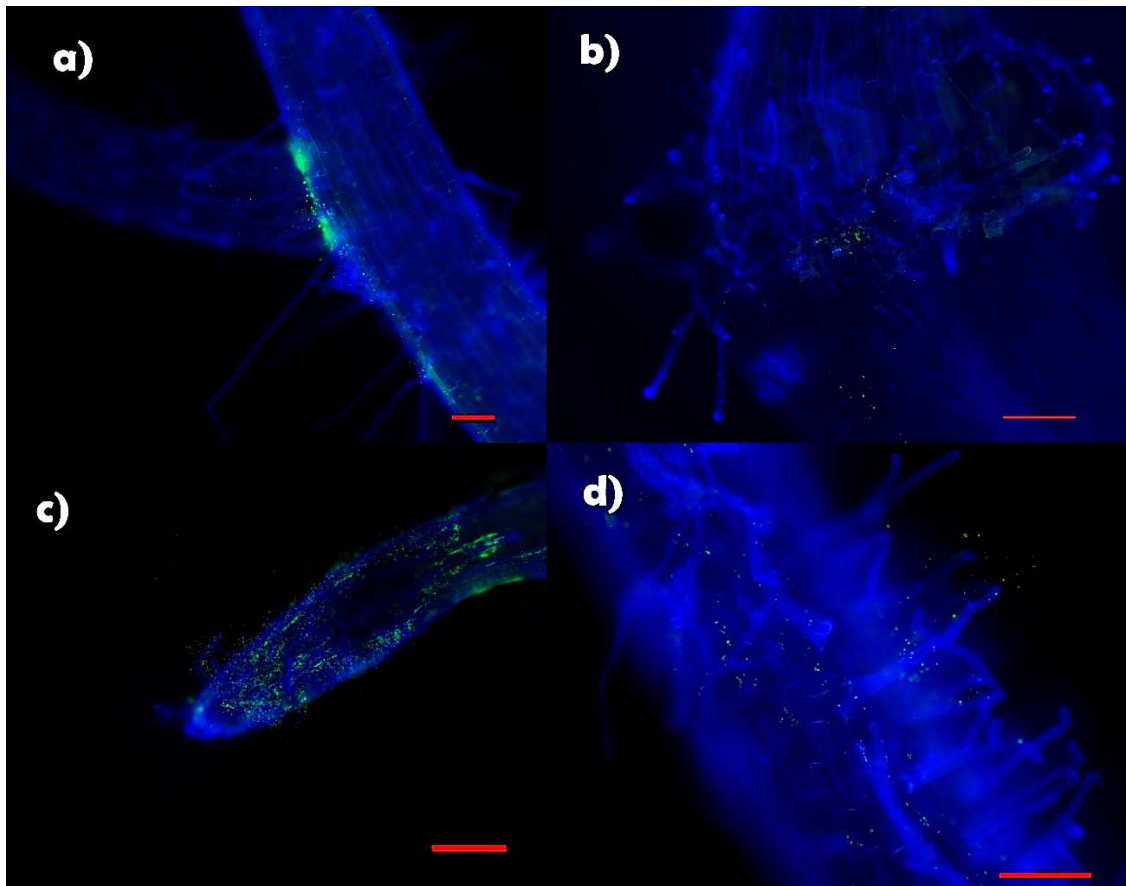


Figura 76. Microscopía de fluorescencia de raíces de fresa inoculada con *P. endophyticum* PEPV15 a) y b) 5 dpi, c) y d) 10 dpi.

En el caso de la cepa *R. laguerreae* PEPV16, el proceso de colonización observado en lechuga era diferente al de *P. endophyticum* PEPV15 pues, aunque comenzaba con una colonización difusa y muy localizada a lo largo de la raíz (Fig. 77 a), no derivaba en una colonización tan generalizada. Aparecían grandes acumulaciones dispersas de bacterias en las zonas de crecimiento de las raíces secundarias (Fig. 77 b). Esta colonización dispersa derivó a partir de los 10 días en una colonización intensa en las zonas con pelos radicales, muy localizada y que no seguía el patrón geométrico tan característico observado en la cepa PEPV15 (Fig. 77 c). Además, también se observó acumulación de grandes cantidades de células en la base de las raíces secundarias, que se extendía a lo largo de las mismas, y su presencia se hacía mínima a medida que nos alejábamos de la raíz principal (Fig. 77 d). Esta estrategia puede ser útil para la bacteria a la hora de colonizar la raíz en toda su extensión, pudiendo responder a estímulos químicos generados en la rotura y creación de paredes celulares para dar lugar a órganos nuevos, como son las raíces secundarias, ya que, de esta manera, la bacteria puede ocupar toda la extensión de la raíz.

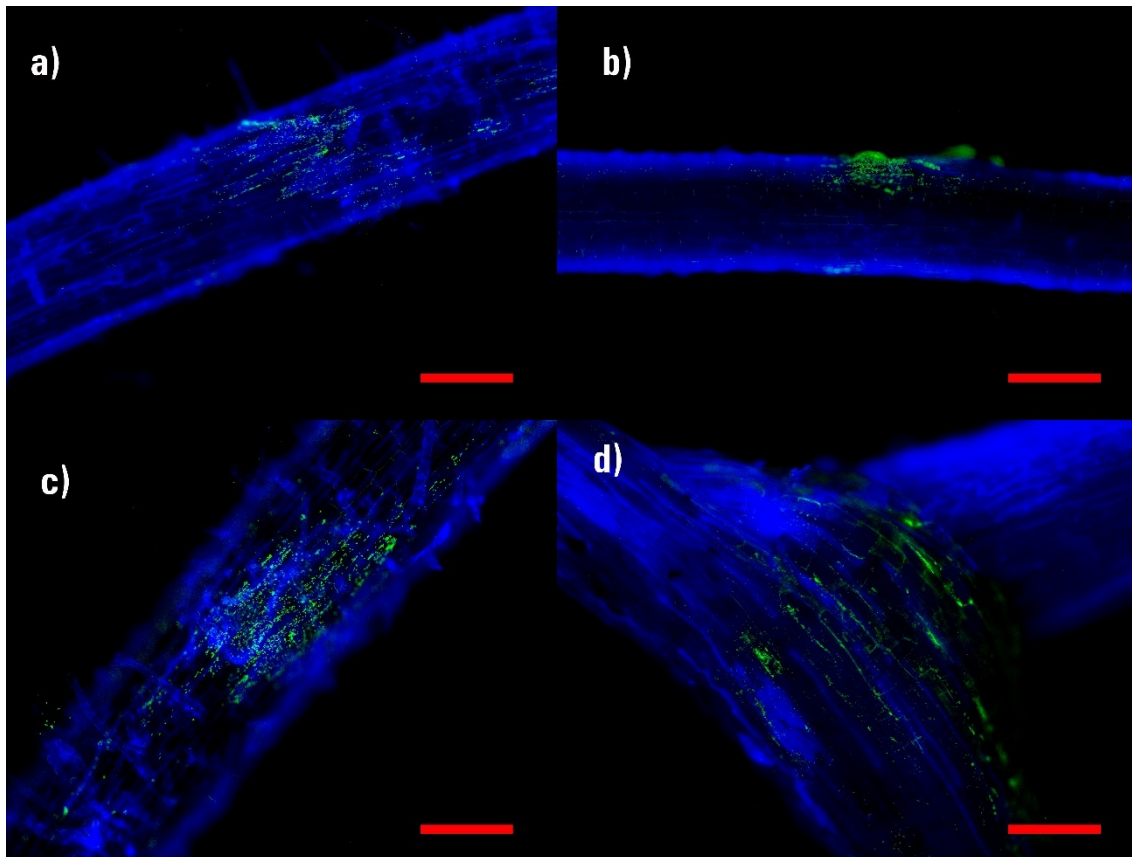


Figura 77. Microscopía de fluorescencia de raíces de lechuga inoculada con *R. laguerreae* PEPV16 a) y b) 5 dpi, c) y d) 10 dpi.

La colonización llevada a cabo por la cepa PEPV16 sobre raíces de zanahoria comenzaba con un proceso de establecimiento de microcolonias de forma dispersa a lo largo de la raíz principal (Fig. 78 a). Estas microcolonias formaban en algunos puntos de la raíz donde se encontraban pelos radicales, estructuras de adhesión a los mismos, con algunas peculiaridades que se observan en la figura 78 b), donde una microcolonia de bacterias había conseguido desarrollarse entre dos pelos radicales; aunque de forma habitual este desarrollo ocurría sobre un único pelo radical. A partir del 7 día tras la inoculación, se observó una colonización generalizada de la raíz, cubriendo de forma intensa la superficie radicular, principalmente en la zona de elongación y aquella donde abundaban los pelos radicales (Fig. 78 c). En la zona superior de la raíz, donde aparecían raíces secundarias, la colonización era más localizada, formada principalmente por microcolonias de mayor tamaño, asociadas a la base de las raíces secundarias (Fig. 78 d), una característica ya observada en el resto de las plantas y en ambas cepas analizadas.

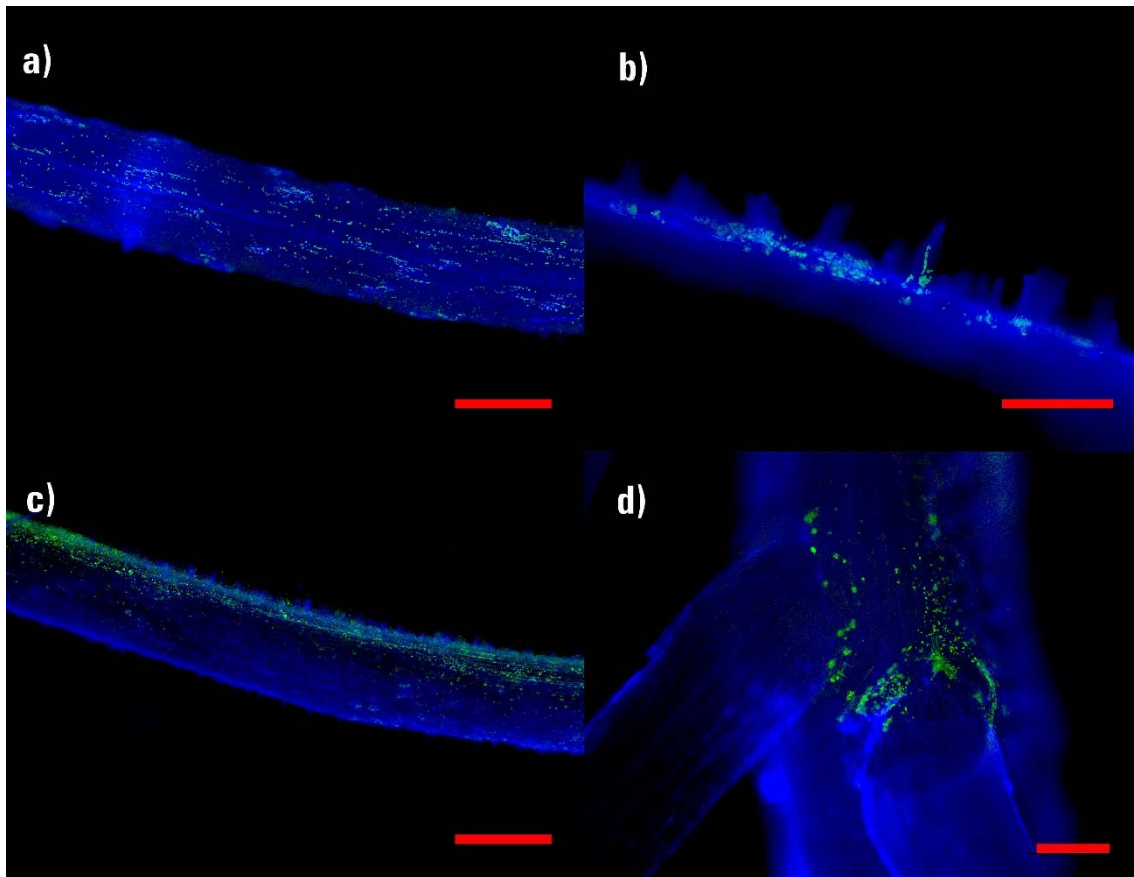


Figura 78. Microscopía de fluorescencia de raíces de zanahoria inoculada con *R. laguerreae* PEPV16 a) y b) 5 dpi, c) y d) 10 dpi.

La colonización mostrada por la cepa PEPV16 sobre raíces de fresa era muy tenue y difusa en las primeras etapas, con una pequeña concentración de células por cm^2 de raíz como se observa en la figura 79 a). Al igual que en el caso de la cepa PEPV15, aparecían pequeños acúmulos de células entre los pelos radicales, pero con una baja densidad, apreciándose unas pocas células que pueden ser contadas con facilidad (Fig. 79). El patrón de colonización mostrado por ambas cepas presentaba similitudes tanto en extensión y densidad, como en la evolución de éste. Destacaba que, tras más de 10 días a partir de la inoculación, la zona intermedia de la raíz, como ocurría en la cepa PEPV15, era colonizada de manera muy débil con algunas pocas células formando microcolonias sobre su superficie (Fig. 79 c). A su vez, la colonización más intensa aparecía tanto en la zona superior, como en la zona inferior cercana al extremo apical. En esta última zona de la raíz, la cepa PEPV16 originaba extensas formaciones que cubrían la raíz en toda su superficie, con tendencia colocarse las células bacterianas en los espacios intercelulares de las células de la epidermis radicular formando el patrón geométrico tan característico que ya habíamos observado con anterioridad en zanahoria.

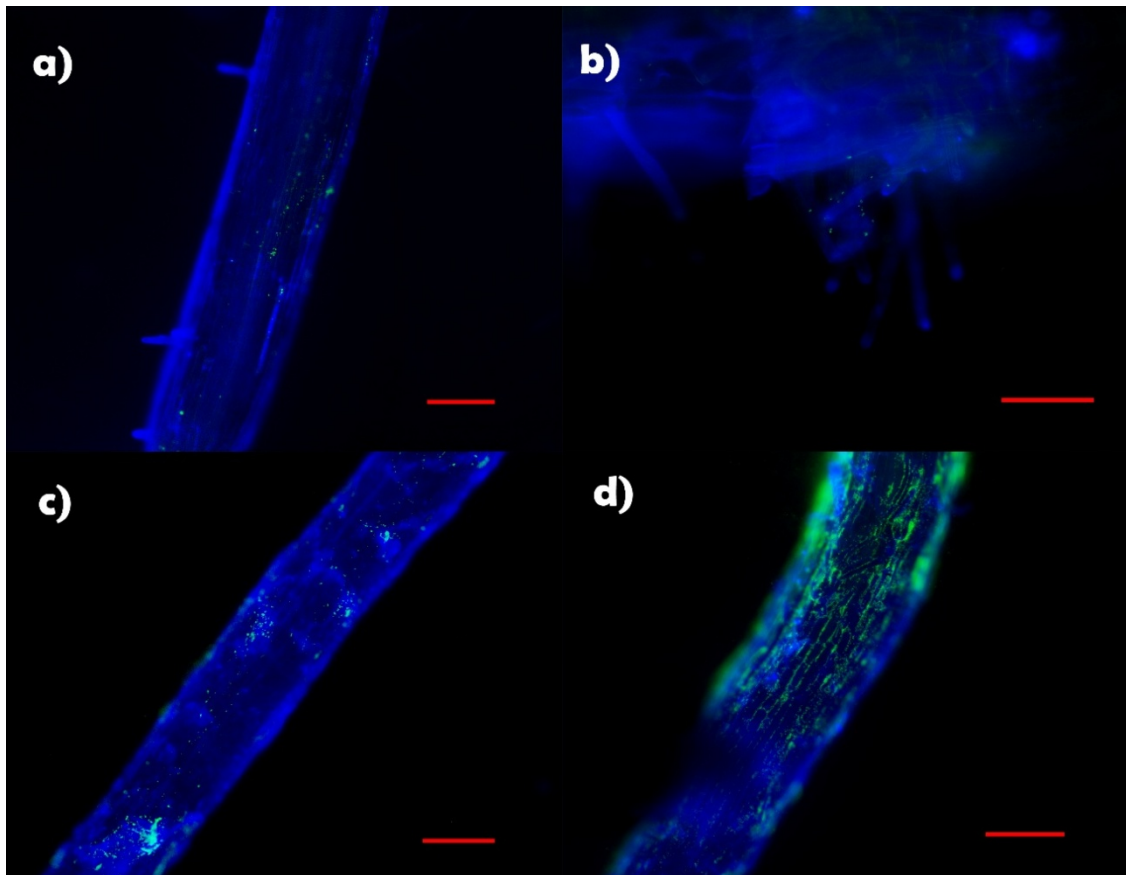


Figura 79. Microscopía de fluorescencia de raíces de fresa inoculada con *R. laguerreae* PEPV16 a) y b) 5 dpi, c) y d) 10 dpi.

Como se ha observado, la colonización radicular puede variar entre distintas plantas, pero cada cepa presenta una serie de patrones específicos, como ya se ha observado incluso en cepas del mismo género (Zachow et al. 2010). El desarrollo va a estar determinado por factores diversos, como la producción de exopolisacárido, la tasa de crecimiento y la capacidad para responder a estímulos químicos (Poonguzhali et al. 2007). Además, estos patrones diferenciados a lo largo de la raíz, ya han sido observados con anterioridad en otras especies tanto de vegetales como de bacterias, como, por ejemplo tomate y *Pseudomonas fluorescens*, con el inoculante presentando importantes variaciones de densidad y distribución a lo largo de la raíz de la planta (Gamalero et al. 2004). Aunque algunos estudios muestran que con colonización menos intensa, el efecto sobre el crecimiento de la planta puede ser positivo (Hassen y Labuschagne 2010; Flores-Félix et al. 2015a; Flores-Félix et al. 2015b), una capacidad de colonización elevada suele estar relacionada con alta capacidad para promover el crecimiento vegetal porque hace más estrecha la interacción planta-microorganismo (Verma et al. 2004; Fan et al. 2012).

2.2. Estudio mediante microscopia confocal

Esta técnica presenta la ventaja de que permite generar imágenes o recreaciones tridimensionales de la raíz con una mínima distorsión de la muestra, mientras que el

microscopio de fluorescencia convencional sólo permite tomar imágenes de la superficie (Krzyzanowska et al. 2012). Mediante esta técnica se estudiaron muestras de plantas inoculadas con las cepas PEPV15 y PEPV16 tras 20 días de la inoculación, pues como se había observado mediante microscopía de fluorescencia, era a partir de los 10-12 días cuando se evolucionaba hacia un alta organización y definición de la colonización y patrones geométricos siguiendo los espacios o depresiones entre las células de la raíz, además de la formación de estructuras tridimensionales alrededor de los pelos radicales.

En primer lugar, se analizó cómo había evolucionado la colonización sobre las raíces de plántulas de lechuga observándose que, a los 20 días después de haber realizado la inoculación, *P. endophyticum* PEPV15 crecía extensamente en las zonas de desarrollo de los pelos radicales creando extensos tapices celulares (Fig. 80 a). *R. laguerreae* PEPV16 mostraba una colonización más extendida pero más laxa (Fig. 80 b), al igual que se había observado mediante microscopía de fluorescencia. Si bien ambas cepas mostraron tener capacidad para colonizar como endófitos las raíces de lechuga, fue la cepa PEPV15 la que colonizó algunas regiones de la raíz con una alta intensidad (Fig. 80 c) en los espacios intercelulares. Estos resultados confirman las observaciones que mediante microscopía de fluorescencia mostraban a la cepa PEPV15 internándose en el interior de la raíz a través de los espacios intercelulares. Para esta cepa se evidenciaron una gran colonización de las zonas altas de la raíz y las primeras etapas de colonización en las zonas de alargamiento de ésta. Respecto a la cepa PEPV16, la colonización del interior de la raíz de lechuga es menos destacable, únicamente producida en las zonas exteriores y de forma menos intensa. La colonización interior ocurre de una manera esporádica, formando tan sólo unos pocos canales entre las células de la raíz (Fig. 80 d), sin alcanzar la extensión de la cepa PEPV15, pero se observa que la colonización de células aisladas se produce en toda la raíz. Patrones similares de colonización se han observado en arroz por una cepa de *Rhizobium*, en la que se observa la colonización de los espacios intercelulares (Perrine-Walker et al. 2007), mostrando un patrón similar al de las dos cepas de este estudio en las raíces de lechuga.

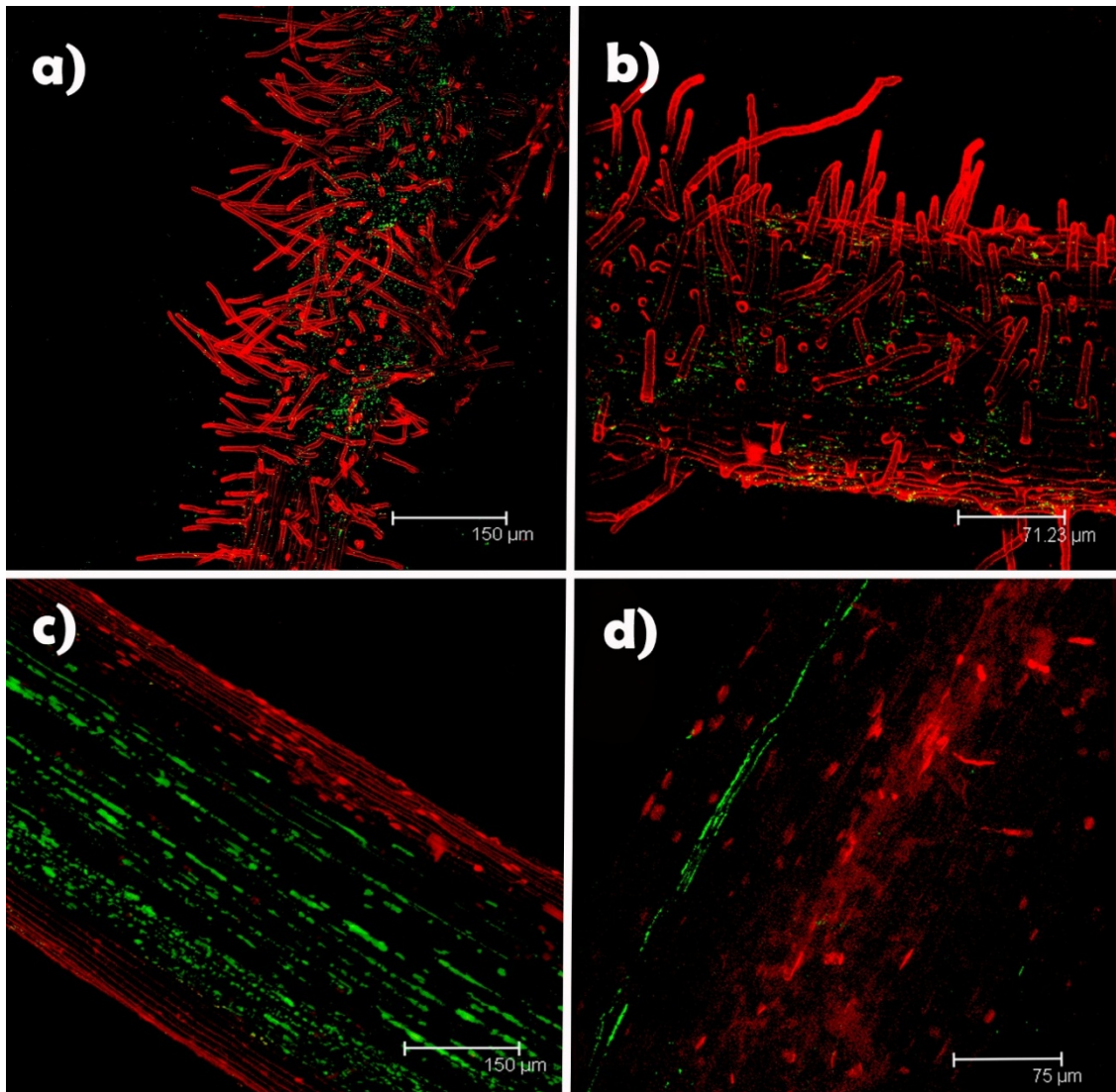


Figura 80. Microscopia confocal de fluorescencia de raíces de lechuga inoculadas con a) y c) *P. endophyticum* PEPV15, y b) y d) *R. laguerreae* PEPV16

El estudio de las raíces de zanahoria mostró que, a pesar de no observarse colonización endófito por parte de ambas cepas, sí se observó cómo, tanto la cepa PEPV15 (Fig. 81 a) como la cepa PEPV16 (Fig. 81 b), crecían a lo largo de la raíz formando extensos biofilms, que en el caso de la cepa PEPV16 alcanzaban una mayor extensión y un mayor desarrollo tridimensional. Estas zonas predominaban donde existían pelos radicales y se hacían más escasas a medida que nos alejábamos de las mismas. Aunque lo deseable en el diseño de un biofertilizante es la selección de cepas con capacidad endófito, la utilización de bacterias que colonizan bien la superficie de las plantas es una ventaja si en la interacción se forman biofilms, que permiten aumentar el volumen eficaz de la raíz aumentando la capacidad de adquisición de nutrientes (Compant et al. 2010).

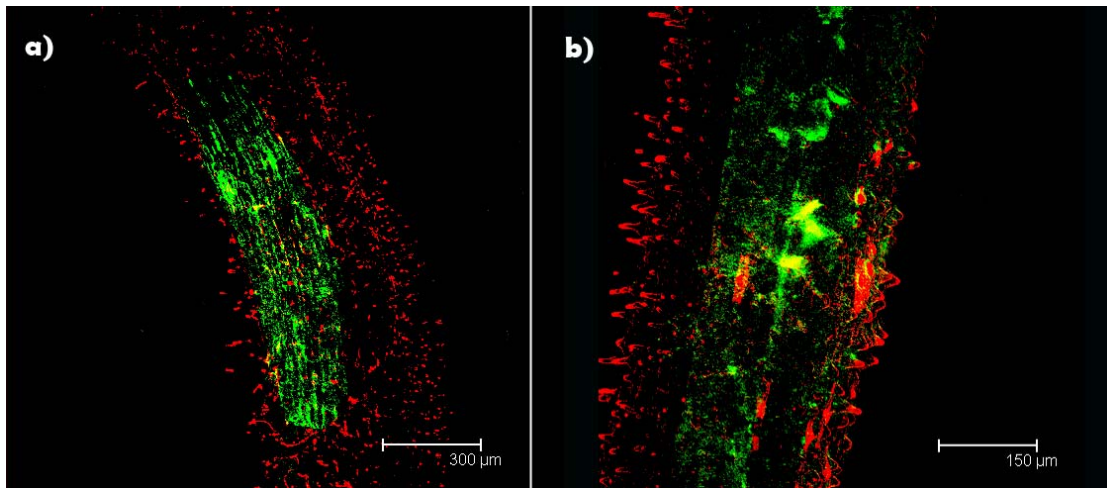


Figura 81. Microscopia confocal de fluorescencia de raíces de lechuga inoculadas con a) *P. endophyticum* PEPV15, y b) *R. laguerreae* PEPV16.

Al estudiar la colonización por la cepa PEPV15 de plántulas de fresa se observó un gran predominio de estructuras similares a biofilms que engloban en el interior de su estructura los pelos radicales de la raíz, creando estructuras densas que se desarrollaban varios micrómetros sobre la superficie de la raíz (Fig. 82 a). En el caso de la cepa PEPV16, se observaron acumulaciones densas de la bacteria sobre la superficie radicular, con una extensión tridimensional más reducida que en el caso de la cepa de PEPV15, incluyendo tan solo de forma parcial algunos pelos radicales (Fig. 82 b). Al igual que en la zanahoria, no se observó colonización endofítica por parte de ninguna de las dos cepas utilizadas como sí había ocurrido en lechuga. Sin embargo, es destacable que en lechuga la producción de biofilms era mucho más discreta, mientras que en los dos cultivos donde no se observó colonización endofítica, la producción de biofilms era mucho más evidente y ocupaba una mayor superficie radicular. Estas variaciones en los tipos de colonización y los diferentes patrones en función de la planta pueden estar relacionadas con la interacción con la planta a través de la captación de exudados radicales (Glick 2015) y de la posible modulación en la síntesis de diferentes enzimas líticas como celulasas, pues variaciones en los patrones de colonización se han observado en mutantes de cepas de *Rhizobium* deficientes y superproductores de estos enzimas (Robledo et al. 2012)

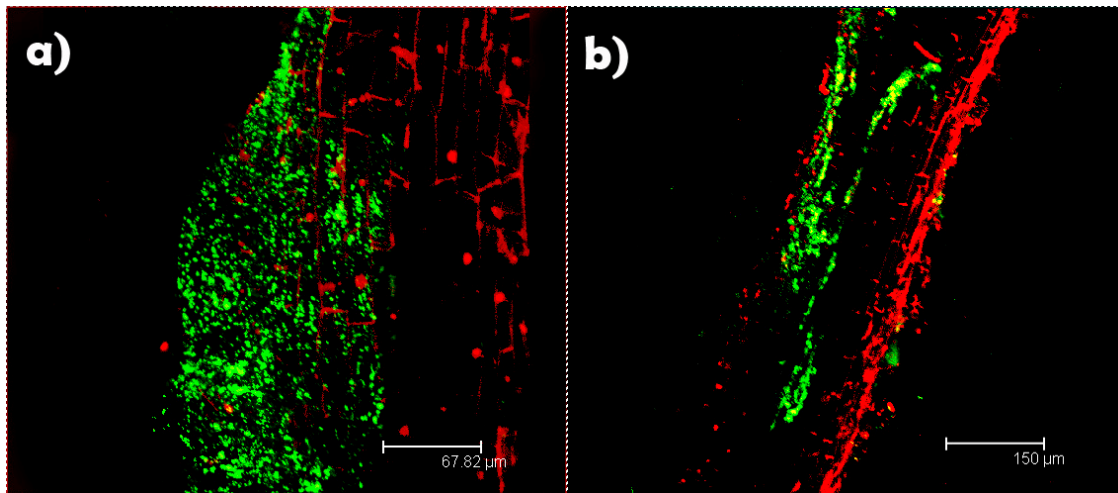


Figura 82. Microscopia confocal de fluorescencia de raíces de lechuga inoculadas con a) *P. endophyticum* PEPV15, y b) *R. laguerreae* PEPV16.

3. Ensayos en microcosmos

Una vez comprobado que las cepas PEPV15 y PEPV16 son capaces de colonizar las raíces de las tres plantas analizadas e interactuar de forma positiva con las mismas en las primeras etapas de su desarrollo, el siguiente paso para analizar su efecto sobre el crecimiento de las plantas es la realización de ensayos en condiciones de microcosmos.

3.1. Ensayos en lechuga

En el caso de la lechuga, la inoculación de ambas cepas se tradujo en un incremento estadísticamente significativo en el peso fresco de la parte aérea del 7% y del 10%, para las cepas PEPV15 y PEPV16, respectivamente, con respecto del control sin inocular (Tabla 29). Aunque se mantuvo la tendencia, el incremento en el peso seco, del 8%, sólo fue significativo en el caso de las plantas inoculadas con la cepa PEPV16. Estas diferencias, aunque son más discretas que las obtenidas en las primeras etapas del desarrollo de las plantas, muestran que la inoculación con *Phyllobacterium* y *Rhizobium* mejora la producción de lechuga, aunque los incrementos son menores que los obtenidos en otros estudios. En ellos los incrementos cuando llevaron a cabo la biofertilización de lechuga fueron muy dispares, entre un 20% con *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Chamangasht et al. 2012) y un 60% con *Bacillus subtilis* y *Glomus intraradices* (Kohler et al. 2007). En la mayoría de estos estudios se utilizaron especies del género *Bacillus* (Kohler et al. 2007; Azco et al. 2008; Galelli et al. 2015), aunque también se han utilizado otros géneros como *Pseudomonas*, *Azospirillum* (Chamangasht et al. 2012) y *Rhizobium* (Chabot et al. 1996; Peña y Reyes 2007). En estos últimos estudios, la aplicación de *Rhizobium* produjo incrementos en el peso de la parte aérea entre un 6% (Chabot et al. 1996) y un 30% (Peña y Reyes 2007).

Tabla 29. Resultados de la inoculación en lechuga en condiciones de microcosmos.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Control	110,64±5,24 ^b	4,55±0,20 ^b
PEPV15	116,80±4,40 ^a	4,68±0,11 ^b
PEPV16	121,03±5,84 ^a	4,92±0,14 ^a

Los resultados del análisis químico mineral de la parte aérea de la lechuga se muestran en la Tabla 30. En el caso del nitrógeno se observaron incrementos significativos del 50% en las lechugas inoculadas con la cepa PEPV15 y del 43% en las inoculadas con la cepa PEPV16, frente al control sin inocular. Estos valores son muy llamativos en el caso de la cepa PEPV16, teniendo en cuenta que *Rhizobium* no es un género fijador de nitrógeno y, probablemente, son debidos a una mayor captación de este elemento por las plantas. En el caso del P, los incrementos en ambas inoculaciones con respecto al control también fueron estadísticamente significativos y en este caso podrían estar relacionados con la capacidad de las dos cepas para solubilizar fosfato bi y tricálcico. En el caso del K, con respecto a las plantas control, se obtuvieron valores más altos en las sometidas a la inoculación con la cepa PEPV15 y más bajos en las tratadas con la cepa PEPV16. Finalmente, el contenido en iones Fe y Mg se incrementó significativamente en ambos tratamientos de inoculación.

Tabla 30. Análisis elemental de la parte aérea de las lechugas en el ensayo de microcosmos.

Elemento	Control	PEPV15	PEPV16
N (%)	3,43±0,05 ^b	5,30±0,06 ^a	4,93±0,35 ^a
P (%)	0,79±0,01 ^b	0,95±0,01 ^a	0,93±0,03 ^a
K (%)	7,41±0,09 ^b	7,72±0,06 ^a	7,20±0,89 ^{ab}
Mg (%)	0,29±0,01 ^b	0,30±0,03 ^a	0,31±0,06 ^a
Ca (%)	0,71±0,06 ^a	0,61±0,01 ^b	0,67±0,03 ^a
Fe (mg/kg)	67,66±2,11 ^b	80,64±1,92 ^a	83,36±5,15 ^a

En otros cultivos hortícolas de hoja como el repollo, la aplicación de *B. megaterium* y *P. agglomerans* es capaz de mejorar la producción e incrementar la absorción de todos los elementos analizados como N, P, K, Fe o Mg (Turan et al. 2014). La aplicación de otros géneros como *Azospirillum* sobre este mismo cultivo es capaz de mejorar la absorción de nutrientes como Fe y Mg (Upadhyay et al. 2012). También se han observado mejoras en el perfil elemental en rúcula debido a la aplicación de *Rhizobium*, con incrementos en P y K (de Souza et al. 2016), por lo que como se ha observado en los datos obtenidos, la utilización de biofertilizantes puede ser una excelente alternativa para mejorar la eficiencia de los cultivos, como la lechuga, en el aprovechamiento de los recursos disponibles.

3.2. Ensayos en zanahoria

En el caso de la zanahoria se estudió la influencia de la inoculación de las dos cepas sobre el desarrollo tanto de la parte aérea como de la parte comestible, la raíz (Tabla 31). Se observó que sólo la inoculación con la cepa PEPV16 producía incrementos estadísticamente significativos sobre el peso de la parte aérea, tanto fresco (5%) como seco (9%). Sin embargo, en el caso de la raíz, la inoculación de ambas cepas produjo un

efecto positivo (Tabla 31). El peso fresco de las raíces de zanahoria se incrementó significativamente cuando se inocularon ambas cepas, un 69% de media con respecto al control sin inocular, cuando se utilizó como inoculante la cepa PEPV15, y un 50% cuando se utilizó la cepa PEPV16. También fueron significativas las diferencias en el peso seco con incrementos del 136% y 113%, respectivamente, para las inoculaciones con las cepas PEPV15 y PEPV16 (Tabla 31). Cabe destacar que las dos cepas analizadas no produjeron un incremento únicamente de la parte comestible de la planta, ya que en otros estudios de biofertilización de zanahoria se ha observado que cepas endófitas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* mostraron tener efecto promotor del crecimiento del sistema radicular pero no de la parte aérea (Surette et al. 2003).

Tabla 31. Resultados de la inoculación en zanahoria en condiciones de microcosmos.

<i>Parte aérea</i>	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
<i>Control</i>	15,06±0,57 ^b	1,96±0,18 ^b
<i>PEPV15</i>	15,08±0,57 ^b	1,97±0,12 ^b
<i>PEPV16</i>	15,96±0,54 ^a	2,14±0,09 ^a
<i>Raíz</i>	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
<i>Control</i>	12,29±1,28 ^b	0,86±0,13 ^b
<i>PEPV15</i>	20,85±1,00 ^a	2,03±0,08 ^a
<i>PEPV16</i>	19,01±1,35 ^a	1,83±0,16 ^a

Los resultados del análisis químico mineral de la zanahoria se muestran en la Tabla 32. Como en el caso de la lechuga, la concentración de nitrógeno se incrementó en respuesta a la inoculación con cualquiera de las dos cepas y al menos en el caso de la cepa de *Rhizobium*, no fijadora en vida libre, este incremento se debe probablemente a una mayor captación de este elemento. Al igual que en el caso de la lechuga, el contenido en P también se incrementó significativamente tras la inoculación con ambas cepas. La concentración de K también se incrementó significativamente con la inoculación de las dos cepas y, al igual que ocurrió en la lechuga, las concentraciones más altas se alcanzaron tras la inoculación con la cepa PEPV15. Los incrementos en la concentración de Ca y Mg también fueron significativos en el caso de la inoculación con ambas cepas, pero el incremento más llamativo se produjo en la concentración de Fe, sobre todo en el caso de las zanahorias procedentes de plantas inoculadas con la cepa PEPV15, que duplicaron su contenido con respecto a las procedentes de las plantas control.

Tabla 32. Análisis elemental de las raíces de las zanahorias en el ensayo de microcosmos

<i>Elemento</i>	Control	PEPV15	PEPV16
N (%)	1,26±0,01 ^b	1,41±0,01 ^a	1,38±0,02 ^a
P (%)	0,39±0,01 ^b	0,48±0,01 ^a	0,44±0,01 ^a
K (%)	1,64±0,01 ^c	2,26±0,05 ^a	1,89±0,01 ^b
Mg (%)	0,08±0,01 ^c	0,11±0,01 ^a	0,19±0,01 ^b
Ca (%)	0,19±0,00 ^b	0,22±0,01 ^a	0,22±0,01 ^a
Fe (mg/kg)	19,9±0,26 ^c	40,21±0,16 ^a	26,17±0,01 ^b

En este caso se ha observado que la inoculación con estas cepas produce una mejora generalizada en la concentración de los elementos al igual que se ha observado en la inoculación de otros cultivos de raíz como el rábano, donde *Azospirillum* y *Bacillus* son capaces de mejorar la concentración de P, K, Mg y Fe (Sotelo et al. 2012). Un incremento en la concentración de N, P y K también se ha observado en la utilización de *Bacillus cereus* y *Achromobacter xyloxidans* en batata (Dawwam et al. 2013). Confirmando que la inoculación de bacterias PGPB son capaces de mejorar la nutrición de la planta a través de una eficiencia en el uso de los nutrientes disponibles.

3.3. Ensayos en fresa

Finalmente se evaluó el efecto de la inoculación de las cepas PEPV15 y PEPV16 sobre el cultivo de fresa, analizándose diferentes parámetros relacionados con la producción de esta planta, tanto en su etapa de propagación (número de estolones por planta y tamaño medio de los mismos), como en su etapa de producción (número de flores por planta, número de frutos por planta y peso medio de los frutos tanto en fresco como en seco) (Tablas 33). En lo que a los parámetros de la fase de propagación se refiere, se observó que ambas cepas producían incrementos estadísticamente significativos en el número de estolones con respecto al control sin inocular, duplicando el número de estolones por planta. Además, el tamaño de estos estolones se veía duplicado también en ambos casos, pasando de un tamaño medio de 44,76 cm en las plantas control a 83,64 cm en las plantas tratadas con PEPV15 y a 71 cm en las plantas inoculadas con PEPV16.

Tabla 33. Resultados de la inoculación en fresa en condiciones de microcosmos

Parámetro	Control	PEPV15	PEPV16
Estolones/planta	2,60±0,47 ^b	4,77±0,32 ^a	4,79±0,46 ^a
Tamaño de los estolones (cm)	44,76±2,12 ^b	83,64±3,29 ^a	71,00±3,85 ^a
Flores/planta	8±1,04 ^b	11±1,09 ^a	11±1,18 ^a
Frutos/planta	2,80±0,25 ^c	4,11±0,504 ^a	3,82±0,42 ^a
Peso medio de los frutos (g)	11,45±0,67 ^b	13,31±0,44 ^a	14,21±0,58 ^a
Peso seco de los frutos (g)	0,89±0,03 ^c	1,01±0,12 ^b	1,40±0,09 ^a

En cuanto al número de flores y frutos por planta se produjeron incrementos significativos también en ambos tratamientos de inoculación con respecto al control. Atendiendo al porcentaje de fruto generado por flor generada, en el caso de las plantas inoculadas con las cepas PEPV15 y PEPV16 se obtuvieron valores que variaron entre el 37% y el 30%, frente al tratamiento control donde este porcentaje se situó en un 25%. Además, las fresas obtenidas a partir de las plantas inoculadas con PEPV15 y PEPV16 produjeron frutos de mayor tamaño, sobre todo en el caso de los procedentes de plantas fertilizadas con la cepa PEPV16, con un peso medio de 14,21 g, seguido de las fertilizadas con la cepa PEPV15, cuyas fresas tenían un peso medio de 13,31 g, frente a

las plantas control cuyos frutos tenían un peso medio de 11,45 g. Por tanto, se puede concluir que la inoculación con *P. endophyticum* PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16 fue capaz de mejorar la productividad de las plantas de fresa en condiciones de microcosmos a través del aumento del peso medio de los frutos y de los frutos por planta. Estos datos coinciden con los de otros estudios en los que se inoculó *Bacillus velezensis* sobre diferentes cultivares de fresa, y se reporta que una inoculación temprana produce efectos positivos sobre la producción en fresa (Palencia et al. 2015). También se ha observado que la aplicación de diferentes biofertilizantes es capaz de mejorar el número de frutos por planta afectando ligeramente al peso de los mismos (Pešaković et al. 2013). Sin embargo, los ensayos únicamente con bacterias son escasos y en muchos casos se basan en la utilización combinada de bacterias y micorrizas u otros hongos (Ingh y Ingh 2006; Bona et al. 2015; Güneş et al. 2009).

Tabla 34. Analisis elemental de los frutos de fresa obtenidos en el ensayo de microcosmos.

Elemento	Control	PEPV15	PEPV16
N (%)	0,94±0,01 ^c	1,15±0,06 ^a	0,99±0,02 ^b
P (%)	0,22±0,01 ^c	0,31±0,06 ^a	0,26±0,01 ^b
K (%)	1,50±0,01 ^c	1,72±0,04 ^a	1,61±0,02 ^b
Mg (%)	0,11±0,01 ^b	0,14±0,01 ^a	0,11±0,01 ^b
Ca (%)	0,10±0,04 ^b	0,19±0,02 ^a	0,10±0,02 ^b
Fe (mg/kg)	18,94±0,04 ^c	24,95±0,19 ^a	21,82±0,01 ^b

Los resultados del análisis químico mineral de las fresas se muestran en la Tabla 34. Como en las dos plantas anteriores, se observó un incremento significativo en la concentración de N cuando las plantas se inocularon con las cepas PEPV15 y PEPV16 con respecto a las plantas control. El contenido en P también se incrementó significativamente en los dos tratamientos de inoculación, como en el caso de la lechuga y zanahoria. El contenido en K y Mg se incrementó también en los dos tratamientos de inoculación, pero en el caso del Mg las diferencias sólo fueron significativas en los frutos de plantas inoculadas con la cepa PEPV15. El Ca sólo se incrementó cuando la inoculación se llevó a cabo con esta cepa y el Fe nuevamente se incrementó significativamente en los dos tratamientos de inoculación. Cambios similares se han observado en la inoculación de bacterias PGPB como *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Agrobacterium*, *Bacillus* y *Pantoea*, que además de mejorar la capacidad productiva de las plantas producían un incremento en la concentración de macro y micronutrientes en los frutos de fresa (Ipek et al. 2014)

Considerando las tres plantas en conjunto podemos concluir que la inoculación con las cepas *R. laguerreae* PEPV16 y *P. endophyticum* PEPV15 incrementó el rendimiento de lechuga, zanahoria y fresa y además su contenido en la mayoría de los minerales analizados. Cabe destacar los incrementos en N que se produjeron también cuando las plantas fueron inoculadas con cepas de *Rhizobium*, una bacteria que no fija nitrógeno en vida libre, en cuyo caso el incremento puede estar ligado a una mayor captación de este elemento debida a una mejora del sistema radicular de los cultivos, alcanzando un mayor volumen eficaz de suelo, como se ha descrito para otras cepas del género *Rhizobium* (Bhattacharjee et al. 2011), lo que permite aprovechar de manera más

eficiente los recursos (Anon 2015). En el caso del P, ambas cepas solubilizaron fosfato, aunque la cepa PEPV15 mostró mayor actividad y esto se refleja en el contenido de P en planta. Teniendo en cuenta que este elemento es esencial para la nutrición vegetal, se presenta en formas no disponibles para las plantas y su aporte en forma de fertilización química no siempre soluciona el problema (Kaur y Reddy 2015), la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfato como biofertilizantes son una excelente alternativa a la fertilización química con P. En cuanto al resto de nutrientes, también la fertilización con las dos cepas utilizadas ha promovido su captación, especialmente en el caso del Fe que puede estar relacionada con la producción de sideróforos por las dos cepas inoculadas o simplemente por una mayor captación de este elemento al igual que parece ocurrir en el caso del nitrógeno.

Capítulo V

El mantenimiento de la productividad agrícola sin comprometer la integridad de los sistemas naturales y la salud humana es una cuestión fundamental que marca las directivas europeas y las líneas directrices de la agricultura del siglo XXI (Kollas et al. 2015). A este respecto, la utilización de biofertilizantes puede jugar un papel fundamental en la modernización de los sistemas productivos a través de la inclusión de una tecnología respetuosa con el medio ambiente, capaz de reducir la aplicación de insumos y mejorar la eficacia de los cultivos mediante una mejora de los recursos disponibles (Bhattacharyya y Jha 2012). Esta tecnología precisa de la búsqueda de nuevos biofertilizantes capaces de mejorar la producción en diferentes cultivos mediante el diseño de biofertilizantes multifuncionales (Gupta et al. 2015). En nuestro caso hemos observado cómo los inoculantes seleccionados, tanto para cultivos hortofrutícolas como para los sistemas de leguminosa-cereal, producían un incremento de producción en los ensayos de microcosmos, mejorando a su vez la capacidad de los cultivos estudiados para aprovechar los nutrientes disponibles en el sustrato. A continuación, se van a presentar los resultados obtenidos tras la inoculación con cepas seleccionadas en este estudio en condiciones de campo.

1. Ensayos en lechuga

Los cultivos de hoja presentan una gran demanda por el consumidor debido a los beneficios para la salud que supone su consumo y, entre ellos, la lechuga es el cultivo de hoja que presenta una mayor producción a nivel mundial situada en torno a unos 22,5 millones de toneladas al año (FAOSTAT, 2011). Esta hortaliza presenta especial relevancia en la cuenca mediterránea donde las condiciones climáticas posibilitan la realización de varias series de cultivo anuales, en función de la latitud, permitiendo su exportación a otros países del norte de Europa donde el rendimiento es menor y, debido a su latitud, presenta restricciones estacionales severas (Fusi et al. 2016; Foteinis y Chatzisyneon 2016). Debido a su situación geográfica, el cultivo de lechuga en España presenta una alta rentabilidad y la demanda europea permite que grandes áreas se dediquen al cultivo de esta hortícola tanto en sistemas al aire libre como en cultivos bajo plástico (Romero-Gámez et al. 2014). En el año 2015, se produjeron unas 957.000 toneladas de lechuga en España, de las que más de la mitad se dedicó a la exportación fruto de la coyuntura geográfica ya mencionada (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016). Debido a los sistemas productivos de alto rendimiento, el cultivo de lechuga ha estado asociado a la utilización indebida de abonos nitrogenados con el fin de mantener la producción, por lo que la Unión Europea ha regulado estrictamente la concentración de nitratos presentes en este cultivo con el fin de evitar problemas de salud pública (Reglamento EC1881/2006). En este escenario, la utilización de biofertilizantes puede ser una alternativa sumamente eficaz para incrementar la producción de lechuga de una manera sostenible y reducir su impacto ambiental (Foteinis y Chatzisyneon 2016).

Los ensayos de campo se llevaron a cabo en condiciones de regadío en una finca de la localidad de Ciudad Rodrigo (Salamanca) inoculando las mismas cepas utilizadas en los ensayos de microcosmos, PEPV15 y PEPV16, y los resultados obtenidos se

muestran en la tabla 35. De acuerdo con estos resultados ambos tratamientos condujeron a una mejora significativa en la producción de lechuga por hectárea (Tabla 35), siendo el tratamiento con la cepa *R. laguerreae* PEPV16 el que generaba los mejores resultados, con incrementos significativos del 18% con respecto del control sin inocular y del 8% con respecto del tratamiento con la cepa *P. endophyticum* PEPV15 (Fig. 83 b y d). A su vez, el tratamiento con esta última cepa también produjo incrementos significativos con respecto del control negativo sin inocular, mejorando la producción un 9%. Estas cifras son importantes ya que permitirían aumentar la producción de lechuga de forma considerable o bien la recolección en fases más tempranas sin reducir la eficiencia del cultivo, permitiendo a su vez la realización de varios ciclos de cultivo.



Figura 83. a) Fotografía del ensayo de campo, b) aspecto general de las lechugas a mitad del ciclo de cultivo c) lechugas procedentes de plantas control (izq) e inoculadas con PEPV15 (drcha.), d) lechugas procedentes de plantas control (izq) e inoculadas con PEPV16 (drcha.).

Los valores de peso fresco mostraron algunas diferencias con respecto al peso seco, ya que si bien los primeros mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con ambas cepas, los del peso seco no. Puesto que ambas medidas se hicieron en las mismas condiciones, esto se debe a que las plantas inoculadas con la PEPV15 pueden tener menor porcentaje de agua. En ambos tratamientos se encontraron incrementos significativos en los dos parámetros con respecto al control sin inocular. Estos datos muestran que la inoculación de ambos tratamientos podría incrementar la rentabilidad del cultivo ya que la producción pasó de 25.520 kg/ha en los cultivos sin fertilizar a 27.880 kg/ha en los fertilizados con *P. endophyticum* PEPV15, y a 30.020 kg/ha en los fertilizados con *R. laguerreae* PEPV16. Existen estudios que han demostrado la utilidad de la inoculación de *Rhizobium* en cultivos de lechuga no hay

datos en ensayos de campo (Chabot et al. 1996). La biofertilización con otras bacterias como *Pseudomonas* ha mostrado una mejora en la producción de la lechuga de entre el 6 y el 8%, valores similares a los observados en el tratamiento con *Phyllobacterium*, pero inferiores a los obtenidos con *Rhizobium* (Chamangasht et al. 2012). Sin embargo, otros estudio más amplios indican que el género *Pseudomonas* puede generar incrementos de hasta el 30% en la productividad de esta hortícola (Cipriano et al. 2016).

Tabla 35. Resultados obtenidos en el ensayo de campo para lechuga

Tratamiento	Peso fresco (Kg)/ planta	Peso seco (g)/ planta	Producción (kg/ha)
Control	1,28±0,02 ^c	76,64±2,334 ^a	25520±460 ^c
PEPV15	1,40±0,03 ^a	95,52±6,162 ^a	27880±700 ^a
PEPV16	1,50±0,03 ^a	97,23±5,709 ^a	30020±640 ^a

Los resultados del análisis químico mineral de la parte aérea de la lechuga se muestran en la Tabla 36. En el caso del nitrógeno no se observaron diferencias entre ninguno de los tratamientos, sin embargo, las lechugas inoculadas con la cepa PEPV16 presentaban un incremento significativo en el resto de elementos analizados con respecto al tratamiento control. La cepa PEPV15 sólo mostró incrementos significativos en el contenido en P con respecto al tratamiento control y una tendencia a incrementar el contenido en Fe. Es destacable que ambas cepas presentan capacidad para solubilizar fosfato y movilizar fósforo a la planta, lo que permitiría reducir el aporte de abonos fosforados, mejorando la rentabilidad del cultivo, como se ha observado para otros biofertilizantes solubilizadores de fosfato (Turan et al. 2014). Los incrementos del rendimiento pueden estar ligados a una mejor actividad fotosintética debido a una mayor concentración de magnesio, imprescindible para la síntesis de clorofila, además de ser cofactor de múltiples enzimas (Farhat et al. 2015).

Tabla 36. Resultados del análisis elemental de la lechuga en ensayos en condiciones de campo

Elemento	Control	PEPV15	PEPV16
N (%)	3,41±0,08 ^a	3,43±0,10 ^a	3,59±0,10 ^a
P (%)	0,37±0,01 ^a	0,42±0,02 ^a	0,43±0,01 ^a
K (%)	5,00±0,08 ^a	5,22±0,18 ^a	5,61±0,14 ^a
Mg (%)	0,30±0,01 ^a	0,29±0,01 ^a	0,34±0,01 ^a
Ca (%)	0,96±0,04 ^a	0,99±0,01 ^a	1,22±0,04 ^a
Fe (mg/kg)	690,11±42,08 ^a	722,34±50,47 ^{ab}	743,30±49,81 ^a

2. Ensayos en zanahoria

La zanahoria es un cultivo hortícola sumamente apreciado debido a su contenido en carbohidratos y a su alta concentración de α y β -carotenos precursores de la vitamina A, que hacen que sea cultivada en numerosas regiones del planeta (Turner et al. 2017). España destaca por presentar una producción de más de 400.000 toneladas anuales, en su mayoría destinadas a cultivo en fresco, por lo que la seguridad alimentaria es una cuestión prioritaria en este cultivo. La zanahoria presenta dos centros de producción importantes en España, Castilla y León y Andalucía, que aglutinan el 85% de la producción nacional (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016). Aunque la variedad silvestre de esta especie es ubicua en el continente europeo, las variedades cultivables precisan de suelos arenosos o franco arenosos, bien drenados para un correcto desarrollo del sistema radicular que es la parte consumible, para evitar bifurcaciones y anomalías (Reid y Gillespie 2017). Estas condiciones se dan en ciertas zonas del centro de la submeseta norte de España que como ocurre con la comarca de Tierra de Pinares en Valladolid, por lo que se llevó a cabo el ensayo de campo en las zonas de producción de zanahoria bajo la tutela de agricultores especializados (Fig. 84 a).

Al igual que en microcosmos, los efectos de la inoculación se evaluaron tanto en la parte aérea como en las raíces que, en cualquier caso, al constituir la parte de interés comercial fueron el objeto final del estudio. Los resultados obtenidos (Tabla 37). mostraron que los dos tratamientos de inoculación con las cepas PEPV15 y PEPV16 ejercieron efectos positivos sobre todos los parámetros estudiados. La inoculación con la cepa de *Phyllobacterium* PEPV15 mejoró el peso fresco de la parte aérea (20%) y de la raíz (41%), el peso seco de la parte aérea (13%) y raíz (18%), así como la longitud (21%), perímetro (11%) y diámetro (16%) de las raíces con respecto a las plantas del tratamiento control (Fig. 84 b). A su vez, la inoculación de la cepa de *R. laguerreae* PEPV16 mostró incrementos similares a la cepa anterior en peso fresco y seco, longitud y diámetro de la raíz, y ligeramente superiores en el peso fresco y seco de la parte aérea, y el diámetro de la raíz (Fig. 84). Es destacable, que los valores medios de los pesos frescos de la raíz se incrementaron en un 40% en ambos tratamientos, resultados muy significativos en condiciones de campo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios para bacterias de diferentes géneros endófitos de zanahoria que mostraron que el principal efecto se produce sobre la raíz, con una promoción del crecimiento mucho mayor que sobre la parte aérea (Surette et al. 2003). El género *Bacillus* se ha utilizado como biofertilizante de zanahoria, incluyendo productos comerciales basados en cepas de este género, observándose incrementos más discretos, en torno a un 20%, que distan mucho del 40% que se ha obtenido con la inoculación de las cepas de este estudio (Meng et al. 2016; Clemente et al. 2016).



Figura 84. a) Ensayo de campo de zanahoria b) zanahorias procedentes de plantas control (izq) e inoculadas con PEPV15 (drcha.), d) zanahorias procedentes de plantas control (izq) e inoculadas con PEPV16 (drcha.)..

Tabla 37. Resultados del ensayo de campo para zanahoria

Tratamiento	Peso fresco aérea (g)/ planta	Peso fresco raíz (g)	Longitud raíz (cm)	Perímetro raíz (cm)	Diámetro (cm)	Peso seco aérea (g)/ planta	Peso seco raíz (g)	Rendimiento (kg/ha)
Control	12,22± 0,68 ^a	52,66± 3,54 ^a	13,94± 0,57 ^a	8,08± 0,18 ^a	2,38± 0,06 ^a	2,53± 0,15 ^a	6,54± 0,10 ^a	63546±299 ^c
PEPV15	14,62± 1,04 ^a	74,09± 6,39 ^a	16,94± 0,56 ^a	8,99± 0,26 ^a	2,76± 0,09 ^a	2,88± 0,04 ^a	7,71± 0,23 ^a	77128±191 ^a
PEPV16	16,23± 1,13 ^a	72,98± 4,12 ^a	16,83± 0,38 ^a	9,23± 0,25 ^a	2,84± 0,66 ^a	2,96± 0,10 ^a	7,53± 0,17 ^a	70401±204 ^b

Estos resultados se tradujeron a su vez en una mejora de la producción de zanahoria por hectárea, en la que el tratamiento control produjo 63.546 kg/ha, valores cercanos a las producciones medias anuales en la zona de producción donde se ubicó el ensayo. Sin embargo, los tratamientos inoculados con las cepas PEPV15 y PEPV16 presentaban un incremento destacable en la producción del 21 y el 11%, respectivamente. Estos datos indican que la utilización de estos microorganismos como biofertilizantes son una buena alternativa para la rentabilización de los cultivos de

zanahoria. Estos datos mejoran los observados cuando se utilizaron microorganismos fijadores de nitrógeno en vida libre como *Azotobacter*, incluso aplicándolos junto con formulaciones comerciales de micronutrientes en los que se observaron incrementos entre el 4% y el 10% (Zdravkovska et al. 2016). Se observó, además, que las incidencias de malformaciones y coloraciones verdes o violáceas en el cuello de la raíz era mucho menor en las zanahorias procedentes de los tratamientos inoculados con las dos cepas del estudio. En el caso de las plantas del tratamiento control, entre el 6% y el 8% de las zanahorias recolectadas presentaron malformaciones, como por ejemplo desviaciones o ahorquillamientos, reduciéndose a un 1-2% en el tratamiento con *P. endophyticum* PEPV15 y a un 2-3% en el caso del tratamiento con *R. laguerreae* PEPV16. La aparición de coloraciones en el cuello de la raíz es un parámetro que reduce la calidad del producto (Comisión Europea 1999) y la incidencia de este tipo de patología se vio reducida desde un 17% en el tratamiento control hasta un 12% en el tratamiento con *P. endophyticum* PEPV15, y un 13% en el tratamiento con *R. laguerreae* PEPV16.

Además, en el caso de la zanahoria existe legislación europea que regula su comercialización, quedando establecida la clasificación por tamaños para su venta, así como aquellos parámetros que hacen a las zanahorias no aptas para la comercialización, en el reglamento CE 730/1999 (CE 1999). Atendiendo a los valores de dicho reglamento, las zanahorias se clasifican en función de su tamaño, forma y coloración en categorías extra, I y II. En la figura 85 se muestra la clasificación de las zanahorias obtenidas en cada una de estas categorías. En este gráfico se puede observar cómo la inoculación con ambos tratamientos reduce el porcentaje de zanahorias no comercializables por tamaño, forma o coloración con respecto al control. También se puede observar cómo la inoculación de ambas cepas incrementa la proporción de zanahorias que pueden clasificarse como categoría Extra. Por lo tanto, la inoculación con las cepas PEPV15 y PEPV16 no sólo es capaz de mejorar la producción por hectárea, sino la calidad de ésta, como se ha observado con la utilización de abonos orgánicos capaces de suplir las demandas nutricionales por la presencia de elementos en formas químicas disponibles (Mbatha et al. 2014). La utilización de diferentes cepas del género *Bacillus* ha demostrado también tener buenos resultados en la mejora de la producción aunque los resultados dependieron del tipo de suelo (Clemente et al. 2016).

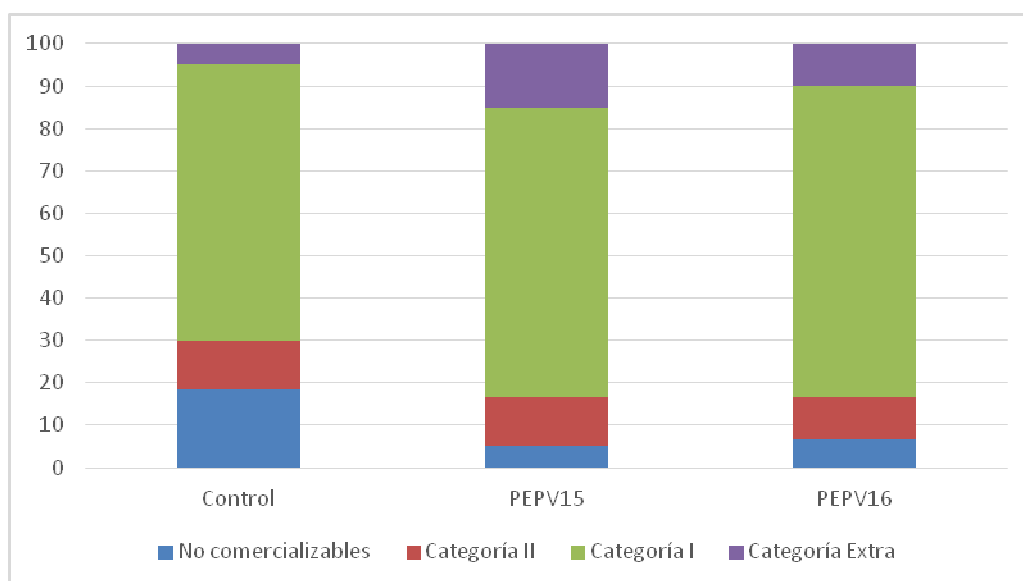


Figura 85. Clasificación por calibres sobre el total de cada tratamiento de las zanahorias obtenidas en el ensayo de campo.

El análisis químico mineral se llevó a cabo sólo en las raíces, ya que es la parte comestible de la zanahoria por el hombre, y los resultados mostraron que en las raíces procedentes de ambos tratamientos se produjo un incremento significativo en los porcentajes de N, P, Mg y Ca con respecto a las procedentes del control, no obstante, el tratamiento con la cepa de *Rhizobium* PEPV16 presentó los mejores resultados para N, P y Mg (Tabla 38). Sin embargo, en el caso del K fue la cepa PEPV15 la que produjo mayores incrementos. En caso del Fe se obtuvieron incrementos significativos con respecto al control en las zanahorias procedentes de las plantas inoculadas con la cepa PEPV16, mientras que en las inoculadas con la cepa PEPV15 se observó una disminución significativa de este elemento. Es destacable en este caso que, al igual que ocurrió en la lechuga, se observó un incremento de P, que puede deberse a que ambas cepas solubilizan fosfato. En otros estudios se ha demostrado que la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfato tiene un efecto positivo sobre la producción de zanahoria, coincidiendo con los resultados de este estudio, y se ha demostrado incluso que su efecto puede suponer un ahorro en la aplicación de insumos tanto inorgánicos como orgánicos (Sarma et al. 2015).

Tabla 38. Resultados de las zanahorias obtenidas en el ensayo de campo.

Elemento	Control	PEPV15	PEPV16
N (%)	1,00±0,03 ^c	1,11±0,008 ^a	1,17±0,05 ^a
P (%)	0,22±0,01 ^c	0,25±0,003 ^a	0,27±0,01 ^a
K (%)	2,40±0,05 ^c	3,150±0,028 ^a	2,70±0,02 ^a
Mg (%)	0,11±0,01 ^c	0,126±0,001 ^a	0,14±0,01 ^a
Ca (%)	0,28±0,01 ^a	0,333±0,004 ^a	0,33±0,01 ^a
Fe (mg/kg)	90,99±1,70 ^a	77,64±4,76 ^c	116,12±11,21 ^a

3. Ensayo en fresa

El cultivo de frutos rojos ha tenido un importante auge en los últimos años debido a los beneficios que su consumo implica para la salud (Giampieri et al. 2015), y entre de ellos la fresa, es posiblemente el que mayor interés ha suscitado debido a la extensión que ocupa su cultivo y la facilidad de producción cuando las condiciones son óptimas (Kyeom et al. 2015). Además, su consumo se ha popularizado debido al bajo precio en comparación con otros cultivos de bayas como el arándano o la frambuesa (denominados frutos rojos) considerados alimentos funcionales. La posibilidad de comercialización durante grandes periodos a lo largo del año también ha ayudado a popularizar su comercio y exportación. El periodo productivo en el sur peninsular abarca desde diciembre hasta finales de abril o mayo en la provincia de Huelva, en la que se realizaron estos ensayos (Fig. 86).

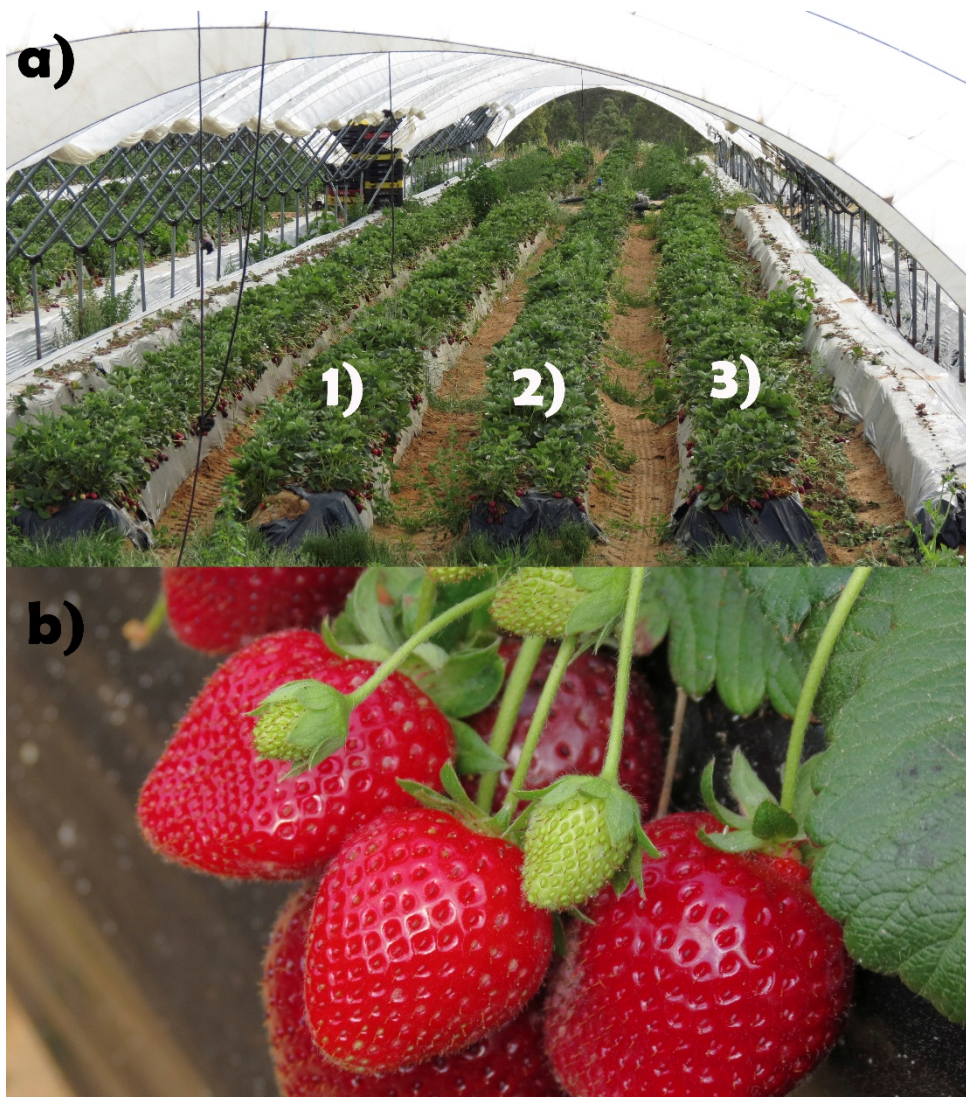


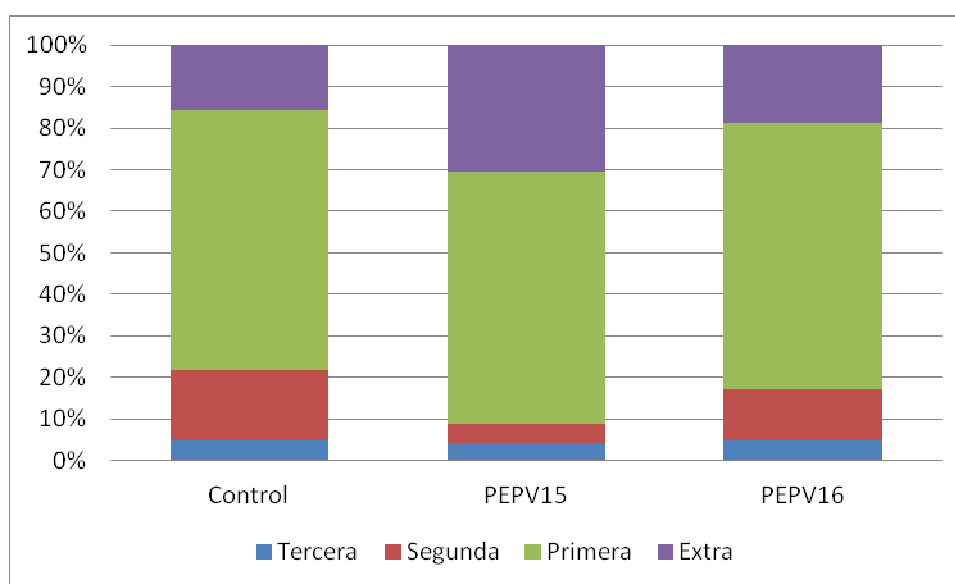
Figura 86. a) Cultivo de fresa donde se indican los caballones inoculados con 1) PEPV15, 2) Control y 3) PEPV16; b) ejemplo de fresas en estado óptimo de recolección.

La producción de los cultivos de fresa se evaluó analizando el peso fresco y seco de los frutos (Tabla 39), así como el calibre de éstos (Fig. 87). Los resultados de peso fresco y seco de los frutos mostraron que el tratamiento con *P. endophyticum* PEPV15 producía incrementos con respecto del tratamiento con *R. laguerreae* PEPV16 y el tratamiento control. Aunque las diferencias no fueron significativas, las plantas inoculadas con la cepa *R. laguerreae* PEPV16 también produjeron frutos con pesos frescos y secos superiores al tratamiento control.

Tabla 39. Pesos medios de los frutos de fresa obtenidos en el ensayo de campo.

Tratamiento	Peso fresco	Peso seco
Control	24,72±1,39 ^a	1,82±0,08 ^a
PEPV15	27,82±1,29 ^a	2,17±0,11 ^a
PEPV16	25,65±1,42 ^a	2,07±0,09 ^a

La distribución por calibre se muestra en la figura 87, en la que se puede observar que las plantas inoculadas con *P. endophyticum* PEPV15 producen frutos de mayor tamaño y con un calibre superior al resto de tratamientos, siendo los frutos de la categoría extra un 30% del total, frente al 19% en el tratamiento con *R. laguerreae* PEPV16 y un 14% en el tratamiento control. Aunque la proporción de frutos de primera categoría se mantiene entre los distintos tratamientos, la proporción de frutos de categorías inferiores, segunda y tercera, varió considerablemente entre tratamientos. De esta manera, la aplicación de ambos biofertilizantes no sólo mejoró la producción, sino la rentabilidad de la misma de cara al agricultor mejorando el valor potencial del



producto en el mercado.

Figura 87. Clasificación por calibres sobre el total de cada tratamiento de las fresas obtenidas en el ensayo de campo.

El análisis químico mineral de las fresas mostró que existía una gran homogeneidad entre tratamientos salvo en el caso del P y el Fe que presentaron incrementos significativos frente al control para los dos tratamientos de inoculación (Tabla 40). A pesar de que todos los elementos minerales se proveen a la planta en cantidades suficientes mediante fertirrigación, que incluye P soluble, llama la atención los incrementos en P, que sugieren que es posible que los mecanismos de transporte y captación de fósforo localizados en el genoma de ambas cepas puedan tener influencia en la nutrición de la planta, mejorando la dinámica de captación en el suelo. Eso es explicable por el mantenimiento de este nutriente en formas químicas solubles o retenidas en forma de fósforo orgánico, ya que a pesar de utilizar formas solubles de este nutriente en los sistemas de abonado, la dinámica edáfica determina que gran parte del fósforo se inmovilice en formas químicas poco asequibles (Weihrauch y Opp 2018). En el caso del Fe también ambas cepas mostraron tener mecanismos de captación de este elemento tanto *in vitro* como *in silico*, por lo que su quelación y posterior traslocación o aprovechamiento por parte de la planta podría explicar las diferencias observadas. En otros estudios se ha encontrado que la inoculación de *Bacillus* y *Pseudomonas*, conduce a una mejora en la composición elemental de los frutos de fresa en condiciones de campo, aumentando la concentración de fósforo y hierro, pero las condiciones de cultivo no son comparables ya que en el caso de estas bacterias, el cultivo se llevó a cabo empleando abonado orgánico (Esitken et al. 2010).

Tabla 40. Análisis elemental de los frutos de fresa obtenidos en el ensayo de campo.

Elemento	Control	PEPV15	PEPV16
N (%)	1,39±0,07 ^a	1,38±0,01 ^a	1,39±0,02 ^a
P (%)	0,39±0,02 ^a	0,41±0,01 ^a	0,41±0,02 ^a
K (%)	1,77±0,02 ^a	1,77±0,08 ^a	1,80±0,123 ^a
Mg (%)	0,14±0,01 ^a	0,14±0,01 ^a	0,143±0,01 ^a
Ca (%)	0,16±0,01 ^a	0,16±0,01 ^a	0,163±0,01 ^a
Fe (mg/kg)	33,87±3,75 ^a	37,49±0,77 ^a	39,02±3,38 ^a

4. Ensayo en guisante

El cultivo extensivo de guisante tanto en condiciones de regadío como de secano se encuentra en auge tanto en Castilla y León como en otras regiones clásicamente cerealistas del interior peninsular, donde las exigencias de la Política Agraria Comunitaria precisan de la incorporación de leguminosas y otros cultivos mejoradores a las rotaciones de cultivos para incorporar al pago de las ayudas la fracción por el denominado *greening*. La utilización de guisante u otra leguminosa permite aportar hasta 100 kg de nitrógeno por hectárea al suelo, disponiéndolo para el cultivo de la

siguiente anualidad, lo que, unido al precio de venta, hace que la utilización de esta leguminosa sea cada vez más frecuente en los sistemas de rotación con cereal (Sainju et al. 2016). Por ello, en este estudio los ensayos de campo se llevaron a cabo en guisante y maíz, que se pueden utilizar en rotación de cultivo en zonas de regadío abundantes en la provincia de León, y utilizando como inoculantes las dos cepas que mostraron mayor eficacia en los ensayos en microcosmos en estas mismas plantas, *R. laguerreae* AMPS34 y *B. simplex* AMPSE14.

En el caso del guisante se analizaron una serie de parámetros cuyos resultados se muestran en la (Tabla 41). El primer parámetro analizado fue el número de vainas en 10 plantas que mostró que el tratamiento combinado entre *R. laguerreae* AMPS34 y *B. simplex* AMPSE14 producía los mejores resultados, 40 vainas, y mostró diferencias significativas con el resto de tratamientos. Las inoculaciones simples con cada una de las dos cepas presentaron resultados similares, entre 30 y 32 vainas, seguidos del control positivo con 21 vainas y del control negativo con 18 vainas por cada 10 plantas.

Tabla 41. Resultados del ensayo de campo de campo en guisante.

Tratamiento	vainas en 10 plantas	Nº de semillas por vaina	Rendimiento de grano (kg/ha)	Peso de grano seco (kg/m ²)	Índice de cosecha
Control sin N	18,50±0,51 ^d	3,67±0,21 ^a	1740,14±72,74 ^d	164,01±7,34 ^d	0,305±0,013 ^a
Control con N	21,33±0,33 ^c	5,31±0,32 ^a	2494,15±73,48 ^a	219,01±12,51 ^c	0,294±0,012 ^a
AMPS34	30,01±2,12 ^a	5,32±0,61 ^a	2738,55±36,08 ^a	268,85±1,39 ^a	0,298±0,009 ^a
AMPSE14	32,47±3,15 ^a	5,27±0,42 ^a	2204,17±13,55 ^c	204,42±3,59 ^c	0,295±0,017 ^a
AMPS34+AMPSE14	40,67±3,18 ^a	5,33±0,37 ^a	2490,29±54,47 ^a	238,69±6,84 ^a	0,304±0,011 ^a

Las vainas de las plantas en todos los tratamientos de inoculación contenían un número similar de semillas, en torno a 5, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas, ni con respecto al control positivo. Sin embargo, todos estos tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo donde se produjo una merma en el número de semillas por vaina pasando de una media de 5 a algo menos de 4 semillas (Tabla 41).

En cuanto a los parámetros que analizan directamente el impacto de los diferentes tratamientos sobre la productividad del cultivo, se observó que el tratamiento con *R. laguerreae* AMPS34 presentaba los mejores resultados con una producción de grano de 2738,55 kg/ha, siendo significativamente superior al rendimiento de todos los tratamientos, incluyendo al control positivo con nitrógeno. El tratamiento de inoculación simple con *B. simplex* AMPSE14 sólo fue significativamente superior al del control sin nitrógeno con un rendimiento de 2204 kg/ha, lo que supone una reducción del 25% con respecto al tratamiento con *R. laguerreae* AMPS34. Es destacable que la adición de la cepa de *Rhizobium* a la de *Bacillus* implicó una recuperación del rendimiento hasta valores idénticos a los del control positivo con nitrógeno.

También se analizó la producción por metro cuadrado de grano secado en estufa obteniéndose resultados con una tendencia similar, con el tratamiento de inoculación simple con la cepa AMPS34 superando significativamente a todos los demás. También la adición de la cepa de *Rhizobium* a la de *Bacillus* provocó una recuperación del rendimiento. Y en cuanto al índice de cosecha, que relaciona el rendimiento del cultivo con la producción de biomasa aérea, de modo que valores más bajos indican menor producción de la parte aprovechable frente a una mayor producción de biomasa aérea, aunque aparecían ligeras diferencias, no fueron estadísticamente significativas por lo que podemos afirmar que mejoras en el rendimiento se deben a un efecto sobre la planta en su conjunto.

El análisis químico mineral se realizó sobre la parte comestible de este cultivo, la semilla, y los resultados se recogen en la tabla 42. Se encontraron diferencias significativas con respecto a todos los demás, en el porcentaje de N en el tratamiento combinado entre AMPS34 y AMPSE14 que presentó fue el más elevado con un 4,912%. Se observó también que la inoculación simple con *R. laguerreae* AMPS34 presentó el mismo porcentaje que el control positivo, a pesar de haber mejorado el rendimiento por hectárea. El tratamiento con la AMPSE14 mejoró el porcentaje de N del control negativo, pero con diferencias no significativas. El porcentaje de P y K más alto se encontró en las semillas del control positivo y del tratamiento combinado de ambas cepas, con diferencias significativas con respecto al resto de tratamientos, aunque estas diferencias fueron discretas. La inoculación combinada de ambas cepas también originó los mejores valores en la concentración de Ca y Fe y en el caso del Mg la combinación de cepas originó los mismos resultados que la inoculación simple con *R. laguerreae* AMPS34.

Tabla 42. Resultados de los guisantes obtenidos en el ensayo de campo.

Elemento	Control sin N	Control con N	AMPS34	AMPSE14	AMPS34+AMPSE14
N (%)	4,56±0,09 ^c	4,76±0,14 ^a	4,80±0,08 ^a	4,67±0,15 ^{bc}	4,91±0,08 ^a
P (%)	0,68±0,01 ^c	0,75±0,01 ^a	0,69±0,01 ^c	0,70±0,01 ^a	0,77±0,05 ^a
K (%)	0,79±0,01 ^a	0,81±0,01 ^a	0,75±0,02 ^a	0,78±0,02 ^a	0,81±0,01 ^a
Mg (%)	0,11±0,01 ^a	0,12±0,01 ^a	0,12±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	0,12±0,01 ^a
Ca (%)	0,09±0,01 ^c	0,10±0,0083 ^c	0,11±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	0,12±0,01 ^a
Fe (mg/kg)	55,15±1,34 ^a	52,45±1,86 ^a	55,93±0,62 ^a	53,27±2,99 ^a	59,82±2,51 ^a

Todos los datos obtenidos indican que el factor determinante en la mejora de la producción de guisante es la aplicación de *Rhizobium*, aunque ciertos parámetros como la fijación de nitrógeno pueden verse alterados en la coinoculación con bacterias endófitas, sin embargo, otros estudios ya han mostrado que en leguminosas, como el garbanzo, la inoculación combinada de endófitos y endosimbiontes no siempre produce resultados positivos, siendo el tratamiento con el endosimbionte en solitario el que muestra mejores productividades (Babu et al. 2015).

5. Ensayo en maíz

En este caso se analizó el número de mazorcas por metro cuadrado como indicativo de la productividad de las plantas siendo el tratamiento con AMPS34 el que arrojó mejores resultados, seguido por el tratamiento control con nitrógeno con el que también presentó diferencias estadísticamente significativas (Tabla 43). El rendimiento por hectárea mostró que ninguno de los tratamientos fue capaz de igualar o superar al control positivo con nitrógeno como sí se había observado en el caso del guisante, reduciéndose la producción en porcentajes en torno al 4% en los tratamientos con AMPS34 y el tratamiento combinado de AMPS34 y AMPSE14. La coinoculación simple de la cepa *B. simplex* AMPSE14 produjo rendimientos similares a los del control negativo. La inoculación simple con *R. laguerreae* AMPS34 produjo un efecto positivo sobre el rendimiento, mejorándolo con respecto al control negativo en un 11%, al igual que ocurrió cuando se combinó con la cepa AMPSE14. También en este caso la adición de *Rhizobium* al inoculante palió los resultados negativos de la inoculación simple con la cepa AMPSE14. Estos resultados apoyan que la biofertilización de maíz con bacterias es un complemento que permite mejorar la eficacia del cultivo (Umesha et al. 2014) y es una alternativa a la fertilización química, aunque la mayoría de las experiencias en maíz se centran en reemplazar la fertilización inorgánica por fertilización orgánica como estiércol o compost (Rusinamhodzi et al. 2013; Adamtey et al. 2016; Agegnehu et al. 2016).

Tabla 43. Resultados del ensayo de campo para maíz.

Tratamiento	Mazorcas/ m ²	Rendimiento grano (kg/ha)	Peso material vegetativo fresco (g/m ²)	Peso material vegetativo seco (g/m ²)	Índice de cosecha
Control sin N	7,91±0,18 ^{cd}	3886,58±45,23 ^c	27,09±0,37 ^a	3,39±0,02 ^a	0,30±0,03 ^a
Control con N	9,07±0,11 ^a	4478,99±12,57 ^a	30,36±0,18 ^a	3,80±0,04 ^a	0,29±0,02 ^a
AMPS34	9,38±0,05 ^a	4343,62±24,97 ^a	27,06±0,02 ^a	3,38±0,06 ^a	0,33±0,03 ^a
AMPSE14	7,75±0,05 ^d	3935,81±14,47 ^c	23,47±0,33 ^c	3,35±0,05 ^a	0,29±0,02 ^a
AMPS34+ AMPSE14	8,27±0,13 ^c	4315,93±90,18 ^a	26,85±0,17 ^a	3,39±0,02 ^a	0,33±0,04 ^a

También se analizó la producción de materia vegetativa, es decir, la parte aérea de las plantas, ya que en una parte del cultivo de maíz se dedica al ensilado, proceso en el que el maíz se cosecha a etapas anteriores al cuajado del grano y se acumula favoreciendo procesos fermentativos para mejorar la digestibilidad y aprovechamiento como forraje (Nevens y Reheul 2001; Crowley et al. 2013). Al igual que los datos obtenidos para el rendimiento de grano, se observó que el control positivo con nitrógeno era el tratamiento que presentó mejores producciones con 30,36 kg/m² en peso fresco y

3,80 en peso seco (Tabla 43). El mejor tratamiento de inoculación fue de nuevo la inoculación simple con la cepa de *Rhizobium* AMPSE34 con diferencias significativas con respecto a la inoculación simple con AMPSE14 en el caso del peso fresco, pero con valores similares a los del control negativo en el peso tanto fresco como seco. En último lugar, y como factor indicativo de la productividad del cultivo, se analizó el índice de cosecha, mostrando que existía una mejora en los tratamientos con AMPS34 sola o combinada con AMPSE14, produciéndose un incremento del índice de cosecha de alrededor del 12%.

El análisis químico mineral del grano producido en el presente experimento mostró que, en el caso del N, los mejores tratamientos fueron la inoculación simple con la cepa AMPS34 y su combinación con la cepa AMPSE14 con diferencias significativas con respecto al resto de tratamientos (Tabla 44). En el caso del P, el mejor tratamiento fue el control positivo con N que superó significativamente al resto de tratamientos que, entre sí, no presentaron diferencias significativas. En el caso del K y del Fe el control positivo presentó los mejores resultados. En el caso del Mg el mejor fue la inoculación simple con AMPSE14 y en el caso del Ca no hubo diferencias entre tratamientos.

Tabla 44. Análisis elemental del maíz cosechado en el ensayo de campo.

Elemento	Control sin N	Control con N	AMPS34	AMPSE14	AMPS34+ AMPSE14
N (%)	1,78±0,06 ^c	1,85±0,03 ^a	1,92±0,01 ^a	1,75±0,08 ^c	1,96±0,19 ^a
P (%)	0,30±0,01 ^a	0,33±0,01 ^a	0,31±0,01 ^a	0,30±0,01 ^a	0,30±0,01 ^a
K (%)	0,27±0,01 ^c	0,32±0,01 ^a	0,28±0,01 ^c	0,23±0,01 ^a	0,27±0,01 ^c
Mg (%)	0,08±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a	0,10±0,001 ^a	0,08±0,01 ^c
Ca (%)	0,01±0,001 ^a	0,01±0,001 ^a	0,01±0,001 ^a	0,01±0,001 ^a	0,01±0,001 ^a
Fe (mg/kg)	16,84±0,43 ^a	17,94±0,49 ^a	16,81±0,16 ^a	16,68±0,78 ^a	15,72±2,13 ^a

En general, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la inoculación con *Rhizobium* es una de las mejores elecciones para biofertilizar maíz, a pesar de que en la bibliografía encontramos múltiples referencias tanto a la inoculación de *Bacillus* solo como en consorcios (Castro et al. 2008; Hassen y Labuschagne 2010; Rojas-Solís et al. 2016). Otros estudios con *Burkholderia* y *Alcaligenes* muestran que la coinoculación no es siempre la mejor opción, pudiendo no suponer una mejora de la producción aunque sí de la composición de minerales (Pande, Pandey, Mehra, et al. 2017). Sin embargo, en experiencias combinando diazotrofos en vida libre con solubilizadores de fosfato, se encontró que mejoraba mucho el rendimiento (Wu et al. 2005; Upadhyay et al. 2012), por ejemplo las combinaciones de *Azospirillum* o *Azotobacter* con *Pseudomonas* muestran una mejora sustancial de la producción en invernadero y campo (Jarak et al. 2012; Beyranvand et al. 2013). También la utilización de estos diazotrofos de vida libre junto con *Rhizobium* es capaz de reducir el efecto del estrés salino sobre la producción de maíz (Fukami et al. 2018), al igual que ocurre con su coinoculación en sistemas de co-cultivo de alubia y maíz (Latati et al. 2016), por lo que la sustitución de alubia por

guisante puede ser una alternativa interesante teniendo en cuenta los resultados de este estudio tanto en guisante como en maíz. Estudios basados en metadatos ratifican la utilidad de estos géneros frente a *Bacillus* o *Enterobacter*, que presentan resultados más discretos principalmente en condiciones de campo (Schmidt y Gaudin 2018).

Discusión general

Aunque la humanidad tiende a un sistema cada vez más urbanizado, la dependencia de los sistemas naturales sigue siendo determinante como fuente de recursos y por lo tanto la agricultura juega un papel fundamental (Specht et al. 2014). Los gobiernos nacionales y supranacionales son conscientes de que el mantenimiento de los sistemas agroecológicos debe ser un pilar de las sociedades y por tanto invierten grandes cantidades en su conservación y la creación de redes sostenibles de producción (Comunidad Europea 2016; Lainez et al. 2018). Sin embargo, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías, o la adaptación de las ya existentes, para conseguir reducir el impacto ambiental de esta actividad sin afectar a su productividad, por lo que el uso de microorganismos como biofertilizantes es una herramienta en auge en los últimos tiempos (Mohammadi & Sohrabi 2012; García-Fraile et al. 2015). El desarrollo de nuevos biofertilizantes debe seguir el principio de bioseguridad evitando la utilización de cualquier microorganismo que suponga un problema para la salud de personas, animales o plantas (Mendes et al. 2013; Jiménez-Gómez et al. 2018). Por ello los *rhizobia* constituyen una de las mejores opciones para el diseño de biofertilizantes ya que, tras años de utilización como inoculantes de leguminosas, no han causado problemas de salud ni medioambientales. Debido a la incapacidad de estas bacterias para fijar nitrógeno atmosférico, se han utilizado consorcios bacterianos con *rhizobia* y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) principalmente cuando su uso está dirigido a cultivos de no leguminosas. La búsqueda de estas otras PGPB se puede realizar en suelo y rizosfera, pero en los últimos años también se ha dirigido al mismo entorno de los *rhizobia*, el nódulo, presuponiendo una buena compatibilidad con estas bacterias, ya que ocupan el mismo nicho, por otra parte tan específico como son los nódulos de las leguminosas. La formación de estos nódulos es un proceso molecularmente dominado por la interacción de los *rhizobia* con la leguminosa, debiendo presentar hospedador y endosimbionte una adecuada compatibilidad genética (Velázquez et al. 2017b).

En lo que se refiere a los *rhizobia*, en este estudio se han aislado a partir de nódulos de dos leguminosas con diferentes orígenes geográficos y centros de distribución. *P. vulgaris* es una leguminosa originaria de América que se distribuyó en Europa a través de España a partir del siglo XVI (Díaz-Alcántara et al. 2014). Cuando *P. vulgaris* llegó a España, otras leguminosas originarias de Oriente Medio, como *P. sativum*, llevaban siglos cultivándose. Estas dos leguminosas, por lo tanto, habían coevolucionado por separado en sus centros de distribución respectivos y tanto las especies como las simbiovariedades que las nodulan son diferentes. No obstante, se trata en todos los casos de cepas de crecimiento rápido de la Familia *Rhizobiaceae* (Velázquez et al. 2017). Cuando *P. vulgaris* llegó a España, su cultivo se extendió por todo el país, pero en determinadas zonas, debido sobre todo a que los suelos eran de secano, nunca se cultivó esta leguminosa, manteniéndose el cultivo de leguminosas locales. Este es el caso de la zona de la Armuña en Salamanca en el que otros cultivos locales, como la lenteja o el garbanzo, son los tradicionales. Por ello, es de gran interés para los estudios de biogeografía de la simbiosis *P. vulgaris-rhizobia* conocer las cepas que nodulan esta leguminosa en ese tipo de regiones en el que su cultivo no ha sido

introducido. Por otra parte, también en situaciones inversas, como es el caso de suelos de regadío en los que el cultivo con leguminosas locales está bien instaurado, como es el caso de *P. sativum* en Valladolid es muy interesante el análisis de los *rhizobia* que establecen simbiosis con esta leguminosa. A partir de nódulos de estas dos leguminosas y en las localizaciones geográficas mencionadas, se aislaron 59 cepas de crecimiento rápido en medio YMA que fueron capaces de reinfectar sus hospedadores respectivos, *Phaseolus vulgaris* y *Pisum sativum*. La mayoría de estas cepas se identificaron a nivel de especie mediante el análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S y de dos genes *housekeeping*, *recA* y *atpD*, cuyas secuencias están accesibles para todas las especies de *rhizobia* de crecimiento rápido en bases de datos públicas. El análisis del gen ribosómico 16S mostró que las cepas pertenecen a un grupo filogenético de *R. leguminosarum*, que es la especie tipo del género *Rhizobium* (Kuykendall et al. 2015), y contiene varias especies con idénticas secuencias del gen ribosómico 16S, *R. indigoferae*, *R. laguerreae*, *R. anhuiense*, *R. sophorae*, *R. acidisoli* y *R. hidalgonense* (Villadas et al. 2017; Yan et al. 2017). Todas estas especies, excepto *R. indigoferae* cuya cepa tipo es muy próxima a la de *R. leguminosarum*, se diferencian entre ellas por las secuencias de los genes *recA* y *atpD* (Villadas et al. 2017) y, por ello, la identificación de los nuevos aislados de este grupo tiene que basarse fundamentalmente en el análisis de estos genes. No obstante, las cepas aisladas en este estudio presentaron ciertas peculiaridades que no se han observado previamente en las cepas tipo de las especies del grupo de *R. leguminosarum*, una de ellas es que aunque algunas cepas mostraron similitudes cercanas al 100% en los dos genes *housekeeping* analizados, algunas de ellas presentaron diferencias a lo largo de la secuencia el gen ribosómico 16S, con la presencia adicional en algunas cepas de un inserto de unos 70 pares de bases al inicio de la secuencia de este gen. Un inserto de este tipo se localizó por primera vez en *R. leucaenae* (Willems & Collins, 1993) y posteriormente en muchas cepas de diferentes géneros y especies del orden Rhizobiales, pero, aunque está colocado siempre en la misma posición en el gen ribosómico 16S, presenta variaciones en la secuencia en diferentes géneros y especies. No obstante, hasta el momento no se puede establecer la utilidad de este tipo de inserto como marcador filogenético en este grupo de bacterias, al contrario de lo que ocurre en el caso de *Faecalibacterium*, en el que se ha propuesto para detectar contaminación fecal en aguas (Duan et al., 2016; Sun et al., 2016). Por otra parte, cepas que presentaron idénticas secuencias en sus genes ribosómicos 16S, presentaron similitudes de alrededor del 97% en los genes *recA* y *atpD*, siendo este hecho muy común en el grupo de *R. leguminosarum* ya que incluso las cepas tipo de varias especies poseen idénticos genes ribosómicos 16S, pero genes *housekeeping* divergentes, En cualquier caso, y a pesar de las diferencias encontradas en los genes ribosómicos 16S y en los genes *recA* y *atpD* en las cepas aisladas en este estudio, todas ellas deben adscribirse a la especie *R. laguerreae*. Esta especie ha sido aislada hasta este momento a partir de nódulos de *Vicia faba* y *Pisum sativum* en distintas regiones del mundo como España, Perú y Túnez (Saïdi et al. 2014), Argelia (Belhadi et al. 2018), China (Xiong et al. 2017) y Marruecos (Taha et al. 2018), sin embargo hasta el momento no se había aislado a partir de nódulos de *P. vulgaris*.

No obstante, los resultados más interesantes, son los obtenidos tras la identificación a nivel de simbiovariedad mediante el análisis del gen simbiótico *nodC*, un gen que ha sido utilizado para la delimitación y descripción de simbiovariedades en todos los grupos de *rhizobia* (Velázquez et al. 2017). De acuerdo con el análisis de este gen, todas las cepas de la especie *R. laguerreae* identificadas hasta el momento y que han sido aisladas a partir de nódulos de leguminosas del grupo de inoculación cruzada de *Vicia* pertenecen a la simbiovariedad *viciae* (Belhadi et al. 2018; Taha et al. 2018; Villadas et al. 2017). Por lo tanto, teniendo en cuenta que *P. sativum* pertenece a este grupo de inoculación cruzada y es un hospedador muy restrictivo, las cepas de este estudio aisladas de nódulos de esta leguminosa portan genes *nodC* característicos de la simbiovariedad *viciae*, si bien tras el análisis de este gen, se comprobó que pertenecen a grupos filogenéticos, entre ellas, y con respecto a las especies cuyas cepas tipo se han aislado originalmente de *P. sativum*, concretamente *R. leguminosarum* y *P. pisi* (Ramírez-Bahena et al. 2008).

Sorprendentemente, el análisis de los genes *nodC* de las cepas aisladas de nódulos de *P. vulgaris* mostró que también estas cepas pertenecían a la simbiovariedad *viciae*, aunque la simbiovariedad *phaseoli* es el endosimbionte más común de esta leguminosa en sus centros de distribución americanos (García-Fraile et al. 2010; Díaz-Alcántara et al. 2014). No obstante, la naturaleza promiscua de *P. vulgaris* le permite ser nodulada por varias simbiovariedades (Peix et al. 2014), lo que le proporciona una gran versatilidad para adaptarse a nuevos ambientes (Servín-Garcidueñas et al. 2014). En el caso de este estudio, le permite nodular con el endosimbionte que establece simbiosis con la lenteja, que es la leguminosa local que se ha cultivado durante siglos en la zona de la Armuña, y cuyo origen geográfico coincide con el de *P. sativum*. Estos resultados son de un gran interés para el conocimiento de la biogeografía de la simbiosis *P. vulgaris-Rhizobium* y plantean la necesidad de ampliar los estudios a otros suelos europeos en los que se cultiven otras leguminosas locales.

Además del estudio de la diversidad de los *rhizobia* que inducen la formación de nódulos en leguminosas, en los últimos años se ha incrementado el interés por identificar a las bacterias que acompañan a los *rhizobia* en los nódulos. Como se ha mencionado anteriormente, no todas las cepas aisladas de nódulos de *P. vulgaris* pertenecían a la especie *R. laguerreae*, aunque todas presentaron colonias típicas de *rhizobia* y crecimiento rápido en YMA. Sin embargo, el análisis de las secuencias del gen ribosómico 16S mostró que una de las cepas, PEPV15, pertenecía al género *Phyllobacterium* (cita on-line del Bergey), un género estrechamente relacionado con los *rhizobia* y que contiene alguna especie capaz de inducir nódulos en leguminosas, como ocurre en el caso de *P. trifolii* aislado a partir de nódulos de trébol en la misma localidad de la que se aislaron las cepas de este estudio (Valverde et al. 2005) y la más recientemente descrita *P. sophorae*, que nodula *Sophora flavescens* en China (Jiao et al. 2015). La cepa PEPV15 aislada en este estudio presentó similitudes inferiores al 99% en la secuencia del gen ribosómico 16S con respecto a las cepas tipo de las especies descritas hasta ese momento en el género *Phyllobacterium* y, después de analizar el gen

atpD, se comprobó que también fue muy divergente a todas ellas. Por ello, se completó el estudio del estatus taxonómico de la cepa con pruebas genéticas, quimiotaxonómicas y fenotípicas para describir la nueva especie a la cual se denominó *Phyllobacterium endophyticum* (Flores-Félix et al. 2013) debido a que la cepa tipo PEPV15 no fue capaz de originar nódulos en *P. vulgaris*, ni se detectó por PCR o el análisis del genoma la presencia del gen *nodC*.

No obstante, el análisis más amplio de bacterias endófitas se llevó a cabo en nódulos de *P. sativum* porque las plantas se recolectaron directamente en el campo y era una leguminosa bien establecida en el suelo de la zona analizada tras años de cultivo. Además, apenas existen estudios acerca de las poblaciones endofíticas de los nódulos de *P. sativum* (Tariq et al. 2014), por lo que el estudio de las mismas en diferentes localizaciones geográficas contribuirá al incremento del conocimiento de este ecosistema. Por otra parte, es esencial la identificación de las bacterias endófitas de plantas, tanto de nódulos como de otros órganos, ya que normalmente estos estudios están encaminados a la selección de cepas con capacidad para promover el crecimiento de las plantas y para poder utilizar una bacteria con esta finalidad es necesario descartar aquéllas potencialmente patógenas para el hombre, plantas y animales (Flores-Félix, Marcos-García, et al. 2015; Alegria Terrazas et al. 2016; Carro & Nouioui 2017).

En este estudio las cepas de bacterias endófitas se aislaron a partir de los mismos nódulos utilizados para aislar las cepas de *rhizobia* y se identificaron mediante el análisis del gen ribosómico 16S porque este gen es actualmente utilizado universalmente para la clasificación e identificación de procariontes (Chun et al. 2018). Los resultados obtenidos tras el análisis de este gen mostró que las cepas aisladas pertenecían a diferentes especies de los géneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Dermacoccus*, *Domibacillus*, *Massilia*, *Paenibacillus*, *Paenisporosarcina*, *Phyllobacterium* y *Terribacillus*. Estos datos confirman que los nódulos de leguminosas contienen una amplia diversidad de bacterias, además de ser una importante fuente de nuevas especies descritas sobre todo en los últimos años (Velázquez et al. 2017 a y b). En el caso de las bacterias endófitas Gram positivas, que fueron las más frecuentemente aisladas, hasta los últimos años no se ha comenzado a incluir en las descripciones de nuevas especies el análisis de algunos genes *housekeeping*, por lo que la identificación a nivel de especie sigue basándose en el análisis del gen ribosómico 16S y se aceptan similitudes intraespecíficas superiores al 99.5%, mientras que valores inferiores corresponden normalmente a especies diferentes. Teniendo en cuenta estos valores, en este estudio predominaron las bacterias Gram positivas del phylum Firmicutes del género *Bacillus*, siendo la más abundante *B. simplex* con 10 cepas, seguida de *Bacillus tequilensis* con cuatro cepas, y, finalmente, *B. aryabhattai* y *B. idriensis* con una cepa cada una y una cepa próxima a *B. simplex* que podría pertenecer a otra especie. Las dos cepas del género *Psychrobacillus* también podrían representar nuevas especies filogenéticamente relacionadas con *Psychrobacillus psychrodurans* y *Psychrobacillus lasiacapiti*, al igual que las dos cepas de *Paenisporosarcina* que podrían pertenecer a una nueva especie filogenéticamente relacionada con *P. quisquiliarum*. Finalmente, se identificaron dentro

de este phylum *Paenibacillus tundrae*, *Terribacillus Paenibacillus tundrae*, *Terribacillus goriensis* y *Oceanobacillus sojae*. La única cepa aislada del phylum Actinobacteria se identificó como *Dermaococcus nishinomiyaensis*. Las cepas Gram negativas pertenecían al phylum Proteobacteria y se identificaron como *Agrobacterium skierniewicense*, 2 cepas, y *Massilia suwonensis*, 4 cepas. Algunos de estos géneros, como *Bacillus* y *Paenibacillus* se han aislado frecuentemente a partir de nódulos de diferentes leguminosas como *Medicago* (Khalifa & Almalki 2015; Lai et al. 2015), *Oxytropis* (Wei et al. 2015; Xu et al. 2014), *Cicer* (Carro et al. 2013), *Caragana* (Xu et al. 2014), *Lupinus* (Carro et al. 2014), *Cytisus*, *Lathyrus*, *Melilotus*, *Ononis* o *Trifolium* (De Meyer et al. 2015).

Uno de los objetivos fundamentales de este estudio ha sido la selección de cepas tanto de *rhizobia* como de bacterias endófitas del nódulo para ser utilizados como biofertilizantes. Para cumplir este objetivo, se comenzó por estudiar varios mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* que se han relacionado en estudios previos con la capacidad de las bacterias para incrementar el desarrollo y el rendimiento de las plantas, entre los que cabría destacar la producción de ácido indol acético y de sideróforos y la solubilización de fosfato (Glick, 2012; Pii et al. 2015; Olanrewaju et al. 2017). El ácido indol acético es una fitohormona sintetizada por numerosas bacterias a través de diversas vías metabólicas (Etesami et al. 2015), habiéndose mostrado como una herramienta esencial de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, ya que influye directamente en el desarrollo de raíces secundarias (Duca et al. 2014). Los sideróforos juegan un papel fundamental en la nutrición tanto del microorganismo como de la planta, a la que permiten una mejor captación de este elemento en condiciones en las que el hierro no está disponible (Chu et al. 2010), en la tolerancia a metales pesados y metaloides tóxicos como el arsénico (Funes Pinter et al. 2017; Wang et al. 2017) y en el control de los patógenos fúngicos en la rizosfera, al disminuir la concentración de hierro disponible (Saha et al. 2016). La solubilización de fosfato ha sido muy estudiado en los últimos tiempos debido a la importancia del fósforo en la nutrición vegetal y los problemas que su déficit ocasiona (Anand et al. 2016; Khan et al. 2014), por lo que la selección de microorganismos con este potencial ha sido uno de los principales pilares en la selección de inoculantes (Zaidi et al. 2017).

Las cepas de *Rhizobium* aisladas en este estudio produjeron distintos niveles de ácido indol acético y en algunas de ellas la producción de sideróforos y solubilización de fosfato fue positiva, resultados que coinciden con los de otros estudios previos para diferentes cepas de *Rhizobium* (García.Fraile et al. 2012). Cabe destacar que estos resultados ya han sido publicados en el caso de las cepas de *Rhizobium* PEPV16 y PEPV40 (Flores-Félix et al. 2013; Jiménez-Gómez et al. 2016) y de la cepa PEPV15 de *Phyllobacterium* (Flores-Félix, Silva, et al. 2015). En el caso del ácido indol acético, los niveles oscilaron entre los 90 mg/l y los 10 mg/l, concentraciones similares a las observadas en otras cepas del género *Rhizobium* (Ghosh & Basu 2006; Yadav & Verma 2014). En cuanto a la producción de sideróforos la presentaron muchas de las cepas aisladas en cantidades moderadas y similares a las descritas para otras especies de *Rhizobium*, como *R. leguminosarum* (García.Fraile et al. 2012). En el caso de la

solubilización de fosfato, fue más común entre las cepas aisladas a partir de *P. vulgaris*, entre las que se encuentran las únicas cepas capaces de solubilizar fosfato tricálcico. No es muy común esta capacidad en las cepas de *Rhizobium*, que suelen presentar baja capacidad de solubilización de fosfato tricálcico, sin embargo, existen algunos datos bibliográficos sobre la solubilización de este fosfato para cepas de *R. leguminosarum* (Abril et al. 2007).

Por su parte, las cepas endófitas aisladas a partir de nódulos de *Pisum sativum* también mostraron capacidad para producir sideróforos, solubilizar fosfato o producir fitohormonas en mayor o menor proporción. Por ejemplo, las cepas del género *Bacillus*, que se han aislado frecuentemente en este estudio, pero también a partir de nódulos de otras leguminosas (Xu et al. 2014; De Meyer et al. 2015) mostraron una gran diversidad de mecanismos. En conjunto, aproximadamente un 50% de las bacterias endófitas produjeron sideróforos destacando especialmente dos cepas, AMPSE14 y AMPSE17. Los niveles de ácido indol acético fueron también muy diversos, con valores oscilando entre 396 y 14 mg/l, y concretamente entre 137 a 14 mg/l en el caso de las cepas de *B. simplex*, coincidiendo con los obtenidos para otras cepas del género *Bacillus* aislados a partir de raíces de maíz morado (Castellano-Hinojosa et al. 2018). Las cepas de la especie *Agrobacterium skirniwicense* mostraron actividades muy elevadas, como la cepa AMPSE16 con 396 mg/l, niveles que podrían llegar a ser perjudiciales para las plantas (Gohlke & Deeken 2014). En cuanto a la producción de sideróforos, fue presentada por aproximadamente la mitad de las cepas, entre los que cabe destacar la capacidad de las cepas AMPSE14, AMPSE17 y AMPSE20 del género *Bacillus*, que contiene muchas especies productoras de estos compuestos (Yu et al. 2011; Saha et al. 2016). La solubilización de fosfato mostró resultados heterogéneos y sólo dos cepas, AMPSE20 y PSE3PSE02, que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, respectivamente fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico. Ambos géneros *Bacillus* son solubilizadores de fosfato (Grady et al. 2016; Meena et al. 2017).

Otro aspecto estudiado fue la producción de sustancias que regulan los sistemas de Quorum sensing. Estos sistemas tienen especial relevancia en *Rhizobium* y géneros afines donde se ha descrito su implicación en el cambio de fase sésil a planctónica, la nodulación, la síntesis de exopolisacárido y la procesos de transferencia genética horizontal (Sanchez-Contreras et al. 2007; Bogino et al. 2015). En nuestro caso, hemos observado como cada uno de los aislados presenta una producción de acil-homoserin-lactonas (AHL), las señales de Quorum sensing principales en Gram negativas, considerablemente variable. Estos datos pueden indicar distintas sensibilidades a las AHL o distinta capacidad intrínseca de producción, en otras palabras, los sistemas de reconocimiento poblacional presentan una alta variación entre las cepas de una misma especie como se ha observado también en *Burkholderia* (Poonguzhali et al. 2007). Diferentes concentraciones de AHL se han relacionado a su vez, con la capacidad de *swarming* en *Rhizobium*, por lo que las distintas actividades pueden determinar diferencias en la capacidad de colonización en la rizosfera (Dixit et al. 2017).

Los resultados del estudio de estos mecanismos nos permitió seleccionar varias cepas tanto de *rhizobia* como de bacterias endófitas para profundizar en el estudio de su capacidad para colonizar, en primer lugar, superficies abióticas y en segundo lugar, las propias raíces de las plantas, antes de ensayar los resultados de su inoculación en planta en ensayos de microcosmos y posteriormente de campo. La capacidad para formar biofilms y colonizar activamente la superficie radicular supone una ventaja para la bacteria, ya que es capaz de competir por el espacio, relegando a otras bacterias de su zona de acción; a su vez, la planta es capaz de aumentar su radio de interacción directo debido al contacto con el biofilm (Lugtenberg 2015). En este estudio se analizó la capacidad de originar biofilms mediante métodos cualitativos y cuantitativos observándose producciones y comportamientos similares en el caso de las cepas de *Rhizobium* seleccionados, pero muy diferentes entre éstos y los de los aislados pertenecientes a *Bacillus* y *Paenibacillus* que formaron biofilms muy densos, siendo estos géneros dos modelos muy estudiados en la caracterización de biofilms, por su intensidad, dimensión y velocidad de formación (Branda et al. 2001; Morikawa 2006; Wijman et al. 2007; Bridier et al. 2013). En este estudio se ha analizado por primera vez el efecto sobre la formación y evolución de los biofilms de la coinoculación de *Rhizobium* junto *Bacillus* y *Paenibacillus*, puesto que los estudios de biofilms mixtos se han centrado hasta el momento en especies patógenas como *Salmonella* (Jahid et al. 2015), *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella* (Lee et al. 2014). Los resultados mostraron que en los biofilms formados estaban muy influenciados por la presencia de *Rhizobium*, reduciendo la intensidad e integrándose de manera conjunta ambas especies.

Una vez conocida la capacidad de las cepas seleccionadas en este estudio para producir biofilms sobre superficies abióticas, se ensayó su capacidad para colonizar las raíces de diversas plantas, ya que éste es un paso crucial en la promoción del crecimiento de las plantas (Compant et al. 2010). Las cepas *Phyllobacterium endophyticum* PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16 colonizaron las raíces de cultivos tan diversos como fresa, lechuga y zanahoria., pero, además, se observó una colonización endófitas de los tejidos de las raíces de lechuga. Tanto en el caso de *Rhizobium* como *Phyllobacterium* estos datos confirman su capacidad para interactuar con las plantas, ya que la mayoría de estas especies han sido aisladas a partir de especies vegetales (Mergaert, & Swings, 2015; Velázquez et al. 2017 a y b). En el caso de las cepas endófitas *Bacillus simplex* AMPSE14 y *Paenibacillus tundrae* PSE3PSE02, ambas fueron capaces de colonizar los nódulos de *Pisum sativum* y además las raíces de maíz de manera endofítica mostrando patrones dispersos similares a los observados en otros endófitos de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* en trigo (Hassen & Labuschagne 2010) o arabidopsis (Fan et al. 2012) y de *Herbaspirillum* en raíces de *Phaseolus vulgaris* (Monteiro et al. 2012), con una colonización interna dispersa altamente restringida a los espacios intercelulares.

P. endophyticum PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16 mostraron capacidad para mejorar la producción en cultivos sumamente diferentes, así, el estudio de su genoma mostró ser una herramienta destacable para analizar el potencial de ambas cepas,

pudiendo localizar en su genoma no sólo genes implicados en mecanismos observados in vitro, sino otros genes implicados en diferentes mecanismos de promoción vegetal y competición en la rizosfera como la producción de volátiles, síntesis de polisacáridos o enzimas líticas. Esta herramienta ha mostrado ser de gran utilidad en el estudio de PGPB de diversos géneros como *Burkholderia* (Kwak et al. 2012), *Pseudomonas* (Roca et al. 2013), o *Micromonospora* (Carro et al. 2018) poniendo de manifiesto el potencial de las cepas analizadas a través del minado del genoma y el análisis del mismo empleando programas específicos (Weber et al. 2015). El estudio del genoma permite discernir la idoneidad de una cepa como biofertilizante mediante el estudio de las rutas metabólicas presentes como Francis et al. (2016) en la cepa D188 de *Rhodococcus fascians*. O el diseño de estrategias de actuación mediante el conocimiento de los requerimientos nutricionales y los sustratos necesarios para la síntesis de compuestos de interés pudiendo dar paso a la posibilidad de tratamientos específicos mediante el empleo de una cepa (Crovadore et al. 2016; Pan et al. 2017).

Aunque la colonización es un paso imprescindible para el éxito de un biofertilizante, los ensayos de promoción del crecimiento en planta son decisivos, ya que la aplicación de un biofertilizante no siempre es fructífera y depende de múltiples factores (Herrmann & Lesueur 2013; Lesueur et al. 2016). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, las cepas PEPV15 y PEPV16 mostraron excelentes resultados en condiciones axénicas y de microcosmos, apoyando la idea de que los *rhizobia* y bacterias relacionadas como *Phyllobacterium* pueden ser una excelente alternativa para mejorar la eficiencia de los sistemas agrícolas modernos (Vargas et al. 2017). Su utilización no sólo debe restringirse a las plantas leguminosas, donde su efectividad está demostrada (Mulas et al. 2011), sino que puede ampliarse a plantas de consumo en fresco donde aportan, además, seguridad para la salud humana (García-Fraile et al. 2012; Rubio-Canalejas et al. 2016). Los resultados de los ensayos de campo han mostrado el enorme potencial de *Rhizobium* como biofertilizante de no leguminosas, mejorando la producción de hoja, fruto y raíz de diversos cultivos como fresa, lechuga, zanahoria, guisante y maíz, un espectro de acción deseado para cualquier biofertilizante (Anon 2015; Verma et al. 2016) y que, normalmente, se obtiene mediante el empleo de consorcios complejos de microorganismos que aúnan diversos mecanismos de promoción del crecimiento (Reddy & Saravanan 2013) para suplir las deficiencias que pueda presentar cada uno de ellos, o producir sinergias entre los mismos (Rojas-Solís et al. 2016). En este estudio también se han utilizado diferentes consorcios de bacterias y *Rhizobium* en leguminosas y cereales que se pueden usar en rotación de cultivo o *intercropping*, sistemas de cultivo que presentan importantes ventajas a nivel de fertilidad y mantenimiento de las condiciones óptimas del suelo, como el aporte de nitrógeno al utilizar una leguminosa (Espinoza et al. 2012), la fitoextracción de nutrientes desde horizontes edáficos inferiores a horizontes superiores (Robacer et al. 2016), y el cambio de las estructuras del suelo debidos a los diferentes sistemas radiculares (Zaccheo et al. 2016). La utilización de consorcios de *rhizobia* y bacterias endófitas generó buenos resultados en guisante en condiciones axénicas, microcosmos y campo, coincidiendo con lo observado para otras leguminosas, como la

soja, con inoculaciones conjuntas de *Bradyrhizobium* y *Bacillus* o *Methylobacterium* (Subramanian et al. 2015) y de *Bradyrhizobium* y *Pseudomonas* (Masciarelli et al. 2014), la judía, con *Rhizobium* y *Bacillus* o *Paenibacillus* (Korir et al. 2017) y el garbanzo, con *Mesorhizobium* y *Pseudomonas* (Yadav & Verma 2014), demostrando que la utilización de consorcios bacterianos puede ser una buena alternativa para mejorar el rendimiento de las leguminosas. Sin embargo, donde más relevancia tiene el uso de consorcios bacterianos es en el maíz, debido a las necesidades nutricionales de este cereal que precisa de aportes de nitrógeno, que pueden ser suplidos mediante la fertilización con *Azospirillum* con *Rhizobium* (Fukami et al. 2018) o de *Azotobacter* con *Bacillus* y *Pseudomonas* (Jarak et al. 2012). Aunque en nuestro estudio comprobamos que algunos consorcios presentaban buenos resultados en maíz, en condiciones de campo el mejor resultado se produjo en el tratamiento simple con *Rhizobium*, a diferencia de las producciones observadas en microcosmos o cámara iluminada, poniendo de manifiesto la capacidad de promoción del crecimiento de las cepas de este género y su enorme potencial como biofertilizante para todo tipo de cultivos.

Conclusiones

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. En suelos de la provincia de Valladolid tradicionalmente cultivados con *Pisum sativum* y en suelos de la provincia de Salamanca no cultivados con *Phaseolus vulgaris*, ambas leguminosas establecen simbiosis con *R. laguerreae* sv *viciae*, que hasta el momento sólo se consideraba un endosimbionte típico para las leguminosas del grupo de inoculación cruzada de *Pisum*. Este hallazgo es crucial para los estudios de biogeografía de *P. vulgaris* porque indica la necesidad de estudiar en mayor profundidad la simbiosis *Rhizobium-Phaseolus* en suelos europeos

2. Las comunidades bacterianas que acompañan a los endosimbiontes en los nódulos de *P. sativum* apenas han sido estudiadas, siendo en este estudio en el que mayor diversidad de estas bacterias se ha encontrado, identificándose 9 géneros y 14 especies, algunas de ellas probablemente nuevas, que no han sido previamente documentados en la bibliografía como endófitas de nódulos de guisante

3. A partir de los nódulos de *P. vulgaris* se ha aislado la nueva especie *Phyllobacterium endophyticum*, lo que demuestra que los nódulos de leguminosas son una fuente de nuevas especies de bacterias y que, por tanto, es necesario seguir profundizando en el estudio de este ecosistema

4. El análisis de los genomas de las cepas *P. endophyticum* PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16 permitió la localización de genes implicados en rutas metabólicas involucradas en promoción del crecimiento vegetal y *Quorum sensing*. Esto confirmó que el análisis de los genomas es una herramienta muy útil para la selección de cepas bacterianas con potencial como biofertilizantes.

5. Las cepas *P. endophyticum* PEPV15 y *R. laguerreae* PEPV16, aisladas a partir de nódulos de *P. vulgaris* mostraron alto potencial como PGPB, capacidad de producción de moléculas implicadas en la colonización de plantas y de formación biofilms en superficies abióticas, una buena colonización de las raíces de fresa, lechuga y zanahoria y un incremento en la producción de estas tres plantas en condiciones de microcosmos y de campo. Por lo tanto, estas cepas son muy adecuadas para el diseño de biofertilizantes para cultivos hortícolas.

6. Aunque las cepas endófitas *Bacillus simplex* AMPSE14 y *Paenibacillus tundrae* PSE3PSE02 aisladas a partir de nódulos de *P. sativum* colonizaron los nódulos de guisante y las raíces de maíz y en consorcios con *R. laguerreae* AMPSE34 mostraron excelentes resultados en condiciones de microcosmos, los mejores resultados en condiciones de campo se consiguieron tras la inoculación simple de la cepa *R. laguerreae* AMPS34. Por lo tanto, *Rhizobium* es también el mejor candidato para el diseño de biofertilizantes para leguminosas y cereales.

Bibliografía

- Abd-Alla, M.H. et al., 2014. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological research*, 169(1), pp.49–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23920230>.
- Adamtey, N. et al., 2016. Productivity, profitability and partial nutrient balance in maize-based conventional and organic farming systems in Kenya. *"Agriculture, Ecosystems and Environment"*, 235, pp.61–79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.10.001>.
- Afkhami, M.E. et al., 2018. Symbioses with nitrogen-fixing bacteria: nodulation and phylogenetic data across legume genera. *Ecology*, 99(2), pp.502–502. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ecy.2110> [Accessed May 22, 2018].
- Agegnehu, G. et al., 2016. Benefits of biochar, compost and biochar-compost for soil quality, maize yield and greenhouse gas emissions in a tropical agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 543, pp.295–306. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.054>.
- Aguilar-flores, S., Valle, M. V & Pe, A., 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. , 33, pp.167–172.
- Ahemad, M. & Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), pp.1–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001> [Accessed July 14, 2014].
- Alberghini, S. et al., 2009. Consequences of relative cellular positioning on quorum sensing and bacterial cell-to-cell communication. *FEMS Microbiology Letters*, 292(2), pp.149–161.
- Albiac, J. et al., 2017. Agriculture and climate change: Potential for mitigation in Spain. *Science of the Total Environment*, 592, pp.495–502. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.110>.
- Alegria Terrazas, R. et al., 2016. *Plant-microbiota interactions as a driver of the mineral Turnover in the Rhizosphere*,
- Ali, B. & Nasim, A., 2010. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L .). , pp.1379–1384.
- Alikhani, H. a., Saleh-Rastin, N. & Antoun, H., 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*, 287(1-2), pp.35–41. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-006-9059-6> [Accessed June 25, 2014].
- Al-Kaisi, M.M., Archontoulis, S. & Kwaw-Mensah, D., 2016. Soybean spatiotemporal yield and economic variability as affected by tillage and crop rotation. *Agronomy Journal*, 108(3), pp.1267–1280.
- Almeida, D.S. & Rosolem, C.A., 2016. Ruzigrass Grown in Rotation with Soybean Increases Soil Labile Phosphorus. *Agronomy Journal*, 108(6), p.2444. Available at: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/aj/abstracts/108/6/2444>.
- Altieri, M. a & Nicholls, C.I., 2012. *Sustainable Agriculture Reviews*, Available at:

- <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5449-2>.
- Altieri, M., Nicholls, C. & Montalba, R., 2017. Technological Approaches to Sustainable Agriculture at a Crossroads: An Agroecological Perspective. *Sustainability*, 9(3), p.349. Available at: <http://www.mdpi.com/2071-1050/9/3/349> [Accessed May 23, 2018].
- 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), pp.996–1006.
- Anand, K., Kumari, B. & Mallick, M.A., 2016. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), pp.37–40.
- Anderson, R.L., 2015. Integrating a complex rotation with no-till improves weed management in organic farming . A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, pp.967–974.
- Andrews, M. & Andrews, M.E., 2017. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4).
- Anglade, J., Billen, G. & Garnier, J., 2015. Relationships for estimating N₂ fixation in legumes : incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere*, 6(March), pp.1–24. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1890/ES14-00353.1> [Accessed May 31, 2018].
- Anon, 2015. *Plant Microbes Symbiosis : Applied Facets*, Springer India.
- Armada, E. et al., 2016. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. *Journal of Plant Physiology*, 192, pp.1–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.11.007>.
- Aserse, A.A. et al., 2013. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), pp.10117–10134. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5248-4> [Accessed June 5, 2018].
- Aserse, A.A. et al., 2012. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(2), pp.120–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.005>.
- Auch, A.F. et al., 2010. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in genomic sciences*, 2(1), pp.117–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304684> [Accessed June 4, 2018].
- Azco, A.M.Æ.R., Manuel, J. & Aroca, R.Æ.R., 2008. Differential Effects of a *Bacillus megaterium* Strain on *Lactuca sativa* Plant Growth Depending on the Origin of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Coinoculated : Physiologic and Biochemical Traits. , pp.10–18.
- Babu, S. et al., 2015. Synergistic action of PGP agents and *Rhizobium* spp. for improved plant growth, nutrient mobilization and yields in different leguminous crops. *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology*, 4(4), pp.456–464. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.004>.
- Badri, D. V et al., 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current opinion in biotechnology*, 20(6), pp.642–50. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875278> [Accessed February 27, 2013].
- Bahroun, A. et al., 2018. Anti-fungal activity of bacterial endophytes associated with legumes against *Fusarium solani*: Assessment of fungi soil suppressiveness and plant protection induction. *Applied Soil Ecology*, 124, pp.131–140. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139317306972> [Accessed June 5, 2018].
- Bailly, X. et al., 2007. Horizontal Gene Transfer and Homologous Recombination Drive the Evolution of the Nitrogen-Fixing Symbionts of Medicago Species ¶ . *Journal of bacteriology*, 189(14), pp.5223–5236.
- Baldwin, I.L. & Fred, E.B., 1928. Nomenclature of the root-nodule bacteria of the leguminosae. *Journal of bacteriology*, pp.141–150.
- Bashan, Y., Kamnev, A.A. & de-Bashan, L.E., 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: A proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49(4), pp.465–479.
- Bautista, V. V, Monsalud, R.G. & Yokota, A., 2017. Isolation and Identification of Bacteria from Root Nodules of Philippine Legumes Using 16S rRNA Gene Sequencing. , 100(1), pp.415–428.
- Beedy, T.L. et al., 2010. Impact of *Gliricidia sepium* intercropping on soil organic matter fractions in a maize-based cropping system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 138(3-4), pp.139–146. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2010.04.008>.
- Beghalem, H. et al., 2017. Molecular and phenotypic characterization of endophytic bacteria isolated from sulla nodules. *Microbial Pathogenesis*, 111, pp.225–231. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017304059>.
- Belbahri, L. et al., 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(AUG), pp.1–15.
- Belhadi, D. et al., 2018. *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), pp.122–130. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.10.004>.
- Bellenger, J.P. et al., 2014. Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, pp.413–420.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. & Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), pp.478–486.
- Bernard, E. et al., 2014. Rapeseed rotation, compost and biocontrol amendments reduce

- soilborne diseases and increase tuber yield in organic and conventional potato production systems. *Plant and Soil*, 374(1-2), pp.611–627.
- Beyranvand, H. et al., 2013. Response of Yield and Yield Components of Maize (*Zea Mayz* L.) to Different Bio Fertilizers. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(9), pp.1068–1077. Available at: http://www.ijabbr.com/article_7870_1266.html [Accessed June 6, 2018].
- Bhardwaj, D. et al., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1), p.66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4022417&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bhattacharjee, R.B. et al., 2011. 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*, 48(2), pp.173–182. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00374-011-0614-9> [Accessed June 27, 2014].
- Bhattacharyya, P.N. & Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(4), pp.1327–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805914> [Accessed May 22, 2013].
- Bogino, P.C., Nieves, F.L. & Giordano, W., 2015. A review: Quorum sensing in *Bradyrhizobium*. *Applied Soil Ecology*, 94, pp.49–58. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139315300019>.
- Bogužas, V. et al., 2015. Long-term effect of tillage systems, straw and green manure combinations on soil organic matter. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(3), pp.243–250. Available at: http://www.zemdirbyste-agriculture.lt/1023_str31/.
- Bona, E. et al., 2015. AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza*, 25(3), pp.181–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25169060> [Accessed June 4, 2015].
- Boonsongcheep, P. et al., 2017. Diversity of endophytic actinomycetes isolated from roots and root nodules of *Pueraria candollei* Grah. Ex Benth. And the analyses of their secondary metabolites. *Chiang Mai Journal of Science*, 44(1), pp.1–14. Available at: <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/>.
- Boonsongcheep, P. et al., 2016. *Rhizobium puerariae* sp. nov., an endophytic bacterium from the root nodules of the medicinal plant *Pueraria candollei* var. *candollei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), pp.1236–1241. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000863> [Accessed June 5, 2018].
- Bouchiba, Z. et al., 2017. Diversity of nodular bacteria of *Scorpiurus muricatus* in Western Algeria and their impact on plant growth. *Canadian Journal of Microbiology*, 63, pp.450–463.

- Bourion, V. et al., 2018. Co-inoculation of a Pea Core-Collection with Diverse Rhizobial Strains Shows Competitiveness for Nodulation and Efficiency of Nitrogen Fixation Are Distinct traits in the Interaction. *Frontiers in Plant Science*, 8(January), pp.1–10. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.02249/full>.
- Branda, S.S. et al., 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp.11621–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brankatschk, G. & Finkbeiner, M., 2015. Modeling crop rotation in agricultural LCAs - Challenges and potential solutions. *Agricultural Systems*, 138, pp.66–76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agsy.2015.05.008>.
- Braun, V. et al., 1983. Plasmid and chromosomal mutants in the iron(III)-aerobactin transport system of *Escherichia coli*. Use of streptonigrin for selection. *Molecular and General Genetics MGG*, 192(1), pp.131–139. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00327658>.
- Bridier, A. et al., 2012. Biofilms of a *Bacillus subtilis* Hospital Isolate Protect *Staphylococcus aureus* from Biocide Action. *PLoS ONE*, 7(9).
- Broughton, W.J. & Perret, X., 1999. Genealogy of legume-Rhizobium symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 2, pp.305–311.
- Bruinsma, J., 2017. *World Agriculture: Towards 2015/2030*, Routledge. Available at: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781315083858> [Accessed May 23, 2018].
- Busby, R.R. et al., 2016. Native *Lespedeza* species harbor greater non-rhizobial bacterial diversity in root nodules compared to the coexisting invader, *L. cuneata*. *Plant and Soil*, 401(1-2), pp.427–436.
- Çakmakçı, R. et al., 2017. The Role of Soil Beneficial Bacteria in Wheat Production: A Review. *Wheat Improvement, Management and Utilization*. Available at: <http://www.intechopen.com/books/wheat-improvement-management-and-utilization/the-role-of-soil-beneficial-bacteria-in-wheat-production-a-review>.
- Calheiros, C.S.C. et al., 2017. Assessment of culturable bacterial endophytic communities colonizing *Canna flaccida* inhabiting a wastewater treatment constructed wetland. *Ecological Engineering*, 98, pp.418–426. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857416302087> [Accessed June 1, 2018].
- Cao, Y. et al., 2017. The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), pp.535–561. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042916-041030>.
- Carareto Alves, L.M. et al., 2014. The Family Rhizobiaceae. In *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 419–437. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30197-1_297 [Accessed May 21, 2018].
- Carro, L. et al., 2012. Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing

- nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(2), pp.73–80. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202011002165#sec0010> [Accessed June 4, 2018].
- Carro, L., Nouioui, I., et al., 2018. Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Scientific Reports*, 8(1), pp.1–23.
- Carro, L. et al., 2016. *Micromonospora luteifusca* sp. nov. isolated from cultivated *Pisum sativum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(4), pp.237–242. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202016300170> [Accessed June 5, 2018].
- Carro, L., Veyisoglu, A., et al., 2018. *Micromonospora phytophila* sp. nov. and *Micromonospora luteiviridis* sp. nov., isolated as natural inhabitants of plant nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), pp.248–253. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002490> [Accessed June 1, 2018].
- Carro, L. et al., 2013. *Paenibacillus endophyticus* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 12), pp.4433–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23852155> [Accessed January 14, 2014].
- Carro, L. et al., 2014. *Paenibacillus lupini* sp. nov., Isolated from nodules of *Lupinus albus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64.
- Carter, R.A. et al., 2002. The vbs genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: Their expression in other genera requires ECF σ factor rpoI. *Molecular Microbiology*, 44(5), pp.1153–1166.
- Castro, R.O., Cantero, E.V. & Bucio, J.L., 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. , (April), pp.263–265.
- Celador-Lera, L. et al., 2016. Analysis of the PGPB Potential of Bacterial Endophytes Associated with Maize. In F. González-Andrés & E. James, eds. *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Cham: Springer International Publishing, pp. 23–35. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6_3.
- Cendrowski, S., MacArthur, W. & Hanna, P., 2004. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Molecular Microbiology*, 51(2), pp.407–417.
- Chabot, R., Antoun, H. & Cescas, M.P., 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil*, 184, pp.311–321.
- Chamangasht, S., Ardakani, M.R. & Khavazi, K., 2012. Improving Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Growth and Yield by the Application of Biofertilizers. *Annals of Biological Research*, 3(4)(4), pp.1876–1879.

- Chapagain, T. & Riseman, A., 2014. Barley-pea intercropping: Effects on land productivity, carbon and nitrogen transformations. *Field Crops Research*, 166, pp.18–25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2014.06.014>.
- Chen, W. et al., 2015. Diverse nodule bacteria were associated with Astragalus species in arid region of northwestern China. *Journal of Basic Microbiology*, 55(1), pp.121–128.
- Cheng, H.-P. & Walker, G.C., 1998. Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads during Nodulation of Alfalfa by Rhizobium meliloti. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 180(19), pp.5183–5191.
- Chilton, M.D. et al., 1974. Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(9), pp.3672–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4530328> [Accessed June 2, 2018].
- Choi, O. et al., 2007. Pyrroloquinoline Quinone Is a Plant Growth Promotion Factor Produced by Pseudomonas fluorescens B16. *Plant Physiology*, 146(2), pp.657–668. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.112748>.
- Chou, Y.M. et al., 2017. Functional diversity and dominant populations of bacteria in banana plantation soils as influenced by long-term organic and conventional farming. *Applied Soil Ecology*, 110, pp.21–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.002>.
- Chu, B.C. et al., 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), pp.601–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596754> [Accessed September 26, 2013].
- Chu, Q. et al., 2013. Mycorrhizal responsiveness of maize (*Zea mays* L.) genotypes as related to releasing date and available P content in soil. *Mycorrhiza*, 23(6), pp.497–505.
- Chun, J. et al., 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), pp.461–466.
- Chun, J. & Rainey, F.A., 2014. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 2), pp.316–324.
- Cipriano, M.A.P. et al., 2016. Lettuce and rhizosphere microbiome responses to growth promoting *Pseudomonas* species under field conditions A. Sessitsch, ed. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(12), p.fiw197. Available at: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1093/femsec/fiw197> [Accessed May 31, 2018].
- Clemente, M.J. et al., 2016. Use of Bacillus spp. as growth promoter in carrot crop. *African Journal of Agricultural Research*, 11(35), pp.3355–3359. Available at: <http://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/2CEC46F60285>.
- Columela, L.J.M. & Álvarez de Sotomayor y Rubio, J.M., 2012. *Los doce libros de agricultura que escribió en latín Lucio Junio Moderato Columela*, Maxtor. Available at:

- https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=4jYFBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=columela+tratado+agricultura&ots=6LV5nFJbCb&sig=b8NM3rNnf6FnWxJeO_wyOxzjP0#v=onepage&q=columela+tratado+agricultura&f=false [Accessed May 24, 2018].
- Comisión Europea, 1999. REGLAMENTO (CE) No 730/1999 DE LA COMISIÓN. , pp.14–19.
- Comisión Europea, 2002. REGLAMENTO (CE) No 843/2002 DE LA COMISIÓN. , (9), pp.2001–2003.
- Compant, S., Clément, C. & Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), pp.669–678. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071709004398> [Accessed July 16, 2014].
- Comunidad Europea, E., 2016. Investing in Spain's agriculture 2014-2020. Available at: https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/cap-in-your-country/pdf/es_en.pdf [Accessed May 24, 2018].
- Contesto, C. et al., 2010. The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of Arabidopsis to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta*, 232(6), pp.1455–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844890> [Accessed March 4, 2013].
- Cooper, B., 2013. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1), pp.19–22.
- Cordeiro, A.B. et al., 2017. *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(10), pp.3937–3945. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002225> [Accessed March 26, 2018].
- Cornelis, P., 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. , pp.1637–1645.
- Crowley, S., Mahony, J. & van Sinderen, D., 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224413001568> [Accessed September 24, 2013].
- D'ae, J. et al., 2009. Biosurfactants in plant-Pseudomonas interactions and their importance to biocontrol. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), pp.359–372. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1758-2229.2009.00104.x> [Accessed March 5, 2013].
- Dabin, Z. et al., 2016. Contribution of green manure legumes to nitrogen dynamics in traditional winter wheat cropping system in the Loess Plateau of China. *European Journal of Agronomy*, 72, pp.47–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2015.09.012>.
- Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3), pp.261–289. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsre.2003.09.004> [Accessed March 11, 2013].
- Dawwam, G.E. et al., 2013. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from

- the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), pp.195–201. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0570178313000298> [Accessed June 17, 2018].
- Debellé, F. et al., 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 168(3), pp.1075–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3023297> [Accessed May 22, 2018].
- Delamuta, J.R.M. et al., 2017. Phylogenies of symbiotic genes of Bradyrhizobium symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(5), pp.254–265.
- Delaux, P.-M. et al., 2013. Evolution of the plant-microbe symbiotic “toolkit”. *Trends in plant science*, 18(6), pp.298–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462549> [Accessed September 20, 2013].
- Deng, P. et al., 2017. The Siderophore Product Ornibactin Is Required for the Bactericidal Activity of Burkholderia contaminans MS14 H. L. Drake, ed. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(8), pp.e00051–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188204> [Accessed June 16, 2018].
- Deng, Z.S. et al., 2011. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the Sphaerophysa salsula in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(3), pp.463–475. Available at: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x> [Accessed June 5, 2018].
- Dhole, A., Shelat, H. & Panpatte, D., 2017. Chryseobacterium indologenes A Novel Root Nodule Endophyte in Vigna radiata. , 6(4), pp.836–844.
- Díaz-Alcántara, C.-A. et al., 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), pp.149–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239274> [Accessed April 8, 2014].
- Dilworth, M.J. et al., 1998. Rhizobium leguminosarum bv. viciae produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vici bactin. *Microbiology*, (144), pp.781–791.
- Dixit, S. et al., 2017. Roles of quorum sensing molecules from Rhizobium etli RT1 in bacterial motility and biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), pp.815–821. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.005>.
- Dong, Y.-H. & Zhang, L.-H., 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 43 Spec No(February), pp.101–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765063>.
- Drouin, Prévost & Antoun, 2000. Physiological adaptation to low temperatures of strains of Rhizobium leguminosarum bv. viciae associated with Lathyrus spp.(1). *FEMS microbiology ecology*, 32(2), pp.111–120. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817864> [Accessed May 15, 2018].
- Duan, J. et al., 2009. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia

- from southern Saskatchewan. *Microbial ecology*, 57(3), pp.423–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18548183> [Accessed March 3, 2013].
- Dudeja, S.S. et al., 2012. Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of basic microbiology*, 52(3), pp.248–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953403> [Accessed May 27, 2013].
- Duval, M.E. et al., 2016. Winter cover crops in soybean monoculture: Effects on soil organic carbon and its fractions. *Soil and Tillage Research*, 161, pp.95–105. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2016.04.006>.
- Egamberdieva, D. et al., 2017. Endophytic Bacteria Improve Plant Growth, Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Induce Suppression of Root Rot Caused by *Fusarium solani* under Salt Stress. *Frontiers in Microbiology*, 8, p.1887. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01887/full> [Accessed June 5, 2018].
- Egamberdieva, D., Jabborova, D. & Berg, G., 2016. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. *Plant and Soil*, 405(1-2), pp.35–45. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-015-2661-8> [Accessed June 5, 2018].
- Elias, S. & Banin, E., 2012. Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), pp.990–1004.
- Emri, T. et al., 2013. Towards high-siderophore-content foods: optimisation of coprogen production in submerged cultures of *Penicillium nalgiovense*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), pp.2221–2228. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349056> [Accessed June 16, 2018].
- Esitken, A. et al., 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124(1), pp.62–66. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423809005299> [Accessed June 9, 2015].
- Etesami, H. & Maheshwari, D.K., 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156(October 2017), pp.225–246. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>.
- Fan, B. et al., 2012. Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 50(1), pp.38–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367935> [Accessed September 26, 2013].
- Fedoroff, N. V., 2015. Food in a future of 10 billion. *Agriculture & Food Security*, 4(1), p.11. Available at: <http://www.agricultureandfoodsecurity.com/content/4/1/11> [Accessed May 23, 2018].
- Ferguson, B.J. & Mathesius, U., 2014. Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia

- Interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), pp.770–790.
- Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), pp.579–590. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro.2017.87>.
- Flemming, H.C. et al., 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), pp.563–575. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.
- Flores, M. et al., 2005. Diversification of DNA Sequences in the Symbiotic Genome of *Rhizobium etli*. *Journal of bacteriology*, 187, pp.7185–7192.
- Flores-félix, J.D. et al., 2015. Calcofluor white , an Alternative to Propidium Iodide for Plant Tissues Staining in Studies of Root Colonization by Fluorescent-tagged Rhizobia. *Journal of Advances in Biology & Biotechnonology*, 2(1), pp.65–70.
- Flores-Félix, J.D. et al., 2014. *Cohnella lupini* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Lupinus albus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 1), pp.83–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021729> [Accessed January 14, 2014].
- Flores-Félix, J.D. et al., 2013. *Fontibacillus phaseoli* sp. nov. isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Antonie van Leeuwenhoek*, pp.23–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122118> [Accessed January 14, 2014].
- Flores-Félix, J.D., Silva, L.R., et al., 2015. Plants Probiotics as a Tool to Produce Highly Functional Fruits: The Case of *Phyllobacterium* and Vitamin C in Strawberries. *Plos One*, 10(4), p.e0122281. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0122281>.
- Flores-Félix, J.D., Marcos-García, M., et al., 2015. *Rhizobium* as plant probiotic for strawberry production under microcosm conditions. *Symbiosis*, 67(1-3), pp.25–32.
- Flores-Félix, J.D. et al., 2013. Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6), pp.876–882. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jpln.201300116> [Accessed January 14, 2014].
- Flores-Félix, J.-D. et al., 2013. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 3), pp.821–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22611197> [Accessed January 14, 2014].
- Fontana, C. et al., 2016. Structural Studies of Lipopolysaccharide-defective Mutants from *Brucella melitensis* Identify a Core Oligosaccharide Critical in Virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), pp.7727–7741. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867577> [Accessed May 15, 2018].
- Foteinis, S. & Chatzisyneon, E., 2016. Life cycle assessment of organic versus conventional agriculture. A case study of lettuce cultivation in Greece. *Journal of Cleaner Production*, 112, pp.2462–2471. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.075>.
- Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1-2), pp.35–59.

- Francis, I.M. et al., 2016. Mining the genome of *Rhodococcus fascians*, a plant growth-promoting bacterium gone astray. *New Biotechnology*, 33(5), pp.706–717. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.009>.
- Fujishige, N. a et al., 2006. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), pp.195–206. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16629750> [Accessed March 11, 2013].
- Fukami, J. et al., 2018. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*, 45(3), p.328. Available at: <http://www.publish.csiro.au/?paper=FP17167> [Accessed June 6, 2018].
- Fusi, A. et al., 2016. The environmental impact of the production of fresh cut salad: a case study in Italy. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 21(2), pp.162–175.
- Gadermaier, F. et al., 2011. Impact of reduced tillage on soil organic carbon and nutrient budgets under organic farming. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 27(MARCH), pp.1–13. Available at: <papers://8d68c05c-2bcb-4890-88b6-64b46c5c35f7/Paper/p211>.
- Galelli, M.E., Sarti, G.C. & Miyazaki, S.S., 2015. *Lactuca sativa* biofertilization using biofilm from *Bacillus* with PGPR activity. *Journal of Applied Horticulture*, 17(3), pp.186–191.
- García-Fraile, P. et al., 2010. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two nodC alleles present in American *Rhizobium etli* strains : biogeographical and evolutionary implications. *Canadian Journal of Forest Research*, 666, pp.657–666.
- García-Fraile, P. et al., 2012. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PloS one*, 7(5), p.e38122. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3364997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 11, 2014].
- García-Fraile, P., Menendez, E. & Rivas, R., 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*, 2(3), pp.183–205. Available at: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/bioeng.2015.3.183>.
- Garg, N., Manchanda, G. & Kumar, A., 2014. Bacterial quorum sensing: Circuits and applications. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 105(2), pp.289–305.
- Gaunt, M.W. et al., 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), pp.2037–2048.
- Gerding, M. et al., 2017. Diversity and symbiotic effectiveness of *Adesmia* spp. root nodule bacteria in central and southern Chile. *Symbiosis*, 72(1), pp.61–72. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13199-016-0440-9> [Accessed June 5, 2018].
- Gevers, D. et al., 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), pp.733–739. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1236> [Accessed May 23, 2018].

- Ghosh, P.K. & Maiti, T.K., 2016. Structure of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Rhizobia and their Functions in Legume–Bacteria Symbiosis: — A Review. *Achievements in the Life Sciences*, 10(2), pp.136–143. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2078152016300372>.
- Giampieri, F. et al., 2015. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & function*, 6(5), pp.1386–98. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/fo/c5fo00147a> [Accessed July 12, 2015].
- Giassi, V., Kiritani, C. & Kupper, K.C., 2016. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, 190, pp.46–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>.
- Gil-Ramírez, Y. et al., 2014. The identification of wadB, a new glycosyltransferase gene, confirms the branched structure and the role in virulence of the lipopolysaccharide core of *Brucella abortus*. *Microbial Pathogenesis*, 73, pp.53–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927935> [Accessed May 15, 2018].
- Glaeser, S.P. et al., 2016. Non-pathogenic Rhizobium radiobacter F4 deploys plant beneficial activity independent of its host Piriformospora indica. *ISME Journal*, 10(4), pp.871–884.
- Glaeser, S.P. & Kämpfer, P., 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), pp.237–245. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>.
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), pp.30–39. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.
- Glick, B.R., 2015. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* O. C. Bernard R. Glick Department of Biology University of Waterloo Waterloo, ed.,
- Gohlke, J. & Deeken, R., 2014. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*, 5(April), pp.1–11. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00155/abstract>.
- González, J.E. & Marketon, M.M., 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(4), pp.574–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=309046&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gopalakrishnan, S. et al., 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1), pp.40–48. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.008>.
- Goswami, D., Thakker, J.N. & Dhandhukia, P.C., 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), pp.1–19. Available at: <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1127500>.
- Gouda, S. et al., 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206(October 2017), pp.131–140. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>.

- Gourion, B. et al., 2015. Rhizobium-legume symbioses: The crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20(3), pp.186–194. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008>.
- Grady, E.N. et al., 2016. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: A review. *Microbial Cell Factories*, 15(1), pp.1–18. Available at: "<http://dx.doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>.
- Grobelak, A., Napora, A. & Kacprzak, M., 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, pp.22–28. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857415301257>.
- Große, C. et al., 2006. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 62(1), pp.120–131.
- Gualtieri, G. & Bisseling, T., 2000. The evolution of nodulation. , pp.181–194.
- Gubry-rangin, C. et al., 2013. Definition and evolution of a new symbiovar , sv . rigiduloides , among Ensifer meliloti efficiently nodulating Medicago species. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(7), pp.490–496. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.004>.
- Guiñazú, L.B. et al., 2010. Response of alfalfa (Medicago sativa L .) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and Sinorhizobium meliloti. , pp.185–190.
- Gumiere, T. et al., 2014. Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (Araucaria angustifolia) and Slash Pine (Pinus elliottii). *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), pp.663–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481491> [Accessed June 26, 2014].
- Güneş, A. et al., 2009. Effects of phosphate-solubilizing microorganisms on strawberry yield and nutrient concentrations. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(3), pp.385–392.
- Gupta, A. et al., 2014. Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. *PLoS ONE*, 9(8).
- Gupta, G. et al., 2015. Microbial & Biochemical Technology Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 7(7), pp.96–102. Available at: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>.
- Halder, U., Banerjee, A. & Bandopadhyay, R., 2017. Structural and Functional Properties, Biosynthesis, and Patenting Trends of Bacterial Succinoglycan: A Review. *Indian Journal of Microbiology*, 57(3), pp.278–284.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S. & Elsas, J.D. Van, 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), pp.463–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789693> [Accessed March 5, 2013].
- Hartmann, A. et al., 2014. Bacterial quorum sensing compounds are important modulators of

- microbe-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5(April), pp.1–4. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00131/abstract>.
- Hassen, A.I. & Labuschagne, N., 2010. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), pp.1837–1846. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-010-0365-z> [Accessed September 17, 2013].
- Hayat, R. et al., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), pp.579–598. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0117-1> [Accessed May 23, 2014].
- Herrmann, L. & Lesueur, D., 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(20), pp.8859–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037408> [Accessed June 5, 2014].
- Hillas, P.J. et al., 2000. The AhpC and AhpD antioxidant defense system of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), pp.18801–18809.
- Hödtker, M., Lopes de Almeida, D. & Köpke, U., 2016. Intercropping of maize and pulses: an evaluation of organic cropping systems. *Organic Agriculture*, 6(1), pp.1–17.
- Hossain, M.Z. & Lundquist, P.-O., 2016. Nodule inhabiting non-rhizobial bacteria and their influence on growth of selected leguminous plants of Bangladesh. *BioResearch Communications*, 2(01), pp.139–145.
- Hu, X. et al., 2014. Synthesis and characterization of a novel hydrogel: saiecan/polyacrylamide semi-IPN hydrogel with a desirable pore structure. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(23), p.3646. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb21711f>.
- Huang, X.F. et al., 2015. Bacillus spp: From rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), pp.672–684.
- Hwang, H.Y. et al., 2015. Improvement of the value of green manure via mixed hairy vetch and barley cultivation in temperate paddy soil. *Field Crops Research*, 183, pp.138–146. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2015.08.001>.
- Ibáñez, F., Wall, L. & Fabra, A., 2017. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: Intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), pp.1905–1918.
- Imen, H. et al., 2015. Inoculation with Phosphate Solubilizing Mesorhizobium Strains Improves the Performance of Chickpea (*Cicer aritenium* L.) Under Phosphorus Deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 38(11), pp.1656–1671. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01904167.2015.1061543> [Accessed June 6, 2018].
- Ingh, A.K.S. & Ingh, J.N.S., 2006. Studies on influence of biofertilizers and bioregulators on flowering , yield and fruit quality of strawberry cv . Sweet charlie. *Ann. Agric. Res. New Series*, 27(3), pp.261–264.
- Ipek, M. et al., 2014. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Pgpr) Increase Yield, Growth And Nutrition Of Strawberry Under High-Calcareous Soil Conditions. *Journal of Plant*

- Nutrition*, 37(7), pp.990–1001. Available at:
http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904167.2014.881857#.VaIvj_lsnbg
[Accessed July 12, 2015].
- Ishimaru, C.A. & Loper, J.E., 1992. High-affinity iron uptake systems present in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* include the hydroxamate siderophore aerobactin. *Journal of Bacteriology*, 174(9), pp.2993–3003.
- Jahid, I.K. et al., 2015. Mixed culture biofilms of salmonella typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce show enhanced resistance of their sessile cells to cold oxygen plasma. *Food Microbiology*, 46, pp.383–394. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.003>.
- Janczarek, M. et al., 2015. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. *Plant and Soil*, 388(1-2), pp.211–227.
- Janczarek, M. et al., 2014. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology*, 85, pp.94–113.
- Janczarek, M. & Skorupska, A., 2004. Regulation of pssA and pssB gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in response to environmental factors. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(3), pp.217–27. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031650>.
- Jeong, J.J. et al., 2017. *Chryseobacterium cucumeris* sp. nov., an endophyte isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) root, and emended description of *Chryseobacterium arthrosphaerae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(3), pp.610–616.
- Jiao, Y.S. et al., 2015. *Phyllobacterium sophorae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of *Sophora flavescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 2), pp.399–406. Available at:
<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.067017-0>.
- Jiménez-Gómez, A. et al., 2016. *Effective colonization of spinach root surface by Rhizobium*.
- Johnston-Monje, D. & Raizada, M.N., 2011. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PloS one*, 6(6), p.e20396. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3108599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 27, 2013].
- Jones, K.M. et al., 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature reviews. Microbiology*, 5(8), pp.619–33. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2766523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 10, 2013].
- Jordan, D.C., 1984. *Rhizobiaceae-Bergey's manual of systematic bacteriology* D. H. (David H. Bergey, N. R. Krieg, & J. G. Holt, eds., Baltimore MD: Williams & Wilkins. Available at:
<http://usal.worldcat.org/title/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology/oclc/9042846>
[Accessed May 21, 2018].

- Jordan, D.C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root. *international journal of systematic bacteriology*, 32, pp.136–139.
- Journet, E.P. et al., 2014. Is P acquisition facilitated by intercropping of durum wheat and grain legumes in field conditions? In *Phosphorus in soils and plants*. pp. 26–29.
- Kalaiarasi, R. & Dinakar, S., 2015. Original Research Article Positive Effect of Different Formulations of *Azotobacter* and *Paenibacillus* on the Enhancement of Growth and Yield Parameters in Maize (*Zea mays* L.), 4(10), pp.190–196.
- Kalia, V.C., 2013. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), pp.224–245. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>.
- Kantachote, D. et al., 2016. Biofertilizers from *Rhodospseudomonas palustris* strains to enhance rice yields and reduce methane emissions. *Applied Soil Ecology*, 100, pp.154–161. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.12.015>.
- Karlen, D.L. et al., 2013. Thirty-year tillage effects on crop yield and soil fertility indicators. *Soil and Tillage Research*, 130, pp.24–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2013.02.003>.
- Kathiravan, R. et al., 2013. *Ciceribacter lividus* gen. nov., sp. nov., isolated from rhizosphere soil of chick pea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(12), pp.4484–4488. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.049726-0> [Accessed May 22, 2018].
- Kaur, G. & Reddy, M.S., 2015. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere*, 25(3), pp.428–437. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)30010-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(15)30010-2) [Accessed June 14, 2018].
- Kaur, T. & Ghosh, M., 2015. *Acinetobacter haemolyticus* MG606 produces a novel, phosphate binding exobiopolymer. *Carbohydrate Polymers*, 132, pp.72–79. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715004890> [Accessed June 4, 2018].
- Kawasaki, Y., 2015. *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants* Y. Kanayama & A. Kochetov, eds., Tokyo: Springer Tokyo. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-55251-2>.
- Kelly, S.J. et al., 2013. Conditional Requirement for Exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* Symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(3), pp.319–329. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-09-12-0227-R>.
- Kerstens, K. & Montagu, M.V.A.N., 1990. Identification and Plant Interaction of a *Phyllobacterium* sp., a Predominant Rhizobacterium of Young Sugar Beet Plants., 56(4), pp.1093–1102.
- Khalifa, A.Y.Z. & Almalki, M.A., 2015. Isolation and characterization of an endophytic bacterium, *Bacillus megaterium* BMN1, associated with root-nodules of *Medicago sativa*

- L. growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia. *Annals of Microbiology*, 65(2), pp.1017–1026. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-014-0946-4> [Accessed June 5, 2018].
- Kim, M. et al., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 2), pp.346–351.
- Kim, S.Y., Gutierrez, J. & Kim, P.J., 2012. Considering winter cover crop selection as green manure to control methane emission during rice cultivation in paddy soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 161, pp.130–136. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2012.07.026>.
- Kimes, N.E. et al., 2015. Pseudorhizobium pelagicum gen. nov., sp. nov. isolated from a pelagic Mediterranean zone. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(5), pp.293–299. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202015000855>.
- Kohler, J. et al., 2007. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology*, 35(3), pp.480–487. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092913930600223X> [Accessed April 2, 2013].
- Kollas, C. et al., 2015. Crop rotation modelling-A European model intercomparison. *European Journal of Agronomy*, 70, pp.98–111.
- Kopriva, S., 2015. Plant sulfur nutrition: From sachs to big data. *Plant Signaling and Behavior*, 10(9), pp.1–5.
- Korir, H. et al., 2017. Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil. *Frontiers in Plant Science*, 08(February), pp.1–10. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00141/full>.
- Krzyzanowska, D. et al., 2012. Colonization of potato rhizosphere by GFP-tagged *Bacillus subtilis* MB73/2, *Pseudomonas* sp. P482 and *Ochrobactrum* sp. A44 shown on large sections of roots using enrichment sample preparation and confocal laser scanning microscopy. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(12), pp.17608–19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3571856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2013].
- Kulasooriya, S. & Magana-Arachchi, D., 2016. Nitrogen fixing cyanobacteria: their diversity, ecology and utilisation with special reference to rice cultivation. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 44(2), p.111. Available at: <http://jnsfsl.sljol.info/article/10.4038/jnsfsl.v44i2.7992/>.
- Kumar, A. et al., 2017. Co-inoculation with *Enterobacter* and Rhizobacteria on Yield and Nutrient Uptake by Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Alluvial Soil Under Indo-Gangetic Plain of India. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(3), pp.608–617.
- Kumar, A.S., Mody, K. & Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides--a perception. *Journal of basic microbiology*, 47(2), pp.103–117. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440912> [Accessed May 6, 2014].

- Kumar, D. et al., 2013. Rhizospheric flora and the influence of agronomic practices on them: A review. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 83(1), pp.1–14.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), pp.1870–1874.
- Kurepin, L. V, Zaman, M. & Pharis, R.P., 2014. Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(9), pp.1715–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375470> [Accessed June 20, 2014].
- Kwak, Y., Jung, B.K. & Shin, J.H., 2015. Complete genome sequence of *Pseudomonas rhizosphaerae* IH5T(=DSM 16299T), a phosphate-solubilizing rhizobacterium for bacterial biofertilizer. *Journal of Biotechnology*, 193, pp.137–138. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.031>.
- Kyeom, S. et al., 2015. Variation of bioactive compounds content of 14 oriental strawberry cultivars. *FOOD CHEMISTRY*, 184, pp.196–202. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.060>.
- Laguerre, G. et al., 2001. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147, pp.981–993.
- Lai, W.-A. et al., 2015. *Paenibacillus medicaginis* sp. nov. a chitinolytic endophyte isolated from a root nodule of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(11), pp.3853–3860. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000505> [Accessed June 5, 2018].
- Lainez, M., González, J.M. & Vela, C., 2018. Spanish strategy on bioeconomy: Towards a knowledge based sustainable innovation. *New Biotechnology*, 40, pp.87–95. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678416326413> [Accessed May 25, 2018].
- Lamine, C., 2015. Sustainability and Resilience in Agrifood Systems: Reconnecting Agriculture, Food and the Environment. *Sociologia Ruralis*, 55(1), pp.41–61. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/soru.12061> [Accessed May 23, 2018].
- Lamont, J.R. et al., 2017. From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry*, 111, pp.1–9.
- Larsen, J. et al., 2017. Interactions between microbial plant growth promoters and their effects on maize growth performance in different mineral and organic fertilization scenarios. *Rhizosphere*, 3(November 2016), pp.75–81. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.01.003>.
- Latati, M. et al., 2016. The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. *European Journal of Agronomy*, 72, pp.80–90. Available at:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1161030115300368> [Accessed June 6, 2018].
- Latif, S. et al., 2013. The diversity of Rhizobia, Sinorhizobia and novel non-Rhizobial *Paenibacillus* nodulating wild herbaceous legumes. *Archives of microbiology*, 195(9), pp.647–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23896976> [Accessed September 26, 2013].
- Le, X.H., Ballard, R.A. & Franco, C.M.M., 2016. Effects of endophytic *Streptomyces* and mineral nitrogen on Lucerne (*Medicago sativa* L.) growth and its symbiosis with rhizobia. *Plant and Soil*, 405(1-2), pp.25–34. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-015-2704-1>.
- Lee, K.W.K. et al., 2014. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME Journal*, 8(4), pp.894–907. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.194>.
- Lei, X. et al., 2008. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Archives of microbiology*, 190(6), pp.657–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704366> [Accessed April 2, 2013].
- Leite, J. et al., 2017. Cowpea Nodules Harbor Non-rhizobial Bacterial Communities that Are Shaped by Soil Type Rather than Plant Genotype. *Frontiers in Plant Science*, 7(January), pp.1–11. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.02064/full>.
- Li, B. et al., 2011. Biofilm formation ability of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* and their inhibitory effect against tomato bacterial wilt. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25), pp.4260–4266. Available at: [http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract_2011/9Nov/Li et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract_2011/9Nov/Li_et_al.htm) [Accessed September 19, 2013].
- Li, D., Kinkema, M. & Gresshoff, P.M., 2009. Autoregulation of nodulation (AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signalling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology*, 166(9), pp.955–967.
- Lichens-Park, A., Gross, D.C. & Chittaranjan, K., 2014. *Genomics of Plant-Associated Bacteria*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Lieben, L., 2017. Plant genetics: Spatial transcriptomics in plants. *Nature Reviews Genetics*, (May), p.2017. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg.2017.41>.
- Lienhard, P. et al., 2013. No-till and cover crops shift soil microbial abundance and diversity in Laos tropical grasslands. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(2), pp.375–384.
- Lin, L. et al., 2012. The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), pp.1185–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002067> [Accessed April 4, 2013].
- Liu, J. et al., 2017. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 157,

- pp.1113–1124. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.084>.
- Liu, X. et al., 2016. Dynamic economic modelling of crop rotations with farm management practices under future pest pressure. *Agricultural Systems*, 144, pp.65–76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agsy.2015.12.003>.
- Liu, Y. et al., 2016. *Paenibacillus chinensis* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) seeds. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 109(2), pp.207–213.
- Lombard, V. et al., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp.490–495.
- Lourenzi, C.R. et al., 2015. Forms of phosphorus transfer in runoff under no-tillage in a soil treated with successive swine effluents applications. *Environ Monit Assess*, 187(209), pp.1–16.
- Lu, C. & Tian, H., 2017. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth Syst. Sci. Data*, 9, pp.181–192. Available at: www.earth-syst-sci-data.net/9/181/2017/ [Accessed May 23, 2018].
- Lugtenberg, B., 2015. *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*,
- Mamani, S. et al., 2016. Insights into the quorum sensing regulon of the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* revealed by transcriptomic in the presence of an acyl homoserine lactone superagonist analog. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP).
- Mano, Hi. & Morisaki, H., 2008. Minireview Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes and Environments*, 23(2), pp.109–117.
- Manohari, R. & Yagalakshmi, K.N., 2016. Optimization of Copper (II) Removal by Response Surface Methodology Using Root Nodule Endophytic Bacteria Isolated from *Vigna unguiculata*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(8), p.285. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11270-016-2964-2> [Accessed June 5, 2018].
- Mantelin, S. et al., 2006. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassic*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 4), pp.827–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585703> [Accessed April 2, 2013].
- Marczak, M. et al., 2008. PssO, a unique extracellular protein important for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Biochimie*, 90(11-12), pp.1781–1790. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18835420> [Accessed May 15, 2018].
- Marek-Kozaczuk, M. et al., 2013. *Rhizobium pisi* sv. *trifolii* K3.22 harboring nod genes of the *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* cluster. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(4), pp.252–258. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202013000283> [Accessed June 4,

- 2018].
- Marra, L.M. et al., 2015. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), pp.367–375. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000200367&lng=en&nrm=iso&tlng=en [Accessed June 4, 2018].
- Martinez-Romero, E., 2003. Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis : overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252, pp.11–23.
- Masciarelli, O., Llanes, A. & Luna, V., 2014. A new PGPR co-inoculated with Bradyrhizobium japonicum enhances soybean nodulation. *Microbiological Research*, 169(7-8), pp.609–615. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001>.
- Masson-Boivin, C. et al., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology*, 17(10), pp.458–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766492> [Accessed March 1, 2013].
- Mateos, P.F. et al., 2011. *The Path of Rhizobia: From a Free-living Soil Bacterium to Root Nodulation*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470959404.ch8> [Accessed May 22, 2018].
- Matos, A.D.M. et al., 2017. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(4), pp.2945–2954.
- Maymon, M. et al., 2015. Mining the phytomicrobiome to understand how bacterial coinoculations enhance plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 6(SEPTEMBER), pp.1–14. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00784/abstract>.
- Mazur, A. et al., 2005. Topological and transcriptional analysis of pssL gene product: a putative Wzx-like exopolysaccharide translocase in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii TA1. *Archives of Microbiology*, 184(1), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16044265> [Accessed May 15, 2018].
- Mbatha, A.N., Ceronio, G.M. & Coetzer, G.M., 2014. Response of carrot (*Daucus carota* L.) yield and quality to organic fertiliser. *South African Journal of Plant and Soil*, 31(1), pp.1–6. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02571862.2013.862309> [Accessed June 1, 2018].
- Meena, V.S. et al., 2017. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. *Ecological Engineering*, 107, pp.8–32. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>.
- Mehboob, I. et al., 2009. Rhizobial Association with Non-Legumes : Mechanisms and Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28, pp.432–456.
- Mehnaz, S. et al., 2010. Growth promoting effects of corn (Zea mays) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(10), pp.1848–1856. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071710002506> [Accessed April 2, 2013].
- Mendes, R., Garbeva, P. & Raaijmakers, J.M., 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS*

- microbiology reviews*, 37(5), pp.634–63. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790204> [Accessed September 17, 2013].
- Menéndez, E., Mulas, R., et al., 2016. Bacterial endophytes and plant growth promotion. In S. Gorawala, P. & Mandhatri, ed. *Agricultural Research Updates*. Nova Publishers, pp. 13–44.
- Menéndez, E. et al., 2017. *Paenibacillus tritici* sp. nov., isolated from wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), pp.2312–2316. Available at:
<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001949>.
- Menéndez, E., Díez-Méndez, A., et al., 2016. *Rhizobium Symbiotic Enzyme Cellulase CelC2: Properties and Applications*,
- Meng, Q., Jiang, H. & Hao, J.J., 2016. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*, 98, pp.18–26. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.010>.
- Merlin, A., He, Z.L. & Rosolem, C.A., 2013. Ruzigrass affecting soil-phosphorus availability. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 48(12), pp.1583–1588.
- De Meyer, S.E. et al., 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83, pp.1–11.
- Miao, Q. et al., 2016. Modeling water use, transpiration and soil evaporation of spring wheat-maize and spring wheat-sunflower relay intercropping using the dual crop coefficient approach. *Agricultural Water Management*, 165, pp.211–229.
- Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, M., 2016. Anuario de Estadísticas Agrarias. , pp.1–1026. Available at:
<http://www.mapama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2016/AE16.pdf> [Accessed May 24, 2018].
- Mirjana Jarak, M. et al., 2012. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27), pp.5683–5690. Available at: [http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract/2012/19July/Jarak et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract/2012/19July/Jarak%20et%20al.htm) [Accessed June 6, 2018].
- Mishra, P.K. et al., 2009. Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), pp.753–761.
- Mohamed, A.A. et al., 2014. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulphur-oxidising bacteria on onion (*Allium cepa* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in sandy soil under green house conditions. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), pp.109–118. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178314000165>.
- Mohanty, S.R., Dubey, G. & Kollah, B., 2016. Endophytes of *Jatropha curcas* promote growth of maize. *Rhizosphere*, 3(P1), pp.20–28. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.11.001>.
- Monteiro, R.A. et al., 2012. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, 356(1-2), pp.175–196. Available at:

- <http://link.springer.com/10.1007/s11104-012-1125-7> [Accessed September 26, 2013].
- Moreno-Ramírez, L. et al., 2015. Molecular identification of phosphate-solubilizing native bacteria isolated from the rhizosphere of *Prosopis glandulosa* in Mexicali valley. *Genetics and m*, 14(1), pp.2793–2798. Available at: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2015/vol14-1/pdf/gmr4551.pdf> [Accessed June 4, 2018].
- Morikawa, M., 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(1), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503283> [Accessed September 19, 2013].
- Morikawa, M. et al., 2006. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 9), pp.2801–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946274> [Accessed May 27, 2014].
- Mousavi, S.A. et al., 2014. Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(3), pp.208–215. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>.
- Mueller, U.G. & Sachs, J.L., 2015. Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in Microbiology*, 23(10), pp.606–617. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.009>.
- Mulas, D. et al., 2011. Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11), pp.2283–2293. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.018>.
- Murugappan, R., Begum, S.B. & Roobia, R.R., 2013. Symbiotic influence of endophytic *Bacillus pumilus* on growth promotion and probiotic potential of the medicinal plant *Ocimum sanctum*. *Symbiosis*, 60(2), pp.91–99. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13199-013-0244-0> [Accessed September 19, 2013].
- N'Dayegamiye, A. et al., 2015. The Benefits of Legume Crops on Corn and Wheat Yield, Nitrogen Nutrition, and Soil Properties Improvement. *Agronomy Journal*, 107(5), pp.1653–1665. Available at: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/aj/abstracts/107/5/1653>.
- Nakatsukasa, H. et al., 2008. Transposon mediation allows a symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to become a symbiosis island in *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Journal of General Microbiology*, 54, pp.107–118.
- Narula, S. et al., 2013. Molecular Diversity of Root and Nodule Endophytic Bacteria From Field Pea (*Pisum Sativum* L.). *Legume Research - An International Journal*, 36(4), pp.344–350. Available at: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:lr&volume=36&issue=4&article=012>
- Nascente, A.S., Crusciol, C.A.C. & Cobucci, T., 2013. The no-tillage system and cover crops- Alternatives to increase upland rice yields. *European Journal of Agronomy*, 45, pp.124–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2012.09.004>.

- Nevens, F. & Reheul, D., 2001. Crop rotation versus monoculture; yield, N yield and ear fraction of silage maize at different levels of mineral N fertilization. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 49(4), pp.405–425. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1573-5214\(01\)80026-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1573-5214(01)80026-9).
- Nhu, V.T.P., 2017. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria in Soybean (*Glycine max L . (Merrill)*) Cultivated on Alluvial Soil of Can Tho city . *International Journal of Innovations in Engineering and Technology*, 8(3), pp.208–221.
- Nobahar, A., Sarikhani, M.R. & Chalabianlou, N., 2017. Buffering capacity affects phosphorous solubilization assays in rhizobacteria. *Rhizosphere*, 4(July), pp.119–125.
- Nunn, C.M. et al., 2002. The crystal structure of Mycobacterium tuberculosis alkylhydroperoxidase AhpD, a potential target for antitubercular drug design. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), pp.20033–20040.
- Olivares, J., Bedmar, E.J. & Sanjuán, J., 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 26(5), pp.486–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23360457>.
- Ormeño-orrillo, E. et al., 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 Microbiology*, 13, pp.1–26.
- Ormeño-Orrillo, E. et al., 2015. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), pp.287–291. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202014001908> [Accessed May 22, 2018].
- Oteino, N. et al., 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6, pp.1–9. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00745/abstract> [Accessed June 14, 2018].
- Palaniappan, P. et al., 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza sp .* *Biology and Fertility of Soils*, 46(8), pp.807–816. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00374-010-0485-5> [Accessed April 2, 2013].
- Palazzotto, E. & Weber, T., 2018. Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 45, pp.109–116. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527417302229>.
- Palencia, P. et al., 2015. Effect of *Bacillus velezensis* and *Glomus intraradices* on Fruit Quality and Growth Parameters in Strawberry Soilless Growing System. *The Horticulture Journal*, 84(2), pp.122–130. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/hortj/84/2/84_MI-002/_article.
- Pan, H.Q., Li, Q.L. & Hu, J.C., 2017. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial biological fungicide agent. *Journal of Biotechnology*, 247, pp.25–28. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.022>.

- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., et al., 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), pp.379–391. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>.
- Pande, A., Pandey, P. & Kaushik, S., 2017. Co-inoculation of Burkholderia cepacia and Alcaligenes aquatilis enhances plant growth of maize (Zea mays) under green house and field condition. , 44(June), pp.196–210.
- Pandya, M., Rajput, M. & Rajkumar, S., 2015. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of Vigna radiata. *Microbiology*, 84(1), pp.80–89. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261715010105> [Accessed June 5, 2018].
- Parniske, M., 2000. Intracellular accommodation of microbes by plants : a common developmental program for symbiosis and disease ? *Current Opinion in Plant Biology*, 3, pp.320–328.
- Patel, H. et al., 2012. Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes From Lycopersicon esculentum. *Nepal Journal of Biotechnology*, 2(1), pp.37–52.
- Paterson, J. et al., 2017. The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. *FEMS microbiology ecology*, 93(3), pp.1–31.
- Paul, D. et al., 2018. Nature to the natural rescue: Silencing microbial chats. *Chemico-Biological Interactions*, 280(September 2017), pp.86–98. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.018>.
- Paul, D. & Lade, H., 2014. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, pp.737–752. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13593-014-0233-6>.
- Pawlowski, K. & Demchenko, K.N., 2012. The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma*, 249(4), pp.967–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22398987> [Accessed April 3, 2014].
- Peix, A. et al., 2014. Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), pp.17–42. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2014.897899>.
- Peña, H.B. & Reyes, I., 2007. AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y DISOLVENTES DE FOSFATOS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA LECHUGA (Lactuca sativa L .)
NITROGEN FIXING BACTERIA AND PHOSPHATE SOLUBILIZERS ISOLATED IN LETTUCE (Lactuca sativa L .) AND EV. , 32, pp.560–565.
- Pereg, L., de-Bashan, L.E. & Bashan, Y., 2016. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants. *Plant and Soil*, 399(1-2), pp.389–414.
- Pereira, P. et al., 2011. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (Zea mays L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *ISRN Ecology*, 2011, pp.1–10. Available at:

- <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2011/938546/>.
- Pereira, S.I.A. et al., 2016. Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering*, 87, pp.91–97. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.033>.
- Pérez-Jaramillo, J.E., Mendes, R. & Raaijmakers, J.M., 2016. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, 90(6), pp.635–644.
- Pérez-Montaño, F. et al., 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5-6), pp.325–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24144612> [Accessed May 23, 2014].
- Perrine-Walker, F.M. et al., 2007. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *Journal of experimental botany*, 58(12), pp.3343–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17925300> [Accessed March 4, 2013].
- Pešaković, M. et al., 2013. Biofertilizer affecting yield related characteristics of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) and soil micro-organisms. *Scientia Horticulturae*, 150, pp.238–243.
- Pini, F. et al., 2012. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. *BMC Microbiology*, 12(1), p.78. Available at: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-78>.
- 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), pp.287–294.
- Posada, L.F. et al., 2016. Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. *Scientia Horticulturae*, 212, pp.81–90. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.040>.
- Pratheepa, V. et al., 2016. Bacterial diversity and tetrodotoxin analysis in the viscera of the gastropods from Portuguese coast. *Toxicon*, 119, pp.186–193. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.003>.
- Pueppke, S.G. & Broughton, W.J., 1999. Rhizobium sp . Strain NGR234 and R . fredii USDA257 Share Exceptionally Broad , Nested Host Ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(4), pp.293–318.
- Raaijmakers, J.M. & Paulitz, T.C., 2009. The rhizosphere : a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. , pp.341–361.
- Radzki, W. et al., 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(3), pp.321–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3739868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 1, 2013].
- Ramasamy, D. et al., 2014. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic

- description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 2), pp.384–391.
- Ramesh, A. et al., 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*, 73, pp.87–96. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139313002126> [Accessed September 26, 2013].
- Ramírez-Bahena, M.H. et al., 2016. *Bradyrhizobium centrosemae* (symbiovar *centrosemae*) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar *phaseolarum*) sp. nov. and a new symbiovar (*tropici*) of *Bradyrhizobium viridifuturi* establish symbiosis with *Centrosema* species native to America. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(6), pp.378–383. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2016.06.001>.
- Ramírez-Bahena, M.H. et al., 2014. *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from a forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 7), pp.2338–2345. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.063560-0>.
- Ramírez-Bahena, M.-H.M.-H. et al., 2015. *Fontibacillus solani* sp. nov. isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) root. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(5), pp.1315–1321. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-015-0426-2>.
- Raphael, J.P.A. et al., 2016. Soil organic matter in crop rotations under no-till. *Soil and Tillage Research*, 155, pp.45–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2015.07.020>.
- Rashid, S., Charles, T.C. & Glick, B.R., 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, pp.217–224. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139311002198> [Accessed September 17, 2013].
- Rasmann, S. & Turlings, T.C.J., 2016. Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Current Opinion in Plant Biology*, 32, pp.62–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.017>.
- Reid, J.B. & Gillespie, R.N., 2017. Yield and quality responses of carrots (*Daucus carota* L.) to water deficits. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 45(4), pp.299–312. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01140671.2017.1343739>.
- Reitz, Z.L., Sandy, M. & Butler, A., 2017. Biosynthetic considerations of triscatechol siderophores framed on serine and threonine macrolactone scaffolds. *Metallomics*, (January 2018). Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7MT00111H>.
- Remigi, P. et al., 2016. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology*, 24(1), pp.63–75. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>.
- Ribeiro, R.A. et al., 2015. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(9), pp.3162–3169.

- Ribeiro, V.A. & Burkert, C.A. V, 2016. Exopolysaccharides Produced by Rhizobium : Production , Composition and Rheological Properties. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, 4(1), pp.1–6.
- Riedell, W.E. et al., 2009. Crop rotation and nitrogen input effects on soil fertility, maize mineral nutrition, yield, and seed composition. *Agronomy Journal*, 101(4), pp.870–879.
- Rincon-Rosales, R. et al., 2013. Rhizobium calliandrae sp . nov ., Rhizobium mayense sp . nov . and Rhizobium jaguaris sp . nov ., rhizobial species nodulating the medicinal legume Calliandra grandiflora. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, pp.3423–3429.
- Rivas, R. et al., 2007. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm Phoenix dactylifera. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), pp.181–187. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2006.02050.x> [Accessed June 4, 2018].
- Rivas, R. et al., 2007. Strains of Mesorhizobium amorphae and Mesorhizobium tianshanense , carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species , constitute a novel biovar (ciceri) capable of nodulating Cicer arietinum. *Letters in applied microbiology*, 44, pp.412–418.
- Robledo, M. et al., 2012. Role of Rhizobium endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11, p.125. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3520766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 27, 2013].
- Robledo, M. et al., 2011. The celC gene, a new phylogenetic marker useful for taxonomic studies in Rhizobium. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(6), pp.393–399. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202011001147?via%3Dihub> [Accessed June 5, 2018].
- Robledo, M. & Martínez-Molina E, M.P.J.-Z.J.V.E.T.M.Z.-P.J.R.-B.M.R.B.D.-M.J.D.F., 2008. Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Pnas*, 105(19).
- Røder, H.L., Sørensen, S.J. & Burmølle, M., 2016. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends in Microbiology*, 24(6), pp.503–513. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.019>.
- Rodrigues, M. et al., 2016. Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. *Science of the Total Environment*, 542, pp.1050–1061. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.118>.
- Rodríguez, H. et al., 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1-2), pp.15–21. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-006-9056-9> [Accessed June 4, 2018].
- Roesch, L.F.W. et al., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1(4), pp.283–290. Available at: <http://www.nature.com/articles/ismej200753> [Accessed May 24, 2018].

- Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E. & Martínez-Romero, E., 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, pp.96–104.
- Rojas-Solis, D., Hernández-Pacheco, C.E. & Santoyo, G., 2016. Evaluation of Bacillus and Pseudomonas to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XXII(1), pp.45–57. Available at:
http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?id_articulo=2208&id_revistas=1&id_revista_numero=223.
- Román-Ponce, B. et al., 2016. Rhizobium acidisoli sp. nov., isolated from root nodules of Phaseolus vulgaris in acid soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), pp.398–406.
- Romero, D. & Kolter, R., 2011. Will biofilm disassembly agents make it to market? *Trends in microbiology*, 19(7), pp.304–6. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21458996>.
- Romero Zarco, C., 2000. Pisum. In *Flora Iberica*. pp. 482–487. Available at:
http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/07_36 Pisum.pdf [Accessed May 28, 2018].
- Romero-Gómez, M., Audsley, E. & Suárez-Rey, E.M., 2014. Life cycle assessment of cultivating lettuce and escarole in Spain. *Journal of Cleaner Production*, 73, pp.193–203. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.053>.
- Rosenblueth, M. & Martínez-romero, E., 2006. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 19(8), pp.827–837.
- Rosolem, C.A. & Calonego, J.C., 2013. Phosphorus and potassium budget in the soil-plant system in crop rotations under no-till. *Soil and Tillage Research*, 126, pp.127–133. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2012.08.003>.
- Rossello-Mora, R. & Amann, R., 2001. The species concept for procaryotes. *FEMS Microbiology Ecology*, 25(November), pp.39–67.
- Rosselló-Móra, R. & Amann, R., 2015. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), pp.209–216. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.001>.
- Roy, T., 2017. The Green Revolution. In *The Economy of South Asia*. Cham: Springer International Publishing, pp. 155–181. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54720-6_7 [Accessed May 23, 2018].
- Rudrappa, T. et al., 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in Arabidopsis thaliana. , 3(2), pp.130–138.
- Rusinamhodzi, L. et al., 2013. Pushing the envelope? Maize production intensification and the role of cattle manure in recovery of degraded soils in smallholder farming areas of Zimbabwe. *Field Crops Research*, 147, pp.40–53. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2013.03.014>.
- Ruzzi, M. & Aroca, R., 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in

- horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, pp.124–134. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042>.
- Ryan, R.P. et al., 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034833> [Accessed February 27, 2013].
- Saha, M. et al., 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23, pp.3984–3999.
- Saïdi, S. et al., 2013. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. *World journal of microbiology & biotechnology*, 29(6), pp.1099–106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397108> [Accessed September 19, 2013].
- Saïdi, S. et al., 2014. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 1), pp.242–247.
- Sainju, U.M. et al., 2016. Nitrogen balance in response to dryland crop rotations and cultural practices. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233(3), pp.25–32. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.023>.
- Saleem, M. et al., 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(10), pp.635–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665234> [Accessed February 28, 2013].
- Sánchez, A.C. et al., 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*, 62, pp.105–112. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.004>.
- Sanchez-Contreras, M. et al., 2007. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1483), pp.1149–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 24, 2013].
- Santi, C., Bogusz, D. & Franche, C., 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111(5), pp.743–767.
- Santoyo, G. et al., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, pp.92–99. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.
- Sarma, I., Phookan, D.B. & Boruah, S., 2015. Influence of manures and biofertilizers on carrot (*Daucus carota* L.) cv. Early Nantes growth, yield and quality. , 10(1), pp.25–27.
- Sbabou, L. et al., 2016. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Hedysarum spinosissimum* L, growing in mining sites of Northeastern region of Morocco. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, 4(3), pp.1–8. Available at: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers17-06/010069861.pdf

[Accessed June 5, 2018].

- Scalise, A. et al., 2015. Legume-barley intercropping stimulates soil N supply and crop yield in the succeeding durum wheat in a rotation under rainfed conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, pp.150–161.
- Schleifer, K.H., 2009. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(8), pp.533–542. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.002>.
- Schmid, J., Sieber, V. & Rehm, B., 2015. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), pp.1–24.
- Schmid, M.W. et al., 2018. Rhizosphere bacterial community composition depends on plant diversity legacy in soil and plant species identity. *BioRxiv*.
- Schmidt, J.E. & Gaudin, A.C.M., 2018. What is the agronomic potential of biofertilizers for maize? A meta-analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. Available at: <https://academic.oup.com/femsec/advance-article/doi/10.1093/femsec/fiy094/4999898> [Accessed June 6, 2018].
- Schnug, E. & Haneklaus, S.H., 2016. The Enigma of Fertilizer Phosphorus Utilization. In E. Schnug & L. J. De Kok, eds. *Phosphorus in Agriculture: 100 % Zero*. Brunswick, Germany e-mail:, pp. 7–26. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-7612-7>.
- Schwartz, A. et al., 2013. *Bacillus simplex*—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*, 3(4), pp.595–620. Available at: <http://www.mdpi.com/2073-4395/3/4/595/>.
- Serova, T.A., Tikhonovich, I.A. & Tsyganov, V.E., 2017. Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization. *Journal of Plant Physiology*, 212, pp.29–44. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.01.012>.
- Servín-Garcidueñas, L.E. et al., 2014. Symbiont shift towards *Rhizobium* nodulation in a group of phylogenetically related *Phaseolus* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79(1), pp.1–11.
- Sessitsch, a et al., 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 25(1), pp.28–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21970692>.
- Sethia, B. et al., 2015. Indole acetic acid production by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the rhizosphere of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. and their variation in extragenic repetitive DNA sequences. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(June), pp.342–349.
- Shamseldin, A. et al., 2016. The symbiovar *trifolii* of *Rhizobium bangladeshense* and *Rhizobium aegyptiacum* sp. nov. nodulate *Trifolium alexandrinum* in Egypt. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(4), pp.275–279. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2016.05.002>.
- Shaw, P.D. et al., 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), pp.6036–6041. Available at:
<http://www.pnas.org/content/94/12/6036%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177164%5Cnhttp://www.pnas.org/content/94/12/6036.full.pdf%5Cnhttp://www.pnas.org/content/94/12/6036.short>.
- Shi, Y., Lou, K. & Li, C., 2010. Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynthesis research*, 105(1), pp.5–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20405213> [Accessed April 2, 2013].
- Shrivastava, A.K. et al., 2015. A novel alkyl hydroperoxidase (AhpD) of *Anabaena* PCC7120 confers abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*. *Functional and Integrative Genomics*, 15(1), pp.77–92.
- Silveira, A.P.D. da et al., 2016. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. *Applied Soil Ecology*, 107, pp.313–319. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.005>.
- Sindelar, A.J. et al., 2015. Long-term corn and soybean response to crop rotation and tillage. *Agronomy Journal*, 107(6), pp.2241–2252.
- Sivasakthivelan, P. & Saranraj, P., 2013. Azospirillum and its Formulations : A Review. *International Journal of Microbiological Research*, 4(3), pp.275–287.
- Smit, P. et al., 2005. NSP1 of the GRAS Protein Family Is Essential for Rhizobial Nod Factor-Induced Transcription. *Science*, 308 (5729), pp.1789–1791. Available at:
<http://www.sciencemag.org/content/308/5729/1789.abstract>.
- Sotelo, L.I. et al., 2012. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.*, Universidad del Cauca, Vicerrectoría de Investigaciones. Available at:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000100004 [Accessed June 17, 2018].
- de Souza, E.M. et al., 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*, (August), pp.3446–3453.
- Souza, R.C. et al., 2013. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. *Applied Soil Ecology*, 72, pp.49–61. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.021>.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), pp.425–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509086> [Accessed February 27, 2013].
- Sprent, J.I., Ardley, J. & James, E.K., 2017. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), pp.40–56.
- Sprent, J.I., Ardley, J.K. & James, E.K., 2013. From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany*, 89, pp.31–41. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.011>.
- Sreevidya, M. et al., 2016. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), pp.390–392. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.030>.
- Sridevi, M. & Mallaiah, K. V, 2009. Phosphate solubilization by Rhizobium strains. *Indian journal of microbiology*, 49(1), pp.98–102. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3450048&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 27, 2014].
- Stagnari, F. et al., 2017. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), p.2. Available at: <http://chembioagro.springeropen.com/articles/10.1186/s40538-016-0085-1> [Accessed May 31, 2018].
- Stein, M. & Nothnagel, T., 1995. Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.). *Plant Breeding*, 114(1), pp.1–11. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00750.x> [Accessed May 25, 2018].
- Stolarski, M.J. et al., 2014. Effect of Increased Soil Fertility on the Yield and Energy Value of Short-Rotation Woody Crops. *Bioenergy Research*, 8(3), pp.1136–1147.
- Streng, A. et al., 2011. Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 6(10), pp.1510–1514.
- Struik, P.C. & Kuyper, T.W., 2017. Sustainable intensification in agriculture: the richer shade of green. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5).
- Subramanian, P. et al., 2015. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with Bradyrhizobium japonicum MN110. *Plant Growth Regulation*, 76(3), pp.327–332. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10725-014-9993-x> [Accessed June 5, 2018].
- Sun, H. et al., 2016. Soil microbial community and microbial residues respond positively to minimum tillage under organic farming in Southern Germany. *Applied Soil Ecology*, 108, pp.16–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.014>.
- Surette, M.A. et al., 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. pp.381–390.
- Szilagyi-Zecchin, V.J. et al., 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, 4(1), pp.1–9.
- Szymánska, S. et al., 2016. Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. - community structure and metabolic potential. *Microbiological Research*, 192, pp.37–51.
- Tacon, L., 2014. Letters Fungal associations of basal vascular plants: reopening a

- Taha, K. et al., 2018. Rhizobium laguerreae is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), pp.113–121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.008>.
- Taktek, S. et al., 2015. Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, pp.1–9.
- Talgre, L. et al., 2012. Green manure as a nutrient source for succeeding crops. *Plant, Soil and Environment*, 58(6), pp.275–281.
- Tilman, D. et al., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), pp.671–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01014>.
- Tindall, B.J. et al., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), pp.249–266.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L. & Beaton, J.D., 1985. Soil fertility and fertilizers. *Soil fertility and fertilizers*. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19851998321> [Accessed May 24, 2018].
- Tomer, M.D. & Liebman, M., 2014. Nutrients in soil water under three rotational cropping systems, Iowa, USA. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 186(3), pp.105–114. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2014.01.025>.
- Torche, A. et al., 2014. Characterization of bacteria associated with nodules of two endemic legumes of Algeria, *Hedysarum naudinianum* and *H. perrauderianum*. *Annals of Microbiology*, 64(3), pp.1065–1071. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-013-0745-3> [Accessed June 5, 2018].
- Tosti, V., Bertozzi, B. & Fontana, L., 2018. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *The Journals of Gerontology: Series A*, 73(3), pp.318–326. Available at: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/73/3/318/4736301> [Accessed May 31, 2018].
- Trabelsi, D., Chihaoui, S.A. & Mhamdi, R., 2017. Nodules and roots of *Vicia faba* are inhabited by quite different populations of associated bacteria. *Applied Soil Ecology*, 119(April), pp.72–79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.002>.
- Trapet, P. et al., 2016. The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. *Plant physiology*, 171(1), pp.675–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956666> [Accessed June 16, 2018].
- Trovato, A. et al., 2014. Quorum vs. diffusion sensing: A quantitative analysis of the relevance of absorbing or reflecting boundaries. *FEMS Microbiology Letters*, 352(2), pp.198–203.
- Trujillo, M.E. et al., 2015. Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), pp.1–15.
- Tsigie, A., Tilak, K.V.B.R. & Saxena, A.K., 2011. Field response of legumes to inoculation

- with plant growth-promoting rhizobacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 47(8), pp.971–974.
- Turan, M. et al., 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38, pp.327–333. Available at: <http://online.journals.tubitak.gov.tr/openDoiPdf.htm?mKodu=tar-1308-62> [Accessed June 27, 2014].
- Turner, S.D. et al., 2017. Dissecting the Genetic Architecture of Shoot Growth in Carrot (*Daucus carota* L.) Using a Diallel Mating Design. *G3. Genes/Genomes/Genetics*, 8(February), p.g3.300235.2017. Available at: <http://g3journal.org/lookup/doi/10.1534/g3.117.300235>.
- Umesha, S. et al., 2014. Comparative Effect of Organics and Biofertilizers on Growth and Yield of Maize (*Zea mays* L.). *Current Agriculture Research Journal*, 2(1), pp.55–62. Available at: <http://www.agriculturejournal.org/volume2number1/comparative-effect-of-organics-and-biofertilizers-on-growth-and-yield-of-maize-zea-mays-l/> [Accessed June 5, 2018].
- Union europea. Comision europea & EUROSTAT, 2013. *Agriculture, forestry and fishery statistics*, Publications Office of the European Union.
- Unno, Y. & Shinano, T., 2013. Metagenomic Analysis of the Rhizosphere Soil Microbiome with Respect to Phytic Acid Utilization. *Microbes and Environments*, 28(1), pp.120–127. Available at: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jsme2/ME12181?lang=en&from=CrossRef&type=abstract> [Accessed September 24, 2013].
- Upadhyay, A.K., Bahadur, A. & Singh, J., 2012. Effect of organic manures and biofertilizers on yield, dry matter partitioning and quality traits of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Indian journal of agricultural sciences*, 82(1), pp.31–34.
- Uyanöz, R. & Karaca, Ü., 2011. Effects of different salt concentrations and Rhizobium inoculation (native and Rhizobium tropici CIAT899) on growth of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Soil Biology*, 47(6), pp.387–391.
- Valin, H. et al., 2014. The future of food demand: understanding differences in global economic models. *Agricultural Economics*, 45(1), pp.51–67. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/agec.12089> [Accessed May 23, 2018].
- Vejan, P. et al., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*, 21(5), pp.1–17.
- Velázquez, E. et al., 2017. Current Status of the Taxonomy of Bacteria Able to Establish Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis. In *Microbes for Legume Improvement*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1–43. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-59174-2_1 [Accessed May 31, 2018].
- Velázquez, E. et al., 2013. Nodular Endophytes: An Untapped Diversity. In *Beneficial Plant-microbial Interactions*. CRC Press, pp. 237–269. Available at: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15251-12> [Accessed June 17, 2018].

- Venkatachalam, G., Srinivasan, D. & Doble, M., 2013. Cyclic β -(1, 2)-glucan production by *Rhizobium meliloti* MTCC 3402. *Process Biochemistry*, 48(12), pp.1848–1854. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.024>.
- Venugopalan, A. & Srivastava, S., 2015. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp.873–887. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.004>.
- Verbon, E.H. & Liberman, L.M., 2016. Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*, 21(3), pp.218–229. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>.
- Verma, J.P. et al., 2013. Effect of indigenous Mesorhizobium spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering*, 51, pp.282–286. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.022>.
- Verma, S.C. et al., 2004. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters*, 26(5), pp.425–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15104142>.
- Vessey, J.K. & Buss, T.J., 2002. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Controlled-environment studies. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1991), pp.283–290.
- Vessey, J.K., Pawlowski, K. & Bergman, B., 2005. Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, Parasponia sp. and cycads., pp.51–78.
- Vidhyasekaran, P., 2015. *Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity Signaling and Communication in Plants*,
- Villadas, P.J. et al., 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), pp.92–101. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2016.11.008>.
- Villegas, M.D.C. et al., 2006. Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(7), pp.526–538. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202005002122> [Accessed June 5, 2018].
- Vinuesa, P. et al., 2005. tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae : Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* geno- species alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp.569–575.
- Wagh, J. et al., 2014. Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), pp.5117–5129.

- Wall, L.G., 2000. The Actinorhizal Symbiosis. , pp.167–182.
- Wang, E.T. et al., 1999. Rhizobium etli bv. mimosae, a novel biovar isolated from Mimosa affinis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (49), pp.1479–1491.
- Wang, S. et al., 2013. Screening and diversity of plant growth promoting endophytic bacteria from peanut. *African Journal of Microbiology Research*, 7(10), pp.875–884. Available at: <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/28D0EEE20527> [Accessed June 5, 2018].
- Wang, X. et al., 2018. Comparative analysis of rhizobial chromosomes and plasmids to estimate their evolutionary relationships. *Plasmid*, 96-97(September 2017), pp.13–24. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147619X17301191>.
- Watson, C.A. et al., 2017. Grain Legume Production and Use in European Agricultural Systems. *Advances in Agronomy*, 144, pp.235–303. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211317300202> [Accessed May 31, 2018].
- Weber, T. et al., 2015. AntiSMASH 3.0-A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp.W237–W243.
- Wei, X.L. et al., 2015. Diaphorobacter ruginosibacter sp. nov., isolated from soybean root nodule, and emended description of the genus Diaphorobacter. *Archives of Microbiology*, 197(5), pp.683–692. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-015-1102-7> [Accessed June 5, 2018].
- Weihrauch, C. & Opp, C., 2018. Ecologically relevant phosphorus pools in soils and their dynamics: The story so far. *Geoderma*, 325(February), pp.183–194. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.02.047>.
- Wen, X. ya et al., 2016. Wheat, maize and sunflower cropping systems selectively influence bacteria community structure and diversity in their and succeeding crop's rhizosphere. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(8), pp.1892–1902.
- Wentland, E.J. et al., 1996. Spatial variations in growth rate within Klebsiella pneumoniae colonies and biofilm. *Biotechnology progress*, 12(3), pp.316–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8652119>.
- White, K.D., 1970. Fallowing, Crop Rotation, and Crop Yields in Roman Times. *Agricultural History*, 44(3), pp.281–290. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3741455> [Accessed May 24, 2018].
- Wiegert, T., Hagmaier, K. & Schumann, W., 2004. Analysis of orthologous hrcA genes in Escherichia coli and Bacillus subtilis. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), pp.9–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109714> [Accessed May 15, 2018].
- Wijman, J.G.E. et al., 2007. Air-liquid interface biofilms of Bacillus cereus: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), pp.1481–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1828785&tool=pmcentrez&re>

- ndertype=abstract [Accessed September 17, 2013].
- Wilking, J.N. et al., 2013. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), pp.848–852. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1216376110>.
- Williams, A. et al., 2008. Glucosaminan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *Journal of Bacteriology*, 190(13), pp.4706–4715.
- Wisniewski-Dyé, F. et al., 2011. Azospirillum Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments P. M. Richardson, ed. *PLoS Genetics*, 7(12), p.e1002430. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002430> [Accessed May 21, 2018].
- Wisniewski-Dyé, F. & Downie, J.A., 2002. Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1-4), pp.397–407.
- Wong, W.S. et al., 2015. The importance of phytohormones and microbes in biofertilizers. In D. K. Maheshwari, ed. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. Springer, pp. 105–158. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24654-3>.
- Wu, D. et al., 2016. Genetic control and regulatory mechanisms of succinoglycan and curdlan biosynthesis in genus *Agrobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), pp.6183–6192. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7650-1>.
- Wu, S.C. et al., 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1-2), pp.155–166.
- Xiao, X. et al., 2017. Two cultivated legume plants reveal the enrichment process of the microbiome in the rhizocompartments. *Molecular Ecology*, 26(6), pp.1641–1651.
- Xie, J. et al., 2016. Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Scientific Reports*, 6(February), pp.1–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21329>.
- Xu, L. et al., 2014. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(6), pp.457–465. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.009>.
- Yadav, J. & Verma, J.P., 2014. Effect of seed inoculation with indigenous *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European Journal of Soil Biology*, 63, pp.70–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.05.001>.
- Yadav, R.K. et al., 2014. Advancements in the utilization of *Azolla-Anabaena* system in relation to sustainable agricultural practices. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2), pp.301–316.
- Yan, J., Li, Y., et al., 2017. *Agrobacterium deltaense* sp. nov., an endophytic bacteria isolated

- from nodule of *Sesbania cannabina*. *Archives of Microbiology*, 199(7), pp.1003–1009.
- Yan, J., Yan, H., et al., 2017. *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Archives of Microbiology*, 199(1), pp.97–104. Available at: "<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-016-1281-x> [Accessed June 4, 2018].
- Yang, X.Y. et al., 2014. Chemical interference with iron transport systems to suppress bacterial growth of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE*, 9(8), pp.1–9.
- Yanni, Y.G. & Dazzo, F.B., 2015. Occurrence and Ecophysiology of the Natural Endophytic *Rhizobium*-Rice Association and Translational Assessment of Its Biofertilizer Performance within the Egypt Nile Delta. *Biological Nitrogen Fixation*, 2-2, pp.1125–1142.
- Yin, Y. et al., 2012. DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), pp.445–451.
- Yoon, S.-H. et al., 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), pp.1613–1617. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001755> [Accessed June 4, 2018].
- Yu, C. et al., 2015. Changes in soil microbial community structure and functional diversity in the rhizosphere surrounding mulberry subjected to long-term fertilization. *Applied Soil Ecology*, 86, pp.30–40. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139314002704> [Accessed May 31, 2018].
- Zachow, C. et al., 2010. Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. *FEMS microbiology ecology*, 74(1), pp.124–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618857> [Accessed April 4, 2013].
- Zaidi, A. & Khan, M.S., 2006. Co-inoculation effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on green gram-*Bradyrhizobium*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 30(3), pp.223–230.
- Zander, P. et al., 2016. Grain legume decline and potential recovery in European agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(2). Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-016-0365-y>.
- Zandi, P. & Basu, S.K., 2016. *Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as BioFertilizers in Stabilizing Agricultural Ecosystems* Y. Wu, L. Wang, & A. Patras, eds.,
- Zdravkovska, M. et al., 2016. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND YIELD OF CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.) GROWN WITH APPLICATION OF MICROBIOLOGICAL. *journal of agricultural, food and Environmental Science*, 68, pp.63–68. Available at: http://www.fzhn.ukim.edu.mk/JAFES/VOL_68_2016/Trudovi_PDF/088_Zdravkovska_Marija_63_68.pdf [Accessed June 1, 2018].
- Zgadaj, R. et al., 2015. A Legume Genetic Framework Controls Infection of Nodules by Symbiotic and Endophytic Bacteria J. M. McDowell, ed. *PLOS Genetics*, 11(6),

- p.e1005280. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005280> [Accessed June 5, 2018].
- Zhang, N. et al., 2016. Comparative genomic analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* reveals evolutionary traits for adaptation to plant-associated habitats. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC).
- Zhang, X.X. et al., 2007. Genetic characterization of *psp* encoding the DING protein in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiology*, 7, pp.1–11.
- Zhang, X.X. et al., 2013. Long-Term Rice and Green Manure Rotation Alters the Endophytic Bacterial Communities of the Rice Root. *Microbial Ecology*, 66(4), pp.917–926.
- Zhang, Y.J. et al., 2015. *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(9), pp.2960–2967.
- Zhao, L. et al., 2018. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), pp.269–278. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838217300072> [Accessed June 5, 2018].
- Zhao, Q. et al., 2011. Inoculation of soil by *Bacillus subtilis* Y-IVI improves plant growth and colonization of the rhizosphere and interior tissues of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), pp.507–514. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00374-011-0558-0> [Accessed April 4, 2013].
- Zheng, H. et al., 2015. The quorum sensing regulator CinR hierarchically regulates two other quorum sensing pathways in ligand-dependent and-independent fashions in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*, 197(9), pp.1573–1581.
- Zhou, K. et al., 2015. Crop rotation with nine-year continuous cattle manure addition restores farmland productivity of artificially eroded Mollisols in Northeast China. *Field Crops Research*, 171, pp.138–145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2014.10.017>.
- Zikeli, S. et al., 2013. Effects of reduced tillage on crop yield, plant available nutrients and soil organic matter in a 12-year long-term trial under organic management. *Sustainability (Switzerland)*, 5(9), pp.3876–3894.
- Zineb, F.B. et al., 2016. Nodular bacterial endophyte diversity associated with native *Acacia* spp. in desert region of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 10(18), pp.634–645. Available at: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/7DBAC6058391> [Accessed June 5, 2018].
- Złoch, M. et al., 2016. Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to Cd²⁺. *Chemosphere*, 156, pp.312–325.
- Zurdo-piñeiro, L. et al., 2009. Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, That Nodulate *Phaseolus vulgaris* Have Characteristics in Common with *Sinorhizobium meliloti* Isolates from Mainland Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), pp.2354–2359.
- Zurkowski, W. & Lorkiewicz, Z., 1979. Plasmid-Mediated Control of Nodulation in *Rhizobium trifolii*. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 123, pp.195–201.

Summary

Although humanity tends towards an increasingly urbanized system, the dependence on natural systems continues to be a determining factor as a source of resources and therefore agriculture plays a fundamental role (Specht et al. 2014). National and supranational governments are aware that the maintenance of agroecological systems must be a pillar of societies and therefore invest large amounts in their conservation and the creation of sustainable production networks (Comunidad Europea 2016; Lainez et al. 2018). However, it is necessary to develop new technologies, or adapt existing ones, to reduce the environmental impact of this activity without affecting their productivity, so the use of microorganisms as biofertilizers is a growing tool in the last times (Mohammadi & Sohrabi 2012; García-Fraile et al. 2015). The development of new biofertilizers must follow the principle of biosecurity avoiding the use of any microorganism that supposes a problem for the health of humans, animals or plants (Mendes et al. 2013; Jiménez-Gómez et al. 2018). Therefore, *rhizobia* is one of the best options for the design of biofertilizers since, after years of use as legume inoculants, they have not caused health or environmental problems. Due to the inability of these bacteria to fix atmospheric nitrogen, bacterial consortiums with rhizobia and other plant growth promoting bacteria (PGPB) have been used mainly when their use is directed to non-legume crops. The search for these other PGPBs can be made in soil and rhizosphere, but in recent years it has also been directed to the same environment as *rhizobia*, the nodule, assuming good compatibility with these bacteria, since they occupy the same niche, on the other hand as specific as are the nodules of the legumes. The formation of these nodules is a molecular process dominated by the interaction of the *rhizobia* with the legume, and host and endosymbionte must present an adequate genetic compatibility (Velázquez et al. 2017b).

With regard to *rhizobia*, in this study they have been isolated from nodules of two legumes with different geographical origins and distribution centers. *P. vulgaris* is a legume native to America that was distributed in Europe through Spain from the 16th century (Díaz-Alcántara et al. 2014). When *P. vulgaris* arrived in Spain, other legumes from the Middle East, such as *P. sativum*, had been growing for centuries. These two legumes, therefore, had co-evolved separately in their respective distribution centers and both the species and the symbionts that nodulate them are different. However, in all cases, their endosymbionts are fast-growing strains of the *Rhizobiaceae* Family (Velázquez et al. 2017). When *P. vulgaris* arrived in Spain, its cultivation spread throughout the country, but in certain areas, mainly due to the fact that the soils were rainfed, this legume was never cultivated, keeping the cultivation of local legumes. This is the case of the La Armuña area in Salamanca in which other local crops, such as lentil or chickpea, are traditional. For this reason, it is of great interest for the biogeography studies of the *P. vulgaris-rhizobia* symbiosis to know the strains that nodulate this legume in those types of regions in which its cultivation has not been introduced. On the other hand, also in reverse situations, as is the case of irrigated land in which the crop with local legumes is well established, as is the case of *P. sativum* in Valladolid is very interesting the analysis of the *rhizobia* that establish symbiosis with this legume. From nodules of these two legumes and in the geographical locations mentioned, 59 fast-

growing strains were isolated in YMA medium that were capable of reinfecting their respective hosts, *P. vulgaris* and *P. sativum*. Most of these strains were identified at the species level by phylogenetic analysis of the 16S ribosomal genes and of two housekeeping genes, *recA* and *atpD*, whose sequences are accessible to all fast-growing *rhizobia* species in public databases. The analysis of the 16S ribosomal gene showed that the strains belong to a phylogenetic group of *R. leguminosarum*, which is the type species of the genus *Rhizobium* (Kuykendall et al. 2015), and contains several species with identical 16S ribosomal gene sequences, *R. indigoferae*, *R. laguerreae*, *R. anhuiense*, *R. sophorae*, *R. acidisoli* y *R. hidalgonense* (Villadas et al. 2017; Yan et al. 2017). All these species, except *R. indigoferae* whose type strain is very close to that of *R. leguminosarum*, are differentiated by the sequences of the *recA* and *atpD* genes (Villadas et al. 2017) and, therefore, the identification of the new isolates of this group has to be based fundamentally on the analysis of these genes. However, the strains isolated in this study presented certain peculiarities that have not been previously observed in the type strains of the species of the *R. leguminosarum* group, one of which is that although some strains showed similarities close to 100% in the two *housekeeping* genes analyzed, some of them showed differences along the 16S ribosomal gene sequence, with the additional presence in some strains of an insert of about 70 base pairs at the beginning of the sequence of this gene. An insert of this type was located for the first time in *R. leucaenae* (Willems & Collins, 1993) and later in many strains of different genera and species of the order Rhizobiales, but, although it is always placed in the same position in the 16S ribosomal gene, it presents variations in the sequence in different genera and species. However, until now, the usefulness of this type of insert as a phylogenetic marker in this group of bacteria can not be established, contrasting to what occurs in the case of *Faecalibacterium*, in which it has been proposed to detect faecal contamination in waters (Duan et al., 2016; Sun et al., 2016). On the other hand, strains that presented identical sequences in their 16S ribosomal genes, presented similarities of around 97% in the *recA* and *atpD* genes, this fact being very common in the *R. leguminosarum* group since even the type strains of several species possess identical 16S ribosomal genes, but divergent housekeeping genes. In any case, and despite the differences found in the 16S ribosomal genes and in the *recA* and *atpD* genes in the strains isolated in this study, all of them must be ascribed to the species *R. laguerreae* (Fig. 88). This species has been isolated up to now from nodules of *Vicia faba* and *P. sativum* in different regions of the world such as Spain, Peru and Tunisia (Saïdi et al. 2014), Argel (Belhadi et al. 2018), China (Xiong et al. 2017) and Morocco (Taha et al. 2018), however, up to now it had not been isolated from nodules of *P. vulgaris*.

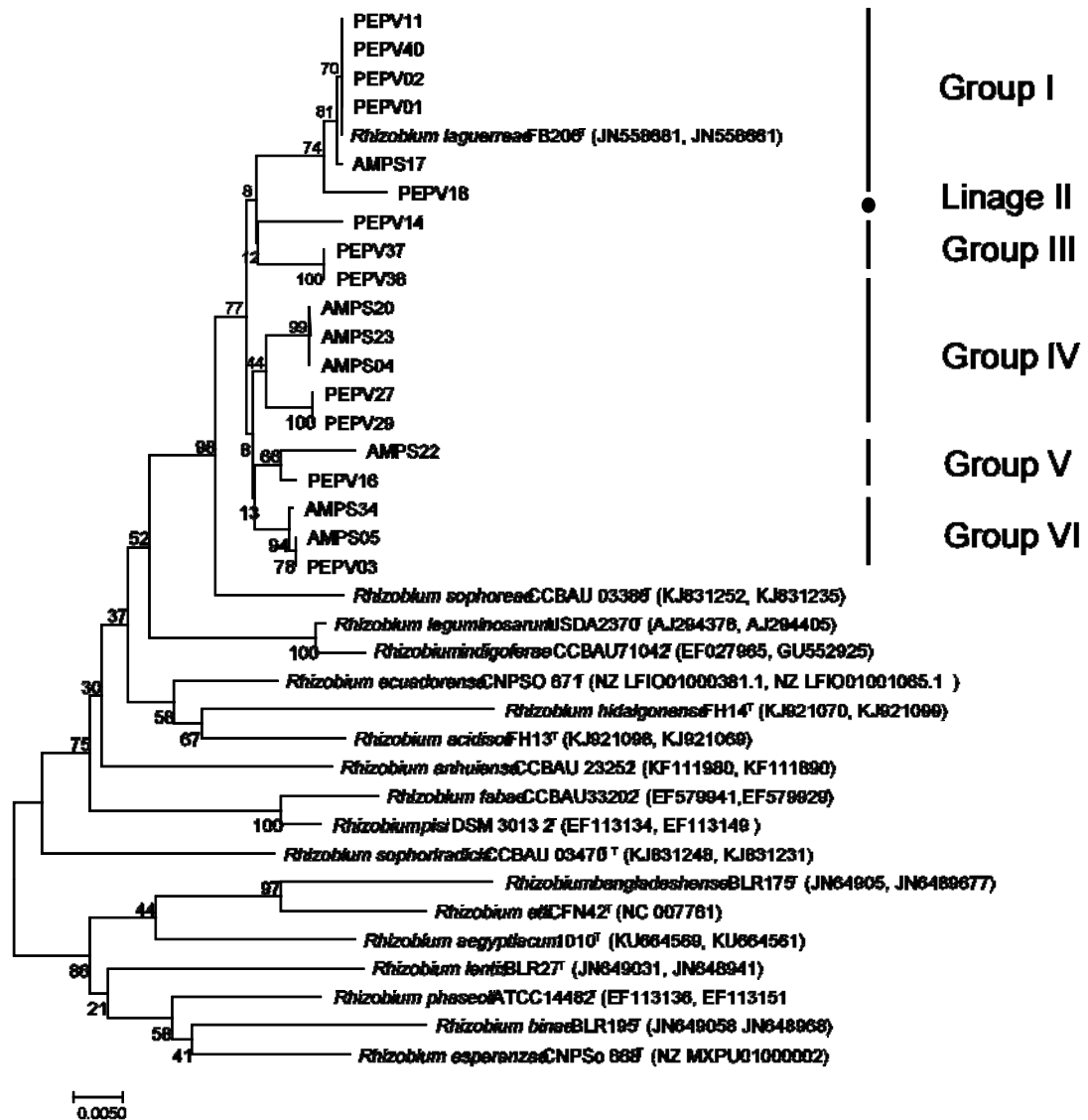


Figure 88. Phylogenetic analysis of the concatenation of the *recA* and *atpD* genes concatenated from the strains of this study and their closest species described in the genus. The analysis was obtained with the Neighbor-Joining method and the Kimura 2 parameter, based on 1000 replies

However, the most interesting results are those obtained after identification at the simbiovar level by means of the analysis of the *nodC* gene, a gene that has been used for the delimitation and description of simbiovars in all the *rhizobia* groups (Velázquez et al. 2017). According to the analysis of this gene, all the strains of the species *R. laguerreae* identified so far and that have been isolated from legume nodules of the *Vicia* cross inoculation group belong to the simbiovar *viciae* (Belhadi et al. 2018; Taha et al. 2018; Villadas et al. 2017). Therefore, taking into account that *P. sativum* belongs to this cross inoculation group and is a very restrictive host, the strains of this study isolated from nodules of this legume carry *nodC* genes characteristic of the simbiovar *viciae*, although after the analysis of this gene, it was found that they belong to different phylogenetic groups, among them, and with respect to the species whose

type strains were originally isolated from *P. sativum*, specifically *R. leguminosarum* and *R. pisi* (Ramírez-Bahena et al. 2008).

Surprisingly, the analysis of the *nodC* genes of the strains isolated from nodules of *P. vulgaris* showed that these strains also belonged to the simiovar *viciae*, although the symbiovar *phaseoli* is the most common endosymbiont of this legume in its American distribution centers (García- Fraile et al., 2010; Díaz-Alcántara et al., 2014). However, the promiscuous nature of *P. vulgaris* allows it to be nodulated by several simbiovars (Peix et al., 2014), which provides it with great versatility to adapt to new environments (Servín-Garcidueñas et al., 2014). In the case of this study, it allows *P. vulgaris* to nodulate with the endosymbiont that establishes symbiosis with the lentil, which is the local legume that has been cultivated for centuries in the area of La Armuña, and whose geographical origin coincides with that of *P. sativum*. These results are of great interest for the knowledge of the biogeography of the symbiosis *P. vulgaris*-*Rhizobium* and raise the need to extend the studies to other European soils in which other local legumes are cultivated.

In addition to the study of the diversity of *rhizobia* that induce the formation of nodules in legumes, in recent years there has been an increasing interest in identifying the bacteria that accompany the *rhizobia* in the nodules. As mentioned above, not all strains isolated from *P. vulgaris* nodules belonged to the species *R. laguerreae*, although all had typical colonies of *rhizobia* and rapid growth in YMA. However, analysis of 16S ribosomal gene sequences showed that one of the strains, PEPV15, belonged to the genus *Phyllobacterium*, a genus closely related to *rhizobia* and that contains some species capable of inducing nodules in legumes, as occurs in the case of *P. trifolii* isolated from clover nodules in the same locality from which the strains of this study were isolated (Valverde et al., 2005) and the more recently described *P. sophorae*, which nodulates *Sophora flavescens* in China (Jiao et al. 2015). The strain PEPV15 isolated in this study showed similarities lower than 99% in the sequence of the 16S ribosomal gene with respect to the type strains of the species described to year 2013 in the genus *Phyllobacterium* and, after analyzing the gene *atpD*, it was found that It was very divergent to all of them. Therefore, the study of the taxonomic status of the strain PEPV15 with genetic, chemotaxonomic and phenotypic tests was completed to describe the new species which was named *Phyllobacterium endophyticum* (Flores-Felix et al., 2013) because the strain PEPV15 was not capable of originating nodules in *P. vulgaris*, nor was the presence of the *nodC* gene detected by PCR or genome analysis.

However, the broader analysis of endophytic bacteria was carried out in *P. sativum* nodules because the plants were harvested directly in the field and it was a well established legume in the soil of the area analyzed after years of cultivation. In addition, there are scarce studies about the endophytic populations of the *P. sativum* nodules (Tariq et al., 2014), so the study of them in different geographical locations will contribute to the increase of knowledge of this ecosystem. On the other hand, it is essential to identify the endophytic bacteria of plants, both nodules and other organs, since normally these studies are aimed at the selection of strains with the capacity to

promote the growth of plants and be able to employ as biofertilizer. For this purpose, it is necessary to discard those potentially pathogenic for humans, plants and animals (Flores-Félix, Marcos-García, et al 2015, Alegria Terrazas et al 2016, Carro & Nouioui 2017).

In this study strains of endophytic bacteria were isolated from the same nodules used to isolate the *rhizobia* strains and were identified by the 16S ribosomal gene analysis because this gene is currently universally used for the classification and identification of prokaryotes (Chun et al. at 2018). The results obtained after the analysis of this gene showed that the isolated strains belonged to different species of the genera *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Dermacoccus*, *Domibacillus*, *Massilia*, *Paenibacillus*, *Paenisporosarcina*, *Phyllobacterium* and *Terribacillus* (Fig. 89). These data confirm that legume nodules contain a wide variety of bacteria, besides being an important source of new species described above all in recent years (Velázquez et al., 2017 a and b). In the case of the Gram-positive endophytic bacteria, which were the most frequently isolated, until recent years, the analysis of some housekeeping genes has not begun to be included in the descriptions of new species, so that identification at the species level based on the analysis of the 16S ribosomal gene and intra-specific similarities higher than 99.5% are accepted, while lower values usually correspond to different species. Taking into account these values, Gram positive bacteria of the phylum Firmicutes of the genus *Bacillus* predominated in this study, being the most abundant *B. simplex* with 10 strains, followed by *Bacillus tequilensis* with 4 strains, and, finally, *B. aryabhatai* and *B. idriensis* with a strain each and a strain close to *B. simplex* that could belong to another species. Both strains of the genus *Psychrobacillus* could also represent new species phylogenetically related to *P. psychrodurans* and *P. lasiicapiti*, as well as the two strains of *Paenisporosarcina* that could belong to a new species phylogenetically related to *P. quisquiliarum*. Finally, *Paenibacillus tundrae*, *Terribacillus goriensis* and *Oceanobacillus sojae* were identified within this phylum. The only isolated strain of phylum Actinobacteria was identified as *Dermacoccus nishinomiyaensis*. The Gram negative strains belonged to the phylum Proteobacteria and were identified as *Agrobacterium skierniewicense*, 2 strains, and *Massilia suwonensis*, 4 strains. Some of these genera, such as *Bacillus* and *Paenibacillus* have been frequently isolated from nodules of different legumes such as *Medicago* (Khalifa & Almalki 2015, Lai et al 2015), *Oxytropis* (Wei et al., 2015, Xu et al., 2014), *Cicer* (Carro et al., 2013), *Caragana* (Xu et al., 2014), *Lupinus* (Carro et al., 2014), *Cytisus*, *Lathyrus*, *Melilotus*, *Ononis* or *Trifolium* (De Meyer et al., 2015).

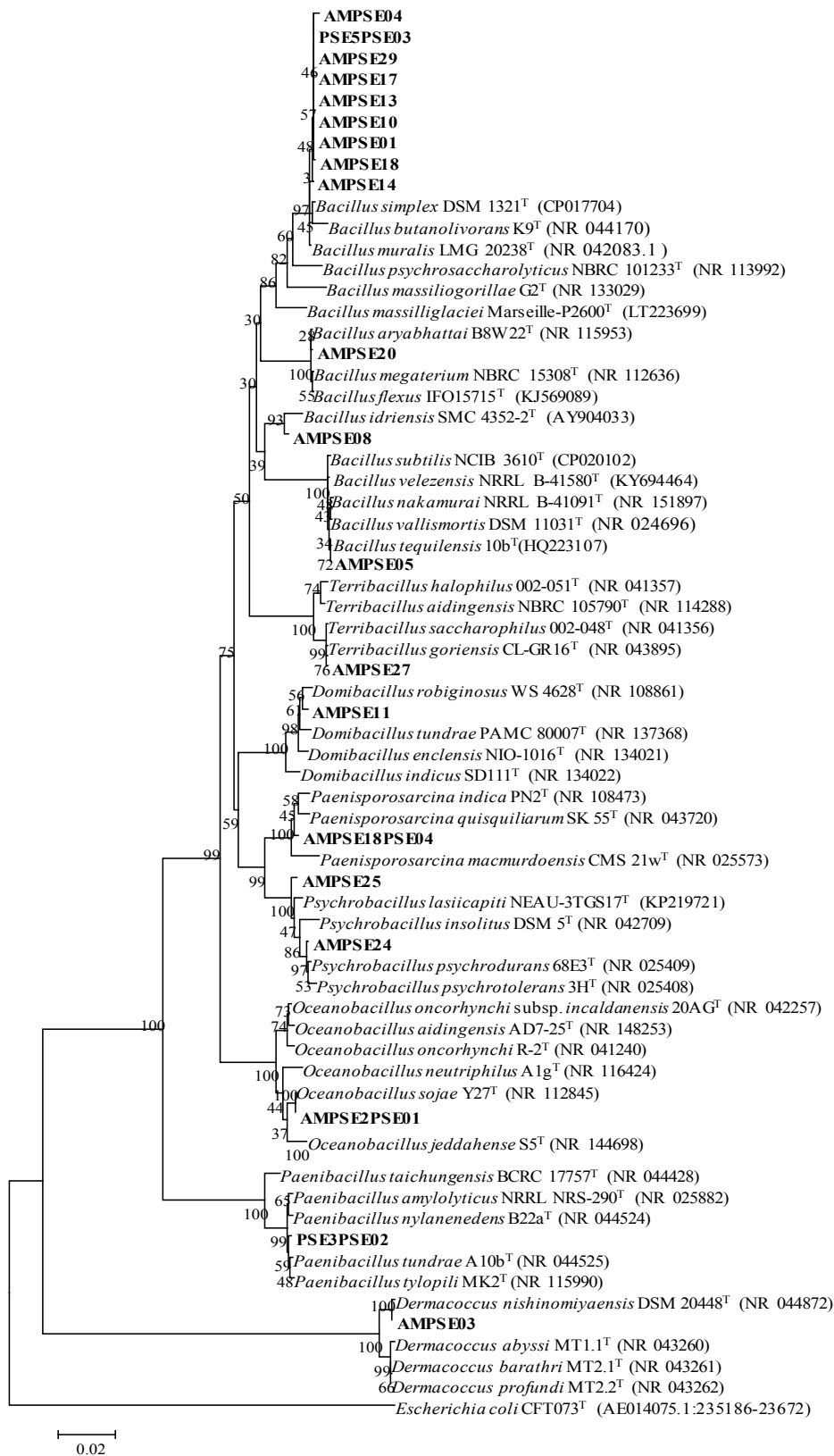


Figure 89. Phylogenetic analysis of the 16S ribosomal gene of the Gram positive strains isolated in this study. The analysis was obtained with the Neighbor-Joining method and Kimura 2 parameters test, based on 1000 replicas

One of the fundamental objectives of this study has been the selection of strains of both *rhizobia* and endophytic bacteria of the nodule to be used as biofertilizers. To achieve this goal, we began by studying several mechanisms of plant growth promotion *in vitro* that have been linked in previous studies with the ability of bacteria to increase the development and performance of plants, among which we should highlight the production of indole acetic acid and siderophores and the phosphate solubilization (Glick, 2012; Pii et al., 2015; Olanrewaju et al., 2017). The indole acetic acid is a phytohormone synthesized by numerous bacteria through various metabolic pathways (Etesami et al., 2015), having been shown as an essential tool of the bacteria that promote plant growth, since it directly influences the development of secondary roots (Duca et al., 2014). The siderophores play a fundamental role in the nutrition of both the microorganism and the plant, which allow a better uptake of this element in conditions in which iron is not available (Chu et al., 2010), tolerance to metals heavy and toxic metalloids such as arsenic (Funes Pinter et al., 2017; Wang et al., 2017) and in the control of fungal pathogens in the rhizosphere, by decreasing the concentration of available iron (Saha et al., 2016). Phosphate solubilization has been studied in recent times due to the importance of phosphorus in plant nutrition and the problems caused by its deficit (Anand et al., 2016; Khan et al., 2014), so the selection of microorganisms with this potential it has been one of the main pillars in the selection of inoculants (Zaidi et al., 2017).

The strains of *Rhizobium* isolated in this study produced different levels of indole acetic acid and in some of them the production of siderophores and solubilization of phosphate was positive, results that coincide with those of other previous studies for different strains of *Rhizobium* (García-Fraile et al. 2012). It should be noted that these results have already been published in the case of the strains of *Rhizobium* PEPV16 and PEPV40 (Flores-Félix et al., 2013; Jiménez-Gómez et al., 2016) and of the PEPV15 strain of *Phyllobacterium* (Flores-Félix, Silva, et al., 2015). In the case of indole acetic acid, the levels ranged between 90 mg/l and 10 mg/l, concentrations similar to those observed in other strains of the genus *Rhizobium* (Ghosh & Basu 2006; Yadav & Verma 2014). As regards the production of siderophores, many of the isolated strains were present in moderate quantities and similar to those described for other *Rhizobium* species, such as *R. leguminosarum* (García-Fraile et al., 2012). In the case of phosphate solubilization, it was more common among strains isolated from *P. vulgaris*, among which are the only strains capable of solubilizing tricalcium phosphate. This capacity is not very common in *Rhizobium* strains, which usually have low solubilization capacity of tricalcium phosphate, however, there are some bibliographic data on the solubilization of this phosphate for strains of *R. leguminosarum* (Abril et al., 2007).

On the other hand, endophytic strains isolated from *P. sativum* nodules also showed the capacity to produce siderophores, solubilize phosphate or produce phytohormones in a greater or lesser proportion. For example, strains of the genus *Bacillus*, which have been frequently isolated in this study, but also from nodules of

other legumes (Xu et al., 2014, De Meyer et al., 2015) showed a great diversity of mechanisms. Altogether, approximately 50% of the endophytic bacteria produced siderophores, especially highlighting two strains, AMPSE14 and AMPSE17. The levels of indole acetic acid were also very diverse, with values ranging between 396 and 14 mg / l, and specifically between 137 to 14 mg / l in the case of strains of *B. simplex*, coinciding with those obtained for other strains of the *Bacillus* genus isolated from purple corn roots (Castellano-Hinojosa et al., 2018). Strains of the species *A. skierniewicence* showed very high activities, such as the strain AMPSE16 with 396 mg / l, levels that could become harmful for plants (Gohlke & Deeken 2014). Regarding the production of siderophores, it was presented by approximately half of the strains, among which we can highlight the capacity of strains AMPSE14, AMPSE17 and AMPSE20 of the genus *Bacillus*, which contains many species that produce these compounds (Yu et al. 2011; Saha et al., 2016). The solubilization of phosphate showed heterogeneous results and only two strains, AMPSE20 and PSE3PSE02, belonging to the genera *Bacillus* and *Paenibacillus*, respectively, were able to solubilize tricalcium phosphate. Both *Bacillus* and *Paenibacillus* genera are phosphate solubilizers (Grady et al 2016, Meena et al., 2017).

Another aspect studied was the production of substances that regulate *Quorum sensing* systems. These systems have special relevance in *Rhizobium* and related genera where their involvement in the change from sessile to planktonic phase, nodulation, exopolysaccharide synthesis and horizontal gene transfer processes have been described (Sanchez-Contreras et al., 2007; Bogino et al. 2015). In our case, we have observed how each of the isolates presents a production of acyl-homoserin-lactones (AHL), the main *Quorum sensing* signals in Gram negative, considerably variable. These data may indicate different sensitivities to AHL or different intrinsic production capacity, in other words, population recognition systems show a high variation between strains of the same species as has also been observed in *Burkholderia* (Poonguzhali et al., 2007) . Different concentrations of AHL have been related, in turn, to the ability to swarm in *Rhizobium*, so that different activities can determine differences in colonization capacity in the rhizosphere (Dixit et al., 2017).

The results of the study of these mechanisms allowed us to select several strains of both rhizobia and endophytic bacteria to study in depth their capacity to colonize, firstly, abiotic surfaces and, secondly, the roots of plants, before to test the results of its inoculation in the plant in microcosm tests and later in the field. The ability to form biofilms and actively colonize the root surface is an advantage for the bacteria, as it is able to compete for space, relegating other bacteria from its area of action; In turn, the plant is able to increase its direct interaction radius due to contact with the biofilm (Lugtenberg 2015). In this study, the ability to originate biofilms was analyzed by qualitative and quantitative methods, observing similar productions and behaviors in the case of the *Rhizobium* strains selected, but very different between them and those of the *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates that formed very dense biofilms, being these two genera very well studied in the characterization of biofilms, by their intensity,

dimension and speed of formation (Branda et al. 2001, Morikawa 2006, Wijman et al., 2007, Bridier et al., 2013). In this study we have analyzed for the first time the effect on the formation and evolution of the biofilms of *Rhizobium* coinoculation with *Bacillus* and *Paenibacillus*, since studies of mixed biofilms have focused so far on pathogenic species such as *Salmonella* (Jahid et al. al. 2015), *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* (Lee et al., 2014). The results showed that in the biofilms formed they were very influenced by the presence of *Rhizobium*, reducing the intensity and integrating both species together (Fig. 90).

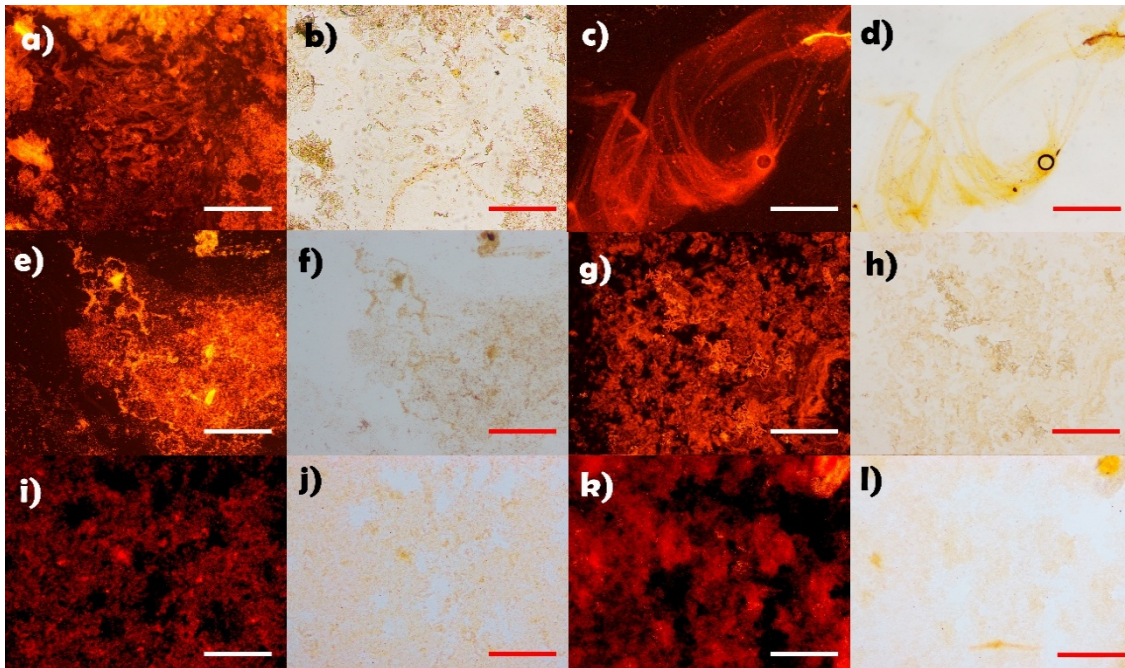


Figura 90. Optical microscopy and fluorescence microscopy of Iso colonization patterns shown by the selected strains. Fluorescence microscopy a) and c), and optics b) and d) of the mixed biofilm between AMPS34 and AMPSE14 in each of the observed phases. Fluorescence microscopy e) and g), and optics f) and h) of the mixed biofilm of AMPS34 and AMPSE20; and fluorescence microscopy i) and k), and optics j) and l) of the morphology of the msixto biofilm of AMPS34 and PSE3PSE02. The size of the bars is a), b), e), f), g), h), i), j), k) and l) 20 μm , and c), d) 50 μm .

Once the ability of the strains selected in this study to produce biofilms on abiotic surfaces was known, their ability to colonize the roots of various plants was tested, as this is a crucial step in the promotion of plant growth (Compant et al. 2010). The strains *P. endophyticum* PEPV15 and *R. laguerreae* PEPV16 colonized the roots of crops as diverse as strawberry, lettuce and carrot. In addition, an endophytic colonization of the tissues of the roots of lettuce was observed. Both in the case of *Rhizobium* and *Phyllobacterium*, these data confirm their ability to interact with plants, since most of these species have been isolated from plant species (Mergaert, & Swings, 2015, Velázquez et al., 2017 a and b). In the case of the endophytic strains *Bacillus simplex* AMPSE14 and *Paenibacillus tundrae* PSE3PSE02, both were able to colonize

the nodules of *P. sativum* and also the roots of maize in an endophytic manner showing scattered patterns similar to those observed in other endophytes of the genera *Bacillus* and *Paenibacillus* in wheat (Hassen & Labuschagne 2010) or arabidopsis (Fan et al. 2012) and *Herbaspirillum* in roots of *P. vulgaris* (Monteiro et al. 2012), with a dispersed internal colonization highly restricted to the intercellular spaces.

P. endophyticum PEPV15 and *R. laguerreae* PEPV16 showed capacity to improve production in very different crops, thus, the study of its genome showed to be a remarkable tool to analyze the potential of both strains, being able to locate in its genome not only genes involved in mechanisms observed *in vitro*, but other genes involved in different mechanisms of plant promotion and competition in the rhizosphere such as the production of volatiles, synthesis of polysaccharides or lytic enzymes. This tool has been shown to be very useful in the study of PGPB of different genera such as *Burkholderia* (Kwak et al., 2012), *Pseudomonas* (Roca et al., 2013), or *Micromonospora* (Carro et al., 2018), highlighting the potential of the strains analyzed through the mining of the genome and its analysis using specific programs (Weber et al., 2015). The study of the genome allows to discern the suitability of a strain as biofertilizer by studying the metabolic pathways present as Francis et al. (2016) in strain D188 of *Rhodococcus fascians*. Or the design of strategies of action through the knowledge of the nutritional requirements and the necessary substrates for the synthesis of compounds of interest, giving way to the possibility of specific treatments through the use of a strain (Crovadore et al. 2016; Pan et al. 2017).

Although colonization is an essential step for the success of a biofertilizer, trials to promote plant growth are decisive, since the application of a biofertilizer is not always fruitful and depends on multiple factors (Herrmann & Lesueur 2013; Lesueur et al. 2016). According to the results obtained in this study, strains PEPV15 and PEPV16 showed excellent results in axenic and microcosm conditions, supporting the idea that *rhizobia* and related bacteria such as *Phyllobacterium* can be an excellent alternative to improve the efficiency of agricultural systems modern (Vargas et al. 2017). Its use should not only be restricted to leguminous plants, where its effectiveness is demonstrated (Mulas et al. 2011), but it can be extended to fresh consumption plants where they also provide security for human health (García-Fraile et al. 2012; Rubio-Canalejas et al. 2016). The results of the field trials have shown the enormous potential of *Rhizobium* as biofertilizer of non-legumes, improving the production of leaf, fruit and root of various crops such as strawberry, lettuce, carrot, pea and corn, a spectrum of action desired for any biofertilizer (Fig. 91) (Anon 2015; Verma et al., 2016) and which is normally obtained through the use of complex consortiums of microorganisms that combine various growth promotion mechanisms (Reddy & Saravanan 2013) to supply the deficiencies that each one of them may present. they, or produce synergies among them (Rojas-Solis et al., 2016).



Figura 91. a) Carrot field test b) carrots from control plants (left) and inoculated with PEPV15 (right), d) carrots from control plants (left) and inoculated with PEPV16 (right).

In this study, different consortiums of bacteria and *Rhizobium* have also been used in legumes and cereals that can be used in crop rotation or intercropping, farming systems that have important advantages in terms of fertility and maintenance of optimal soil conditions, such as nitrogen input when using a legume (Espinoza et al., 2012), the phytoextraction of nutrients from edaphic horizons below higher horizons (Robacer et al., 2016), and the change of soil structures due to different root systems (Zaccheo et al., 2016). The use of consortia of *rhizobia* and endophytic bacteria generated good results in pea in axenic, microcosm and field conditions, coinciding with what was observed for other legumes, such as soybean, with coinoculations of *Bradyrhizobium* and *Bacillus* or *Methylobacterium* (Subramanian et al., 2015) and of *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* (Masciarelli et al. 2014), the bean, with *Rhizobium* and *Bacillus* or *Paenibacillus* (Korir et al. 2017) and the chickpea, with *Mesorhizobium* and *Pseudomonas* (Yadav & Verma 2014), showing that the use of bacteria consortia can be a good alternative to improve the yield of legumes. However, where the use of bacterial consortia is more important is in maize, due to the nutritional needs of this cereal that requires nitrogen inputs, which can be supplemented by fertilization with *Azospirillum* with *Rhizobium* (Fukami et al. 2018). or of *Azotobacter* with *Bacillus* and *Pseudomonas* (Jarak et al., 2012). Although in our study we found that some consortia showed good results in corn, in field conditions the best result was obtained in the simple treatment with *Rhizobium*, unlike the productions observed in microcosm or illuminated chamber,

showing the capacity to promote the growth of the strains of this genus and its enormous potential as a biofertilizer for all types of crops.

Conclusions

Conclusions

According to the results obtained in this work, the following conclusions can be established:

1. *In soils of the province of Valladolid traditionally cultivated with Pisum sativum and in soils of the province of Salamanca not cultivated with Phaseolus vulgaris, both legumes establish symbiosis with Rhizobium laguerreae sv viciae, which until now was only considered a typical endosymbiont for the legumes from the Pisum cross inoculation group. The present discovery is essential for biogeography studies of P. vulgaris because expose the needed to study it in greater depth the Rhizobium-Phaseolus symbiosis in European soils*
2. *The bacterial communities that live within the endosymbionts in the nodules of P. sativum have barely been studied, being in this study in which greater diversity of these bacteria has been found, identifying 9 genera and 14 species, some of them probably new, that have not previously been documented in the literature as endophytes of pea nodules*
3. *The new Phyllobacterium endophyticum species has been isolated from nodules of P. vulgaris, which shows that the nodules of legumes are a source of new species of bacteria and, therefore, it is necessary to continue deepening the study of this ecosystem*
4. *The analysis of the genomes of the strains P. endophyticum PEPV15 and R. laguerreae PEPV16 allowed the localization of genes involved in metabolic pathways related with plant growth promotion and Quorum sensing. This confirm that the analysis of genomes is a very useful tool for the selection of bacterial strains with potential as biofertilizers*
5. *The strains P. endophyticum PEPV15 and R. laguerreae PEPV16, isolated from nodules of P. vulgaris showed high potential as PGPB, the ability to produce molecules involved in the colonization of plants and formation of biofilms on abiotic surfaces, a good colonization of the roots of strawberry, lettuce and carrot and an increase in the production of them under microcosm and field conditions. Therefore, these strains are fit for the design of biofertilizers for horticultural crops.*
6. *Endophytic strains Bacillus simplex AMPSE14 and Paenibacillus tundrae PSE3PSE02 isolated from nodules of P. sativum were able to colonize the nodules of pea and the roots of maize, and showed excellent results in consortia with R. laguerreae AMPSE34 under microcosm conditions. However, the best results in field conditions were achieved after simple inoculation of the R. laguerreae AMPS34. Therefore, Rhizobium is also the best candidate for the design of biofertilizers for legumes and cereals.*

Anexos

Anexo I

En el presente anexo se adjunta la composición de los medios y soluciones nutritivas utilizados en la esta tesis doctoral.

Tabla 4. Medio YMA (Yeast Manitol Agar).

Medio YMA	
K₂HPO₄ (Fluka™)	0,5 g.
MgSO₄ (Fluka™)	0,2 g.
NaCl (Fluka™)	0,1 g.
Manitol (Fluka™)	10,0 g.
Extracto de levadura (Difco™)	0,2 g.
Agar (Conda™)	20,0 g.
Agua destilada, c.s.p.	1 l.

Tabla 5. Medio TSA (Tryptic Soy Agar)

Medio TSA	
Digerido pancreático de caseina	15 g
Digerido papaínico de soja	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	20 g
H₂O	1 litro

Tabla 6. Medio TY (Tryptone Yeast extract)

Medio TY	
Cl₂Ca (Codex™)	0,9 g.
Triptona (Difco™)	5 g.
Extracto de levadura (Difco™)	3 g.
Agar	20 g
H₂O	1 l.

Tabla 7. Composición del medio Pikovskaya

Pikovskaya Agar	
Extracto de levadura	0,5 g
Glucosa	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂ ó Ca ₂ PO ₃	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄	0,1 g
MnSO ₄ (H ₂ O)	0,0001 g
FeSO ₄	0,0001 g
Agar	20 g
H ₂ O	1 litro

Tabla 8. Solución 2 de la preparación del medio M9-CAS-Agar

Solución 2	
PIPES	30.24 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1.0 g
Agar	15 g
H ₂ O	750 ml

Tabla 9. Solución 3 de la preparación del medio M9-CAS-Agar

Solución 3	
Sacarosa	2 g
Manitol	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	493 mg
CaCl ₂	11 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.17 mg
H ₃ BO ₃	1.4 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.0 mg
H ₂ O destilada	70 ml

Tabla 10. Composición del medio JMM base, y JMM-DFsales modificado.

	Medio JMM (g/l)	Medio DF-sales (g/l)
D-(+)-galactosa	1,8	
L-(+)-arabinosa	1,5	
Glucosa		4
Manitol		8
Piruvato		4
K ₂ HPO ₄	26,1 · 10 ⁻³	0,6
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0,4
NaCl		0,2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5,5 · 10 ⁻³	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	147 · 10 ⁻³	
Solución de vitaminas (Tabla 8)	1 ml	1 ml
Solución de elementos traza (tabla 9)		1 ml

Tabla 11. Composición de la solución de vitaminas

Solución de VITAMINAS	mg/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
Pantotenato cálcico	20,0
Inositol	120,0

Para la preparación de la solución de vitaminas (Fluka TM), todos los ingredientes se disolvieron en Na₂HPO₄ 0,05M (pH 7,0) y se esterilizaron por filtración.

Tabla 12. Solución de elementos traza

Composición Solución de 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

Para la preparación de la solución de elementos traza, los ingredientes se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH a 5,0 y se añadió EDTA 1 g/l. Todos los reactivos utilizados son de Panreac.

Tabla 13. Composición medio AB

Medio AB	
K ₂ HPO ₄	3 g
NaH ₂ PO ₄	1 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g
KCl	0,15 g
CaCl ₂	0,01 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 mg
Glucosa	5 g
H ₂ O	1 l

Tabla 14. Composición medio Luria-Bertani (LB)

Composición LB	g/l
Triptona peptona (Difco)	10,0
Extracto de levadura (Difco)	5,0
NaCl (Panreac)	10,0

Tabla 15. Composición del medio ϕ

Medio ϕ	g/l
Triptona peptona (DIFCO)	20
Extracto de levadura (BD)	5
KCl (Panreac)	0,75
MgSO₄ (Panreac)	4

Tabla 16. Composición del medio mínimo

Composición Medio mínimo	g/l
K₂HPO₄ (Panreac)	0,3
KH₂PO₄ (Panreac)	0,3
MgSO₄ · 7H₂O (Panreac)	0,15
CaCl₂ · 2H₂O(CODEX)	0,05
NaCl (Panreac)	0,1
NH₄NO₃ (Prolabo)	0,1
Manitol	10,0

El medio mínimo se ajustó a pH 7,0 con K₂HPO₄ o KH₂PO₄ y después de su esterilización se agregaron las cantidades necesarias de las soluciones de vitaminas (tabla 8) y elementos traza (tabla 9).

Tabla 17. Composición del medio VRB

Composición Violet Red Agar	g/l
Extracto de levadura	3,0
Peptona	7,0
Sales biliares	1,5
Lactosa	10,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar	15,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002

Tabla 18. Composición del medio Rigaud & Puppo

Solución Rigaud & Puppo	g/l
KH_2PO_4 (Panreac™)	0,200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac™)	0,200
KCl (Panreac™)	0,200
EDTA Fe Na_2 (Sigma™)	0,025
Na_2MoO_4 (Panreac™)	0,004
H_3BO_3 (Panreac™)	0,018
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Panreac™)	0,02
ZnSO_4 (Panreac™)	0,003
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Panreac™)	0,002

Tabla 19. Composición del medio Fahraeus

Fahraeus	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac™)	0,12
KH_2PO_4 (Panreac™)	0,10
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac™)	0,15
Citrato férrico (Panreac™) *	1mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Codex)	1mL
Solución de oligoelementos Fahraeus (tabla 17) *	1mL
NH_4NO_3 50mM (Sigma) *	3.20g

*Estos reactivos se añaden una vez realizado el autoclavado.

Tabla 20. Solución de oligoelementos del medio Fahraeus.

Solución de oligoelementos	Cantidad para 200mL (1mg/mL)
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	200 mg
H_3BO_3	200 mg
Na_2MoO_4	200 mg

Anexo II

En el presente anexo se incluyen las composiciones y metodología para preparar los tampones y soluciones utilizados en esta tesis doctoral.

Tabla 21. Tampón SSC

Tampón SSC		
	Concentración	Cantidades
NaCl (Fluka™)	3,0 M	8,77 g
Na-citrato pH 7,0	0,3 M	4,41 g
Agua c.s.p.		1,00 l

Tabla 22. Proporción de las soluciones de ácido cítrico 0,1 M y Na₂HPO₄ 0,2 M, y completar hasta 100 ml para obtener tampón PCA a los pHs deseados.

pH	ml de ácido cítrico	ml de Na₂HPO₄
4,5	37,8	22,2
5	24,3	25,7
5,5	22,2	27,8
6,5	13,6	36,4

Tabla 23 Cantidad de la solución de HCl 0,2 M a añadir a la solución Tris 0,2M para obtener el pH deseado hasta completar 50 ml..

pH	ml HCl
8	29,2
9	0,2

Tabla 24. Composición del reagente Salkowsky

Reagente Salkowsky	
FeCl₃ (0,5M)	20 ml
HClO₄ (35% v/v)	980 ml

Tabla 25. Tampones TFB1 y TFB2.

Composición tampón	TFB1	TFB2
RbCl₂ (Panreac)	12,092 g/l	1,209 g/l
MnCl₂·4H₂O (Panreac)	9,9 g/l	-
Acetato potásico	2,94 g/l	-
CaCl₂	1,47 g/l	11.02 g/l
Glicerol	15 % v/v	15% v/v
MOPS	-	2,093 g/l

Ambos tampones fueron esterilizados por filtración. El pH del tampón TBF1 fue ajustado a 5,8 con ácido acético 0,2 M y el tampón TFB2 frío fue ajustado a pH 7,0 con NaOH.