

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN AGROBIOTECNOLOGÍA (CIALE)



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

Análisis del endobacterioma asociado a *Rubus ulmifolius* Schott, evaluación del potencial antifúngico del volatilo bacteriano vinculado y estudio de la influencia de cepas de los géneros *Arthrobacter* y *Rhizobium* en la variación de la expresión génica relacionada con la tolerancia al estrés oxidativo en el modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*.

Analysis of the *Rubus ulmifolius* Schott associated endobacteriome, antifungal potential evaluation related with bacterial volatiles and study of *Arthrobacter* and *Rhizobium* strains influence on the gene expression variation related to oxidative stress tolerance of the *in vivo* model *Caenorhabditis elegans*.

Tesis doctoral presentada por Rocío Roca Couso para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca

Fdo. Rocío Roca Couso

Salamanca, 2024

Dr. Raúl Rivas González, Catedrático del Área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y Dr. José David Flores Félix del área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

AUTORIZAN:

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Análisis del endobacterioma asociado a *Rubus ulmifolius* Schott, evaluación del potencial antifúngico del volatilo bacteriano vinculado y estudio de la influencia de cepas de los géneros *Arthrobacter* y *Rhizobium* en la variación de la expresión génica relacionada con la tolerancia al estrés oxidativo en el modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*”, elaborada por Doña Rocío Roca Couso 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 22 de julio de 2024.

Fdo. Raúl Rivas González

Fdo. José David Flores Félix

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han acompañado y apoyado durante esta etapa predoctoral.

A mis directores de tesis, el Catedrático Raúl Rivas González y el Dr. José David Flores Félix, por haberme dado la oportunidad de realizar con ellos este trabajo y de iniciarme en el mundo de la ciencia. Por su dedicación, cercanía, disposición y por la confianza depositada en mí.

A todos mis compañeros del laboratorio. Con vosotros he compartido innumerables momentos, de alegría, de estrés, de drama y de emoción. Gracias por vuestros conocimientos, vuestra disposición para ayudarme cuando lo necesitaba y por alegrarme el día a día en el laboratorio. Gracias por las risas, las salidas y los momentos de desconexión que han logrado que forjemos una amistad.

Al profesor Andrea Squartini y a todo su equipo por acogerme y permitirme realizar la estancia predoctoral en su grupo.

A todos mis amigos de A Coruña y de Salamanca, por estar siempre ahí, las palabras de ánimo y por los momentos de diversión que me han ayudado a despejar la mente y seguir adelante.

Y, por supuesto, a mi familia a la que adoro. A mis padres, mi hermana, mis abuelos y mis padrinos, cuyo amor y apoyo incondicional han sido lo que me ha motivado a seguir adelante. A mis padres, José y María José, por inculcarme el valor del esfuerzo y la perseverancia, y por su apoyo emocional a lo largo de todos estos años. A Raquel, por esos momentos de cotilleos, sororidad y confianza que son tan importantes para mí. A Javier, por su paciencia, comprensión y por estar a mi lado en los momentos más estresantes, y a toda su familia, que me ha hecho sentir como en casa.

Sin la ayuda y el apoyo de todos vosotros, este logro no habría sido posible. A todos vosotros, muchísimas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I: ANÁLISIS METATAXONÓMICO DE LAS BACTERIAS ENDOFÍTICAS ASOCIADAS A LOS DIFERENTES TEJIDOS DE PLANTAS DE ZARZAMORA.....	5
CAPÍTULO II: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DEL INTERIOR DE PLANTAS DE ZARZAMORA...	9
CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS AISLADOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL.....	10
CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE LOS AISLADOS EN EL BIOCONTROL DEL HONGO FITOPATÓGENO <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	17
CAPÍTULO V: INOCULACIÓN DE PLANTAS DE ZARZAMORA CON LAS BACTERIAS SELECCIONADAS Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA MEJORA NUTRACÉUTICA DE LOS FRUTOS.....	20
CONCLUSIONES.....	26
SUMMARY	29
INTRODUCTION.....	31
OBJETIVES.....	32
CHAPTER I: METATAXONOMIC ANALYSIS OF ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH DIFFERENT TISSUES OF BLACKBERRY PLANTS.....	33
CHAPTER II: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ENDOPHYTIC BACTERIA COLLECTION FROM BLACKBERRY PLANTS' INNER.	36
CHAPTER III: CHARACTERIZATION OF THE ISOLATES' ABILITY TO PROMOTE PLANT GROWTH.....	37
CHAPTER IV: CHARACTERIZATION OF THE ISOLATES' BIOCONTROL POTENTIAL AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGUS <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	43
CHAPTER V: BLACKBERRY PLANTS INOCULATION WITH SELECTED BACTERIA AND ANALYSIS OF FRUIT PRODUCTION AND NUTRACEUTICAL IMPROVEMENT.....	46
CONCLUSIONS.....	51
1. INTRODUCCIÓN	53
1.1. CONTEXTO ACTUAL DE LA AGRICULTURA	55
1.1.1. Los fertilizantes y los pesticidas en la agricultura	56
1.2. LOS MICROORGANISMOS EN LA AGRICULTURA	58
1.2.1. La microbiota del suelo	59

1.2.2.	El microbioma de las plantas.....	60
1.2.2.1.	La colonización de la rizosfera.....	62
1.2.2.2.	La colonización de la filosfera.....	65
1.2.2.3.	La colonización de la endosfera.	66
1.2.2.4.	La relevancia del microbioma vegetal.....	67
1.2.3.	Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.....	68
1.2.3.1.	La fijación del nitrógeno.....	68
1.2.3.2.	La solubilización de fosfatos.	69
1.2.3.3.	La solubilización de compuestos de potasio.....	70
1.2.3.4.	La producción de sideróforos.	71
1.2.3.5.	La producción de fitohormonas.....	72
1.2.3.6.	La ACC desaminasa.	73
1.2.4.	Los mecanismos de biocontrol.....	73
1.2.4.1.	La producción de compuestos antifúngicos difusibles.....	74
1.2.4.2.	La producción de compuestos volátiles.....	75
1.2.4.3.	La competencia.	76
1.2.4.4.	La inducción de la resistencia sistémica.....	76
1.2.5.	La mejora de la calidad nutricional.....	77
1.3.	LA ZARZAMORA COMO CULTIVO DE ALTO VALOR NUTRICIONAL.....	78
1.3.1.	La composición de la mora y el efecto de su consumo en la salud... 80	
1.3.2.	La evaluación de la actividad biológica en organismos modelo..... 82	
2.	OBJETIVOS.....	85
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
3.1.	ANÁLISIS METATAXONÓMICO.....	91
3.1.1.	Toma de muestras vegetales.....	91
3.1.2.	Extracción del ADN y secuenciación de los amplicones.....	92
3.1.3.	Análisis bioinformático.....	92
3.1.3.1.	Procesamiento de las lecturas.....	92
3.1.3.2.	Análisis de la diversidad de las muestras.....	93
3.1.3.3.	Determinación de los ASVs compartidos y diferencias en la abundancia de los taxones bacterianos.....	93
3.1.3.4.	Predicción del metagenoma bacteriano.....	93

3.2. AISLAMIENTO.	93
3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.	95
3.3.1. Extracción y purificación del ADN.	95
3.3.2. Identificación de los perfiles de MALDI-TOF.	95
3.3.3. Amplificación del ADN mediante PCR.	96
3.3.3.1. Electroforesis.	96
3.3.3.2. Secuenciación.	96
3.3.3.3. Análisis filogenético de las secuencias genéticas.	97
3.3.4. Estudio de los genomas.	97
3.3.4.1. Herramientas de comparación de genomas.	97
3.3.4.2. Análisis filogenómicos de las secuencias genómicas.	98
3.4. ANÁLISIS TAXONÓMICO DE LA CEPA CRRU44.	98
3.4.1. Asimilación de fuentes de carbono y/o nitrógeno utilizando sistemas miniaturizados.	98
3.4.2. Análisis quimiotaxonómicos.	98
3.5. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> CON LAS CEPAS AISLADAS.	99
3.5.1. Determinación las condiciones óptimas de crecimiento.	99
3.5.2. Determinación las capacidades de promoción del crecimiento vegetal.	100
3.5.2.1. Solubilización de compuestos de fósforo.	100
3.5.2.2. Solubilización del compuesto de potasio.	101
3.5.2.3. Producción de sideróforos.	101
3.5.2.4. Producción presuntiva de auxinas y de ácido indol acético.	102
3.5.2.5. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.	104
3.5.2.6. Utilización del ACC desaminasa.	105
3.5.3. Caracterización fenotípica de las capacidades antifúngicas.	105
3.5.3.1. Obtención del hongo <i>Botrytis cinerea</i> .	106
3.5.3.2. Inhibición del hongo <i>Botrytis cinerea</i> mediante la síntesis de compuestos antifúngicos difusibles.	106
3.5.3.3. Inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> mediante la síntesis de compuestos antifúngicos difusibles.	106
3.5.4. Caracterización de la producción de enzimas líticas.	106
3.5.4.1. Amilasas.	107
3.5.4.2. Celulasas.	107

3.5.4.3.	β-glucosidasas.....	107
3.5.4.4.	Proteasas.....	108
3.5.4.5.	Quitinasas.....	108
3.5.4.6.	Xilanasas.....	109
3.5.5.	Producción de <i>biofilms</i>.	109
3.6.	ENSAYOS EN PLÁNTULA EN CONDICIONES DE LABORATORIO.	110
3.6.1.	Preparación de las soluciones bacterianas.	110
3.6.2.	Manejo del material vegetal.	110
3.6.2.1.	Esterilización de las semillas.....	110
3.6.2.2.	Condiciones de la cámara iluminada.....	110
3.6.3.	Preparación de la suspensión de esporas fúngicas.	110
3.6.4.	Estudios de colonización en plántula.	111
3.6.4.1.	Marcación bacteriana para localización en ensayos in vivo.....	111
3.6.4.2.	Visualización de la colonización.....	114
3.6.5.	Ensayo de la promoción del crecimiento vegetal.	114
3.6.6.	Estudio del biocontrol de <i>Botrytis cinerea</i> mediante la competición directa en plántula de tomate.	115
3.6.7.	Estudio de biocontrol de <i>Botrytis cinerea</i> mediante la producción de compuestos volátiles en plántulas de tomate.	115
3.7.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL VOLATILOMA.	116
3.7.1.	Preparación de las muestras.	116
3.7.2.	Extracción de los compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC-MS.	116
3.8.	ENSAYOS <i>IN PLANTA</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.	117
3.8.1.	Ensayos de la promoción del crecimiento vegetal en la cámara iluminada.	117
3.8.2.	Cuantificación de la colonización por qPCR.	117
3.8.2.1.	Toma de las muestras, procesamiento y extracción del ADN.....	117
3.8.2.2.	Diseño de los primers.....	118
3.8.2.3.	Diseño de la qPCR.....	118
3.8.2.4.	Determinación de la recta patrón.....	118
3.9.	ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE MORAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO.	119
3.9.1.	Obtención de las plantas de zarzamora.	119

3.9.2.	Ensayo en condiciones de invernadero.	119
3.10.	ESTUDIO DE MEJORA DE LA PRODUCCIÓN DE MORA EN CONDICIONES DE CAMPO.	119
3.10.1.	Ensayo en campo.	119
3.10.2.	Toma de datos de los parámetros de producción.	120
3.10.3.	Toma de datos de los parámetros fisicoquímicos.	120
3.10.4.	Toma de datos de los parámetros del color.	121
3.11.	CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS FRUTOS	121
3.12.	ENSAYO DE ESTRÉS TÉRMICO EN ORGANISMO MODELO <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>.	122
3.12.1.	Preparación y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>.	122
3.12.1.1.	Sincronización de la población.	123
3.12.1.2.	Obtención de los extractos de la mora.	123
3.12.1.3.	Ensayo de estrés oxidativo inducido térmicamente.	124
3.13.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.	124
3.13.1.	Toma de muestras y extracción de ARN de las plantas de tomate.	124
3.13.2.	Toma de muestras y extracción de ARN del organismo <i>Caenorhabditis elegans</i>.	125
3.13.3.	Obtención del cDNA.	125
3.13.4.	Cuantificación de la expresión de genes por qPCR.	125
3.13.5.	Condiciones de la qPCR.	126
3.14.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.	127
4.	CAPÍTULO I: ANÁLISIS METATAXONÓMICO DE LAS BACTERIAS ENDOFÍTICAS ASOCIADAS A LOS DIFERENTES TEJIDOS DE PLANTAS DE ZARZAMORA	129
4.1.	COMPOSICIÓN DE LOS ENDOBIOMAS BACTERIANOS ASOCIADOS A ZARZAMORA.	131
4.2.	ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE LAS MUESTRAS.	142
4.3.	ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DIFERENCIAL Y EL MICROBIOMA <i>CORE</i>.	148
4.3.1.	Análisis de la abundancia diferencial (DAA).	148
4.3.2.	Análisis del microbioma <i>core</i>.	150
4.4.	PREDICCIÓN DE LAS RUTAS METABÓLICAS ASOCIADAS A LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LAS PLANTAS DE ZARZAMORA.	154

5. CAPÍTULO II: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DEL INTERIOR DE PLANTAS DE ZARZAMORA	159
5.1. AISLAMIENTO.....	161
5.2. MALDI-TOF MS.....	162
5.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEL GEN ARNr 16S.....	166
5.3.1. Análisis filogenéticos.	170
5.3.2. Descripción del género <i>Ferrancluibacter</i> y la especie <i>Ferrancluibacter rubi</i>.....	179
5.3.2.1. Análisis filogenómico.....	182
5.3.2.2. Fisiología y quimiotaxonomía.....	188
5.3.2.3. Descripción de <i>Ferrancluibacter</i> gen. nov.....	189
5.3.2.4. Descripción de <i>Ferrancluibacter rubi</i> sp. nov.....	190
5.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DEL CRECIMIENTO.....	190
6. CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS AISLADOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL.....	195
6.1. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL.	197
6.1.1. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.....	197
6.1.2. Solubilización de compuestos de fosfato.....	200
6.1.3. Solubilización de compuestos de potasio.....	201
6.1.4. Producción de sideróforos.....	202
6.1.5. Producción de auxinas.....	203
6.1.6. Síntesis de la ACC-desaminasa.....	205
6.2. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LÍTICAS.....	206
6.2.1. Producción de celulasas.....	206
6.2.2. Producción de xilanasas.....	207
6.2.3. Producción de amilasas.....	208
6.3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS.....	210
6.4. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLÁNTULAS DE TOMATE COMO PLANTA MODELO Y ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN... ..	210
6.4.1. Evaluación de la colonización.....	210
6.4.1.1. Producción de biofilms.....	211

6.4.1.2.	Estudio de la colonización mediante microscopía de fluorescencia.	212
6.4.2.	Ensayos de la promoción del crecimiento vegetal en plántulas de tomate.....	215
6.5.	PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS MODELO DE TOMATE Y CUANTIFICACIÓN POR qPCR.	217
6.5.1.	Determinación cuantitativa de la colonización.	221
6.6.	ESTUDIO DE LOS GENOMAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS. ..	223
6.6.1.	Búsqueda de genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal.....	226
6.6.2.	Búsqueda de otras actividades no evaluadas de promoción del crecimiento vegetal.....	232
7.	CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE LOS AISLADOS EN EL BIOCONTROL DEL HONGO FITOPATÓGENO <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	237
7.1.	CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS CAPACIDADES ANTIFÚNGICAS.	239
7.1.1.	Producción de enzimas líticas.	239
7.1.1.1.	Producción de β -glucosidasas.....	240
7.1.1.2.	Producción de proteasas.	243
7.1.1.3.	Producción de quitinasas.	244
7.1.2.	Ensayo de inhibición por producción de compuestos difusibles. ...	244
7.1.3.	Producción de compuestos volátiles.	247
7.2.	SELECCIÓN DE LAS CEPAS.	249
7.3.	CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LAS CAPACIDADES ANTIFÚNGICAS.	250
7.3.1.	Reducción de la infección por contacto con el hongo.	250
7.3.2.	Reducción de la infección mediante la producción de VOCs.	251
7.4.	ESTUDIO DE LOS GENOMAS.	252
7.4.1.	Síntesis de acetoína.	258
7.4.2.	Fermentación de la acetona-butanol-etanol (ABE).	259
7.4.3.	Metilcetonas.	260
7.4.4.	Terpenos.	262
7.5.	ESTUDIO DEL VOLATILOMA.	262
7.6.	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA EN LA PLANTA.	265
7.6.1.	Gen relacionado con la patogenicidad 1a (<i>pr1a</i>).	265

7.6.2.	Inhibidor de la proteinasa 1 (<i>pi-1</i>)	267
7.6.3.	Factor de respuesta de etileno (<i>pti4</i>)	268
7.6.4.	Gen del receptor de etileno (<i>etr4</i>)	269
7.6.5.	Fenilalanina amoníaco-liasa (<i>pal</i>)	270
8.	CAPÍTULO V: INOCULACIÓN DE PLANTAS DE ZARZAMORA CON LAS BACTERIAS SELECCIONADAS Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA MEJORA NUTRACÉUTICA DE LOS FRUTOS	273
8.1.	ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE MORAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO	275
8.1.1.	Mejora de la producción en términos cuantitativos	275
8.1.2.	Análisis del contenido en compuestos fenólicos de los frutos de zarzamora obtenidos en condiciones de invernadero	277
8.1.3.	Ensayos con el organismo modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	282
8.1.3.1.	Análisis de la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i> bajo condiciones de estrés.	282
8.1.3.2.	Estudio de la ruta de la señalización de la insulina/IGF-1 (IIS).....	286
8.2.	ENSAYO EN CAMPO	290
8.2.1.	Análisis del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de zarzamora en condiciones de campo	290
8.2.2.	Mejora de la producción	293
8.2.2.1.	Parámetros de producción.	293
8.2.2.2.	Parámetros fisicoquímicos.....	295
8.2.2.3.	Parámetros del color.	298
9.	DISCUSIÓN GENERAL	301
10.	CONCLUSIONES	311
11.	CONCLUSIONS	315
12.	BIBLIOGRAFÍA	319

RESUMEN

INTRODUCCIÓN.

La población humana está en constante crecimiento y, a partir de la Revolución Industrial, experimentó un incremento exponencial descontrolado. La agricultura es la base de la alimentación humana y, para satisfacer la continua demanda de alimentos, ha tenido que evolucionar y mejorar para conseguir cultivos más eficientes. Los fertilizantes y pesticidas químicos son dos de los factores más importantes en la agricultura que aportan los nutrientes necesarios a los cultivos y los protegen de las enfermedades.

El uso de los fertilizantes y de los pesticidas ha ido en aumento desde su incorporación a la agricultura. Entre el año 2000 y el 2021, el consumo mundial de fertilizantes aumentó en un 144,3%, mientras que el consumo de los pesticidas aumentó en un 162,3%. En la actualidad, se han descrito una serie de consecuencias negativas relacionadas con la salud ambiental y la humana, derivadas del uso excesivo de los compuestos agroquímicos. El exceso de estos productos que no son absorbidos por las plantas, son acumulados en los suelos. Estos, ya sea por la lluvia, la erosión del suelo, el riego o la infiltración, acaban en las aguas subterráneas y los acuíferos, lo que altera las características fisicoquímicas del agua y la contamina. Además, el uso excesivo de los pesticidas químicos ha dado lugar a la aparición de cepas de microorganismos fitopatógenos resistentes a estos compuestos, los cuales acaban perdiendo su efectividad y capacidad de control. Por esta razón, en los últimos años, las diferentes legislaciones gubernamentales y supragubernamentales se han vuelto más estrictas con respecto al uso de este tipo de compuestos químicos, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas más sostenibles.

Una de las alternativas propuestas es el uso de bioestimulantes o biopesticidas. Por un lado, los bioestimulantes son compuestos formulados en base a microorganismos PGP (*Plant Growth Promotion*) que poseen diferentes mecanismos de acción que inducen el crecimiento vegetal. Por otro lado, los biopesticidas son formulados en base a microorganismos que poseen actividad antagonista frente a algún fitopatógeno, ya sea porque lo combaten o porque previenen la infección. La mayoría de estos microorganismos con interés agronómico utilizados para estos fines provienen o bien de los suelos, ya que están relacionados con la fertilidad y la productividad del suelo; o bien del interior de los tejidos vegetales, pues son organismos capaces de establecer relaciones más estrechas con las plantas que los microorganismos edáficos.

En este sentido, tanto los microorganismos edáficos como los que habitan en el interior de las plantas, llamados endófitos, pueden tener un rol activo en el mantenimiento de los sistemas agrícolas. El estudio de estos microorganismos y de sus interacciones con las plantas puede abrir nuevas puertas al desarrollo de nuevos bioestimulantes o biopesticidas.

Los microorganismos del suelo desempeñan funciones que son esenciales para el mantenimiento de los ecosistemas. Además, inducen el crecimiento de las plantas y mejoran la salud vegetal, por lo que son considerados como un importante recurso para

el mantenimiento de la sostenibilidad en los sistemas agrícola. La interacción entre las plantas y los microorganismos del suelo no es unidireccional, ya que las plantas también influyen en la microbiota edáfica. En este sentido, diversos estudios apoyan la teoría de que las plantas reclutan a microorganismos específicos mediante la liberación de exudados, que las ayudan en la adquisición de nutrientes y la mitigación de estreses tanto bióticos como abióticos. Estos microorganismos pueden colonizar los tejidos de la planta y establecerse en su interior, pasando a ser considerados microorganismos endófitos, los cuales ahora conforman el microbioma de la planta. Este conjunto de microorganismos está involucrado en el mantenimiento del estado de la salud y la nutrición óptima de la planta. El origen de los microorganismos que interactúan con las plantas es diverso. La mayoría son reclutados a partir del suelo circundante, y conforman la microbiota rizosférica de la planta, mientras que otros provienen del ambiente aéreo y tienen una influencia determinante sobre la microbiota filosférica, en la superficie de los tejidos vegetales. Tanto los microorganismos que conforman la rizosfera como los que conforman la filosfera pueden acabar colonizando el interior de las plantas y así establecerse en la endosfera. Para ello, deben de atravesar y de penetrar los tejidos vegetales. Las estimaciones indican que el suelo rizosférico es el contribuyente mayoritario de la microbiota endófito de las plantas, contribuyendo con más de dos tercios de la diversidad bacteriana y la fúngica. Además, la composición de los ambientes endofíticos es diversa, variando no solo entre las plantas sino también entre los compartimentos de un mismo individuo. Dado que estos microorganismos están intrínsecamente ligados a la planta, es probable que muchos de ellos posean mecanismos beneficiosos para las plantas. Sin embargo, muchas de estas funciones siguen sin estar caracterizadas. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva evitan algunas de las limitaciones asociadas al cultivo de microorganismos ya que permiten analizar toda la comunidad, incluidas las células que están inactivas.

Estos microorganismos pueden contar con diferentes mecanismos que sirvan para el desarrollo de bioestimulantes o biopesticidas. Por un lado, los bioestimulantes cuentan con mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, que facilitan la adquisición de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el potasio o el hierro o intervienen en la regulación hormonal de la planta. Por otro lado, los biopesticidas cuentan con mecanismos de protección frente a patógenos, como la producción de moléculas antibióticas o la inducción de la resistencia sistémica en la planta.

OBJETIVOS.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal el estudio de las poblaciones bacterianas asociadas a los tejidos de *Rubus ulmifolius* Schott y el aislamiento de bacterias endofíticas para su evaluación como posibles bioinoculantes para la mejora del crecimiento vegetal, el biocontrol del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y la mejora de la producción agrícola de cultivos de zarzamora. Para la consecución de este objetivo se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la diversidad de las poblaciones bacterianas endofíticas de la raíz, el tallo y las hojas de plantas de la especie *Rubus ulmifolius* Schott recogidas en tres ambientes impactados por diferentes condiciones ambientales.
2. Aislamiento, identificación y caracterización fenotípica *in vitro* de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal y de biocontrol del hongo *Botrytis cinerea* de las bacterias obtenidas del interior de los tejidos de la raíz y del tallo de plantas de la especie *Rubus ulmifolius* Schott.
3. Evaluación de la capacidad de colonización de los aislados seleccionados combinando técnicas *in vitro* e *in vivo*.
4. Evaluación de la capacidad de la promoción del crecimiento vegetal de los aislados seleccionados en plantas de la especie *Solanum lycopersicum* y cuantificación de la colonización.
5. Evaluación de la capacidad de biocontrol de las cepas seleccionadas en plantas de la especie *Solanum lycopersicum* infectadas con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.
6. Análisis *in silico* e *in vivo* de la capacidad antifúngica del volatilo de las bacterias seleccionadas frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.
7. Análisis del efecto del volatilo de las cepas seleccionadas en la inducción de la resistencia sistémica de las plantas de la especie *Solanum lycopersicum*.
8. Estudio de la inoculación de los aislados seleccionados en la producción de moras en plantas del género *Rubus* en condiciones de invernadero y de campo.
9. Análisis del efecto de la inoculación de las bacterias sobre la composición de los compuestos fenólicos de las moras y estudio del potencial biológico en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.
10. Análisis de la expresión génica de genes de *Caenorhabditis elegans* involucrados en la tolerancia al estrés oxidativo tras la exposición a las moras obtenidas de las plantas inoculadas con las bacterias seleccionadas.

CAPÍTULO I: ANÁLISIS METATAXONÓMICO DE LAS BACTERIAS ENDOFÍTICAS ASOCIADAS A LOS DIFERENTES TEJIDOS DE PLANTAS DE ZARZAMORA.

En este capítulo se estudió la diversidad bacteriana asociada a la raíz, el tallo y las hojas de plantas de zarzamora, *Rubus ulmifolius* Schott, un nicho que, hasta ahora, estaba sin caracterizar. Las muestras fueron tomadas de varios individuos de plantas de zarzamora localizadas en tres ambientes diferentes e influidas por diferentes factores ambientales. Por un lado, se tomaron muestras de plantas de una localización que no estaba influida por ningún factor, a la que denominamos Natural, y por otro lado se tomaron muestras de otras dos localizaciones, una influida por ambientes ribereños, a la que se denominó Ribereña y otra influidas por campos de cultivos cercanos, a la que se denominó Humanizada.

En primer lugar, se estudió la composición bacteriana a diferentes niveles taxonómicos de las diferentes muestras de tejidos en los diferentes ambientes. En todas

las muestras los tres filos bacterianos más abundantes fueron los filos Pseudomonadota, Actinomycetota y Bacteroidota. Además, las muestras de raíces mostraron una gran representación de otros filos, como Myxococcota o Acidobacteriota. Con respecto a las clases bacterianas, las más abundantes en todas las muestras fueron las clases Alfaproteobacteria y Gammaproteobacteria, ambas pertenecientes al filo Pseudomonadota. La clase Actinobacteria también fue abundante en todas las muestras, aunque decreció ligeramente en las muestras de hoja en las muestras de los ambientes Humanizados y Ribereños. Finalmente, la clase Bacteroidia no representó un gran porcentaje en las muestras de las raíces, pero aumentó en los otros dos tejidos. Con respecto a los órdenes bacterianos el más abundante en todas las muestras fue Sphingomonadales, y la abundancia de este taxon iba aumentando desde las muestras de la raíz a las muestras de la parte aérea de la planta en todos los ambientes. El orden Hyphomicrobiales también fue abundante en todas las muestras, aunque no mostró un patrón constante a todos los ambientes. El orden Cytophagales mostró una representación baja en las muestras de las raíces de todos los ambientes, pero que aumentó en las muestras de los tallos y las hojas. Finalmente, hubo algunos órdenes que aparecieron sobrerrepresentados en muestras concretas, como el orden Burkholderiales en las muestras de los tallos del ambiente Ribereño o el orden Pseudomonadales en las muestras de las hojas de los ambientes Humanizados. En cuanto a la diversidad por familia bacteriana, la familia *Sphingomonadaceae* fue la más abundante en todas las muestras. Sin embargo, las siguientes familias más abundantes difirieron entre las muestras. En las muestras de los ambientes Naturales, las familias *Xanthobacteraceae* y *Microbacteriaceae* fueron la segunda y tercera familias más abundantes. En las muestras de los ambientes Ribereños, fueron las familias *Xanthobacteraceae* y *Pseudonocardaceae*. y en las muestras de las raíces de los ambientes Humanizados, las principales familias fueron *Streptomyetaceae* y *Steroidobacteraceae*. Finalmente, con respecto a los géneros, al igual que ocurrió con la clase Alfaproteobacteria, el orden Sphingomonadales y la familia *Sphingomonaceae*, el género *Sphingomonas* fue el género más abundante en todas las muestras, mostrando un incremento en la composición de las muestras de las raíces a las muestras de los tejidos aéreos. El resto de los géneros destacaron de manera diversa en las diferentes muestras (Figura I).

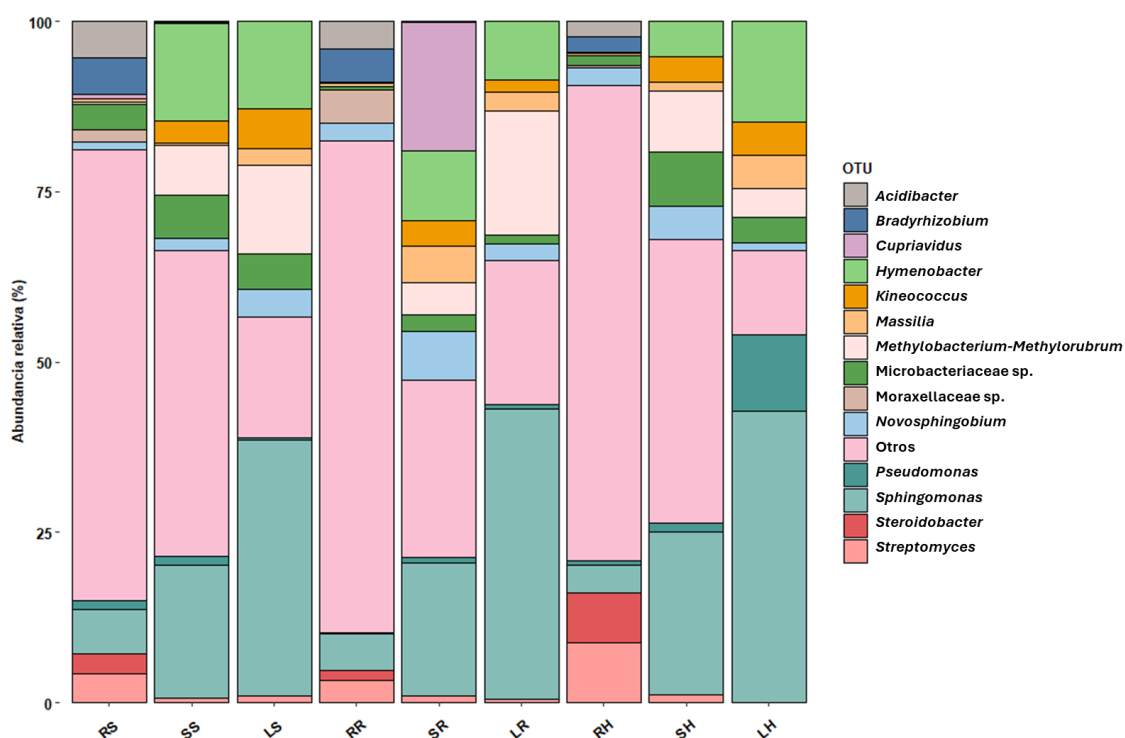


Figura I. Abundancia relativa de los 14 géneros bacterianos más abundantes en diferentes partes anatómicas de plantas de *Rubus ulmifolius* en diferentes condiciones. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

La composición bacteriana parecía esencialmente la misma en los mismos tejidos de las plantas de distintas localizaciones. Esto fue corroborado por el análisis estadístico, que encontró que la mayoría de las diferencias significativas en la composición eran dadas entre las muestras de las raíces y las muestras de las hojas de los mismos ambientes.

Los resultados anteriores parecían indicar que la composición de las comunidades de las bacterias endofíticas era moldeada por el tejido y no por el lugar de muestreo. Para profundizar en esta idea, llevamos a cabo un estudio de las diversidades alfa y beta de las muestras. Con respecto a la diversidad alfa, que evalúa la diversidad intraespecífica, los resultados obtenidos tras el cálculo de los índices de *Richness*, *Chao1*, *ACE*, *Shannon*, *Simpson* y de *Evenness* mostraron que las diversidades más elevadas se daban en las muestras de las raíces, seguidas de las muestras del tallo, y de las muestras de las hojas. Además, los análisis estadísticos mostraron que únicamente había diferencias significativas entre las diversidades de las muestras de las raíces y de las hojas de los mismos ambientes. Al igual que ocurría en los análisis de la composición bacteriana. El análisis de la diversidad beta usando el índice de *Bray-Curtis* mostró que las diferentes muestras se agrupaban en función del tejido y no de la localización de la planta, lo que

corroboraba la teoría de que la composición de las comunidades bacterianas estaba determinada por el tejido en el que se localizan. Por lo tanto, todos estos resultados apoyan la teoría de que las plantas son capaces de seleccionar a las bacterias que colonizan sus diferentes tejidos.

Para completar este capítulo, se realizaron estudios adicionales como la abundancia diferencial (DAA), el análisis del microbioma *core* o la predicción de las rutas metabólicas asociadas a las comunidades bacterianas de las plantas de zarzamora. En el DAA observamos que, entre las muestras de las raíces y los tallos, la abundancia de la familia *Xanthobacteraceae* aumenta en todas las muestras de las raíces. Del mismo modo, entre las muestras de las raíces y de las hojas, en estas últimas se observó un aumento de la familia *Hymenobacteraceae* en todas las ubicaciones y de bacterias de la familia *Beijerinckiaceae* en las muestras de las hojas de los ambientes Ribereños y Naturales. Mientras que en las raíces hubo una mayor abundancia de miembros de las familias *Micromonosporaceae*, *Xanthobacteraceae*. Por otro lado, el análisis entre las muestras de los tallos y las hojas no presentó diferencias en la abundancia de ninguna de las familias.

Con respecto al análisis del microbioma *core*, este fue realizado en cada grupo de muestras por separado. Los resultados mostraron que la familia más abundante en todos los grupos fue *Sphingomonadaceae*. Por otro lado, tal y como demostró en el análisis DAA, la familia *Xanthobacteriaceae* sólo prevalece en muestras de raíces. Tres familias, *Hymenobacteraceae*, *Microbacteraceae* y *Beijerinckiaceae*, demostraron pertenecer al microbioma *core* de todas las muestras de los tallos y las hojas. Finalmente, la familia *Oxallobacteriaceae* solo apareció en el microbioma *core* de las muestras de las hojas. En general, las muestras de los tallos y de las hojas comparten más taxones que cualquier otro grupo.

Finalmente, realizamos una predicción de las rutas metabólicas asociadas a las comunidades bacterianas de cada una de las muestras, lo que nos permite hacernos una idea del potencial metabólicos de esas bacterias. Entre las rutas predichas, se incluyeron procesos metabólicos habituales como la biosíntesis de lipopolisacáridos, la fijación de carbono, el metabolismo de los ácidos grasos, la glucólisis, la gluconeogénesis y varios procesos anabólicos y catabólicos. Sin embargo, también se mostraron rutas para la producción de metabolitos secundarios, como antibióticos como la vancomicina o la tetraciclina; o algunas rutas relacionadas con la tolerancia a la sequía y al estrés por calor, como la biosíntesis de carbohidratos solubles, prolina y moléculas antioxidantes.

Los resultados obtenidos durante este capítulo revelaron que la composición bacteriana de las plantas de *Rubus ulmifolius* era esencialmente la misma en los diferentes entornos y que las diferencias en la composición eran dadas principalmente entre los diferentes tejidos vegetales. Entre los diferentes tejidos fue destacable que la diversidad bacteriana era menor cuanto más alejada del suelo se encontraba la muestra. Además, la composición de los taxones era uniforme entre las muestras de las raíces de los diferentes ambientes, pero en las muestras de los tallos y las hojas, algunos taxones específicos incrementaron su abundancia. Este es el primer enfoque que ha sido realizado sobre la

composición de las bacterias endofíticas dentro de los diferentes tejidos de las plantas de *Rubus ulmifolius* que crecen en diferentes ambientes. Los resultados de este capítulo contribuyen a sentar las bases para futuras investigaciones con el objetivo de que las plantas de zarzamora se establezcan como una fuente de posibles biocompuestos alternativos.

CAPÍTULO II: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DEL INTERIOR DE PLANTAS DE ZARZAMORA.

Los métodos independientes de cultivos, como la secuenciación masiva de amplicones llevada a cabo en el capítulo anterior, proporcionan información fiable sobre las comunidades bacterianas que albergan los diferentes ecosistemas, sin embargo, aproximadamente el 80% de estas no son cultivables, por lo que en este segundo capítulo se llevó a cabo un aislamiento de bacterias endofíticas del interior de muestras de la raíz y el tallo, ya que fueron las muestras que presentaron mayor diversidad. Además, en este capítulo llevamos a cabo la identificación de los aislados en base al perfil proteico y en base a la secuenciación del gen ARNr 16S.

En total, 70 cepas endofíticas fueron aisladas de diferentes partes de la planta, concretamente 39 fueron aisladas de la raíz y 31 del tallo. El análisis del perfil proteico fue llevado a cabo con la técnica MALDI TOF-MS, usando como para comparar la base de datos Bruker y una base de datos propia del grupo que recoge más de 100 especies de la familia *Rhizobiaceae*. La base de datos de Bruker permitió la identificación a nivel de especie del 12,9% de las cepas y la identificación a nivel de género del 20%. Mientras que la base de datos de la familia *Rhizobiaceae* permitió la identificación a nivel de especie del 17,1% de las cepas y la identificación a nivel de género del 8,5%. Los perfiles de proteínas fueron comparados y agrupados en base a un 80% de similitud. Esto permitió agrupar a los 70 aislados diferentes en 35 grupos según sus perfiles proteicos. De cada uno de los grupos obtenidos, un único representante fue seleccionado para la identificación mediante la secuenciación del gen ARNr 16S.

Tras la secuenciación del gen ARNr 16S y la comparación de estos con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI, se encontró que los géneros *Bacillus*, *Neorhizobium* y *Rhizobium* fueron los dominantes en las raíces, representando el 10,3, el 10,3 y el 25,6%, respectivamente; mientras que, en los tallos, fueron los géneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, representando el 12,9, el 19,4 y el 25,8% respectivamente. Además, destacó que la mayoría de los géneros fueron aislados en un único tejido y solamente cuatro fueron comunes en la raíz y el tallo, concretamente los géneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Novosphingobium* y *Rhizobium*. En la raíz, el resto de los aislados pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Inquilinus*, *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Neobacillus*, *Neorhizobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, y *Staphylococcus*, mientras que en el tallo los aislados pertenecieron a los géneros *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

Tras la secuenciación del gen ARNr 16S de los aislados, destacó la cepa CRRU44, la cual presentó un porcentaje de similitud inferior al 96% con el resto de las secuencias depositadas en la base de datos, por lo que podría tratarse de un nuevo género bacteriano.

La familia con la que más similitud presentó fue la familia *Rhizobiaceae*, por lo que se realizó un análisis filogenético con el gen ARNr 16S de las cepas tipo de las especies tipo de los géneros incluidos hasta ese momento en la familia *Rhizobiaceae* (Figura II). Además, se calcularon los valores de ANI_b y AAI entre el genoma de la cepa CRRU44 y los genomas de las cepas más cercanas pertenecientes a esta familia. En todos los casos, los valores fueron inferiores al 78,5 y al 76,5%, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados indicaron que la cepa CRRU44 pertenecía a un nuevo género bacteriano el cual denominamos *Ferrancluibacter* y, la nueva especie fue denominada *Ferrancluibacter rubi*.

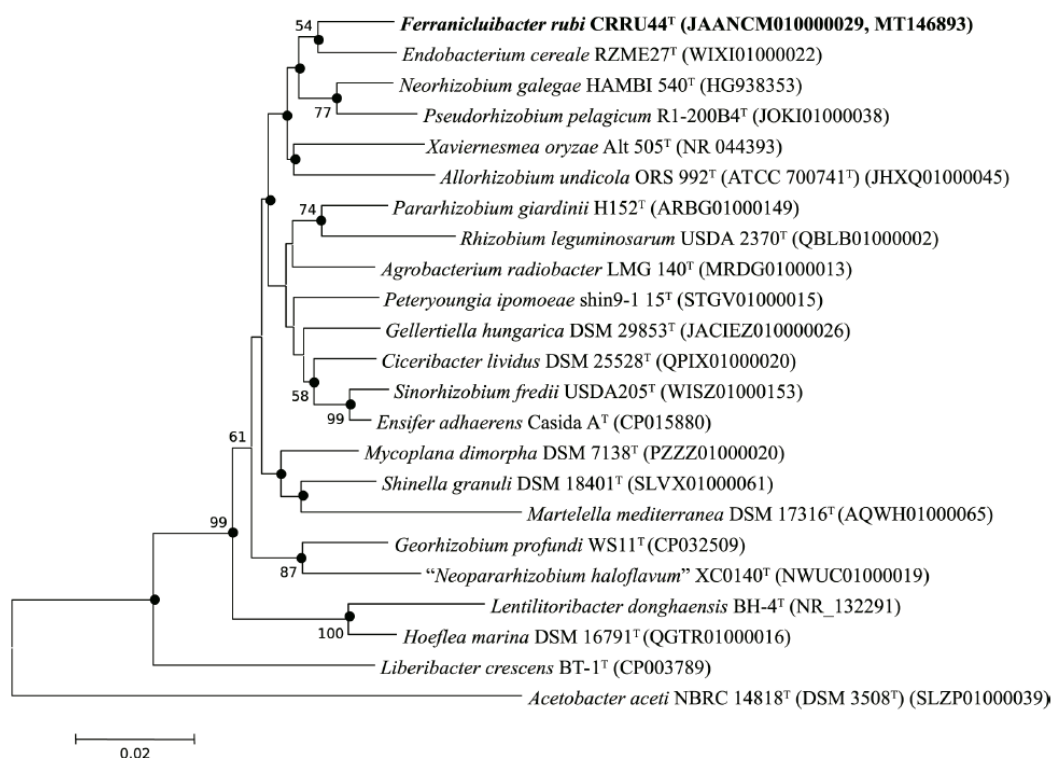


Figura II. Análisis filogenético del gen ribosómico ARNr 16S que muestra la posición filogenética de la cepa CRRU44^T dentro de la familia *Rhizobiaceae*. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis. Los nodos marcados con círculos también fueron obtenidos con la máxima probabilidad de algoritmo.

CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS AISLADOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL.

Habiendo caracterizado genótipicamente los aislados, en el Capítulo III fue evaluada la capacidad de promover el crecimiento vegetal de las 70 cepas. En primer lugar, se evaluaron *in vitro* los mecanismos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal, concretamente, el crecimiento en medios libres de nitrógeno, la

solubilización de compuestos de fosfatos, la solubilización de compuestos de potasio, la producción de sideróforos, la producción de fitohormonas y la síntesis de ACC desaminasa. Por otro lado, la capacidad de colonización de las cepas también fue estudiada *in vitro*, realizando ensayos de producción de enzimas hidrolíticas y de producción de *biofilms*. Los resultados obtenidos permitieron hacer una selección de aquellas bacterias más eficientes. Posteriormente, tanto la capacidad de promover el crecimiento vegetal como la capacidad de colonizar de las cepas seleccionadas fue evaluado en ensayos *in vivo*, en plantas de tomate.

En el estudio de los mecanismos *in vitro* de los aislados, obtuvimos que el 34,7% (n=16) de las cepas evaluadas fue capaz de crecer en el medio sin nitrógeno. De las 70 cepas estudiadas, el 61,4% (n=43) fue capaz de solubilizar el fosfato bicálcico II, el 28,6% (n=20) fue capaz de solubilizar el fosfato tricálcico III y sólo una cepa fue capaz de solubilizar la hidroxiapatita, concretamente *Pantoea agglomerans* CRRU38. Con respecto a la solubilización de los compuestos de potasio, sólo el 18,6% (n=13) de las cepas fue capaz de solubilizar el silicato de aluminio y potasio (AlK₂O₆Si₂). Al evaluar la producción de sideróforos encontramos que el 51,4% (n=36) tenían la capacidad de producir sideróforos. Con respecto a la producción de auxinas, el 91,49% (n=64) de las cepas aisladas en este trabajo mostró ser capaz de sintetizar esta fitohormona en condiciones *in vitro*. Finalmente, de las 70 cepas, el 92,9% (n=65) de las cepas fueron capaces de utilizar el ACC. De ellas, el 4,6% (n=3) lo usaban como fuente de carbono, el 38,5% (n=25) como fuente de nitrógeno y el 57,0% (n=37) como fuente de ambos nutrientes.

Por otro lado, la capacidad de colonizar los tejidos vegetales en las bacterias que se quieran emplear en la agricultura. Por lo que se estudió la capacidad de los 70 aislados de producir enzimas hidrolíticas. De las 70 cepas evaluadas, el 50% (n=35) presentó actividad celulasa, el 24,3% (n=17) presentó actividad xilanasa y el 81,4% (n=57) presentó actividad amilasa.

La evaluación de estos resultados nos permitió seleccionar a las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67. En estas cepas se cuantificó por HPLC la producción de la fitohormona ácido indol acético, y se obtuvo que estas cepas producían 110, 73, 830, 490, 140, 220 y 210, respectivamente.

Con estas cepas seleccionadas se llevaron a cabo ensayos adicionales de la colonización, tanto *in vitro* como *in vivo* y, además, ensayos de la promoción del crecimiento vegetal en plantas de tomate, debido a su interés agronómico.

En primer lugar, se estudió la capacidad de las cepas de producir *biofilms*. De las siete cepas evaluadas, todas fueron capaces de producir *biofilms*, sin embargo, mostraron dos patrones claramente diferenciados. Por un lado, las bacterias Gram positivas, es decir, las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B y

Arthrobacter crystallopoietes CRRU21 mostraron un desarrollo rápido del *biofilm*, alcanzando su máximo a las 24 horas. Por otro lado, las bacterias Gram negativas, es decir las cepas *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, mostraron una leve producción de *biofilm* en las primeras 48 horas, y que empezaba a incrementarse a las 72 horas. Por lo tanto, de los aislados analizados, las cepas Gram negativas parecían necesitar más tiempo que las cepas Gram positivas para desarrollar el *biofilm*. Aunque todas las cepas parecieron ser capaces de producir *biofilms*, en los ensayos *in vitro* como este, tanto las condiciones seleccionadas de crecimiento como el material, son las óptimas para facilitar el desarrollo del *biofilm*. Por lo tanto, es conveniente realizar ensayos de la colonización más complejos.

A continuación, se realizó un ensayo de visualización de la colonización en las raíces de plántulas de tomate. Para ello, las cepas pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* fueron conjugadas para que adquirieran el plásmido que contiene la proteína verde fluorescente GFP y el resto de las cepas fueron inmunolocalizadas con anticuerpo acoplados a un fluoróforo. La visualización de la colonización mostró que, por un lado, las cepas *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 conjugadas con la proteína verde fluorescente exhibían una colonización abundante y generalizada por toda la raíz (Figura III). Por otro lado, las cepas inmunolocalizadas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 también mostraron una colonización abundante y generalizada por la raíz, mientras que las cepas inmunolocalizadas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B y *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 mostraron una colonización más limitada y específica. La cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B estaba localizada principalmente en las zonas de emergencia de las raíces secundarias. Mientras que la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 presentó una colonización escasa.

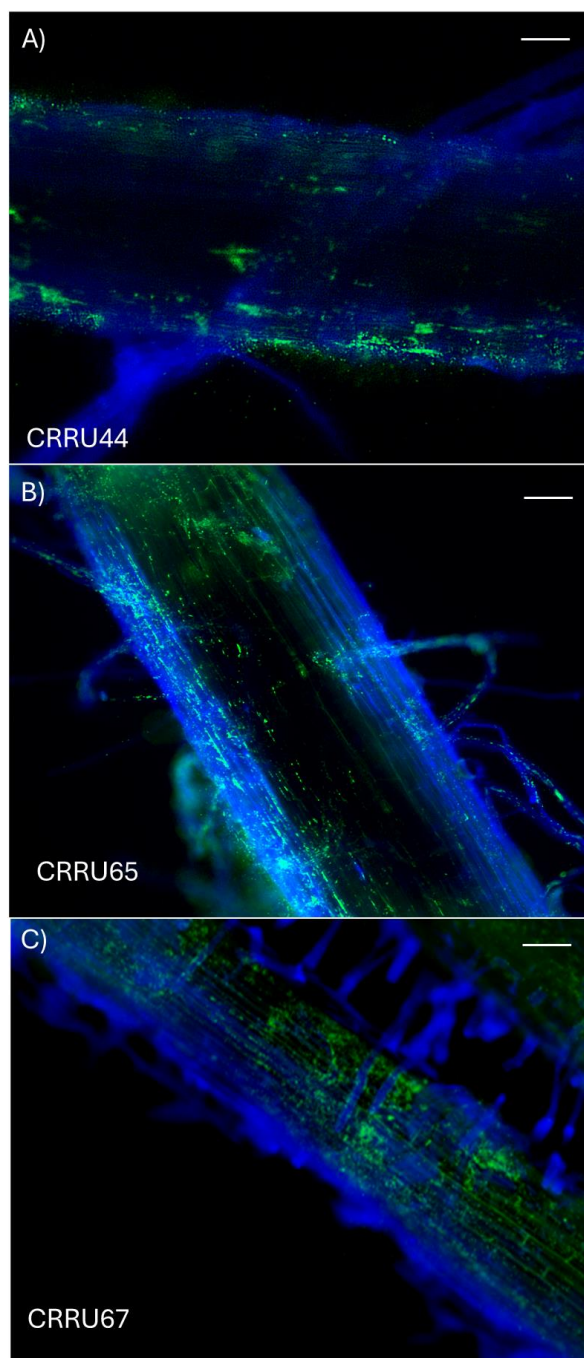


Figura III. Imágenes al microscopio de fluorescencia de raíces de plántulas de tomate inoculadas con cepas marcadas con proteína fluorescente (verde) y teñidas en contraste con blanco de calcoflúor (azul), siete días después de la inoculación: (A) *Neorhizobium galegae* CRRU16 (barra 220 μm); (B) *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 (barra 200 μm); (C) *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (barra 200 μm); (D) *Rhizobium laguerreae* CRRU67 (barra 330 μm).

Habiendo evaluado la capacidad de las cepas de colonizar, quisimos evaluar la capacidad de promover el crecimiento vegetal en los primeros estadios de la planta de tomate. En este ensayo, se tomaron datos de la longitud de la parte aérea, la longitud de la parte radicular y el número de raíces secundarias. En la promoción de la elongación de la parte aérea, tres cepas mostraron resultados significativamente positivos frente a los controles, mientras que la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 mostró resultados

significativamente negativos, ya que redujo considerablemente la longitud de la parte aérea de la planta. Las tres cepas que mejoraron el crecimiento fueron las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65, incrementando la longitud de la parte aérea en un 194%, 180% y 153% respectivamente, con respecto a los controles. En la promoción de la elongación de la parte radicular de las plantas, las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, incrementaron significativamente el tamaño en un 151% y 138%, respectivamente. Por el contrario, la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 redujo significativamente la longitud radicular de las plantas inoculadas. Por último, en el estudio del incremento del número de las raíces secundarias, de nuevo las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 mostraron resultados significativos. Ambas cepas aumentaron el número de raíces secundarias en un 157%. Los resultados obtenidos en este ensayo nos permitieron realizar una nueva selección de las cepas, las cuales se redujeron a *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67. Con estas cuatro cepas quisimos evaluar la promoción del crecimiento vegetal en plantas adultas en condiciones de cámara iluminada. En este ensayo, se tomaron datos de la longitud de la parte aérea, el número de hojas, el calibre de la base del tallo y el peso húmedo (Figura IV).

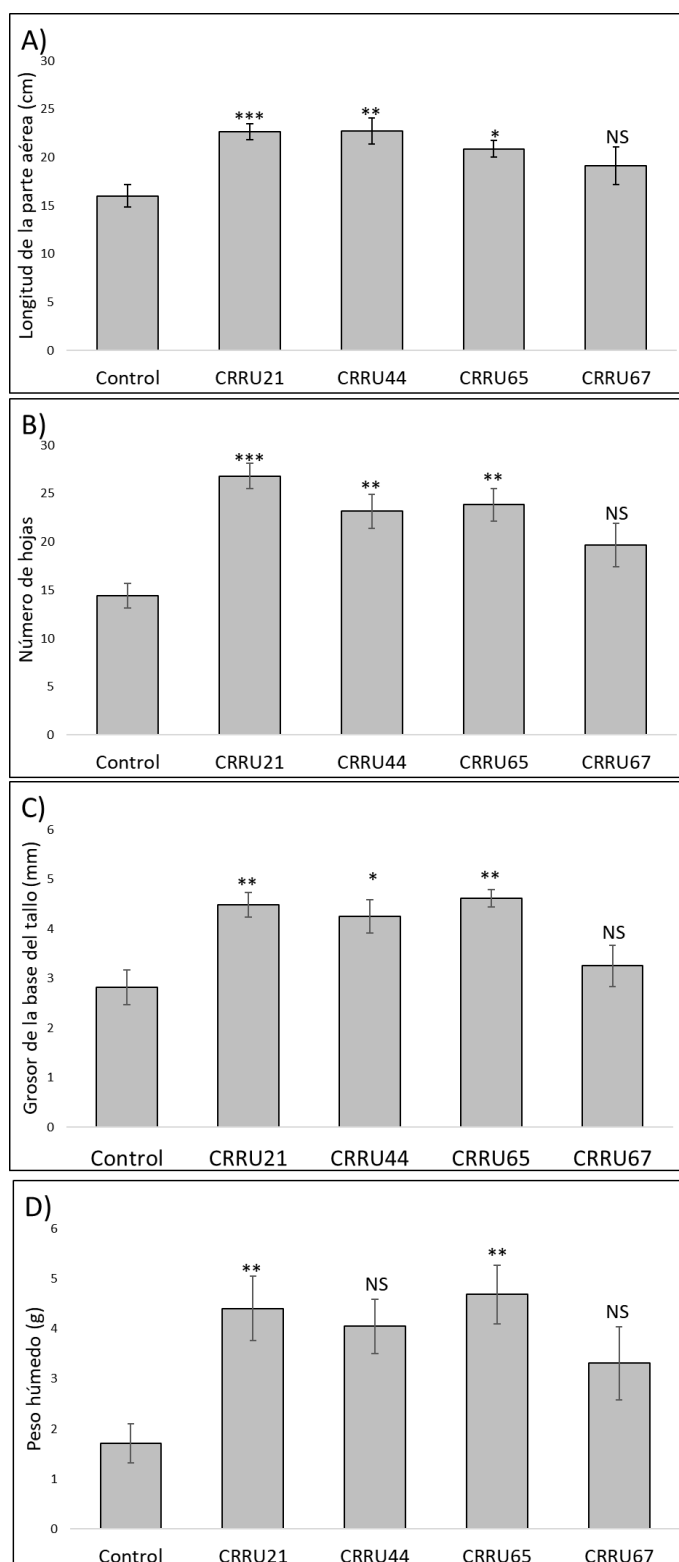


Figura IV. A) Longitud promedio de las partes aéreas del tomate tras ser inoculado con las cepas de estudio. B) Número de hojas promedio del tomate tras ser inoculado con las cepas de estudio. C) Grosor medio de la base del tallo de los tomates tras ser inoculados. D) Peso húmedo medio de los tomates tras ser inoculados. Las diferencias significativas entre las plantas control y las plantas de los tratamientos están marcadas con asteriscos según el test de Tukey en $p \leq 0,1$ (*), $p \leq 0,05$ (**) y $p \leq 0,01$ (***).

En la promoción de la elongación de la parte aérea de la planta, las inoculaciones con las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 fueron las que mostraron un mayor incremento, un 141,7 y 141,9% respectivamente. Seguidas de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 que incrementó la longitud de la parte aérea en un 130,4% y de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67, que la incrementó en un 119,5%, aunque esta última no fue significativa. Con respecto al número de hojas, la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fue la que mostró mejores resultados, con un incremento del 185,7%, seguida de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 con un 165,3% y de la cepa *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 con un 160,7%. La cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostró un incremento no significativo del 136,1%. En el estudio del grosor de la base del tallo, la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostró el mayor incremento en un 164,0%, seguido de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, con un 159,3% y de la cepa *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, con un 150,9%. De nuevo, la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostró un incremento no significativo del 115,5%. Finalmente, en el parámetro del peso húmedo, la inoculación con las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 mostraron los mejores resultados, incrementándolos en un 273,6% y 257,3% respectivamente.

Adicionalmente, se tomaron muestras de las raíces de las plantas de estos ensayos para cuantificar la colonización mediante la técnica qPCR. En las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, se detectó una colonización de 10^{12} log UFC/gramo de raíz. De la misma forma, la detección de la cepa *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 en las raíces mostró una colonización de 10^{15} UFC/gramo de raíz. Finalmente, la detección de las especies *Rhizobium laguerreae* en las raíces procedentes de los tratamientos inoculados con las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostraron una colonización de 10^{13} UFC/gramo de raíz, respectivamente.

A lo largo de este capítulo se ha evaluado la capacidad de las cepas de promover el crecimiento vegetal a partir de diferentes enfoques. Los estudios *in silico* de los genomas también aportan información valiosa sobre las diferentes rutas que pueden estar involucradas en lo observado hasta ahora. Por lo tanto, el genoma de las cuatro cepas seleccionadas fue estudiado. Así, en el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fueron anotados un total de 8 genes para la solubilización de fosfatos, 6 para la producción de sideróforos, 3 para la fijación del nitrógeno, 9 para la síntesis de AIA, 3 para la degradación de tejidos vegetales y 14 para la colonización. En el genoma de la cepa *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 fueron anotados un total de 23 genes para la solubilización de fosfatos, 8 para la producción de sideróforos, 9 para la síntesis de AIA, 3 para la degradación de tejidos vegetales y 52 para la colonización. En el genoma de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65, 24 para la solubilización de fosfatos, 8 para la producción de sideróforos, 6 para la fijación del nitrógeno, 10 para la síntesis de AIA, 7 para la degradación de tejidos vegetales y 59 para la colonización. Y en el genoma de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 fueron anotados un total de 26 genes para la solubilización de fosfatos, 8 para la producción de sideróforos, 6 para la fijación del

nitrógeno, 10 para la síntesis de AIA, 7 para la degradación de tejidos vegetales y 58 para la colonización.

CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE LOS AISLADOS EN EL BIOCONTROL DEL HONGO FITOPATÓGENO *BOTRYTIS CINEREA*.

En el Capítulo IV fue evaluado el potencial biopesticida, de las 70 cepas aisladas en el Capítulo II, frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, ya que es uno de los diez hongos patógenos con mayor relevancia a nivel económico. En primer lugar, se evaluaron *in vitro* la producción de enzimas hidrolíticas, la acción directa de las bacterias frente al hongo y la acción indirecta del volatilo de las bacterias frente al hongo. Los resultados obtenidos permitieron hacer una selección de aquellas bacterias más eficientes. A continuación, el potencial biofungicida de las cepas seleccionadas fue evaluado en ensayos *in vivo* realizados en plantas de tomate. Cuatro de las cepas analizadas presentaron un volatilo con un gran potencial, por lo que se decidió analizar su genoma, la composición del volatilo y su efecto sobre la regulación de la expresión de genes involucrados en la activación de la resistencia sistémica en la planta.

En el estudio de los mecanismos *in vitro* de los aislados obtuvimos como resultado que el 68,6% (n=48) de los aislados mostró actividad β -glucosidasa, el 44,3% (n=31) presentó actividad proteasa frente a las proteínas de la leche, mientras que sólo el 28,6% (n=20) presentó actividad proteasa frente a las proteínas de la gelatina y únicamente un aislado, la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, fue capaz de hidrolizar la quitina *in vitro*. A parte de la capacidad de hidrolizar compuestos de la pared fúngica, también se evaluaron *in vitro* la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo mediante el cocultivo con la bacteria y mediante la producción de compuestos volátiles. En estos dos ensayos, el 54,3% (n=38) fue capaz de inhibir el crecimiento de la especie *Botrytis cinerea* cuando ambos microorganismos eran cocultivados en la misma placa, pero sólo el 18,6% (n=13) fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* mediante la producción de compuestos volátiles.

La evaluación de estos resultados nos permitió seleccionar a las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiabacter rubi* CRRU44, *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

La capacidad antifúngica de las cepas seleccionadas fue evaluada mediante ensayos *in vivo* en plantas de tomate. Dos tipos de ensayo fueron llevados a cabo, uno en el que las plantas de tomate eran inoculadas con la bacteria e infectadas con el hongo, por lo que ambos microorganismos estaban en contacto; y otro ensayo en el que las plantas eran infectadas por el hongo, pero la bacteria permanecía separada tanto del hongo como de la planta, lo que permite evaluar la capacidad de inhibir el fitopatógeno mediante la producción de compuestos volátiles. En ambos ensayos, se evaluó la tasa de supervivencia de las plantas de tomate.

Por un lado, en el ensayo por contacto, las plantas control, infectadas con el hongo *Botrytis cinerea*, mostraron un 0% de supervivencia. Las plantas inoculadas con las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65, aunque mostraron tasas de supervivencia del 20, 0, 13, 7, 0 y 7% respectivamente, no representaron una diferencia significativa. Sin embargo, la inoculación con las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 sí presentó diferencias significativas en la supervivencia de las plantas, alcanzando tasas del 67, 40 y 67% de supervivencia, respectivamente.

Por otro lado, en el ensayo mediado por la producción de compuestos volátiles, las plantas control infectadas por el patógeno *Botrytis cinerea* mostraron una supervivencia del 40%. Las plantas inoculadas con las bacterias *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 e *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostraron una mejoría en las tasas de supervivencia del 80, el 80 y el 60% respectivamente, aunque no representaron una diferencia significativa. Sin embargo, la inoculación con las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44 y *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 sí presentaron diferencias significativas en la supervivencia, alcanzando tasas del 93, el 87, el 97, el 97 y el 100% de supervivencia respectivamente (Figura V).

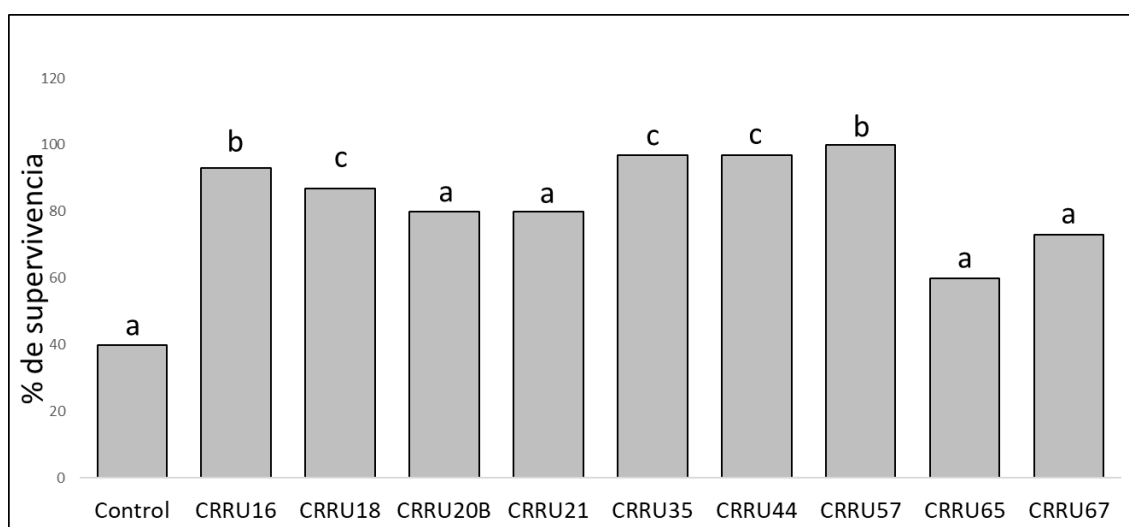


Figura V. A) Porcentaje de plantas vivas en los ensayos de antibiosis *in planta* por contacto entre el hongo y la bacteria. B) Porcentaje de plantas vivas en los ensayos de antibiosis *in planta* sin contacto entre el hongo y la bacteria. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Chi cuadrado.

Los resultados obtenidos en este ensayo nos permitieron realizar una nueva selección de las cepas, las cuales se redujeron a *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57. Además, los resultados parecían indicar que la actividad antifúngica del volatiloma era más fuerte, por lo que se quiso determinar que compuestos volátiles

podrían ser los responsables de la actividad mostrada. Para ello, se hizo una primera aproximación de la composición del volatilo de mediante el estudio de los genomas, en donde se buscaron enzimas relacionadas con la biosíntesis de alguna de las moléculas volátiles con capacidad antifúngica conocida. Por un lado, se estudió la ruta de la biosíntesis de la acetoina, encontrándose que se habían anotado la enzima α -acetolactato sintasa en los cuatro genomas evaluados, pero la enzima α -acetolactato descarboxilasa fue anotada solo en el genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18. La ruta de la fermentación de la acetona-butanol-etanol fue estudiada y, en este caso, se encontró que en los genomas de *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 se anotaron respectivamente, tres, cuatro, cuatro y cinco enzimas relacionadas con la síntesis de 1-butanol. Finalmente, también se estudió la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos, por la cual se sintetizan las metil cetona. Dentro de esta ruta, se anotaron cuatro genes en los genomas de *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57.

Dado que las cuatro cepas estudiadas parecían ser capaces de sintetizar algunos compuestos volátiles con capacidad antifúngica, se analizó la composición de su volatilo de con la técnica HS-SPME-GC-MS (*Headspace Solid Phase MicroExtraction* acoplada con *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). En el volatilo de la cepa *Neorhizobium galegae* CRRU16 se encontraron un total de 11 compuestos volátiles con posible actividad antifúngica, entre los que destacaron el α -Pino y la 2-Heptanona. En el volatilo de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 se encontraron un total de 11 compuestos volátiles con posible actividad antifúngica, entre los que destacaron el 1-butanol y la acetoina. En el volatilo de la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 se encontraron un total de 11 compuestos volátiles con posible actividad antifúngica, entre los que destacaron el 3-metil-1-Butanol y la 2-Pentanona. Por último, en el volatilo de la cepa *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 se encontraron un total de 11 compuestos volátiles con posible actividad antifúngica, entre los que destacaron el α -Pino y la metil isobutil cetona. Todos estos compuestos son conocidos por su capacidad antifúngica, por lo que podrían ser los responsables de los efectos observados en contra del hongo *Botrytis cinerea*.

Por último, en este capítulo se quiso estudiar si la actividad antifúngica mostrada podía ser debida a la activación de la resistencia sistémica en la planta. Para ello, analizamos la expresión génica de cuatro genes reporteros en las plantas de tomate, tras la exposición de las plantas al volatilo de las bacterias. Los genes analizados fueron el gen inhibidor de la proteinasa 1 (*pi-1*), el factor de respuesta de etileno (*pti4*), el receptor del etileno (*etr4*), el gen relacionado con la patogenicidad 1a (*pr1a*) y el gen de la fenilalanina amoníaco-liasa (*pal*). El análisis de la expresión del gen *pr1a* mostró que la expresión no variaba en las plantas expuestas al volatilo de la cepa *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57, mientras que en las plantas expuestas al volatilo de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 hubo una reducción significativa de la expresión. El análisis de la

expresión del gen *pi-I* mostró que la expresión en las plantas inoculadas con las cuatro bacterias disminuía significativamente en comparación con las plantas control. El análisis de la expresión del gen *pti4* mostró que la expresión en las plantas inoculadas con las cuatro bacterias disminuía significativamente en comparación con las plantas control. El análisis de la expresión del gen *etr4* mostró que la expresión no varió con respecto a las plantas control tras la exposición al volatilo de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, pero aumentó en las plantas expuestas al volatilo de la cepa *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57, sugiriendo que esta última puede estar relacionada con la activación de la síntesis del etileno. Por último, el análisis de la expresión del gen *pal* mostró que la expresión disminuyó tras la exposición al volatilo de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 con respecto a las plantas control, pero que aumentó en las plantas expuestas al volatilo de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, sugiriendo que el efecto observado en los ensayos *in vivo* podría estar relacionado con la activación de la síntesis del ácido salicílico.

CAPÍTULO V: INOCULACIÓN DE PLANTAS DE ZARZAMORA CON LAS BACTERIAS SELECCIONADAS Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA MEJORA NUTRACÉUTICA DE LOS FRUTOS.

En el último capítulo de la tesis doctoral fue evaluada la posibilidad de usar dos de las cepas seleccionadas en el Capítulo III para mejorar la producción de los cultivos de la especie *Rubus* tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo. En ambos experimentos, las plantas alcanzaron la fase de producción y los frutos fueron evaluados tanto en términos cualitativos como cuantitativos.

Las cepas seleccionadas fueron *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65, por ser las que mejores resultados mostraron en el estudio de la promoción del crecimiento vegetal del Capítulo III.

En el ensayo de la producción en condiciones de invernadero, se evaluó el contenido en clorofila previo a la floración. También fueron evaluados el número de flores por planta, el número de frutos por planta y el peso medio de los frutos por tratamiento. Con respecto al contenido en clorofila, la inoculación de las bacterias no mostró diferencias significativas con respecto al control sin inocular. Con respecto a la floración, esta aumentó significativamente en un 155,9% en aquellas plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65, lo que a su vez fue reflejado en la producción de frutos por planta que aumentó significativamente en un 207,7% en aquellas plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Sin embargo, el peso medio de los frutos no se vio alterado por la inoculación. En contraposición, las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 no mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas control en ninguno de los parámetros evaluados.

La composición de las moras recogidas en el ensayo en invernadero fue analizada. En total en todas las muestras, se detectaron 5 ácidos fenólicos, 18 flavonoides y 2 compuestos desconocidos que no pudieron ser identificados ni por su masa ni por su perfil de fragmentación iónica. En todas las muestras, los compuestos más abundantes del grupo de los ácidos fenólicos fueron el ácido elágico y el pentósido del ácido elágico, mientras que los compuestos más abundantes del grupo de los flavonoides fueron la sanguina H6, su isómero y la cianidina-3-o-glucósido. La concentración de estos compuestos fue esencialmente la misma en todos los tratamientos. Únicamente difirieron en la concentración del acetilhexósido de kaempferol, la cual aumentó significativamente en las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con las dos bacterias; la concentración la cianidina-3-o-glucósido, la cual aumentó significativamente en las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21; la concentración la glucogalina, la cual disminuyó significativamente en las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con ambas bacterias; y las concentraciones de la sanguina H6 y su isómero, las cuales disminuyeron significativamente en las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, pero aumentaron significativamente en las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65.

Todos estos compuestos identificados en las moras son los responsables de las propiedades nutraceuticas asociadas al consumo de este tipo de fruto. Por esto, se quiso determinar si las diferencias observadas en la concentración de los compuestos fenólicos entre las diferentes moras obtenidas de los ensayos en el invernadero aumentaban la resistencia al estrés térmico del organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

Los datos fueron tomados en el día 2 de la fase adulta de *Caenorhabditis elegans* tras 6 y 8 horas de exposición al estrés térmico y en el día 9 de la fase adulta, también tras 6 y 8 horas de exposición al estrés térmico. En términos generales, salvo en el día 2 a las 6 horas, las diferencias significativas entre las tasas de supervivencia fueron observadas al comparar los ensayos realizados sin extractos de mora y los ensayos realizados con nemátodos expuestos a los extractos de las moras obtenidas de las plantas control sin inocular. El resto de los resultados mostraron que, en el día 2 de la fase adulta, tras 6 horas de exposición al estrés térmico, la tasa de supervivencia de los nemátodos incrementaba tras la exposición a los extractos de las moras obtenidas de las plantas sin inocular con respecto al ensayo control realizado sin mora, aumentando de un 89,4 a un 95,7%. Por otro lado, los ensayos realizados con los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 incrementaron de manera significativa la tasa de supervivencia de los nemátodos con respecto al ensayo realizado sin los extractos de mora. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los ensayos realizados con los extractos de las moras de las plantas control sin inocular y los ensayos realizados con los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con las bacterias. En el día 2 de la fase adulta, tras 8 horas de estrés térmico y en el día 9 de la fase adulta tras 6 horas de estrés térmico, los

resultados fueron similares. Las diferencias significativas fueron observadas entre el ensayo realizado sin los extractos de las moras y los ensayos realizados con los extractos de las moras recogidas tanto de las plantas sin inocular como de las plantas inoculadas con las bacterias. Sin embargo, entre los ensayos realizados con los extractos de las moras no hubo diferencias significativas en las tasas de supervivencia de los nemátodos. Finalmente, en el día 9 de la fase adulta, tras 8 horas de estrés térmico, los resultados mostraron una mejora en la tasa de supervivencia en aquellos nemátodos expuestos a los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65, tanto en comparación con el ensayo realizado sin extracto de mora, como en comparación con el ensayo realizado con los extractos de las moras obtenidas de las plantas sin inocular. En estos casos, la tasa de supervivencia aumentó de un 41,8 y un 71,4% respectivamente a un 80,7%. Por el contrario, los nemátodos expuestos a los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 sólo mostraron diferencias significativas con respecto al ensayo realizado sin extracto de moras (Figura VI).

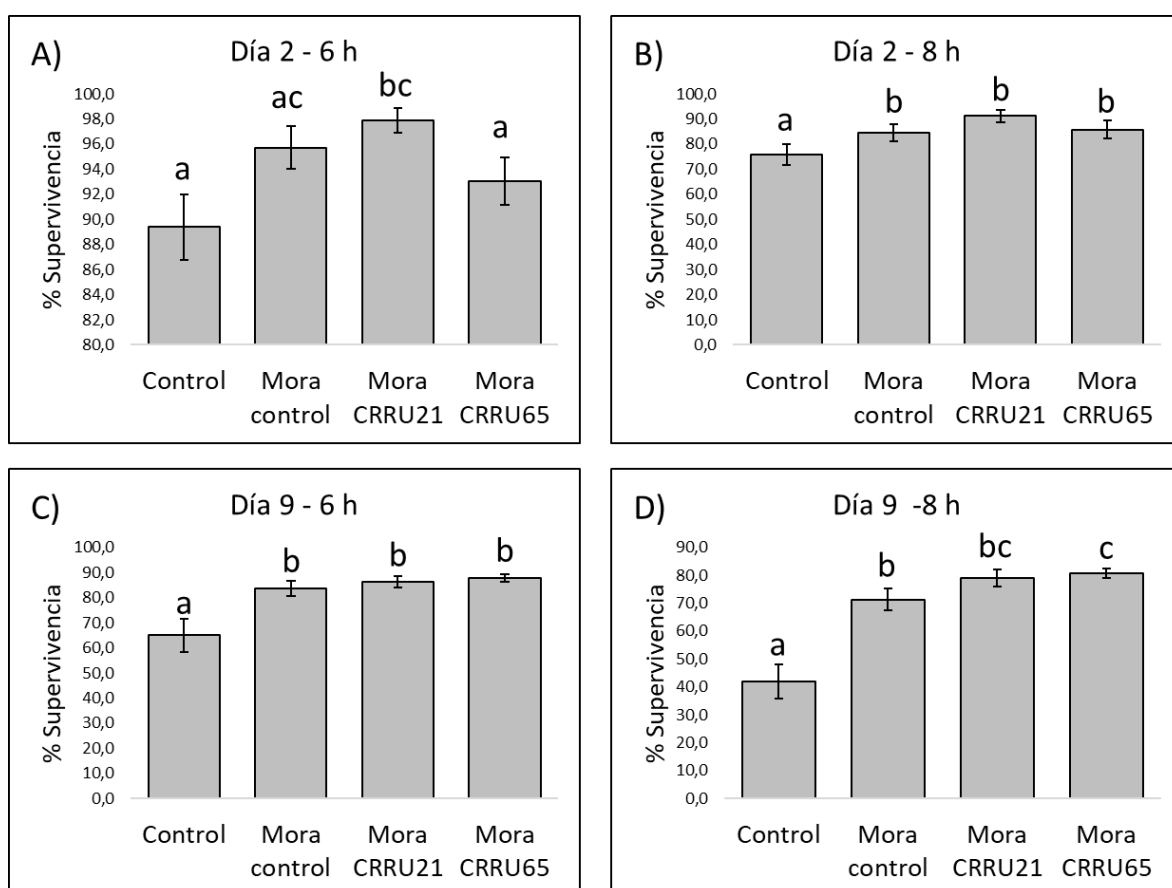


Figura VI. Porcentaje de supervivencia en: A) Día 2 de fase adulta tras 6 horas de exposición al estrés térmico; B) Día 2 de fase adulta tras 8 horas de exposición al estrés térmico; C) Día 9 de fase adulta tras 6 horas de exposición al estrés térmico; D) Día 9 de etapa adulta tras 8 horas de exposición al estrés térmico. Las letras a–b indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos según lo determinado por el análisis de Tukey.

Los efectos observados *in vivo* pueden ser debidos a la activación de algunas rutas metabólicas del organismo *Caenorhabditis elegans* relacionadas con la tolerancia al

estrés oxidativo. Por lo tanto, en este capítulo se quiso evaluar si a la exposición de los nemátodos a los extractos de las moras activaba la expresión de varios genes de la ruta de señalización de la insulina (IIS), una de las rutas principales involucradas en la regulación del estrés oxidativo. Los genes evaluados fueron los genes que codifican para los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1 y algunos de los genes que son activados por estos factores de transcripción, concretamente el gen de la enzima catalasa-1 (*ctl-1*), el gen de la enzima glutatión S-transferasa-7 (*gst-7*) y el gen de la proteína del choque térmico 16 (*hsp-16*) (Figura VII).

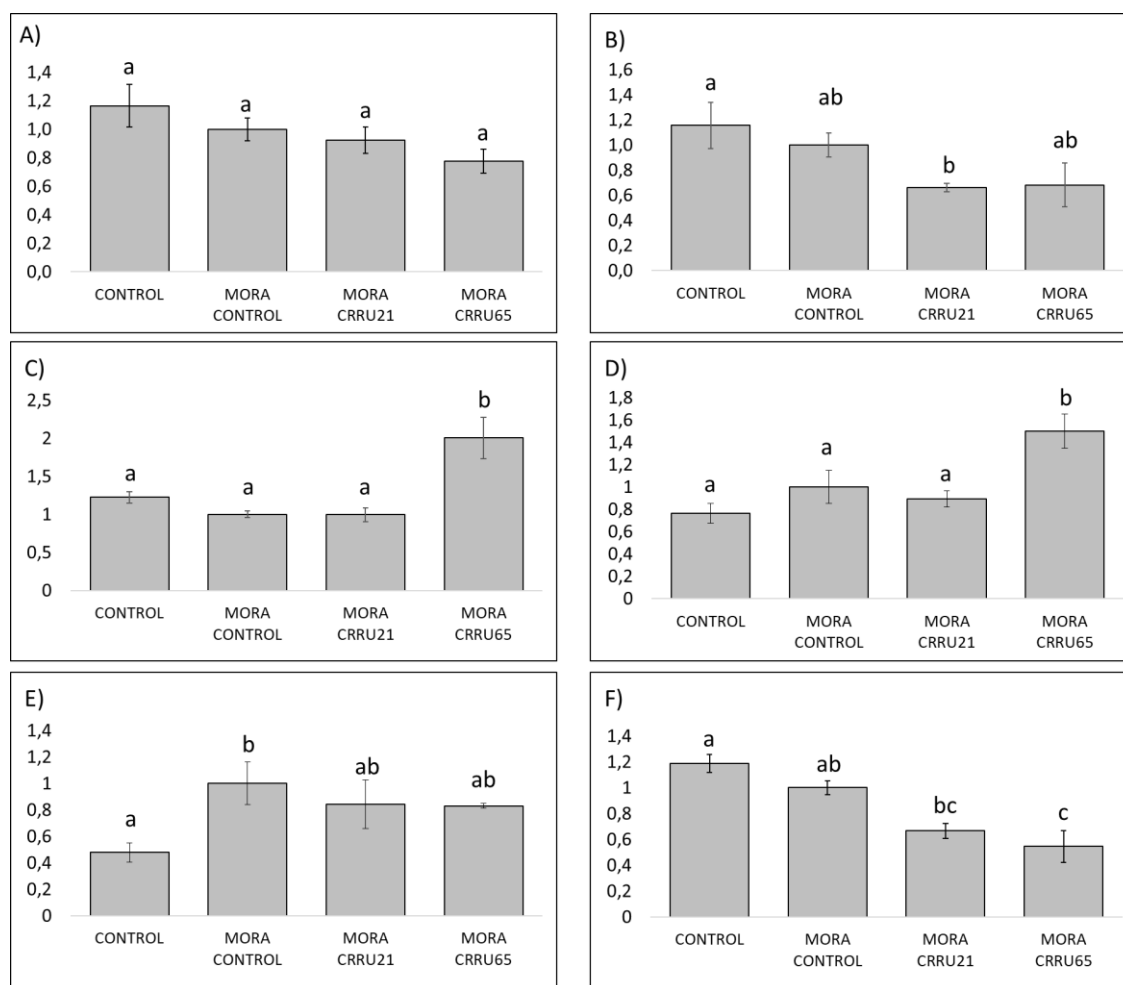


Figura VII. Análisis de la expresión relativa del gen A) *hsf-1*; B) *daf-16*; C) *skn-1*; D) *hsp-16*; E) *ctl-1*; F) *gst-7* en los organismos *Caenorhabditis elegans* en las placas control, las placas suplementadas con las mora sin inocular (MORA CONTROL), las placas suplementadas con el extracto de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 (MORA CRRU21) y las placas suplementadas con el extracto de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (MORA CRRU65). Las letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

En términos generales, la expresión de estos genes no se vio alterada por la exposición de los nemátodos a ninguno de los extractos obtenidos a partir de las moras recogidas de los ensayos en el invernadero. Las diferencias significativas en la expresión de estos genes sólo se dieron en dos casos concretos.

Por un lado, la expresión de los genes *daf-16* y *gst-7* fue significativamente inferior en aquellos nemátodos que estuvieron expuestos a los extractos de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, en comparación con la expresión en los nemátodos que no estuvieron expuestos a ningún tipo de extracto de mora.

Por otro lado, la expresión de los genes *skn-1* y *hsp-16* fue significativamente superior en aquellos nemátodos que estuvieron expuestos a los extractos de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65, en comparación con la expresión en los nemátodos de los otros ensayos. Por lo tanto, el aumento de la tasa de supervivencia bajo las condiciones de estrés térmico observado en el apartado anterior podría estar relacionado con el aumento de la expresión de estos dos genes.

Los ensayos previos demostraron que la inoculación con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mejoraba significativamente la producción de moras en condiciones del invernadero. Sin embargo, este estudio precisa de una validación a nivel de campo para asegurar que el efecto observado es aplicable en condiciones reales. En el campo, las bacterias tienen que hacer frente a multitud de estrés bióticos o abióticos que no están presentes en los ensayos de laboratorio o invernadero.

El ensayo en condiciones de campo fue llevado a cabo únicamente con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y se estudiaron diferentes parámetros de producción y de composición de las moras recogidas. En este caso, el análisis de la composición de los compuestos fenólicos de las moras mostró que los compuestos más abundantes del grupo de los ácidos fenólicos fueron el ácido elágico y el pentósido del ácido elágico, mientras que los compuestos más abundantes del grupo de los flavonoides fueron la sanguina H6, su isómero y la cianidina-3-o-glucósido.

Los parámetros de producción evaluados fueron la producción total, el número medio de frutos por planta, el peso medio de los frutos, el diámetro medio de los frutos y la altura media de los frutos. Todos estos parámetros fueron evaluados en cada uno de los cinco tiempos de recogida.

De manera general, el número de frutos producidos por las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 fue significativamente superior al número de frutos producidos por las plantas control (Figura VIII). Además, también hubo diferencias significativas en cuanto al peso medio de los frutos, la altura y el diámetro medios, siendo en todos los casos, significativamente superior en las moras recogidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65.

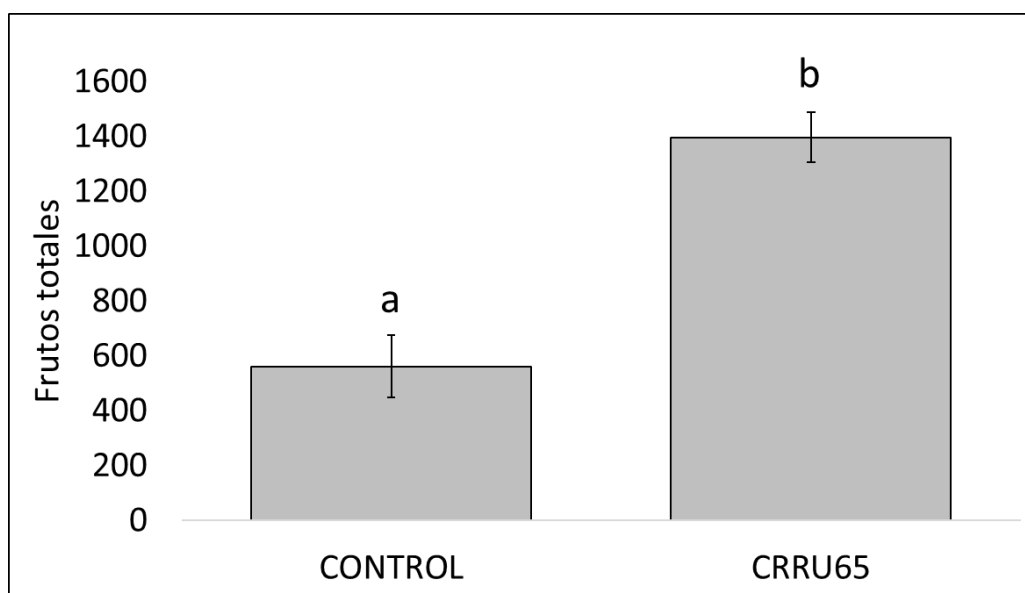


Figura VIII. Resultados de la producción total de frutos recogida las plantas control sin inocular y el tratamiento de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Las letras diferentes indican diferencias significativas según el test de t-student ($p < 0,05$).

Por otro lado, se evaluaron también los parámetros fisicoquímicos de pH, el porcentaje de ácido cítrico, los sólidos totales solubles (TSS), el índice de maduración, el porcentaje de humedad y el porcentaje de ceniza. En todos estos parámetros no hubo diferencias significativas entre las moras obtenidas de plantas inoculadas con *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y las moras obtenidas de las plantas control. Únicamente, al final de la cosecha, los frutos obtenidos de las plantas inoculadas con *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostraron un aumento significativo en la palatabilidad.

Finalmente, se evaluaron parámetros relacionados con el color de los frutos. Los parámetros evaluados fueron los determinados por la escala CIELab, que representan brillo, enrojecimiento y amarillez. El valor L^* representa la luminosidad. Aunque no hubo diferencias significativas entre las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y las moras obtenidas de las plantas control, el valor L^* fue más uniforme a lo largo de la cosecha en las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Los valores a^* y b^* aportan información sobre la variabilidad entre las tonalidades verde-rojo y azul-amarillo, respectivamente. En ambos casos, no hubo diferencias significativas entre las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y las moras obtenidas de las plantas control. El valor C^* representa la intensidad o pureza del color, los valores próximos a 0 indican colores poco saturados, cercanos al gris neutro. De nuevo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, los cuales presentaron ambos valores cercanos al 0. Finalmente, el valor h^* representa el valor de Hue, el cual posiciona a un color dentro de un círculo cromático estándar, lo que permite describir y clasificar los colores según el tono dominante. En este caso, tampoco se dieron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Por lo tanto, la inoculación de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 en las plantas de zarzamora incrementó la producción de moras con respecto a las plantas control, sin alterar los parámetros fisicoquímicos y de color que influyen en las características organolépticas de los frutos.

CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, hemos podido establecer las siguientes conclusiones:

1. La composición endofítica bacteriana de la planta *Rubus ulmifolius* es esencialmente la misma en los diferentes ambientes estudiados. Las diferencias observadas en la composición estaban influidas principalmente por factores del tejido vegetal, lo que demuestra que las plantas de *Rubus ulmifolius* Schott son capaces de seleccionar a las comunidades bacterianas que habitan en el interior de sus tejidos.
2. El interior de los tejidos vegetales de las plantas de zarzamora presenta una elevada biodiversidad de microorganismos aún sin explorar, siendo una fuente de nuevas especies bacterianas con capacidad de llevar a cabo potenciales actividades de interés biotecnológico.
3. La nueva especie *Ferranicluiabacter rubi* CRRU44^T aislada del interior de tallos de zarzamora es un buen candidato para ser aplicado como bioestimulante, pues la inoculación de las semillas de tomate, plantas en los primeros estadios y tomates en fase adulta mejora de manera significativa el desarrollo vegetal.
4. Las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranicluiabacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 presentan la capacidad de colonizar el sistema radicular y de promover el crecimiento vegetal de plantas de tomate, por lo que podrían ser consideradas como posibles candidatas para su uso como bioestimulantes en la agricultura.
5. El volatilo de las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 es una herramienta prometedora para el control del fitopatógeno *Botrytis cinerea* mediante una acción directa sobre el hongo.
6. Los análisis de la expresión génica de cinco genes reporteros de la inducción de la resistencia sistémica de las plantas de tomate sugieren que el volatilo de las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 no induce la activación de la defensa sistémica de las plantas de tomate, probablemente porque las bacterias endofíticas deben evadir los sistemas de defensa para lograr una colonización eficiente.
7. La inoculación de la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 en los cultivos de zarzamora ha resultado ser una importante herramienta para la mejorar de la actividad antioxidante de las moras, ya que incrementa la concentración de

los compuestos fenólicos, lo que a su vez mejora en la tolerancia al estrés oxidativo, como se ha demostrado en el modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*.

SUMMARY

INTRODUCTION.

Human population is constantly growing, and it became exponential since Industrial Revolution. Agriculture is the responsible for feeding all the human race and, in order to satisfy the growing population, it has had to evolve for achieving more efficient crops. Chemical fertilizer and pesticides have been two of the key factors in modern agriculture, since they provide with nutrients and protect plants from the attack of pathogens.

Fertilizer and pesticide use has been increasing since their incorporation into agriculture. Global fertilizer and pesticide consumption increased by 144.3% and by 162.3% respectively between 2000 and 2021. Currently, the overuse of the agrochemical compounds has resulted in the development of environmental and human health related negative consequences. These compounds excesses are accumulated in the soils, and they may end up in groundwater and aquifers, altering water physicochemical properties and contaminate it. Furthermore, the overuse of chemical pesticides has led to the emergence of resistant phytopathogenic microorganisms, which are no longer affected by the chemical pesticides. For these reasons, in recent years, governmental and supragovernmental legislations have become stricter regarding the use of this type of chemical compounds, clamouring to search for more sustainable alternatives.

One of the proposed alternatives was the use of biostimulants or biopesticides. The firsts are compounds formulated on PGP (Plant Growth Promotion) microorganisms which may have mechanisms for inducing plant growth. The seconds are formulated on microorganisms that have antagonistic activity against some phytopathogen. Most of these agronomic-interesting microorganisms are obtained either from soils, called rhizospheric microorganisms, or from the plant inner tissues, called endophytes.

In this sense, both rhizospheric and endophytic microorganisms may have an active role in the agricultural systems maintenance. Studying these microorganisms and their interactions with plants may bring new opportunities for the development of new biostimulants or biopesticides.

Soil microorganisms perform functions that are essential for the maintenance of ecosystems. In addition, they may induce plant growth and improve plant health. The interaction between plants and soil microorganisms is not unidirectional, since plants can also influence surrounding edaphic microorganisms. In this sense, some studies support the theory that plants may recruit specific microorganisms through the release of exudates, which help them to acquire nutrients and mitigate both biotic and abiotic stresses. These microorganisms can colonize the plant tissues and then establish inside them. These microorganisms are now considered endophytic microorganisms and are considered as plant's microbiome. This set of microorganisms is involved in maintaining the state of health and optimal nutrition of the plant. The origin of the microorganisms that inhabit plant tissues is diverse. Most are recruited from the surrounding soil while others come from the aerial environment and conform the phyllospheric microbiota, on

the surface of plant tissues. Both the microorganisms that make up the rhizosphere and those that make up the phyllosphere can end up colonizing the inside of the plants and thus establish in the endosphere. Estimations indicate that rhizospheric soil is the major contributor to the plant endophytic microbiota, which contributes with more than two-thirds of bacterial and fungal diversity. Furthermore, the composition of endophytic environments is diverse, varying not only between plants but also between different parts of the same individual. Since these microorganisms are intrinsically linked to the plant, it is likely that many of them possess beneficial mechanisms for plants. However, many of these functions remain uncharacterized. The use of new massive sequencing techniques has overcome the cultivation limitations and has allowed to efficiently analyse whole communities.

These microorganisms may have different mechanisms that serve for the development of biostimulants or biopesticides. On the one hand, biostimulants must have mechanisms to promote plant growth, which either facilitate nutrients acquisition such as nitrogen, phosphorus, potassium or iron or intervene in the hormonal regulation of the plant. On the other hand, biopesticides must have protection mechanisms against pathogens, such as the production of antibiotic molecules or the induction of systemic resistance in the plant.

OBJETIVES.

The main objective of this doctoral thesis is the study of the bacterial communities associated with the inner tissues of *Rubus ulmifolius* Schott and the isolation of endophytic bacteria for the evaluation of their potential use as bioinoculants, the evaluation of their potential use as biopesticides against phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* and the evaluation of its potential use as blackberry production enhancers. In order to achieve this objective, the following specific objectives are proposed:

1. Study of the endophytic bacterial diversity of *Rubus ulmifolius* Schott's roots, stems and leaves, collected in three environments impacted by different environmental conditions.
2. Isolation, identification and *in vitro* phenotypic characterization of plant growth promotion and *Botrytis cinerea* biocontrol mechanisms displayed by endophytic bacteria obtained from the inside *Rubus ulmifolius* Schott's roots and stems.
3. Evaluation of the colonization abilities of the selected bacteria by combining *in vitro* and *in vivo* techniques.
4. Plant growth promotion evaluation and colonization quantification of the selected bacteria in *Solanum lycopersicum* plants.
5. *Botrytis cinerea* biocontrol evaluation of the selected bacteria in *Solanum lycopersicum* plants.
6. *In silico* and *in vivo* antifungal potential evaluation of the selected bacteria volatilome against the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*.
7. Analysis of the selected bacteria volatilome effect on the induction of systemic resistance in *Solanum lycopersicum* plants.

8. Blackberry fruit production evaluation after *Rubus* sp. selected bacteria inoculation under greenhouse and field conditions.
9. Phenolic compounds composition analysis in blackberry fruits after selected bacteria plant inoculation and its effect on oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* model organism.
10. Gene expression analysis in *Caenorhabditis elegans* regarding oxidative stress tolerance genes after exposure to blackberries obtained from selected bacteria inoculated plants.

CHAPTER I: METATAXONOMIC ANALYSIS OF ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH DIFFERENT TISSUES OF BLACKBERRY PLANTS.

During this chapter, the bacterial diversity within root, stem and leaves of blackberry plants, *Rubus ulmifolius* Schott, was evaluated. Samples were taken from several blackberry plants located in three different environments which were influenced by different environmental factors. Firstly, plant samples were taken from a location that was not influenced by any factor, which we called Natural. Secondly, samples were taken from two other locations, one influenced by riparian environments, which was called Riverside, and another influenced by nearby crop fields, which was called Humanized.

First, the bacterial composition was studied at different taxonomic levels regarding the different tissue samples in the different environments. In all samples, the three most abundant bacterial phyla were the phyla Pseudomonadota, Actinomycetota and Bacteroidota. Furthermore, root samples showed an overrepresentation of other phyla, such as Myxococcota or Acidobacteriota. Regarding the bacterial classes, the most abundant in all samples were the Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria classes, both belonging to the Pseudomonadota phylum. Actinobacteria class was also abundant in all samples, although it slightly decreased in leaf samples from both Humanized and Riverside environments. Finally, Bacteroidia class did not represent a large percentage in the root samples but increased in the other two tissues. Regarding bacterial orders, the most abundant in all samples was Sphingomonadales, and the abundance of this taxon increased from the root samples to the aerial part of the plant in all environments. The order Hyphomicrobiales was also abundant in all samples, although it did not show a constant pattern. The order Cytophagales showed low representation in root samples from all environments, but its abundance increased in stem and leaf samples. Finally, there were some orders that appeared overrepresented in specific samples, such as the order Burkholderiales in the stem samples from the Riverside environment or the order Pseudomonadales in the leaf samples from the Humanized environments. Regarding the bacterial family diversity, the *Sphingomonadaceae* family was the most abundant in all samples. However, the next most abundant families differed among samples. In the samples from Natural environments, the families *Xanthobacteraceae* and *Microbacteriaceae* were the second and third most abundant families. In the samples from the Riverside environments, they were the families *Xanthobacteraceae* and

Pseudonocardiaceae; and in the root samples from Humanized environments, the main families were *Streptomycetaceae* and *Steroidobacteraceae*. Finally, regarding genera, the genus *Sphingomonas* was the most abundant genus in all the samples and, as occurred with the class Alphaproteobacteria, the order Sphingomonadales and the family *Sphingomonaceae*, it showed an increasing abundance from root samples to aerial tissues samples. The rest of the genera stood out in a diverse way in the different samples (Figure I).

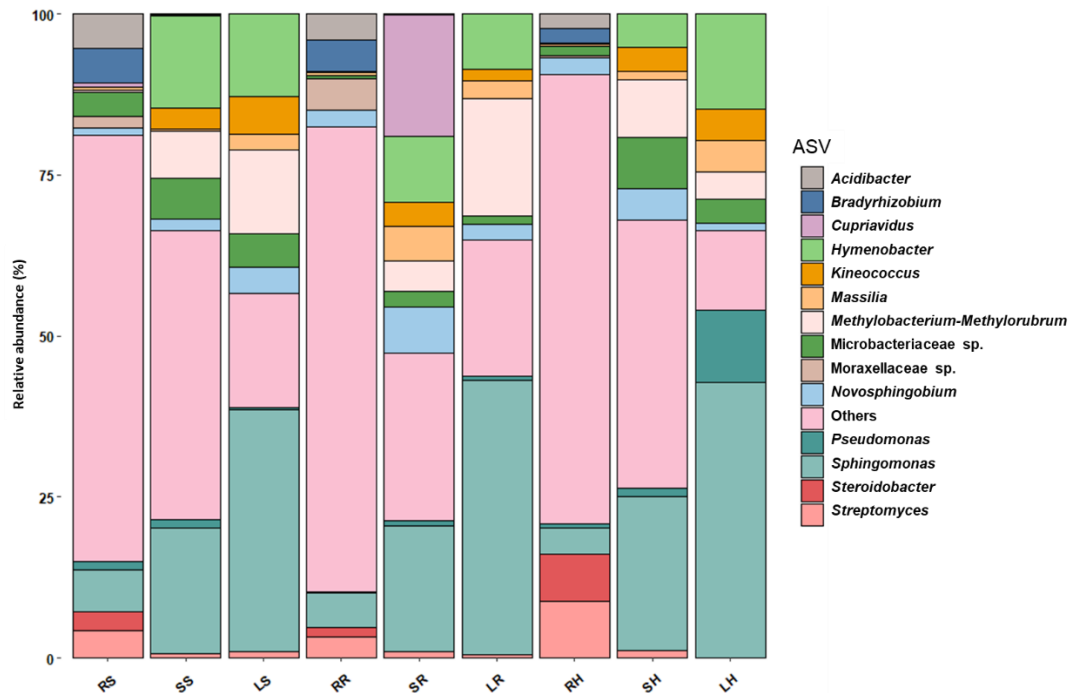


Figure I. Relative abundance of bacterial genera in different anatomic parts of the *Rubus ulmifolius* plant sampled in different locations. RS: root samples from plants located in Natural environment; SS: stem samples from plants located in Natural environment; LS: leaf samples from plants located in Natural environment; RR: root samples from plants located in Riverside environment; SR: stem samples from plants located in Riverside environment; LR: leaf samples from plants located in Riverside environment; RH: root samples from plants located in Humanized environment; SH: stem samples from plants located in Humanized environment; LH: leaf samples from plants located in Humanized environment.

Bacterial composition seemed to be essentially the same across different locations. In this sense, statistical analysis showed that most significant differences in composition were between root samples and leaf samples from the same environments.

Previous results seemed to indicate that the community composition of endophytic bacteria was shaped by the tissue and not by the sampling location. To further explore this idea, we carried out an alpha and beta diversity analyses of the samples. Alpha diversity evaluates intraspecific diversity. Results obtained after Richness, Chao1, ACE, Shannon, Simpson and Evenness indices calculations showed that the highest diversities values were obtained in the root samples, followed by stem samples, and leaf samples. Furthermore, statistical analysis showed that there were only significant differences between root and leaf samples diversities from the same environments. Bray-Curtis index was used for beta

diversity analysis and showed that samples were grouped according to the sampled tissue and not the plant location, which corroborated the theory that bacterial communities composition was determined by the tissue in which they are located. Therefore, all these results support the theory that plants are capable of selecting which bacteria may colonize their different tissues.

During this chapter, additional studies were carried out, such as differential abundance analysis (DAA), core microbiome analysis or endophytic bacteria associated metabolic pathways prediction. After DAA we observed that the abundance of the *Xanthobacteraceae* family increased in all root samples, when comparing root and stem samples. Similarly, *Hymenobacteraceae* family increased in all leaf samples and *Beijerinckiaceae* family increased in the leaf samples from the Riverside and Natural environments, when comparing root and leaf samples. In root samples, the greater abundance was observed in *Micromonosporaceae* and *Xanthobacteraceae* families. Finally, there were no differential abundances regarding bacterial families between stem and leaf samples.

Core microbiome analysis was carried out in each group of samples separately. The results showed that the most abundant family in all groups was *Sphingomonadaceae*. Additionally, the *Xanthobacteriaceae* family only prevailed in root samples, as DAA showed. *Hymenobacteraceae*, *Microbacteraceae* and *Beijerinckiaceae* families belonged to the core microbiome of all stem and leaf samples. Finally, *Oxallobacteriaceae* family only appeared in the core microbiome of the leaf samples. In general, stem and leaf samples shared more taxa than any other group.

Finally, the metabolic pathways associated with the bacterial communities of each of the samples was predicted. This allowed us to get an idea of the metabolic potential of the bacterial communities. Predicted pathways included common metabolic processes such as lipopolysaccharide biosynthesis, carbon fixation, fatty acid metabolism, glycolysis, gluconeogenesis, and several anabolic and catabolic processes. However, secondary metabolites production such as vancomycin or tetracycline biosynthetic pathways were also predicted. Additionally, some pathways related to drought and heat stress tolerance were predicted, such as soluble carbohydrates, proline and antioxidant molecules biosynthesis.

The results obtained during this chapter revealed that the bacterial composition of *Rubus ulmifolius* plants was essentially the same in the same tissues across different environments while differences in composition were observed among different tissues of the same plant. Among the different tissues, the higher the sample was in the plant, the lower the diversity was. Furthermore, taxa composition was uniform among root samples from different environments, but stem and leaf samples showed some specific taxa enrichment. This is the first time that endophytic bacteria composition of *Rubus ulmifolius* plants across different tissues and environment has been evaluated. Results of this chapter contribute to establish blackberry plants as a source of new alternative biocompounds.

CHAPTER II: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ENDOPHYTIC BACTERIA COLLECTION FROM BLACKBERRY PLANTS' INNER.

Culture-independent methods, such as the massive amplicon sequencing carried out in the previous chapter, provide reliable information on the bacterial communities that host different ecosystems. However, approximately 80% of these are not culturable. So, in this second chapter, a set of endophytic bacteria from the inside of root and stem samples was isolated. Furthermore, in this chapter we carried out the identification of the isolates based on their protein profile and based on the 16S rRNA gene sequencing.

In total, 70 endophytic strains were isolated from different parts of the plant, specifically 39 were isolated from the root and 31 from the stem. The analysis of the protein profile was carried out with the MALDI TOF-MS technique, using for comparisons both the Bruker database and the group's own database which includes more than 100 species belonging to *Rhizobiaceae* family. The Bruker database allowed species-level identification of 12.9% of strains and genus-level identification of 20%. While the *Rhizobiaceae* family database allowed the identification at the species level of 17.1% of the strains and the identification at the genus level of 8.5%. Protein profiles were compared and grouped based on 80% similarity. This allowed us to group the 70 different isolates into 35 groups according to their protein profiles. A single representant from each of the groups was selected for identification by sequencing the 16S rRNA gene.

After 16S rRNA gene sequencing, the sequences were compared with the sequences deposited in the NCBI database. It was found that the genera *Bacillus*, *Neorhizobium* and *Rhizobium* were the dominant among root isolates, representing 10.3, 10.3 and 25.6%, respectively; while, in the stems, most of the isolates belonged to the genera *Agrobacterium*, *Pseudomonas* and *Rhizobium*, which represented 12.9, 19.4 and 25.8% respectively. Furthermore, it was highlighted that most of the genera were isolated in one of the two tissues and only four were common in both the root and stem. Specifically, the genera *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Novosphingobium* and *Rhizobium*. In the root, the rest of the isolates belonged to the genera *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Inquilius*, *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Neobacillus*, *Neorhizobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, and *Staphylococcus*, while in the stem the isolates belonged to the genera *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. After this evaluation, 16S rRNA gene sequence of CRRU44 showed similarity percentage with the rest of the sequences deposited in the database lower than 96%, which indicates that it could be a new bacterial genus.

The family *Rhizobiaceae* was the closest family to CRRU44 strain, so a phylogenetic analysis was carried out with the 16S rRNA gene of the type strains of the type species of the genera included in the *Rhizobiaceae* family until that moment (Figure II). In addition, the ANI_b and AAI values were calculated between the genome of CRRU44 strain and the closest strains' genomes, which belonged to this family. In all cases, values were lower than 78.5 and 76.5%, respectively. Therefore, these results

indicated that the CRRU44 strain belonged to a new bacterial genus which we called *Ferraniclubacter*, and the new species was called *Ferraniclubacter rubi*.

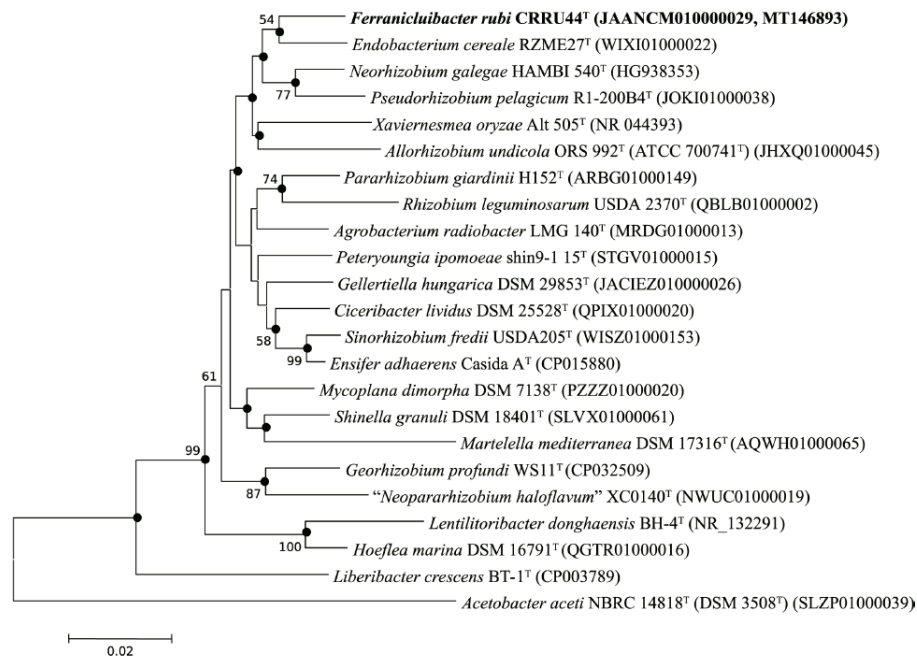


Figure II. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA ribosomal gene showing the phylogenetic position of strain CRRU44^T within the *Rhizobiaceae* family. Analysis performed with the Neighbor-Joining method and Kimura coefficient 2 parameters, based on 1000 replicates. Genbank accession numbers are given in parentheses. The nodes marked with circles were also obtained with the maximum probability algorithm.

CHAPTER III: CHARACTERIZATION OF THE ISOLATES' ABILITY TO PROMOTE PLANT GROWTH.

After genotypically characterized the isolates, the ability to promote plant growth of the 70 strains was evaluated during Chapter III. First, plant growth promotion related mechanisms were evaluated *in vitro*. Specifically, we evaluated nitrogen-free media growth, phosphate solubilization, potassium compounds solubilization, siderophores production, phytohormones production and ACC deaminase synthesis. Additionally, the colonization ability of the strains was also studied *in vitro* by carrying out hydrolytic enzyme production and biofilm production assays. The results obtained allowed us to select the most efficient bacteria. Subsequently, both the plant growth promotion and colonization abilities of the selected strains were evaluated *in vivo* assays with tomato plants.

After these assays, 34.7% (n=16) of the evaluated strains were able to grow in nitrogen-free media, 61.4% (n=43) were able to solubilize dicalcium phosphate, 28.6% (n=20) were able to solubilize tricalcium phosphate, only *Pantoea agglomerans* CRRU38 strain was able to solubilize hydroxyapatite, 18.6% (n=13) were able to solubilize potassium aluminum silicate (AlK₂O₆Si₂), 51.4% (n=36) were able to produce siderophores, 91.49% (n=64) were able to synthesize auxins, and 92.9% (n=65) of the

evaluated strains were able to use ACC. Regarding colonization ability, 50% (n=35) of the 70 isolated strains were able to hydrolyze cellulose, 24.3% (n=17) were able to hydrolyze xylan, and 81.4% (n=57) were able to hydrolyze starch.

These results allowed us to select seven strains for the further analyses. The selected strains were *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65, and *Rhizobium laguerreae* CRRU67. These strains were evaluated to produce indole acetic acid by HPLC. It was obtained that these strains produced 110, 73, 830, 490, 140, 220 and 210, respectively. These selected strains were evaluated for additional colonization plant growth promotion essays in tomato plants.

First, the strains' ability to produce biofilms was studied. All the seven evaluated strains were able to produce biofilms, however, they showed two clearly differentiated patterns. On the one hand, Gram-positive bacteria, that is *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B and *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strains, showed rapid development of the biofilm, reaching its maximum at 24 hours. On the other hand, Gram-negative bacteria, that is *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65, and *Rhizobium laguerreae* CRRU67, showed a slight production of biofilm in the first 48 hours, which began to increase after 72 hours. Therefore, Gram-negative strains seemed to require more time than Gram-positive strains to develop biofilm. Although all strains seemed to be capable of producing biofilms, this essay was performed using the optimal conditions for biofilm development. In this sense, it is necessary to perform more complex colonization assays.

In this sense, a colonization visualization evaluation was carried out on tomato roots. To do this, the strains belonging to the *Rhizobiaceae* family were conjugated to acquire a green fluorescent protein GFP containing plasmid, while the rest of the strains were immunolocalized with antibodies coupled to a fluorophore. Green fluorescent protein conjugation of *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65, and *Rhizobium laguerreae* CRRU67 strains exhibited an abundant and widespread colonization throughout the root (Figure III). Immunolocalized *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 and *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 strains also showed abundant and generalized colonization of the root. However, immunolocalized *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B and *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strains showed a more limited and specific colonization. *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B colonization was located mainly in the emergence zones of secondary roots, while the *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strain showed little colonization.

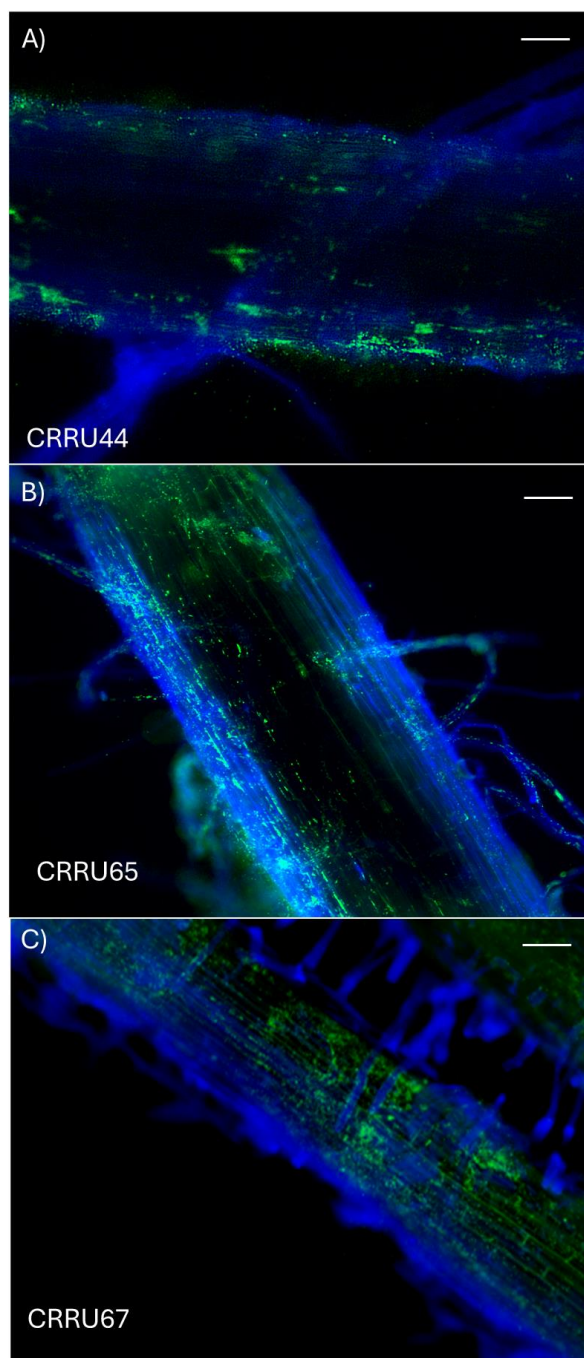


Figure III. Fluorescence microscopic images of roots of tomato seedlings inoculated with fluorescent protein labelled strains (green) and counterstained with calcofluor white (blue), seven days after inoculation: A) *Ferranicluibacter rubi* CRRU44 (bar 200 μm); B) *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (bar 200 μm); C) *Rhizobium laguerreae* CRRU67 (bar 330 μm).

After colonization ability evaluation, we wanted to evaluate the ability to promote plant growth in the first stages of the tomato plant. In this trial, aerial part length, root part length and the number of secondary roots were measured. In aerial part elongation, the inoculation of three strains showed significantly positive results compared to control plants, while *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 strain significantly reduced aerial part length of the plants. *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranicluibacter rubi*

CRRU44, and *Rhizobium laguerreae* CRRU65, showed a significant increment of the aerial part length by 194%, 180% and 153% respectively, with respect to the control. In root part elongation, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 and *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 strains significantly increased the size by 151% and 138%, respectively. On the contrary, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 strain significantly reduced the root length of the inoculated plants. Finally, regarding number of secondary roots, again *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 and *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 showed a significant increment of the number of secondary roots. Both strains increased the number of secondary roots by 157%. The results obtained in this trial allowed us to carry out a new selection of the strains, which were reduced to *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 and *Rhizobium laguerreae* CRRU67. With these four strains we wanted to evaluate plant growth promotion in adult plants under illuminated chamber conditions. In this trial, data were taken on aerial part length, number of leaves, stem base calibre and wet weight (Figure IV).

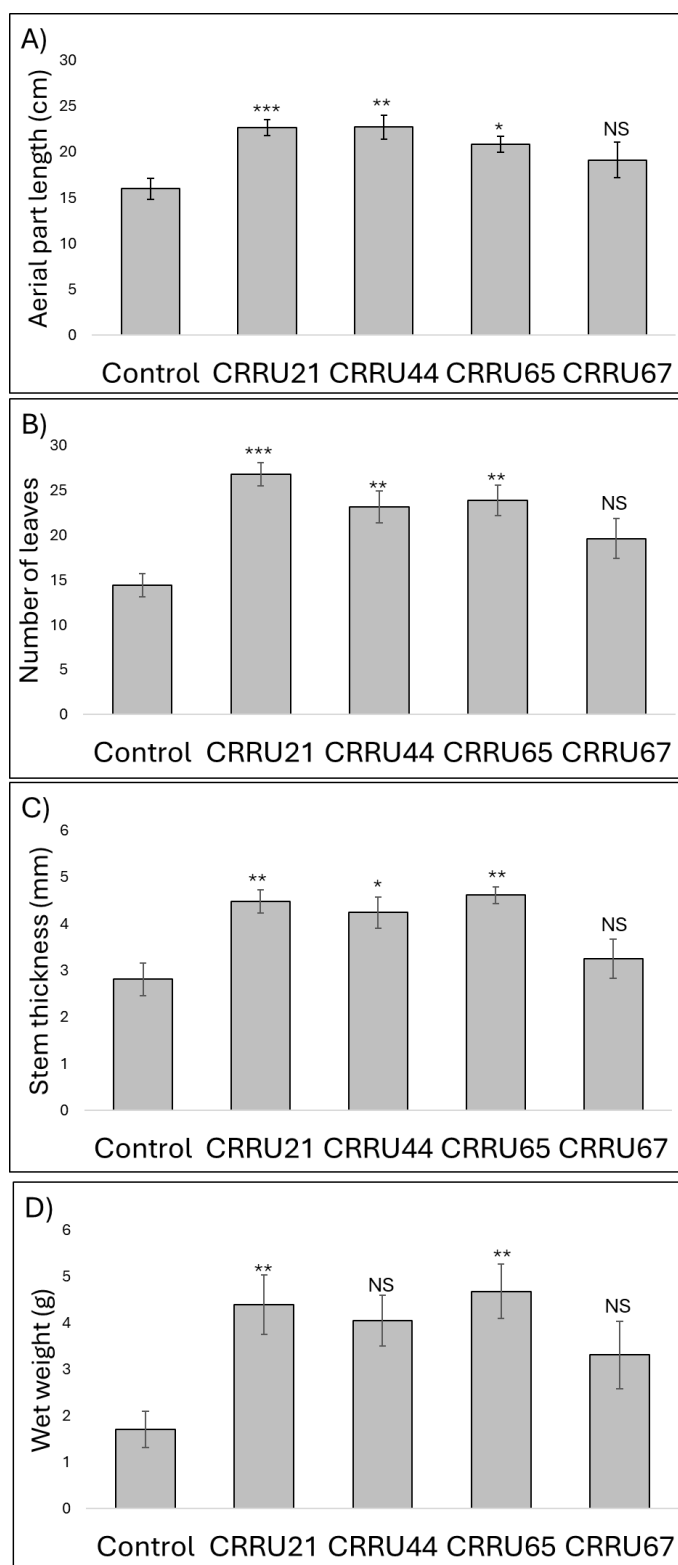


Figure IV. A) Average length of the aerial parts of the tomato after being inoculated with the study strains. B) Average number of leaves of the tomato after being inoculated with the study strains. C) Average thickness of the stem base of the tomatoes after being inoculated. D) Average wet weight of the tomatoes after being inoculated. Significant differences between control plants and treatment plants are marked with asterisks according to the Tukey test at $p \leq 0.1$ (*), $p \leq 0.05$ (**) and $p \leq 0.01$ (***).

Regarding aerial part elongation, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 and *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 strains inoculations showed the greatest increases, by 141.7 and 141.9% respectively. Followed by the *Rhizobium laguerreae* CRRU65 strain, which increased the of the aerial part length by 130.4%, and by the *Rhizobium laguerreae* CRRU67 strain, which increased it by 119.5%. Regarding the number of leaves, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strain was the one that showed the best results, with an increase of 185.7%, followed by *Rhizobium laguerreae* CRRU65 strain with 165.3% and *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 strain with a 160.7%. *Rhizobium laguerreae* CRRU67 strain showed a non-significant increase of 136.1%. In the study of the thickness of the stem base, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 strain showed the greatest increase of 164.0%, followed by *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strain, with 159.3% and *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 strain, with 150.9%. Again, *Rhizobium laguerreae* CRRU67 strain showed a non-significant increase of 115.5%. Finally, in the wet weight measurement, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 and *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 inoculations showed the best results, increasing them by 273.6% and 257.3% respectively.

Additionally, root samples from the previous plant trials were taken to quantify colonization by using the qPCR technique. Inoculated plants with *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strain showed a root colonization of 10^{12} log CFU/gram of root. Similarly, inoculated plants with *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 strain showed a root colonization of 10^{15} CFU/gram of root. Finally, inoculated plants with *Rhizobium laguerreae* CRRU65 and *Rhizobium laguerreae* CRRU67 showed a root colonization of 10^{13} CFU/gram of root, respectively.

During this chapter, the ability of the strains to promote plant growth has been evaluated by using different approaches. *In silico* studies of genomes also provide valuable information about the different pathways that may be involved in the previously performed *in vivo* assays. Therefore, the genome of the four selected strains was studied. Thus, in the genome of the *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strain, a total of 8 genes were annotated for phosphates solubilization, 6 for siderophores production, 3 for nitrogen fixation, 9 for the synthesis of IAA, 3 for plant tissues degradation and 14 for colonization. In the genome of *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 strain, a total of 23 genes were annotated for phosphates solubilization, 8 for siderophores production, 9 for the IAA synthesis, 3 for plant tissues degradation and 52 for colonization. In the genome of *Rhizobium laguerreae* CRRU65, 24 genes were annotated for phosphates solubilization, 8 for siderophores production, 6 for nitrogen fixation, 10 for IAA synthesis, 7 for plant tissues degradation and 59 for colonization. Finally, in the genome of *Rhizobium laguerreae* CRRU67 strain, a total of 26 genes were annotated for phosphate solubilization, 8 for siderophore production, 6 for nitrogen fixation, 10 for IAA synthesis, 7 for plant tissue degradation and 58 for colonization.

CHAPTER IV: CHARACTERIZATION OF THE ISOLATES' BIOCONTROL POTENTIAL AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *BOTRYTIS CINEREA*.

During Chapter IV we evaluated the biopesticide potential against the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* of the 70 strains isolated in Chapter II. Firstly, the production of hydrolytic enzymes, the direct action of the bacteria against the fungus and the indirect action of the bacterial volatilome against the fungus were evaluated *in vitro*. The results obtained allowed us to select the most efficient bacteria. Next, the biofungicide potential of the selected strains was evaluated *in vivo* on tomato plants. Four of the analysed strains presented a volatilome with a great antifungal potential. In this sense, the genome of the selected strains was evaluated for the biosynthesis of volatile compounds with reported antifungal activity. Additionally, the volatilome composition and its effect on the regulation of the expression of genes involved in the activation of systemic resistance in the plant was also evaluated.

After the *in vitro* assays, 68.6% (n=48) of the 70 isolated bacteria were able to hydrolyze β -glucosides, 44.3% (n=31) were able to hydrolyze milk proteins, 28.6% (n=20) were able to hydrolyze gelatine proteins and only *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 strain was able to hydrolyze. Beside the production of hydrolytic enzymes, the inhibition of *Botrytis cinerea* growth was evaluated through co-culture with the bacteria and through the production of volatile compounds was also evaluated *in vitro*. In these two trials, 54.3% (n=38) of the 70 isolated bacteria were able to inhibit *Botrytis cinerea* growth when both microorganisms were co-cultured on the same plate, but only 18.6% (n=13) were able to inhibit *Botrytis cinerea* growth through the production of volatile compounds.

The previous results allowed us to select the strains *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57, *Rhizobium laguerreae* CRRU65, and *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

The antifungal ability of the selected strains was evaluated through *in vivo* assays in tomato plants. Two types of tests were carried out, one in which tomato plants were inoculated with the bacteria and infected with the fungus, so both microorganisms were in contact; and another test in which the plants were infected by the fungus, but the bacteria remained separated from both the fungus and the plant. The latter assay allowed us to evaluate the inhibition of *Botrytis cinerea* growth through the production of volatile compounds. In both trials, the survival rate of tomato plants was evaluated.

On one hand, in the first *in vivo* assay, the control plants, infected with the *Botrytis cinerea* fungus, showed 0% of survival rate. Plants inoculated with the bacteria *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57, and *Rhizobium laguerreae* CRRU65, showed survival rates of 20, 0, 13, 7, 0 and 7%

respectively, however, these results did not represent a significant difference. On the contrary, plant inoculation with the *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, and *Rhizobium laguerreae* CRRU67 showed survival rates of 67, 40 and 67%, respectively. All of them represented significant differences when comparing with the control plants.

On the other hand, in the *in vivo* assay mediated by the production of volatile compounds, control plants infected with the pathogen *Botrytis cinerea* showed a survival rate of 40%. Plants inoculated with the bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 and *Rhizobium laguerreae* CRRU67 showed an improvement in survival rates of 80, 80 and 60% respectively, although this did not represent a significant difference. However, inoculation with the strains *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferrancluibacter rubi* CRRU44, and *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 showed an improvement in survival rates of 93, 87, 97, 97 and 100% respectively. In this case, results were significantly different when comparing with control plants (Figure V).

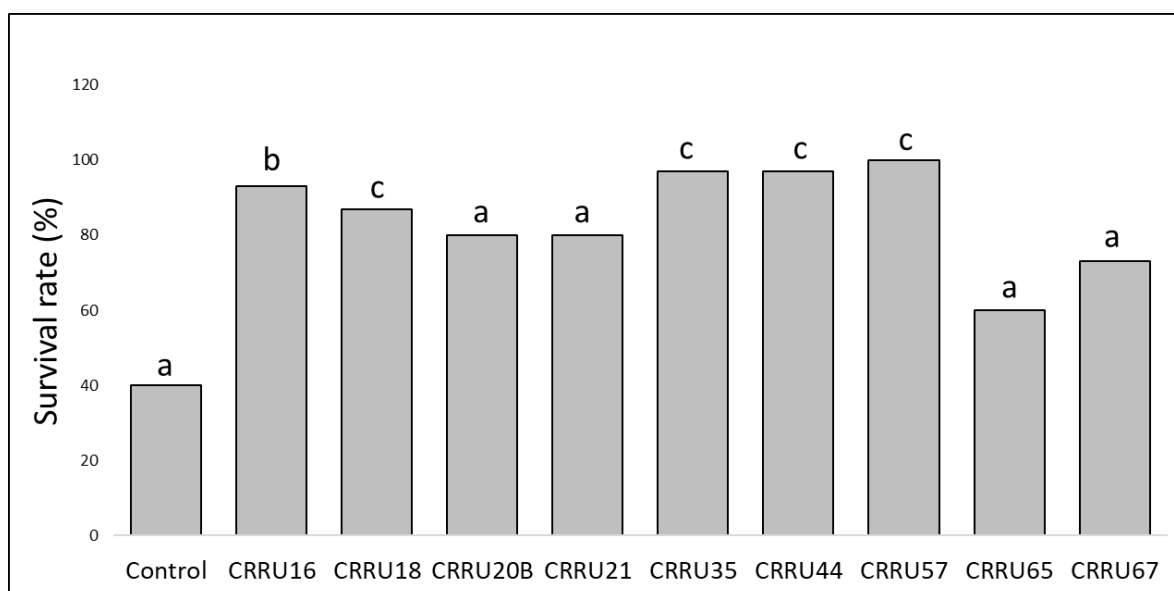


Figure V. Survival rate of *Botrytis cinerea* infected tomato plants after exposition to bacteria volatilomes. Letters indicate significant differences between treatments according to the Chi square test, p value < 0.05.

Results obtained in this trial allowed us to carry out a new selection of the strains, which were reduced to *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 and *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57. Furthermore, the results seemed to indicate that the antifungal activity mediated by the production of volatile compounds was stronger, so we wanted to determine which volatile compounds could be responsible for the activity shown. To do this, we first evaluate the bacteria genomes, searching for genes related to the biosynthesis of some of the volatile molecules with known antifungal activity. We studied several biosynthetic pathways such as acetoin biosynthesis pathway. Here we found α -acetolactate synthase gene had been annotated in the four evaluated genomes, but α -acetolactate decarboxylase gene was only

annotated *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 genome. The acetone-butanol-ethanol fermentation route was studied. In this case, three, four, four and five enzymes related to the synthesis of 1-butanol were annotated in the genomes of *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 and *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57, respectively. Finally, the fatty acid β -oxidation pathway was studied. Within this pathway, four genes were annotated in the genomes of *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 and *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57.

Since all the four strains seemed to have the potential to produce volatile compounds with antifungal activity, the composition of their volatilome was analyzed through the HS-SPME-GC-MS (Headspace Solid Phase MicroExtraction coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry) technique. *Neorhizobium galegae* CRRU16 volatilome was composed by 11 volatile compounds with possible antifungal activity, such as α -Pinene and 2-Heptanone. *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 volatilome was composed by 10 volatile compounds with possible antifungal activity, such as 1-butanol and acetoin. *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 volatilome was composed by 14 volatile compounds with possible antifungal activity, such as 3-methyl-1-Butanol and 2-Pentanone. *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 volatilome was composed by 8 volatile compounds with possible antifungal activity, such as α -Pinene and methyl isobutyl ketone. All these compounds are known for their antifungal capacity, so they could be responsible for the effects observed against *Botrytis cinerea* fungus.

Finally, in this chapter we wanted to study whether the antifungal activity shown *in vivo* could be due to the activation of systemic resistance in the plant. To do this, we analyzed the gene expression of four reporter genes in tomato plants, after exposing the plants to the bacteria's volatilome. The analyzed genes were the proteinase inhibitor 1 gene (*pi-1*), the ethylene response factor (*pti4*), the ethylene receptor (*etr4*), the pathogenicity-related gene 1a (*pr1a*) and the phenylalanine ammonia-lyase (*pal*). The analysis of the expression of the *pr1a* gene showed that plant exposition to *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57's volatilome did not reported variations on the gene expression. However, plant exposition to *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, and *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 showed a significant reduction in *pr1a* gene expression. The analysis of the expression of both *pi-1* and *pti4* genes showed that plant exposition to the four bacteria's volatilomes reported a significant reduction in both gene expressions. The analysis of the expression of the *etr4* gene showed that plant exposition to *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 and *Pseudomonas silesiensis* CRRU35's volatilomes did not reported variations on the gene expression. However, plant exposition to *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57's volatilome significantly increased gene expression. Finally, the analysis of the expression of the *pal* gene showed that plant exposition to *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 and *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57's volatilomes significantly decreased gene expression, but plant exposition to *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18's volatilome significantly increased gene expression, suggesting that the antifungal activity mediated by *Bacillus*

amyloliquefaciens CRRU18's volatilome observed during *in vivo* assays could be related to the activation of salicylic acid synthesis.

CHAPTER V: BLACKBERRY PLANTS INOCULATION WITH SELECTED BACTERIA AND ANALYSIS OF FRUIT PRODUCTION AND NUTRACEUTICAL IMPROVEMENT.

During this last chapter of the doctoral thesis, it was evaluated the use of two of the selected strains in Chapter III to improve the blackberry fruit production of *Rubus* sp. crops both in greenhouse and in field conditions. In both experiments, the plants reached the production phase, and the fruits were evaluated in both qualitative and quantitative terms.

Selected strains were *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 and *Rhizobium laguerreae* CRRU65, since they reported the best results during plant growth promotion *in vivo* assay performed during Chapter III.

During greenhouse conditions assay, the chlorophyll content prior to flowering was evaluated. The number of flowers per plant, the number of fruits per plant and the average fruit weight per treatment were also evaluated. Regarding the chlorophyll content, the inoculation of the bacteria did not show significant differences with respect to the non-inoculated control. Regarding flowering, plant inoculation with this *Rhizobium laguerreae* CRRU65 significantly increased it by 155.9%. This effect was also reflected on fruit production per plant, which significantly increased by 207.7% in *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants. However, the fruit average weight was not altered by the inoculation. In contrast, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 inoculated plants did not show significant differences with respect to control plants in any of the evaluated parameters.

Blackberries composition was also evaluated after greenhouse trial. In total, blackberry from inoculated plants and non-inoculated plants were composed by 5 phenolic acids, 18 flavonoids and 2 unknown compounds. In all samples, the most abundant phenolic acids were ellagic acid and ellagic acid-pentoside, while the most abundant flavonoid were sanguin H6, its isomer and cyanidin-3-o-glucoside. The concentration of these compounds was essentially the same in all treatments but there were some differences in some component concentration among treatments. Kaempferol acetylhexoside concentration was significantly increased in those fruits collected from blackberry plants inoculated with the two bacteria; Cyanidin-3-o-glucoside concentration significantly increased in fruits collected from blackberry plants inoculated with the *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21; galloyl glucose concentration significantly decreased in fruits collected from blackberry plants inoculated with both bacteria; and both sanguin H6 and its isomer concentrations significantly decreased in fruits collected from blackberry plants inoculated with the *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 strain, but significantly increased in fruits collected from blackberry plants inoculated with the *Rhizobium laguerreae* CRRU65.

All these compounds identified in blackberries are responsible for the nutraceutical properties associated with the consumption of this type of fruit. For this reason, we wanted to determine if the observed differences in phenolic compounds concentration among the different blackberries obtained from the greenhouse trials could be related with the increment of heat stress tolerance in model organism *Caenorhabditis elegans*.

Results were observed on day 2 of the adult phase of *Caenorhabditis elegans* after 6 and 8 hours of heat stress exposure and on day 9 of the adult phase, also after 6 and 8 hours of heat stress exposure. In general terms, except on day 2 at 6 hours, survival rates were significantly different when comparing the trials carried out without blackberry extracts and the trials carried out with nematodes exposed to the blackberry extracts obtained from the non-inoculated plants.

On day 2 of the adult phase after 6 of heat stress exposure, the survival rate of the nematodes significantly increased after exposure of blackberry extracts made of fruits obtained from the non-inoculated plants when comparing to the control test carried out without blackberry extracts. Survival rates increased from 89.4 to 95.7%. On the other hand, the tests carried out with the extracts of blackberries obtained from the *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 and *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated significantly increased the survival rate of the nematodes with respect to the test carried out without blackberry extracts. However, there were no significant differences between the tests carried out with the extracts of the blackberries from the non-inoculated control plants and the tests carried out with the extracts of the blackberries obtained from the bacteria inoculated plants. On day 2 of the adult phase, after 8 hours of heat stress exposure, and on day 9 of the adult phase after 6 hours of heat stress exposure, results were similar. Significant differences were observed between the test carried out without the blackberry extracts and the tests carried out with the extracts of the blackberries collected from both the non-inoculated plants and the bacteria inoculated plants inoculated with the bacteria. However, among the trials carried out with blackberry extracts there were no significant differences regarding the nematode survival rates. Finally, on day 9 of the adult phase, after 8 hours of heat stress exposure, the results showed an improvement in the survival rate in those nematodes exposed to extracts of blackberries obtained from *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants, when comparing with both the test carried out without blackberry extract, and the test carried out with the extracts of blackberries obtained from non-inoculated plants. In these cases, the survival rate increased from 41.8 and 71.4% respectively to 80.7%. On the contrary, nematodes exposed to blackberry extracts obtained from *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 inoculated plants inoculated only showed significant differences with respect to the test carried out without blackberry extract (Figure VI).

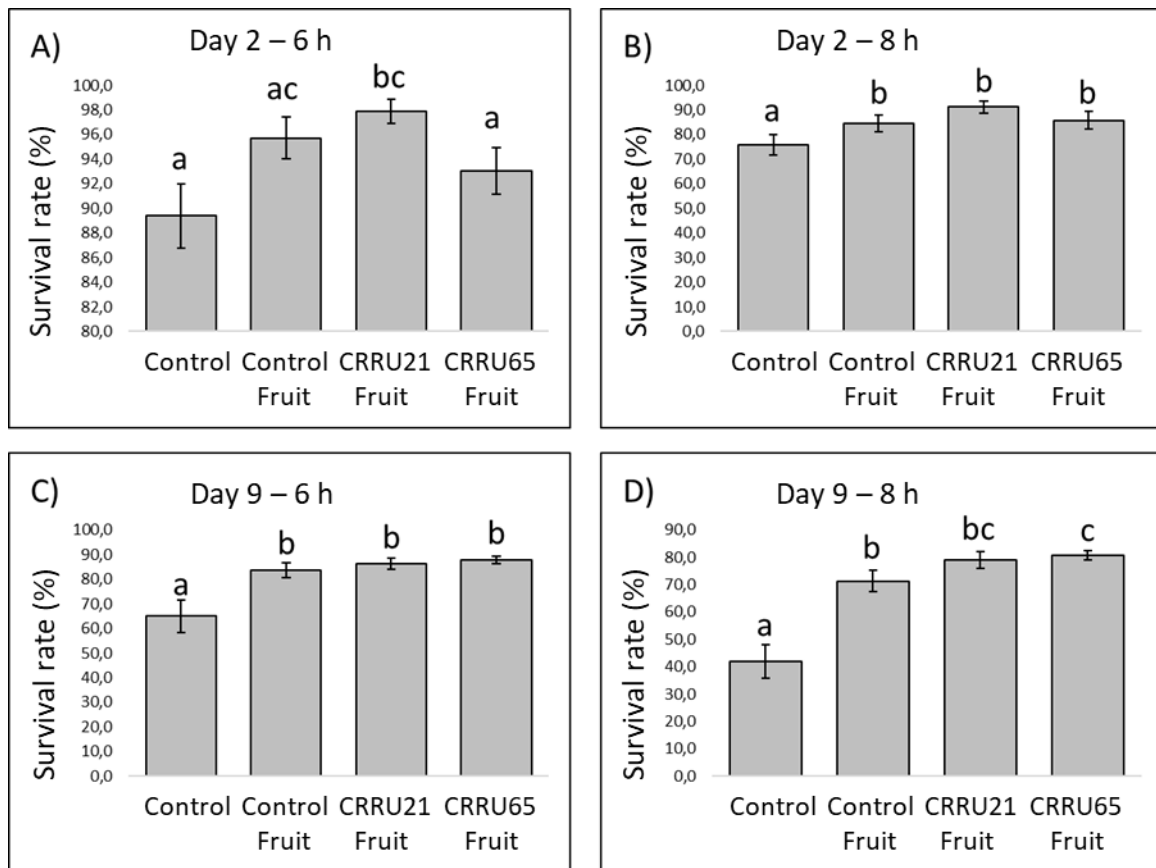


Figure VI. Survival rates at: A) Day 2 of the adult phase after 6 hours of heat stress exposure; B) Day 2 of the adult phase after 8 hours of heat stress exposure; C) Day 9 of the adult phase after 6 hours of heat stress exposure; D) Day 9 of the adult phase after 8 hours of heat stress exposure. a–b letters indicate significant differences (p -value ≤ 0.05) among treatments according to Tukey test.

The previously observed effects may be due to the activation of some metabolic pathways in the *Caenorhabditis elegans* organism related to oxidative stress tolerance. Therefore, in this chapter we wanted to evaluate whether the exposure of nematodes to blackberry extracts activated the expression of several genes involved in the insulin signaling pathway (IIS), one of the main routes involved in the regulation of oxidative stress. The evaluated genes were those encoding for transcription factors DAF-16, HSF-1 and SKN-1 and some of the genes activated by these transcription factors, specifically catalase-1 (*ctl-1*), glutathione S-transferase-7 (*gst-7*) and the heat shock protein 16 (*hsp-16*) (Figure VII).

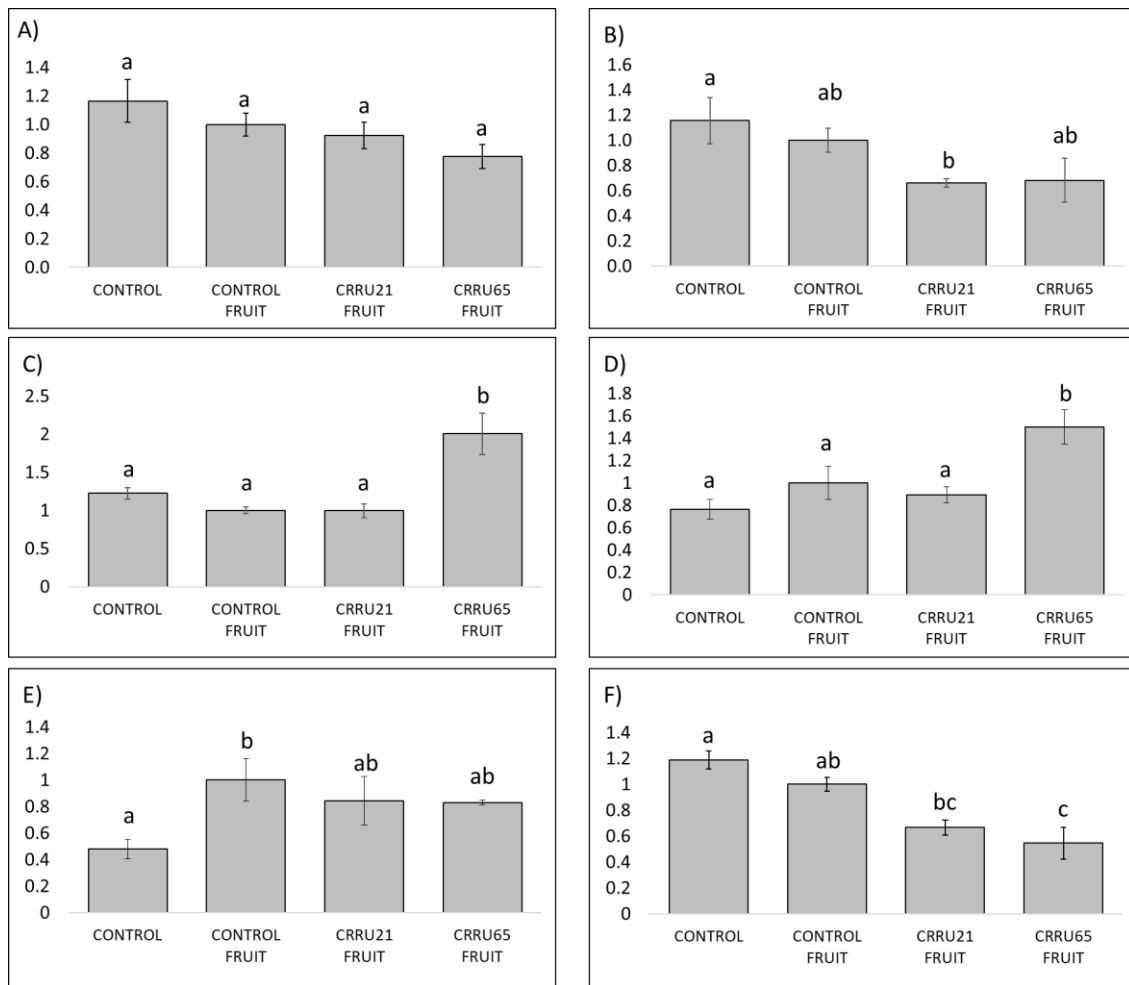


Figure VII. Relative gene expression of: A) *hsf-1*; B) *daf-16*; C) *skn-1*; D) *hsp-16*; E) *clt-1*; F) *gst-7* in model organism *Caenorhabditis elegans* growing on control plants, on plates made of blackberry extracts from non-inoculated plants (CONTROL FRUIT), on plates made of blackberry extracts from *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 inoculated plants (CRRU21 FRUIT) and on plates made of blackberry extracts from *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants (CRRU65 FRUIT). a–b letters indicate significant differences (p-value ≤ 0.05) among treatments according to Tukey test.

In general terms, the evaluated genes expressions were not altered by the nematode's exposure to any of the extracts obtained from the blackberries collected during the greenhouse trials. Significant differences in the expression of these genes only occurred in two specific cases.

On one hand, the *daf-16* and *gst-7* gene expression significantly decreased in those nematodes exposed to extracts from fruits collected from *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 inoculated blackberry plants, when comparing to gene expression in nematodes that were not exposed to any type of blackberry extract.

On one hand, the *skn-1* and *hsp-16* gene expression significantly increased in those nematodes exposed to extracts from fruits collected from *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated blackberry plants, when comparing to gene expression in nematodes that were not exposed to any type of blackberry extract. Therefore, the increase in the

survival rate increment under heat stress conditions observed in the previous section could be related to the gene expression increment of these two genes.

Previous trials demonstrated that inoculation with the *Rhizobium laguerreae* CRRU65 bacteria significantly improved blackberry production under greenhouse conditions. However, this study requires field-level validation to ensure that the observed effect is maintained during real conditions. In the field, bacteria have to cope with a multitude of biotic or abiotic stresses that are not present in laboratory or greenhouse tests.

The trial under field conditions was carried out only with the *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Different production and composition parameters of the collected blackberries were studied. In this case, the analysis of the composition of the phenolic compounds of blackberries showed that the most abundant compounds were sanguin H6, its isomer and cyanidin-3-o-glucoside.

The production parameters evaluated were total production, average number of fruits per plant, average fruit weight, average fruit diameter and average fruit height. All these parameters were evaluated at five collection times.

In general, the number of fruits produced by the *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants was significantly higher than the number of fruits produced by the control plants (Figure VIII). In addition, there were also significant differences in the average weight of the fruits, the average height and diameter, being in all cases significantly higher in the blackberries collected from the *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants.

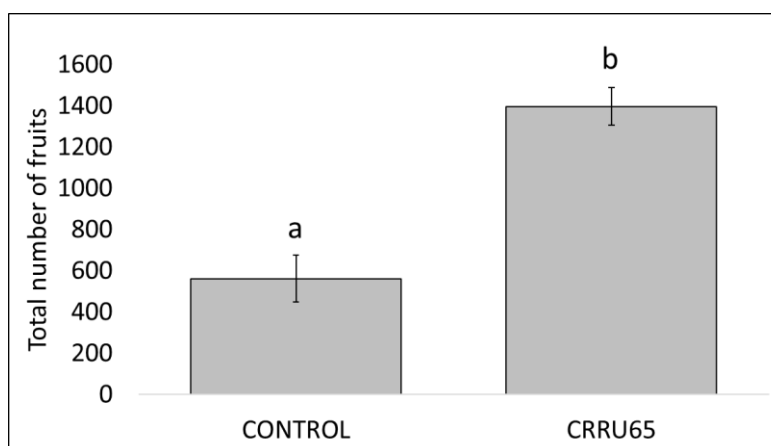


Figure VIII. Total fruit production results collected from control non-inoculated plants without inoculation and *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants. Letters indicate significant differences according to t-student test ($p < 0,05$).

Evaluated physicochemical parameters were pH, citric acid percentage, the total soluble solids (TSS), the palatability index, humidity and ashes percentages. In all these parameters there were no significant differences between blackberries obtained from *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants and blackberries obtained from control plants. Only, at the end of the harvest, fruits obtained from *Rhizobium laguerreae*

CRRU65 inoculated plants showed a significant increment in palatability index, comparing to the blackberry obtained from non-inoculated plants.

Finally, parameters related to fruit colour were evaluated. The parameters evaluated were those determined by the CIELab scale. The L* value represents the luminosity. Although there were no significant differences between the blackberries obtained from *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants and the blackberries obtained from the non-inoculated control plants, the L* value showed more uniform values throughout the harvest in the blackberries obtained from the *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants. The a and b values provide information about the variability between the green-red and blue-yellow tones, respectively. In both cases, there were no significant differences between the blackberries obtained from the *Rhizobium laguerreae* CRRU65 inoculated plants and the blackberries obtained from non-inoculated control plants. The C value represents the intensity or purity of the colour and values close to 0 indicate poorly saturated colours, close to neutral grey. Again, there were no significant differences between the treatments, which both presented values close to 0. Finally, the h value represents the Hue value, which positions a colour within a standard chromatic circle, allowing it to be described and classified colours according to the dominant tone. In this case, there were no significant differences between the two treatments.

Therefore, inoculation of the *Rhizobium laguerreae* CRRU65 strain in blackberry plants increased blackberry fruit production compared to non-inoculated control plants, without altering the physicochemical and colour parameters which influence the organoleptic characteristics of the fruits.

CONCLUSIONS.

Based on the results obtained in this doctoral thesis, we established the following conclusions:

1. Bacterial endophytic composition of the *Rubus ulmifolius* plants is essentially the same in the different environments studied. The differences observed in the composition were mainly influenced by plant tissue factors, which demonstrates that *Rubus ulmifolius* Schott plants are able to select selecting the bacterial communities that inhabit their inner tissues.
2. The inside of blackberry plant tissues shows a high biodiversity of unexplored bacteria, and it is a source of new bacterial species with may possess potential activities with biotechnological interest.
3. New species *Ferraniclubacter rubi* CRRU44^T isolated from the inside of blackberry stems is a good candidate for its application as a biostimulant, since the inoculation of tomato plants in both first stages and during adult phase adult phase significantly improves plant development.
4. *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65, and *Rhizobium laguerreae* CRRU67 have the ability to colonize the root system and promote plant growth of tomato

plants, so they could be considered as possible candidates for their use as agricultural biostimulants.

5. The volatilome of the bacteria *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, and *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 is a promising tool for the biocontrol of the phytopathogen *Botrytis cinerea* through direct action on the fungus.
6. Gene expression analysis of five reporter genes related with induction of systemic resistance in tomato plants suggest that the volatilome of the bacteria *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, and *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 does not induce systemic defenses activation on tomato plants, probably because endophytic bacteria must evade defense systems in order to stablish colonization.
7. Inoculation of blackberry plants with the bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 has resulted to be an important tool for improved antioxidant activity, since it increased phenolic composition concentrations, which enhances oxidative stress tolerance on *in vivo* model organism *Caenorhabditis elegans*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTEXTO ACTUAL DE LA AGRICULTURA.

La agricultura es una de las actividades humanas más antiguas. El origen se remonta al periodo Neolítico (Thakur *et al.*, 2022). Al comienzo, esta actividad consistía simplemente en la siembra y la recolección de semillas y otras partes de las plantas. Con el tiempo, esta actividad evolucionó hacia la domesticación de las especies vegetales, con la selección de aquellos individuos que presentaban unos caracteres adecuados o deseables, como la producción de frutos de mayor tamaño o una mayor homogeneidad genética (Charmet, 2011). Esto permitió a las poblaciones humanas establecerse en territorios determinados, sembrando la base de las primeras civilizaciones (Munro, 2003; Zeder, 2008), y dando lugar al periodo conocido como la Primera Revolución Agrícola. A partir de este momento, la agricultura fue creciendo y expandiéndose por todas las sociedades humanas. Tuvieron que pasar cientos de siglos para que la agricultura experimentase una nueva revolución. Esta fue la Revolución Agrícola Británica, que tuvo lugar desde mediados del siglo XVII hasta finales del siglo XIX. En ella se establecieron las bases tecnológicas y agronómicas de los sistemas modernos de producción de alimentos, donde destacaron el uso de maquinaria como los molinos de vapor y los molinos de rodillos, que aumentaron el rendimiento y la estabilidad de almacenamiento de los granos básicos (Milani *et al.*, 2022).

Tras este periodo, no tardó mucho en ocurrir la siguiente revolución en la agricultura, la Revolución Verde, la cual comenzó en los años 40 del siglo XX. Esta consistió en un acontecimiento tecnológico basado, entre otras cosas, en el aumento de la producción agrícola debido a la selección de variedades mejoradas, principalmente de plantas de trigo y arroz, capaces de resistir a las condiciones meteorológicas adversas y plagas, la utilización de sistemas de regadío por irrigación y el uso de fertilizantes y pesticidas (Hassaan y El Nembr, 2020). Todos estos avances permitieron satisfacer la demanda de alimentos de una población humana que duplicó su tamaño en la segunda mitad del siglo XX (Maja y Ayano, 2021). Sin embargo, este crecimiento no se detuvo, y actualmente las estimaciones apuntan a que la población podría alcanzar los 10.000 millones de personas en el año 2050 (Nwachukwu y Babalola, 2022).

Por lo tanto, para satisfacer las necesidades de la creciente población, los agricultores deberán incrementar la producción agrícola, en un mundo en el que cada vez los recursos son más limitados y el cambio climático más evidente (Kassam y Kassam, 2021). Hasta ahora, este problema ha sido solventado con el aumento del uso de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) que permiten suministrar los nutrientes y controlar los patógenos de manera eficiente. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos ha dado lugar a una serie de problemas tanto medioambientales como de salud pública, lo que ha provocado que la legislación se vuelva más restrictiva (Zhou *et al.*, 2024).

1.1.1. Los fertilizantes y los pesticidas en la agricultura.

Las plantas necesitan 16 elementos esenciales para un correcto crecimiento y desarrollo. Estos son el carbono (C), el hidrógeno (H), el oxígeno (O), el nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K), el calcio (Ca), el magnesio (Mg), el azufre (S), el cloro (Cl), el cobre (Cu), el boro (B), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el zinc (Zn) y el molibdeno (Mo) (Srivastav, 2020). De estos, los tres primeros son obtenidos de la atmósfera a través de las partes aéreas de la planta, mientras que los otros 13 son obtenidos del suelo, a través de las raíces. En este último grupo destacan el N, el P y el K, que constituyen el 83% de los nutrientes absorbidos por las plantas, mientras que el Ca, el Mg y el S constituyen el 16%. Estos seis conforman los macronutrientes vegetales, y el resto de los elementos que constituyen sólo el 1%, son los llamados micronutrientes (Ayamba *et al.*, 2023).

El cultivo continuado, la siembra de monocultivos y la utilización de variedades altamente productivas exigen una gran cantidad de recursos edáficos que termina por agotar los nutrientes disponibles en el suelo, siendo necesario un aporte externo que, generalmente, se logra mediante el uso de fertilizantes químicos de N, P y K. Un fertilizante es cualquier material orgánico o inorgánico de origen natural o sintético, distinto de los materiales calcáreos, que se añade al suelo para suministrar uno o más nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas (Baweja *et al.*, 2020). El uso de los fertilizantes químicos ha aumentado considerablemente en los últimos años, por lo que son considerados una parte indispensable de la agricultura moderna (Tabla 1) (FAO, 2023).

Tabla 1. Uso de fertilizantes en miles de toneladas y en kg/ha entre los años 2000 y 2021, en los diferentes continentes y por tipo de nutriente aportado. Fuente: FAO.

Uso de fertilizantes (Miles de toneladas)	Nitrógeno		Fósforo		Potasio		Total	
	2000	2021	2000	2021	2000	2021	2000	2021
África	2.465	4.788	928	1.784	470	1.045	3.862	7.618
América	17.434	26.909	8.153	14.273	5.247	15.355	33.834	56.537
Asia	46.723	60.286	17.698	24.850	7.865	18.686	72.286	103.821
Europa	13.214	14.898	4.093	4.135	4.814	4.507	22.121	23.593
Oceanía	1.190	1.807	1.580	1.229	349	481	3.118	3.517
España	1.114	1.011	568	480	468	369	2.149	1.860
Mundo	81.025	108.688	32.451	46.270	21.745	40.128	135.220	195.086
Uso de fertilizantes por área de cultivo (kg por ha)								
África	10,4	16,1	3,9	6,0	2,0	3,5	16,3	25,6
América	40,3	62,5	21,9	37,8	20,6	38,4	82,8	138,7
Asia	82,9	102,3	31,5	42,2	13,9	31,7	128,3	176,3
Europa	38,5	47,3	12,4	13,5	14,3	14,5	65,1	75,2
Oceanía	34,4	37,4	31,6	20,3	7,6	7,8	73,5	65,5
España	60,8	60,9	31,0	28,9	25,6	22,2	117,4	112,0
Mundo	51,3	65,5	21,0	28,8	13,7	24,4	85,9	118,6

Durante el año 2021, Asia fue el mayor consumidor de fertilizantes del mundo, donde destacaron China como país líder, seguido de la India. Dentro de Europa en 2021, España empleó un total de 1.860,2 miles de toneladas de fertilizantes, lo que la convirtió en el segundo país europeo con mayor consumo de fertilizantes, solo por debajo de Francia, cuyo consumo fue de 2.753 miles de toneladas. Además, el uso de los

fertilizantes a nivel mundial aumentó un 144,3% entre el año 2000 y el año 2021, alcanzando un total de 195,1 millones de toneladas de fertilizantes (FAO, 2023).

Por otro lado, las enfermedades vegetales son una de las causas más importantes de pérdida de producción en todo el mundo. Por ejemplo, en los cultivos de trigo, arroz, patata, soja y maíz, que son los cinco cultivos mayoritarios a nivel mundial y que representan el 40% de la ingesta calórica, las pérdidas debidas a las enfermedades vegetales oscilan entre un 20 y un 30% (Fisher *et al.*, 2012; Savary *et al.*, 2019). Hasta ahora, los pesticidas químicos han sido el método elegido para controlar los distintos fitopatógenos. Para minimizar la pérdida de cultivos inducida por los patógenos y mantener el ritmo de la creciente demanda de alimentos, el consumo de pesticidas en los suelos agrícolas aumentó drásticamente a finales del siglo pasado (Prashar y Shah, 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Uso de pesticidas por miles de toneladas y en kg/ha, entre los años 2000 y 2021, en los diferentes continentes. Fuente: FAO.

	2000	2005	2010	2015	2017	2018	2019	2020	2021
Uso de pesticidas (toneladas)									
África	73.856	99.378	132.010	158.659	169.309	190.194	200.813	202.869	203.580
América	892.215	1.077.051	1.302.929	1.459.752	1.534.677	1.545.084	1.662.586	1.738.388	1.775.009
Asia	727.564	818.325	1.056.873	1.068.090	1.041.289	994.909	988.980	903.646	979.816
Europa	446.630	459.330	451.858	513.496	507.013	493.325	462.150	485.759	505.157
Oceanía	38.431	40.191	49.393	58.546	68.077	71.918	71.256	71.536	71.813
España	34.597	41.017	39.043	77.217	71.987	75.014	75.190	67.099	76.174
Mundo	2.178.696	2.494.276	2.993.063	3.258.544	3.320.366	3.295.430	3.385.786	3.402.199	3.535.375
Uso de pesticida por área (kg por ha)									
África	0,3	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
América	2,4	2,9	3,5	3,9	4,1	4,1	4,5	4,6	4,7
Asia	1,3	1,5	1,9	1,9	1,8	1,7	1,7	1,6	1,7
Europa	1,5	1,6	1,6	1,8	1,8	1,7	1,6	1,7	1,8
Oceanía	1,5	1,4	1,8	1,7	2,0	2,1	2,1	2,1	2,1
España	1,9	2,3	2,3	4,5	4,2	4,5	4,5	4,0	4,6
Mundo	1,5	1,7	2,0	2,1	2,1	2,1	2,2	2,2	2,3

Durante el año 2021, América fue el mayor consumidor de pesticidas del mundo, siendo Brasil el líder mundial, seguido de Estados Unidos. Dentro de Europa durante el año 2021, España lideró las estadísticas del uso de pesticidas con 76.174 toneladas, seguida de Francia con 69.602 toneladas e Italia con 50.345 toneladas. Al igual que con los fertilizantes, el consumo global de los pesticidas aumentó un 162,3% entre los años 2000 y 2021, alcanzando un total de 3,5 millones de toneladas en 2021 (FAO, 2023).

En la actualidad, el aumento global en el consumo de estos químicos ha dado lugar a problemas relacionadas con la salud humana, la salud ambiental, el mantenimiento del equilibrio ecológico, el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero y la conservación de la biodiversidad del suelo (Prashar y Shah, 2016; Zhou *et al.*, 2024). Por ejemplo, los fertilizantes nitrogenados aplicados en los suelos se descomponen fácilmente por hidrólisis en amonio, metano y dióxido de carbono, aumentando las emisiones a la atmósfera de estos gases de efecto invernadero (Krein *et al.*, 2023). Por otro lado, la aplicación excesiva de los fertilizantes aumenta su concentración en los suelos y la gran

mayoría, ya sea por la lluvia, la erosión del suelo, el riego o la infiltración, acaba en las aguas subterráneas y los acuíferos, lo que altera las características fisicoquímicas del agua y la contamina (Srivastav, 2020). Del mismo modo, el uso excesivo de los pesticidas también provoca la acumulación de grandes cantidades en los suelos que, por procesos de escorrentía pueden llegar a los acuíferos y contaminarlos (Rashmi *et al.*, 2020). Por último, la sobreutilización de los pesticidas ha dado lugar al desarrollo de cepas fitopatógenas resistentes a estos compuestos, los cuales acaban perdiendo su efectividad y capacidad de biocontrol (Roca-Couso *et al.*, 2021). Por esta razón, en los últimos años, las diferentes legislaciones gubernamentales y supragubernamentales se han vuelto más estrictas con respecto al uso de este tipo de compuestos químicos, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas más sostenibles (Garske *et al.*, 2020).

En este sentido, los bioestimulantes y los biopesticidas han cobrado gran importancia como una alternativa segura a los productos químicos (Thomas y Singh, 2019). Por un lado, los bioestimulantes son formulados en base a microorganismos PGP (*Plant Growth Promotion*) que poseen diferentes mecanismos de acción que inducen el crecimiento vegetal, ya sea porque son capaces de influenciar el equilibrio hormonal de la planta o de incrementar la eficacia en la captación de nutrientes. Por otro lado, los biopesticidas son formulados en base a microorganismos que poseen actividad antagonista frente a algún fitopatógeno, ya sea porque lo combaten o porque previenen la infección (de Souza *et al.*, 2015).

Aunque el efecto beneficioso de los microorganismos en los cultivos ya ha sido ampliamente demostrado y su uso está siendo actualmente implementado, su aplicación podría generar beneficios adicionales, llegando incluso a tener un efecto positivo sobre la salud humana. Así, su aplicación puede incrementar la producción de compuestos bioactivos producidos por las especies vegetales, induciendo la síntesis de compuestos con actividad antioxidante o anticancerígena (Jiménez-Gómez *et al.*, 2017).

1.2. LOS MICROORGANISMOS EN LA AGRICULTURA.

El uso de los microorganismos en la agricultura está ganando cada vez más apoyos al ser un enfoque más rentable y respetuoso con el medio ambiente (Antoszewski *et al.*, 2022). La agricultura es una actividad que depende estrechamente de las condiciones medioambientales, las cuales, si no son favorables, pueden dar lugar a grandes pérdidas económicas y de producto. Los microorganismos representan una alternativa segura a los químicos ya que muchos de ellos poseen capacidades de promoción del crecimiento vegetal y/o capacidades de control de enfermedades vegetales (Viscardi *et al.*, 2020). La mayoría de estos microorganismos con interés agronómico utilizados para estos fines provienen de los suelos (Bolívar-Anillo *et al.*, 2020). Los microorganismos edáficos pueden llegar a ser un gran aliado para alcanzar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. No solo porque poseen mecanismos de acción que les permiten actuar como bioestimulantes, sino que, además, el conjunto de microorganismos de los suelos está relacionado con la fertilidad y la productividad del suelo, siendo un parámetro más a tener en cuenta para conseguir mejorar la productividad de los cultivos (Mueller y Sachs, 2015).

Adicionalmente, los microorganismos que residen en el interior de los tejidos vegetales, en simbiosis con sus hospedadores, están siendo objeto de múltiples estudios debido a que son capaces de establecer relaciones más estrechas con las plantas que los microorganismos edáficos. Esta interacción con la planta proporciona nutrientes al organismo superior o bien les otorga resistencia frente a estreses tanto bióticos como abióticos (Singh *et al.*, 2022a). Este tipo de microorganismos son comúnmente microorganismos del suelo que han desarrollado mecanismos de colonización que les permiten penetrar en los tejidos vegetales. Estos microorganismos también poseen capacidades PGP y, además, se ha observado que estas actividades son más potentes que en los microorganismos edáficos, pues la relación entre la planta y el microorganismo es mucho más estrecha (Ngalimat *et al.*, 2021).

Así, tanto los microorganismos edáficos como los que habitan en el interior de las plantas, llamados endófitos, pueden tener un rol activo en el mantenimiento de los sistemas agrícolas. El estudio de estos microorganismos y de sus interacciones con las plantas puede abrir nuevas puertas al desarrollo de nuevos bioestimulantes o biopesticidas (Fuke *et al.*, 2021).

1.2.1. La microbiota del suelo.

Los microorganismos del suelo son muy abundantes y taxonómicamente diversos. Este es uno de los ambientes con mayor número de microorganismos, estimándose hasta 50.000 especies por gramo de suelo (Banerjee y van der Heijden, 2022). Esta composición no es homogénea, sino que varía con respecto al tipo de suelo, las regiones geográficas o las variables ambientales (Jansson *et al.*, 2023).

Los microorganismos del suelo desempeñan funciones que son esenciales para el mantenimiento de los ecosistemas (Sharma *et al.*, 2022). Son los agentes principales de los ciclos de los nutrientes, movilizándolos y permitiendo su acceso para el resto de los seres vivos (Jansson *et al.*, 2023). También participan en el secuestro del carbono, la reducción de las emisiones de los gases de efecto invernadero y la degradación de los contaminantes. No solo eso, sino que además inducen el crecimiento de las plantas y mejoran la salud vegetal, por lo que son considerados como un importante recurso para el mantenimiento de la sostenibilidad en los sistemas agrícolas (Guerra *et al.*, 2020).

El manejo de los microorganismos edáficos está mostrando ser una herramienta sumamente eficaz en el mantenimiento de la producción agrícola, permitiendo gestionar la disposición de los nutrientes para las plantas (Hu y He, 2018). Por ejemplo, las especies del género *Rhizobium* y otros géneros afines son capaces de establecer simbiosis mutualistas con plantas leguminosas para fijar el nitrógeno atmosférico y proporcionar este nutriente en una forma química disponible para la planta (Lindström y Mousavi, 2020). Del mismo modo, la relación entre las plantas de arroz y el hongo endofítico *Rhizophagus irregularis* induce la expresión génica en las plantas de transportadores de nitratos, aumentando la adquisición de este nutriente y promoviendo el crecimiento de las plantas (Singh *et al.*, 2022b). Por lo tanto, la utilización y el manejo de estos

microorganismos permitirá a la agricultura entrar en una nueva etapa de su historia donde la biotecnología tendrá un papel relevante en la creación de una agricultura más integrada en los ecosistemas.

La interacción entre las plantas y los microorganismos del suelo no es unidireccional, ya que las plantas también influyen en la microbiota edáfica. Dentro del ecosistema “suelo” destaca la zona denominada rizosfera, la cual es el volumen de suelo que rodea las raíces. Las plantas, a través de sus raíces, pueden exudar alrededor del 20% del carbono fijado durante la fotosíntesis y liberarlo en la rizosfera (Lei *et al.*, 2023). Estos exudados actúan como señales químicas y sustento nutricional para atraer y modular la concentración y composición taxonómica de microorganismos en este espacio (Bolívar-Anillo *et al.*, 2020). Los exudados son químicamente muy diversos, presentan una gran variación entre especies y son usados por los microorganismos edáficos como fuente de energía (Seitz *et al.*, 2023). En este sentido, diversos estudios apoyan la teoría de que las plantas reclutan a microorganismos específicos mediante la liberación de exudados, que les ayuden en la adquisición de nutrientes y la mitigación de estreses tanto bióticos como abióticos (Yue *et al.*, 2023).

1.2.2. El microbioma de las plantas.

La asociación entre los microorganismos y las plantas se remonta 400 millones de años atrás (Delaux y Schornack, 2021). Lo que indica que estos organismos han evolucionado de forma conjunta a lo largo de cientos de siglos, estableciendo mecanismos bioquímicos, hormonales y enzimáticos de reconocimiento mutuo (Santoyo, 2022).

Si bien el concepto del microbioma engloba a todos los microorganismos, la mayoría de los estudios consideran principalmente al análisis de las poblaciones de bacterias (bacterioma) y algunos de ellos también a las poblaciones fúngicas (microbioma) (Glick y Gamalero, 2021). Estos estudios han permitido determinar qué patrones rigen estas poblaciones y cómo interaccionan con su hospedador en una escala espacio-temporal (Becker *et al.*, 2022; Bell-Dereske *et al.*, 2023; Comeau *et al.*, 2020; Moroenyane *et al.*, 2021). Además, han mostrado que existe un grupo de microorganismos que están presentes de manera permanente, independientemente de las condiciones o del genotipo de la planta, es el denominado microbioma *core* (Figura 1) (Massoni *et al.*, 2019). El reclutamiento de este microbioma está influenciado por diversos factores abióticos y bióticos. Entre los abióticos podemos destacar el pH del suelo, la disponibilidad de recursos, la temperatura, la presencia de metales o de metaloides contaminantes, la salinidad y el tipo de suelo, mientras que entre los bióticos los principales son la genética de la planta y la diversidad y la composición de los microorganismos residentes en el suelo (Park *et al.*, 2023).

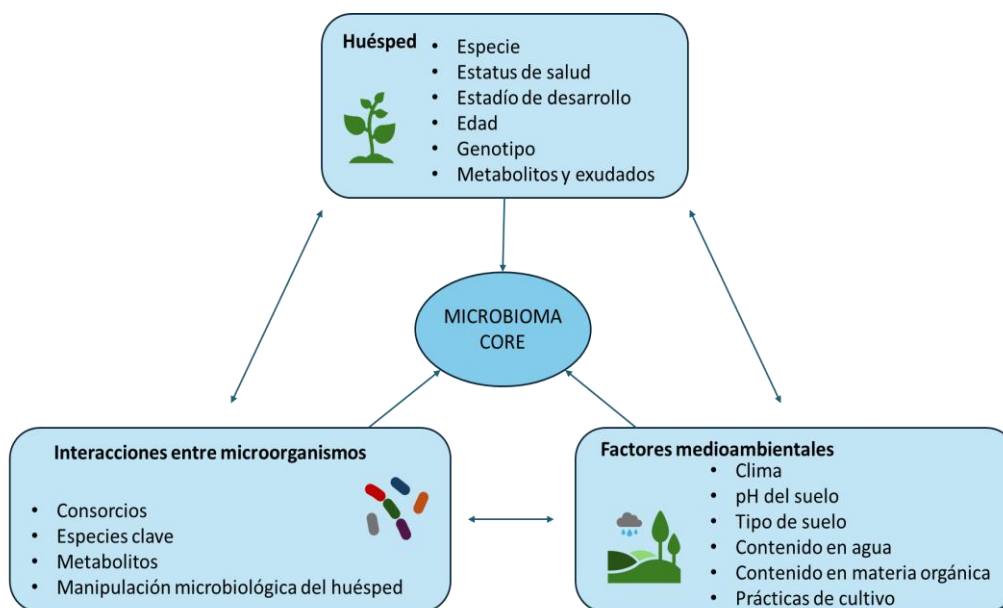


Figura 1. Representación esquemática simple de varios factores que dan forma a las estructuras comunitarias del microbioma *core*. El huésped, el microorganismo y el medio ambiente son los factores responsables, que están interconectados y juntos construyen la comunidad de microbiomas en las plantas. Adaptado de Dastogeer *et al.* (2020).

La coevolución entre las plantas y los microorganismos sugiere que el reclutamiento de los microorganismos beneficiosos bajo condiciones de estreses bióticos está conservado dentro del reino vegetal. Sin embargo, las plantas difieren en la fisiología y las respuestas inmunes a las invasiones patógenas, lo que implica que los mecanismos moleculares y la base química probablemente dependan de la especie vegetal (Liu *et al.*, 2020a). Aunque la evidencia empírica de esta estrategia, denominada “*cry fo help*”, sigue siendo escasa y los mecanismos de base todavía no están claros en muchos aspectos, en términos generales la infección por patógenos da lugar a un reclutamiento activo de microorganismos por parte de la planta, los cuales inducen cambios fisiológicos en los organismos superiores que les permiten luchar contra la infección. Diversos ejemplos han sido documentados. Por citar algunos, la infección de plantas de trigo con *Phytophthora cactorum* induce el reclutamiento de bacterias rizosféricas beneficiosas que modulan la respuesta inmune de las plantas (Liu *et al.*, 2021a). Del mismo modo, la infección de plantas de cebada por el hongo *Pythium ultimum*, induce el reclutamiento de bacterias como *Pseudomonas fluorescens* que desencadena la síntesis de compuestos antibióticos (Ahlawat *et al.*, 2024). Estas evidencias manifiestan la relevancia de la relación entre las plantas y su microbioma, y cómo este último tiene una especial importancia en el mantenimiento del estado de la salud y la nutrición óptima de la planta. Por consiguiente, también ha sido definido el concepto de microbioma vegetal sano, que está caracterizado por presentar una alta diversidad microbiana y una alta uniformidad dentro de las comunidades microbianas autóctonas asociadas a las plantas (Trivedi *et al.*, 2020). Curiosamente todos los microbiomas vegetales sanos contienen patógenos que, una vez aislados, son capaces de presentar patogenicidad, por lo que se deduce que el efecto de comunidad limita su capacidad patogénica (Manzotti *et al.*, 2020). Cada microbioma vegetal sano está caracterizado por especies clave dentro del microbioma *core* y una densa

red de interacciones positivas entre los constituyentes (Berg *et al.*, 2020). Siguiendo esta perspectiva, la interacción beneficiosa entre el huésped y su microbioma es esencial para mantener la salud del holobionte, mientras que las enfermedades a menudo son correlacionadas con una disbiosis microbiana o una diversidad reducida (Berg *et al.*, 2021).

El origen de los microorganismos que interactúan con las plantas es diverso. La mayoría provienen del suelo y forman la microbiota rizosférica de la planta mientras que otros provienen del ambiente aéreo, conformando la microbiota filosférica, en la superficie de los tejidos vegetales. Ambos microorganismos, tanto los rizosféricos como los filosféricos, pueden llegar a colonizar los compartimentos internos que poseen las plantas, la llamada endosfera. Por lo tanto, la interacción del microbioma con las plantas se produce en tres zonas principales: la rizosfera, la filosfera y la endosfera (Santoyo, 2022).

1.2.2.1. La colonización de la rizosfera.

Cuando las semillas germinan y las raíces emergen, interactúan con la microbiota del suelo para conformar la rizosfera, donde los exudados atraen por primera vez al futuro microbioma asociado. Los exudados pueden ser aminoácidos, azúcares, factores de crecimiento, vitaminas, ácidos grasos, ácidos orgánicos u otros quimioatrayentes (Santoyo, 2022). Además, algunos exudados como los flavonoides, el citrato, el malato, el oxalato cumarínico, la camalexina, los benzoxazinoides o incluso el etileno, pueden ser reclutadores de taxones específicos (Arif *et al.*, 2020). Por ejemplo, las plantas leguminosas excretan compuestos fenólicos, como los flavonoides y los isoflavonoides, que inducen la expresión de genes de nodulación de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, pertenecientes al género *Rhizobium*. En respuesta, las bacterias del género *Rhizobium* producen factores *nod*, que son lipoquitooligosacáridos, cuya función es inducir una serie de cambios fisiológicos en la raíz de la planta para posteriormente formar nódulos fijadores de nitrógeno. Este tipo de comunicación es altamente específica entre ciertas especies del género *Rhizobium* y especies de plantas leguminosas (Jaiswal *et al.*, 2021). Por otro lado, la producción de compuestos como la fenacina producidos por algunas especies de bacterias como varias pertenecientes al género *Pseudomonas*, mejora la interacción de la planta y permite una colonización más eficiente de plantas como la patata (Benaissa, 2024).

Los exudados de las raíces difieren en la cantidad y la composición dependiendo de diferentes factores, como la especie vegetal, el estado de desarrollo de la planta o las condiciones ambientales del suelo, por lo que el reclutamiento de los microorganismos edáficos también varía en función de las condiciones (Feng *et al.*, 2021). Para establecer la interacción, los microorganismos deben ser capaces de responder quimiotácticamente a estos exudados. Por lo tanto, es esencial que estos microorganismos presenten capacidades de quimiotaxis y movilidad para migrar desde diferentes puntos del entorno edáfico (Figura 2). Esta respuesta quimiotáctica suele iniciarse por la unión de ligandos a los quimiorreceptores (MCP). Aunque estos son muy diversos, uno de los MCPs clave es

el conformado por el sistema Che, cuya activación induce el movimiento de los flagelos hacia las zonas preferentes de colonización (Zboralski y Filion, 2020). De esta forma, los procesos de quimiotaxis favorecen la aproximación de microorganismos beneficiosos hacia las raíces (Feng *et al.*, 2021).

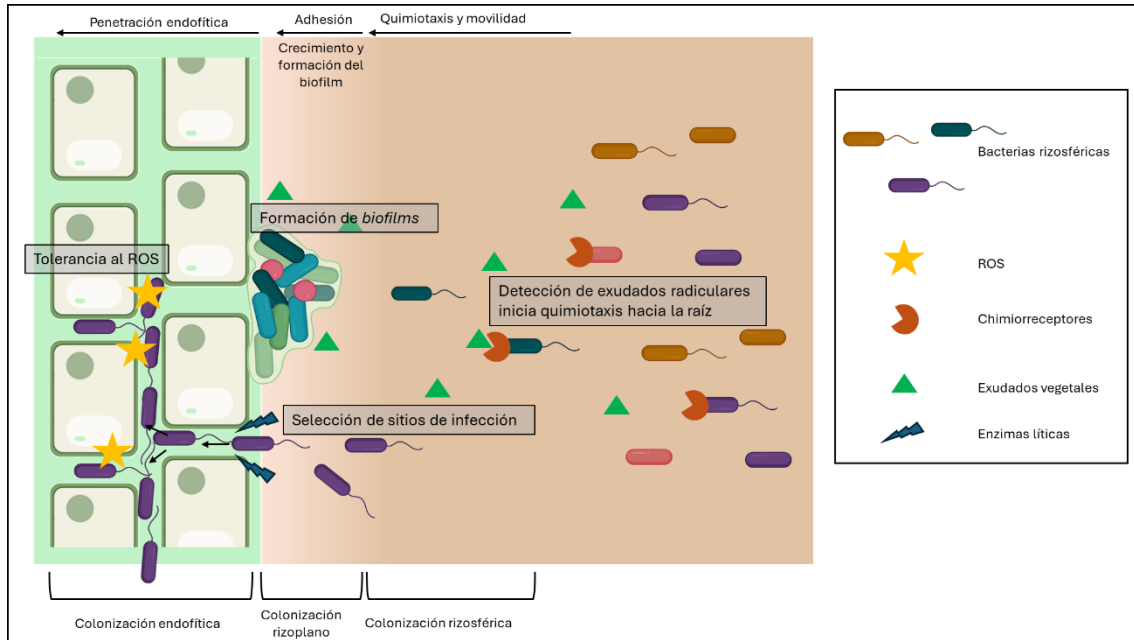


Figura 2. Proceso de colonización incluyendo la quimiotaxis y la motilidad, la unión a la superficie de la raíz, el crecimiento y la formación de *biofilms* en el rizoplano, y la penetración endofítica. Adaptada de Liu *et al.* (2024).

Paralelamente, existen otros mecanismos para el reclutamiento de microorganismos, como el *quorum sensing* (QS) o la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). Por un lado, la comunidad microbiana ya establecida puede atraer a los nuevos taxones microbianos mediante el uso del *quorum sensing*. Este mecanismo es un proceso de comunicación entre células basado en la producción, la liberación y la detección de moléculas señalizadoras donde unas de las más comunes son las N-acil homoserina lactonas (AHL) (Yi *et al.*, 2021). La detección de este tipo de moléculas activa diversos procesos celulares en la comunidad circundante como la tolerancia a los desinfectantes, la formación de esporas, la motilidad, la formación de *biofilms* o la producción de enzimas líticas, lo cual confiere a las bacterias receptoras habilidades para colonizar las plantas (Zhao *et al.*, 2020). Estos compuestos también pueden ser detectados por las plantas, lo que induce algunos cambios fisiológicos en estas, como la promoción del crecimiento, el incremento del contenido de pigmentos fotosintéticos, la modificación del equilibrio de las fitohormonas o la estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas (Babenko *et al.*, 2022; Flores-Félix *et al.*, 2020). Por otro lado, los VOCs son otras moléculas de comunicación producidas tanto por los microorganismos como por las plantas. Estos compuestos suelen ser pequeños y olorosos (<C15), de baja masa molecular (<300 Da) y con una fracción lipófila (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). Aquellos producidos por las raíces desempeñan un papel importante en la ingeniería del microbioma subterráneo al dar forma a la estructura de la comunidad

microbiana y reclutar microorganismos beneficiosos (Sharifi *et al.*, 2022). En cambio, los producidos por las bacterias pueden participar en la comunicación con otros taxones beneficiosos en la rizosfera o en la endosfera de las plantas (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013).

Tras el proceso de quimiotaxis hacia la raíz, comienza el proceso de colonización de la superficie radicular donde un paso crítico es la adhesión (Huang *et al.*, 2022). En general, el proceso comienza con una débil unión inicial, reversible e inespecífica. Aunque no es un proceso muy caracterizado, se sabe que están involucradas numerosas fuerzas fisicoquímicas y electrostáticas que las bacterias deben contrarrestar mediante la acción de sus *pili* y flagelos. Además de esto, las bacterias poseen numerosos mecanismos de unión y colonización específicos de cada especie como las proteínas de la membrana externa y los polisacáridos (Matilla *et al.*, 2022). A continuación, solo un pequeño porcentaje de las bacterias son capaces de cambiar a un modo de unión más fuerte y específico. En esta fase entra en juego la formación de *biofilms*. Estos son asociaciones de múltiples especies bacterianas embebidas en una matriz que les da una estructura espacial y múltiples niveles de protección. La formación de estas estructuras generalmente indica una colonización exitosa de la rizosfera (Liu *et al.*, 2024).

Durante este proceso de colonización de la rizosfera, las plantas deben evitar interactuar con microorganismos potencialmente patógenos. Para ello, las plantas pueden detectarlos utilizando los receptores de reconocimiento de patrones de superficie (PRR), que reconocen los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) (Yun *et al.*, 2023). La interacción MAMP-PRR induce la inmunidad desencadenada por patrones (PTI), que activa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son tóxicas para las bacterias (Khan *et al.*, 2023a). A su vez, este sistema también permite detectar microorganismos "no patógenos". En este caso, los MAMPs de las bacterias beneficiosas regulan las respuestas de defensa de las plantas a través de su sistema inmunológico innato. Estos sistemas reconocen y detectan a los microorganismos colonizadores, que intentan formar asociaciones beneficiosas con las plantas hospedantes (Kalpana *et al.*, 2019).

Todos estos mecanismos de selección y reclutamiento del microbioma dan lugar a una reducción de la diversidad de los suelos rizosféricos en comparación con los suelos no rizosféricos, y un enriquecimiento de taxones específicos. En general, en los suelos rizosféricos parece haber un enriquecimiento de los filos bacterianos Bacteroidota y Pseudomonadota, mientras que la concentración de bacterias pertenecientes a los filos Acidobacteriota, Chloroflexota, Gemmatimonadota y Nitrospirota es considerablemente menor en comparación a los suelos no rizosféricos. Con respecto a los géneros bacterianos, también parece existir un enriquecimiento de algunos géneros como *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter*, *Phylobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* o *Streptomyces* en los suelos rizosféricos (Ling *et al.*, 2022).

1.2.2.2. La colonización de la filosfera.

La filosfera es el entorno que rodea a la parte aérea de la planta y su colonización supone un destacable reto para los microorganismos. Esta es probablemente el hábitat más desafiante para que las bacterias establezcan asociaciones prolongadas, ya que deben hacer frente a factores abióticos como los rayos ultravioletas, las variaciones drásticas de temperatura, la lluvia y el viento (Santoyo, 2022). Además, la microbiota que es relativamente nueva en la vida epífita debe competir por el espacio y los nutrientes con la microbiota residente y bien establecida. Por lo tanto, los microorganismos que deseen alcanzar la filosfera deben tener ciertos mecanismos que les confieran adaptaciones ecológicas que permitan su supervivencia. Por ejemplo, muchos de los microorganismos producen polisacáridos extracelulares (EPS) que permiten la agregación celular y la acumulación de compuestos osmoprotectores intracelulares como la prolina, la colina y algunos azúcares solubles que contribuyen a la protección contra la desecación. Para combatir el estrés oxidativo derivado de los rayos UV, muchos de los microorganismos producen pigmentos o enzimas antioxidantes como la enzima catalasa y la enzima superóxido dismutasa (Sohrabi *et al.*, 2023).

El origen de los microorganismos encontrados en la filosfera es diverso. Inicialmente, en los primeros estadios de desarrollo de la planta, las comunidades de la filosfera reflejan las comunidades aéreas, lo que indica que los primeros microorganismos colonizadores provienen del aire. Según el desarrollo de la planta avanza, la comunidad va modificándose y asemejándose más a la composición de la rizosfera. Este proceso parece indicar que parte de la comunidad bacteriana de la filosfera proviene de la rizosfera (Sohrabi *et al.*, 2023).

Algunos autores consideran que la interacción ha de estabilizarse mediante la colonización endofítica a través de estomas o heridas y así reducir la aleatoriedad de la interacción (Smets *et al.*, 2023). De esta manera, las comunidades filosféricas pueden ser un punto de colonización para los entornos endofíticos de la parte aérea de los vegetales, contribuyendo de manera exógena a la diversidad de los microbiomas vegetales y a la salud de la planta mediante diferentes mecanismos de regulación hormonal (Herpell *et al.*, 2023).

La microbiota de la filosfera está dominada por los miembros bacterianos de unos pocos géneros, en particular *Methylobacterium* (filo Alfaproteobacteria), *Pseudomonas* (filo Gammaproteobacteria) y *Sphingomonas* (filo Alfaproteobacteria). Todos ellos presentan una amplitud metabólica destacable (Sohrabi *et al.*, 2023). De entre ellos, cabe destacar la estrategia de las bacterias del género *Methylobacterium* y otros géneros afines con especial predilección por fuentes de carbono simples como el etanol o el metanol, para aprovechar los recursos disponibles en las filosferas de diferentes plantas, además de producir pigmentos coloreados que le protegen frente a la irradiación solar (Wellner *et al.*, 2011).

1.2.2.3. La colonización de la endosfera.

Tanto los microorganismos que conforman la rizosfera como los que conforman la filosfera pueden acabar colonizando el interior de las plantas y así establecerse en la endosfera. Para ello, deben de atravesar y de penetrar los tejidos vegetales. Una vez dentro, estas bacterias, ahora llamadas endófitos, tendrán la oportunidad de colonizar otros compartimentos vegetales a través del sistema vascular de la planta y de viajar hacia los tejidos aéreos, como los tallos y las hojas, o incluso las flores y los frutos (Dini-Andreote, 2020). El proceso clave en la penetración en el tejido vegetal es la selección del sitio de infección (Liu *et al.*, 2024). Las bacterias pueden colonizar de forma pasiva o activa. En el caso de la colonización pasiva en las raíces, suele darse a través de las heridas o las grietas, mientras que, en la filosfera, a través también de los estomas (Kandel *et al.*, 2017). En la colonización activa, las bacterias suelen poseer mecanismos activos de colonización como la producción de *biofilms* para una mejor adhesión, la capacidad de hidrolizar las células de la planta huésped, la posesión de apéndices de movilidad, la capacidad de sintetizar antibióticos que desplacen a otros microorganismos competidores o la producción de enzimas antioxidantes (Santoyo, 2022).

Además, la colonización endofítica de las plantas está determinada, no sólo por los factores de exposición a los microbiomas edáficos o aéreos, sino que estas poblaciones sufren un proceso de evolución asociado a los cambios intrínsecos en la composición de los tejidos vegetales como pueden ser la lignificación de los tejidos o la mayor exposición a microbiomas ambientales (Harrison y Griffin, 2020). Los tallos y la corteza de las plantas leñosas están expuestos al contacto con los microorganismos del aire, el agua y el polvo durante todo el año, mientras que las hojas, incluso en los árboles de hoja perenne, no persisten durante tanto tiempo. De manera similar, las raíces son los tejidos más longevos, por lo que tienen mayor contacto con la microbiota de la matriz del suelo circundante. En este sentido, existe una mayor variación en la microbiota asociada a los tallos que en la asociada a las raíces a lo largo de la vida de esos tejidos (Dastogeer *et al.*, 2020). Este hecho, unido a la especificidad que muestra cada hospedador por las poblaciones microbianas con las que interacciona de manera endofítica, resulta en el establecimiento de poblaciones de microorganismos específicos de cada planta (Kumar *et al.*, 2023).

Las estimaciones indican que el suelo rizosférico es el contribuyente mayoritario de la microbiota endófito de las plantas, contribuyendo con más de dos tercios de la diversidad bacteriana y la fúngica (Banerjee y van der Heijden, 2022). La composición de los ambientes endofíticos es diversa, variando no solo entre las plantas sino también entre los compartimentos de un mismo individuo. Las investigaciones sobre la diversidad de las raíces en las diferentes especies de plantas han demostrado que hay un enriquecimiento de alguno de los filos específicos presentes en la rizosfera, principalmente Actinomycetota, Bacteroidota y Pseudomonadota, mientras que otros, como Acidobacteriota, disminuyen (Bulgarelli *et al.*, 2013). Con respecto a otros compartimentos, como los tallos, se ha descrito un enriquecimiento de bacterias

pertenecientes al filo Pseudomonadota, en comparación con las poblaciones endofíticas de las raíces (Huang *et al.*, 2024). De todas formas, el mecanismo por el cual las bacterias colonizan el interior de los tejidos está aún por dilucidar y son necesarios estudios más exhaustivos de comparación genómica que permitan identificar si existen rasgos comunes en el genoma (Santoyo, 2022).

1.2.2.4. La relevancia del microbioma vegetal.

Muchos de estos microorganismos poseen mecanismos beneficiosos para las plantas, sin embargo, muchas de estas funciones siguen sin estar caracterizadas. Hay varias razones por las cuales no ha sido posible estudiarlos en profundidad, destacando la heterogeneidad de los ecosistemas, la alta diversidad taxonómica y química, la dificultad para estudiar los microorganismos a la microescala en la que funcionan y el hecho de que la mayoría de los microorganismos del suelo aún no han sido cultivados en un laboratorio y, por lo tanto, sus funciones siguen sin caracterizarse. Sin embargo, esta caracterización es de gran interés, pues estos microorganismos no cultivados podrían albergar funciones beneficiosas inexploradas (Jansson *et al.*, 2023).

De todas formas, unas primeras aproximaciones han sido desveladas con respecto a las ventajas que aportan estos microorganismos al desarrollo de las plantas. El microbioma vegetal está intrínsecamente ligado a la salud de las plantas. Un microbioma saludable está caracterizado por una alta diversidad microbiana y una alta uniformidad dentro de las diferentes comunidades microbianas autóctonas asociadas a las plantas. Esta composición ayuda a mitigar los estreses a los que las plantas están sometidas. El mantenimiento del equilibrio y la uniformidad dentro del microbioma vegetal son cruciales para la salud de las plantas (Berg *et al.*, 2021). A pesar de esto, la composición del microbioma puede fluctuar en respuesta a las tensiones y los estímulos ambientales que provocan que la planta reclute a los microorganismos beneficiosos que puedan ayudarle a paliar ese estrés. Por ejemplo, la exposición de las raíces de la remolacha azucarera al patógeno *Rhizoctonia solani*, inducen la atracción de los géneros bacterianos *Chitinophaga* y *Flavobacterium* hacia la endosfera, los cuales ayudan en la supresión del hongo patógeno (Liu *et al.*, 2020).

Las nuevas tecnologías de generación de secuenciación, combinadas con herramientas bioinformáticas, permiten determinar la composición de los endobiotas de las plantas. Con estas técnicas es posible comprender cómo se estructura el microbioma en los diferentes ecosistemas y su papel en estos entornos (Afridi *et al.*, 2022a). Concretamente, la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S para bacterias y arqueas y del gen ARNr 18S o de las secuencias ITS (*Internal transcribed spacer*) para eucariotas, evita algunas de las limitaciones asociadas al cultivo de microorganismos ya que permiten analizar toda la comunidad, incluidas las células que están inactivas. Los avances en este ámbito son prometedores pues podrían promover beneficios para la salud vegetal y, con el tiempo, sería posible manipular la comunidad bacteriana de las plantas para promover su mejor desarrollo (Nwachukwu y Babalola, 2022). Este objetivo se conseguiría dilucidando la estructura, el funcionamiento y los factores que modulan la

estructura de los microbiomas. De esa manera, sería posible utilizarlos en la agricultura para optimizar el desarrollo de los cultivos mediante la selección de prácticas de manejo agrícola que favorezcan la microbiota con funciones beneficiosas. Del mismo modo, sería posible identificar a los miembros del microbioma que fuesen funcionalmente importantes para las plantas y aislarlos mediante técnicas dependientes del cultivo. A partir de estos microorganismos sería posible que se elaborasen nuevos bioinoculantes con mecanismos de promoción del crecimiento vegetal o mecanismo de biocontrol que podrían llegar a aplicarse en los cultivos (Figueiredo y Lopes, 2021).

1.2.3. Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

El término “promoción del crecimiento vegetal” fue acuñado en 1978 por Kloepper y Schroth (1978) para describir a las bacterias que forman parte de la microbiota de la planta y que estimulan el crecimiento vegetal mediante varios mecanismos. Desde ese momento, las investigaciones encaminadas a comprender cómo estas bacterias realizan su efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas ha incrementado constantemente, lo que ha dado lugar a la publicación de numerosos artículos (Flores-Félix *et al.*, 2018; Liriano González *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020; de Matos Nascimento *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020a; Nosheen *et al.*, 2021). Debido a esta intensa producción científica que intenta dilucidar los pormenores de las interacciones positivas entre plantas y microorganismos, se ha conseguido conocer los mecanismos por los cuales estas bacterias ejercen su acción. Algunos de los más notorios son la fijación del nitrógeno atmosférico, la solubilización de los fosfatos, la solubilización de los compuestos de potasio, producción de sideróforos, la producción de fitohormonas y la utilización del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Santoyo *et al.*, 2016).

1.2.3.1. La fijación del nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los elementos esenciales para los seres vivos y también es uno de los menos disponibles ya que se encuentra principalmente en estado gaseoso en su forma química molecular (N_2) (Soumare *et al.*, 2020). Por eso, algunas bacterias han desarrollado una estrategia que les permite realizar el cambio químico del nitrógeno molecular al nitrógeno orgánico, denominada fijación biológica del nitrógeno. Este mecanismo implica la presencia de un complejo sistema enzimático donde la enzima nitrogenasa es la clave. Los microorganismos que llevan a cabo esta actividad biológica son denominados diazotrofos (Antoszewski *et al.*, 2022). Como particularidad, este sistema enzimático presenta un importante gasto metabólico que le permite romper el triple enlace que forma el nitrógeno molecular y transformarlo en amonio. Además, es excepcionalmente sensible a la presencia de oxígeno, ya que este compite con el sitio activo de la enzima nitrogenasa, inactivándola. Esta es la razón por la que la nitrogenasa no es una enzima común en los seres vivos, pues su mantenimiento y su coste metabólico es muy elevado (Luxem *et al.*, 2020).

La fijación biológica del nitrógeno puede dividirse en dos tipos, en simbiosis o en vida libre. Por un lado, está la fijación biológica en bacterias que establecen relaciones de

simbiosis con organismos eucariotas, principalmente plantas, aunque también con algunos animales y protozoos (Zhou *et al.*, 2020). De entre estas relaciones, el caso más destacado y conocido es la simbiosis entre las bacterias del género *Rhizobium* y las plantas leguminosas. Este sistema muestra un elevado nivel de especificidad y una elevada eficiencia con tasas de fijación de nitrógeno de hasta 1000 kg/ha (Swarnalakshmi *et al.*, 2020). Esta simbiosis está asociada a la formación de unos órganos específicos en las raíces de las plantas, denominados nódulos, donde se lleva a cabo la fijación del nitrógeno. Este proceso también es llevado a cabo en las plantas actinorrícicas que establecen simbiosis con actinomicetos del género *Frankia*. Los géneros de las plantas que establecen esta simbiosis pertenecen a las familias *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Elaeagnaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* y *Rosaceae*. Estas se caracterizan por formar nódulos de crecimiento continuo, con una estructura histológica diferente a los nódulos de las leguminosas (Pawłowski y Sirrenberg, 2003).

Por otro lado, los microorganismos que llevan a cabo la fijación del nitrógeno en vida libre son tanto bacterias heterótrofas, como autótrofas y algunas arqueas. Esta actividad estaba limitada a organismos procariotas o arqueas, sin embargo, recientemente ha sido descubierto que un alga marina unicelular también posee esta actividad. Esto es debido a la adquisición de una cianobacteria endosimbionte, la cual ha evolucionado hasta convertirse en un nitroplasto, u orgánulo fijador de N₂. Lo que convierte a esta alga en, posiblemente, el primer organismo eucariota capaz de fijar nitrógeno (Coale *et al.*, 2024).

Dado que la fijación del nitrógeno no puede darse en presencia de oxígeno, algunos microorganismos autótrofos, como las bacterias de los géneros *Rhodospseudomonas* y *Rhodospirillum* o las cianobacterias llevan a cabo la fijación de nitrógeno en células diferenciadas denominadas heterocistos (Higuchi-Takeuchi *et al.*, 2016). Estos orgánulos de pared engrosada limitan la entrada de oxígeno y permiten que la enzima nitrogenasa pueda desarrollar su actividad catalítica sin interferencias (Grover *et al.*, 2022). En el caso de los microorganismos heterótrofos, la fijación del nitrógeno está condicionada por las condiciones ambientales, donde destaca la alta humedad. En los suelos, este factor disminuye la concentración del oxígeno, lo que permite a la enzima nitrogenasa fijar nitrógeno de manera más eficiente (Van Langenhove *et al.*, 2020). Dentro de los microorganismos heterótrofos fijadores del nitrógeno, destacan las especies de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter*. Finalmente, dentro de las arqueas, destacan algunos géneros como *Methanobacteriales*, *Methanococcales* y *Methanosarcinales* (Sun *et al.*, 2021).

1.2.3.2. La solubilización de fosfatos.

El fósforo es el segundo nutriente más importante para el crecimiento vegetal y está relacionado con muchos procesos biológicos como la división celular, la síntesis de los ácidos nucleicos o la fotosíntesis (Banerjee y van der Heijden, 2022). Dependiendo de la latitud y del clima en el que nos encontremos, estos compuestos tienen mayor probabilidad de ser orgánicos, como los monoésteres de ortofosfato, los diésteres de ortofosfato, los polifosfatos orgánicos y los fosfonatos; o inorgánicos, como el Ca₃(PO₄)₂,

el AlPO_4 o el FePO_4 . Salvo la forma inorgánica del fósforo, ortofósforo (H_2PO_4^- and HPO_4^{2-}), el resto de las formas suelen ser insolubles para las plantas (Antoszewski *et al.*, 2022). Tradicionalmente, para suplir el déficit de fósforo, los agricultores han recurrido a los fertilizantes. Sin embargo, estos son poco eficientes ya que sólo el 5-25% del total aplicado es absorbido por las plantas, mientras que el resto permanece en los suelos (Banerjee y van der Heijden, 2022). Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB: *Phosphate Solubilizing Bacteria*) resuelven este problema ya que son capaces de solubilizar los compuestos del suelo a través de diferentes mecanismos y de aumentar la biodisponibilidad del fósforo. El mecanismo que mayor incidencia tiene sobre la disponibilidad del fósforo para las plantas es la producción de ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido láctico, el ácido málico o el ácido cítrico (Nosheen *et al.*, 2021). La liberación de estos ácidos al medio da lugar a una reducción en el pH del suelo mediante la liberación de iones H^+ , lo que a su vez facilita la disolución de los compuestos inorgánicos de fosfato. Al mismo tiempo, el grupo carboxilo del ácido orgánico puede quelar los cationes unidos al fósforo (Cheng *et al.*, 2023). Otro mecanismo relacionado de las PBS consiste en la mineralización de los compuestos orgánicos de fosfato, convirtiéndolos en ortofosfatos que los cultivos pueden absorber. Este proceso es llevado a cabo por enzimas como las fosfoesterasas, las fosfodiesterasas, las polifosfatasas o las fitasas (Antoszewski *et al.*, 2022).

Multitud de bacterias han sido descritas como PSB y la mayoría pertenecen a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Clomobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* y *Thiobacillus* (Cheng *et al.*, 2023).

1.2.3.3. La solubilización de compuestos de potasio.

El potasio es el tercero de los tres macronutrientes necesarios para los seres vivos (Hernández-Fernández *et al.*, 2021). Este nutriente está relacionado directamente con los procesos de crecimiento de las plantas, la resistencia a las enfermedades, el ataque de herbívoros o el frío (Sun *et al.*, 2020b). Al igual que en el caso anterior, aproximadamente el 98% del K del suelo está fijado en minerales de silicato como los feldespatos y las micas, por lo que sólo el 1-2% pueden ser usados por las plantas. Los fertilizantes químicos han sido usados para aportar este nutriente a los cultivos, sin embargo, su uso está cada vez más cuestionado (Nosheen *et al.*, 2021). Las bacterias solubilizadoras de potasio (KSB) han sido presentados como una alternativa a la aplicación de los químicos. Al igual que en el caso del fósforo, estos microorganismos son capaces de producir ácidos orgánicos que disminuyen el pH del suelo y liberan el potasio de los minerales mediante reacciones de protonación y acidificación (Hernández-Fernández *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2020b). Además de la producción de ácidos orgánicos, existen otros mecanismos mediante los cuales los microorganismos solubilizan K inorgánico, como la producción de sideróforos, la producción de exopolisacáridos (EPS) y la secreción de compuestos fenólicos. Recientemente ha sido descrito otro mecanismo de solubilización del potasio

en el que está involucrado la formación de *biofilms* en las superficies de los minerales (Soumare *et al.*, 2023).

Dentro de las bacterias KSB destacan los géneros *Aminobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cladosporium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* (Bakhshandeh *et al.*, 2017; Jini *et al.*, 2023).

1.2.3.4. La producción de sideróforos.

El hierro es un elemento importante para la vida ya que es parte esencial de muchas reacciones de oxidación-reducción, donde actúa como el cofactor de numerosas enzimas. Además, es un componente esencial de algunas moléculas como los citocromos o las proteínas heme y no heme (Saravanakumar *et al.*, 2008). En las plantas también es necesario para la correcta realización de la fotosíntesis y su déficit de este elemento es la causa principal de la clorosis en las plantas (Freimoser *et al.*, 2019).

Aunque el hierro es el cuarto elemento más abundante en la superficie terrestre, este suele encontrarse en su forma más oxidada Fe^{3+} , la cual es muy insoluble y no es fácilmente asimilable por los seres vivos. (Freimoser *et al.*, 2019). Por eso, la gran mayoría de los microorganismos han desarrollado un sistema de producción de sideróforos que secuestra el hierro y lo introduce en la célula a través de transportadores específicos (Masih *et al.*, 2000). Muchos de los sideróforos producidos por las bacterias son moléculas difusibles, por lo que pueden ser usadas no sólo por sus productores, sino también por organismos circundantes que tengan receptores compatibles, como las plantas (Leroux, 2007). Además, los sideróforos juegan un papel importante en la protección de la planta contra los patógenos ya que la patogenicidad de algunas especies de fitopatógenos está influenciada por la disposición del hierro en el medio. En este sentido, las bacterias PGP productoras de sideróforos actúan como competidoras por este elemento, reduciendo la infección (Lim *et al.*, 2017).

Actualmente han sido descritos más de 500 sideróforos diferentes de origen microbiano (Soumare *et al.*, 2023). Estos pueden clasificarse en tres tipos de sideróforos, en función de los ligandos usados para quelar el Fe^{3+} . Estos son los catecolatos, los hidroxamatos y los carboxilatos. Asimismo, también existen sideróforos que son mezclas de algunos de los grupos anteriores (Crowley, 2006). Los sideróforos del tipo hidroxamato pueden tener configuraciones muy diversas, pero todos coinciden en que están compuestos de uno o más residuos de ácido N-hidroxamino. Algunos de los sideróforos más conocidos dentro de este grupo son el ferricromo y la micobactina, producida por bacterias del género *Mycobacterium* (Ait Barka *et al.*, 2002). La mayoría de los catecoles son derivados del ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA), al que se le añaden uno o más residuos de aminoácidos. Uno de los catecoles más comunes es la bacillibactina, la cual es producida por una amplia variedad de especies del género *Bacillus* (Nifakos *et al.*, 2021). Los sideróforos del tipo carboxilatos fueron los últimos en ser descubiertos y, mientras que los hidroxamatos y los catecoles poseen estructuras muy variadas, donde varios componentes de la molécula actúan como secuestradores del

hierro, en los carboxilatos, solo los grupos hidroxilo y carboxilo pueden realizar esta función. Uno de los sideróforos más conocidos dentro de este grupo es la rizobactina, producida generalmente por las especies del género *Rhizobium* (Lambrese *et al.*, 2018).

1.2.3.5. La producción de fitohormonas.

El desarrollo tisular de las plantas y la diferenciación de los órganos vegetales está controlado por la producción y la concentración de moléculas biológicamente activas, denominadas fitohormonas. Estas son moléculas de diferente naturaleza que actúan a concentraciones relativamente bajas y que regulan los procesos de crecimiento, desarrollo y senescencia en la planta. En la actualidad existen cuatro grupos diferentes: las auxinas, las giberelinas, las citoquininas y el etileno. Además, en los últimos años se ha descrito que el ácido abscísico y el ácido jasmónico presentan actividades similares, por lo que algunos autores los consideran fitohormonas (Fuke *et al.*, 2021).

Las auxinas son las hormonas vegetales mejor estudiadas y también fueron las primeras en ser descubiertas y aisladas. Participan en casi todos los procesos vegetativos y reproductivos, como la arquitectura de las plantas, el patrón de los órganos, el desarrollo de la vasculatura y las respuestas a la luz y a la gravedad. El ácido indol-3-acético (AIA) es la forma de auxina bioactiva más común en las plantas, responsable de la elongación de los coleóptilos y de partes del tallo. Las giberelinas regulan muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, como la germinación, el alargamiento del tallo, el desarrollo de las flores, la latencia, la senescencia de las hojas y la maduración de los frutos. Las citoquininas, al igual que las dos hormonas anteriores, también están involucradas en procesos de desarrollo vegetal y, además, inducen la iniciación de primordios radiculares, la iniciación del nacimiento de los brotes y la formación de las yemas en los cultivos de los tejidos. El etileno está asociado con muchos procesos fisiológicos diferentes, como el crecimiento de las plántulas, el desarrollo de los órganos, la senescencia, la maduración y la abscisión de los frutos y las respuestas inmunes a los patógenos. El ácido abscísico regula muchas etapas del crecimiento y del desarrollo de las plantas, desde la germinación hasta la latencia de las semillas, y modula las respuestas de las plantas a los factores ambientales. El ácido jasmónico participa en procesos vegetativos y reproductivos, como el alargamiento de las raíces y la fertilidad. Además, juega un papel importante en la adaptación de las plantas a los estímulos ambientales, incluidos los estreses abiótico y biótico (Kurepin *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023).

Numerosos grupos de bacterias son capaces de producir fitohormonas siendo la producción de ácido indol acético el mecanismo más estudiado debido a que es el más común entre las bacterias de la rizosfera. Además, está involucrada en la producción de raíces secundarias, que favorecen la colonización de la planta por parte de las rizobacterias, por lo que muchas de ellas se han especializado en su producción (Maharana *et al.*, 2019). Esta auxina puede ser sintetizada por diferentes rutas metabólicas, pero en la mayoría de ellas, el triptófano es el precursor principal (Chandra *et al.*, 2018).

La producción de las giberelinas y las citoquininas es menos abundante pero no extraña. Por ejemplo, las giberelinas, son producidas por cepas de bacterias pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Bacillus* y *Rhizobium*. Mientras que las citoquininas son producidas por algunas cepas de bacterias pertenecientes a los géneros *Methylobacterium* y *Pseudomonas* (Pereira *et al.*, 2023; Salazar-Cerezo *et al.*, 2018).

1.2.3.6. La ACC desaminasa.

El ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) es un precursor del etileno, la hormona vegetal volátil producida por las plantas superiores y que interviene en la germinación de las semillas, el alargamiento de las raíces de las plantas, la formación de las hojas primordiales, el inicio de la floración y la maduración de los frutos. Además, el etileno juega un papel importante en la defensa de las plantas frente a factores bióticos o abióticos. Su síntesis aumenta como respuesta al estrés e induce procesos de marchitez, senescencia e inhibición del crecimiento de las plantas (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2020).

La producción del etileno comienza con la síntesis de S-adenosil-metionina (SAM), que es convertida en ACC mediante la acción de la enzima ACC sintasa. Posteriormente, el ACC es convertido a etileno mediante la acción de la enzima ACC oxidasa (Houben y Van de Poel, 2019). Los estudios han demostrado que la transcripción de algunos de los genes de la ACC sintetasa está inducida por factores de estrés como las inundaciones, los daños en la planta o la salinidad. La enzima ACC-desaminasa está presente en numerosas bacterias de la rizosfera y se ha observado que aquellas bacterias que presentan esta enzima pueden regular y mejorar las capacidades de las plantas para superar procesos temporales de estrés (Ullah *et al.*, 2019). Esta enzima degrada el ACC a α -cetobutirato y amoníaco, regulando así la sobreproducción de etileno, lo que mantiene a raya la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y ayuda a la planta a tolerar las situaciones de estrés (Gupta *et al.*, 2022). Por lo tanto, la enzima bacteriana ACC desaminasa ayuda a las plantas a reducir muchas de las manifestaciones de estrés, además favorece el crecimiento (generalmente aumentando la longitud de las raíces y de las estructuras aéreas) y facilita su adaptación y su supervivencia (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2020).

Numerosas bacterias han sido descritas por poseer la enzima ACC desaminasa, cuya transcripción es activada en momentos de estrés como la sequía, la salinidad, la presencia de contaminantes o la presencia de patógenos. Algunos de los géneros bacterianos descritos con estas enzimas son *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Shahid *et al.*, 2023).

1.2.4. Los mecanismos de biocontrol.

Los fitopatógenos son un gran problema en la agricultura y provocan grandes pérdidas en producción y, por lo tanto, también económicas (Tao *et al.*, 2020). En términos globales, son responsables del 10 al 42% de las pérdidas de producción, lo que resulta en aproximadamente 220 mil millones de dólares en pérdidas anuales. De los

agentes causales de estas enfermedades, los hongos fitopatógenos son de los más preocupantes, pues suponen entre el 70% y el 80% de todos los ataques por fitopatógenos (Priyashantha *et al.*, 2023). Entre estos hongos fitopatógenos, uno de los que destaca es *Botrytis cinerea*, el cual es uno de los 10 hongos fitopatógenos con mayor importancia económica, responsable de pérdidas de entre 10 y 100 mil millones de dólares anuales en todo el mundo (Shao *et al.*, 2021; Bi *et al.*, 2023). Este es un patógeno de transmisión aérea que causa podredumbre en todas las partes aéreas de las plantas, incluyendo los frutos y las flores, en las que aparece un moho gris, característico de la infección (Schalchli *et al.*, 2016). Es un hongo necrotrófico, lo que significa que induce la muerte de las células vegetales para asegurar su suministro de nutrientes (Fan *et al.*, 2017a). Los cultivos que producen pequeños frutos como la zarzamora son especialmente susceptibles a infectarse con *Botrytis cinerea* y es una de las principales causas de pérdida de producto, pudiendo acabar con el total de la producción en los casos más extremos (Kozhar y Peever, 2018; Huerta-Olalde *et al.*, 2022). Aunque el control de esta enfermedad se basa en una gestión estratégica donde se integran la eliminación de partes enfermas, un riego y una fertilización adecuados, y la regulación de la humedad, la mayor responsabilidad recae en los fungicidas (Shao *et al.*, 2021). Sin embargo, el hongo ha evolucionado relativamente rápido ante la presión de los químicos, y cada vez es más frecuente encontrar poblaciones multirresistentes (Cosseboom *et al.*, 2020). Viendo que los fungicidas más importantes están dejando de ser efectivos, está haciéndose palpable la necesidad de buscar nuevas estrategias de control (Fuke *et al.*, 2021). De nuevo, el uso de los microorganismos representa una alternativa a los compuestos químicos, ya que poseen diferentes mecanismos para combatir las infecciones en las plantas e incluso prevenirlas (Meena *et al.*, 2020). Entre los diferentes mecanismos podemos destacar la producción de compuestos difusibles, la producción de compuestos volátiles, la competición y la inducción de la resistencia sistémica (Roca-Couso *et al.*, 2021).

1.2.4.1. La producción de compuestos antifúngicos difusibles.

Las bacterias pueden producir gran variedad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. Estos compuestos son capaces de difundir a través del medio y llegar más allá del entorno de la propia bacteria (Lim *et al.*, 2017). Entre ellos podemos destacar los sideróforos y las enzimas líticas. Como ya comentamos anteriormente, los sideróforos reducen la cantidad de hierro disponible en el medio, el cual es necesitado por la mayoría de los hongos fitopatógenos. Así, hongos como *Botrytis cinerea* lo necesitan para la germinación de sus esporas y el crecimiento de su micelio (Shanmugaiyah *et al.*, 2015). Algunos de los géneros bacterianos que han sido descritos como agentes de biocontrol mediante la producción de sideróforos son *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Brevundmonas*, *Brevibacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Providencia* (Deb y Tatung, 2024).

Las enzimas líticas en cambio son capaces de degradar componentes concretos de la pared fúngica de los hongos. Aunque la composición de la pared celular de los hongos varía tanto entre especies como en diferentes etapas del ciclo de vida, en términos

generales, están compuestas por polímeros lineales de β -1,4-N-acetilglucosamina (quitina), α -1,3-glucanos, β -1,3-glucanos, β -1,6-glucanos y proteínas, con una extensa reticulación entre estos componentes (Cantu *et al.*, 2009). El contenido aproximado de cada polímero es de un 20% de quitina, 50-60% de glucanos y 20-30% de proteínas (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Los componentes de las paredes celulares de los hongos pueden ser usados como diana de compuestos antifúngicos formulados en base a enzimas hidrolíticas, como las glucosidasas, las quitinasas y las proteasas. La acción de estas enzimas podría provocar la desestabilización de la pared del hongo y la consecuente muerte celular (Gow *et al.*, 2017). La alteración de los principales componentes de la pared celular puede inducir la supresión de los hongos, por lo que los microorganismos capaces de producir este tipo de enzimas son buenos candidatos para el desarrollo de biofungicidas (Haidar, 2017). De hecho, los microorganismos con capacidad de escindir la quitina ya se utilizan para el control de patógenos microbianos y de plagas de insectos (Kim *et al.*, 2019). Algunos de los géneros bacterianos que han sido descritos como agentes de biocontrol mediante la producción de enzimas líticas son *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Luteibacter* y *Pseudomonas* (Bilous *et al.*, 2023).

1.2.4.2. La producción de compuestos volátiles.

Otro de los mecanismos de acción en el biocontrol es la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). Compuestos pequeños y olorosos (<C15), de baja masa molecular (<300 Da) y con una fracción lipófila (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). Las estructuras químicas de los volátiles bacterianos son muy diversas, desde pequeñas moléculas alifáticas o aromáticas hasta grandes cetonas, alcanos o alquenos (Garbeva y Weiskopf, 2020). Este tipo de compuestos son producidos por multitud de microorganismos, entre ellos las bacterias, y son considerados como los mensajeros de largas distancias. Participan en las interacciones entre muchos organismos diferentes, entre ellas, las relaciones bacterias-fitopatógenos (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). Muchas bacterias del suelo pueden producir VOCs con efectos antifúngicos, que restringen la capacidad de los hongos de crecer o de germinar sus esporas. En este sentido, representan un mecanismo de acción importante frente a los hongos fitopatógenos y poseen unas ventajas específicas en contraposición a los compuestos difusibles. Son eficaces a bajas concentraciones, difunden a través de los poros del suelo, viajan largas distancias desde su punto de origen y pueden actuar sobre los patógenos sin establecer contacto físico (Belda *et al.*, 2017, Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Además, sus fuertes actividades antifúngicas, junto con la característica de ser inofensivos tanto para el medio ambiente como para los seres vivos, hacen de los VOCs un agente prometedor y sostenible para reemplazar a los fungicidas químicos en el control de patógenos vegetales en el futuro (Zhang *et al.*, 2020a)

Adicionalmente, los VOCs bacterianos no solo interaccionan con otros microorganismos, sino que además pueden ejercer su influencia en los organismos superiores, como las plantas. En este sentido, su efecto ha sido estudiado y ha sido comprobado que los VOCs bacterianos son capaces de alterar drásticamente el desarrollo

del sistema radicular de las plantas, la fisiología de las plantas, las vías hormonales y la producción de biomasa (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). Finalmente, también han sido estudiados por intervenir en la salud vegetal pues son capaces de inducir la resistencia sistémica inducida (ISR) de la planta (Garbeva y Weiskopf, 2020; Pertot *et al.*, 2017).

Algunos de los géneros bacterianos que han sido descritos como agentes de biocontrol mediante la producción de compuestos volátiles son *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Streptomyces*. Algunos de los VOCs con actividad antifúngica producidos por estos géneros bacterianos son alcoholes (el 2-feniletanol y el 3-metil-1-butanol), cetonas (la 2-nonanona y la 2-heptanona), pirazinas (la 2,5-dimetilpirazina y la 2-metilpirazina) y compuestos que contienen azufre (el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo) (Almeida *et al.*, 2023).

1.2.4.3. La competición.

La competición ha demostrado ser otra buena estrategia en la lucha contra los hongos fitopatógenos. Esta puede darse tanto por los nutrientes disponibles como por el espacio (Haidar, 2017). La competencia por los nutrientes y el espacio son factores claros en el establecimiento de una enfermedad, ya que la infección sólo es posible cuando hay una cantidad adecuada de nutrientes (Page, 2019). Los microorganismos no patógenos que son capaces de colonizar las superficies de las plantas limitan la cantidad de nutrientes disponibles, lo que reduce el porcentaje de germinación de las esporas patógenas y, por lo tanto, reduce la capacidad de invasión del huésped (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Además, en los hongos necrotróficos como *Botrytis cinerea*, la reducción de la cantidad de nutrientes generalmente reduce el crecimiento del tubo germinal, lo que reduce la infección, la necrosis y la expansión del hongo (Elad y Stewart, 2004). Algunas bacterias que tienen la capacidad de competir son los miembros de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Salvatierra-Martinez *et al.*, 2018).

1.2.4.4. La inducción de la resistencia sistémica.

Los mecanismos anteriormente mencionados son producto de la acción directa de la bacteria frente al hongo. Sin embargo, existe un mecanismo de biocontrol indirecto, en el que la bacteria no ataca directamente, sino que induce cambios en las plantas para aumentar su defensa frente a las infecciones (Oleńska *et al.*, 2020).

Como cualquier ser vivo, las plantas poseen su propio sistema de defensa inducido. Es decir, un proceso de resistencia activa dependiente de las barreras físicas y químicas de la planta huésped. Este puede ser activado por agentes inductores tanto bióticos como abióticos (Van Loon, 1997, Zhou *et al.*, 2021). El propio patógeno es a menudo un desencadenante que activa esta resistencia a través de reacciones bioquímicas o la producción de proteínas patógenas (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Por ejemplo, en la infección por *Botrytis cinerea*, el hongo produce poligalacturonasas, que hidrolizan los componentes de la pared celular de la planta y libera oligogalacturónidos que inducen la respuesta de defensa del huésped (Ferrari *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos

microorganismos no patógenos también pueden activar la resistencia inducida, lo que aumenta la protección de la planta frente a multitud de patógenos (Rabari *et al.*, 2023).

La resistencia inducida generalmente se divide en dos grupos, la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducible (ISR) (Figura 3) (Zhou *et al.*, 2021). La primera es definida como la inmunidad inherente de la planta, activada mediante la exposición directa a desencadenantes bióticos, tanto patógenos como no patógenos, o por factores abióticos (Govrin y Levine, 2002; Lazarovits *et al.*, 2014). Este mecanismo depende principalmente de la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y la producción de ácido salicílico, un compuesto químico que generalmente se produce después de la infección (Rabari *et al.*, 2023). En la segunda, la respuesta es producto de una hipersensibilidad derivada de la exposición a los microorganismos, siendo el etileno y el ácido jasmónico las dos moléculas involucradas (Timothy y Adejumo, 2021). Ambos mecanismos pueden ser activados por bacterias beneficiosas mediante la regulación de las vías de señalización hormonal del ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno, la síntesis de metabolitos secundarios, la producción de diversas enzimas y la producción de compuestos volátiles (Rabari *et al.*, 2023).

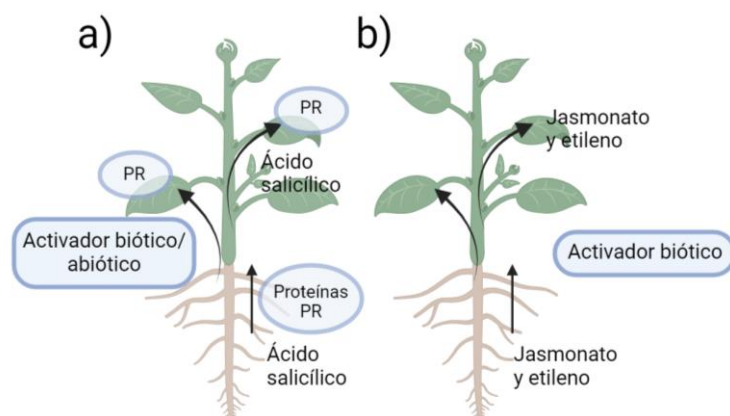


Figura 3. Esquema de los sistemas de resistencia sistémica en plantas. a) Resistencia sistémica adquirida; b) Resistencia sistémica inducible

El sistema inmunológico de las plantas desempeña un papel central en la resistencia a los estreses bióticos. El uso de las bacterias que modulan esta respuesta inmune puede resultar ser una importante estrategia en el campo del biocontrol (Pieterse *et al.*, 2014). Algunos de los géneros bacterianos que han sido descritos como agentes de biocontrol mediante la activación del ISR son *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Salwan *et al.*, 2023).

1.2.5. La mejora de la calidad nutricional.

La aplicación de las bacterias beneficiosas en las plantas puede aportar beneficios más allá de la promoción del crecimiento vegetal o la protección frente a los patógenos. La aplicación de los microorganismos en los cultivos ha demostrado que también puede impactar en el valor nutricional de estos. Algunos ejemplos han sido descritos, como que

la inoculación de cultivos de maíz con las bacterias *Azotobacter chroococum* y *Planomicrobium chinense* incrementa el contenido en compuestos fenólicos, flavonoides y proteínas en el producto de consumo (Khan *et al.*, 2023b). Del mismo modo, la inoculación de cultivos de arándanos con las bacterias pertenecientes a los géneros *Paenibacillus* y *Rhizobium* incrementaba la concentración de polifenoles en los frutos, o la inoculación de plantas de lechuga con *Rhizobium laguerreae* incrementa la concentración de compuestos fenólicos en las hojas (Ayuso-Calles *et al.*, 2020; Flores-Félix *et al.*, 2024).

En estos casos, los mecanismos por los que las bacterias mejoran el contenido nutricional en las plantas no han sido todavía esclarecidos. En algunos estudios, los resultados fueron asociados con los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, que facilitan la adquisición de los nutrientes y, por lo tanto, podrían estar relacionados con el aumento del contenido nutricional en los frutos. Mientras que, en otros estudios, los resultados obtenidos fueron asociados con la activación de rutas metabólicas en las plantas, relacionadas con la síntesis de compuestos beneficiosos como los flavonoles (Galicia-Campos *et al.*, 2022).

1.3. LA ZARZAMORA COMO CULTIVO DE ALTO VALOR NUTRICIONAL.

La zarzamora es una planta que pertenece al género *Rubus* y a la familia *Rosaceae* (Meng *et al.*, 2022a). Los miembros de este género pueden encontrarse distribuidos a nivel global e incluso colonizando todos los biomas, desde ecosistemas tropicales hasta subárticos, con excepción de la Antártida (Figura 4) (Jennings, 2018). El grupo de especies englobadas dentro del género *Rubus* ha sufrido numerosos procesos de hibridación, de apoximia y de poliploidía a lo largo de los años. Por lo que no está claro el número exacto de especies, el cual oscila entre 450 y más de 1.000 (Huang *et al.*, 2023).

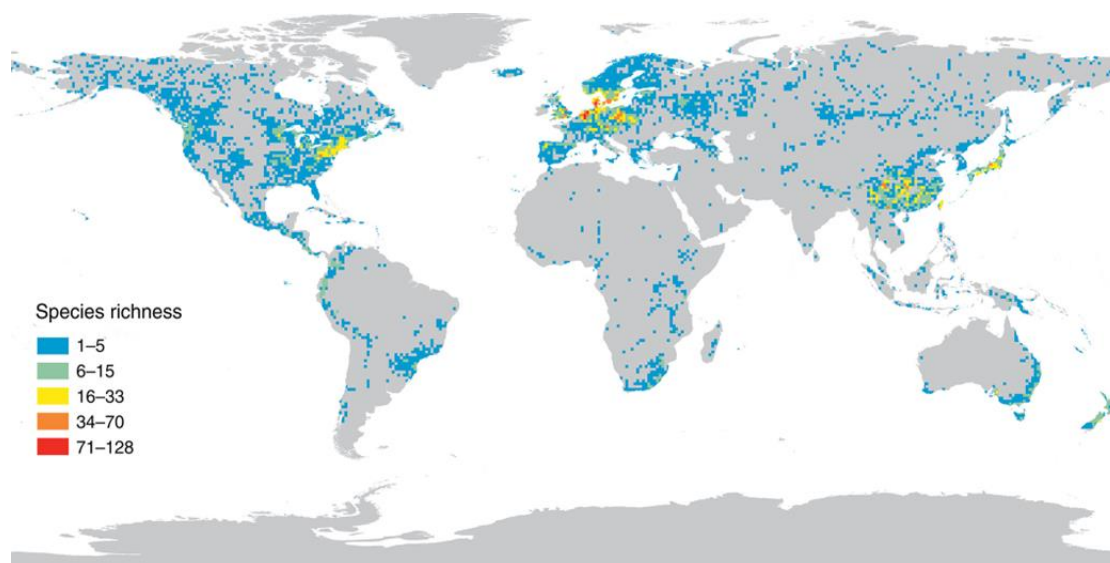


Figura 4. Riqueza de las especies del género *Rubus* alrededor del mundo. Fuente: *Global Biodiversity Information Facility*, <https://www.gbif.org/> y (Huang *et al.*, 2023).

En la Península Ibérica podemos encontrar un total de 26 especies de *Rubus* diferentes, englobadas dentro de tres de los subgéneros *Cyclactis* (Raf.) Focke, *Ideobatus* Focke y *Eubatus*. El primer subgénero incluye a *Rubus saxatilis* L. (Figura 5.A.) la única especie herbácea; el segundo incluye a *Rubus idaeus* L. (Figura 5.B.), la clásica frambuesa; mientras que *Eubatus* engloba a las otras 24 especies. La organización de este último subgénero es mucho más compleja y diversa, sin embargo, la mayor parte de la extensión de la península está dominada por la especie *Rubus ulmifolius* Schott (Figura 5.C.) y, en menor medida, *Rubus caesius* L. (Figura 5.D.) (Vicente-Orellana y Galán-de-Mera, 2022).

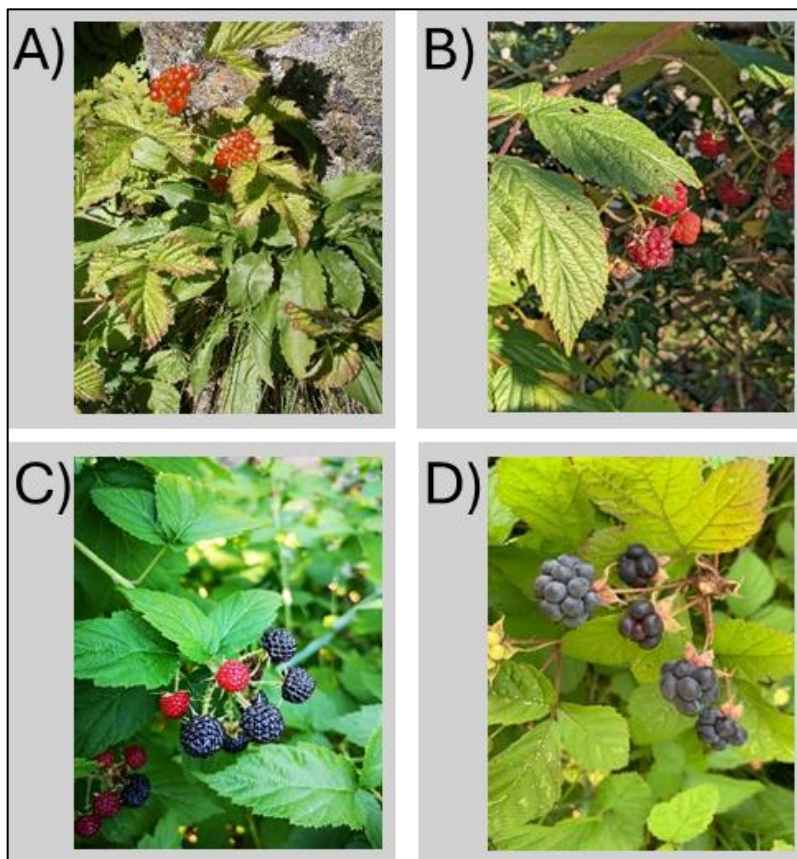


Figura 5. Imágenes de los mayores representantes de género *Rubus* en la Península Ibérica. A) *Rubus saxatilis* L. B) *Rubus idaeus* L. C) *Rubus ulmifolius* Schott. D) *Rubus caesius* L.

La especie *Rubus ulmifolius* Schott es la más importante en España, tanto a nivel ecológico como comercial. Es una especie de planta arbustiva que puede alcanzar los 3 o 4 metros de altura. Es un arbusto caducifolio, espinoso, con tallos arqueados de color violeta oscuro. Las hojas tienen una disposición alterna, son compuestas y están divididas en 3 o 5 foliolos, dentados o aserrados. Las flores son vistosas, solitarias o en cimas racemiformes, con un cáliz de 5 sépalos blanco y una corola de 5 pétalos, color rosado o blanco (Figura 6). Por último, el fruto es una polidrupa, formado por muchas drupas pequeñas, arracimadas y soldadas entre sí, de color rojo que oscurece al madurar. Este arbusto necesita suelos con una cierta humedad y puede encontrarse en diferentes ambientes, en altitudes de entre 0 y 1.600 metros. En el hemisferio norte, la época de la

floración ocurre entre los meses de mayo y junio, seguida de la época de maduración y de desarrollo del fruto (Da silva *et al.*, 2019).



Figura 6. Representación gráfica de *Rubus ulmifolius* Schott.

En los últimos años, el perfil de consumidores ha cambiado, dirigiéndose hacia un tipo de consumidor más especializado, con unas demandas muy elevadas en cuanto a calidad del producto. Esto a su vez, ha incrementado la demanda de productos con propiedades nutraceuticas, es decir, productos que poseen compuestos bioactivos que impactan de manera positiva en la salud de los consumidores (McClements, 2019). El fruto de la zarzamora está categorizado en ese tipo de productos y es por eso que el consumo de este cultivo está en constante aumento a nivel mundial (Petković *et al.*, 2024).

1.3.1. La composición de la mora y el efecto de su consumo en la salud.

En la tradición española, el consumo de las moras ya era conocido por tener supuestas propiedades medicinales. Por ello, estos frutos han sido usados para tratar diversas afecciones como la anemia, los dolores de garganta, las úlceras bucales y las inflamaciones de las encías (Martins *et al.*, 2023). Sin embargo, el conocimiento sobre las propiedades de los frutos ha ido más allá. Durante los últimos años, se ha observado un cambio en los hábitos de consumo de los consumidores de los países occidentales hacia un mayor consumo de frutas y hortalizas (Cosme *et al.*, 2022). Dentro de ellos, encontramos los alimentos funcionales, aquellos alimentos cuyo consumo está asociado a mejoras en la salud de las personas, más allá de las implicaciones nutritivas del alimento en sí (Meng *et al.*, 2022a). A este respecto, la composición del fruto juega un gran papel. La mora, como cualquier fruta, está compuesta principalmente por carbohidratos, destacando en este caso la glucosa y la fructosa. Sin embargo, los frutos de la zarzamora

también incluyen una gran cantidad de compuestos bioactivos, con actividades anticancerígenas, antibacterianas y antiinflamatorias, debidas principalmente a sus propiedades antioxidantes (Meng *et al.*, 2022a). Estos compuestos bioactivos son diversos, pero fundamentalmente se hace referencia a ellos como compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas producidos por las rutas de las pentosas fosfatos, del siquimato y de los feniltropanoides (Vuolo *et al.*, 2019). Estructuralmente consisten en un anillo aromático que contiene uno o más sustituyentes hidroxilo (OH⁻) (Gan *et al.*, 2019). Estos compuestos suelen estar presentes, en mayor o menor medida, en los alimentos de origen vegetal (Gimeno Creus, 2004). Su función no es únicamente la de aumentar el poder antioxidante, sino que muchos de ellos son los responsables del color y sabor de los alimentos. Atendiendo a sus estructuras químicas pueden ser clasificados en varios subgrupos, siendo los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos los más comunes en la dieta humana (Figura 7). La cantidad de estos compuestos varía dentro de cada especie vegetal en función de la localización, el cultivar o el tiempo de la cosecha, pero en general en las moras los más prevalentes son los ácidos fenólicos y los flavonoides (Bhuyan y Dutta, 2021; Meng *et al.*, 2022a).

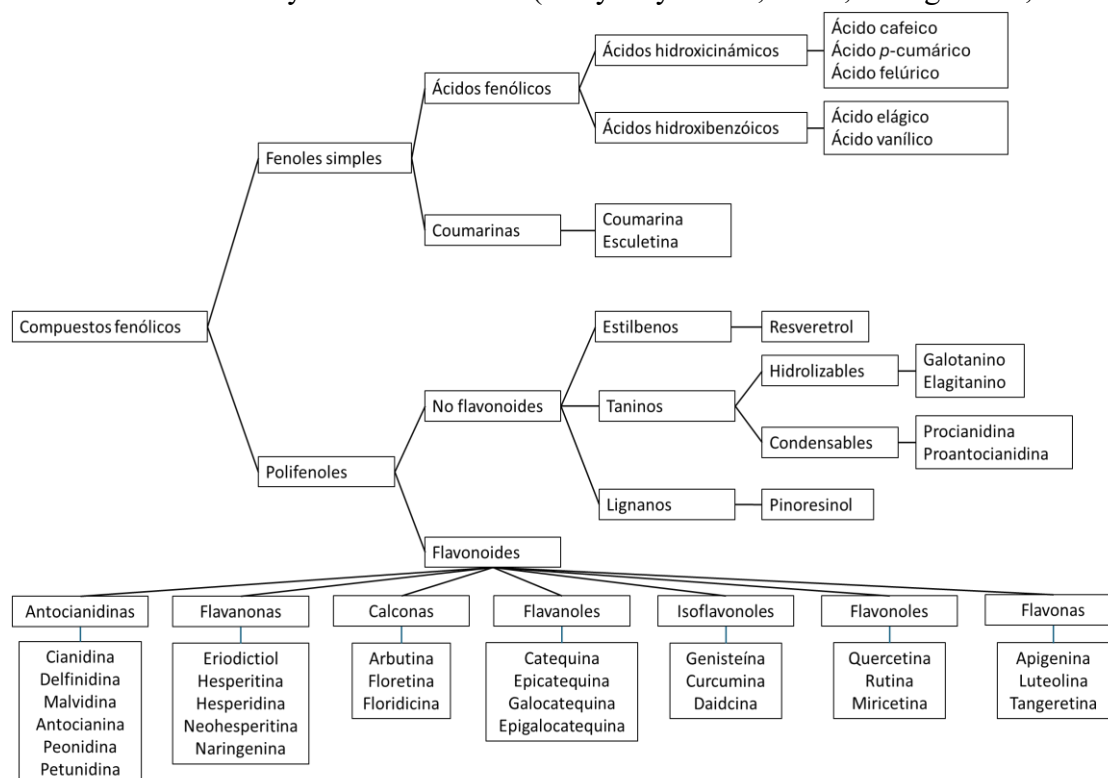


Figura 7. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Los ácidos fenólicos están formados por al menos un anillo aromático, donde al menos un hidrógeno ha sido sustituido por un grupo hidroxilo (Vuolo *et al.*, 2019). Están divididos en dos grupos, los ácidos hidroxibenzoicos (HBA) y los ácidos hidroxicinámicos (HCA), los cuales derivan de moléculas no fenólicas de ácido benzoico y cinámico, respectivamente. Son sintetizados por la ruta del siquimato, usando como moléculas precursoras la L-fenilalanina o la L-tirosina (Williamson, 2017). El principal

ácido fenólico de las moras es el ácido elágico, un polifenol con cuatro grupos hidroxilo, clasificado en la familia de compuestos del ácido hidroxibenzoico. Este compuesto ha sido descrito por reducir el riesgo de desarrollar cáncer y por mitigar la respuesta inflamatoria en humanos (Larrosa *et al.*, 2010, Muñoz-Espín *et al.*, 2013).

Los flavonoides constituyen el grupo más grande de los compuestos fenólicos, con más de 6.000 compuestos descritos en los alimentos vegetales. Su estructura consiste básicamente en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos, frecuentemente en forma de anillo heterocíclico. Uno de sus anillos es sintetizado en la ruta del acetato/malonato, mientras que el segundo deriva de la ruta del siquimato (Birt y Jeffery, 2013). Algunos ejemplos son las antocianidinas, como la cianidina, que presenta colores desde el rojo al magenta, o la delphinidina, que presenta colores del magenta al morado. Otro ejemplo son las antocianinas, que son las que aportan el color azul oscuro de las moras y son la clase de antioxidantes más asociada con las bayas y frutos rojos (Liu *et al.*, 2021b). La ingesta de antocianinas se ha asociado con una reducción de la resistencia a la insulina, un menor riesgo de infarto de miocardio y una moderación de la respuesta inflamatoria (Ruddock y Facey, 2024).

1.3.2. La evaluación de la actividad biológica en organismos modelo.

Diversos ensayos sobre las actividades bioactivas de las moras han sido realizados en los últimos años. Destacan sobre todo los estudios en líneas celulares *in vitro*. Sin embargo, es importante señalar que, en líneas generales, en estos estudios los extractos investigados no fueron digeridos ni absorbidos y por tanto, no están sometidos a las mismas transformaciones que ocurren durante la ingesta (Robinson *et al.*, 2020). Otra forma de realizar este tipo de estudios es mediante el uso de organismos modelo, más concretamente *Caenorhabditis elegans*. Este organismo pertenece a la familia *Rhabditidae*, al orden Rhabditida, la clase Secernente y el filo Nematoda. Desde que fue introducido en los años 70 por Sydney Brenner, ha sido usado como modelo para diversos ensayos científicos (Ayuda-Durán *et al.*, 2020). Este nemátodo destaca por poseer una serie de características que facilitan trabajar con él, como la autofecundación, el ciclo de vida corto, un cuerpo pequeño y transparente, la facilidad de cultivar en laboratorio, la operación simple, el bajo costo y las reducidas limitaciones éticas (Johnson, 2003). A pesar de su estructura simple, los nematodos tienen músculos, tejido subcutáneo, sistema nervioso, intestino, gónadas, glándulas y sistema excretor completos. Además, muchos procesos fisiológicos básicos y respuestas al estrés oxidativo de organismos superiores están altamente conservados en los nematodos (Markaki y Tavernarakis, 2020). No solo eso, sino que además comparten aproximadamente entre el 60% y el 80% de los genes con los humanos. Por lo que los convierte en un excelente modelo para estudios del desarrollo, de neurobiología y para evaluar los efectos farmacológicos y toxicológicos en humanos (Zhang *et al.*, 2020b).

Caenorhabditis elegans tiene un ciclo de vida muy sencillo. Si son mantenidos a 20 °C, desde la eclosión del huevo el individuo pasa por cuatro fases larvarias (L1, L2, L3, L4) y alcanza el estado de adulto a los 3-5 días. La esperanza de vida de los adultos es de dos a tres semanas más. Si las condiciones de crecimiento no son favorables, esto incluye que la temperatura no sea la adecuada, la falta de alimento o la sobrepoblación, las larvas L1 pueden entrar en un estado larvario especial denominado L3d o *dauer* en el cual las constantes vitales se ralentizan. En este estado pueden sobrevivir durante meses hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables (Yue *et al.*, 2021) (Figura 8).

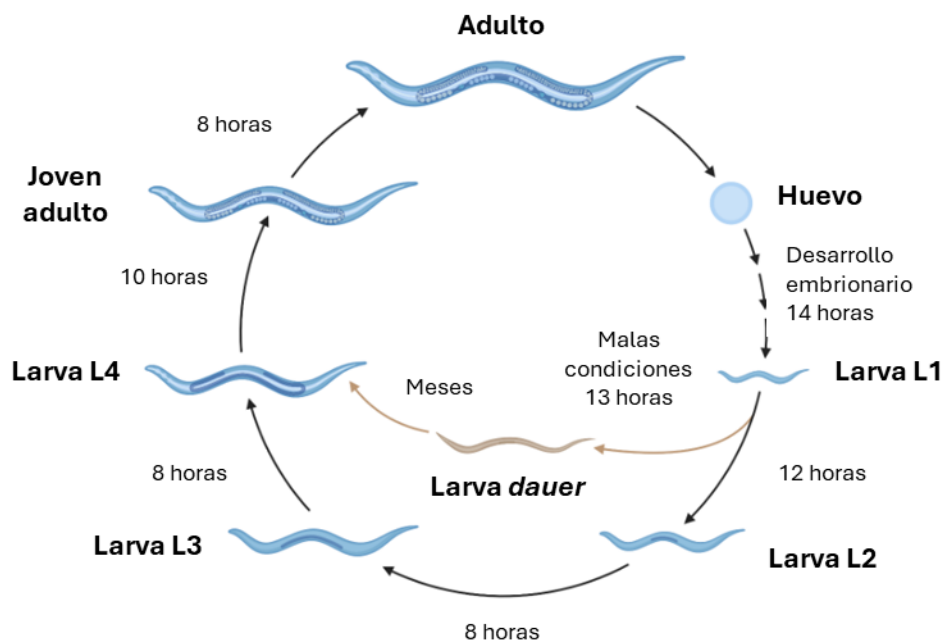


Figura 8. Esquema del ciclo de vida del organismo *Caenorhabditis elegans* a 20 °C. Adaptada de Biorender.

El organismo modelo *Caenorhabditis elegans* ha sido usado durante años para el estudio de diversas enfermedades como el Alzheimer o la obesidad (Zhu *et al.*, 2022a). Otro de sus usos ha sido el estudio de las rutas bioquímicas relacionadas con el envejecimiento y la respuesta al estrés (Zhang *et al.*, 2020b). El envejecimiento es la disminución progresiva de la morfología y función de los tejidos a medida que aumenta la edad cronológica, que eventualmente resulta en la muerte del organismo. Desde el descubrimiento de las mutaciones genéticas únicas que retrasan el deterioro relacionado con la edad y prolongan la esperanza de vida, *Caenorhabditis elegans* se ha convertido en uno de los principales organismos modelo para estudiar el envejecimiento (Scharf *et al.*, 2021). Además, es sabido que la ingesta regular de ciertos nutrientes y sustancias bioactivas favorecen la prevención y el tratamiento tanto de enfermedades crónicas como del envejecimiento (Liu *et al.*, 2021b). En este sentido, *Caenorhabditis elegans* también ha servido como modelo a la hora de estudiar sustancias bioactivas naturales y sus efectos sobre la salud general y la esperanza de vida de los nemátodos (Ye *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal el estudio de las poblaciones bacterianas asociadas a los tejidos de *Rubus ulmifolius* Schott y el aislamiento de bacterias endofíticas para su evaluación como posibles bioinoculantes para la mejora del crecimiento vegetal, el biocontrol del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y la mejora de la producción agrícola de cultivos de zarzamora. Para la consecución de este objetivo se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la diversidad de las poblaciones bacterianas endofíticas de la raíz, el tallo y las hojas de plantas de la especie *Rubus ulmifolius* Schott recogidas en tres ambientes impactados por diferentes condiciones ambientales.
2. Aislamiento, identificación y caracterización fenotípica *in vitro* de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal y de biocontrol del hongo *Botrytis cinerea* de las bacterias obtenidas del interior de los tejidos de la raíz y del tallo de plantas de la especie *Rubus ulmifolius* Schott.
3. Evaluación de la capacidad de colonización de los aislados seleccionados combinando técnicas *in vitro* e *in vivo*.
4. Evaluación de la capacidad de la promoción del crecimiento vegetal de los aislados seleccionados en plantas de la especie *Solanum lycopersicum* y cuantificación de la colonización.
5. Evaluación de la capacidad de biocontrol de las cepas seleccionadas en plantas de la especie *Solanum lycopersicum* infectadas con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.
6. Análisis *in silico* e *in vivo* de la capacidad antifúngica del volatilo de las bacterias seleccionadas frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.
7. Análisis del efecto del volatilo de las cepas seleccionadas en la inducción de la resistencia sistémica de las plantas de la especie *Solanum lycopersicum*.
8. Estudio de la inoculación de los aislados seleccionados en la producción de moras en plantas del género *Rubus* en condiciones de invernadero y de campo.
9. Análisis del efecto de la inoculación de las bacterias sobre la composición de los compuestos fenólicos de las moras y estudio del potencial biológico en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.
10. Análisis de la expresión génica de genes de *Caenorhabditis elegans* involucrados en la tolerancia al estrés oxidativo tras la exposición a las moras obtenidas de las plantas inoculadas con las bacterias seleccionadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANÁLISIS METATAXONÓMICO.

3.1.1. Toma de muestras vegetales.

Las muestras fueron tomadas de plantas de la especie *Rubus ulmifolius* Schott de tres ambientes diferentes de la comarca de Ciudad Rodrigo, en Salamanca (España). Esta zona está ubicada bajo las condiciones climáticas de tipo Csa (clima templado cálido con verano seco y caluroso) según la clasificación de Köppen-Geiger. Teniendo esta clasificación en cuenta, se tomaron muestras de plantas silvestres que crecían en tres condiciones diferentes. Las primeras muestras fueron tomadas de una zona abandonada, en la que no hubo intervención humana en los últimos 20 años, denominadas en adelante como muestras Naturales (40° 35' 23,4" N; 6° 29' 53,6" O). Las segundas fueron tomadas de plantas influenciadas por la proximidad de ambientes ribereños, las cuales estaban localizadas en la llanura de inundación del río Águeda, denominadas en adelante como muestras Ribereñas (40° 34' 51,5" N; 6° 30' 42,2" O). Las terceras fueron tomadas de plantas influidas por actividades humanas que estaban localizadas en el margen de campos de cultivos, denominadas en adelante como muestras Humanizadas (40° 35' 27,7" N; 6° 29' 51,4" O) (Figura 9). Para todas las plantas, el muestreo consistió en la toma de muestras de raíces, tallos y hojas (Tabla 3). Las muestras de los tallos y de las hojas se recogieron empleando tijeras de podar, previamente esterilizadas con etanol al 70% (v/v). Del mismo modo, las muestras de las raíces fueron recogidas usando una azada previamente esterilizada. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones asépticas y a temperatura estable, reduciendo en todo momento la manipulación, para que la microbiota no fuese alterada.



Figura 9. Representación geográfica de Ciudad Rodrigo en España y de los lugares de las tomas de muestras. El punto azul muestra la localización de las muestras Naturales, el punto rojo muestra la localización de las muestras Humanizadas y el punto azul muestra la localización de las muestras Ribereñas.

Tabla 3. Resumen de la nomenclatura de las muestras.

Muestras	Tejido	Condiciones de crecimiento	Coordenadas
RS	Raíz	Natural	40° 35' 23,4" N; 6° 29' 53,6" O
SS	Tallo	Natural	40° 35' 23,4" N; 6° 29' 53,6" O
LS	Hoja	Natural	40° 35' 23,4" N; 6° 29' 53,6" O
RR	Raíz	Ribereña	40° 34' 51,5" N; 6° 30' 42,2" O
SR	Tallo	Ribereña	40° 34' 51,5" N; 6° 30' 42,2" O
LR	Hoja	Ribereña	40° 34' 51,5" N; 6° 30' 42,2" O
RH	Raíz	Humanizada	40° 35' 27,7" N; 6° 29' 51,4" O
SH	Tallo	Humanizada	40° 35' 27,7" N; 6° 29' 51,4" O
LH	Hoja	Humanizada	40° 35' 27,7" N; 6° 29' 51,4" O

3.1.2. Extracción del ADN y secuenciación de los amplicones.

Las muestras de las plantas fueron esterilizadas en superficie antes de la extracción del ADN. En primer lugar, realizamos pruebas con diferentes protocolos de extracción de ADN para asegurar la máxima eficiencia, siendo el kit DNeasy PowerSoil el más efectivo. La extracción total del ADN fue realizada con el kit DNeasy PowerSoil (Qiagen, Germantown, MD, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el paso de la lisis, usamos el FastPrep-24 TM 5G (Thermo Scientific™), empleando un programa de tres pulsos de 40 segundos a 60 m/s. La concentración del ADN purificado fue medida con el Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Scientific™).

Los análisis de *metabarcoding* del ADN fueron llevados a cabo utilizando el kit 16S Ion Metagenomics Kit (Thermo Scientific™), y la preparación de la biblioteca se basó en dos grupos de *primers* dirigidos a siete regiones hipervariables diferentes (grupo de *primers* V2-V4-V8 y V3-V6-V7-V9) del gen ARNr 16S. La secuenciación fue realizada empleando un secuenciador Ion GeneStudio S5 (Thermo Scientific™).

3.1.3. Análisis bioinformático.

3.1.3.1. Procesamiento de las lecturas.

El análisis bioinformático fue realizado en las lecturas agrupadas como lo indica el procedimiento habitual del enfoque de múltiples amplicones. Los *primers* fueron eliminados recortando 20 nucleótidos en ambos extremos utilizando el complemento *cutadapt* en *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2* (QIIME2) v2020.08 (Bolyen *et al.*, 2019; Martin, 2011). Para la eliminación de las quimeras y el emparejamiento de las lecturas, usamos el complemento *qiime dada2*. Para la clasificación taxonómica de las *Amplicon Sequence Variants* (ASV), se usó el complemento *classify-consensus-blast* que utiliza SILVA SSU v138.1 como base de datos de referencia (Quast *et al.*, 2013). A continuación, usamos la aplicación *online* Calypso para escalar la suma total normalizada (TSS) para las diferencias de tamaño de la librería, lo que permite procesar la tabla de abundancia de taxonomía en diferentes niveles taxonómicos (Zakrzewski *et al.*, 2017). Los taxones con un promedio inferior a 10 lecturas en las muestras fueron eliminados de los análisis posteriores. Tras la clasificación taxonómica, las lecturas identificadas como

cloroplastos y mitocondrias también fueron eliminadas. Las lecturas fueron depositadas en NCBI bajo el código de acceso SRA: PRJNA981419.

3.1.3.2. Análisis de la diversidad de las muestras.

Las diversidades alfa y beta fueron calculadas utilizando la tabla de ASVs con una similitud del 97%. La riqueza de la comunidad (índice de ASV observados, índice Chao1 e índice ACE), la diversidad (índice de Shannon y el índice de Simpson) y la uniformidad (*evenness*) fueron calculados utilizando el paquete *vegan* de Rstudio (versión 4.1.2.) (www.r-project.org). Las comparaciones múltiples de las abundancias de los taxones y los índices de diversidad alfa entre muestras de grupos fueron calculadas con la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba *posthoc* empleada fue la prueba de Dunn por pares con 5% de significancia y usando el ajuste de Bonferroni, lo que permitió determinar qué niveles de la variable independiente diferían entre sí. Todas estas pruebas estadísticas fueron llevadas a cabo con el programa Rstudio (versión 4.1.2.). Las comparaciones de la diversidad beta de los tratamientos se realizaron siguiendo el método de Bray del paquete *vegan* de R (www.r-project.org) (Bray, 1957) y la prueba de ANOVA de permutación (pseudo-F, 999 permutaciones) fue usada para comparar las distancias de Bray-Curtis.

3.1.3.3. Determinación de los ASVs compartidos y diferencias en la abundancia de los taxones bacterianos.

Los enriquecimientos específicos de los taxones bacterianos fueron comparados en tres bloques de dos a dos: raíces vs tallos; tallos vs hojas; raíces vs hojas. El análisis de la composición de los microbiomas fue realizado con ANCOM (Böhm, *et al.*, 2007). El análisis del microbioma *core* fue realizado con el programa *online* MicrobiomeAnalyst 2.0. (<https://www.microbiomeanalyst.ca>).

3.1.3.4. Predicción del metagenoma bacteriano.

Las rutas metabólicas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) asociados a las secuencias del gen ARNr 16S de los endófitos fueron predichas usando el programa PICRUSt2 v2.5.1 (*Phylogenetics Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) (Douglas *et al.*, 2020). Los resultados fueron visualizados con MicrobiomeAnalyst 2.0. (Dhariwal *et al.*, 2017).

3.2. AISLAMIENTO.

Los microorganismos empleados en este estudio fueron aislados del interior de muestras de la raíz y el tallo de plantas salvajes de zarzamora (*Rubus ulmifolius* Schott) situadas en Ciudad Rodrigo (40° 35' 23,4" N; 6° 29' 53,6" O, Salamanca, España). La recogida de las muestras fue realizada como se especifica en el apartado 3.1.1.

Para evitar el aislamiento de algún microorganismo no endofítico, se llevó a cabo una esterilización superficial que consistió en cortar las muestras de las raíces y de los tallos en trozos de un tamaño aproximado de 10 cm. Estos fragmentos fueron lavados con

agua destilada estéril y sometidos a una primera inmersión con etanol al 70% (v/v) durante un minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 3,7% (NaClO) durante tres minutos. Posteriormente, el exceso de NaClO fue eliminado con cinco lavados de agua destilada estéril. Para comprobar que la esterilización había sido exitosa, el agua del último lavado fue sembrada en placas con medio TSA (*Trypto-Casein Soy Agar*) (Tabla 4).

Tabla 4. Composición del medio TSA.

TSA (<i>Trypto-Casein Soy Agar</i>)	g/L
Peptona de caseína	15
Peptona de soja	5
NaCl	5
Agar	15

Una vez esterilizadas las muestras, fueron colocadas en tubos Falcon estériles que contenían 15 mL de agua destilada estéril. El contenido fue machacado con varillas de vidrio hasta conseguir una masa homogénea de la porción vegetal. A continuación, fueron mantenidos en agitación a 160 r.p.m., durante 1 hora y con una inclinación de 45°.

Finalmente, realizamos diluciones seriadas de la suspensión y sembramos 100 µL de las diluciones de 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en placas Petri con medios TSA e YMA (*Yeast Mannitol Agar*) (Tabla 5). Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 24 - 48 horas. Pasado ese tiempo, un total de 70 colonias fueron seleccionadas y aisladas mediante la técnica de agotamiento en estría, hasta que se obtuvieron los cultivos puros.

Tabla 5. Composición del medio YMA.

YMA (<i>Yeast Mannitol Agar</i>)	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄	0,2
NaCl	0,1
Manitol	10
Extracto de levadura	0,2
Agar	20

Para su uso rutinario, las cepas aisladas en el medio TSA fueron mantenidas en el mismo medio, mientras que las cepas aisladas en el medio YMA fueron mantenidas en medio TY (Tabla 6), conservándolas a 4 °C. A largo plazo, la conservación de las cepas fue llevada a cabo mediante criopreservación a -80 °C, utilizando una solución crioprotectora estéril de glicerol al 25% en criotubos de 2 mL. A partir de los cultivos crecidos en medio TSA o YMA durante 5 días a 28°C, preparamos suspensiones celulares de cada uno de los aislados en agua destilada estéril, añadiendo 500 µL de la suspensión a cada criotubo de glicerol. Cada una de las cepas fue preservada por duplicado.

Tabla 6. Composición del medio TY.

TY (<i>Tryptone Yeast</i>)	g/L
Cl ₂ Ca	0,9
Triptona	5
Extracto de levadura	3
Agar	15

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.

3.3.1. Extracción y purificación del ADN.

A partir de los cultivos puros crecidos durante 48 horas a 28°C, se extrajo el ADN de cada aislado utilizando el kit REDExtract-N-Amp Plant PCR kit (Sigma-Aldrich®, Alemania). Las células fueron resuspendidas en 100 µL de la solución de extracción y, tras una agitación en vórtex, los tubos fueron incubados durante 10 minutos a 95°C en un termoblock (J.P-Selecta™, España). Transcurrido este tiempo, añadimos 100 µL de la solución de dilución y centrifugamos a 6.000 r.p.m. durante 4 minutos en una centrífuga 5417C (Eppendorf®, Alemania) a temperatura ambiente. A continuación, se recogieron 100 µL del sobrenadante y se pasaron a un nuevo tubo tipo Eppendorf, al que se le añadió 400 µL de agua destilada estéril. La solución fue conservada a -20°C.

3.3.2. Identificación de los perfiles de MALDI-TOF.

A partir de los cultivos puros de las bacterias aisladas, la extracción de proteínas fue realizada según el protocolo proporcionado por Bruker Daltonics GmbH (Alemania). Las colonias al comienzo de la fase exponencial (24 horas) fueron tomadas y medidas en tubos tipo Eppendorf que contenían 300 mL de agua MilliQ estéril y 900 µL de etanol. Los tubos fueron centrifugados a velocidad máxima (15.500 r.p.m.) durante 2 minutos. El sobrenadante fue descartado y al precipitado seco se le agregaron 50 µL de ácido fórmico (70% v/v). A continuación, se resuspendieron usando un vórtex y se agregaron 50 µL de acetonitrilo. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo durante 2 minutos y 1 µL del sobrenadante fue transferido a los pocillos de la placa de ionización hasta conseguir la evaporación del solvente. Finalmente, cada pocillo fue cubierto con 1 µL de la solución matriz (ácido α -hidroxicinámico-HCCA) y secado nuevamente. Los espectros de proteínas de las cepas aisladas fueron obtenidos utilizando el espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics GmbH, Alemania) entre 2-20 kD de forma automática. Para la calibración utilizamos los estándares proporcionados por la casa comercial (BTS): RL36, 4365,3Da; RS22, 5096,8Da; RL34, 5381,4Da; RL33meth, 6255,4Da; RL29, 7274,5Da; RS19, 10300,1Da; ARNasa A, 13683,2Da y mioglobina, 16952,3Da. Los espectros fueron analizados utilizando el programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Alemania) y comparados con una librería de referencia de la base de datos MALDI Biotyper 3.0 y con una base de datos propia del género *Rhizobium* y otros géneros afines publicada previamente (Ferreira *et al.*, 2011). Según las instrucciones del fabricante, una puntuación $\geq 2,3$ indica una identificación de especie altamente probable, una puntuación entre $< 2,3$ y $\geq 2,0$ indica una identificación probable

de la especie, una puntuación entre $<2,0$ y $\geq 1,7$ indica una identificación probable del género y una puntuación $<1,7$ indica que no hay identificación (Gonçalves *et al.*, 2022).

3.3.3. Amplificación del ADN mediante PCR.

Los reactivos y las concentraciones son mostrados en la Tabla 7 y las condiciones de PCR en la Tabla 8. La amplificación del gen fue llevada a cabo con los *primers* específicos (Tabla 9).

Tabla 7. Reactivos y cantidades para una reacción de PCR.

Reacciones de PCR	
Red mix PCR (Sigma-Aldrich®, Alemania)	10 μ L
Primer específico x2	2,5 μ L
H ₂ O	5 μ L
ADN molde	2 μ L

Tabla 8. Etapas de la PCR, temperaturas y tiempos.

Método		Amplificación 16S	
Predesnaturalización		9' a 95 °C	
35 ciclos	Desnaturalización	1' a 94 °C	
	Anillamiento	1' a 45 °C	1' 30'' a 55 °C
	Extensión	2' a 72 °C	
Extensión final		7' a 72 °C	

Tabla 9. *Primers* usados para la secuenciación del gen ARNr 16S.

Secuenciación	<i>Primers</i>	Secuencia	Posición	Referencia
Gen ribosómico 16S	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8 - 27	(Rivas <i>et al.</i> , 2002)
	1522R	5' -AAGGAGGTGATCCANCCRCA- 3'	1503-1522	

3.3.3.1. Electroforesis.

La comprobación de la amplificación fue llevada a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tampón utilizado para la preparación de los geles, así como para la electroforesis, fue el TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, Millipore). Como marcador de pesos moleculares se utilizó el “GeneRuler 1 kb ladder” (Thermo Scientific™) en las proporciones que marca el fabricante. Las condiciones de las electroforesis fueron de 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 MIDORI^{Green} Advance (NIPPON Genetics EUROPE, Alemania), al 0,002%. Los resultados fueron visualizados con luz U.V. utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad™, EEUU).

3.3.3.2. Secuenciación.

Comprobada la amplificación, el producto de PCR fue purificado usando el kit *GeneJET Gel Extraction Kit and DNA Cleanup Micro Kit* de QUIAGEN® siguiendo las instrucciones del protocolo comercial.

Los fragmentos de ADN obtenidos fueron secuenciados en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca utilizando el kit *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* y el equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem, EE.UU.). Los *primers* usados para la secuenciación fueron el *primer* 800R (5' TACCAGGGTATCTAATCC 3') y el *primer* 1522R (Chávez Díaz *et al.*, 2013; Raúl Rivas *et al.*, 2001). Los fragmentos generados de una misma secuencia fueron ensamblados mediante el programa SeqMan II. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), usando la herramienta BLASTn versión 2.0. (*Basic Local Alignment Search Tool*) y seleccionando *type material* como condición de búsqueda.

3.3.3.3. Análisis filogenético de las secuencias genéticas.

Para el análisis filogenético, las secuencias de las cepas del estudio, junto con las de las cepas de referencia pertinentes en cada análisis, fueron alineadas mediante el programa Clustal W (Chenna *et al.*, 2003) y, utilizando el programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Los árboles filogenéticos fueron construidos, empleando el método *Neighbour-Joining*, el coeficiente de Kimura 2 y seleccionando un *bootstrap* de 1000 (Kimura, 1980; Saitou y Nei, 1987).

3.3.4. Estudio de los genomas.

Para la extracción del ADN genómico se usó el kit “ZR Fungal/Bacterial ADN MiniPrep (Zymo Research™) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN fue conservado a -20°C. La secuenciación fue llevada a cabo utilizando la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas mediante Velvet 1.2.10 en base Linux (Zerbino y Birney, 2008) y la anotación fue llevada a cabo utilizando el programa RAST 4.0 (<http://rast.theseed.org>) que permite la anotación automática de los genomas obtenidos (Overbeek *et al.*, 2014). Los genomas anotados también fueron analizados con las herramientas *online* antiSMASH, para la búsqueda de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios, y PLaBase, para la búsqueda de genes relacionados con las interacciones entre las plantas y los microorganismos (Patz *et al.*, 2021; Weber *et al.*, 2015). El software BUSCO Versión 5.5.0 (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) fue usado para evaluar la completitud de los genomas ensamblados. Para ello, se seleccionó manualmente el linaje más cercano para realizar la comparación del genoma y se utilizaron los parámetros de búsqueda por defecto (Manni *et al.*, 2021; Simão *et al.*, 2015). El software CheckM versión 1.2.3. fue usado para evaluar el grado de contaminación de los genomas (Parks *et al.*, 2015).

3.3.4.1. Herramientas de comparación de genomas.

Para la comparación de los genomas se usó el cálculo de la Identidad media de nucleótidos (*Average Nucleotide Identity*, ANI) y la hibridación digital DNA-DNA

(dDDH), la cual sustituye a la hibridación DNA-DNA realizada habitualmente en laboratorio. El cálculo de ANI utilizando BLAST (ANIb) se llevó a cabo utilizando la plataforma *online* JspeciesWS (Richter *et al.*, 2016). Los porcentajes de similitud superiores al 95% indican que los genomas pertenecen a la misma especie. El cálculo del valor de la Hibridación digital DNA-DNA (dDDH) fue llevado a cabo utilizando la plataforma bioinformática *Type (Strain) Genome Server* (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de>) usando el método *Genome-BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) (Meier-Kolthoff y Göker, 2019), que permite comparar la secuencia de los genomas de las distintas cepas aisladas y de los genomas de las cepas tipo de especies filogenéticamente próximas a ellos.

3.3.4.2. Análisis filogenómicos de las secuencias genómicas.

La construcción de filogramas fue llevada a cabo en el *Type Strain Genome Sever* (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de>), a partir de los datos de hibridación digital DNA-DNA obtenidos por el método *Genome-BLAST Distance Phylogeny* (Meier-Kolthoff y Göker, 2019). Las distancias intergenómicas resultantes fueron usadas para inferir un filograma de evolución mínimo equilibrado con soporte de ramas (Lefort *et al.*, 2015). Los cálculos fueron apoyados en el cálculo de 100 réplicas de *pseudo-bootstrap* cada uno.

3.4. ANÁLISIS TAXONÓMICO DE LA CEPA CRRU44.

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

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

El API 20NE contiene 20 pocillos con medios deshidratados que permiten evaluar la presencia o ausencia de actividades metabólicas. Los ocho primeros pocillos corresponden con reacciones en las que los resultados son visualizados en función del color. Los 12 últimos pocillos son reacciones cuyos resultados son visualizados en función de la turbidez. El API ZYM contiene 20 pocillos donde en el fondo están un sustrato y su tampón.

3.4.2. Análisis quimiotaconómicos.

Para llevar a cabo estos análisis, la cepa CRRU44 fue incubada en placas de YMA a 28 °C durante 48 h. Las células fueron recogidas con agua destilada estéril y centrifugadas a 8.000 r.p.m. durante 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, las células fueron congeladas a -80 °C y posteriormente liofilizadas. Los análisis de las quinonas y de los ácidos grasos fueron realizados en el Servicio de Identificación de la DSMZ (Colección Alemana de Cultivos Tipo). Las quinonas fueron analizadas 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, siguiendo las instrucciones técnicas de este sistema (Sasser, 2001).

3.5. ENSAYOS *IN VITRO* CON LAS CEPAS AISLADAS.

3.5.1. Determinación las condiciones óptimas de crecimiento.

La determinación de las condiciones óptimas de temperatura, salinidad y pH fueron evaluadas. Para ver la capacidad de los microorganismos de crecer a diferentes temperaturas, estos fueron inoculados en placas de medio TSA o YMA, dependiendo de en qué medio fueron aislados, e incubados a 4 °C, 10 °C, 37 °C y 42 °C. El crecimiento en las placas fue observado a las 72 horas en las placas incubadas a 37 °C y 42 °C, y a los 7 días en las placas incubadas a 5 °C y 10 °C.

La capacidad de las cepas para crecer a diferentes concentraciones de cloruro sódico fue determinada usando los medios base, TSA o YMA, suplementados con NaCl en las concentraciones correspondientes a los porcentajes 1%, 2,5%, 5% y 7% (p/v). El crecimiento en las placas fue observado a las 72 horas.

Para la determinación del pH óptimo, los medios base TSA o YMA fueron ajustados a pH 4,5; 5,5; 6,5; 8 y 9 mediante el uso de tampones. Para obtener los medios de cultivo con un pH inferior a 7, se utilizaron mezclas de dos soluciones en diferentes concentraciones (Tabla 10). En el caso de los medios de cultivo con pH superiores a 7, se utilizaron mezclas de otras dos soluciones en diferentes concentraciones que fueron añadidas a los medios bases (Tabla 11).

Tabla 10. Soluciones para los medios de pH ácido.

pH	Ácido cítrico 0,2 M (monohidratado)	Na ₂ HPO ₄ 0,4 M (deshidratado)
4,5	54,6 mL	45,4 mL
5,5	43,1 mL	56,9 mL
6,5	29 mL	71 mL

Tabla 11. Soluciones para los medios de pH básico.

pH	HCl 0,2 M	Tris 0,2 M
8	29,2 mL	Completar hasta 50 mL
9	0,2 mL	Completar hasta 50 mL

Todas las soluciones fueron autoclavadas durante 15' a 121 °C. Posteriormente fueron mezcladas en las cantidades indicadas según el pH deseado, y la mezcla fue vertida sobre 100 mL de medio estéril de TSA o YMA al doble de su concentración habitual en el caso de las soluciones para la obtención de los medios con los pH ácidos, y sobre 50 mL de medio estéril de TSA o YMA al doble de su concentración habitual en el caso de las soluciones para la obtención de los medios con los pH básicos.

En todos los casos, la inoculación fue realizada utilizando un hisopo estéril con el fin de homogeneizar la cantidad de microorganismos sembrada y evitar falsos positivos. El crecimiento fue considerado un resultado positivo, mientras que la ausencia de crecimiento indicó un resultado negativo, siempre y cuando hubiese un correcto crecimiento en la placa control, que estaba a una temperatura de 28 °C, 0% de salinidad y pH 7,2.

3.5.2. Determinación las capacidades de promoción del crecimiento vegetal.

El estudio de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal incluyó el crecimiento en medios libres de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la solubilización de compuestos de potasio, la producción de sideróforos, la producción presuntiva de auxinas y la síntesis de la enzima ACC desaminasa. Para la evaluación de todas estas actividades, partimos de un cultivo puro de las bacterias cultivadas durante 5 días a 28°C en medio TSA o YMA; a partir de los cuales se realizaron suspensiones en agua destilada estéril a una densidad aproximada de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland.

3.5.2.1. Solubilización de compuestos de fósforo.

La capacidad de solubilización del fosfato inorgánico fue estudiada utilizando el medio Pikovskaya como medio base (Tabla 12) (Pikovskaya, 1948), suplementada con fosfato bicálcico (Ca_2PO_3) y fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$). Esta capacidad también fue evaluada en el medio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*), que tiene como base la hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) (Tabla 13), un compuesto de fosfato difícil de solubilizar (Nautiyal, 1999). Las placas fueron inoculadas con 5 μL de la suspensión bacteriana.

Tabla 12. Componentes del medio Pikovskaya.

Medio Pikovskaya	g/L
Extracto de levadura	0,5
Glucosa	10
(Ca_2PO_3) o ($\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$)	5
(NH_4) ₂ SO ₄	0,5
KCl	0,2
MgSO ₄	0,1
MnSO ₄ (H ₂ O)	0,0001
FeSO ₄	0,0001
Agar	20

Tabla 13. Componentes del medio NBRIP.

Medio NBRIP	g/L
Glucosa	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
KCl	0,2
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25
Hidroxiapatita	5
Agar	20

3.5.2.2. Solubilización del compuesto de potasio.

La capacidad de solubilización del compuesto de potasio fue estudiada utilizando el medio Aleksandrov, que contiene silicato de potasio y aluminio (AlK₂O₆Si₂) (Aleksandrov, *et al.*, 1967) (Tabla 14). Las placas fueron inoculadas con 5 µL de suspensión bacteriana.

Tabla 14. Composición del medio Aleksandrov

Medio Alexandrov	g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
CaCO ₃	0,1
AlK ₂ O ₆ Si ₂	2
Glucosa	5
FeCl ₃	0,005
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2
Agar	20

3.5.2.3. Producción de sideróforos.

Para identificar qué cepas eran capaces de producir sideróforos, se utilizó el medio M9-CAS-Agar, el cual es una modificación del medio CAS-Agar (Schwyn y Neilands, 1987). La modificación consistió en la adición de hexadeciltrimetilamonio bromuro (HDTMA) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Alexander y Zuberer, 1991). El medio M9-CAS-AGAR fue preparado partiendo de cuatro soluciones diferentes, esterilizadas de forma individual y mezcladas posteriormente:

- Solución 1: esta solución fue preparada mezclando 10 mL de FeCl₃·6H₂O (1 mM) disueltos en HCl (10 mM), con una solución acuosa de 50 mL de CAS (Cromoazurol S, 1,21 mg/mL). La solución resultante fue mezclada con 40 mL de una solución acuosa de HDTMA (1,82 mg/mL).
- Solución 2: solución salina (Tabla 15) a la que posteriormente añadimos la solución PIPES (piperazina-N,N'-bis[ácido 2-ethanesulfónico]). El pH fue ajustado a 6,8.

Tabla 15. Componentes de la solución 2 del medio M9-CAS-Agar.

Solución 2	g/L
PIPES	30,24 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
Agar	15 g

- Solución 3: los ingredientes son mostrados en la Tabla 16.

Tabla 16. Componentes de la solución 3 del medio M9-CAS-Agar.

Solución 3	
Sacarosa	2,0 g
Manitol	2,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	493,0 mg
CaCl ₂	11,0 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	70 mL

- Solución 4: dilución de 30 mL de cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de la caseína) al 10% (p/v), esterilizada mediante filtración con una membrana de 0,22 µm (Millipore®, Amicon, EEUU).

Una vez preparadas todas las soluciones, fueron esterilizadas en autoclave. Posteriormente, cuando la temperatura de los medios hubo descendido a 50 °C, las soluciones fueron mezcladas, siendo la solución 4 la última en ser añadida. Las placas fueron inoculadas con 5 µL de suspensión bacteriana.

3.5.2.4. Producción presuntiva de auxinas y de ácido indol acético.

La capacidad presuntiva de las diferentes cepas para producir auxinas fue evaluada utilizando el medio JMM (John Howieson *minimal medium*) (O'Hara *et al.*, 1989) para las cepas pertenecientes al género *Rhizobium* o JMM-DF sales (Flores-Félix *et al.*, 2018) (Tablas 17) para el resto de los endófitos. Todos los ingredientes fueron mezclados, dispensados en viales (3 mL por vial) y autoclavados, a excepción de la solución de vitaminas que fue preparada por separado (Tabla 18). Para la preparación de la solución de vitaminas todos los ingredientes fueron disueltos en Na₂HPO₄ a 0,05M (pH 7,0) y esterilizados por filtración con una membrana de 0,22 µm (Millipore®, Amicon, EEUU). Los medios fueron suplementados con triptófano, a una concentración final de 0,165 g/L. Para facilitar la suplementación, se preparó una solución stock de triptófano al

100X, esterilizada por filtración con una membrana de 0,22 μm (Millipore®, Amicon, EEUU). Un total de 30 μL fueron añadidos a cada vial. La solución stock fue almacenada a una temperatura de 4°C.

Tabla 17. Componentes del medio JMM y JMM-DF sales.

Medios	JMM	JMM-DF sales
D-(+)-galactosa	1,8 g	-
L-(+)-arabinosa	1,5 g	-
Glucosa	-	4,0 g
Manitol	-	8,0 g
Piruvato	$147 \cdot 10^{-3}$ g	4,0 g
K_2HPO_4	$26,1 \cdot 10^{-3}$ g	0,6 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	-	0,4 g
NaCl	-	0,2 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$ g	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$147 \cdot 10^{-3}$ g	-
Solución de vitaminas (Tabla 18)	1,0 mL	1,0 mL
Solución de elementos traza (Tabla 19)	-	1,0 mL
H_2O destilada	1 L	1 L

Tabla 18. Solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	mg/L
Riboflavina	20
Ácido P-amino benzoico	20
Ácido nicotínico	20
Biotina	20
Tiamina-HCl	20
Piridoxina-HCl	20
Pantotenato cálcico	20
Inositol	120

El medio JMM-DF sales incluye además una solución de elementos traza (Tabla 19). Para esta solución, los ingredientes fueron disueltos en agua destilada, ajustando el pH a 5,0 y añadiendo EDTA 1 g/L.

Tabla 19. Solución de elementos traza.

Composición Solución de elementos traza	mg/L
H_3BO_3	145
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	125
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	59
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	108
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125

Los medios se inocularon con un volumen de 3 μL de la suspensión bacterianas y se incubaron a 28 °C durante 72 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo, tomamos 1,5 mL de cada vial y los pasamos a un tubo tipo Eppendorf para poder centrifugarlos a 14.000 r.p.m. durante 1 minuto. A continuación, recogimos 1 mL del sobrenadante y lo añadimos a tubo de medición de espectrofotometría, al que se le añadieron 500 μL del agente Salkowsky en la proporción 2:1 (Tabla 20). Tras aproximadamente 20 minutos, los medios tornaron a un color rosado o rojizo en función de la concentración de auxinas 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. La concentración de auxinas fue extrapolada a partir de la absorbancia obtenida mediante la recta patrón: $y = 2,4637 \cdot x + 0,0053$ (donde: y = Absorbancia, x = Concentración en mg/L).

Tabla 20. Solución del Agente Salkowsky.

Agente Salkowsky	
FeCl ₃ (0,5 M)	20 mL
HClO ₄ (35% v/v)	980 mL

Por otro lado, la producción de ácido 3-indolacético (AIA) también fue determinada en las cepas seleccionadas. Para ello, usamos la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (*High-Performance Liquid Chromatography* o HPLC). A partir del crecimiento obtenido en los medios JMM o JMM-DF sales, tomamos 1 mL de cada vial, el cual fue filtrado con una membrana de 0,22 μm (Millipore®, Amicon, EEUU) y analizado por HPLC para obtener la concentración del AIA. La medida fue llevada a cabo en el Servicio Análisis Elemental, Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca.

3.5.2.5. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.

La capacidad de los endófitos de crecer en medios libres de nitrógeno fue llevada a cabo utilizando el medio JMM-DF sales (Tabla 17) sin añadir ninguna fuente de nitrógeno y añadiendo metavanadato (0,1 g/L). El medio fue dispensado en tubos (7 mL por tubo) y autoclavados. Posteriormente, se añadió la solución de vitaminas, tal y como se indica en el apartado 3.5.2.4. Los tubos fueron inoculados con 7 μL de las suspensiones bacterianas. En paralelo, se utilizó como control positivo el medio suplementado con 0,4 g/L de NH₄NO₃ como fuente de nitrógeno. Los tubos fueron incubados durante tres semanas a 28 °C. A partir de los tubos donde se observó crecimiento, se transfirieron 100 μL a un nuevo tubo. Este proceso fue repetido una vez más. Tras este tercer pase, observamos la densidad óptica a 600 nm. Aquellos tubos que presentaron una densidad óptica igual a la de los controles positivos, fueron consideradas como resultados positivos en la evaluación del crecimiento en los medios libres de nitrógeno.

3.5.2.6. Utilización del ACC desaminasa

La detección de la actividad ACC (1-Aminociclopropano-1-ácido carboxílico) desaminasa fue evaluada usando siete medios diferentes que tienen como base el medio mínimo (Tabla 21), y se diferencian en algunos componentes (Tabla 22). La concentración final de ACC en los medios es de 0,003 M.

Tabla 21. Composición del medio mínimo.

Medio mínimo	g/L
K ₂ HPO ₄	0,30
KH ₂ PO ₄	0,30
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,05
NaCl	0,10
NH ₄ NO ₃	0,10
Manitol	10,00

Tabla 22. Combinación de fuentes de carbono y nitrógeno en los siete medios mínimos necesarios para la evaluación de ACC desaminasa.

Medios ACC	Variables
M1	Con N, sin manitol, con ACC
M2	Sin N, sin manitol, con ACC
M3	Sin N, con manitol, con ACC
M4	Con N, con manitol, con ACC
M5	Sin N, sin manitol, sin ACC
M6	Con N, con manitol, sin ACC
M7	Con N, sin manitol, sin ACC

El pH del medio fue ajustado a 6,8 utilizando soluciones de K₂HPO₄ o KH₂PO₄ (0,02 M) en función de las necesidades de cada caso. Tras el autoclavado, se añadió 1 mL/L de la solución de vitaminas (Tabla 18) y 1 mL/L de la solución de elementos traza (Tabla 19). Una vez preparados, 200 µL de cada medio fueron distribuidos en un pocillo de una placa multipocillo de 96. A continuación, 10 µL de la suspensión bacteriana fueron inoculados en cada uno de los medios. La placa fue incubada a 180 r.p.m. a 28 °C durante siete días. Finalizado el periodo de incubación, la densidad óptica fue medida a 600 nm de la placa con un lector de placas Asys UVM-340 (Biochron®, Reino Unido).

3.5.3. Caracterización fenotípica de las capacidades antifúngicas.

El estudio *in vitro* de la antibiosis de las cepas seleccionadas frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* fue llevado a cabo siguiendo dos metodologías diferentes. Por una parte, analizando la inhibición mediada por la producción de compuestos difusibles y, por otra parte, la inhibición mediada por la producción de compuestos orgánicos volátiles. Para la evaluación de estas actividades, partimos de un cultivo puro de las bacterias cultivadas durante 5 días a 28 °C en medio TSA o YMA, a partir de los

cuales ser realizaron suspensiones en agua destilada estéril a una densidad aproximada de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland.

3.5.3.1. Obtención del hongo *Botrytis cinerea*.

La cepa *Botrytis cinerea* CECT 20973 fue obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo. La cepa liofilizada fue resuspendida en agua destilada estéril, sembrada en placas de PDA (Tabla 23) e incubada a 25 °C.

Tabla 23. Composición del medio PDA.

PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>)	g/L
Dextrosa	20
Infusión de patata*	4
Agar	18

*Aproximadamente 200 g de infusión de patata

3.5.3.2. Inhibición del hongo *Botrytis cinerea* mediante la síntesis de compuestos antifúngicos difusibles.

Las bacterias fueron sembradas en el medio correspondiente (TSA o YMA), dibujando una línea en uno de los extremos de la placa, y fueron incubadas durante cinco días a 28 °C. Pasado este tiempo, en cada placa fue añadido un *plug* de una placa del hongo *Botrytis cinerea*, la cual fue previamente crecida durante 3 semanas. A continuación, las placas fueron incubadas a 25 °C durante cinco días.

3.5.3.3. Inhibición de *Botrytis cinerea* mediante la síntesis de compuestos antifúngicos difusibles.

Las Placas de Petri usadas para este ensayo estaban divididas por una barrera física que permitía el uso de dos medios de cultivo diferentes y que impedía el contacto físico entre los microorganismos sembrados a ambos lados. En uno de los lados, sembramos la bacteria de interés en su medio correspondiente (TSA o YMA) y en el otro compartimento fue colocado un *plug* del hongo *Botrytis cinerea* en el medio PDA. Estas placas fueron incubadas a 25 °C durante cinco días. Paralelamente, se realizó un control negativo con una placa en la que únicamente estaba el hongo. Este control fue usado para comparar el crecimiento de los hongos sembrados con las bacterias.

3.5.4. Caracterización de la producción de enzimas líticas.

El estudio de la producción de enzimas líticas fue llevado a cabo usando los medios de cultivo habituales suplementados con diferentes sustratos. En esta tesis se evaluaron enzimas que degradan tanto la pared celular de los hongos como los tejidos vegetales. Concretamente, se evaluaron la producción de amilasas, celulasas, β -glucosidasas, proteasas, quitinasas y xilanasas.

3.5.4.1. Amilasas.

Para la evaluación de esta actividad, el medio fue preparado a partir de dos soluciones independientes que fueron autoclavadas por separado (Tabla 24). Una vez autoclavadas, las soluciones se mezclaron cuando ambas alcanzaron una temperatura aproximada de 60 °C.

Tabla 24. Composición de las dos soluciones para el medio de producción de amilasas.

Solución 1		Solución 2	
Extracto de levadura	4 g	Almidón de patata	10 g
Agar	20 g	H ₂ O	500 mL
H ₂ O	500 mL		

Los microorganismos fueron incubados a 28 °C durante una semana. Pasado este tiempo, las placas fueron cubiertas con lugol. En presencia del almidón, el yodo que forma parte del lugol se intercala en la hélice del almidón creando un compuesto coloreado. Por el contrario, si las cepas son productoras de amilasas, el almidón habría sido degradado y no aparecería esta coloración.

3.5.4.2. Celulasas.

Para esta actividad se utilizó el medio TSA o YMA suplementado con celulosa al 0,1% (p/v). Los microorganismos fueron incubados a 28 °C durante una semana. Pasado este tiempo, las placas fueron teñidas con Rojo Congo, un colorante que se une a los enlaces α 1- \rightarrow 4 de la celulosa. Las placas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) y a continuación el exceso fue lavado tres veces con NaCl 1 M, manteniendo esta solución durante 15 minutos en cada lavado. Las zonas alrededor de las colonias productoras de esta enzima presentaron un halo clareado, indicando que el Rojo Congo no pudo unirse por la ausencia de la celulosa.

3.5.4.3. β -glucosidasas.

Esta actividad fue evaluada usando el medio EGA (*Esculin Glycerol Agar*), formulado en base a la esculina (Tabla 25). Las placas fueron inoculadas y dejadas crecer a 28 °C durante una semana. Pasado ese tiempo, las cepas productoras de β -glucosidasas presentaron un halo oscuro alrededor de la colonia.

Tabla 25. Composición del medio EGA.

Medio EGA	g/L
Esculina	1
FeCl ₃	0,3
Caseína	1
Extracto de levadura	25
Glicerol	8 mL/L
Agar	15

3.5.4.4. Proteasas.

Para evaluar esta actividad se usaron dos medios de cultivo diferentes. Las enzimas proteasas son capaces de degradar proteínas, pero debido a la amplia naturaleza de estos compuestos es preciso ampliar el número de sustratos para no obtener resultados sesgados. El primer medio evaluó la capacidad de hidrolizar las proteínas de la leche, para ello se prepararon dos soluciones independientes que se mezclaron después de autoclavar (Tabla 26).

Tabla 26. Composición de las dos soluciones para el medio 1 de producción de proteasas.

Solución 1		Solución 2	
Leche en polvo	20 g	Agar	16 g
H ₂ O	200 mL	H ₂ O	800 mL

El segundo medio evalúa la capacidad de hidrolizar las proteínas de la gelatina. Para este medio, 120 gramos de gelatina en polvo y 20 gramos de agar fueron añadidos en 1 L de agua destilada. En ambos casos, las cepas productoras de proteasas presentan un halo transparente alrededor de la colonia.

3.5.4.5. Quitinasas.

Para evaluar la actividad quitinolítica de las de bacterias, se utilizó el medio agar modificado con quitina coloidal (Tabla 27).

Tabla 27. Composición del medio para la evaluación de la producción de quitinasas.

Medio Quitinasas	g/L
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NH ₄ Cl	1
NaCl	0,5
Extracto de levadura	0,05
Agar	15
Quitina coloidal	1% (p/v)

La quitina coloidal se preparó a partir de quitina de origen crustáceo (Sigma-Aldrich®, Alemania) mediante el método modificado de Hsu y Lockwood (Hsu y Lockwood, 1975). El proceso consistió en añadir 40 g de quitina en polvo a 600 ml de HCl concentrado. Esta mezcla se mantuvo durante 60 minutos a 30 °C con agitación vigorosa. La quitina fue precipitando en forma de suspensión coloidal al añadir lentamente 2 L de agua a 4-10 °C. La suspensión fue recogida mediante filtración con succión sobre un papel de filtro grueso y fue lavada mediante suspensión en aproximadamente 5 L de agua destilada. El lavado se repitió 3 veces hasta que el pH de la suspensión fue 3,5. Después del tratamiento anterior, la quitina coloidal fue usada como sustrato.

3.5.4.6. Xilanasas.

Para esta actividad se utilizó el medio TSA o YMA suplementado con xilano al 0,1% (p/v). Los microorganismos fueron incubados a 28 °C durante una semana. Pasado este tiempo, las placas fueron teñidas con Rojo Congo, un colorante que se une a los enlaces α 1-3 del xilano. Las placas son incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) y a continuación el exceso fue lavado tres veces con NaCl 1 M, manteniendo esta solución durante 15 minutos en cada lavado. Las zonas alrededor de las colonias productoras de esta enzima presentaban un halo clareado, indicando que el Rojo Congo no pudo unirse por la ausencia del xilano.

3.5.5. Producción de *biofilms*.

El estudio de la formación de *biofilms* fue llevado a cabo utilizando la técnica de las placas *microtiter* descrita por Fujishige *et al.* (2006), la cual permite hacer un análisis cuantitativo de la producción de *biofilms*.

La técnica consistió en realizar un precultivo de las cepas en un medio líquido de crecimiento óptimo, en este caso se usó TSB (*Tryptic Soy Broth*) para las cepas aisladas en TSA, e YMB (*Yeast Mannitol Broth*) para las cepas aisladas en YMA, cuya composición es similar a los medios sólidos, pero sin añadir el agente gelificante. El precultivo fue incubado durante 72 horas a 28 °C, con una inclinación de 45° y en agitación a 180 r.p.m. hasta que el crecimiento bacteriano alcanzó una densidad óptica de D.O.₆₀₀ de 2. Cuando esta densidad óptica fue alcanzada, el precultivo se diluyó hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,2. A continuación, se añadieron 100 μ L de la solución con la bacteria en cada uno de los pocillos de una placa multipocillo de 96 pocillos. Por cada cepa se inocularon un total de ocho pocillos, y se dejaron libres los pocillos adyacentes para añadir el medio sin inocular, que sirvió de control negativo. Las placas fueron incubadas a 28°C. Las lecturas fueron realizadas a las 24, 48 y 72 horas.

Una lectura inicial fue realizada a D.O.₆₀₀ en cada uno de los tiempos. A continuación, realizamos una tinción para visualizar el *biofilm* formado en la parte inferior del pocillo. La tinción consistió en descartar el medio líquido, añadir 100 μ L de cristal violeta al 0,3% y esperar 10 minutos. Esta solución tiñó el *biofilm* y permitió su visualización. A continuación, para eliminar el exceso, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril de 5 minutos cada uno. Finalmente, añadimos 100 μ L de una solución de 80% etanol y 20% acetona durante 15 minutos. Esta solución despegó el *biofilms* de la superficie del pocillo, por lo que permitió medir la densidad óptica a 575 nm. En la finalización del ensayo, obtuvimos tres medidas indirectas (una a 24 h, otra a 48 y otra a 72 h) de la cantidad de *biofilm* producida por cada cepa. La absorbancia fue determinada con un lector de placas Asys UVM-340 (Biochron®, Reino Unido).

3.6. ENSAYOS EN PLÁNTULA EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

3.6.1. Preparación de las soluciones bacterianas.

Las bacterias seleccionadas fueron crecidas en placas con el medio en el que fueron aisladas, durante 48 horas a 28°C. Pasado este tiempo, se tomó biomasa con un asa de siembra y se resuspendió en 1 mL de PBS (*Phosphate Buffer Solution*, Tabla 28) hasta obtener una solución a una DO_{600nm} de 0,6. Esta solución fue usada para la inoculación de las bacterias sobre las plantas.

Tabla 28. Composición del PBS.

PBS (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)	g/L
KH ₂ PO ₄	0,210
NaCl	9,000
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0,726

3.6.2. Manejo del material vegetal.

3.6.2.1. Esterilización de las semillas.

Para los ensayos realizados en planta, las semillas fueron esterilizadas siguiendo un protocolo adaptado. Las semillas fueron sumergidas durante 30 segundos en etanol al 70% (v/v). Seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio al 3,7% (NaClO) durante cinco minutos y cinco lavados con agua destilada estéril. A continuación, fueron dejadas en imbibición durante una hora. Una vez completado este protocolo, las semillas fueron incubadas en placas de Agar-Agua al 0,7% (p/v) en oscuridad en la cámara iluminada durante 72 horas para su pregerminación.

3.6.2.2. Condiciones de la cámara iluminada.

En la cámara iluminada había una mezcla de luz incandescente y fluorescente (cantidad de luz de 400 $\mu\text{Einsteins} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 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 21 °C durante el día y la noche.

3.6.3. Preparación de la suspensión de esporas fúngicas.

El hongo *Botrytis cinerea* fue crecido en placas con medio PDA durante cinco semanas. Una vez el hongo hubo esporulado, se añadieron 5 mL de la solución estéril de peptona bacteriológica al 0,1% (p/v) suplementada con Tween 80 al 0,05% (v/v) (Sauceda-Gálvez *et al.*, 2019). El hongo fue obtenido mediante raspado con un asa de siembra estéril y recogido en un tubo de plástico de 10 mL.

Las esporas fueron contadas con una cámara de Thoma (BLAU BRAND, Alemania). Para ello, se añadieron 10 μL de la muestra preparada sobre el portaobjetos y se contaron las esporas de los 16 cuadrantes (Figura 10). Para obtener la concentración

real, se sumaron los conteos de los 16 cuadrantes y se multiplicó por el factor de dilución, que era 10^4 .

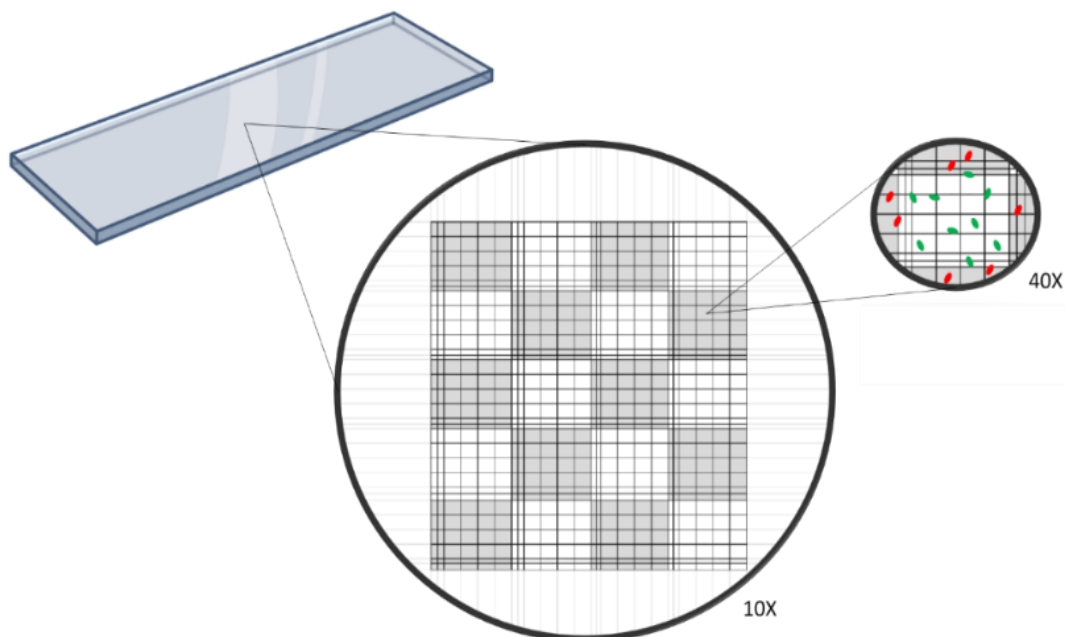


Figura 10. Visualización de los cuadrantes de la cámara Thoma en los aumentos 10X y 40X del microscopio.

3.6.4. Estudios de colonización en plántula.

3.6.4.1. Marcación bacteriana para localización en ensayos *in vivo*.

3.6.4.1.1. Conjugación de las cepas pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*.

Las cepas seleccionadas pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* fueron transformadas mediante conjugación biparental, usando como cepa donadora la bacteria *Escherichia coli* S17.1 (Sp^f/Sm^r) (Simon *et al.*, 1983) portadora del plásmido pHC60 (Figura 11) (Cheng y Walker, 1998). Este plásmido contiene los genes necesarios para su transferencia por conjugación y un fragmento que expresa constitutivamente una proteína fluorescente (*Green Fluorescent Protein* o GFP) y como marcador tiene un gen de resistencia a la tetraciclina (Tc).

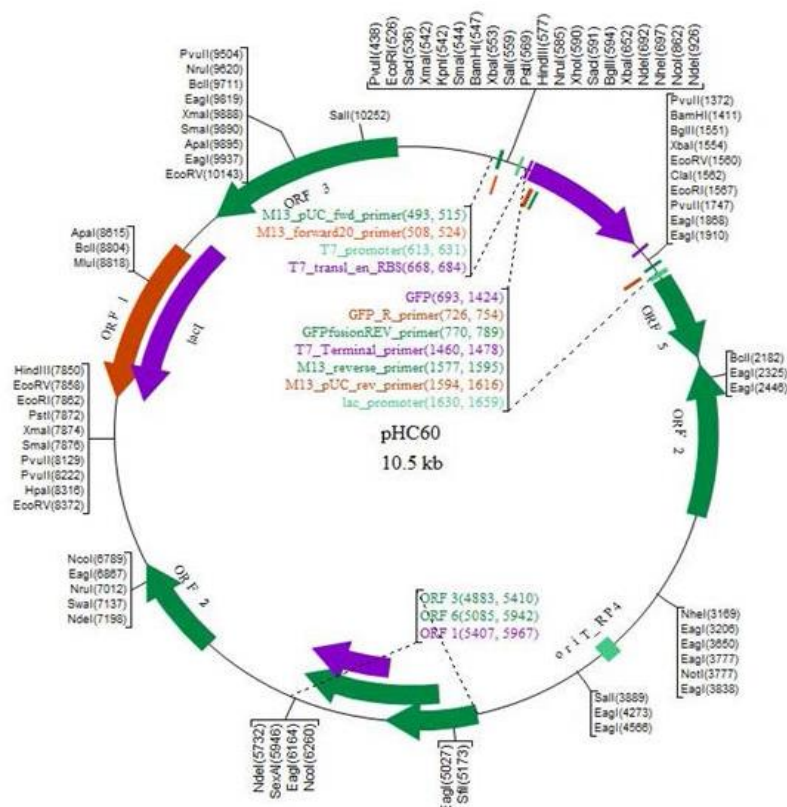


Figura 11. Representación del plásmido pHC60 (Sultana *et al.*, 2016).

Este ensayo fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio (García-Fraile *et al.*, 2012). Los medios suplementados con tetraciclina contenían una concentración de 10 µg/mL, que fue previamente esterilizada por filtración con una membrana de 0,22 µm (Millipore®, Amicon, EEUU).

Para llevar a cabo la conjugación, las cepas receptoras fueron crecidas en el medio TY a 28 °C durante 48 horas y la bacteria *Escherichia coli* pHC60 fue crecida en el medio LB (Luria-Bertani) (Tabla 29) con tetraciclina a una temperatura de 37 °C durante 24 h. Con un asa de siembra, se mezclaron pequeñas porciones de cada cultivo en medio TY sólido, por este orden: cepa receptora y cepa donadora (*Escherichia coli* pHC60) en la proporción 2:1 y realizando movimientos circulares. Estas placas fueron incubadas *overnight* a una temperatura de 28 °C. Al día siguiente, se realizó un agotamiento en estría en el medio mínimo (O’Gara y Shanmugam, 1976), suplementado con tetraciclina.

Tabla 29. Composición del medio LB.

LB (Luria-Bertani)	g/L
Triptona peptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5

Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta que aparecieron colonias aisladas con la morfología característica de las cepas seleccionadas (5-7 días). Una vez seleccionadas las colonias adecuadas, fueron sembradas simultáneamente en el medio mínimo sólido

suplementado con tetraciclina y en el medio VRBA (*Violet Red Bile Agar*, Scharlab™) (Tabla 30), incubando el primero a una temperatura de 28 °C y el VRBA a una temperatura de 37 °C. Este último medio de cultivo se utilizó para determinar la posible presencia de coliformes y facilitar la selección de cepas transformadas. Una vez comprobado que las cepas seleccionadas estaban libres de coliformes, fueron sembradas en el medio YMA suplementadas con tetraciclina.

Tabla 30. Composición del medio VRBA.

VRBA (<i>Violet Red Bile Agar</i>)	g/L
Extracto de levadura	3
Peptona	7
Sales biliares	1,5
Lactosa	10
Cloruro de sodio	5
Agar	15
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002

3.6.4.1.2. Inmunolocalización de las cepas.

Las cepas pertenecientes a otras familias diferentes a *Rhizobiaceae*, fueron inmunolocalizadas mediante anticuerpos. Este proceso fue llevado a cabo en el Servicio de Patología Molecular Comparada (CIC-IBMCC, USAL-CSIC).

Brevemente, las raíces de las plantas inoculadas como especifican los apartados 3.6.1. y 3.6.2. fueron cortadas en fragmentos y colocadas en tubos tipo Eppendorf que contenían 1 mL de PBS estéril. Los fragmentos fueron sumergidos en una solución de leche (3 %) y Triton (0,03 %) en PBS, durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron lavados con PBS de 5 minutos, tres veces. Una vez lavadas, el anticuerpo primario (diluido 1/50 en diluyente comercial DAKO) fue añadido, e incubado *overnight* a 4 °C. En el caso de la cepa perteneciente al género *Pseudomonas*, utilizamos un anticuerpo policlonal comercial *Pseudomonas* (Thermo Scientific™). En el caso del resto de las cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Inquilius*, se usaron anticuerpos policlonales comerciales anti-uricasa (Novus Biologicals Ltd™). Las raíces fueron lavadas de nuevo con PBS durante 5 minutos, tres veces. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario anti FITC GOAT, diluido 1/200 en diluyente comercial DAKO, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. De nuevo, las muestras se lavaron con PBS durante 5 minutos, tres veces. Finalmente, las raíces fueron teñidas con 4',6-Diamidina-2'-fenilindol dihidroclorido (DAPI) durante 10 minutos, y lavadas de nuevo con PBS. Las muestras fueron conservadas a 4 °C y en oscuridad, hasta ser analizadas.

En este proceso, el anticuerpo primario se une de manera específica a las bacterias y el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario llevaba

acoplado un fluoróforo que emite en verde, en la misma longitud de onda que la GFP (488 nm).

3.6.4.2. Visualización de la colonización.

El ensayo fue realizado como se explica en el punto 6.1. En el caso de las cepas pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, las plantas fueron inoculadas con las cepas conjugadas con el plásmido PHC60 y fueron crecidas durante una semana en la cámara iluminada.

En el caso del resto de las cepas, las plantas fueron inoculadas con las bacterias y dejadas crecer durante una semana en la cámara iluminada. Al finalizar el ensayo, las raíces de las plantas fueron seccionadas y llevadas al Servicio de Patología Molecular Comparada (CIC-IBMCC, USAL-CSIC) donde se inmunolocalizaron las bacterias utilizando los anticuerpos mencionados en el apartado 3.6.4.1.2.

En ambos casos, la colonización fue visualizada tras una semana en la cámara iluminada. En las preparaciones directas de las raíces, el Blanco de Calcoflúor fue usado como colorante diferencial para la tinción de las paredes celulares vegetales, añadiendo 20 μ L de la solución de Blanco de Calcoflúor (Sigma-Aldrich®, Alemania) al 5% (v/v) sobre la muestra (Flores-Félix *et al.*, 2015). Para la visualización, usamos un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse i80), que llevaba acoplada una lámpara de luz ultravioleta LED pE-300lite. Las bacterias fueron observadas con un filtro a 488 nm mientras que los tejidos vegetales teñidos fueron observados con un filtro de 420 nm.

3.6.5. Ensayo de la promoción del crecimiento vegetal.

Para este ensayo, se esterilizaron y pregerminaron 15 semillas por tratamiento, como indica el apartado 3.6.2. A continuación, fueron colocadas en placas cuadradas de 12x12 mm con medio Rigaud y Puppo (Tabla 31). Con un bisturí estéril, un tercio del medio de cada placa fue recortado y descartado. A continuación, el medio restante fue cubierto con un papel Whatman estéril, donde las semillas pregerminadas fueron cuidadosamente colocadas, cuatro por placa. En este momento se inocularon con 250 μ L/raíz de las suspensiones bacterianas o un equivalente de PBS estéril para el control negativo. Las semillas inoculadas fueron cubiertas con otro papel Whatman estéril. Las placas se cerraron y sellaron con Parafilm. Finalmente, fueron colocadas en posición vertical y la zona inferior fue cubierta para que las semillas germinasen en dirección a la luz. Las placas se mantuvieron en la cámara iluminada durante 14 días. Tras ese tiempo, se midió la longitud de la parte aérea de las plantas, la longitud de la parte radicular y el número de raíces secundarias.

Tabla 31. Composición del medio Rigaud y Puppo.

Medio Rigaud y Puppo	
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Panreac™)	0,12 g
KH ₂ PO ₄ (Panreac™)	0,10 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Panreac™)	0,15 g
Citrato férrico (Panreac™) *	1 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Codex)	1 mL
Solución de oligoelementos Fahraeus (Tabla 31.A.) *	1 mL
NH ₄ NO ₃ 50mM (Sigma-Aldrich®, Alemania) *	3,20 g
H ₂ O	1 L

Tabla 31.A. Solución de oligoelementos.

Solución de oligoelementos	Cantidad para 200 mL (1 mg / mL)
MnSO ₄ · 2H ₂ O	200 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	200 mg
ZnSO ₄ · 5H ₂ O	200 mg
H ₃ BO ₃	200 mg
Na ₂ MoO ₄	200

3.6.6. Estudio del biocontrol de *Botrytis cinerea* mediante la competición directa en plántula de tomate.

Para este ensayo, se esterilizaron y pregerminaron 15 semillas por tratamiento, como indica el apartado 3.6.2. Las placas de Petri usadas fueron placas cuadradas de 12x12 mm con medio Rigaud y Puppo. Con un bisturí estéril, un tercio del medio de cada placa fue recortado y descartado. A continuación, el medio restante fue cubierto con un papel Whatman estéril, donde las semillas pregerminadas fueron cuidadosamente colocadas, cuatro por placa. En ese momento fueron inoculadas con 250 µL/raíz de las suspensiones bacterianas o un equivalente de PBS estéril para el control negativo. Las semillas inoculadas fueron cubiertas con otro papel Whatman estéril. Las placas se cerraron y sellaron con Parafilm. Finalmente fueron colocadas en posición vertical y la zona inferior fue cubierta para que las semillas se desarrollaran en dirección a la luz. Las placas se mantuvieron en la cámara iluminada durante 7 días. Pasado este tiempo, las plantas fueron con 50 µL de la suspensión de esporas a una concentración de 10⁵ esporas/mL. Las placas se sellaron de nuevo, y volvieron a ser incubadas en la cámara iluminada durante dos semanas más. Finalizado el ensayo, el parámetro medido fue el número de plantas vivas y de plantas muertas por tratamiento.

3.6.7. Estudio de biocontrol de *Botrytis cinerea* mediante la producción de compuestos volátiles en plántulas de tomate.

Para este ensayo, se esterilizaron y pregerminaron 15 semillas por tratamiento, como indica el apartado 3.6.2. Las placas de Petri usadas fueron placas redondas de 8,5 x 8,5 cm con medio Rigaud y Puppo. Con un bisturí estéril, un tercio del medio de cada

placa fue recortado y descartado. A continuación, el medio restante fue cubierto con un papel Whatman estéril, donde las semillas pregerminadas fueron cuidadosamente colocadas, tres por placa. En este momento, las plantas fueron infectadas con 10 µL de la suspensión fúngica a una concentración de 10⁵ esporas/mL. Las bacterias fueron sembradas en placas de Petri redondas de 10 mL con medio TSA o TY. Tanto las placas abiertas con las plantas infectadas como las placas abiertas con las bacterias fueron colocadas dentro del mismo recipiente, el cual fue cerrado, y colocado en la cámara iluminada durante una semana. Finalizado el ensayo, el parámetro medido fue el número de plantas vivas y de plantas muertas por tratamiento

3.7. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL VOLATILOMA.

3.7.1. Preparación de las muestras.

Las cepas que originalmente fueron aisladas en el medio TSA fueron cultivadas en el medio TSB, mientras que las cepas aisladas en el medio YMA fueron cultivadas en el medio TY líquido, cuya composición es la misma que el TY sólido, pero sin añadir agar. Los viales empleados fueron unos tubos de rosca de 20 mL sellados por tapones con septum de silicona (Sigma-Aldrich®, Alemania). A cada tubo se le añadieron 4 mL del medio y se inocularon 100 µL de una suspensión de cada cepa a una D.O.₆₀₀ de 0,6. Los tubos fueron incubados en agitación a 150 r.p.m., inclinación de 45° y a una temperatura de 28 °C, durante 5 días. Un total de tres réplicas fueron realizadas por cada cepa y también se hicieron controles negativos sin inocular, uno por cada medio empleado.

3.7.2. Extracción de los compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC-MS.

La técnica usada para la extracción de los compuestos volátiles fue *Headspace solid-phase microextraction* (HS-SPME) acoplada a *gas chromatography–mass spectrometry* (GC-MS). La metodología fue la desarrollada por Amaron *et al.* (2020) con modificaciones mínimas (Amaro *et al.*, 2020). Los VOCs producidos en 4 mL de medio de cultivo fueron extraídos mediante la técnica HS-SPME utilizando una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). La muestra estaba en agitación continua a 250 r.p.m. a una temperatura de 45 °C, con un tiempo de incubación de 5 minutos y un tiempo de extracción de 30 minutos. Para la detección se usó un sistema 436-GC (Bruker Daltonics, Fremont, CA) acoplado a un detector de masas SCION Single Quadrupole (SQ) y el software de estación de trabajo Bruker Daltonics MS (versión 8.2). Los análisis fueron realizados utilizando un muestreador automático Combi-PAL (Varian Pal Autosampler, Suiza). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna capilar de sílice fundida GC Rxi-5Sil MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interior x 0,25 µm de espesor de película) (RESTEK Corporation, EE. UU., Bellefonte, Pensilvania). El gas portador fue helio C-60 (Gasin, Portugal) a un caudal constante de 1,0 mL/min. Las inyecciones fueron realizadas en modo dividido con una proporción de 1:5. El programa de temperatura del horno fue de 40 °C durante 1 minuto a 250 °C durante 5 minutos, con intervalos de 5 °C/min, seguido del aumento a 300 °C durante 1 min, con intervalos de 5

°C/min. El detector MS operó en modo de impacto electrónico (70 eV). La temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C, la temperatura del colector fue de 40 °C y la temperatura del impacto electrónico fue de 260 °C. El rango de masa fue de 40 a 250 m/z, con una velocidad de exploración de 6 exploraciones/s. El análisis cromatográfico fue realizado en modo de barrido completo.

Los VOCs fueron identificados mediante estándares químicos de referencia o mediante comparación entre la fragmentación de MS obtenida con los espectros de masas presentes en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST 14) y a través de comparación con el índice de retención de Kovats.

3.8. ENSAYOS *IN PLANTA* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

3.8.1. Ensayos de la promoción del crecimiento vegetal en la cámara iluminada.

Las semillas de tomate fueron pregerminadas como especifica el apartado 3.6.2. y puestas en vasos de plástico de medio litro agujereados por debajo, los cuales contenían 300 mL de vermiculita "SEED PRO 6040" (PROJAR, Madrid, España), previamente lavada y autoclavada. Los vasos fueron puestos en unos platos de plástico donde se añadía la solución de riego. Esta consistió en agua destilada estéril durante la primera semana y solución Rigaud y Puppo sin agar hasta la finalización del ensayo. Las plantas se regaron a demanda durante el desarrollo del ensayo. Cuando las plantas emergieron (seis días) fueron inoculadas en la raíz con 4 mL de suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml. Las plantas permanecieron en la cámara iluminada durante 30 días tras la inoculación. Los parámetros medidos fueron la longitud de la parte aérea, el número de hojas, el calibre de la base del tallo y el peso húmedo.

3.8.2. Cuantificación de la colonización por qPCR.

3.8.2.1. Toma de las muestras, procesamiento y extracción del ADN.

Las muestras de la raíz fueron tomadas del ensayo realizado en el apartado 3.8.1. Las muestras fueron esterilizadas en superficie según el protocolo del apartado 3.1.2. y machacadas con nitrógeno líquido en un mortero. El ADN total fue extraído con el kit DNeasy® Plant Pro Kit (QIAGEN). Para la lisis complementaria se usó un FastPrep-24 TM 5G (Thermo Scientific™), empleando un programa de 40 segundos a 60 m/segundo por triplicado. El ADN extraído fue cuantificado con el Qubit dsDNA HS (Thermo Scientific™).

3.8.2.2. Diseño de los primers.

Los *primers* fueron diseñados con la herramienta *online primer-BLAST* del NCBI a partir de los genes *recA* de las especies de los géneros *Rhizobium* y *Ferranicluiibacter*. Las secuencias de los *primers* se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32. Características de los *primers*.

Nombre	Gen	Secuencia (5' – 3')	Referencia
<i>ArtF</i>	16S rRNA	GATCTGCGGTGGGTACGG	(Dsouza <i>et al.</i> , 2015)
<i>ArtR</i>	16S rRNA	CGGTTTCATGTCAAGCCTT	
<i>FerrF</i>	<i>recA</i>	GATCATCGGCAACCAGACCA	Elaboración propia
<i>FerrR</i>	<i>recA</i>	CGCTGGCTGTTGTAGGAGAA	
<i>RhiF</i>	<i>recA</i>	AGGCCGGTATCGTCGAAAAG	Elaboración propia
<i>RhiR</i>	<i>recA</i>	GGATTATCGCGCAGGAAGGT	

La eficiencia y especificidad de los *primers* fue evaluada mediante PCR convencional usando como ADN molde el ADN extraído de las cepas que iban a ser estudiadas.

3.8.2.3. Diseño de la qPCR.

Los reactivos y las concentraciones son mostrados en la Tabla 33. Las condiciones de la PCR para una reacción de 10 μ L fueron de 20 segundos a 95 °C para la etapa de *holding stage*; seguida de 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C para la etapa de *cycling*; y de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 15 segundos a 95 °C para la etapa de *melting curve*. Los *primers* específicos fueron usados para la detección de las bacterias (Tabla 32).

Tabla 33. Reactivos del qPCR.

Reactivos por reacción de PCR	
Syber Green	5 μ L
H ₂ O	3,5 μ L
<i>Primer</i> Forward a 10 μ M	0,25 μ L
<i>Primer</i> Reverse a 10 μ M	0,25 μ L
ADN	1 μ L

3.8.2.4. Determinación de la recta patrón.

Los cultivos bacterianos de 48 horas de crecimiento fueron resuspendidos en PBS. A partir de estos, fueron realizadas diluciones seriadas hasta la 10⁻⁸. De cada dilución se sembraron 100 μ L en placas de Petri con el medio correspondiente y se extendieron en superficie con el asa de Drigalsky. Las placas fueron incubadas hasta que las colonias fueron visibles y contables. Las placas con entre 30 y 300 UFCs fueron contadas para obtener la concentración en UFC/mL. De las soluciones originales, el ADN total fue extraído como específica el apartado 3.3.1. Este ADN fue cuantificado en qPCR para obtener una recta patrón que evaluará el Ct correspondiente con UFC/ mL.

3.9. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE MORAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

3.9.1. Obtención de las plantas de zarzamora.

Las moras usadas fueron adquiridas a la empresa “Arándanos el Cierrón”. Las plantas adquiridas fueron *Rubus fruticosus* variedad Asterina.

3.9.2. Ensayo en condiciones de invernadero.

Los ensayos fueron realizados en las instalaciones del Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) y adecuando el diseño experimental a las necesidades del cultivo. Las plantas adquiridas fueron trasplantadas a macetas de 5 L con suelo mezclado perlita y fueron mantenidas en el invernadero en condiciones de humedad y temperatura constantes. La inoculación fue llevada a cabo al comienzo de la fase reproductiva, cuando los primeros brotes se desarrollaron. Al cabo de un mes, las plantas fueron reinoculadas de nuevo, aportando una dosis de refuerzo. Estas fueron mantenidas hasta la finalización de la recolección de los frutos (Figura 12). Para la inoculación, las soluciones de las bacterias fueron preparadas a una concentración de 10^8 UFC/mL y 10 mL fueron inoculados en cada planta. Un total de 15 plantas por tratamiento fueron usadas y distribuidas de manera aleatoria en el invernadero.

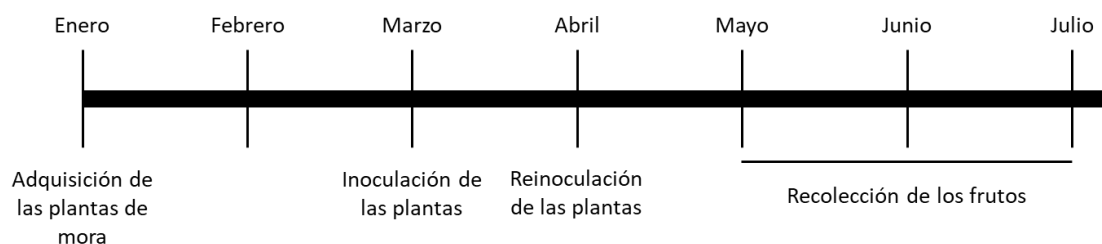


Figura 12. Cronología representativa del ensayo de mora en el invernadero.

3.10. ESTUDIO DE MEJORA DE LA PRODUCCIÓN DE MORA EN CONDICIONES DE CAMPO.

3.10.1. Ensayo en campo.

El estudio en campo fue realizado en la plantación de la empresa Agroberry – *Original from Zamora* (41° 35' 09,5'' N; 5° 56' 17,6'' O). La especie con la que trabaja es *Rubus* sp. variedad *Cherokee*. La inoculación fue llevada a cabo al comienzo de la fase reproductiva, cuando los primeros brotes comenzaron a aparecer. Para la inoculación se prepararon soluciones de las bacterias correspondientes a 10^8 UFC / mL y se inocularon 50 mL en cada planta. En total, se utilizaron 15 plantas por tratamiento distribuidas de manera aleatoria en el terreno. La producción total de las plantas del ensayo fue recogida en cinco tiempos. El 22 de junio, el 27 de junio, el 03 de julio, el 11 de julio y el 21 de julio. Finalizada la recogida, se evaluaron diferentes parámetros c cuantitativos y cualitativos de la producción (Figura 13).

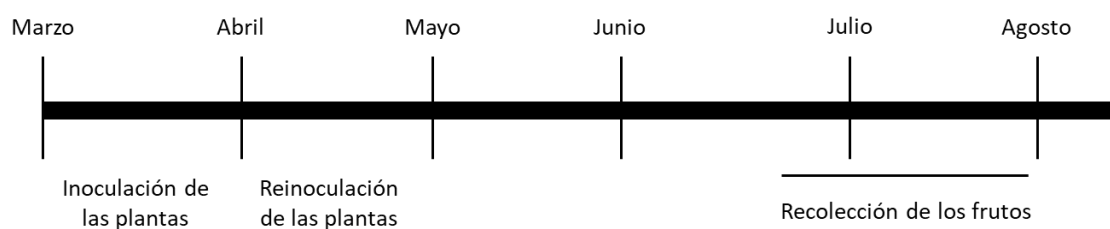


Figura 13. Cronología representativa del ensayo de mora en el campo.

3.10.2. Toma de datos de los parámetros de producción.

De cada tratamiento se seleccionaron un total de 90 moras al azar. Cada una de ellas fue pesada individualmente en una balanza de precisión (*Denver Instrument*, España) y el ancho y el largo fueron medidos con un calibre de precisión. Estas medidas fueron realizadas en cada uno de los tiempos de recogida. Además, en cada uno de los días se pesó la producción total de las plantas.

3.10.3. Toma de datos de los parámetros fisicoquímicos.

El pH y la acidez titulable (AT) fueron medidos utilizando zumo de mora que se obtuvo licuando 5 g de moras en una licuadora. El zumo obtenido fue mezclado con 50 mL de agua destilada Mili-Q (Millipore Ibérica, S.A.U., Madrid). El pH fue medido utilizando un medidor de pH de mesa (827 pH lab, Metrohm, Herisau, Suiza). La acidez titulable fue determinada titulando el jugo con NaOH 0,1 N a un pH de 8,1. Los resultados fueron expresados como contenido de ácido málico (g de ácido málico/100 g de peso fresco). Estas medidas fueron tomadas por triplicado por cada tratamiento en cada uno de los tiempos de recolección.

El contenido total de sólidos solubles (TSS) fue medido con un refractómetro (Auxilab S.L., Navarra, España) previamente calibrado con agua destilada. Las medidas fueron expresadas en °Brix. Estas medidas fueron tomadas cinco veces por cada tratamiento en cada uno de los tiempos de recolección.

El índice de palatabilidad fue obtenido con la relación entre TSS y AT. Estas medidas fueron tomadas por triplicado de cada tratamiento por cada uno de los tiempos de recolección.

El contenido de humedad y cenizas fue evaluado según describe la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2000). Un total de 5 g de mora fresca de cada tratamiento fueron pesados y colocados en diferentes crisoles de porcelana. Para la prueba de humedad, cada muestra fue secada en una estufa a 105 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, fueron transferidas a un desecador y, una vez enfriadas, fueron pesadas de nuevo. A continuación, para determinar el contenido en ceniza, cada muestra fue incinerada en un horno a 550 °C durante 24 h. Tras enfriarse en un desecador, volvieron a ser pesadas. Estas medidas fueron tomadas cinco veces por cada tratamiento en cada uno de los tiempos de recolección.

3.10.4. Toma de datos de los parámetros del color.

Los parámetros del color fueron determinados mediante colorimetría de reflectancia triestímulo a 520 nm, utilizando un colorímetro CR-300 (Chromometer, Minolta, Japón) con un área de medición de 8 mm de diámetro (McLaren y Walford, 1980), previamente calibrado con una teja blanca. Un total de 15 moras seleccionados al azar fueron usados para la toma de muestra. Cada mora fue medida en dos puntos de la superficie diferentes. Los parámetros evaluados fueron de Hunter L* (luminosidad, 100 = blanco, 0 = negro), a* (positivo = rojo, negativo = verde) y b* (positivo = amarillo, negativo = azul). Los resultados se procesaron utilizando un procesador de Chroma Meters serie CR-300 (DP-301) y fueron presentados como la media de dos mediciones en puntos equidistantes en la región ecuatorial de la fruta respectiva \pm desviación estándar. Los datos obtenidos fueron utilizados para calcular el parámetro de cromaticidad, es decir, croma (C*) $[(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$, y el matiz de color, es decir, ángulo de tono (h*) $[\arctan (b^*/a^*)]$.

3.11. CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS FRUTOS

El contenido en compuestos fenólicos de las frutas procedentes de los ensayos en invernadero y en campo fue analizado en colaboración con el Grupo de Investigación en Polifenoles del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.

Cada una de las muestras fue congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilizada. A continuación, la extracción fue realizada usando una solución de metanol al 80%, acidificado al 5% con HCl al 0,5 N. Por cada muestra se usaron tres tubos Falcon que contenían 8 mL de la solución hidroalcohólica. A cada tubo se le añadieron 0,2 g por muestra y fueron colocados en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. y a una temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes fueron filtrados con papel de filtro y recogidos en balones de destilación. Este proceso fue realizado por triplicado, obteniéndose un volumen final de 24 mL por cada 0,2 g de muestra. El extracto final fue concentrado a presión reducida, utilizando un rotavapor Büchi R-124 acoplado a un baño de agua caliente B-480 y una bomba de vacío B-270 (Marshall Scientific, EEUU). El residuo fue disuelto en un volumen final de 10 mL de agua destilada.

La determinación de la composición fenólica de los extractos de las moras fue realizada mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la detección mediante red de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS). Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard de la serie 1200 (Agilent Technologies, Alemania) utilizando una columna Spherisorb® S3 ODS-2 C18 de fase reversa ($3\text{ }\mu\text{m}$, $150 \times 4,6\text{ mm}$) (Waters Corporation, EE. UU.) termostaticada a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los eluyentes utilizados fueron una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1% (v/v) y acetonitrilo, siguiendo el gradiente previamente descrito (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

Las longitudes ondas preferentes usadas para la detección fueron 280, 330, 360 y 520 nm y los espectros fueron registrados entre 220 y 600 nm. El espectrómetro de masas estaba conectado al sistema HPLC a través de la salida de la celda DAD (Detector de Red de Diodos). La detección por espectrometría de masas (MS) fue realizada utilizando un API 3200 Qtrap (Sciex, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas de triple cuadrupolo-trampa de iones. La metodología usada fue la desarrollada previamente para los compuestos no antociánicos (Dueñas *et al.*, 2015). Brevemente, se utilizó aire de grado cero como gas nebulizador (30 psi) y gas turbo (40 psi, 400 °C), y nitrógeno como gas de cortina (20 psi) y gas de colisión (medio). El voltaje de ionización fue fijado en - 4.500 V y los espectros fueron registrados en modo negativo entre m/z 100 y 1.700. El detector de MS fue programado para realizar el análisis completo de masas (*full scan* – EMS), seguido de un análisis de MS/MS (EPI) para mostrar el patrón de fragmentación del principal ion detectado.

La identificación de los compuestos fue realizada a partir de los espectros UV-vis, los tiempos de retención y los espectros de masas, comparándolos con los estándares comerciales cuando estaban disponibles. Los compuestos individuales fueron cuantificados a partir de los valores del área del pico obtenidos en los cromatogramas registrados a 280 nm (glucósido del ácidoprotocatéquico o ácido elágico), 330 nm (derivados del ácido cafeico), 360 nm (derivados de flavona y flavonol) o 520 nm (flavonoides), utilizando el método del patrón externo. El ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico) se cuantificó con su propia recta patrón. El hexósido de eriodictiol, desconocido 1 y desconocido 2 se cuantificaron como equivalente de ácido gálico. Dímero de procianidina tipo b y epicatequina se cuantificaron empleando la recta patrón de epicatequina. El ácido elágico, pentósido del ácido elágico, la glucogalina, la trigaloil hhdp glucosa, el isómero de la sanguina H6 y la sanguina H6 se determinaron como ácido elágico. La cianidina-3-o-glucósido, la cianidina-3-o-pentósido, la cianidina-3-o-malonilglucósido, la cianidina-3-o-pentósido, la pelargonidina-3-o-glucósido y la quercertina-3-o-glucuronido se determinaron como equivalente de la cianidina 3-o-rutinósido. La epicatequina, acetilhexósido de kaempferol, el hexósido de quercetina, la rutina, el rutinósido de kaempferol, la acetilhexósido de quercetina y el derivado del pentósido de quercetina, fueron expresados como equivalente de quercetina glucuronido. Los resultados fueron obtenidos del valor medio de tres análisis independientes, expresados en g/kg de peso seco de la fruta.

3.12. ENSAYO DE ESTRÉS TÉRMICO EN ORGANISMO MODELO CAENORHABDITIS ELEGANS.

3.12.1. Preparación y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*.

El organismo *Caenorhabditis elegans* fue crecido y mantenido en medio NGM (Tabla 34). Bajo condiciones estériles, el medio NGM fue repartido con pipeta en placas Petri de 10 mL. Esto permitió repartir una cantidad constante de medio en las placas, lo que redujo la necesidad de enfocar el microscopio cuando cambiamos de una placa a otra.

Tabla 34. Composición del medio NGM. Los componentes marcados con un asterisco son esterilizados por filtración y añadidos después de autoclavar el medio.

Medio NGM (<i>Nematode Growth Medium</i>)	
NaCl	1,2 g
Peptona	1 g
CaCl ₂ 1 M pH 6,0	400 µL
Colesterol (5 mg/mL etanol)	400 µL
MgSO ₄ 1 M *	400 µL
Buffer fosfato 1 M pH 6,0	400 µL
Ampicilina sódica (50 µg/mL)	400 µL
Nistatina (1 g/100 mL en etanol: acetato de amonio 1:1)	700 µL
Agar	6,8 g
H ₂ O	390 mL

La fuente de alimento del organismo *Caenorhabditis elegans* consistió en un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* OP50. Las placas de NGM fueron inoculadas con la bacteria *Escherichia coli* OP50 a partir de un cultivo líquido de la bacteria crecida *overnight* en el medio LB, en agitación a una temperatura de 37 °C. Las placas de 10 mL de NGM fueron inoculadas con 100 µL de la solución de *Escherichia coli* OP50.

La siembra de una nueva placa con nemátodos se hizo transfiriendo un trozo de agar con nemátodos desde una placa almacenada a una placa fresca, usando un bisturí estéril.

3.12.1.1. Sincronización de la población.

Para la realización de cualquier ensayo con el organismo *Caenorhabditis elegans* es necesario que todos los individuos de la población estén en el mismo estado larvario. Esto es conseguido con una sincronización, para la cual es necesario tener placas NGM con la bacteria *Escherichia coli* OP50, nemátodos con 3-4 días de crecimiento a 20 °C, una lupa y un asa de siembra fabricada con alambre de platino de calibre 32 introducido en una pipeta Pasteur. El extremo del alambre fue aplanado con una lima para eliminar los filos del borde, y evitar así dañar a los nemátodos y el agar.

Usando el asa y la lupa, se van tomando uno a uno los individuos de *Caenorhabditis elegans* en estadio L4 y estos son traspasados a placas nuevas. En total, usamos 20 nemátodos por placa y 2 placas por tratamiento. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 20 °C durante 1-2 horas. Pasado ese tiempo, al observar a la lupa, observamos que los nemátodos adultos han puesto huevos. Habiendo comprobado esto, localizamos a los adultos puestos originalmente y se retiraron de las placas.

3.12.1.2. Obtención de los extractos de la mora.

La mora obtenida durante los ensayos en el invernadero fue congelada a -80 °C y liofilizada. Un total de dos gramos por muestra liofilizada fueron usados para la preparación de los extractos. Estos dos gramos fueron separados en tubos Falcon, un

gramo por tubo, dos tubos por tratamiento. En cada tubo fueron añadidos 40 mL de metanol acidificado al 5% con HCl al 0,5 N. La muestra fue introducida en un baño de sonicación durante 30 minutos. A continuación, fue centrifugada durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. a temperatura de 10 °C. El sobrenadante fue filtrado con papel de filtro y recogido en balones de destilación. Este procedimiento fue realizado por triplicado, obteniendo un volumen final de 120 mL por cada balón. Una vez obtenida la solución, evaporamos el líquido con un rotavapor Büchi R-124, con un baño de agua termostatizable B-480 y bombas de vacío B-270. El extracto remanente en cada uno de los balones fue solubilizado en 10 mL de agua destilada y preparado para liofilizar de nuevo. Finalmente, las muestras que correspondan al mismo tratamiento fueron juntas y homogeneizadas para su utilización.

3.12.1.3. Ensayo de estrés oxidativo inducido térmicamente.

Para la realización de los ensayos, el medio NGM fue suplementado con 1 µL del extracto a la concentración deseada multiplicada por 100 por cada mL de medio. Adicionalmente, el medio fue suplementado con 1 µL de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUDR) por cada mL de medio. Este compuesto evita la eclosión de los huevos y, por lo tanto, la mezcla de las generaciones. La sincronización fue realizada en placas de NGM con el extracto deseado, pero sin el FUDR, y fueron cultivadas a 20 °C. Paralelamente, el tratamiento control fue suplementado con 1 µL de DMSO por cada mL de medio. La influencia del estrés térmico sobre la viabilidad del nemátodo fue evaluada en diferentes estados de desarrollo. Los nemátodos permanecieron en las placas con el tratamiento hasta alcanzar el día del ensayo deseado (días 2 o 9). El día anterior al día del ensayo, los nemátodos fueron transferidos uno a uno con el asa de siembra a placas de 35 mm de diámetro suplementadas con el extracto y con FUDR. En total se transfirieron 20 nemátodos por placa y cuatro placas por tratamiento. El día del ensayo, las placas fueron sometidas a una temperatura de 35 °C durante 6 y 8 h. Tras el estrés térmico, se contabilizó el número de nemátodos supervivientes. Para la contabilización, se consideró que estaban muertos cuando no respondían a ningún estímulo. Estos ensayos fueron llevados a cabo con 80 nemátodos por tratamiento y por triplicado.

3.13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

3.13.1. Toma de muestras y extracción de ARN de las plantas de tomate.

Todo el material usado para la recolección de las muestras y procesamiento fue previamente tratado con el descontaminante de superficies RNase AWAY™ (Thermo Scientific™), un inhibidor de RNAsas. Para este ensayo, 12 semillas por tratamiento fueron pregerminadas y puestas en placas redondas de 8,5 x 8,5 cm, tres semillas por placa. Las bacterias fueron sembradas en placas redondas de 10 mL con el medio TSA o TY. Ambas placas abiertas fueron colocadas dentro del mismo recipiente, el cual fue cerrado, y colocado en la cámara iluminada durante una semana. Finalizado el tiempo del ensayo, las plantas fueron tomadas con pinzas estériles y congeladas inmediatamente en

nitrógeno líquido. Las plantas congeladas fueron machacadas en un mortero hasta obtener un polvo.

El ARN total fue extraído a partir de 100 mg de muestra machacada usando el kit PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Scientific™). El FastPrep-24 TM 5G (Thermo Scientific™) fue usado para la lisis complementaria, empleando un programa de 40 segundos a 60 m/segundo, por triplicado y enfriando en hielo entre los ciclos. Una vez obtenido el ARN, fue tratado con DNAsa para eliminar restos indeseables usando el kit TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Scientific™) y cuantificado con Qubit RNA HS (Thermo Scientific™).

3.13.2. Toma de muestras y extracción de ARN del organismo *Caenorhabditis elegans*.

Los nemátodos fueron sembrados en placas con el medio NGM con *Escherichia coli* OP50, que contenían los compuestos de mora a 200 µM o DMSO (0,1 %), en el caso de las placas control. Estos ensayos fueron realizados en condiciones normales de crecimiento (20 °C).

Para extraer el ARN total, los nemátodos fueron recogidos de las placas con buffer M9 (Tabla 35). Previamente, realizamos siete lavados con el mismo buffer para eliminar los restos del medio. En el último lavado se dejaron 300 µL del buffer M9. El kit usado para la extracción fue ZymoBIOMICS RNA Miniprep Kit y el paso de la homogeneización fue realizado con FastPrep-24 TM 5G (Thermo Scientific™), empleando un programa de siete pulsos de 10 segundos a 5,5 m/segundo, con un descanso de 20 segundos entre pulsos. El ARN total fue cuantificado con Qubit RNA HS (Thermo Scientific™).

Tabla 35. Composición del buffer M9.

Buffer M9	g/L
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄	6
NaCl	5
MgSO ₄ (1 M)	1 mL

3.13.3. Obtención del cDNA.

Una vez obtenido el ARN, fue tratado con DNAsa para eliminar restos indeseables usando el kit TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Scientific™) y cuantificado con Qubit RNA HS (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, EE. UU.). Finalmente, para obtener cDNA, se usó el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™), volviéndose a cuantificar con Qubit dsDNA HS (Thermo Scientific™) al finalizar.

3.13.4. Cuantificación de la expresión de genes por qPCR.

Los reactivos y concentraciones son especificados en el apartado 3.8.2. Las secuencias de los *primers* usadas en los ensayos con las plantas de tomate son descritas

en la Tabla 36 mientras que las secuencias de los *primers* usadas en los ensayos con los nemátodos son descritas en la Tabla 37.

Tabla 36. Características de los *primers* usados en los ensayos con plantas de tomate.

Nombre	Gen	Secuencia (5' – 3')	Referencia
<i>tubF</i>	Tubulina	TCGTGGCCACTATAACCATTG	(Constantin <i>et al.</i> , 2019)
<i>tubR</i>		AGTGACCCAAGACCTGAACC	
<i>PR1aF</i>	Gen relacionado con la patogenicidad 1a	TGGTGGTTCATTTCTTGCAACTAC	
<i>PR1aR</i>		ATCAATCCGATCCACTTATCATTTTA	
<i>Pti4F</i>	Factor de respuesta al etileno	TCGTCCGGAAACGGTTCCAT	
<i>Pti4R</i>		GACATCCAACCTTGCATGACACTTG	
<i>ETR4F</i>	Gen receptor del etileno	GGTAATCCCAAATCCAGAAGGTTT	
<i>ETR4R</i>		CAATTGATGGCCGCAGTTG	
<i>PALF</i>	Fenilalanina amoniaco-liasa	CGTTATGCTCTCCGAACATC	
<i>PALR</i>		GAAGTTGCCACCATGTAAGG	
<i>PIIF</i>	Inhibidor de la proteinasa 1	GTGTACCAACAAAGCTTGCTAAAGA	
<i>PIIR</i>		GTACAACAACACCCAAAATGTTGTC	

Tabla 37. Características de los *primers* usados en los ensayos con *Caenorhabditis elegans*.

Nombre	Gen	Secuencia (5' – 3')	Referencia	
<i>act1-F</i>	Actina	CCAGGAATTGCTGATCGTATG	(Gutierrez-Zetina <i>et al.</i> , 2021)	
<i>act1-R</i>		GGAGAGGGAAGCGAGGATAG		
<i>skn-1-F</i>	Proteína <i>skinhead</i> 1	AGTGTCCGGCGTTCCAGATTTT		
<i>skn-1-R</i>		GTCGACGAATCTTGCGAATCA		
<i>daf-16-F</i>	Gen 16 de la formación anormal <i>dauer</i>	CCAGACGGAAGGCTTAAACT		
<i>daf-16-R</i>		ATTCCGCATGAAACGAGAATG		
<i>hsf-1-F</i>	Factor de transcripción del choque térmico 1	GAAATGTTTTGCCGCATTTT		
<i>hsf-1-R</i>		CCTTGGGACAGTGGAGTCAT		
<i>hsp-16-F</i>	Proteína del choque térmico 16	CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTC		
<i>hsp-16-R</i>		AGATTCCGAAGCAACTG-CACC		
<i>ctl-1-F</i>	Catalasa 1	AATGGATACGGAGCGCATAAC		
<i>ctl-1-R</i>		TCCTGTTCAGCACCATCTTG		
<i>gst-7-F</i>	Glutación-S-transferasa 7	GACAGCTTCCACTCCTTGAA		(Ayuda-Durán <i>et al.</i> , 2019b)
<i>gst-7-R</i>		GCACACTTTCCATTGATTCC		

3.13.5. Condiciones de la qPCR

Para determinar los niveles de expresión de los genes utilizamos la técnica PCR cuantitativa (RT-qPCR). Esta fue realizada en un termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) utilizando el PowerTrack SYBR® Green 2X Mater Mix (Applied Biosystems) como fluorocromo. La cuantificación relativa fue realizada mediante el método Ct, donde el ciclo umbral (*threshold*) (Ct) es determinado durante la fase exponencial del proceso. La cuantificación fue normalizada con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con el gen de la tubulina (*tub*) como gen constitutivo para los ensayos con plantas de tomate y el gen actina (*act*) para los ensayos con el organismo *Caenorhabditis*

elegans (Ayuda-Durán *et al.*, 2019b; Constantin *et al.*, 2019). El análisis fue realizado con seis muestras biológicas y tres réplicas técnicas.

3.14. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

En los ensayos realizados en el Apartado 3.1, los test estadísticos empleados son descritos en el mismo apartado.

En los ensayos realizado en los apartados 3.6.6., 3.6.7. y 3.12.1.3, las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron obtenidas mediante la construcción de tablas de contingencia. La significancia estadística fue obtenida usando el Chi Square Test. En cada análisis, las diferencias significativas se consideraron estadísticamente en el nivel de $p < 0,05$

En el resto de los apartados, las diferencias significativas entre los tratamientos de cada uno de los ensayos realizados fueron obtenidas mediante análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional, en base a la prueba Tukey HSD ($p \leq 0,05$), utilizando el software estadístico software para PC Rstudio (versión 4.1.2).

**4. CAPÍTULO I:
ANÁLISIS METATAXONÓMICO DE
LAS BACTERIAS ENDOFÍTICAS
ASOCIADAS A LOS DIFERENTES
TEJIDOS DE PLANTAS DE
ZARZAMORA**

El interior de los tejidos vegetales es una fuente de nuevas bacterias endofíticas que podrían ser usadas en la agricultura, ya que muchas de ellas son capaces de sintetizar compuestos bioactivos que influyen en la defensa o el crecimiento de las plantas (Khan *et al.*, 2020). A pesar de su importancia, pocas de ellas han sido caracterizadas, y la mayoría ni siquiera han podido ser cultivadas. Sin embargo, la integración de varios métodos metagenómicos en estudios endofíticos, como el *metabarcoding* empleado en esta tesis, promete proporcionar un enfoque rápido y oportunidades para desentrañar las comunidades endofíticas aún por cultivar y su posible uso en aras del beneficio vegetal (Adeleke y Babalola, 2022).

Gracias al desarrollo de estas técnicas, las comunidades endofíticas de algunas especies vegetales como el trigo, el arroz o el tomate han sido desveladas sin necesidad de cultivarlas (Quince *et al.*, 2017). Sin embargo, en otras especies como la zarzamora, sólo se han dado unas primeras aproximaciones sobre la composición de sus comunidades bacterianas (Saati-Santamaría *et al.*, 2023).

El primer capítulo de esta tesis tratará de arrojar luz sobre la diversidad bacteriana del interior de tejidos de plantas silvestres de zarzamora (*Rubus ulmifolius* Schott) y analizar cómo está distribuida en diferentes ambientes y tejidos de la planta. Por lo tanto, el estudio no estará centrado únicamente en desentrañar la diversidad endofítica y su potencial de producción metabólica, sino también en comprender de manera más profunda las relaciones entre el nicho de la planta huésped y los endófitos (Kaul *et al.*, 2016).

4.1. COMPOSICIÓN DE LOS ENDOBIOMAS BACTERIANOS ASOCIADOS A ZARZAMORA.

En la zona oeste de la provincia de Salamanca, ubicada en la comunidad española de Castilla y León, el clima predominante es el templado de veranos cálidos y secos tipo Csa, según la clasificación Köppen-Geiger (Kottek *et al.*, 2006). Esta es una clasificación que, a pesar de haber sido formulada hace ya más de 100 años, sigue siendo la más usada en los estudios climatológicos de todo el mundo (Chazarra-Bernabé *et al.*, 2022). Basándonos en eso, tomamos muestras de plantas de diferentes zonas del municipio de Ciudad Rodrigo (Salamanca). Las primeras muestras fueron tomadas de una zona abandonada, en la que no hubo intervención humana en los últimos 20 años, denominadas en adelante muestras Naturales. De forma paralela, también se tomaron muestras de plantas que podían estar influenciadas por factores locales. Por un lado, se tomaron muestras de plantas influenciadas por la proximidad de ambientes ribereños, las cuales estaban localizadas en la llanura de inundación del río Águeda, denominadas en adelante muestras Ribereñas. Por otro lado, se tomaron muestras de plantas influenciadas por actividades humanas, ya que estaban localizadas en el margen de campos de cultivos, denominadas en adelante como muestras Humanizadas. De las plantas de todas estas áreas, tomamos muestras de la raíz, el tallo y las hojas y secuenciamos diferentes fragmentos del gen ARNr 16S, concretamente de las regiones hipervariables V2, V3, V4, V6, V7, V8 y V9 (Figura 14).

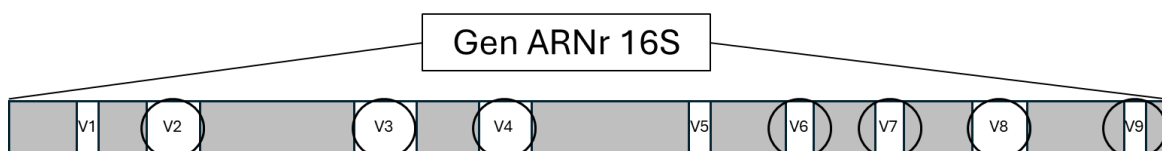


Figura 14. Regiones hipervariables del gen ARNr 16S.

Tras la secuenciación, eliminamos las lecturas de baja calidad, las quimeras, las lecturas que correspondían a los cloroplastos y a las mitocondrias y las muestras con poca cobertura, quedando un total de 1.019.239 lecturas de alta calidad (Tabla 38). La muestra SH2 fue retirada de los análisis debido a que no produjo lecturas. Después de la filtración, el número total de ASVs fue 19.887, que pertenecieron principalmente a tres filos, Pseudomonadota, Actinomycetota y Bacteroidota, representando el 53,7, el 29,1 y el 8,3% respectivamente, de todas las lecturas globales.

Tabla 38. Metadatos, número de lecturas y ASVs de las comunidades bacterianas presentes en las muestras.

Nombre muestra	Tejido	Condiciones de crecimiento	N.º de lecturas en crudo	N.º de lecturas después de procesarlas*	ASVs observados
RS1	Raíz	Natural	81.962	30.632	1.039
RS2	Raíz	Natural	136.198	75.855	1.968
RS3	Raíz	Natural	226.675	106.290	1.794
SS1	Tallo	Natural	76.997	18.922	390
SS2	Tallo	Natural	116.674	84.176	1.514
SS3	Tallo	Natural	101.690	30.755	416
LS1	Hoja	Natural	106.636	38.283	414
LS2	Hoja	Natural	76.952	11.542	139
LS3	Hoja	Natural	66.264	12.236	203
RR1	Raíz	Ribereña	124.070	48.817	1.530
RR2	Raíz	Ribereña	165.562	89.329	1.719
RR3	Raíz	Ribereña	89.235	28.429	977
SR1	Tallo	Ribereña	468.852	29.000	439
SR2	Tallo	Ribereña	115.724	31.767	523
SR3	Tallo	Ribereña	92.629	18.555	293
LR1	Hoja	Ribereña	107.478	26.070	311
LR2	Hoja	Ribereña	73.909	15.737	259
LR3	Hoja	Ribereña	90.918	19.425	260
RH1	Raíz	Humanizada	114.822	63.677	1.407
RH2	Raíz	Humanizada	139.924	75.522	1.657
RH3	Raíz	Humanizada	108.255	58.272	1.062
SH1	Tallo	Humanizada	111.550	60.575	825
SH2	Tallo	Humanizada	12	0	0
SH3	Tallo	Humanizada	85.077	35.595	470
LH1	Hoja	Humanizada	117.194	6.085	142
LH2	Hoja	Humanizada	123.238	1.061	55
LH3	Hoja	Humanizada	74.267	2.632	81

* después del filtrado (< 800 nucleótidos > 1300 nucleótidos), eliminación de quimeras, mitocondrias y cloroplastos.

Analizando la diversidad con más detalle encontramos que, como era de esperar, todas las muestras presentaron un alto contenido de lecturas pertenecientes a los filos Pseudomonadota, Actinomycetota y Bacteroidota. En concreto, el filo Pseudomonadota representó el 44,9, el 52,1 y el 70,3% en las muestras de las raíces, los tallos y las hojas de las muestras de los ambientes Humanizados, en las muestras de los ambientes

Ribereños representó el 50,5, el 66,9 y el 80,9% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 53,1, el 45,1 y el 63,1%. El filo Actinomycetota representó el 34,6, el 37,4 y el 12,4% en las muestras de las raíces, los tallos y las hojas de las muestras de los ambientes Humanizados, en las muestras de los ambientes Ribereños representó el 29,9, el 19,5 y el 7,1% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 29,5, el 30,0 y el 23,0%. Finalmente, el filo Bacteroidota representó el 6,7, el 8,5 y el 14,9% en las muestras de las raíces, los tallos y las hojas de las muestras de los ambientes Humanizados en las muestras de los ambientes Ribereños representó el 2,9, el 11,4 y el 10,6% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 6,8, el 11,4 y el 13,2%. Además, las muestras de raíces mostraron una gran representación de otros filios, como Myxococcota, que representó el 4,1, el 4,0 y el 3,5% de las muestras de los ambientes Ribereños, Naturales y Humanizados, o Acidobacteriota, que representó el 4,4, el 1,7 y el 1,8%, respectivamente (Figura 15).

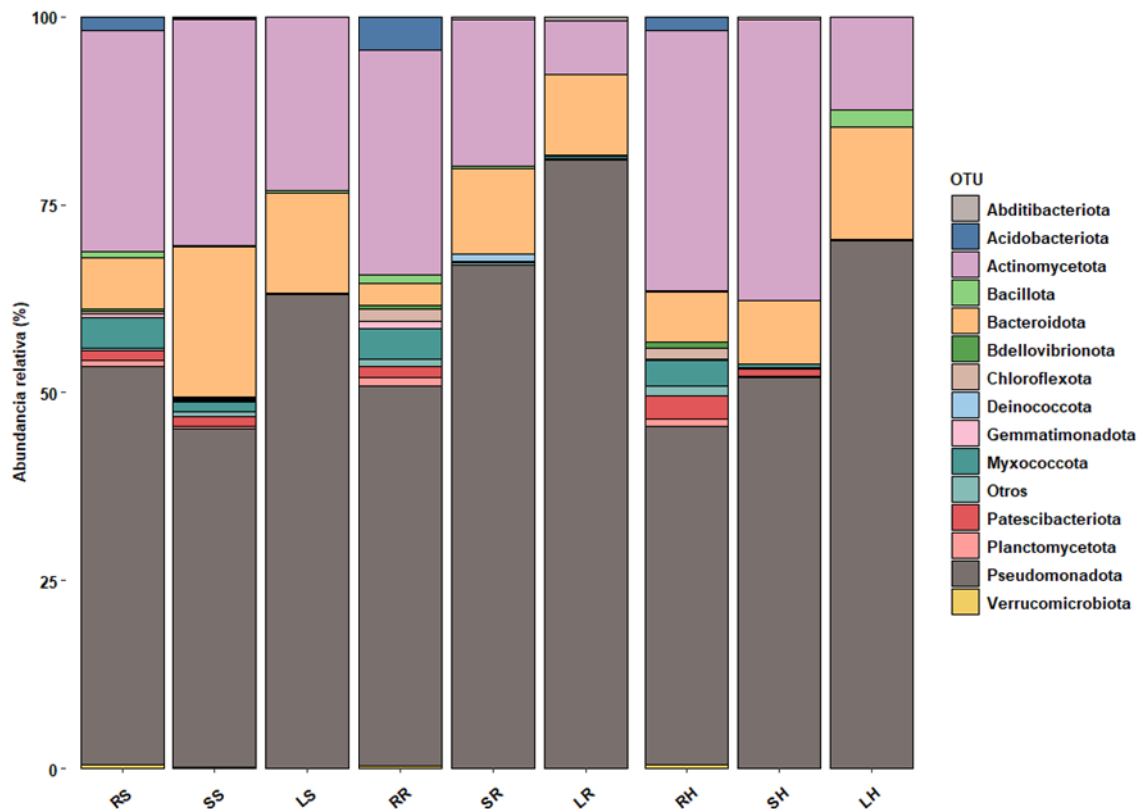


Figura 15. Abundancia relativa de los 14 filios bacterianos más abundantes en diferentes partes anatómicas de plantas de *Rubus ulmifolius* en diferentes condiciones. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

Dentro del filo Pseudomonadota, la clase más abundante en todas las muestras fue Alphaproteobacteria, que representó el 29,1, el 44,7 y el 51,3% de las muestras de las raíces,

los tallos y las hojas de las muestras de los ambientes Humanizados, en los ambientes Ribereños representó el 29,7, el 35,9 y el 74,1% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 30,4, el 38,8 y el 57,3%. La distribución de esta clase bacteriana mostró el mismo patrón en todos los ambientes, aumentando la composición según la distancia al suelo de dónde se tomó la muestra en la planta. Otra clase destacable, que también pertenece al filo Pseudomonadota, fue Gammaproteobacteria, la cual mostró distribuciones diversas dependiendo del tejido y del ambiente. Así, en las muestras de los ambientes Humanizados observamos una composición del 15,8% en las raíces, que decreció en las muestras de tallo a un 7,3% pero aumentó en las muestras de hoja a un 18,5%. En las muestras de los ambientes Ribereños, las raíces presentaron un 20,8%, aumentando en los tallos a un 31,1% pero decreciendo en las hojas a un 6,8%. Por último, en las muestras de los ambientes Naturales, la mayor abundancia fue observada en las raíces, con un 22,7%, mientras que en los tallos y hojas decreció a un 6,2 y un 5,8% respectivamente. La clase Actinobacteria también fue abundante y destacó por tener una composición más o menos uniforme en las muestras de raíces y los tallos, pero que decreció en las muestras de hoja en las muestras de los ambientes Humanizados y Ribereños. Así, en las muestras de los ambientes Humanizados, las raíces y tallos mostraron un 33,3 y un 35,6%, mientras que las hojas un 12,2%. Del mismo modo, las muestras de los ambientes Ribereños mostraron en las raíces y los tallos un 22,9 y un 19,7%, decreciendo hasta un 7,1% en las hojas. En cambio, las muestras de los ambientes Naturales mantuvieron uniforme esta composición en todas las muestras, con un 25,6, un 29,2 y un 23,0% en las muestras de las raíces, los tallos y las hojas. Finalmente, la clase Bacteroidia no representó un gran porcentaje en las muestras de las raíces, pero aumentó en los otros dos tejidos. Así, en muestras de raíces de los ambientes Humanizados la composición fue de un 6,7%, mientras que en los tallos y las hojas fue del 8,4 y el 14,9%. En muestras de las raíces de los ambientes Ribereños la composición fue de un 2,9%, mientras que en los tallos y las hojas fue del 11,4 y el 10,6%. Y en muestras de las raíces de los ambientes Naturales la composición fue de un 6,8, mientras que en los tallos y las hojas fue del 19,9 y el 13,2% (Figura 16).

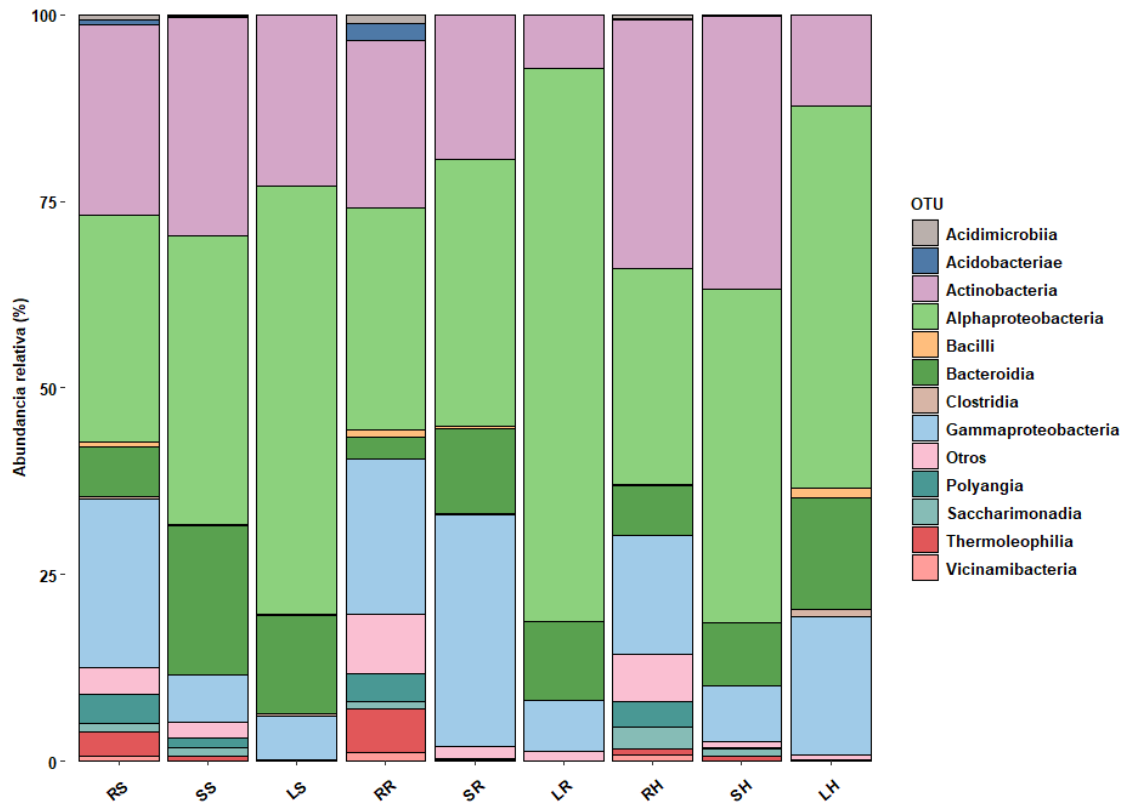


Figura 16. Abundancia relativa de las 12 clases bacterianas más abundantes en diferentes partes anatómicas de plantas de *Rubus ulmifolius* en diferentes condiciones. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

Con respecto a los órdenes bacterianos, el más abundante en todas las muestras fue Sphingomonadales, que representó el 9,3, el 30,4 y el 44,1% de las raíces, los tallos y las hojas de las muestras de los ambientes Humanizados, en las muestras de los ambientes Ribereños representó el 10,4, el 28,8 y el 45,8% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 9,5, el 22,8 y el 42,8%. En este orden bacteriano destacó que la composición aumentaba de la raíz a la parte aérea de la planta en todos los ambientes. El orden Hyphomicrobiales también fue abundante en todas las muestras, aunque no mostró un patrón constante a todos los ambientes. Así, representó el 13,0, el 13,3 y el 6,4% en las muestras de las raíces, los tallos y las hojas de muestras de los ambientes Humanizados, en las muestras de los ambientes Ribereños representó el 13,1, el 5,5 y el 22,1% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 14,9, el 10,1 y el 13,8%. El orden Cytophagales mostró una representación baja en las muestras de las raíces de todos los ambientes, pero que aumentó en las muestras de los tallos y las hojas. Así, representó el 2,8, el 6,6 y el 14,8% en las raíces, los tallos y las hojas de las muestras de los ambientes Humanizados, en las muestras de los ambientes Ribereños representó el 0,1, el 10,9 y el 9,4% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 1,4, el

14,7 y el 12,9%. Finalmente, hubo algunos órdenes que aparecieron sobrerrepresentados en muestras concretas, como el orden Burkholderiales en las muestras de los tallos del ambiente Ribereño con un 29,9% o el orden Pseudomonadales en las muestras de las hojas de los ambientes Humanizados con un 12,6% (Figura 17).

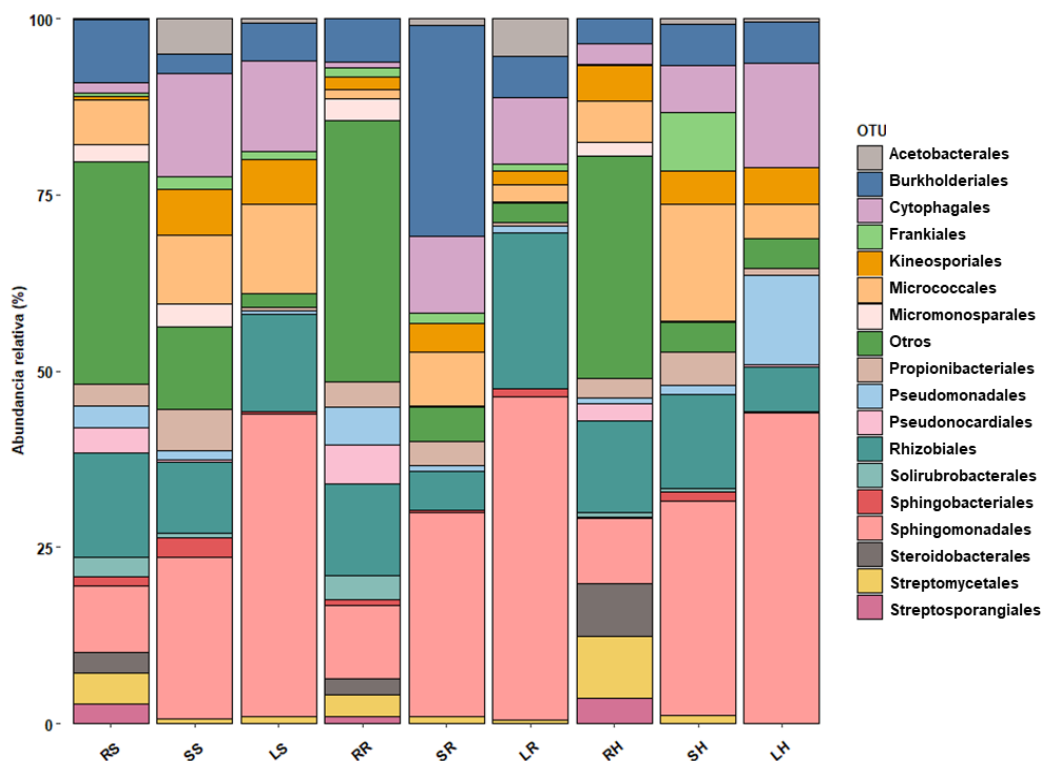


Figura 17. Abundancia relativa de los 17 órdenes bacterianos más abundantes en diferentes partes anatómicas de plantas de *Rubus ulmifolius* en diferentes condiciones. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

En cuanto a la diversidad por familia bacteriana, la familia *Sphingomonadaceae* fue la más abundante en todas las muestras, representando el 9,4, el 30,4 y el 44,1% en las raíces, los tallos y las hojas de las muestras de los ambientes Humanizados, en las muestras de los ambientes Ribereños representó el 10,4, el 28,8 y el 45,8% y en las muestras de los ambientes Naturales representó el 9,5, el 22,8 y el 42,8%. Sin embargo, las siguientes familias más abundantes difirieron entre las muestras. En las muestras de los ambientes Naturales, las familias *Xanthobacteraceae* y *Microbacteriaceae* fueron la segunda y tercera familias más abundantes, siendo en las muestras de las raíces un 8,6 y un 4,3%, respectivamente. En las muestras de los tallos se observó una disminución de la familia *Xanthobacteraceae* hasta el 0,5%, mientras que la familia *Microbacteriaceae* aumentó al 9,6%. Adicionalmente, también hubo un aumento de la familia *Hymenobacteraceae* al 14,4%. En las muestras de las hojas, la familia *Microbacteriaceae*

aumentó hasta el 12,0%, mientras que la familia *Hymenobacteraceae* se mantuvo en 12,8% y la familia *Xanthobacteraceae* prácticamente desapareció. En las muestras de los ambientes Ribereños, las familias *Xanthobacteraceae* y *Pseudonocardiaceae* fueron la segunda y la tercera más abundantes en raíces, con un 9,5 y un 5,4%, respectivamente. En las muestras de los tallos hubo una disminución, por no decir desaparición, de ambas familias al 0,1 y el 0,0%, respectivamente. Paralelamente, al igual que en las muestras de los ambientes Naturales, hubo un aumento en las familias *Microbacteriaceae* e *Hymenobacteraceae* al 5,8, y el 10,3%, respectivamente en las muestras de los tallos. Adicionalmente, también hubo un aumento de la familia *Burkholderiaceae* hasta el 19,4%. En hojas, la única familia que se mantuvo fue la familia *Hymenobacteraceae* con un 8,5%, y las familias *Beijerinckiaceae* y *Acetobacteraceae* aumentaron a un 19,0% y un 5,4%, respectivamente. Finalmente, en las muestras de las raíces de los ambientes Humanizados, las principales familias fueron *Streptomyacetaceae* y *Steroidobacteraceae*, con abundancias del 8,7 y el 7,5%, respectivamente. De nuevo, estas familias disminuyeron en las muestras de los tallos hasta el 1,2 y el 0,0%, mientras que las familias *Microbacteriaceae* y *Beijerinckiaceae* aumentaron al 16,3 y el 8,9%, respectivamente. En las muestras de las hojas, estas dos familias mantuvieron su presencia en un 4,5%, mientras que las familias *Hymenobacteraceae* y *Pseudomonadaceae* aumentaron hasta el 14,8 y el 11,1%, respectivamente (Figura 18).

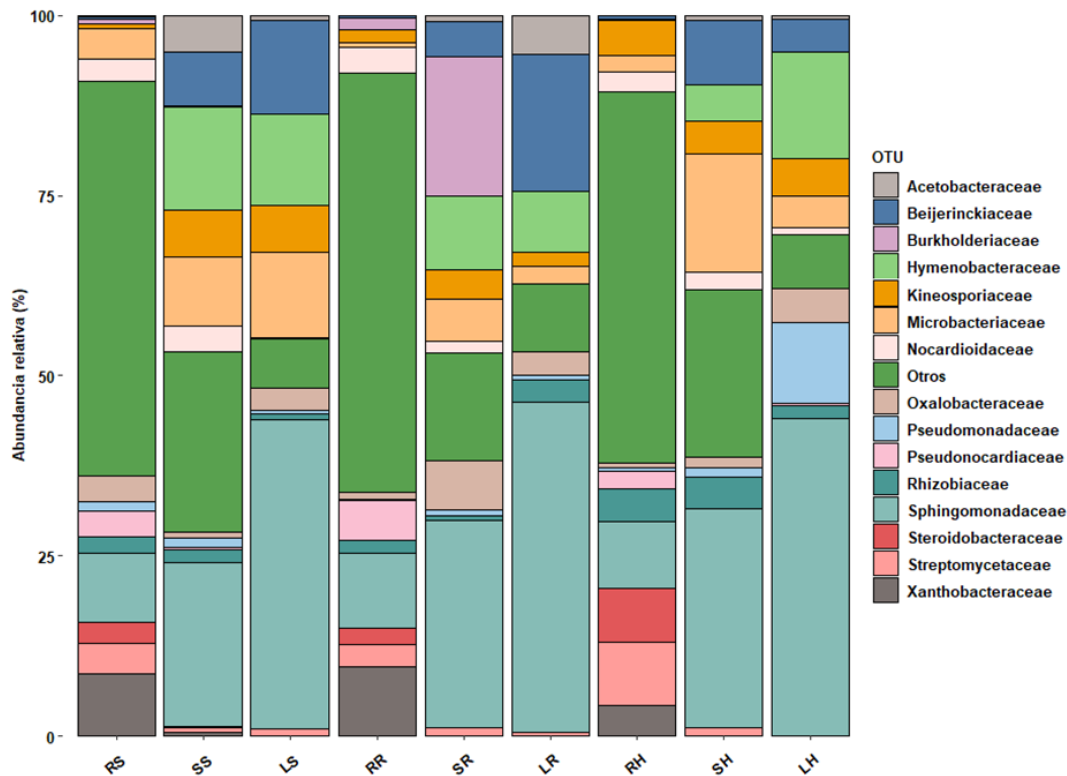


Figura 18. Abundancia relativa de las 15 familias bacterianas más abundantes en diferentes partes anatómicas de plantas de *Rubus ulmifolius* en diferentes condiciones. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de

la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

Con respecto a los géneros, *Sphingomonas* fue el género más abundante en todas las muestras, mostrando un incremento en la composición de las muestras de las raíces a las muestras de los tejidos aéreos. Así, en las muestras de los ambientes Humanizados hubo un 4,1% en las muestras de las raíces, un 23,9% en las muestras de los tallos y un 42,8% en las muestras de las hojas. En las muestras de los ambientes Ribereños, un 3,2% en las muestras de las raíces, un 19,5% en las muestras de los tallos y un 42,6% en las muestras de las hojas. Y en las muestras de los ambientes Naturales, un 6,6% en las muestras de las raíces, un 19,4% en las muestras de los tallos y un 37,5% en las muestras de las hojas. El resto de los géneros destacaron de manera diversa en las diferentes muestras. Por ejemplo, el género *Hymenobacter* mostró una gran representación en las muestras de los tallos y las hojas de todos los ambientes, un 5,1 y un 14,8% en las muestras de los ambientes Humanizados, en las muestras de los ambientes Ribereños representó un 10,3 y un 8,5% y en las muestras de los ambientes Naturales representó un 14,4 y un 12,8%. El género *Bradyrhizobium* sólo apareció en las muestras de las raíces con un 2,3% en las muestras de los ambientes Humanizados, 5,0% en las muestras de las raíces de los ambientes Ribereños y 5,3% en las muestras de las raíces de los ambientes Naturales. El género *Cupriavidus* tuvo una gran representación únicamente en las muestras de los tallos del ambiente Ribereño con un 18,9%. Por último, el género *Pseudomonas* tuvo una gran representación únicamente en las muestras de las hojas del ambiente Humanizado, con un 11,2% (Figura 19).

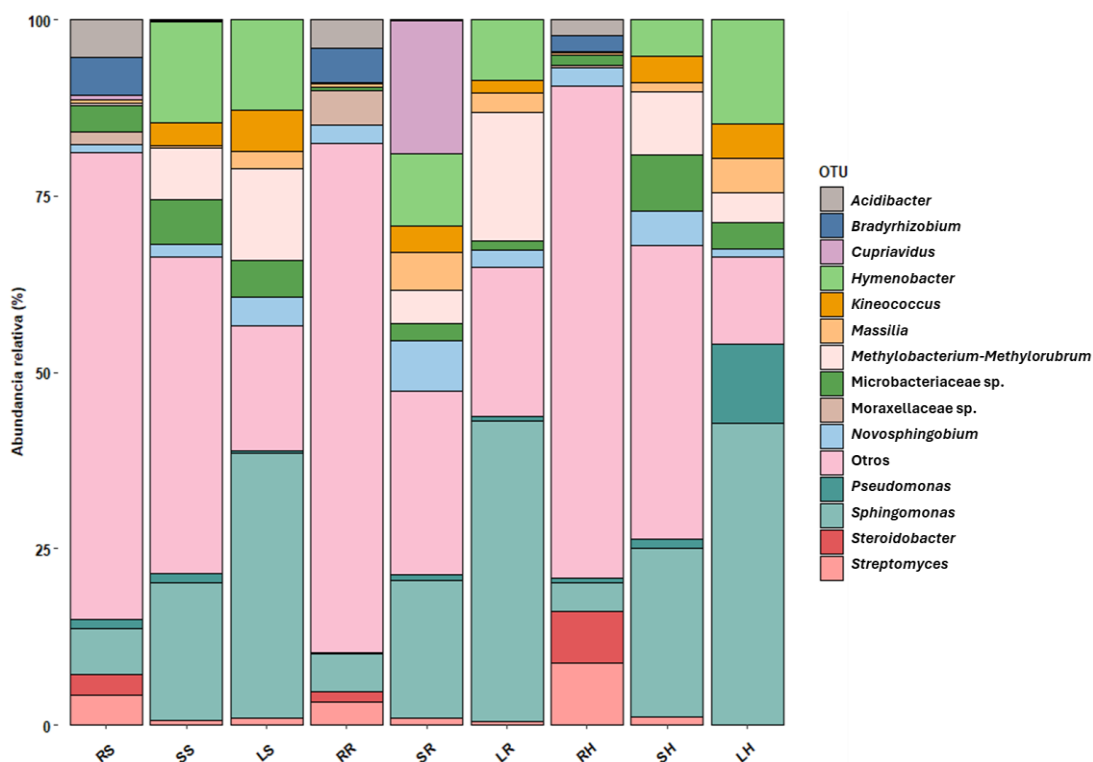


Figura 19. Abundancia relativa de los 14 géneros bacterianos más abundantes en diferentes partes anatómicas de plantas de *Rubus ulmifolius* en diferentes condiciones. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de

zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

Para comprobar si las diferencias observadas entre la composición en los taxones de las diferentes muestras eran significativas, realizamos la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn para la comparación múltiple por pares (Dinno, 2015).

Tras el análisis estadístico, encontramos diferencias significativas en las abundancias de algunos de los taxones entre las muestras, destacando que casi todas eran dadas entre las muestras de las raíces y las hojas del mismo ambiente. Más concretamente, hubo diferencias entre las abundancias de ocho filos, cuatro clases, seis órdenes, siete familias y siete géneros entre las muestras de las raíces y las hojas dentro del ambiente Ribereño, dentro del ambiente Natural hubo diferencias en cinco filos, una clase, tres órdenes, cinco familias y seis géneros entre las muestras de las raíces y de las hojas, dentro del ambiente Humanizado hubo diferencias en cuatro filos, una clase, cuatro órdenes, cuatro familias y cinco géneros entre las muestras de la raíz y de las hojas. Sin embargo, en algunos casos puntuales también hubo diferencias significativas entre las muestras de las raíces y los tallos, y los tallos y las hojas de los mismos ambientes. Así, en las muestras del ambiente Ribereño, la abundancia del género *Kineococcus* entre las muestras de las raíces y los tallos mostró diferencias significativas. En las muestras del ambiente Natural, fue la clase Bacilli la que mostró diferencias entre las muestras de las raíces y los tallos, mientras que entre las muestras de los tallos y las hojas fue el orden Sphingobacteriales. En las muestras de los ambientes Humanizados, las diferencias fueron observadas entre las muestras de los tallos y las hojas en la composición del filo Bacillota y la clase Bacilli. Por otro lado, también encontramos diferencias significativas entre la abundancia de algunos taxones de las muestras del mismo tejido, pero en diferentes ambientes. Las muestras de las raíces difirieron entre los ambientes Ribereño y Humanizado en la clase Acidobacteriae y el orden Cytophagales. Las muestras de los tallos difirieron entre los ambientes Ribereño y Humanizado en el género *Microbacteriaceae*. Finalmente, entre las muestras de las hojas de los ambientes Natural y Ribereño hubo diferencias en el filo Pseudomonadota, entre las muestras de los ambientes Natural y Humanizado hubo diferencias en el orden Streptomycetales, la familia *Pseudomonaceae* y los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*, y entre las muestras de los ambientes Ribereño y Humanizado, en la clase Bacilli, la familia *Beijerinckiaceae* y el género *Methylobacterium-Methylorubrum* (Tabla 39).

Tabla 39. Comparación múltiple por pares mediante la prueba de Dunn de abundancia de taxones. Sólo se presentan los taxones con diferencias significativas. Las significancias asintóticas bidireccionales (prueba bilateral) son mostradas como valores $\pm Z$ (prueba Z por pares de Dunn). Pareja: indica las dos muestras que son comparadas. p-valor: nivel de significación estadística. q-valor: corrección de Bonferroni para múltiples pruebas. Nivel de significancia $<0,05$.

	Pareja	Valor Z	Valor q	Valor p
Filo				
Acidobacteriota	LR - RR	-2,426	0,015	0,046
	LS - RS	-2,545	0,011	0,033
Actinomycetota	LR - RR	-2,683	0,007	0,022
Bdellovibrionota	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LH - RH	-2,397	0,017	0,050
Chloroflexota	LS - RS	-2,426	0,015	0,046
	LH - RH	-2,397	0,017	0,050
Bacillota	LH - SH	2,460	0,014	0,042
Gemmatimonadota	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LS - RS	-2,569	0,010	0,031
Myxococcota	LS - RS	-2,395	0,017	0,050
Patescibacteria	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
Pseudomonadota	LR - LS	2,534	0,011	0,034
	LR - RR	2,534	0,011	0,034
Planctomycetota	LR - RR	-2,569	0,010	0,031
	LH - RH	-2,562	0,010	0,031
Verrucomicrobiota	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LH - RH	-2,397	0,017	0,050
Clase				
Acidimicrobiia	LH - RH	-2,515	0,012	0,036
	LR - RR	-2,569	0,010	0,031
Acidobacteriae	RH - RR	-2,683	0,007	0,022
Bacilli	LH - SH	2,489	0,013	0,038
	RS - SS	2,395	0,017	0,050
	LH - LR	2,706	0,007	0,020
Polyangia	LR - RR	-2,569	0,010	0,031
	LS - RS	-2,578	0,010	0,030
Saccharimonadia	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
Thermoleophilia	LR - RR	-2,631	0,009	0,026
	LS - RS	-2,729	0,006	0,019
Orden				
Acetobacterales	LR - RR	2,695	0,007	0,021
Cytophagales	LH - RH	2,500	0,012	0,037
	RH - RR	2,534	0,011	0,034
Micromonosporales	LH - RH	-2,562	0,010	0,031
Pseudonocardiales	LR - RR	-2,569	0,010	0,031
	LS - RS	-2,569	0,010	0,031
Solirubrobacterales	LR - RR	-2,426	0,015	0,046
Sphingobacteriales	LS - SS	-2,534	0,011	0,034
Sphingomonadales	LS - RS	2,534	0,011	0,034
Steroidobacterales	LH - RH	-2,397	0,017	0,050
	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LS - RS	-2,569	0,010	0,031
Streptomycetales	LH - RH	-2,562	0,010	0,031
	LR - RR	-2,534	0,011	0,034
	LH - LS	-2,413	0,016	0,047
Streptosporangiales	LR - RR	-2,449	0,014	0,043

Continúa...

Continuación Tabla 39.

	Pareja	Valor Z	Valor q	Valor p
Familia				
<i>Acetobacteraceae</i>	LR - RR	2,695	0,007	0,021
<i>Beijerinckiaceae</i>	LR - RR	2,683	0,007	0,022
	LS - RS	2,534	0,011	0,034
	LH - LR	-2,534	0,011	0,034
<i>Burkholderiaceae</i>	LS - RS	-2,426	0,015	0,046
<i>Hymenobacteraceae</i>	LH - RH	2,562	0,010	0,031
<i>Nocardioideaceae</i>	LR - RR	-2,578	0,010	0,030
	LH - LR	2,449	0,014	0,043
<i>Pseudomonadaceae</i>	LH - LS	2,395	0,017	0,050
<i>Pseudonocardiaceae</i>	LR - RR	-2,569	0,010	0,031
	LS - RS	-2,569	0,010	0,031
<i>Steroidobacteraceae</i>	LH - RH	-2,397	0,017	0,050
	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LS - RS	-2,569	0,010	0,031
<i>Streptomycetaceae</i>	LH - RH	-2,562	0,010	0,031
	LR - RR	-2,534	0,011	0,034
	LH - LS	-2,413	0,016	0,047
<i>Xanthobacteraceae</i>	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LS - RS	-2,729	0,006	0,019
Género				
<i>Acidibacter</i>	LH - RH	-2,400	0,017	0,050
	LR - RR	-2,569	0,010	0,031
	LS - RS	-2,569	0,010	0,031
<i>Bradyrhizobium</i>	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LS - RS	-2,729	0,006	0,019
<i>Hymenobacter</i>	LH - RH	2,562	0,010	0,031
<i>Kineococcus</i>	RR - SR	-2,426	0,015	0,046
	LS - RS	2,729	0,006	0,019
<i>Methylobacterium- Methylorubrum</i>	LR - RR	2,683	0,007	0,022
	LS - RS	2,534	0,011	0,034
	LH - LR	-2,534	0,011	0,034
<i>Moraxellaceae</i>	LR - RR	-2,569	0,010	0,031
<i>Microbacteriaceae</i>	SH - SR	2,460	0,014	0,042
<i>Pseudomonas</i>	LH - LS	2,395	0,017	0,050
<i>Steroidobacter</i>	LH - RH	-2,400	0,017	0,050
	LR - RR	-2,449	0,014	0,043
	LS - RS	-2,569	0,010	0,031
<i>Streptomyces</i>	LH - RH	-2,562	0,010	0,031
	LR - RR	-2,534	0,011	0,034
	LH - LS	-2,413	0,016	0,047
<i>Sphingomonas</i>	LH - RH	2,500	0,012	0,037
	LR - RR	2,683	0,007	0,022
	LS - RS	2,534	0,011	0,034

En un estudio previo, la diversidad bacteriana de las plantas de *Rubus ulmifolius* fue estudiada centrándose en las comunidades endofíticas de las muestras de raíces y de la rizosféricas (Saati-Santamaría *et al.*, 2023). A nivel de filo, los resultados de la composición del bacterioma de esta tesis y el estudio de Saati-Santamaría fueron similares. Pseudomonadota fue el filo más abundante en todas las muestras, con un 37,0 – 76,8% en las muestras de las raíces, seguido del filo Acidobacteriota con un 0,8 – 26,7%. En este trabajo, el filo Pseudomonadota fue, en efecto, el filo más abundante en las muestras de las raíces con un 38,4 - 62,7% y el filo Acidobacteriota fue bastante

abundante con un 1,5 – 6,8%, aunque hubo otros filos más abundantes. Respecto a las familias, en el trabajo de 2023, la familia *Xanthomonadaceae* fue la familia más abundante en las muestras de las raíces, seguida de las familias *Solibacteraceae*, *Chitinophagaceae* y *Micropepsaceae*. En esta tesis, la familia *Xanthomonadaceae* fue una de las familias más abundantes, aunque representó sólo el 1,3 – 12,2% del bacterioma total de las muestras de las raíces, y el resto de las familias mencionadas representaron menos del 1%. Con respecto a los géneros, los más abundantes del estudio de Saati-Santamaría fueron los géneros *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Bryobacter*, *Mucilaginitibacter*, *Granulicella*, *Acidibacter*, *Acidothermus* y *Rhodanobacter*. Sin embargo, aunque en nuestro trabajo los géneros *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas* y *Acidibacter* sí que fueron de los más abundantes con un 0,9 – 7,1%, un 1,5 – 16,1% y un 1,1 – 6,2%, respectivamente, el resto de los géneros mencionados representaron menos de un 1%.

A parte de este, pocos estudios han sido realizados sobre la diversidad bacteriana de las plantas de zarzamora. Un estudio reciente de comunidades bacterianas en pseudonódulos presentes en ocasiones en las raíces de algunas especies del género *Rubus* encontró que el 90% de los endófitos pertenecían al filo Pseudomonadota, concretamente al género *Stenotrophomonas* (55%) (Farda *et al.*, 2022). Aunque no son comparables, en nuestro caso Pseudomonadota fue de hecho el filo principal en las muestras de raíces, representando el 56,2, el 66,1 y el 53,8% en las muestras de los ambientes Humanizados, Ribereños y Naturales, respectivamente, mientras que el género *Stenotrophomonas* no fue detectado.

4.2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE LAS MUESTRAS.

Los resultados anteriores parecían indicar que la composición de las comunidades de las bacterias endofíticas era moldeada por el tejido y no por el lugar de muestreo. Para profundizar en esta idea, llevamos a cabo un estudio de las diversidades alfa y beta de las muestras. La diversidad alfa mide la “diversidad local” de las muestras, ya sea porque mide la riqueza observada, es decir el número de taxones, o la uniformidad (*eveness*), es decir las abundancias relativas de esos taxones, en las muestras promedio. Por otro lado, la diversidad beta cuantifica cómo varía la composición de la comunidad entre las muestras (Walters y Martiny, 2020).

Para evaluar las diversidades alfa y beta se han creado diversos índices. En el caso de la diversidad alfa, existen índices que evalúan la riqueza de la muestra, la *eveness* o ambas. En este trabajo, evaluamos la diversidad alfa bajo los índices *Richness*, *Chao1* y *Abundance-based coverage estimators* (ACE), que evalúan la riqueza, el índice *Eveness*, que evalúa la uniformidad, y los índices Shannon y Simpson, que evalúan ambas (Kers y Saccenti, 2022) (Figura 20). Los resultados fueron similares en todos los índices, presentando tendencias equiparables. En todos ellos, las muestras de las raíces tuvieron los valores de diversidad más altos, seguidas de las muestras de los tallos y de las hojas. De nuevo, un análisis por pares encontró diferencias estadísticamente significativas,

únicamente entre los índices de las muestras de las raíces y las hojas de los mismos ambientes (Tabla 40).

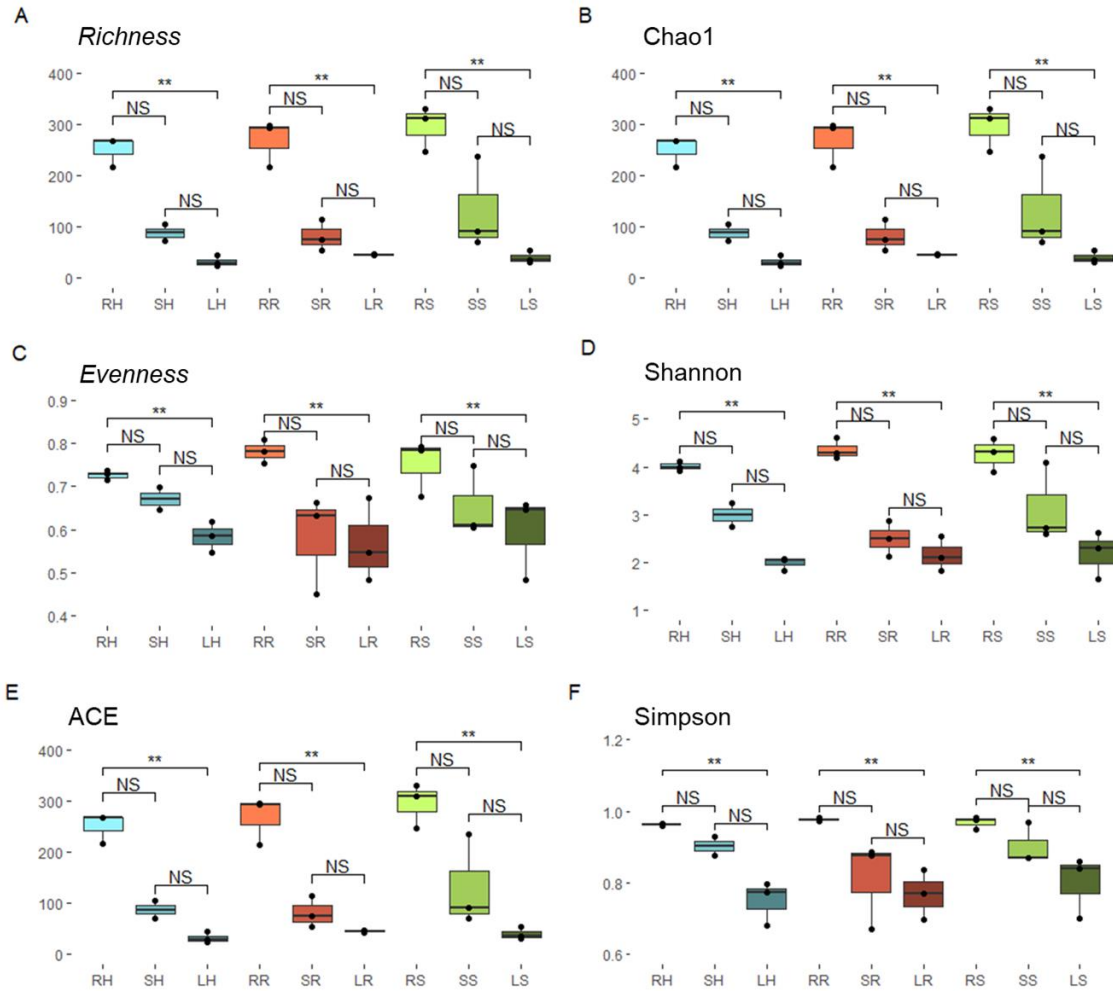


Figura 20. Comparación de los índices de alfa diversidad. A) Índice *Richness* (ASVs observados); B) Índice Chao1; C) Índice ACE; D) Índice *Evenness*; E) Índice Shannon; F) Índice Simpson. Analizado con el test de Dunn. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

Tabla 40. Comparación múltiple por pares mediante la prueba de Dunn de abundancia de taxones. Las significancias asintóticas bidireccionales (prueba bilateral) se muestran como valores $\pm Z$ (prueba Z por pares de Dunn). Pareja: indica las dos muestras que son comparadas. p-valor: nivel de significación estadística. q-valor: corrección de Bonferroni para múltiples pruebas. Se consideran significativos valores $<0,05$.

Índice	Par	Valor Z	Valor q	Valor p
<i>Richness</i>	LR - RR	-2,683	0,007	0,022
	LS - RS	-2,683	0,007	0,022
	LH - RH	-2,5	0,012	0,037
Chao1	LR - RR	-2,683	0,007	0,022
	LS - RS	-2,683	0,007	0,022
	LH - RH	-2,5	0,012	0,037
ACE	LR - RR	-2,683	0,007	0,022
	LS - RS	-2,683	0,007	0,022
	LH - RH	-2,5	0,012	0,037
Shannon	LR - RR	-2,405	0,016	0,048
	LS - RS	-2,47	0,014	0,041
	LH - RH	-2,515	0,012	0,036
Simpson	LH - RH	-2,594	0,009	0,028

Los índices para la diversidad beta resumen qué muestras difieren entre sí al considerar la abundancia de secuencias o considerar solo la presencia o ausencia de secuencias. En este trabajo usamos la disimilitud de Bray-Curtis (BC), uno de los índices más usados que mide la diferencia de la composición entre las comunidades bacterianas de dos muestras, basándose en los recuentos de cada muestra (Kers y Saccenti, 2022). Para visualizar los resultados, se construyeron gráficos de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de dos componentes, que permiten observar las diferencias de ordenación debido a los cambios en la composición de la comunidad bacteriana entre las muestras (Figura 21). Las diferencias estadísticas entre los tejidos vegetales y las ubicaciones fueron medidas mediante el análisis PERMANOVA (valores de $p \leq 0,01$). Las muestras fueron agrupadas fácilmente por tejido. Sin embargo, no hubo ordenación cuando se analizaron por ubicación (Tabla 41). La contribución de cada variable a la comunidad bacteriana fue realizada mediante un análisis de Adonis2, corroborando la teoría de que las comunidades están formadas por tejido ($R^2 = 0,56$; $\text{Pr}(> F) = 0,001$) y no por ubicación ($R^2 = 0,06$; $\text{Pr}(> F) = 0,676$).

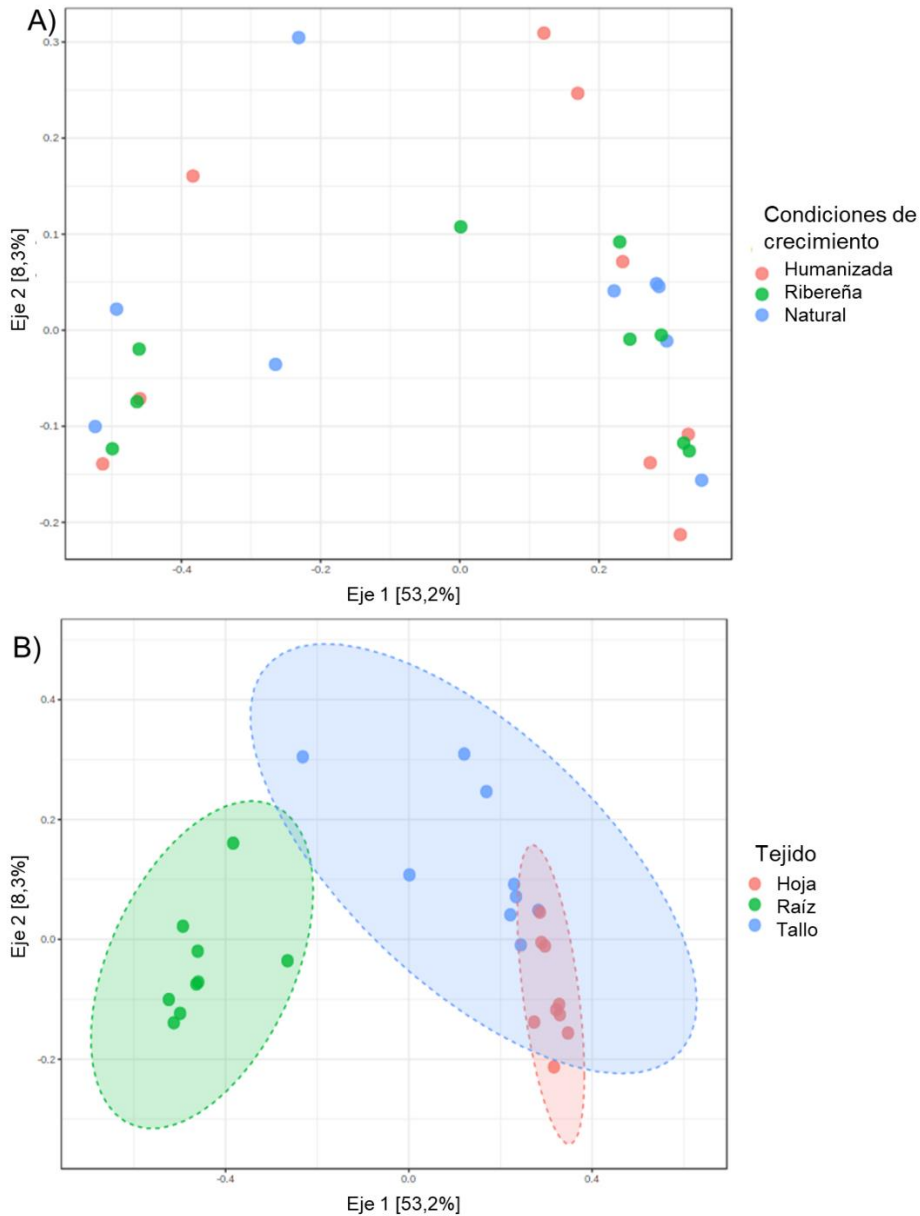


Figura 21. Gráfica PCoA analizando la relación entre los microbiomas de las muestras y la distribución de diferentes familias bacterianas.

Tabla 41. Resultados del análisis PERMANOVA por pares. El ajuste de pruebas múltiples se basa en el procedimiento de Benjamini-Hochberg (FDR: *false discovery rates*).

Pareja	Valor F	R ²	Valor p	FDR
Hoja vs Raíz	31,907	0,666	0,001	0,001
Hoja vs Tallo	4,615	0,224	0,001	0,001
Raíz vs Tallo	12,572	0,440	0,001	0,001

Es bien sabido que las plantas pueden influir en sus propios microbiomas, siendo capaces de reclutar grupos específicos para colonizar sus tejidos (Jones *et al.*, 2019). Los suelos son uno de los ambientes más heterogéneos y su diversidad suele exceder a la de otros hábitats (Daniel, 2005). Sin embargo, aunque los suelos poseen una alta diversidad, en los suelos rizosféricos toda esa diversidad está reducida a pocos filos (Acidobacteriota, Actinomycetota, Bacteroidota, Chloroflexota, Bacillota y Pseudomonadota) (Bulgarelli

et al., 2013). Por lo que las plantas parecen reclutar grupos bacterianos específicos para interactuar con ellas. De manera similar, la investigación sobre la diversidad de las raíces en diferentes especies de plantas ha demostrado que hay un enriquecimiento de filos específicos, principalmente Actinomycetota, Bacteroidota y Pseudomonadota, mientras que otros, como Acidobacteriota, disminuyen (Gottel *et al.*, 2011). Este último filo no suele identificarse como endófito ya que suele representar el 0,7% de los endófitos identificados (Hardoim *et al.*, 2015) y ha sido visto que son incapaces de colonizar el interior de los tejidos vegetales, probablemente debido a cambios en el pH, el O₂ y el contenido de nutrientes (Liu *et al.*, 2017). Nuestro estudio parece concordar con los estudios previos, pues el filo Acidobacteriota solo estuvo presente en las muestras de las raíces, representando el 1,7, el 4,4 y el 1,8% de las muestras de los ambientes Naturales, Ribereños y Humanizados respectivamente. Además, los análisis de diversidad alfa (Figura 20) revelaron que las muestras de las raíces fueron las más diversas y la diversidad disminuyó en las plantas cuánto más alejada del suelo fue tomada la muestra. Esto es debido a que las muestras de los tallos y de las hojas mostraron un enriquecimiento de algunas familias que estaban menos representadas en las muestras de raíces. En concreto, la concentración del filo Pseudomonadota aumentó del 49,5% en raíces al 55,0% y el 71,5% en tallos y hojas, respectivamente. Este efecto fue estudiado en otros cultivos, demostrando que Pseudomonadota es en general el filo más abundante en los bacterioma endofíticos de las plantas, ya que generalmente son seleccionadas por las plantas (Hardoim *et al.*, 2015; Pérez-Jaramillo *et al.*, 2018).

En algunos estudios anteriores, la clase Gammaproteobacteria era la que más aumentaba, donde representaban el 47% de las endosferas de la patata y del 30 al 98% de las del arroz (Liu *et al.*, 2017). En el caso de las plantas estudiadas en esta tesis, esta clase fue bastante abundante en raíces, representando un 15,8% en muestras de los ambientes Humanizados, un 20,8% en muestras de los ambientes Ribereños y un 22,7% en muestras de los ambientes Naturales. Sin embargo, en el resto de los tejidos, el porcentaje variaba según el entorno. En las muestras de los ambientes Humanizado y Natural, el contenido disminuía en tallos al 7,4 y al 6,2%, mientras que en las muestras de los ambientes Ribereños aumentaba al 31,1%. Las razones por las que las plantas parecen seleccionar este grupo de bacterias son desconocidas. Sin embargo, su presencia fue relacionada positivamente con la actividad inmunoestimuladora de las plantas (Kalpana *et al.*, 2019). La clase Alfaproteobacteria también representa un gran porcentaje de la composición de la comunidad bacteriana de las raíces y fue estudiada por ser uno de los grupos más representados dentro de las plantas en general. Además, los miembros de esta clase asociados a las plantas, principalmente las bacterias pertenecientes a los órdenes Hyphomicrobiales y Rhodospirillales, comparten un núcleo de genes que incluye un conjunto relacionado con el intercambio de metabolitos y la comunicación entre las plantas y las bacterias. De esta forma, los resultados obtenidos en esta tesis parecen coincidir, donde el filo Alfaproteobacteria representó gran parte de la comunidad de todas las muestras (Figura 16) (Pini *et al.*, 2011).

Otros filos que suelen aumentar en las raíces de plantas son los filos Actinomycetota y Bacteroidota (Bulgarelli *et al.*, 2015). Es sabido que los miembros del

filo Actinomycetota poseen varias actividades que pueden beneficiar el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, más del 20% de los miembros del filo Actinomycetota son capaces de solubilizar formas de fosfato, lo que permite a las plantas obtener ese nutriente (Bulgarelli *et al.*, 2015). De la misma manera, los miembros del filo Bacteroidota suelen estar asociados con actividades de PGP y protección contra patógenos (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2018).

De nuevo, estos resultados apoyan la teoría según la cual las plantas son capaces de seleccionar qué bacterias pueden colonizar sus tejidos (Zarraonaindia *et al.*, 2015). Los mecanismos de selección siguen siendo desconocidos. Sin embargo, han sido descritos algunos enfoques que involucran las interacciones planta-bacteria, las interacciones bacteria-bacteria y la contribución del sistema inmunológico de las plantas (Zarraonaindia *et al.*, 2015; Kalpana *et al.*, 2019). La mayoría de las bacterias endofíticas de las plantas provienen del suelo circundante y algunas pueden viajar a través del sistema vascular y establecerse en otros órganos (Thomas y Sahu, 2021). Por ejemplo, la bacteria *Azoarcus* sp. fue estudiada por ingresar a través de los haces de las raíces y propagarse sistémicamente a los tejidos de los brotes aéreos (Böhm *et al.*, 2007). Nuestros resultados parecían concordar con estas teorías por lo que parece plausible que en la mora las bacterias puedan colonizar las plantas a través de las raíces y viajar hasta llegar a los órganos del tallo y las hojas. Esto es visible ya que la diversidad es mayor en las muestras de raíz y disminuye cuanto más alejado del suelo está el órgano. Además, cuando es comparada la diversidad entre órganos, no existen diferencias estadísticas entre órganos adyacentes, como la raíz y el tallo, y el tallo y las hojas. Sólo existen diferencias significativas cuando se comparan las raíces con las hojas. Esto parece indicar que la colonización desde las raíces hasta las hojas está escalonada y cada órgano representa una barrera que impide que algunas de las bacterias lleguen a la parte superior (Kandel *et al.*, 2017).

Además, esta selección de las poblaciones endofíticas parece prevalecer sobre las condiciones ambientales y las impuestas por las actividades humanas. Estos datos refuerzan el concepto de la importante capacidad de reclutamiento y de selección que ejercen las plantas sobre el microbioma del suelo (Morella *et al.*, 2020) y sugieren que se requieren perturbaciones más profundas, como alteraciones climáticas, la introducción de contaminantes o la modificación de los ciclos biogeoquímicos, para que se produzcan modificaciones en las composiciones de estas comunidades (Berg y Cernava, 2022).

Comprender el microbioma central y accesorio de las especies silvestres relacionadas con las especies domésticas como *Rubus ulmifolius* puede ayudar en el desarrollo de estrategias innovadoras de bioestimulación para mejorar la adaptación de los cultivos, la resiliencia y la funcionalidad de sus microbiomas (Afridi *et al.*, 2022b). Este fenómeno es atribuido a que los procesos de domesticación están vinculados a una reducción en la diversidad, complejidad y funcionalidad de los microbiomas rizosféricos y endofíticos, disminuyendo ciertos rasgos como la resistencia a patógenos y la resiliencia al estrés (Gutierrez y Grillo, 2022). Por lo tanto, la selección de componentes centrales

del microbioma de especies silvestres puede representar una estrategia eficaz en el futuro para mejorar la aptitud de las plantas a través de su microbioma.

4.3. ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DIFERENCIAL Y EL MICROBIOMA CORE.

El estudio de los microbiomas debe de completarse con análisis adicionales basados en las tablas de abundancia de taxones, como los análisis de la abundancia diferencial (DAA) o el análisis del microbioma *core*.

4.3.1. Análisis de la abundancia diferencial (DAA).

Uno de los análisis estadísticos más importantes es el análisis de la abundancia diferencial (DAA), cuyo objetivo es identificar los taxones microbianos cuya abundancia covaría con una variable de interés. Los taxones microbianos identificados podrían ofrecer información biológica sobre los mecanismos y la dinámica temporal de las interacciones planta-microorganismo, las funciones y las redes de coexistencia del microbioma vegetal (Xiong *et al.*, 2021). Para este tipo de análisis, se han descrito diferentes aproximaciones para normalizar los datos. Una de ellas es el análisis del patrón de las relaciones logarítmicas por pares. Esta estrategia está basada en que los taxones no diferenciales de las muestras no presentarán diferencias en sus relaciones logarítmicas, mientras que los taxones que sí sean diferenciales destacarán por sí presentar diferencias en sus relaciones logarítmicas. Por lo tanto, al analizar el patrón de proporciones logarítmicas por pares, los taxones diferenciales son recuperados con alta confianza (Yang y Chen, 2022).

Para el análisis de la abundancia diferencial de este trabajo usamos la herramienta ANCOM. Según los estudios para evaluar la eficiencia de los métodos disponibles para el análisis DA (*differential abundance*), sólo ANCOM ofrece resultados robustos en el control del FDR (*false discovery rates*) manteniendo una alta potencia, siempre que el tamaño de la muestra no sea demasiado pequeño (Lin y Peddada, 2020; Nearing *et al.*, 2022).

Entre las muestras de las raíces y los tallos, aunque no existen diferencias significativas, observamos un ligero aumento de las bacterias de la familia *Xanthobacteraceae* en todas las muestras de las raíces (Figura 22.A.). Sucede lo mismo cuando las muestras de los tallos y las hojas son comparadas, donde ningún taxón parece tener importancia diferencial (Figura 22.B.). Sin embargo, al comparar las muestras de las raíces y de las hojas, aparecen abundancias diferenciales de varios taxones, tal y como fue observado en los ensayos anteriores. Las muestras de las hojas mostraron una alta abundancia de bacterias de la familia *Hymenobacteraceae* en todas las ubicaciones y de bacterias de la familia *Beijerinckiaceae* en las muestras de las hojas de los ambientes Ribereños y Naturales. Mientras que en las raíces existe gran abundancia de miembros de las familias *Micromonosporaceae*, *Xanthobacteraceae* y una familia desconocida que pertenece al filo Pseudomonadota. Además, hay un incremento considerable de las bacterias pertenecientes a la familia *Moraxellaceae* en las muestras de las raíces de los ambientes Ribereños (Figura 22.C.).

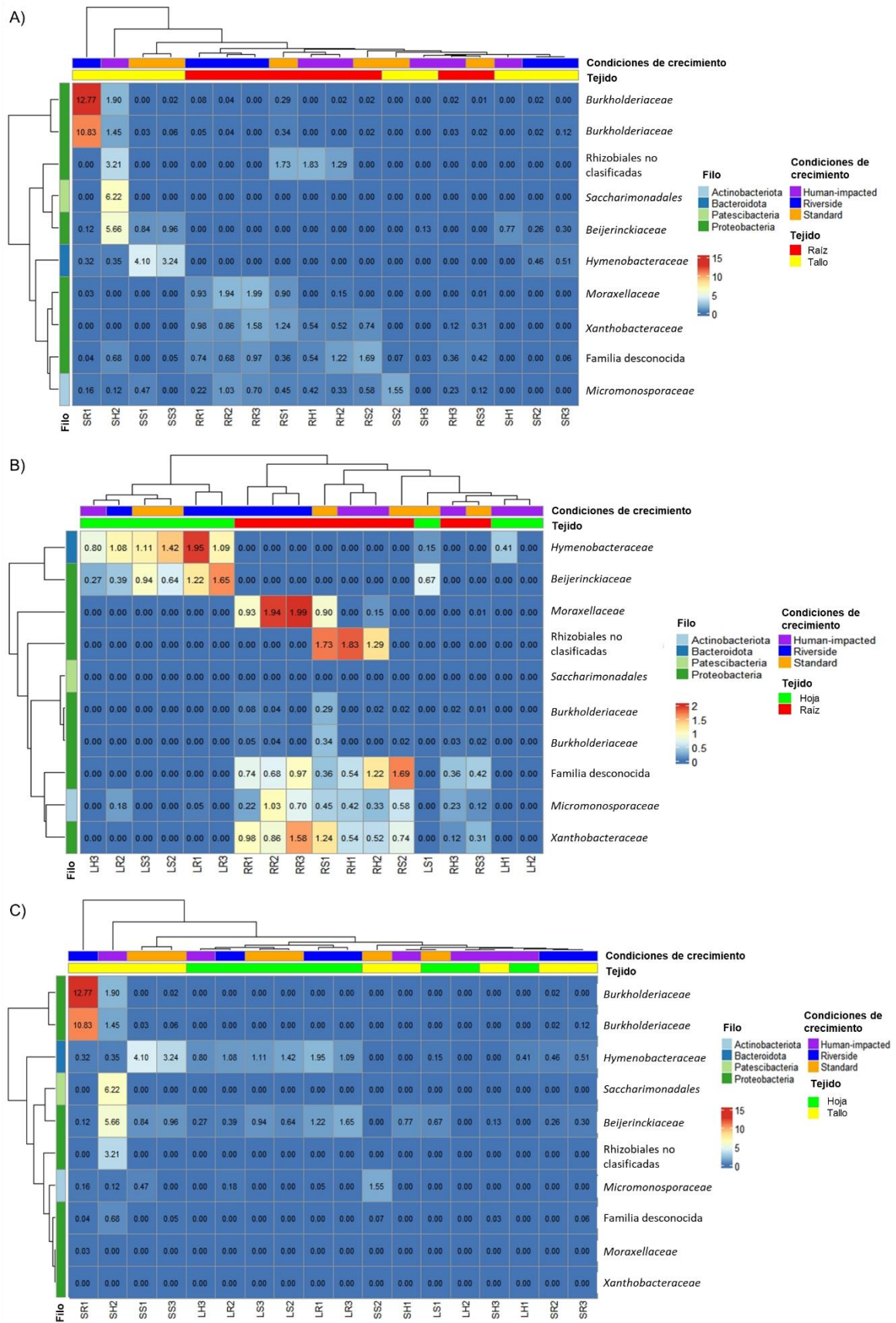


Figura 22. Análisis de las abundancias diferenciales entre: A) Las muestras de las hojas y los tallos. B) Las muestras de las raíces y los tallos. C) Las muestras de las hojas y las raíces. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo

de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

Como ya hemos comentado a lo largo del capítulo, en los últimos años ha surgido la teoría de que las plantas son capaces de seleccionar y de promover la colonización de aquellos microorganismos circundantes que puedan aportarles algún beneficio (Santoyo, 2022). Las familias de bacterias *Micromonosporaceae* y *Xanthobacteraceae* marcan la diferencia en todas las muestras de las raíces, por lo que es probable que estas colaboren de alguna manera en el bienestar de la planta. Las especies del género *Micromonospora*, perteneciente a la familia *Micromonosporaceae*, fueron estudiadas por sus mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y biorremediación. La inoculación con *Micromonospora saelicesensis* GAR05 y *Micromonospora saelicesensis* PSN13 en *Arabidopsis thaliana* promovió el crecimiento de las plantas en condiciones de contaminación por metales pesados (Ortúzar *et al.*, 2020). Además, también demostraron ser una fuente de metabolitos secundarios beneficiosos para las plantas, como los sideróforos o los antibióticos (Yan *et al.*, 2022). *Xanthomonaceae* es una familia que alberga patógenos vegetales como los miembros del género *Xanthomonas*, pero que también fue estudiada por su potencial papel en la promoción del crecimiento vegetal y la colonización de los tejidos vegetales (Chen *et al.*, 2021a). Otro motivo por el que las plantas puedan seleccionar a los miembros de esta familia puede ser la inducción de la resistencia sistémica, pues *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99 fue estudiada por inducir la respuesta de la ruta del ácido salicílico en las raíces, la expresión de genes que codifican varias enzimas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y la producción de ROS y de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Santoyo, 2022).

4.3.2. Análisis del microbioma core.

Otro de los análisis más habituales es el análisis del microbioma *core*, el cual es definido como un conjunto de taxones que aparecen consistentemente dentro de un tipo de hábitat dado. Este concepto es explorado al examinar las abundancias de taxones y su ocupación en múltiples muestras, que a menudo incluye variación espacio-temporal. Estos conjuntos comunes de especies microbianas dentro de cada hábitat son importantes pues suelen asociarse con el mantenimiento del funcionamiento básico del ecosistema. Por ello, la identificación y conservación de miembros *core* en una variedad de sistemas ha cobrado cada vez más importancia, arropado por el contexto de un clima en constante cambio y la utilización de microorganismos para el mantenimiento de procesos esenciales de un ecosistema (Custer *et al.*, 2023).

El análisis del microbioma *core* fue evaluado a nivel familias bacterianas en todas las muestras de forma independiente. Los resultados son visualizados con un *heatmap* en el que aparece que la familia más abundante en todos los grupos fue *Sphingomonadaceae* (Figura 23). Tal y como demostró en el análisis DA, la familia *Xanthobacteriaceae* sólo

prevalece en muestras de raíces. De la misma manera, *Moraxellaceae*, que parecía ser abundante en el análisis DA de las raíces de los ambientes Ribereños, también pertenece al microbioma *core* de estas muestras. Tres familias, *Hymenobacteraceae*, *Microbacteraceae* y *Beijerinckiaceae*, demostraron pertenecer al microbioma *core* de todas las muestras de los tallos y las hojas. Finalmente, la familia *Oxallobacteriaceae* solo apareció en el microbioma *core* de las muestras de las hojas. En general, las muestras de los tallos y de las hojas comparten más taxones que cualquier otro grupo.

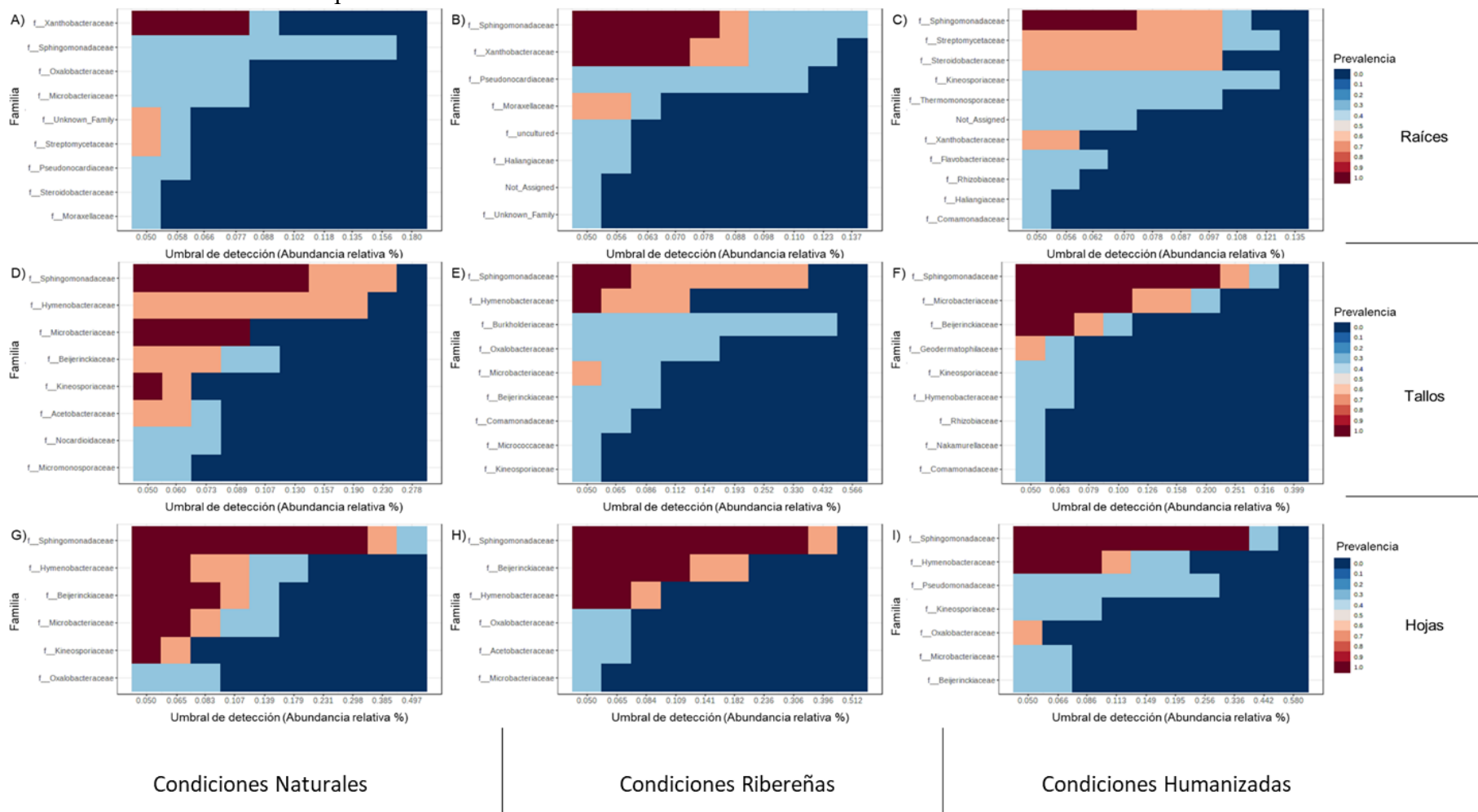


Figura 23. Análisis del microbioma *Core*. A) Las muestras de las raíces en el ambiente Natural; B) Las muestras de las raíces en el ambiente Ribereño; C) Las muestras de las raíces en el ambiente Humanizado; D) Las muestras de los tallos en el ambiente Natural; E) Las muestras de los tallos en el ambiente Ribereño; F) Las muestras de los tallos en el ambiente Humanizado; G) Las muestras de las hojas en el ambiente Natural; H) Las muestras de las hojas en el ambiente Ribereño; I) Las muestras de las hojas en el ambiente Humanizadas. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas.

Hasta la fecha, esta es la primera vez que se realiza un análisis del microbioma *core* del interior de los tejidos de las plantas de *Rubus ulmifolius* o de alguno de los géneros relacionados. Además, aunque numerosos estudios han sido realizados durante los últimos años sobre el microbioma *core* de otras especies vegetales como el del azúcar de caña, la patata, el arroz o el maíz, la mayoría de ellos han sido realizados sobre el microbioma *core* de la rizosfera o las raíces, por lo que el estudio realizado en esta tesis no es completamente comparable (Neu *et al.*, 2021).

Sin embargo, algunos estudios sí han sido realizados en diferentes tejidos vegetales. El estudio del microbioma *core* asociado a árboles del género *Populus* mostró que en las raíces el microbioma *core* estaba conformado por los géneros *Rhizobium*, *Variovorax*, *Novosphingobium* y *Niastella*, en los tallos estaba conformado por los géneros *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Deinococcus*, *Alcaligenaceae* y *Corynebacterium*, y en las muestras de las hojas, por los géneros *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Moraxellaceae* y *Aurantimonas* (Beckers *et al.*, 2017). Por otro lado, el análisis de los microbiomas *core* de plantas de agave mostró que en las raíces predominaban los taxones bacterianos *Actinosynnemataceae*, *Promicromonospora* *Hyphomicrobiales*, *Stenotrophomonas* y *Agrobacterium* mientras que en las endosferas de las hojas predominaban *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Leclercia* (Coleman-Derr *et al.*, 2016). En el análisis del microbioma de plantas de caña de azúcar describió que los taxones bacterianos más asociados a los tejidos de las raíces eran las familias *Hyphomicrobiaceae*, *Cytophagaceae* y *Sinobacteraceae* mientras que los más asociados a los tejidos de los tallos y las hojas eran *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* y *Pseudomonadaceae* (De Souza *et al.*, 2016).

En general, los resultados obtenidos en los análisis de esta tesis son bastante diversos con respecto a los estudios realizados en otras especies vegetales. Sin embargo, esto es algo perfectamente normal ya que el microbioma *core* esta influenciado, entre otras cosas, por el genotipo de la planta (Dastogeer *et al.*, 2020). A pesar de estas diferencias, todos estos taxones bacterianos suelen estar asociados con algún tipo de actividad beneficiosa para las plantas. Así, los miembros de la familia *Sphingomodanaceae* asociados a las plantas de zarzamora o a las muestras de hojas de árboles del género *Populus*, fueron vinculados con actividades de protección de las plantas frente a fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* o de mejora de las condiciones del suelo por su capacidad de producir exopolisacáridos y lipopolisacáridos (Harrison y Griffin, 2020; Hirpara *et al.*, 2024).

4.4. PREDICCIÓN DE LAS RUTAS METABÓLICAS ASOCIADAS A LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LAS PLANTAS DE ZARZAMORA.

Las bacterias que habitan los tejidos vegetales pueden estar involucradas en diferentes procesos que beneficien a las plantas, como la promoción del crecimiento vegetal o la protección frente a estreses bióticos y abióticos (Mengistu, 2020). Aunque nuestros datos son limitados, ya que la secuenciación masiva ha sido realizada en el gen ARNr 16S, algunas herramientas, han sido desarrolladas en los últimos años, permiten inferir el potencial metabólico a partir de las identificaciones por este gen. Una de esas herramientas es el PICRUS2, que predice el potencial funcional de una comunidad bacteriana basándose en perfiles de secuenciación de genes marcadores (Douglas *et al.*, 2020).

El análisis de la tabla de ASVs utilizando PICRUS2 reveló un total de 145 rutas funcionales. De ellas, 54 rutas metabólicas predichas (37,2% del total de rutas predichas) fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Estas rutas incluyeron procesos metabólicos como la biosíntesis de lipopolisacáridos, la fijación de carbono, el metabolismo de los ácidos grasos, la glucólisis, la gluconeogénesis y varios procesos anabólicos y catabólicos (Figura 24 y Tabla 42). Entre ellos, existen rutas que son relevantes para la producción de metabolitos secundarios, como antibióticos como la vancomicina o la tetraciclina. Además, algunas rutas relacionadas con la tolerancia a la sequía y al estrés por calor fueron identificadas, como la biosíntesis de carbohidratos solubles, prolina y moléculas antioxidantes. También la inducción de mecanismos de defensa de las plantas, como los terpenoides, y la síntesis de moléculas promotoras del crecimiento de las plantas, como el triptófano.

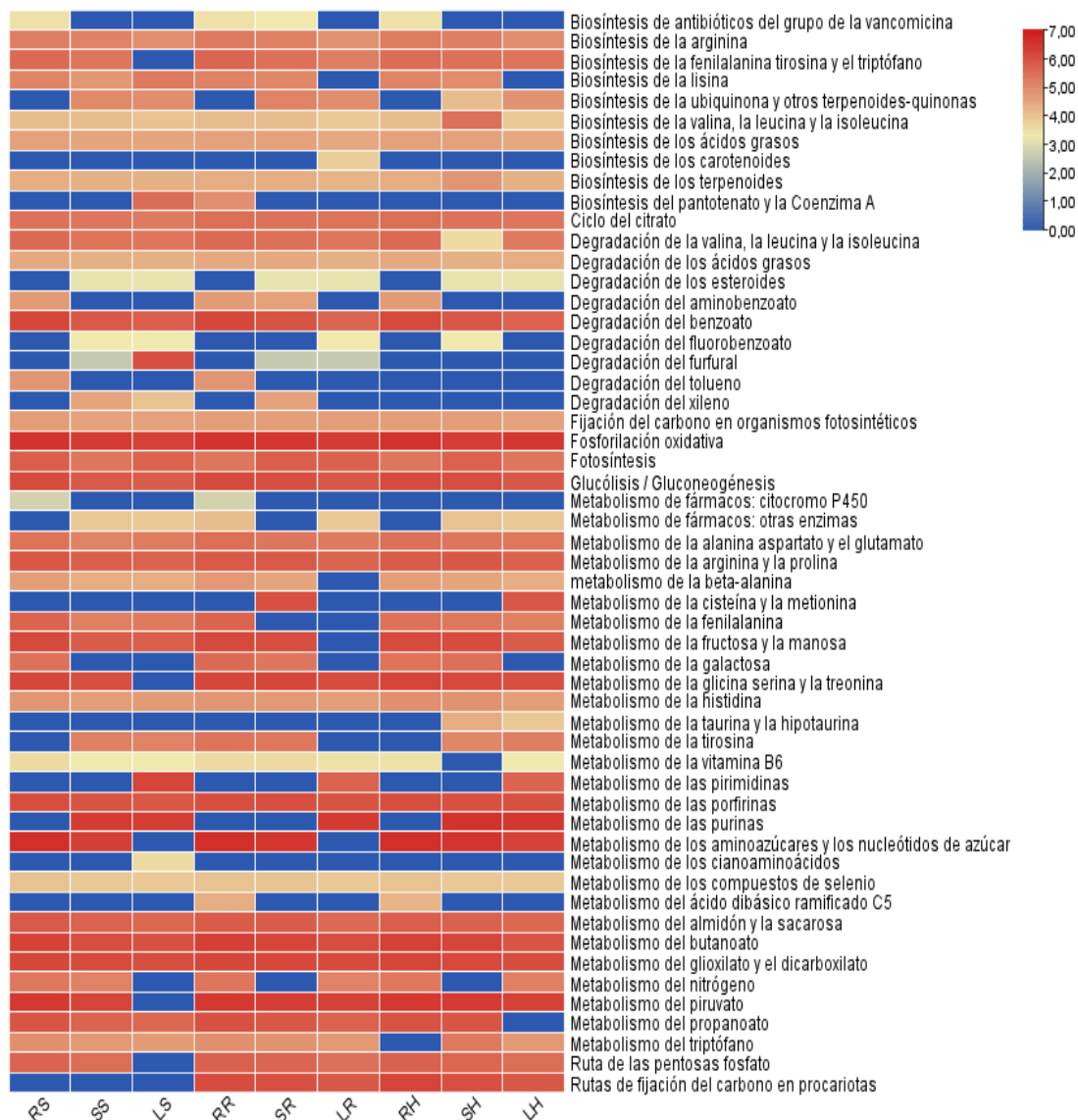


Figura 24. Visualización de las rutas metabólicas más prevalentes de cada muestra en función del número de *KEGG ORTHOLOGY* (KO) predichos en cada una de las muestras. Las muestras son representadas en las columnas y las rutas metabólicas en las filas. Los colores más rojizos indican que en esa muestra se han predicho un mayor número de KOs relacionados con una ruta metabólica. RS: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; SS: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; LS: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Naturales; RR: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; SR: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; LR: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Ribereños; RH: muestras de la raíz de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; SH: muestras del tallo de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas; LH: muestras de las hojas de las plantas de zarzamora de los ambientes Humanizadas

Tabla 42. Vías metabólicas previstas relacionadas con la biosíntesis de compuestos antioxidantes inferidas por PICRUST2 en las comunidades bacterianas de las plantas de *Rubus ulmifolius*. Hits indica el número de coincidencias para esa ruta. Valor p, nivel de significación estadística. FDR, *false discovery rates*. Se consideran significativos valores <0,05.

Ruta	Raíz - Natural			Tallo - Natural			Hojas - Natural			Raíz - Ribereña			Tallo - Ribereño			Hojas - Ribereñas			Raíz - Humanizada			Tallo - Humanizado			Hojas - Humanizadas		
	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR
Biosíntesis de antibióticos del grupo de la vancomicina	11	0,005	0,033	-	-	-	-	-	-	11	0,005	0,028	10	0,020	0,092	-	-	-	11	0,004	0,025	-	-	-	-	-	-
Biosíntesis de la arginina	37	0,003	0,026	35	0,000	0,001	30	0,010	0,057	39	0,000	0,003	36	0,001	0,009	29	0,024	0,104	38	0,001	0,006	37	0,000	0,001	31	0,006	0,036
Biosíntesis de la fenilalanina tirosina y el triptófano	47	0,001	0,017	41	0,001	0,005	-	-	-	50	0,000	0,001	44	0,002	0,015	37	0,015	0,071	46	0,002	0,014	44	0,001	0,006	42	0,000	0,003
Biosíntesis de la lisina	34	0,003	0,026	27	0,022	0,090	39	0,000	0,003	35	0,001	0,009	33	0,001	0,010	-	-	-	34	0,002	0,014	31	0,027	0,106	-	-	-
Biosíntesis de la ubiquinona y otros terpenoides-quinonas	-	-	-	32	0,004	0,025	31	0,007	0,043	-	-	-	35	0,006	0,031	31	0,008	0,048	-	-	-	17	0,000	0,001	29	0,039	0,151
Biosíntesis de la valina, la leucina y la isoleucina	17	0,000	0,005	17	0,000	0,000	16	0,000	0,001	17	0,000	0,004	17	0,000	0,002	15	0,001	0,009	17	0,000	0,004	44	0,000	0,001	15	0,001	0,008
Biosíntesis de los ácidos grasos	24	0,006	0,036	23	0,000	0,003	23	0,000	0,003	24	0,005	0,029	24	0,001	0,010	22	0,001	0,012	24	0,004	0,025	24	0,001	0,005	22	0,001	0,011
Biosíntesis de los carotenoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	0,046	0,191	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biosíntesis de los terpenoides	21	0,002	0,020	20	0,000	0,002	20	0,000	0,002	21	0,002	0,014	21	0,000	0,004	19	0,001	0,009	21	0,001	0,011	28	0,025	0,102	20	0,000	0,002
Biosíntesis del pantotenato y la Coenzima A	-	-	-	-	-	-	46	0,001	0,008	30	0,010	0,046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclo del citrato	43	0,004	0,031	41	0,000	0,001	39	0,000	0,003	45	0,000	0,006	43	0,000	0,004	42	0,000	0,000	45	0,000	0,005	43	0,000	0,002	41	0,000	0,001
Degradación de la valina, la leucina y la isoleucina	47	0,000	0,002	42	0,000	0,001	41	0,000	0,001	48	0,000	0,001	44	0,000	0,004	41	0,000	0,001	48	0,000	0,001	12	0,001	0,006	39	0,001	0,008
Degradación de los ácidos grasos	22	0,004	0,031	20	0,001	0,011	20	0,001	0,009	22	0,004	0,023	22	0,001	0,009	20	0,001	0,012	22	0,003	0,019	20	0,009	0,045	21	0,000	0,003
Degradación de los esteroides	-	-	-	9	0,009	0,051	9	0,008	0,048	-	-	-	9	0,032	0,128	9	0,009	0,050	-	-	-	9	0,024	0,101	9	0,009	0,049
Degradación del aminobenzoato	26	0,033	0,149	-	-	-	-	-	-	26	0,030	0,121	24	0,048	0,177	-	-	-	26	0,023	0,104	-	-	-	-	-	-
Degradación del benzoato	73	0,000	0,000	58	0,000	0,003	54	0,005	0,030	73	0,000	0,000	63	0,001	0,010	50	0,050	0,202	70	0,000	0,001	59	0,007	0,037	52	0,021	0,094
Degradación del fluorobenzoato	-	-	-	10	0,016	0,072	10	0,015	0,074	-	-	-	-	-	-	10	0,016	0,071	-	-	-	10	0,043	0,156	-	-	-
Degradación del furfural	-	-	-	6	0,014	0,066	66	0,000	0,001	-	-	-	6	0,035	0,137	6	0,013	0,070	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación del tolueno	28	0,035	0,152	-	-	-	-	-	-	28	0,032	0,123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación del xileno	-	-	-	23	0,013	0,066	16	0,411	-	-	-	24	0,048	0,177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fijación del carbono en organismos fotosintéticos	25	0,000	0,002	24	0,000	0,000	24	0,000	0,000	25	0,000	0,001	25	0,000	0,000	25	0,000	0,000	25	0,000	0,001	25	0,000	0,000	24	0,000	0,000
Fosforilación oxidativa	93	0,000	0,000	83	0,000	0,000	78	0,000	0,000	93	0,000	0,000	89	0,000	0,000	84	0,000	0,000	93	0,000	0,000	81	0,000	0,001	87	0,000	0,000
Fotosíntesis	54	0,000	0,000	41	0,000	0,001	52	0,000	0,000	41	0,032	0,123	54	0,000	0,000	53	0,000	0,000	41	0,023	0,104	52	0,000	0,000	41	0,011	0,002
Glucólisis / Gluconeogénesis	69	0,000	0,004	58	0,000	0,003	57	0,001	0,006	70	0,000	0,001	66	0,000	0,002	59	0,000	0,002	69	0,000	0,002	67	0,000	0,000	59	0,000	0,002
Metabolismo de fármacos: citocromo P450	7	0,036	0,152	-	-	-	-	-	-	7	0,035	0,123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolismo de fármacos: otras enzimas	-	-	-	15	0,017	0,072	15	0,015	0,074	17	0,023	0,098	-	-	-	15	0,016	0,071	-	-	-	16	0,019	0,087	15	0,017	0,076
Metabolismo de la alanina aspartato y el glutamato	42	0,011	0,059	35	0,014	0,066	38	0,001	0,008	45	0,000	0,006	41	0,003	0,018	39	0,000	0,005	44	0,001	0,009	41	0,001	0,008	40	0,000	0,002
Metabolismo de la arginina y la prolina	60	0,002	0,021	54	0,000	0,001	51	0,001	0,009	58	0,008	0,040	58	0,001	0,006	51	0,001	0,012	57	0,010	0,052	59	0,000	0,001	53	0,000	0,003
Metabolismo de la beta-alanina	25	0,023	0,105	21	0,028	0,107	21	0,024	0,111	27	0,002	0,014	23	0,038	0,147	-	-	-	25	0,016	0,078	23	0,023	0,101	21	0,028	0,119
Metabolismo de la cisteína y la metionina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	0,029	0,122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	0,007	0,041
Metabolismo de la fenilalanina	51	0,000	0,001	36	0,043	0,157	39	0,003	0,018	51	0,000	0,001	-	-	-	-	-	-	43	0,036	0,153	40	0,032	0,119	36	0,043	0,161
Metabolismo de la fructosa y la manosa	70	0,007	0,043	56	0,025	0,099	54	0,049	0,197	70	0,006	0,031	67	0,003	0,018	-	-	-	69	0,007	0,038	68	0,000	0,003	57	0,015	0,073
Metabolismo de la galactosa	43	0,037	0,152	-	-	-	-	-	-	47	0,001	0,011	41	0,023	0,105	-	-	-	42	0,044	0,183	44	0,001	0,006	-	-	-
Metabolismo de la glicina serina y la treonina	73	0,004	0,030	67	0,000	0,001	-	-	-	73	0,003	0,020	73	0,000	0,002	68	0,000	0,000	75	0,000	0,005	71	0,000	0,002	67	0,000	0,001
Metabolismo de la histidina	28	0,019	0,092	25	0,006	0,036	26	0,002	0,012	28	0,017	0,076	27	0,011	0,057	25	0,005	0,036	30	0,001	0,011	29	0,001	0,004	25	0,006	0,038
Metabolismo de la taurina y la hipotaurina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	0,000	0,002	15	0,032	0,135
Metabolismo de la tirosina	-	-	-	36	0,022	0,090	35	0,033	0,142	42	0,041	0,142	40	0,029	0,122	-	-	-	-	-	-	33	0,015	0,072	37	0,011	0,058
Metabolismo de la vitamina B6	12	0,003	0,026	10	0,016	0,072	10	0,015	0,074	12	0,003	0,020	12	0,001	0,010	11	0,002	0,019	11	0,022	0,104	-	-	-	10	0,016	0,076
Metabolismo de las pirimidinas	-	-	-	-	-	-	75	0,000	0,001	-	-	-	-	-	-	52	0,018	0,081	-	-	-	-	-	-	51	0,035	0,140
Metabolismo de las porfirinas	67	0,002	0,021	62	0,000	0,001	60	0,000	0,001	67	0,002	0,014	66	0,000	0,003	62	0,000	0,000	67	0,001	0,009	65	0,000	0,001	64	0,000	0,000
Metabolismo de las purinas	-	-	-	83	0,041	0,153	82	0,042	0,176	-	-	-	-	-	-	85	0,016	0,071	-	-	-	93	0,026	0,103	88	0,005	0,033

Continúa...

Continuación Tabla 42.

Ruta	Raíz - Natural			Tallo - Natural			Hojas - Natural			Raíz - Ribereña			Tallo - Ribereño			Hojas - Ribereñas			Raíz - Humanizada			Tallo - Humanizado			Hojas - Humanizadas		
	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR	Hits	Valor p	FDR
Metabolismo de los aminoazúcares y los nucleótidos de azúcar	97	0,005	0,033	80	0,006	0,036	-	-	-	98	0,002	0,016	89	0,012	0,061	-	-	-	97	0,002	0,014	90	0,002	0,011	76	0,036	0,140
Metabolismo de los cianoaminoácidos	-	-	-	-	-	-	12	0,029	0,128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolismo de los compuestos de selenio	16	0,013	0,068	15	0,003	0,021	15	0,003	0,017	16	0,012	0,055	16	0,004	0,023	15	0,003	0,020	16	0,010	0,052	15	0,012	0,059	15	0,003	0,023
Metabolismo del ácido dibásico ramificado C5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	0,006	0,030	-	-	-	-	-	-	19	0,047	0,191	-	-	-	-	-	-
Metabolismo del almidón y la sacarosa	58	0,001	0,014	52	0,000	0,001	49	0,001	0,008	57	0,002	0,015	56	0,000	0,004	48	0,002	0,019	55	0,006	0,036	53	0,001	0,009	49	0,001	0,011
Metabolismo del butanoato	78	0,000	0,002	67	0,000	0,001	64	0,000	0,003	79	0,000	0,001	74	0,000	0,002	67	0,000	0,001	78	0,000	0,001	74	0,000	0,000	61	0,004	0,028
Metabolismo del glioxilato y el dicarboxilato	73	0,000	0,000	69	0,000	0,000	67	0,000	0,000	73	0,000	0,000	72	0,000	0,000	70	0,000	0,000	74	0,000	0,000	71	0,000	0,000	68	0,000	0,000
Metabolismo del nitrógeno	40	0,045	0,176	35	0,014	0,066	-	-	-	41	0,020	0,086	-	-	-	35	0,012	0,066	40	0,029	0,127	-	-	-	36	0,007	0,039
Metabolismo del piruvato	86	0,001	0,014	75	0,000	0,001	-	-	-	86	0,001	0,008	82	0,000	0,004	78	0,000	0,000	86	0,000	0,005	83	0,000	0,001	78	0,000	0,000
Metabolismo del propanoato	61	0,013	0,068	51	0,011	0,058	49	0,025	0,114	64	0,001	0,011	60	0,002	0,012	52	0,005	0,035	63	0,001	0,012	61	0,000	0,002	-	-	-
Metabolismo del triptófano	30	0,038	0,152	27	0,009	0,049	26	0,016	0,080	30	0,034	0,123	29	0,020	0,092	27	0,008	0,048	-	-	-	39	0,028	0,106	27	0,009	0,047
Ruta de las pentosas fosfato	51	0,017	0,086	45	0,003	0,021	-	-	-	53	0,003	0,020	50	0,004	0,021	44	0,006	0,036	53	0,002	0,014	49	0,003	0,016	45	0,003	0,023
Vías de fijación del carbono en procariotas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69	0,034	0,123	65	0,029	0,122	59	0,011	0,059	75	0,000	0,005	65	0,011	0,053	59	0,012	0,062

La búsqueda de las rutas metabólicas relevantes entre los miembros de la comunidad bacteriana asociada a las plantas de *Rubus ulmifolius* en los tres ambientes diferentes reveló que algunas de las rutas estaban relacionadas con la tolerancia a la sequía y al estrés por calor, dos de los factores abióticos más importantes en la zona de muestreo, debido a las condiciones climáticas de la región. Los endófitos bacterianos participan en la mitigación del estrés mediante la reducción del daño celular, el aumento de la fotosíntesis y la acumulación de metabolitos asociados al estrés, como la prolina (Kamran *et al.*, 2022). La síntesis de la prolina ha sido estudiada previamente por estar presentes en el metabolismo de otras bacterias endófitas de plantas (Gagné-Bourque *et al.*, 2016). Por ejemplo, la inoculación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 en plantas de caña de azúcar aumenta el contenido de prolina en las plantas en condiciones de sequía (Santoyo, 2022).

Además de la tolerancia al estrés abiótico, los endófitos bacterianos también pueden participar en la mitigación del estrés biótico y en las actividades de promoción del crecimiento de las plantas. En este caso, el análisis de las vías metabólicas reveló algunas rutas relacionadas, como la biosíntesis del cuerpo principal de los terpenoides y el metabolismo del triptófano. Los terpenoides son compuestos orgánicos volátiles, conocidos por su actividad antifúngica y antibacteriana (Lim *et al.*, 2017). El aumento de algunos tipos de terpenoides en las plantas de *Panax ginseng* fue relacionado con la presencia de la bacteria *Agrobacterium* sp. PDA-2 (Yan *et al.*, 2019). El triptófano es el precursor del ácido indol-3-acético (AIA), una auxina responsable del crecimiento de las plantas y ya se ha demostrado que la inoculación con bacterias de los géneros *Sphingomonas*, *Bacillus* o *Methylobacterium* mejora el crecimiento en plantas como *Solanum lycopersicum* debido a la producción AIA (Khan *et al.*, 2016). De nuevo, los análisis metataxonómicos revelaron que tanto el género *Sphingomonas* como el género *Methylobacterium* formaban parte de la composición mayoritaria de las plantas de zarzamora.

**5. CAPÍTULO II:
OBTENCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE UNA
COLECCIÓN DE BACTERIAS
ENDÓFITAS DEL INTERIOR DE
PLANTAS DE ZARZAMORA**

En el Capítulo I observamos que las comunidades endofíticas de las plantas de *Rubus ulmifolius* Schott estaban conformadas por una gran diversidad bacteriana, la cual podría albergar un considerable potencial metabólico. Los métodos independientes de cultivos, como la secuenciación masiva de amplicones llevada a cabo en el capítulo anterior, proporcionan información fiable sobre las comunidades bacterianas que albergan los diferentes ecosistemas, sin embargo, aproximadamente el 80% de estas no son cultivables (Pereira y Cunha, 2020). En este sentido, la información proporcionada por este tipo de análisis suele completarse con el aislamiento de las bacterias cultivables en condiciones controladas de laboratorio. Esto permitiría obtener una colección de individuos valiosos, y además estudiar las adaptaciones metabólicas novedosas que podrían servir para el desarrollo de futuras aplicaciones biotecnológicas (Blandón *et al.*, 2022).

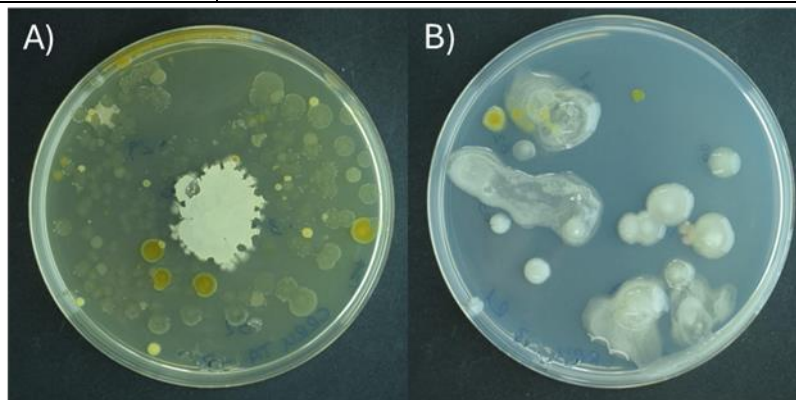
Para ello, existe un enfoque basado en la combinación de métodos dependientes de cultivo integrados con técnicas de identificación de alto rendimiento, que en ocasiones recibe la denominación de culturómica. Este método está basado en la utilización de medios de cultivos selectivos y no selectivos, combinados con la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) y con la identificación molecular basada en la secuenciación de las regiones hipervariables del gen ARNr 16S (Diakite *et al.*, 2020). Por lo tanto, en este capítulo llevamos a cabo un proceso de culturómica. Para el aislamiento de los microorganismos usamos los medios TSA, que es un medio generalista, e YMA, que es un medio específico pero no selectivo, muy utilizado para el crecimiento de bacterias del género *Rhizobium* y que contiene manitol como fuente de carbono (Ekyastuti *et al.*, 2022). Una vez realizado el aislamiento de los endófitos de *Rubus ulmifolius* Schott, los aislados obtenidos fueron identificados mediante la técnica MALDI-TOF MS y mediante la secuenciación del gen ARNr 16S (Lagier *et al.*, 2016).

5.1. AISLAMIENTO.

Los resultados obtenidos en el Capítulo I parecían indicar que la composición endofítica de las plantas de *Rubus ulmifolius* Schott estaba influenciada por el tejido vegetal del que era tomada la muestra y no de la localización de la planta. Por lo tanto, el aislamiento de las bacterias endofíticas se realizó del interior de muestras de las raíces y los tallos de plantas de zarzamora recogidas de un ambiente Natural, según la clasificación usada en el Capítulo I. En total, 70 cepas endofíticas fueron aisladas de diferentes partes de la planta, concretamente 39 fueron aisladas de la raíz y 31 del tallo (Tabla 43 y Figura 25).

Tabla 43. Cepas aisladas a partir de diferentes órganos de *Rubus ulmifolius* Schott.

Parte de la planta	Cepas
Raíz	CRRU02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20A, 20B, 21, 52, 53, 57, 58, 59A, 59B, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72
Tallo	CRRU22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 54, 55, 56

**Figura 25.** Ejemplos de la diversidad microbiana obtenida a partir de las muestras de zarzamora en A) TSA y B) YMA.

5.2. MALDI-TOF MS.

Los 70 aislados obtenidos fueron comparados frente a dos bases de datos usando la técnica MALDI-TOF MS. La primera fue la base de datos de Bruker, que contiene más de 4.000 cepas diferentes, mientras que la segunda fue una base de datos propia de nuestro grupo de investigación, que recoge más de 100 especies de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* (Sánchez-Juanes *et al.*, 2013). La base de datos de Bruker permitió la identificación a nivel de especie del 12,9% de las cepas y la identificación a nivel de género del 20%. Mientras que la base de datos de la familia *Rhizobiaceae* permitió la identificación a nivel de especie del 17,1% de las cepas y la identificación a nivel de género del 8,5%. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 44. Los perfiles de proteínas fueron comparados y agrupados en base a un 80% de similitud. Esto permitió agrupar a los 70 aislados diferentes en 35 grupos según sus perfiles proteicos (Figura 26). De cada uno de los grupos obtenidos, un único representante fue seleccionado para la identificación mediante la secuenciación del gen ARNr 16S.

Tabla 44. Resumen de la identificación mediante las técnicas MALDI-TOF y Secuenciación del gen ARNr 16S de las 70 cepas aisladas.

Cepa	Tejido	Identidad por MALDI-TOF				Secuenciación del gen ARNr 16S		Número de acceso	
		Grupo	Base de datos Bruker	Puntuación	Base de datos <i>Rhizobium</i>	Puntuación	Identidad		Porcentaje de identidad
CRRU44	Tallo	1	I.N.F	1,501	I.N.F	1,101	<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMG 14904 ^T	95,5	MT146893.1
CRRU60	Raíz	2	I.N.F	1,592	I.N.F	0,939	<i>Mesorhizobium australicum</i> ICMP 19515 ^T	100	OQ196014
CRRU38	Tallo	3	<i>Pantoea agglomerans</i>	2,283	I.N.F	0,684	<i>Pantoea agglomerans</i> JCM 1236 ^T	99,0	OQ195998
CRRU34	Tallo	4	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1,879	I.N.F	0,823	<i>Curtobacterium pusillum</i> DSM 20527 ^T	99,6	OQ195994
CRRU54	Tallo	5	I.N.F	1,45	I.N.F	1,238	<i>Curtobacterium herbarum</i> P 420/07 ^T	99,0	OQ196007
CRRU37	Tallo	6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	2,021	I.N.F	0,912	<i>Curtobacterium pusillum</i> DSM 20527 ^T	99,6	OQ195997
CRRU21	Raíz	7	I.N.F	1,556	I.N.F	0,921	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117 ^T	98,8	OQ195989
CRRU48	Tallo	8	<i>Methylobacterium organophilum</i>	1,938	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	1,878	<i>Methylobacterium bullatum</i> F3.2 ^T	100	OQ196005
CRRU59A	Raíz	9	I.N.F	1,484	I.N.F	0,931	<i>Cellulosimicrobium composti</i> BIT-GX5 ^T	98,8	OQ196012
CRRU42	Tallo	10	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	2,041	I.N.F	1,077	<i>Pantoea septica</i> LMG 5345 ^T	99,2	OQ196001
CRRU59B	Raíz	11	I.N.F	1,647	I.N.F	0,953	<i>Neobacillus drentensis</i> NBRC 102427 ^T	99,8	OQ196013
CRRU15	Raíz	12	I.N.F	1,362	I.N.F	1,151	<i>Mucilaginibacter celer</i> HYN0043 ^T	98,6	OQ195985
CRRU66	Raíz	12	I.N.F	1,409	I.N.F	0,884	<i>Mucilaginibacter celer</i> HYN0043 ^T	98,6	N.A.
CRRU08	Raíz	12	I.N.F	1,418	I.N.F	1,161	<i>Mucilaginibacter celer</i> HYN0043 ^T	98,6	N.A.
CRRU29	Tallo	13	<i>Pseudomonas congelans</i>	1,941	I.N.F	0,808	<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939 ^T	99,6	N.A.
CRRU56	Tallo	13	<i>Pseudomonas congelans</i>	2,121	I.N.F	0,962	<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939 ^T	99,6	OQ196009
CRRU47	Tallo	13	<i>Pseudomonas congelans</i>	2,228	I.N.F	1,076	<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939 ^T	99,9	N.A.
CRRU39	Tallo	13	<i>Pseudomonas congelans</i>	2,002	I.N.F	0,947	<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939 ^T	97,9	N.A.
CRRU35	Tallo	14	<i>Pseudomonas agarici</i>	1,838	I.N.F	1,081	<i>Pseudomonas silesiensis</i> A3 ^T	99,1	OQ195995
CRRU52	Raíz	15	I.N.F	1,541	I.N.F	0,997	<i>Inquilinus ginsengisoli</i> Gsoil 080 ^T	99,7	OQ196006
CRRU57	Raíz	16	I.N.F	1,417	I.N.F	0,919	<i>Inquilinus ginsengisoli</i> Gsoil 080 ^T	100	OQ196010
CRRU40	Tallo	17	<i>Pseudomonas lutea</i>	2,25	I.N.F	0,912	<i>Pseudomonas lutea</i> OK2 ^T	99,8	OQ195999
CRRU55	Tallo	18	<i>Sphingobium xenophagum</i>	1,819	I.N.F	0,92	<i>Novosphingobium fluoreni</i> HLJ-RS18 ^T	98,2	OQ196008
CRRU53	Raíz	19	I.N.F	1,447	I.N.F	0,995	<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> Cra20 ^T	98,4	PP350073
CRRU64	Raíz	20	I.N.F	1,378	I.N.F	1,221	<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> Cra20 ^T	99,1	OQ196015
CRRU69	Raíz	20	I.N.F	1,44	I.N.F	1,269	<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> Cra20 ^T	99,1	N.A.
CRRU31	Tallo	21	<i>Xanthomonas cynarae</i>	1,826	I.N.F	0,773	<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 33913 ^T	100	N.A.
CRRU41	Tallo	21	I.N.F	1,663	I.N.F	1,091	<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 33913 ^T	100	OQ196000
CRRU36	Tallo	22	<i>Xanthomonas cynarae</i>	1,8	I.N.F	1,051	<i>Xanthomonas campestris</i> XCC-C7 ^T	99,6	OQ195996
CRRU11	Raíz	23	I.N.F	1,509	<i>Rhizobium vignae</i>	1,854	<i>Neorhizobium galegae</i> LMG 6214 ^T	99,7	N.A.
CRRU16	Raíz	23	I.N.F	1,581	<i>Rhizobium vignae</i>	1,859	<i>Neorhizobium galegae</i> LMG 6214 ^T	99,7	OQ195986
CRRU17	Raíz	23	I.N.F	1,482	<i>Rhizobium galegae</i>	1,782	<i>Neorhizobium galegae</i> LMG 6214 ^T	99,7	N.A.
CRRU61	Raíz	23	I.N.F	1,658	<i>Rhizobium vignae</i>	1,916	<i>Neorhizobium galegae</i> LMG 6214 ^T	99,7	N.A.
CRRU32	Tallo	24	<i>Rhizobium rubi</i>	1,733	I.N.F	1,401	<i>Agrobacterium rubi</i> NBRC 13261 ^T	100	OQ195992

Continúa...

Continuación Tabla 44.

Cepa	Tejido	Identidad por MALDI-TOF				Secuenciación del gen ARNr 16S		Número de acceso	
		Grupo	Base de datos Bruker	Puntuación	Base de datos <i>Rhizobium</i>	Puntuación	Identidad		Porcentaje de identidad
CRRU33	Tallo	25	<i>Rhizobium rubi</i>	2,45	<i>Rhizobium rubi</i>	2,173	<i>Agrobacterium rubi</i> NBRC 13261 ^T	100	OQ195993
CRRU49	Tallo	25	<i>Rhizobium rubi</i>	2,379	<i>Rhizobium rubi</i>	2,204	<i>Agrobacterium rubi</i> NBRC 13261 ^T	100	N.A.
CRRU45	Tallo	26	I.N.F	1,481	<i>Rhizobium soli</i>	2,117	<i>Rhizobium soli</i> DS-42 ^T	99,7	N.A.
CRRU46	Tallo	26	I.N.F	1,423	<i>Rhizobium soli</i>	2,435	<i>Rhizobium soli</i> DS-42 ^T	99,7	OQ196004
CRRU03	Raíz	26	I.N.F	1,386	<i>Rhizobium soli</i>	2,428	<i>Rhizobium soli</i> DS-42 ^T	99,7	N.A.
CRRU06	Raíz	27	I.N.F	1,299	I.N.F	1,419	<i>Rhizobium soli</i> DS-42 ^T	99,7	OQ195981
CRRU68	Raíz	28	I.N.F	1,597	I.N.F	0,91	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> RW16 ^T	98,6	OQ196017
CRRU02	Raíz	29	I.N.F	1,386	I.N.F	1,23	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> DSM 12677 ^T	98,4	N.A.
CRRU07	Raíz	29	I.N.F	1,495	I.N.F	0,849	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> DSM 12677 ^T	98,4	OQ195982
CRRU10	Raíz	30	I.N.F	1,395	I.N.F	1,138	<i>Novosphingobium silvae</i> FGD1 ^T	98,1	OQ195983
CRRU14	Raíz	30	I.N.F	1,406	I.N.F	0,825	<i>Novosphingobium silvae</i> FGD1 ^T	98,1	N.A.
CRRU04	Raíz	30	I.N.F	1,433	I.N.F	1,158	<i>Staphylococcus warneri</i> DSM 20316 ^T	99,7	N.A.
CRRU09	Raíz	30	I.N.F	1,496	I.N.F	1,163	<i>Staphylococcus warneri</i> DSM 20316 ^T	99,7	N.A.
CRRU12	Raíz	31	I.N.F	1,381	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,812	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	N.A.
CRRU67	Raíz	31	I.N.F	1,632	<i>Rhizobium sp.</i>	2,305	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	N.A.
CRRU70	Raíz	31	I.N.F	1,645	<i>Rhizobium sp.</i>	2,413	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	N.A.
CRRU71	Raíz	31	I.N.F	1,513	<i>Rhizobium sp.</i>	2,444	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	N.A.
CRRU13	Raíz	31	I.N.F	1,499	<i>Rhizobium sp.</i>	2,269	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	N.A.
CRRU62	Raíz	31	I.N.F	1,544	<i>Rhizobium sp.</i>	2,232	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	N.A.
CRRU65	Raíz	31	I.N.F	1,537	<i>Rhizobium sp.</i>	2,473	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	OQ196016
CRRU72	Raíz	31	I.N.F	1,568	<i>Rhizobium sp.</i>	2,405	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100	N.A.
CRRU20A	Raíz	32	I.N.F	1,639	I.N.F	1,298	<i>Agrobacterium rosae</i> NCPPB1650 ^T	99,4	N.A.
CRRU43	Tallo	32	I.N.F	1,554	I.N.F	1,238	<i>Agrobacterium rosae</i> NCPPB1650 ^T	99,4	OQ196002
CRRU18	Raíz	33	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,739	I.N.F	1,406	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	OQ195988
CRRU22	Tallo	33	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,772	I.N.F	1,545	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU23	Tallo	33	I.N.F	1,542	I.N.F	1,196	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU19	Raíz	34	<i>Bacillus subtilis</i>	1,99	I.N.F	1,15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU20B	Raíz	34	<i>Bacillus subtilis</i>	2,017	I.N.F	1,561	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	PP738876
CRRU24	Tallo	34	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,899	I.N.F	1,108	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU25	Tallo	34	I.N.F	1,639	I.N.F	1,183	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU26	Tallo	34	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,813	I.N.F	1,565	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU27	Tallo	34	<i>Bacillus vallismortis</i>	1,901	I.N.F	1,685	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU28	Tallo	34	<i>Bacillus subtilis</i>	1,859	I.N.F	1,371	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU30	Tallo	34	<i>Bacillus subtilis</i>	2,093	I.N.F	1,161	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU58	Raíz	34	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,95	I.N.F	1,512	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	99,7	N.A.
CRRU05	Raíz	35	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,149	I.N.F	1,091	<i>Staphylococcus warneri</i> DSM 20316 ^T	99,7	OQ195980

I.N.F.: Identificación No Fiable; N.A.: No Aplica

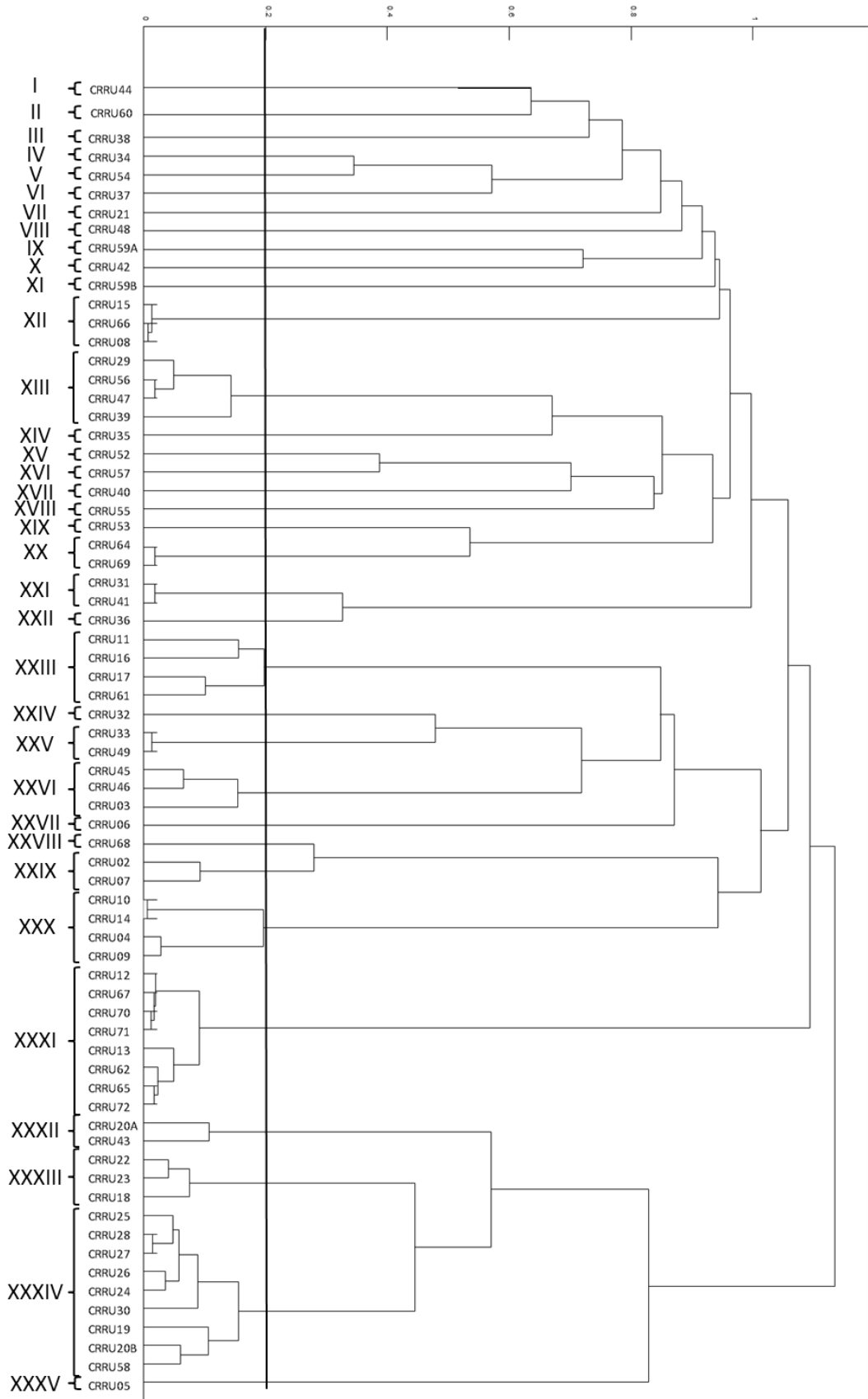


Figura 26. Dendrograma de los resultados derivados del análisis por MALDI-TOF MS de las 70 cepas aisladas. En la izquierda de la imagen se representan los grupos obtenidos.

En la última década, la técnica MALDI-TOF MS se ha usado para la identificación rápida de patógenos clínicos, debido a la versatilidad y la robustez de los resultados (Maldonado *et al.*, 2018). El interés del método radica en que la técnica MALDI-TOF MS permite obtener un perfil proteico de cada cepa, el cual es muy específico a nivel de especie (Sánchez-Juanes *et al.*, 2013). En esta tesis, algunas de las cepas fueron identificadas como potenciales patógenos al comparar los perfiles proteicos con la base de datos Bruker, que recoge a multitud de microorganismos de interés clínico. Por ejemplo, la cepa CRRU05 fue identificada como la especie *Staphylococcus warneri*, una bacteria responsable de infecciones en humanos (Gelman *et al.*, 2022). Sin embargo, la técnica MALDI-TOF MS ha continuado evolucionando y cada vez se usa más para la identificación de microorganismos de forma general, y no sólo en el ámbito clínico (Schubert y Kostrzewa, 2017). En esta tesis, por ejemplo, al comparar los perfiles proteicos con la base de datos propia del grupo de investigación, que recoge bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, se han podido identificar como miembros de esta familia a 18 de las cepas aisladas.

5.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEL GEN ARNr 16S.

Una vez agrupados los aislados, se procedió a secuenciar el gen ARNr 16S de cada uno de los representantes de los grupos obtenidos en el apartado anterior. Esta técnica permitió o bien confirmar las especies de aquellas cepas identificadas por MALDI-TOF MS o bien identificar las que no pudieron ser identificadas. Las secuencias obtenidas de las cepas representantes (en negrita en la Tabla 44) fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Tabla 44).

El gen ARNr 16S es considerado el marcador taxonómico de referencia en los organismos procariotas, ya que está presente en todos los genomas bacterianos y, además de ser una región muy conservada, presenta unas regiones hipervariables que son específicas a nivel de especie (Shukitt-Hale *et al.*, 2007). La herramienta BLAST disponible en el NCBI compara las secuencias de ADN de los aislados con las secuencias de ADN depositadas en su base de datos, y devuelve un resultado con un porcentaje de similitud entre las dos secuencias. Si al compararse dos secuencias del gen ARNr 16S el porcentaje de similitud es superior al 98,5-99%, suele asumirse que las dos bacterias de las que se obtuvieron las secuencias pertenecen a la misma especie, aunque habría que realizar análisis más exhaustivos para confirmar la identificación (Church *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos mostraron que las familias *Bacillaceae* y *Rhizobiaceae* fueron las dominantes en los dos tejidos estudiados, representando el 35,9 y el 15,4% respectivamente de los aislados de la raíz, y el 19,4 y el 25,8% respectivamente de los aislados del tallo. Tres de las familias bacterianas identificadas, las familias *Bacillaceae*, *Rhizobiaceae* y *Sphingomonadaceae* fueron comunes en los tejidos de la raíz y del tallo, mientras que el resto de las familias sólo fueron aisladas en uno de los dos tejidos. En la raíz se aislaron miembros de las familias *Azospirillaceae*, *Micrococcaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Sphingobacteriaceae* y

Staphylococcaceae, mientras que en el tallo se aislaron miembros de las familias *Erwiniaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*. De estas, sólo las familias *Microbacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Xanthomonadaceae* fueron identificadas como cinco de las familias predominantes en los análisis de la composición bacteriana realizados en el Capítulo I, en el que comprendieron el 10,6 y el 12,9% de la composición total de las raíces y los tallos, respectivamente. En cambio, en el aislamiento el 53,8% de los aislados de las muestras de las raíces y el 64,5% de los aislados de las muestras de los tallos estaban incluidas en estas familias. Como ya comentamos anteriormente, aproximadamente un 80% de los taxones obtenidos en los análisis metataxonómicos no son cultivables, por lo que es normal que en los aislamientos se obtenga una sobrerrepresentación de las familias que tengan más facilidad para crecer en los medios de cultivo empleados.

Con respecto a los géneros, los géneros *Bacillus*, *Neorhizobium* y *Rhizobium* fueron los dominantes en las raíces, representando el 10,3, el 10,3 y el 25,6%, respectivamente; mientras que, en los tallos, fueron los géneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, representando el 12,9, el 19,4 y el 25,8% respectivamente. Al igual que con las familias, cabe destacar que la mayoría de los géneros fueron aislados en un único tejido y solamente cuatro fueron comunes en la raíz y el tallo, concretamente los géneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Novosphingobium* y *Rhizobium*. En la raíz, el resto de los aislados pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Inquilinus*, *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Neobacillus*, *Neorhizobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, y *Staphylococcus*, mientras que en el tallo los aislados pertenecieron a los géneros *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Figura 27).

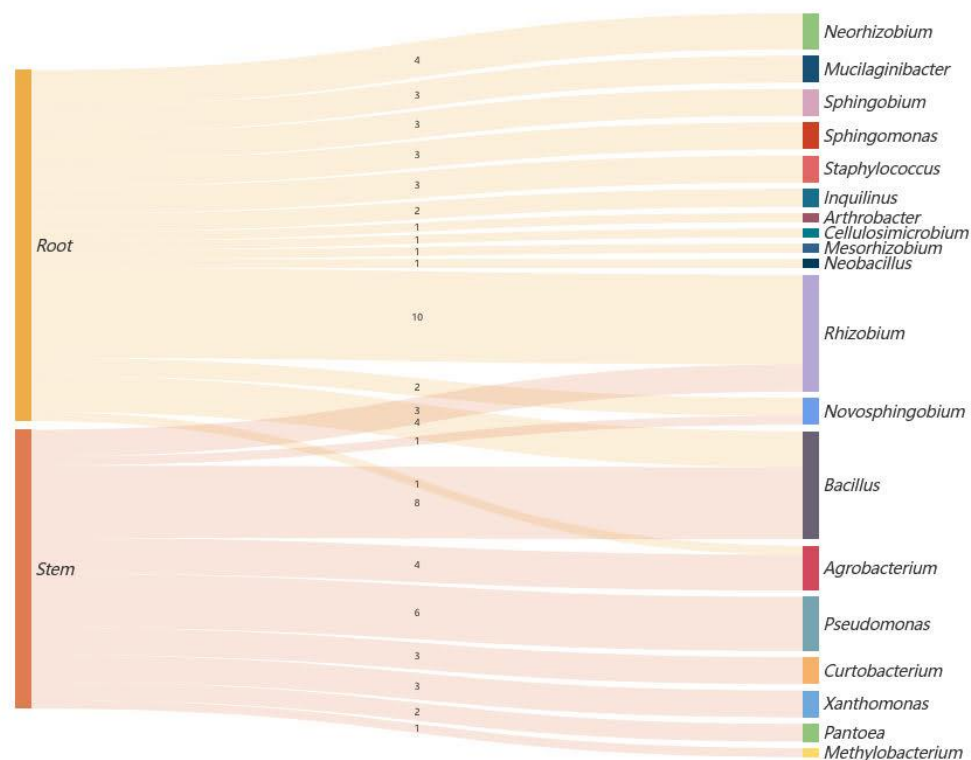


Figura 27. Distribución de los géneros aislados entre los dos tejidos.

Aunque las cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Rhizobium* fueron las más abundantes en la raíz, y las cepas pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* fueron las más abundantes en los tallos, únicamente el género *Pseudomonas* fue identificado como uno de los más abundantes en la composición bacteriana analizada en el Capítulo I. Concretamente, representó una mayor abundancia en las muestras del tallo, que fue la parte de la planta de la que fueron aisladas las cepas pertenecientes a este género. En cambio, el resto de los géneros mayoritarios del aislamiento, aunque fueron identificados, no representaron más del 2% en la composición bacteriana de ninguno de los dos tejidos. Del resto de géneros aislados, los géneros *Methylobacterium*, *Novosphingobium* y *Sphingomonas* fueron identificados en el Capítulo I como tres de los más abundantes. El género *Methylobacterium* destacó entre la composición de las muestras del tallo, donde representó entre el 4,8 y el 8,9%, lo cual coincide con el aislamiento de la cepa identificada dentro del género *Methylobacterium*, que también fue aislada del tejido del tallo. El género *Novosphingobium* representó en los análisis del Capítulo I entre el 1,1 y el 2,7% de las muestras de las raíces y entre el 1,7 y el 4,9% de las muestras de los tallos. En el caso de las cepas aisladas pertenecientes a este género, fueron aisladas de ambos tejidos. Por último, el género *Sphingomonas* representó en los análisis del Capítulo I entre el 4,1 y el 6,6% de las muestras de las raíces y entre el 19,4 y el 23,9% de las muestras de los tallos. Sin embargo, en este caso las cepas aisladas pertenecientes a este género fueron aisladas de las muestras de la raíz en lugar de las muestras del tallo, donde la abundancia parecía ser mayor.

En principio, parece que no existe correlación entre la abundancia de taxones identificados en el Capítulo I y los aislados obtenidos en el Capítulo II. Sin embargo, esto es un suceso bastante común en los aislamientos de las bacterias endófitas de las plantas. Los aislamientos planteados de forma general en los que no se establece ningún género bacteriano como género diana, como en el caso de esta tesis, suelen obtener taxones fácilmente cultivables y de crecimiento rápido, los cuales normalmente representan tan solo el 1% de toda la diversidad (Riva, 2022).

Hasta la fecha, esta es la primera vez que se realiza un aislamiento de bacterias endófitas del interior de los tejidos de plantas de *Rubus ulmifolius* Schott. Sin embargo, sí han sido realizados en *Rubus fruticosus*, otra especie de plantas de zarzamora (Contreras *et al.*, 2016). En ese estudio, los géneros más comunes aislados del interior de las raíces fueron *Bacillus* en un 42,1%, *Burkholderia* en un 29,4%, *Dyella* en un 3,9%, *Herbaspirillum* en un 10,7% y *Pseudomonas* en un 4,9%. En esta tesis, sin embargo, únicamente fueron aislados miembros pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. De todas formas, estos resultados no son comparables ya que el aislamiento llevado a cabo por Contreras *et al.* fue realizado en plantas pertenecientes a una especie de zarzamora diferente, las cuales fueron de origen doméstico en contraposición a las de esta tesis que tenían un origen silvestre. Además, los medios de cultivos sobre los que se realizaron los aislamientos no fueron los mismos, aunque ambos fueron medios generalistas, ya que Contreras *et al.* usaron el medio Agar Nutritivo (Contreras *et al.*, 2016).

A pesar de que las comunidades de bacterias endofíticas cultivables todavía no han sido muy estudiadas en las plantas del género *Rubus*, sí que se han realizado estudios en otras plantas, perteneciendo la mayoría de ellas a las familias *Poaceae*, *Fabaceae* y *Brassicaceae*. El estudio sobre las comunidades endofíticas cultivables de diferentes especies vegetales mostró que el género bacteriano más aislado era el género *Bacillus*, independientemente de la especie vegetal, del tejido, de las condiciones de crecimiento o del medio de aislamiento (Riva, 2022). En los tejidos de las raíces, los siguientes géneros más comúnmente aislados fueron los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter* y *Burkholderia*; mientras que en los tallos fueron los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Xanthomonas*, *Methylobacterium*, *Erwinia* y *Sphingomonas* (Riva *et al.*, 2022). En esta tesis, el 59,0% de las cepas aisladas en la raíz y el 74,2% de las cepas aisladas en el tallo, pertenecieron a esos géneros. El resto de los géneros aislados en la raíz fueron los géneros *Cellulosimicrobium*, *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Novosphingobium* y *Sphingobium*, los cuales también han sido reportados por haber sido aislados del interior de las raíces de plantas como *Bromus aegyptiacus* o *Panicum turgidum* (Eida *et al.*, 2020; Mostafa *et al.*, 2020; Riva, 2022). Con respecto a las bacterias del tallo, los géneros que no pertenecieron a los antes mencionados, fueron los géneros *Agrobacterium*, *Novosphingobium* y *Rhizobium*. Estos géneros también han sido reportados numerosas

veces como endófitos de plantas (Ayuso-Calles *et al.*, 2020; Flores-Félix *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2015).

5.3.1. Análisis filogenéticos.

Las cepas fueron agrupadas en función de sus relaciones filogenéticas, lo que permitió estudiar su posición con respecto a otros miembros cercanos. Con el fin de facilitar la comprensión de las diferentes relaciones filogenéticas y permitir un análisis más sencillo, las diferentes bacterias fueron clasificadas según su taxonomía. Así, se realizaron análisis individuales para cada orden bacteriano.

Un primer análisis filogenético fue realizado con las cepas CRRU05, CRRU18, CRRU20B y CRRU59B, las cuales fueron identificadas como miembros de los géneros *Bacillus*, *Neobacillus* y *Staphylococcus*, incluidos en el orden Bacillales. Todas las cepas fueron agrupadas junto a la cepa tipo con la que se identificaron al comparar la secuencia del gen ARNr 16S con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados CRRU18 y CRRU20B presentaron un porcentaje de similitud con la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535^T del 99,7% y en la representación de las relaciones filogenéticas, las cepas CRRU18 y CRRU20B fueron agrupadas en la misma rama junto a las especies *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535^T, *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T y *Bacillus velezensis* NRRL B-41580^T. Entre estas especies no hubo apenas diferencias filogenéticas ya que sus secuencias del gen ARNr 16S presentan un alto porcentaje de similitud entre ellas, lo cual dificulta su clasificación taxonómica (Fan *et al.*, 2017b). La cepa CRRU59B fue agrupada con la especie *Neobacillus drentrensis* NBRC 102427^T, con la cual presentó un porcentaje de similitud del 98,8%. La cepa CRRU05 presentó un porcentaje de similitud del 99,7% con *Staphylococcus warneri* DSM 20316^T, especie con la que fue agrupada tras el análisis filogenético (Figura 28).

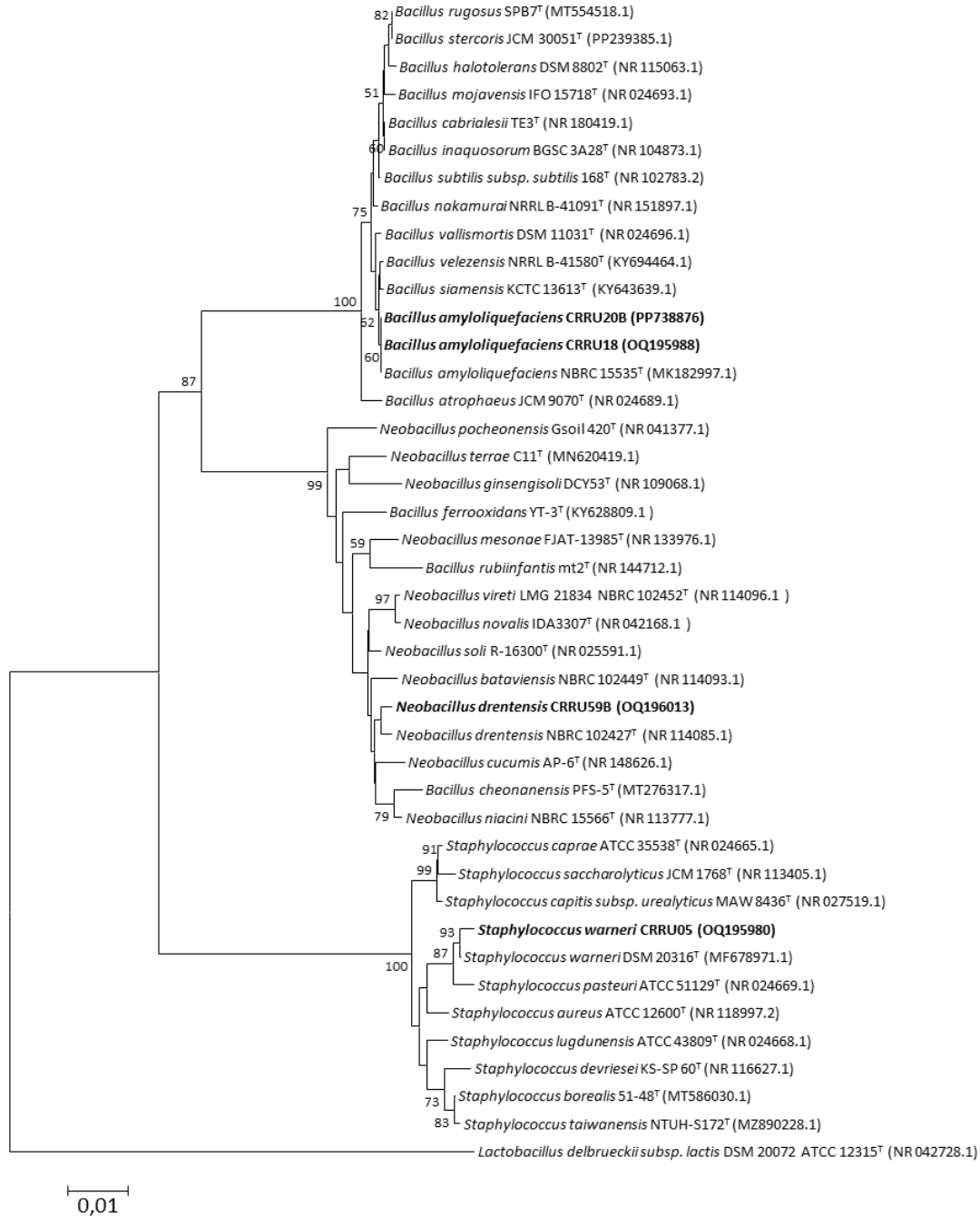


Figura 28. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Bacillales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

En el análisis para el orden Enterobacterales fueron englobadas las dos cepas pertenecientes al género *Pantoea*, las cepas CRRU38 y CRRU42. La cepa CRRU38 presentó un porcentaje de similitud del 99,0% con *Pantoea agglomerans* ATCC 27155^T y la cepa CRRU42 presentó un porcentaje de similitud del 99,2% con *Pantoea septica* LMG 5345^T. En el análisis filogenético, ambas cepas fueron agrupadas con las dos especies con las que fueron identificadas al comparar sus secuencias del gen ARNr 16S con las depositadas en la base de datos del NCBI (Figura 29).

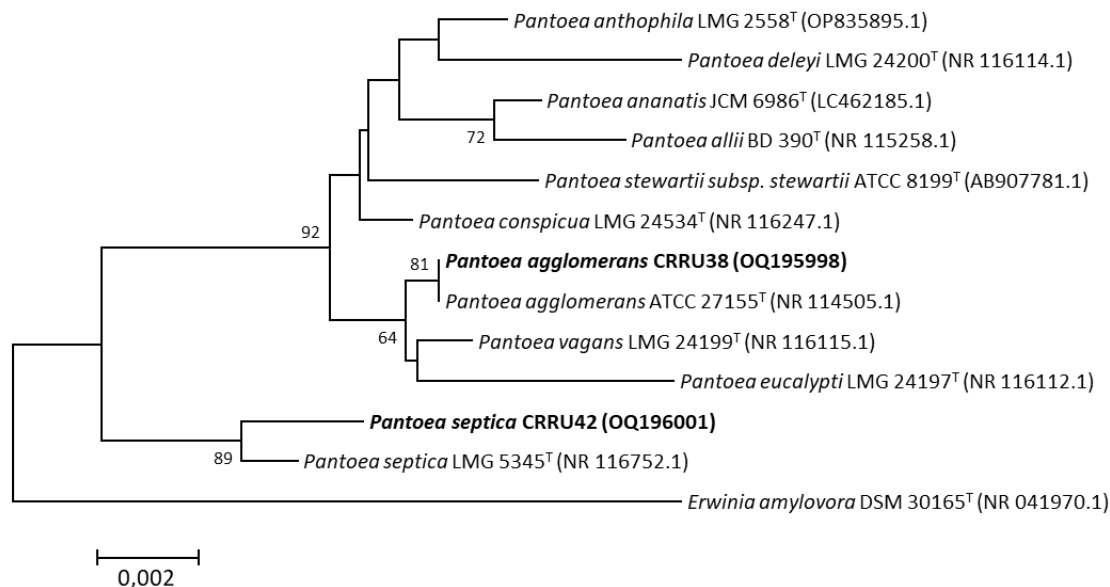


Figura 29. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Enterobacterales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

A continuación, en el análisis filogenético realizado para las bacterias del orden Micrococcales fueron incluidas las cepas CRRU21, CRRU34, CRRU37, CRRU54 y CRRU59A pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium* y *Curtobacterium*. El análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de cepa CRRU21 con las secuencias depositadas en el NCBI identificó a la cepa CRRU21 como la especie *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117^T con un porcentaje de similitud del 98,8%. En el análisis filogenético, la cepa CRRU21 fue agrupada junto a esa misma especie. El análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de cepa CRRU59B con las secuencias depositadas en el NCBI identificó a la cepa CRRU59A como la especie *Cellulosimicrobium composti* BIT-GX5^T con un porcentaje de similitud del 98,8%. En el análisis filogenético, la cepa CRRU59B fue agrupada junto a esa misma especie. Finalmente, las cepas CRRU34 y CRRU37 fueron agrupadas en el análisis filogenético junto a la especie *Curtobacterium pusillum* DSM 20527^T y la cepa CRRU54 fue agrupada en el análisis filogenético junto a la especie *Curtobacterium herbarum* P 420/07^T. Estas tres cepas presentaron porcentajes de similitudes superiores al 99,0% cuando se compararon las secuencias de sus genes ARNr 16S con las secuencias de los genes ARNr 16S de *Curtobacterium pusillum* DSM 20527^T y *Curtobacterium herbarum* P 420/07^T depositados en la base de datos del NCBI (Figura 30).

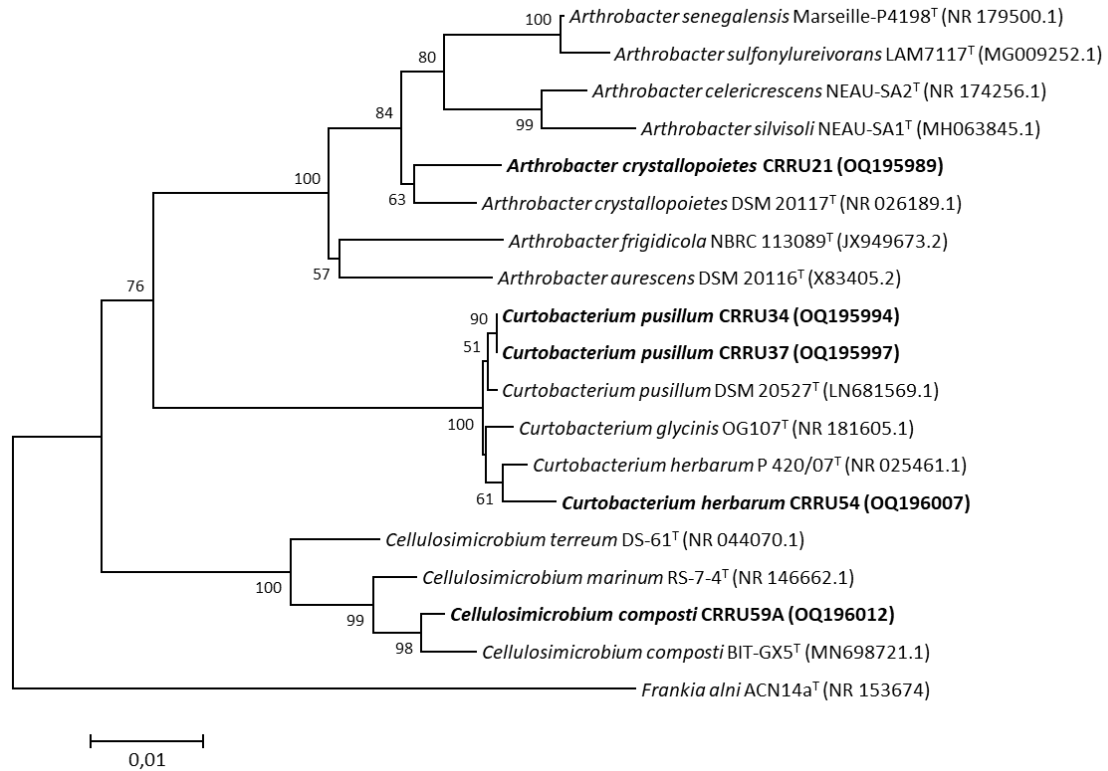


Figura 30. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Micrococcales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

El análisis realizado para las bacterias del orden Pseudomonadales incluyó a las cepas CRRU35, CRRU40 y CRRU56, pertenecientes al género *Pseudomonas*. Los aislados CRRU35, CRRU40 y CRRU56 fueron agrupados junto a las especies *Pseudomonas silesiensis* A3^T, *Pseudomonas lutea* OK2^T y *Pseudomonas congelans* P 538/23^T, respectivamente. En el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, estas tres cepas presentaron porcentajes de similitudes superiores al 99,1% con las secuencias del gen ARNr 16S de las especies tipo con las que fueron agrupadas (Figura 31).

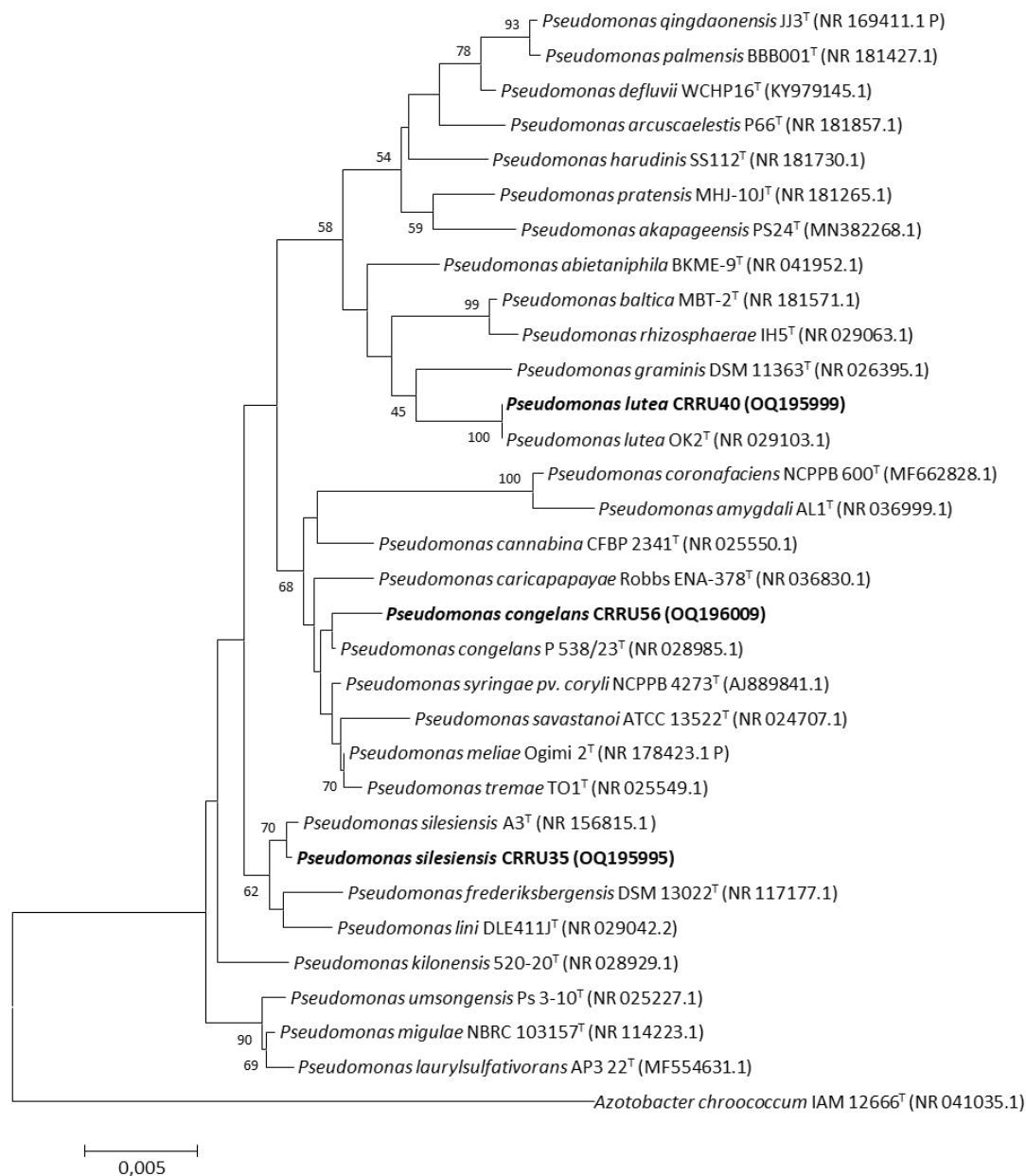


Figura 31. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al filo Pseudomonadales y de las especies más cercanas descritas en el género. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

En el análisis para las cepas incluidas en el orden Rhodospirillales se incluyeron las cepas CRRU52 y CRRU57, pertenecientes al género *Inquilinus*. Ambas cepas, fueron agrupadas junto a la especie *Inquilinus ginsengisoli* Gsoil 080^T, especie con la que presentaron un porcentaje de similitud del 99,7 y del 100% respectivamente, al comparar las secuencias de sus genes ARNr 16S (Figura 32).

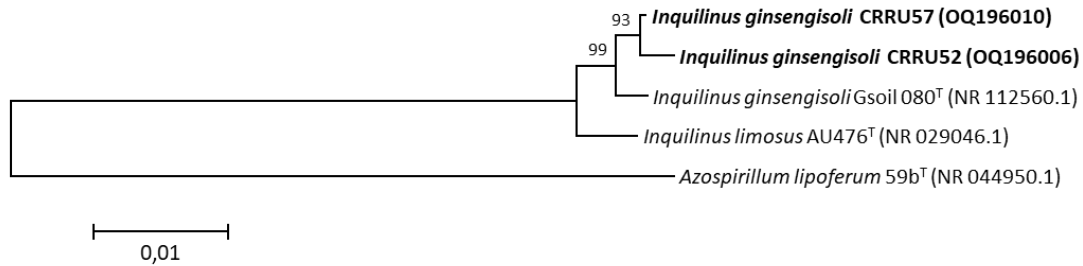


Figura 32. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Rhodospirillales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

El análisis para el orden Sphingobacteriales incluyó a la cepa CRRU15 del género *Mucilaginibacter*, la cual fue agrupada con la especie *Mucilaginibacter celer* HYN0043^T. En este caso, el porcentaje de identidad entre las secuencias del gen ARNr 16 de la cepa CRRU15 y la cepa *Mucilaginibacter celer* HYN0043^T fue del 97,2%, lo que podría indicar que la cepa CRRU15 era una especie nueva (Figura 33).

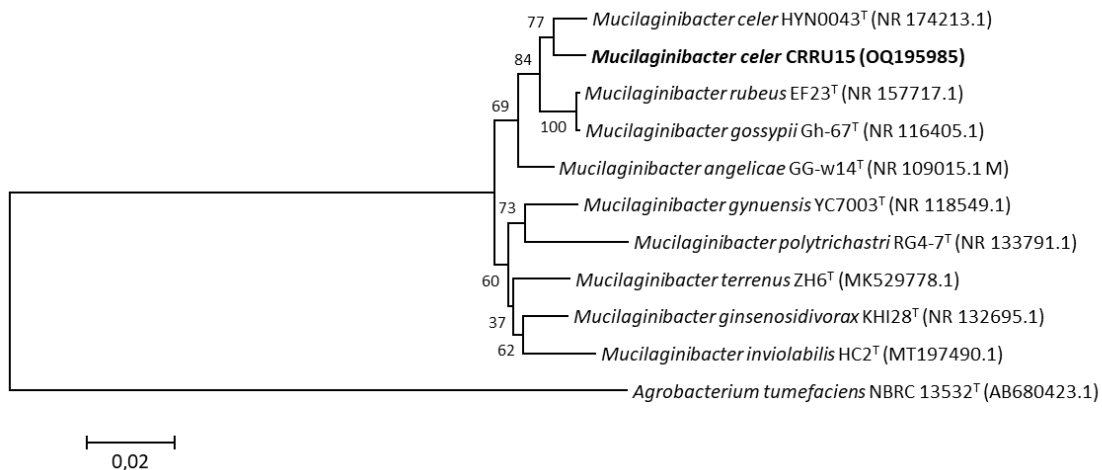


Figura 33. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Sphingobacteriales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

El análisis realizado para las especies del orden Sphingomonadales recogió a las cepas CRRU02, CRRU13, CRRU53, CRRU55, CRRU64 y CRRU68, pertenecientes a los géneros *Novosphingobium*, *Sphingobium* y *Sphingomonas*. Al comparar las secuencias de los genes ARNr 16S de las cepas CRRU02 y CRRU68 con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI se obtuvieron unos porcentajes de similitud del 97,2 y del 98,6% con la especie *Sphingobium aromaticiconvertens* DSM 12677^T. Esto fue reflejado en el análisis filogenético, donde fueron agrupadas junto a la especie *Sphingobium aromaticiconvertens* DSM 12677^T, pero formando una rama independiente, lo que podría indicar que ambas cepas son especies nuevas. Las cepas CRRU53 y CRRU64 fueron agrupadas en el análisis filogenético junto a *Sphingomonas psychrotolerans* Cra20^T, especie con la que obtuvieron un porcentaje de similitud del 98,4

y del 99,1% al comparar las secuencias del gen ARNr 16S. Las cepas CRRU10 y CRRU55 fueron agrupadas en el análisis filogenético con las especies *Novosphingobium silvae* FGD1^T y *Novosphingobium fluoreni* HLJ-RS18^T respectivamente, especies con las que obtuvieron unos porcentajes de similitud del 98,1 y 98,2% tras comparar las secuencias de sus genes ARNr 16S (Figura 34).

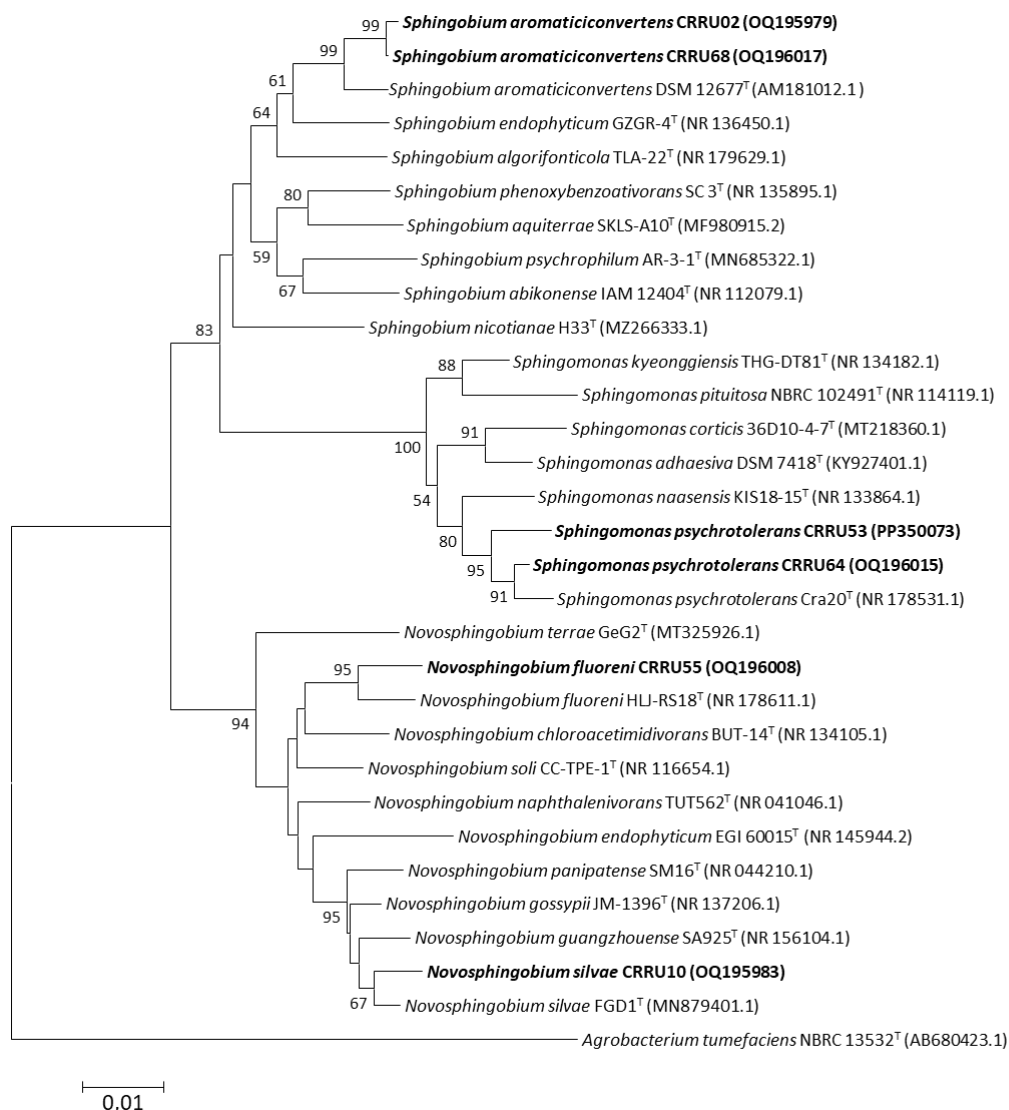


Figura 34. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Sphingomonadales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis

Realizamos un análisis filogenético para las dos cepas pertenecientes al orden Lysobacterales, las cepas CRRU36 y CRRU41. Ambas cepas fueron agrupadas junto a la especie *Xanthomonas campestris* ATCC 33913^T. EN la comparación de sus secuencias del gen SRNr 16S con las depositadas en la base de dato del NCBI, la cepa CRRU41 presentó un 100% de similitud, mientras que la cepa CRRU36 obtuvo un porcentaje de similitud del 99,6% (Figura 35).

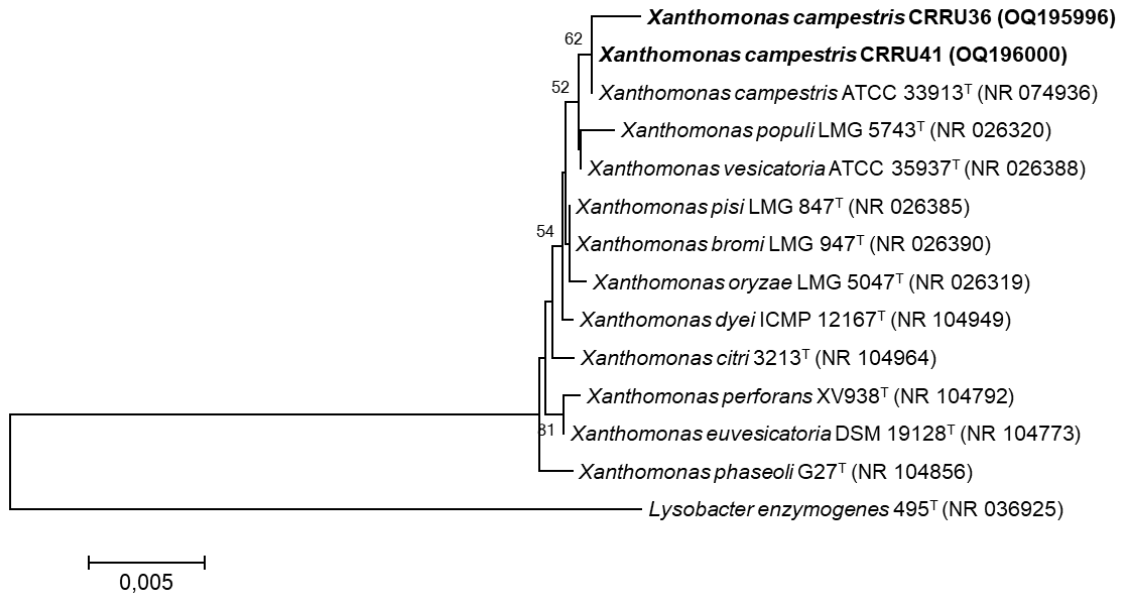


Figura 35. Análisis filogenético del gen ribosómico ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Lysobacterales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

Por último, realizamos un análisis filogenético para las cepas CRRU06, CRRU16, CRRU32, CRRU33, CRRU43, CRRU44, CRRU45, CRRU60 y CRRU65 pertenecientes al orden Hyphomicrobiales, que pertenecían a los géneros *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium* y *Rhizobium*. Todos los aislados fueron agrupados junto a la cepa con la que fue identificada por la base de datos NCBI. Las cepas CRRU32, CRRU33 y CRRU43 fueron agrupadas en el clado del género *Agrobacterium*, las dos primeras junto a *Agrobacterium rubi* y la última con *Agrobacterium rosae*. La cepa CRRU60 fue agrupada en el clado del género *Mesorhizobium*, junto a *Mesorhizobium australicum*. La cepa CRRU16 fue agrupada en el clado de *Neorhizobium* junto a *Neorhizobium galegae*. Finalmente, las cepas CRRU06, CRRU46 y CRRU65 fueron agrupadas en el género *Rhizobium*. Las cepas CRRU06 y CRRU46 fueron agrupadas con *Rhizobium soli*, mientras la cepa CRRU65 fue agrupada en la misma rama juntos a *Rhizobium sophorae*, *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium laguerreae*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium anhuiense*, *Rhizobium pisi*, *Rhizobium indicum* y *Rhizobium phaseoli*, todas ellas muy cercanas filogenéticamente (Figura 36).

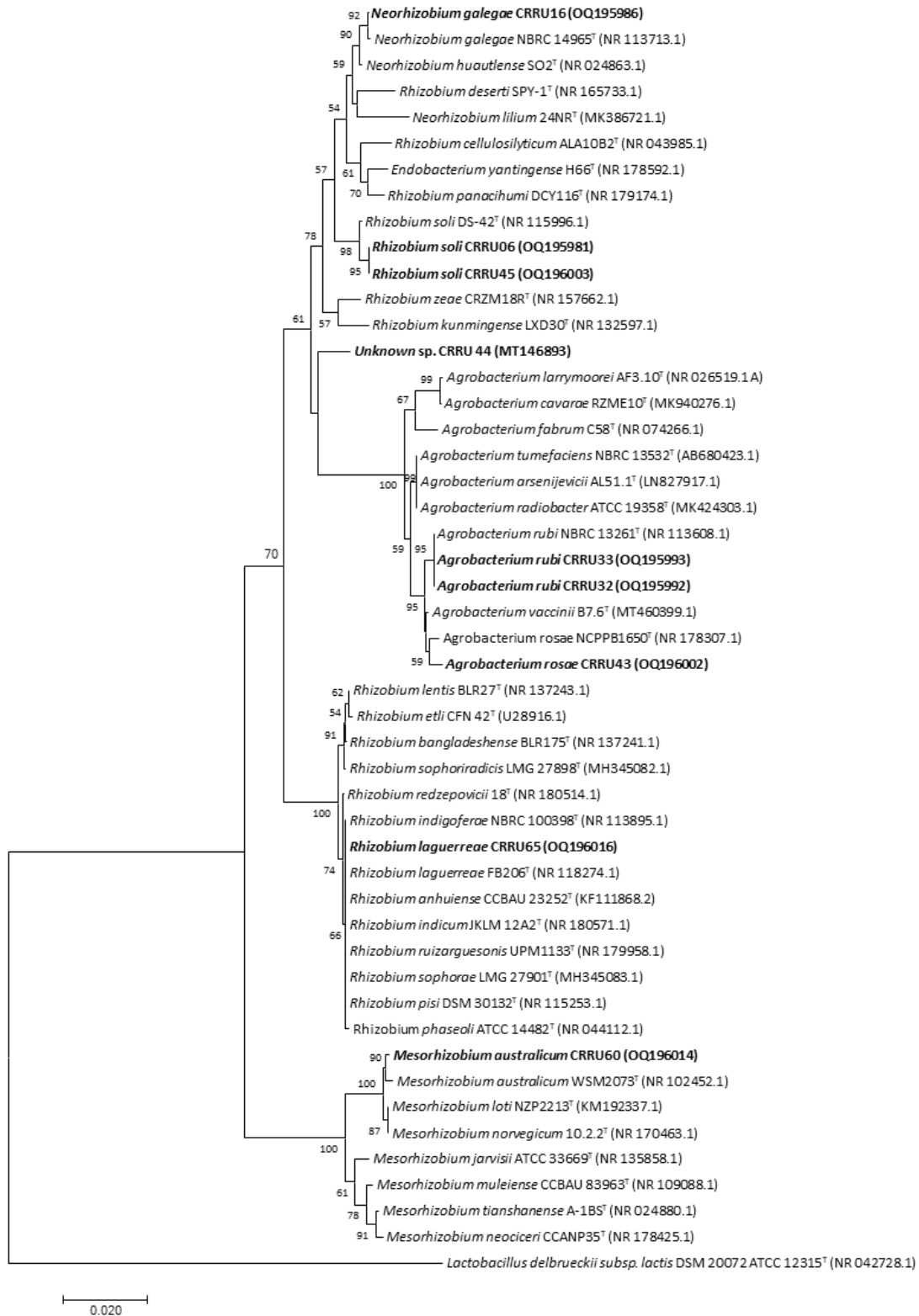


Figura 36. Análisis filogenético del gen ribosómico ARNr 16S de los aislados de este estudio pertenecientes al orden Hyphomicrobiales y de las especies más cercanas descritas en los géneros. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

De entre los aislados obtenidos, la secuencia del gen ribosómico 16S de la cepa CRRU44 presentó un porcentaje de similitud del 95,5% con la secuencia de la cepa 178

Rhizobium leguminosarum LMG 14904^T. Además, al realizar los análisis filogenéticos su secuencia fue colocada formando un clado independiente. Estos resultados parecían indicar que esta cepa posiblemente era un nuevo género.

5.3.2. Descripción del género *Ferrancluibacter* y la especie *Ferrancluibacter rubi*.

Tras observar el bajo porcentaje de similitud de la secuencia del gen ARNr 16S cepa CRRU44 con cualquiera de las secuencias depositadas en el NCBI GenBank, se estudió la posibilidad de que se tratase de un nuevo género bacteriano.

Dado que la familia con la que mayor similitud presentó CRRU44 fue la familia *Rhizobiaceae*, se realizó un análisis filogenético con el gen ARNr 16S de las cepas tipo de las especies tipo de los géneros incluidos hasta ese momento en la familia *Rhizobiaceae*. Los resultados mostraron que la cepa tipo más cercana dentro de esta familia era la cepa *Endobacterium cereale* RZME27^T. Además, el análisis mostró que la cepa CRRU44 estaba agrupada en el mismo clado con las especies *Endobacterium cereale* RZME27^T, *Neorhizobium galegae* HAMB1540^T y *Pseudorhizobium pelagicum* R1-200B4^T. Sin embargo, el porcentaje de similitud de la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa CRRU44 parecía indicar su pertenencia a un nuevo género, ya que varios géneros de la familia *Rhizobiaceae* estaban más estrechamente relacionados entre sí que la cepa CRRU44^T con respecto a sus parientes más cercanos (Figura 37).

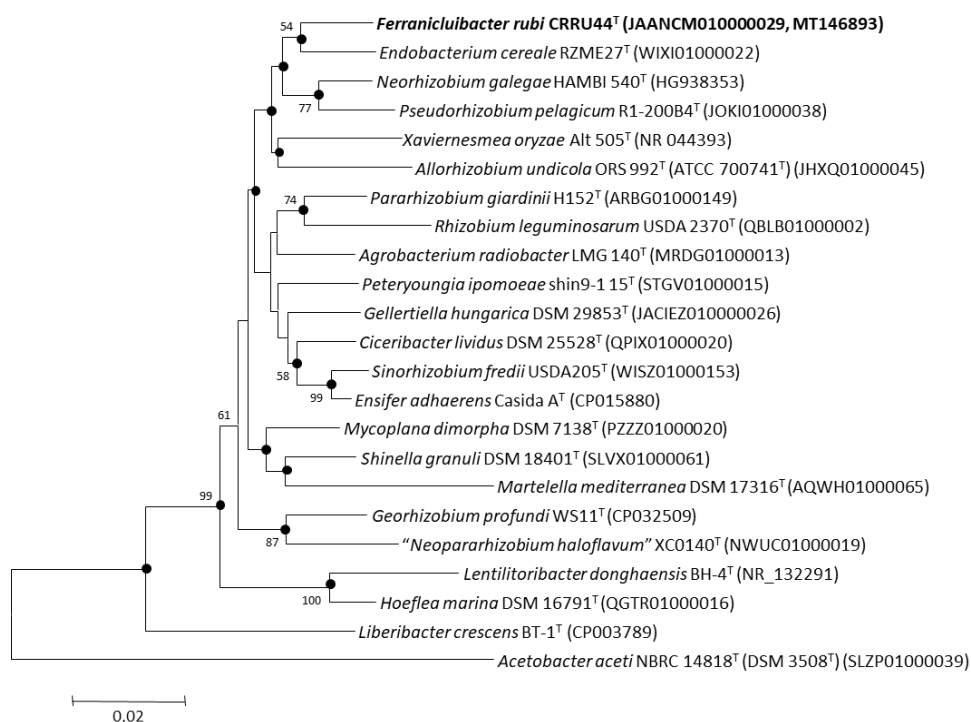


Figura 37. Análisis filogenético del gen ribosómico ARNr 16S que muestra la posición filogenética de la cepa CRRU44^T dentro de la familia *Rhizobiaceae*. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis. Los nodos marcados con círculos también fueron obtenidos con la máxima probabilidad algoritmo.

Un análisis más exhaustivo mostró que la secuencia del gen ARNr 16S de esta cepa poseía valores de similitud superiores al 99% con respecto a las secuencias de algunas de las cepas no tipo disponibles en el GenBank. Estas secuencias pertenecieron o bien a bacterias no cultivadas o a cepas no tipo aisladas de diversas fuentes. Nuestros resultados mostraron que estas bacterias formaban un mismo grupo filogenético con la cepa CRRU44, el cual fue denominado *Ferranicluibacter* gen. nov. (Figura 38). Las bacterias de este género fueron aisladas de ecosistemas muy diferentes, tanto de muestras ambientales como del suelo o las plantas, como de otro tipo de muestras como el pao cai chino, e incluso en la piel humana.

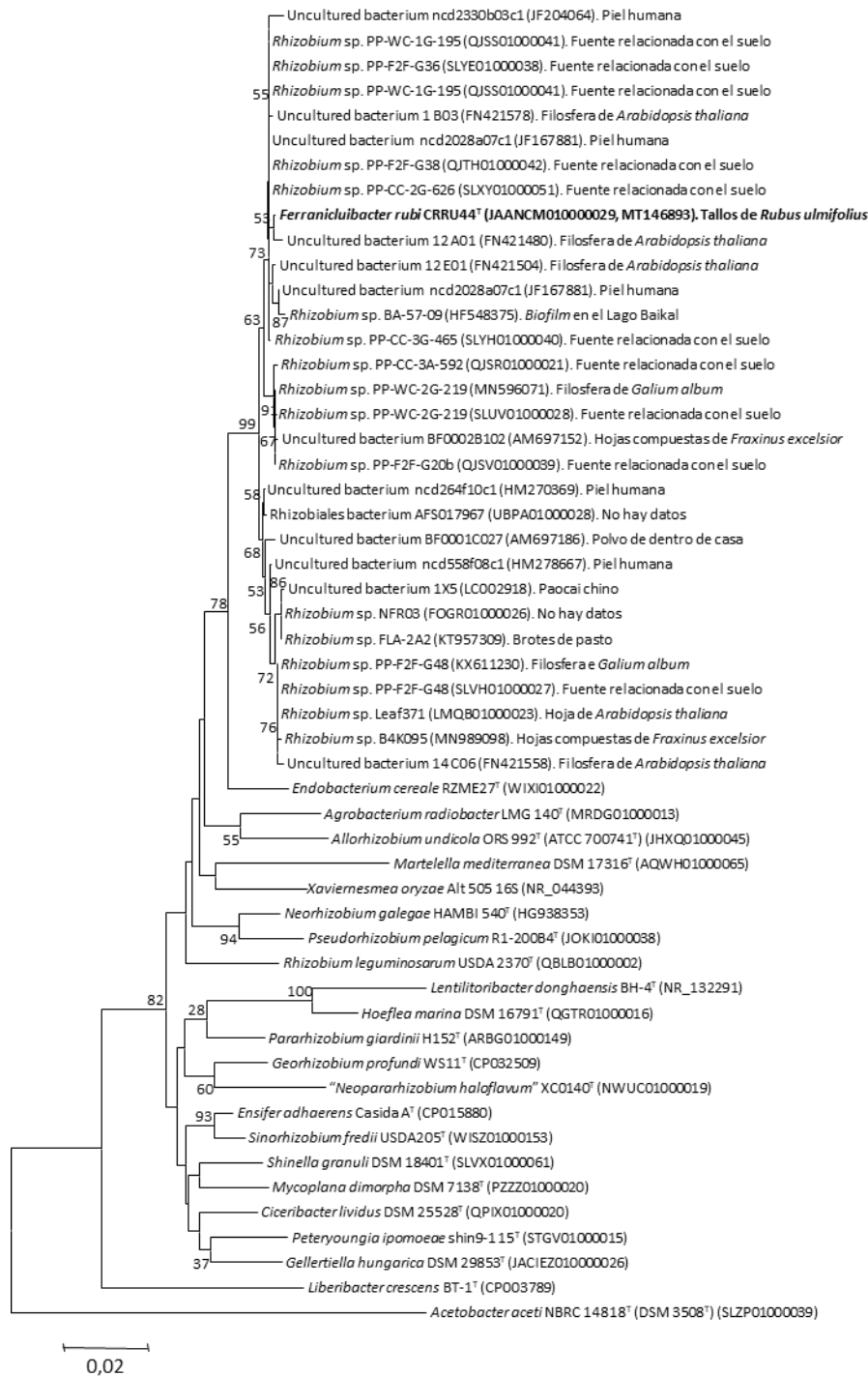


Figura 38. Análisis filogenético del gen ribosómico ARNr 16S que muestra la posición filogenética de la cepa CRRU44^T, otras bacterias no cultivadas relacionadas y cepas aisladas cuyas secuencias del gen ARNr 16S están disponibles en Genbank. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis. Los nodos marcados con círculos también fueron obtenidos con la máxima probabilidad algoritmo.

5.3.2.1. Análisis filogenómico.

Los resultados del análisis filogenómico de 92 genes *core* mostraron que la cepa CRRU44 estaba agrupada con las cepas tipo *Xaviernesmea oryzae* 1.7048^T, *Pararhizobium giardinii* H152^T, *Ensifer adhaerens* Casida A^T y *Sinorhizobium fredii* USDA205^T (Figura 39). Estos resultados y los obtenidos anteriormente en el análisis del gen ARNr 16S, apoyaron la idea de que la cepa CRRU44 representaba un nuevo género dentro de la familia *Rhizobiaceae*.

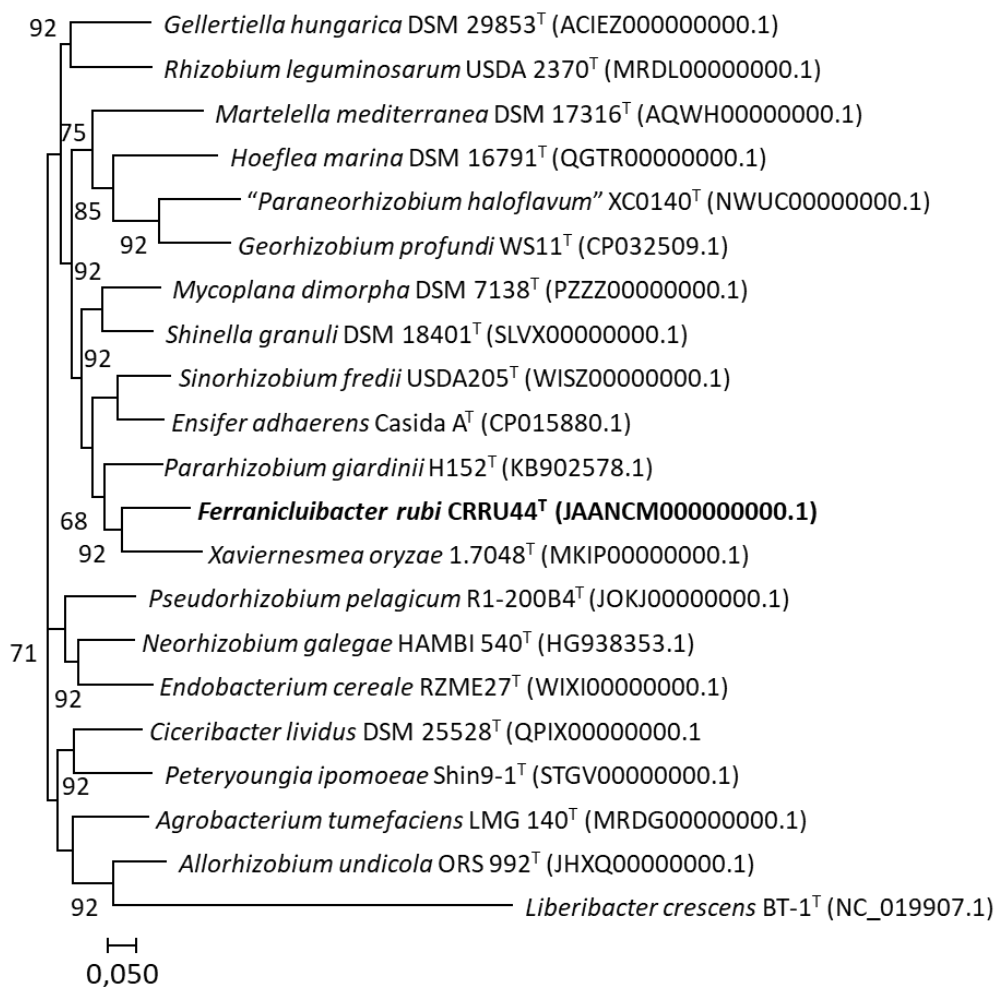


Figura 39. Análisis filogenómico generado tras el análisis de 92 genes centrales de la cepa CRRU44^T y las cepas tipo de especies tipo de otros géneros de la familia *Rhizobiaceae*. Análisis realizado con el método Neighbour-Joining y coeficiente Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas. Los números de acceso de Genbank son dados entre paréntesis.

Para corroborar que la cepa CRRU44 pertenecía a un nuevo género se calcularon los valores de ANIb (*Average Nucleotide Identity based on BLAST+*), AAI (*Pairwise Amino Acid Identity*) (AAI) y dDDH (*digital DNA:DNA Hybridization*). Estos métodos son utilizados para la delimitación de especies basadas en el genoma (Meier-Kolthoff y Göker, 2019). En el caso del ANIb y AAI, los valores superiores al 96% entre dos bacterias indican que ambas son las misma especie, mientras que valores superiores al 76% indican que son el mismo género (Yoon *et al.*, 2017). Sin embargo, en 2022,

Kuzmanovic *et al.* propusieron que los valores umbral de ANIb y AAI fueran el 78,5 y el 76,5%, respectivamente, para la diferenciación de géneros dentro de la familia *Rhizobiaceae* (Kuzmanović *et al.*, 2022). En el caso del dDDH, el umbral para diferenciar dos especies es del 70% (Auch *et al.*, 2010).

Los valores de ANIb y AAI calculados entre los genomas de la cepa CRRU44 y los genomas de las cepas tipo de las especies tipo de cada uno de los géneros de la familia *Rhizobiaceae* fueron inferiores al 78,5 y al 76,5%, respectivamente (Tabla 45). Los resultados entre el gen de ARNr 16S de la cepa CRRU44 y los genes de ARNr 16S de las cepas tipo de las especies no tipo de varios géneros fueron idénticos, mostrando valores superiores al 96% (Tabla 46). Esto respalda la clasificación de la cepa CRRU44 en un nuevo género dentro de la familia *Rhizobiaceae*.

Los valores calculados de ANIb y AAI entre los genomas de las cepas no tipo y con la cepa CRRU44 fueron superiores al 78,5 y al 76,5%, respectivamente, lo que demostró que todos ellos también pertenecían al género *Ferraniclubacter* (Tabla 47). Sin embargo, solo cinco de estas cepas pertenecieron a la misma especie que la cepa CRRU44 ya que sus genomas presentaron valores de dDDH y ANIb superiores al 70% y 95-96 %, respectivamente (Tabla 47), que son los valores umbral recomendados para la diferenciación de las especies (Chun *et al.*, 2018).

Tabla 45. Valores ANIb (inferior izquierda) y AAI (superior derecha) por pares entre el genoma de la cepa CRRU44 y las cepas tipo de otras especies de la familia *Rhizobiaceae*.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	*	64,88	65,43	66,58	64,91	64,03	65,29	65,42	59,67	71,77	66,98	64,82	65,39	68,92	60,15	55,55	59,31	66,86	60,17	68,97	60,50
2	72,49	*	71,29	66,31	69,74	63,33	65,90	66,15	58,94	64,79	64,71	65,72	68,51	64,35	58,58	55,68	59,31	64,42	58,75	64,26	70,18
3	73,02	75,61	*	68,46	72,41	64,08	66,96	67,39	59,87	65,89	64,90	66,39	68,70	65,05	59,48	56,06	60,16	65,12	59,54	65,39	63,47
4	72,95	73,34	74,49	*	65,88	65,16	66,29	67,25	59,08	69,23	66,31	67,06	67,25	66,35	59,49	56,90	59,47	66,48	59,36	67,89	63,46
5	73,34	75,04	75,90	73,89	*	64,79	68,01	68,08	60,49	65,19	65,83	66,50	68,06	64,98	60,41	56,16	60,46	66,10	60,42	65,25	65,04
6	72,86	72,78	73,05	73,47	72,99	*	66,05	66,97	59,92	65,10	66,19	64,93	64,32	65,72	60,19	56,40	59,59	66,43	60,01	65,77	63,79
7	72,47	73,29	72,91	73,15	73,13	72,50	*	71,47	60,36	66,03	66,48	68,83	67,44	66,02	60,62	55,69	60,90	65,64	60,72	65,62	63,99
8	73,31	73,82	74,08	74,16	74,19	73,33	74,11	*	60,80	66,99	67,10	69,79	67,95	66,32	61,56	56,87	60,97	66,85	61,26	66,91	64,40
9	71,27	70,91	70,90	71,03	71,04	70,95	70,58	71,03	*	60,20	61,05	59,90	59,64	60,43	61,19	53,22	57,21	61,37	72,14	60,32	65,21
10	75,11	72,90	73,17	74,56	72,72	72,57	72,34	72,97	70,70	*	70,36	65,99	66,37	72,97	60,98	56,17	59,06	69,97	60,75	74,05	59,80
11	74,17	73,14	73,36	74,18	73,39	73,55	72,68	73,70	71,08	75,25	*	65,52	66,11	70,76	61,45	55,75	59,37	74,20	61,13	69,77	68,90
12	72,28	72,97	72,70	72,81	72,64	72,50	73,23	73,27	69,94	72,43	72,75	*	67,57	64,85	59,85	56,45	60,45	65,14	59,90	65,48	66,12
13	72,26	74,30	73,77	73,29	73,38	72,26	72,59	73,11	70,10	72,86	73,20	72,76	*	65,98	59,34	56,97	60,01	65,52	59,20	65,97	65,04
14	74,32	72,75	73,20	73,64	72,98	72,82	72,52	73,04	70,87	75,67	76,03	71,84	72,40	*	60,87	56,20	58,76	70,57	60,48	77,52	64,86
15	71,36	70,91	71,23	71,32	71,45	71,22	70,60	71,37	71,12	71,68	72,60	70,53	70,52	71,69	*	53,15	57,31	61,86	61,86	60,75	66,75
16	64,82	63,60	64,63	64,68	64,36	64,91	64,67	64,45	64,11	64,71	64,60	64,56	64,60	64,63	64,60	*	53,47	56,07	52,93	56,24	59,68
17	71,03	71,12	71,09	71,18	71,27	71,39	70,69	71,45	69,98	71,22	71,59	70,94	70,90	70,99	70,46	63,49	*	59,85	57,17	58,88	55,47
18	74,33	73,32	73,77	74,49	73,98	73,59	72,78	73,99	71,55	75,37	78,27	72,40	72,97	76,01	72,48	63,27	71,92	*	61,54	70,17	59,41
19	70,90	70,30	70,30	70,69	70,59	70,70	69,96	70,65	73,89	70,76	71,66	69,78	70,01	71,13	70,79	63,33	69,96	71,31	*	60,88	66,14
20	74,19	72,40	73,17	74,21	73,06	72,83	72,23	73,18	71,25	76,08	75,44	71,83	72,45	78,17	71,45	65,11	71,28	74,98	70,51	*	66,98
21	74,66	71,82	72,12	72,42	72,82	72,5	72,35	72,82	71,12	73,96	73,62	72,54	72,38	73,46	71,22	64,8	71,28	73,99	70,96	73,56	*

Cepas: 1. CRRU44^T (JAANCM000000000.1); 2. *Endobacterium cereale* RZME27 (WIXI00000000.1); 3. *Neorhizobium galegae* HAMB1540^T (HG938353.1); 4. *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370^T (QBLB01000000.1); 5. *Pseudorhizobium pelagicum* R1-200B4^T (JOKJ00000000.1); 6. *Gellertiella hungarica* RAM11^T (JACIEZ010000000.1); 7. *Peteryoungia ipomeae* shin9-1^T (STGV00000000.1); 8. *Ciceribacter lividus* DSM 25528^T (QPIX01000000.1); 9. *Georhizobium profundi* WS11^T (CP032509.1); 10. *Pararhizobium giardinii* H152^T (ARBG01000149.1); 11. *Shinella granuli* DSM 18401^T (SLVX01000000.1); 12. *Allorhizobium undicola* ORS 992^T (JHXQ01000000.1); 13. *Agrobacterium radiobacter* DSM 30147^T (ASXY01000000.1); 14. *Ensifer adhaerens* casida A^T (CP015880.1); 15. *Hoeflea marina* DSM 16791^T (QGTR00000000.1); 16. *Liberibacter crescens* BT-1^T (NC 019907.1); 17. *Martellella mediterranea* DSM 17316^T (AQWH00000000.1); 18. *Mycoplana dimorpha* DSM 7138^T (PZZZ00000000.1); 19. *Paraneorhizobium haloflavum* XC0140^T (NWUC00000000.1); 20. *Sinorhizobium fredii* USDA205^T (WISZ00000000.1); 21. *Xaviernesmea oryzae* 1.7048^T (MKIP00000000.1).

Tabla 46. Valores de ANIb (inferior izquierda) y AAI (superior derecha) por pares entre los genomas de CRRU44 y las cepas tipo de especies no tipo de la familia *Rhizobiaceae* con similitud en el gen 16S ARNr superior al 96%.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	*	64,89	66,00	67,24	63,75	69,00	65,52	66,76	65,72	65,07	66,31	65,35	66,24	65,49	65,30	65,88	66,28	65,34	66,57	65,29
2	72,49	*	65,99	64,50	64,97	64,39	71,72	63,84	66,42	70,12	66,70	70,16	66,88	65,98	69,81	66,28	66,23	71,27	65,99	71,40
3	72,30	72,59	*	66,85	64,67	66,94	66,57	66,07	76,30	66,61	76,65	67,27	76,34	76,10	66,46	87,80	86,34	67,65	87,28	67,22
4	74,25	72,87	73,08	*	64,21	70,12	65,52	81,73	66,91	66,52	67,13	66,88	66,80	66,53	66,94	66,97	67,01	66,43	67,18	65,41
5	72,23	73,05	71,91	72,67	*	63,88	66,37	64,62	64,93	66,55	65,39	66,98	65,05	65,14	66,26	64,74	64,62	65,96	64,61	65,97
6	73,88	72,52	72,56	74,65	71,63	*	65,16	70,08	66,06	65,81	66,57	66,06	66,90	66,29	66,20	67,40	66,80	65,72	67,34	65,52
7	72,57	76,19	72,74	73,11	72,67	72,62	*	65,03	66,53	71,68	66,77	71,63	67,12	66,61	71,63	66,47	65,91	74,47	66,39	75,13
8	73,60	72,66	72,71	80,66	72,62	74,76	72,32	*	65,99	65,78	66,34	67,62	66,27	65,93	66,01	66,30	66,47	66,19	66,25	64,77
9	72,57	73,15	76,86	73,12	72,11	72,73	72,72	72,81	*	66,86	80,14	67,03	80,90	91,08	67,13	76,36	77,06	68,59	76,96	68,10
10	72,52	74,47	72,63	73,19	72,29	72,78	74,27	73,15	72,76	*	66,96	95,85	66,78	67,11	95,75	66,74	66,55	74,17	66,75	73,24
11	73,29	73,84	77,60	74,18	72,63	73,66	73,23	73,65	79,98	72,94	*	67,45	88,39	80,26	67,39	76,54	77,14	68,92	77,10	68,11
12	72,69	74,28	72,70	73,39	72,66	72,67	74,21	74,24	73,08	94,9	73,33	*	66,99	67,03	95,23	67,20	66,76	73,86	66,96	73,44
13	73,31	73,85	77,35	74,02	72,62	73,70	73,38	73,64	80,18	72,85	85,82	72,91	*	80,48	67,08	76,42	77,36	68,98	77,71	68,93
14	72,51	73,10	76,66	73,07	72,15	72,78	72,71	72,73	88,63	72,41	79,45	72,29	79,92	*	67,19	76,28	76,53	68,49	76,98	67,96
15	72,69	74,57	72,64	73,51	72,33	72,84	74,37	72,91	72,99	94,53	73,43	94,58	73,48	72,89	*	66,78	66,59	73,98	66,77	73,49
16	72,19	72,67	84,52	72,82	71,62	72,78	72,15	72,54	76,69	71,98	76,99	72,03	77,16	76,38	72,05	*	86,44	67,98	86,82	67,41
17	72,65	73,16	84,38	73,07	71,85	73,04	72,19	72,68	77,17	72,29	77,33	72,24	77,78	76,76	72,34	83,39	*	67,94	94,37	67,38
18	72,41	75,14	73,17	73,14	72,33	72,53	75,4	72,76	73,52	74,45	73,89	74,57	73,97	73,38	74,32	72,85	73,14	*	67,91	81,76
19	72,54	72,88	84,71	73,01	71,63	72,98	72,25	72,82	76,94	72,12	77,31	72,14	77,67	76,65	72,30	83,59	94,17	72,62	*	67,73
20	72,80	75,69	73,06	73,31	72,51	73,01	76,37	72,87	73,87	74,46	74,20	74,62	74,65	73,76	74,52	72,76	72,99	79,04	73,1	*

Cepas: 1. *Ferranichuibacter rubi* CRRU44^T (JAANCM000000000.1); 2. *Endobacterium cereale* RZME27^T (WIXI000000000.1); 3. *Rhizobium altiplani* BR 10423^T (LNCD000000000.1); 4. *Rhizobium azooxidifex* DSM 100211^T (JACIEE000000000.1); 5. *Rhizobium borbori* DSM 26385^T (JACIDU000000000.1); 6. *Ensifer morelense* Lc04^T (JABEKT000000000.1); 7. *Rhizobium soli* AS3.12^T (JACHBU000000000.1); 8. *Rhizobium subbaraonis* JC85^T (OBQD000000000.1); 9. *Rhizobium viscosum* DSM 7307^T (JADBEC000000000.1); 10. *Rhizobium halotolerans* AB21^T (CABFWE000000000.1); 11. *Rhizobium esperanzae* CNPSo 668^T (MXPU000000000.1); 12. *Rhizobium flavum* YW14^T (MUXO000000000.1); 13. *Rhizobium changzhiense* WYCCWR 11279^T (JACGBJ000000000.1); 14. *Rhizobium mesosinicum* CCBAU 25010^T (JAEUAK000000000.1); 15. *Pseudorhizobium banfieldiae* NT-26^T (FO082820.1); 16. *Rhizobium grahamii* CCGE 502^T (AEYE000000000.1); 17. *Rhizobium favelukesii* LPU83^T (ATTO000000000.1); 18. *Neorhizobium huautlense* S02^T (PVBM000000000.1); 19. *Rhizobium tibeticum* CF048^T (JUNH000000000.1); 20. *Neorhizobium vignae* CCBAU 05176^T (JNNU000000000.1).

Tabla 47. Valores calculados de ANiB (inferior izquierda) y dDDH (superior derecha) para la cepa CRRU44, las cepas tipo de otras especies tipo de la familia Rhizobiaceae y otros genomas disponibles de las cepas relacionadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	*	42,20	31,60	59,60	79,70	60,10	79,30	78,30	60,80	75,50	78,60	34,80	23,20	20,70	20,50	20,60	20,30	20,40	20,80	20,10	21,50	21,40	20,00	20,50	21,50	20,10	44,30	19,60	20,80	19,00	21,10	21,60
2	90,40	*	31,30	42,10	42,10	42,00	42,30	42,10	42,50	42,10	42,10	32,80	22,70	20,70	20,60	20,60	20,70	20,50	16,00	14,20	21,70	21,40	19,90	20,50	21,60	19,70	43,10	19,80	21,20	19,60	21,40	21,80
3	85,81	85,77	*	31,50	31,40	31,70	31,50	31,70	31,90	31,40	31,60	29,20	22,60	20,80	20,80	20,60	20,70	20,70	15,60	14,00	21,80	21,40	20,10	20,60	21,70	20,00	43,60	19,70	21,30	19,70	21,30	21,60
4	94,51	90,30	85,72	*	59,90	84,60	60,30	60,00	84,00	60,00	60,10	34,60	22,80	20,50	20,30	20,60	20,40	20,50	15,50	14,20	21,50	21,20	19,90	20,60	21,70	20,10	44,10	20,00	21,10	19,20	21,30	21,70
5	96,80	89,77	85,21	93,85	*	61,40	98,30	80,20	62,50	77,20	80,70	34,50	23,20	20,50	20,50	20,40	20,60	20,70	15,30	14,00	21,30	21,30	20,00	20,40	21,30	20,20	44,00	19,90	20,90	19,30	21,20	21,80
6	94,09	89,90	85,51	97,47	94,63	*	62,00	61,60	84,50	61,70	61,70	34,80	23,20	20,80	20,50	20,50	20,50	20,40	15,30	14,00	21,50	21,30	20,00	20,70	21,40	20,30	44,10	19,70	21,00	19,30	21,30	21,80
7	97,08	90,00	85,36	94,14	99,56	94,83	*	79,90	63,10	76,60	79,70	34,60	23,20	20,50	20,50	20,40	20,50	20,60	15,30	14,00	21,40	21,30	19,80	20,50	21,30	20,20	44,00	19,80	20,80	19,20	21,30	21,50
8	96,77	89,88	85,41	93,99	97,45	94,51	97,43	*	62,30	76,40	79,80	34,50	23,30	20,60	20,70	20,60	20,30	20,60	15,40	14,00	21,50	21,40	20,10	20,40	21,30	19,90	43,80	19,90	20,90	19,20	21,20	21,50
9	94,26	90,17	85,88	97,46	95,03	97,76	95,08	94,94	*	62,70	62,00	35,00	23,20	20,80	20,50	20,80	20,80	20,90	15,50	14,20	21,60	21,50	20,00	20,60	21,40	20,20	43,40	19,90	21,30	19,30	21,30	21,90
10	96,33	89,71	85,22	93,86	96,93	94,41	96,76	96,87	93,78	*	76,00	34,70	23,00	20,60	20,50	20,40	20,50	20,60	15,20	13,80	21,60	21,50	20,00	20,30	21,30	19,80	43,80	19,50	21,00	19,70	20,90	21,80
11	96,96	89,94	85,38	94,07	97,54	94,64	97,39	97,47	93,92	96,91	*	34,50	23,10	20,60	20,50	20,50	20,60	20,70	15,40	13,90	21,40	21,30	20,60	20,60	21,20	19,90	44,00	19,80	21,00	19,50	21,30	21,70
12	87,15	86,21	84,36	87,22	87,06	87,21	87,07	87,06	86,90	87,22	87,08	*	23,10	20,60	20,30	20,30	20,20	20,40	14,60	13,70	21,50	21,30	19,90	21,10	21,10	19,90	43,00	20,00	21,00	19,20	21,10	21,20
13	72,49	72,60	72,54	72,54	72,48	72,53	72,48	72,43	72,53	72,51	72,42	72,11	*	24,90	23,80	24,40	22,70	24,10	23,90	21,10	23,20	22,90	22,50	23,50	23,60	20,80	3,70	21,60	22,90	19,20	22,60	21,90
14	73,02	73,06	72,96	72,90	72,84	72,87	72,86	72,85	72,79	72,87	72,82	72,54	75,61	*	21,40	20,70	20,40	20,30	20,60	20,30	20,90	20,80	20,00	20,50	20,80	19,50	47,50	19,40	20,80	19,60	20,70	20,80
15	72,95	72,99	73,14	73,09	72,93	73,10	72,99	72,86	72,88	72,96	72,94	72,54	73,34	74,49	*	20,20	20,50	20,20	20,50	19,90	21,50	21,00	19,70	20,20	21,30	19,40	48,80	19,70	20,80	19,90	21,00	20,80
16	73,34	73,46	73,20	73,35	73,33	73,31	73,32	73,34	73,53	73,33	73,32	72,90	75,04	75,90	73,89	*	20,00	20,50	20,50	20,00	20,40	20,60	20,00	20,90	20,50	19,20	33,40	19,90	20,50	18,90	20,90	20,70
17	72,86	73,05	72,93	72,81	72,86	72,86	72,81	72,70	72,97	72,83	72,84	72,46	72,78	73,05	73,47	72,99	*	20,20	20,50	20,40	20,50	21,00	20,50	20,50	21,00	19,40	44,60	19,70	20,70	20,50	21,00	21,10
18	72,47	72,75	72,78	72,57	72,52	72,60	72,53	72,54	72,56	72,51	72,48	72,29	73,29	72,91	73,15	73,13	72,50	*	20,60	19,80	20,50	20,50	21,20	20,30	20,90	19,80	45,50	20,10	20,60	18,80	20,80	21,00
19	73,31	73,50	73,40	73,26	73,27	73,29	73,24	73,27	73,24	73,23	73,26	72,81	73,82	74,08	74,16	74,19	73,33	74,11	*	20,20	20,30	21,00	20,90	20,60	21,20	19,40	46,80	19,80	21,20	18,70	21,00	21,20
20	71,27	71,37	71,46	71,42	71,27	71,39	71,23	71,31	71,50	71,32	71,33	70,95	70,91	70,90	71,03	71,04	70,95	70,58	71,03	*	19,70	20,20	19,60	20,20	21,00	19,80	41,50	20,10	21,00	19,80	20,90	20,40
21	75,11	75,30	75,37	75,21	75,19	75,17	75,16	75,08	75,36	75,13	75,16	74,71	72,90	73,17	74,56	72,72	72,57	72,34	72,97	70,70	*	21,80	20,10	20,50	22,10	19,80	44,40	19,70	21,50	19,10	21,90	21,60
22	74,17	74,43	74,34	74,28	74,23	74,34	74,20	74,11	74,30	74,09	74,16	73,55	73,14	73,36	74,18	73,39	73,55	72,68	73,70	71,08	75,25	*	20,50	20,60	22,30	19,90	45,60	19,90	23,00	19,50	22,10	21,80
23	72,28	72,35	72,32	72,29	72,27	72,25	72,25	72,20	72,37	72,18	72,18	71,88	72,97	72,70	72,81	72,64	72,50	73,23	73,27	69,94	72,43	72,75	*	20,80	20,40	46,30	19,70	19,70	21,20	19,20	20,30	21,00
24	72,26	72,58	72,54	72,37	72,28	72,40	72,30	72,34	72,50	72,30	72,30	72,14	74,30	73,77	73,29	73,38	72,26	72,59	73,11	70,10	72,86	73,20	72,76	*	20,70	19,10	42,60	19,70	21,20	19,20	20,40	20,80
25	74,32	74,41	74,36	74,31	74,21	74,24	74,26	74,27	74,44	74,31	74,25	73,76	72,75	73,20	73,64	72,98	72,82	72,52	73,04	70,87	75,67	76,03	71,84	72,40	*	20,50	45,50	19,60	20,50	19,60	23,70	21,60
26	71,36	71,72	71,68	71,45	71,37	71,50	71,37	71,38	71,52	71,42	71,34	71,05	70,91	71,23	71,32	71,45	71,22	70,60	71,37	71,12	71,68	72,60	70,53	70,52	71,69	*	41,40	20,20	22,10	19,90	20,10	20,50
27	64,82	64,95	64,89	65,14	64,94	65,30	64,93	64,79	65,18	64,93	65,02	64,69	63,60	64,63	64,68	64,36	64,91	64,67	64,45	64,11	64,71	64,60	64,56	64,60	64,63	64,60	*	44,60	45,50	41,50	47,70	48,10
28	71,03	71,25	71,24	71,05	70,99	71,00	71,01	70,90	71,29	70,96	70,98	70,73	71,12	71,09	71,18	71,27	71,39	70,69	71,45	69,98	71,22	71,59	70,94	70,90	70,99	70,46	63,49	*	20,30	19,80	20,30	20,50
29	74,33	74,79	74,70	74,55	74,43	74,46	74,41	74,43	74,52	74,40	74,36	73,91	73,32	73,77	74,49	73,98	73,59	72,78	73,99	71,55	75,37	78,27	72,40	72,97	76,01	72,48	63,27	71,92	*	19,60	22,20	21,40

Continúa...

Continuación Tabla 47.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
30	70,90	71,03	71,13	71,02	70,86	70,87	70,89	70,96	71,04	70,86	70,85	70,52	70,30	70,30	70,69	70,59	70,70	69,96	70,65	73,89	70,76	71,66	69,78	70,01	71,13	70,79	63,33	69,96	71,31	*	20,20	20,10
31	74,19	74,49	74,42	74,23	74,15	74,22	74,18	74,11	74,24	74,07	74,14	73,74	72,40	73,17	74,21	73,06	72,83	72,23	73,18	71,25	76,08	75,44	71,83	72,45	78,17	71,45	65,11	71,28	74,98	70,51	*	21,40
32	*	42,20	31,60	59,60	79,70	60,10	79,30	78,30	60,80	75,50	78,60	34,80	23,20	20,70	20,50	20,60	20,30	20,40	20,80	20,10	21,50	21,40	20,00	20,50	21,50	20,10	44,30	19,60	20,80	19,00	21,10	21,60

Cepas. 1. *Ferranichuibacter rubi* CRRU44^T (JAANCM000000000.1); 2. AFS017967 (UBPA00000000.1); 3. Leaf371 (LMQB00000000.1); 4. PP-CC-3A-592 (QJSR00000000.1); 5. PP-WC-1G-195 (QJSS00000000.1); 6. PP-F2F-G20b (QJSV00000000.1); 7. PP-F2F-G38 (QJTH00000000.1); 8. PP-CC-2G-626 (SLXY00000000.1); 9. PP-WC-2G-219 (SLUV00000000.1); 10. PP-F2F-G36 (SLYE00000000.1); 11. PP-CC-3G-465 (SLYH00000000.1); 12. NFR03 (FOGR00000000.1); 13. *Endobacterium cereale* RZME27 (WIXI00000000.1); 14. *Neorhizobium galegae* HAMBIS40^T (HG938353.1); 15. *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370^T (QBLB01000000.1); 16. *Pseudorhizobium pelagicum* R1-200B4^T (JOKJ00000000.1); 17. *Gellertiella hungarica* RAM11^T (JACIEZ00000000.1); 18. *Peteryoungia ipomeae* shin9-1^T (STGV00000000.1); 19. *Ciceribacter lividus* DSM 25528^T (QPIX00000000.1); 20. *Georhizobium profundum* WS11^T (CP032509.1); 21. *Pararhizobium giardinii* H152^T (ARBG00000000.1); 22. *Shinella granuli* DSM 18401^T (SLVX00000000.1); 23. *Allorhizobium undicola* ORS 992^T (JHXQ00000000.1); 24. *Agrobacterium radiobacter* DSM 30147^T (ASXY01000000.1); 25. *Ensifer adhaerens* Casida A^T (CP015880.1); 26. *Hoeflea marina* DSM 16791^T (QGTR00000000.1); 27. *Liberibacter crescens* BT-1^T (NC_019907.1); 28. *Martellella mediterranea* DSM 17316^T (AQWH00000000.1); 29. *Mycoplana dimorpha* DSM 7138^T (PZZZ00000000.1); 30. *Paraneorhizobium haloflavum* XC0140^T (NWUC00000000.1); 31. *Sinorhizobium fredii* USDA205^T (WISZ00000000.1); 32. *Xaviernesmea oryzae* 1.7048 (MKIP00000000.1).

5.3.2.2. Fisiología y quimiotaxonomía.

Las características fenotípicas de la cepa CRRU44 y de las cepas tipo de la familia *Rhizobiaceae* relacionadas se incluyeron en la descripción de la especie. La cepa CRRU44 difiere de estas especies en la reducción de los nitratos, el crecimiento en diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de NaCl, y en la asimilación de varias fuentes de carbono (Tabla 48).

Tabla 48. Diferencias fenotípicas entre CRRU44 y las cepas tipo de sus especies tipo estrechamente relacionadas de la familia *Rhizobiaceae* después del análisis del gen 16S ARNr y del genoma.

Características	1	2	3	4	5	6	7	8
Color de la colonia en YMA	Marfil	Blanco	Blanco-rosa	Blanco	Crema	Blanco-crema	Blanco	Blanco-crema
Reducción del nitrato	-	+	-	+	N.D.	-	+	N.D.
Crecimiento en 1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 7% NaCl	-	-	-	+	-	-	-	-
Crecimiento a 37°C	+	d	+	+	+	d	+	-
Crecimiento a pH 5	+	-	+	-	+			+
Gluconato	-	+	+	+	+	-	-	-
Malato	+	+	+	-	+	+	+	+
L-ramosa	+	+	-	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	-	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	-	+	+	+	+
5-ceto-gluconato	-	+	+	+	N.D.	-	-	-
Propionato	-	+	-	-	N.D.	-	+	-
3-hidroxibutirato	-	-	-	-	+	-	-	-
L-histidina	-	+	+	-	+	+	+	+
L-alanina	-	d	+	d	+	-	+	-
L-serina	-	-	-	+	+	-	+	-

Cepas: 1. *Ferrancluibacter rubi* CRRU44^T; 2. *Endobacterium cereale* RZME27^T; 3. *Neorhizobium. galegae* HAMB1540^T; 4. *Pseudorhizobium pelagicum* R1-200B4^T; 5. *Xaviernesmea oryzae* Alt 505^T; 6. *Pararhizobium giardinii* H152^T; 7. *Ensifer adhaerens* Casida A^T; 8. *Sinorhizobium fredii* USDA 205^T. +: positivo, -: negativo, s: débil, N.D: No hay Datos. Datos obtenidos en este estudio y en los estudios de De Lajudie *et al.*, 1994; Kimes *et al.*, 2015; Menéndez *et al.*, 2020; y Peng *et al.*, 2008.

Con respecto a los ácidos grasos celulares, los resultados obtenidos mostraron que los principales ácidos grasos de la cepa CRRU44 eran los de la característica sumada 8 (C18: 1 ω6c/C18: 1 ω7c), como ocurre en los géneros más cercanos de la familia *Rhizobiaceae* (Tabla 49). La principal diferencia se observó en el porcentaje de C18: 1 ω7c 11-metilo, que es el segundo ácido graso principal en la cepa CRRU44 (Tabla 49).

Tabla 49. Composición de ácidos grasos celulares de *Ferranichuibacter rubi* CRRU44^T y los de las cepas tipo de sus especies tipo más cercanas de la familia *Rhizobiaceae* después del análisis del gen ARNr 16S y del genoma.

Ácido graso	1	2	3	4	5	6	7	8
C _{16:0}	8,7	8,9	11,6	7,7	28,7	6,6	2,9	10,0
C _{17:0}	0,5	0,1	1,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,5
C _{18:0}	1,8	2,1	2,3	2,3	2,3	0,6	4,0	5,0
C _{16:0} 3OH	1,8	2,1	2,5	N.D.	N.D.	N.D.	1,7	0,6
C _{18:0} 3OH	0,5	1,3	1,6	1,5	N.D.	2,3	2,5	2,0
C _{17:0} cyclo	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3,8	N.D.	N.D.	1,0
C _{18:1} ω7c 11-methyl	20,9	0,4	0,5	3,0	9,5	N.D.	2,1	0,2
C _{19:0} cyclo ω8c	N.D.	N.D.	10,8	4,4	N.D.	N.D.	0,4	15,0
Características sumadas 2	1,2	5,2	4,6	4,4	6,3	8,8	6,0	6,9
Características sumadas 3	5,5	1,8	0,6	1,5	N.D.	6,9	0,9	0,8
Características sumadas 8	53,4	77,7	61,1	73,8	32,9	74,9	79,3	54,9

Características sumadas 2: (C_{14:0} 3OH/ C_{16:1} iso I)

Características sumadas 3: (C_{16:1} ω7c / C_{16:1} ω6c)

Características sumadas 8: (C_{18:1} ω7c/ C_{18:1} ω6c)

Cepas: 1. *Ferranichuibacter rubi* CRRU44^T; 2. *Endobacterium cereale* RZME27^T; 3. *Neorhizobium. galegae* HAMB1540^T; 4. *Pseudorhizobium pelagicum* R1-200B4^T; 5. *Xaviernesmea oryzae* Alt 505^T; 6. *Pararhizobium giardinii* H152^T; 7. *Ensifer adhaerens* Casida A^T; 8. *Sinorhizobium fredii* USDA 205^T. No se muestran los ácidos grasos presentes en cantidades inferiores al 1% en todas las especies. N.D.: no detectado. Los datos provienen de este estudio y de De Lajudie *et al.*, 1994; Kimes *et al.*, 2015; Menéndez *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2016.

5.3.2.3. Descripción de *Ferranichuibacter* gen. nov.

Las células tienen forma de bastones, son aeróbicas, Gram negativas, móviles por medio de flagelos polares y subpolares (Figura 40) y no esporuladas. Las colonias presentaron coloración blanca en el medio YMA. Las células presentaron el crecimiento óptimo a 28 °C y a pH 7. Las pruebas de la catalasa y la oxidasa fueron positivas. Las pruebas de la reducción de los nitratos, la fermentación de la glucosa y de la arginina dihidrolasa fueron negativas. Las pruebas de la hidrólisis de la esculina y la producción de ureasa y de α-galactosidasa fueron positivas. Las pruebas de la producción de indol y H₂S fueron negativas. Los principales ácidos grasos fueron el C18: 1 ω6c/C18: 1 ω7c. La delimitación del género se determinó mediante la información filogenética de la secuenciación del gen ARNr 16S y mediante el análisis de la secuencia completa del genoma. La especie tipo es *Ferranichuibacter rubi*.

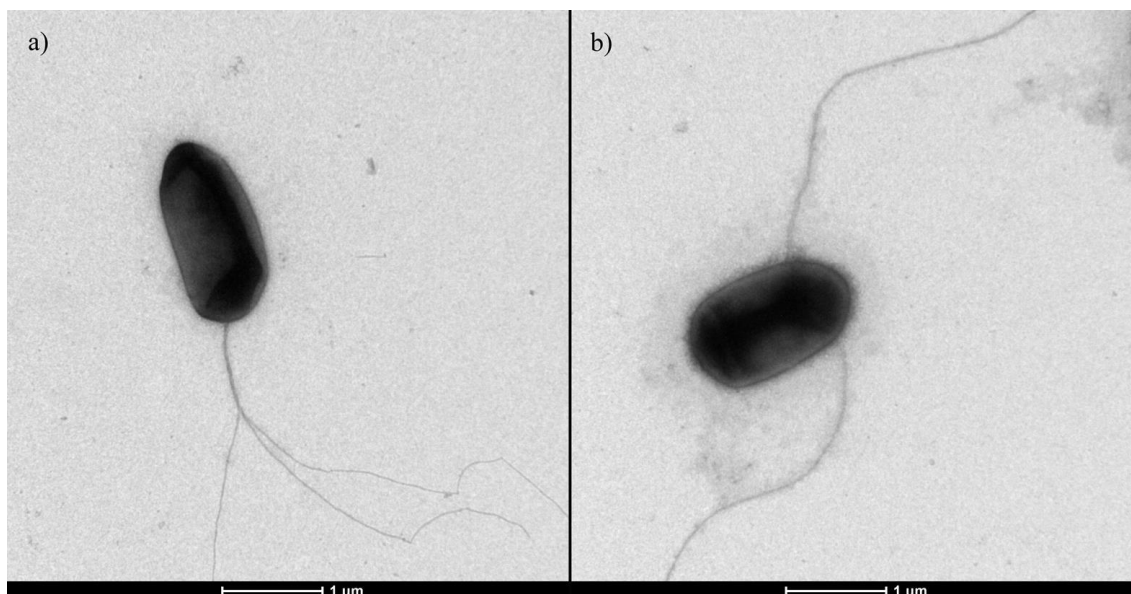


Figura 40. Micrografía electrónica de *Ferranicluibacter rubi* CRRU44^T mostrando el flagelo polar (A) y el subpolar (B) (TEM).

5.3.2.4. Descripción de *Ferranicluibacter rubi* sp. nov.

Las células son Gram negativas, aeróbicas, móviles mediante flagelos polares o subpolares (Figura 40), no esporuladas y tienen forma de bastón. Las colonias en YMA fueron de color crema/blanco, circulares y convexas con un diámetro de 0,5 mm en 48 h a 28 °C. Las pruebas de la catalasa y la oxidasa fueron positivas. La bacteria creció en un rango de temperatura de 5 a 37°C, siendo la temperatura óptima a 28°C, y en un rango de pH a 8 con crecimiento óptimo a pH 7. La bacteria fue capaz de crecer con hasta un 2% de NaCl. Las pruebas de la reducción de los nitratos, la gelatinasa y la arginina dihidrolasa fueron negativas. Las pruebas de la ureasa y la α -galactosidasa fueron positivas. La prueba de la hidrólisis de la esculina fue positiva. Las asimilaciones de la glucosa, la l-arabinosa, la l-ramnosa, la ribosa, la manosa, el manitol, la N-acetil-glucosamina, el inositol, la sacarosa, la maltosa, el malato, la melibiosa, la salicina, la l-fucosa y el sorbitol fueron positivas. Las asimilaciones del citrato, el gluconato, el caprato, el adipato, el fenilacetato, el itaconato, el suberato, el malonato, el propionato, el valerato, el glucógeno, la l-alanina, la l-serina, la l-histidina, el 3-hidroxi-butirato, el 2 y el 5-cetogluconato, el 3-hidroxi-benzoato y la l-prolina fueron negativas. El acetato, el DL-lactato y el 4-hidroxi-benzoato fueron asimilados débilmente. Los ácidos grasos principales fueron los de la característica sumada 8 (C18: 1 ω 6c/C18: 1 ω 7c) y C16: 0. El contenido de G+C fue del 62,8%. La cepa tipo, CRRU44^T (=CECT 30117^T =LMG 31822^T), fue aislada de un tallo de *Rubus ulmifolius* Schott.

5.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DEL CRECIMIENTO.

Con el fin de mantener las cepas aisladas en las mejores condiciones posibles para su uso rutinario, se evaluaron las condiciones óptimas del crecimiento atendiendo a la temperatura, la salinidad y el pH.

La determinación de las condiciones óptimas del crecimiento es un paso previo a cualquier otro análisis que se quiera realizar. Es necesario conocer cuáles son para poder diseñar correctamente los experimentos. En este sentido, diferentes rangos de temperaturas, de concentraciones de salinidad y de pH fueron evaluadas (Tabla 50).

Tabla 50. Resultados por cepa de crecimiento en diferentes condiciones.

Cepa	Temperatura				Salinidad				pH				
	5 °C	10 °C	37 °C	42 °C	1%	2,5%	5%	7%	4,5	5,5	6,5	8	9
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU02	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU03	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU04	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU06	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU07	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU08	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU09	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Novosphingobium silvae</i> CRRU10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU11	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU12	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Novosphingobium silvae</i> CRRU14	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU15	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU16	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU17	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU19	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rosae</i> CRRU20A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU20B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> CRRU21	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU25	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU26	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU27	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU29	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU31	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU32	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU33	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Curtobacterium pusillum</i> CRRU34	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas silesiensis</i> CRRU35	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU36	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Curtobacterium pusillum</i> CRRU37	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Pantoea agglomerans</i> CRRU38	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU39	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas lutea</i> CRRU40	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU41	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Pantoea septica</i> CRRU42	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rosae</i> CRRU43	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Ferranichluibacter rubi</i> CRRU44 [†]	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU45	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU46	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU47	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-

Continúa...

Continuación Tabla 50.

Cepa	Temperatura				Salinidad				pH				
	5 °C	10 °C	37 °C	42 °C	1%	2,5%	5%	7%	4,5	5,5	6,5	8	9
<i>Methylobacterium bullatum</i> CRRU48	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU49	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Inquilius ginsengisoli</i> CRRU52	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Curtobacterium herbarum</i> CRRU54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Novosphingobium fluoreni</i> CRRU55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU56	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Inquilius ginsengisoli</i> CRRU57	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU58	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Cellulosimicrobium composti</i> CRRU59A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Neobacillus drentensis</i> CRRU59B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Mesorhizobium australicum</i> CRRU60	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU62	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU65	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU66	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU67	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU68	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU69	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*-: crecimiento negativo. +: crecimiento positivo.

Con respecto a la temperatura, los resultados mostraron que el 67,1% (n=47) de las cepas eran capaces de crecer a 5 °C, el 91,4% (n=64) eran capaces de crecer a 10 °C y a 37 °C, y el 58,6% (n=41) a 42 °C. Además, el 37,1% (n=26) de las bacterias fueron capaces de crecer en todas las temperaturas testadas, destacando varias cepas de los géneros *Bacillus* y *Rhizobium*. Las especies del género *Bacillus* habitualmente son capaces de crecer a temperaturas elevadas. En este sentido, todas las cepas del género *Bacillus* aisladas en esta tesis mostraron ser capaces de crecer a 37 °C, y todas menos una, de crecer a 42 °C (Gohil *et al.*, 2022). Las bacterias del género *Rhizobium* son sensibles a los cambios de temperatura y muchas de sus actividades pueden verse afectadas (Zhang *et al.*, 2020c). Sin embargo, varias especies han sido documentadas por tolerar tanto las temperaturas altas como las bajas (Kumar Patel *et al.*, 2020). En esta tesis, el 66,7% (n=8) y el 50% (n=6) de los aislados pertenecientes al género *Rhizobium* fueron capaces de tolerar los 5 °C y los 42 °C, respectivamente. Varias bacterias endófitas han sido descritas por soportar bajas temperaturas, entre ellas destacan diversas especies de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Vega-Celedón *et al.*, 2021). De los aislados de esta tesis que pertenecen a estos géneros, el 100% de las cepas de *Curtobacterium* (n=3), *Pseudomonas* (n=6) y *Xanthomonas* (n=3) fueron capaces de crecer a 5 °C, mientras que solo el 33,3% (n=4) de los aislados pertenecientes al género *Bacillus* crecieron a esa temperatura y la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 no mostró crecimiento a 5 °C. En general, un porcentaje

elevado de cepas fueron capaces de crecer a bajas temperaturas. Las plantas de la especie *Rubus ulmifolus* Schott suelen requerir temperaturas frías para su correcto desarrollo, por lo tanto, la asociación con bacterias psicrotolerantes puede suponer un beneficio para la planta (Marian *et al.*, 2023).

En relación con la salinidad, los resultados mostraron que, de las 70 cepas evaluadas, el 88,6% (n=62) fueron capaces de crecer con un 1% de salinidad, el 74,3% (n=52) fueron capaces de crecer con un 2,5% de salinidad, el 51,4% (n=36) fueron capaces de crecer con un 5% de salinidad y el 38,6% (n=27) fueron capaces de crecer con un 7% de salinidad. En este caso, a medida que aumentamos la salinidad en el medio, la cantidad de cepas que podían soportar estas condiciones decreció. Cabe destacar que las cepas que eran capaces de crecer en cualquier concentración de salinidad, pertenecían principalmente al género *Bacillus*, el cual destaca por su capacidad para soportar importantes concentraciones osmóticas (Hantke *et al.*, 2019). Otros géneros bacterianos como los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas* han sido documentados por tolerar altas concentraciones de sal en los suelos (Papik *et al.*, 2020). En este sentido, de las cepas pertenecientes al género *Agrobacterium* aisladas en esta tesis, las dos cepas de la especie *Agrobacterium rosae* fueron capaces de crecer en todos los medios con salinidad, mientras que el resto de las cepas no toleraron el 7%. La cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 también fue capaz de crecer en todos los medios con salinidad. Las bacterias identificadas dentro del género *Pantoea*, aisladas en esta tesis, también fueron capaces de crecer en todos los medios. Finalmente, ninguna de las cepas aisladas pertenecientes al género *Pseudomonas* fue capaz de crecer en el medio al 7% de salinidad y sólo la mitad de ellas fueron capaces de crecer en el medio al 5% de salinidad. Otros géneros que destacaron por ser capaces de tolerar el 7% de salinidad fueron el 100% (n=1) de las cepas del género *Cellulosimicrobium*, el 33,3% (n=1) de las cepas del género *Curtobacterium*, el 25% (n=1) de las cepas del género *Neorhizobium*, el 66,6% (n=2) de las cepas del género *Novosphingobium*, el 33,3% (n=1) de las cepas del género *Sphingomonas*, el 33,3% (n=1) de las cepas del género *Staphylococcus* y el 25% (n=3) de las cepas del género *Rhizobium*. Algunas de estas bacterias ya han sido descritas en estudio anteriores por tolerar diferentes niveles de salinidad (Ayuso-Calles *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2022).

Por último, de las 70 cepas evaluadas, el 71,4% (n=50) fueron capaces de crecer a pH 4,5, el 87,1% (n=61) fueron capaces de crecer a pH 5,5, el 90% (n=63) fueron capaces de crecer a pH 6,5, el 97,1% (n=68) fueron capaces de crecer a pH 8 y el 24,3% (n=17) fueron capaces de crecer a pH 9. Las bacterias pertenecientes a filo Actinomycetota suelen predominar en los ambientes alcalinos, mientras que las pertenecientes al filo Acidobacteriota y a la clase Alphaproteobacteria predominan en los ambientes ácidos (Msimbira y Smith, 2020). El 60% (n=3) de las cepas pertenecientes al filo Actinomycetota aisladas en esta tesis fueron capaces de crecer a pH 9, mientras que de las pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria, el 60% (n=21) fueron capaces de tolerar el pH 4,5, y el 80% (n=28) fueron capaces de tolerar el pH 5,5. Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido descritos como alcalinotolerantes (Satyanarayana *et al.*,

2005). Todos los aislados pertenecientes a estos géneros fueron capaces de crecer a pH 8, pero sólo el 22,2% (n=4) fueron capaces de crecer a pH 9. Dentro de las bacterias acidotolerantes destacan los miembros de géneros *Arthrobacter* y *Pseudomonas* (Karagöz *et al.*, 2012). La cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 aislada en esta tesis fue capaz de crecer tanto a pH 4,5 como a 5,5. Por otro lado, de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, el 100% (n=6) fueron capaces de crecer a pH 5,5 mientras que sólo el 50% (n=3) fueron capaces de crecer a pH 4,5. En general, las bacterias aisladas en esta tesis toleraron mejor los pH ácidos que los básicos. Esto puede ser debido a que *Rubus ulmifolius* Schott crece preferentemente en suelos de carácter ácido, dominados por bacterias capaces de sobrevivir en ellos (Sikirić *et al.*, 2022).

Estos resultados muestran cómo la mayoría de los aislados presentaron condiciones de crecimiento cercanas a las condiciones normales empleadas para el aislamiento, las cuales fueron una temperatura a 28 °C, pH neutro y salinidad baja igual o inferior al 1%. Sin embargo, cabe destacar que muchos de los aislados presentaron tolerancia a condiciones ácidas y temperaturas bajas, lo que puede estar determinado por las condiciones ambientales donde fueron aislados (Scheuerl *et al.*, 2020).

6. CAPÍTULO III:
CARACTERIZACIÓN DE LA
CAPACIDAD DE LOS AISLADOS
PARA PROMOVER EL
CRECIMIENTO VEGETAL

Los fertilizantes químicos han sido usados durante años para aportar los nutrientes necesarios a los cultivos. Sin embargo, el uso indiscriminado ha dado lugar a varios problemas ambientales, entre los que destacan el aumento de los gases de efecto invernadero, el deterioro del suelo y la contaminación del agua (Singh, 2019). Por lo tanto, en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de alternativas más sostenibles con el medio ambiente, que mejoren el crecimiento vegetal sin dañar los ecosistemas. Los bioestimulantes, que puede ser bacterias capaces de promover el crecimiento vegetal, destacan como alternativa segura, ya que son capaces de mejorar el desarrollo de la planta ya que poseen diferentes mecanismos de acción que promueven el desarrollo vegetal (Pirttilä *et al.*, 2021).

En este sentido, las bacterias endofíticas son consideradas como unos potenciales candidatos para el desarrollo de bioinoculantes ya que promuevan el crecimiento de las plantas (Afzal *et al.*, 2019). Además, debido a que estas bacterias pueden establecerse con mayor facilidad en el interior de las plantas, es posible que los beneficios que aportan puedan mantenerse en el tiempo a largo plazo (Pirttilä *et al.*, 2021).

En este capítulo, fue evaluada la capacidad de promover el crecimiento vegetal de las 70 cepas aisladas en el Capítulo II. En primer lugar, se evaluaron *in vitro* los mecanismos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal, concretamente, el crecimiento en medios libres de nitrógeno, la solubilización de compuestos de fosfatos, la solubilización de compuestos de potasio, la producción de sideróforos, la producción de fitohormonas y la síntesis de ACC desaminasa. Por otro lado, la capacidad de colonización de las cepas también fue estudiada *in vitro*, realizando ensayos de producción de enzimas hidrolíticas y de producción de *biofilms*. Los resultados obtenidos permitieron hacer una selección de aquellas bacterias más eficientes. Posteriormente, tanto la capacidad de promover el crecimiento vegetal como la capacidad de colonizar de las cepas seleccionadas fue evaluado en ensayos *in vivo*, en plantas de tomate.

6.1. CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE LOS MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

Los estudios *in vitro* de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las bacterias permiten hacer una evaluación de las características de las cepas, permitiendo seleccionar las que tengan mayor potencial bioestimulante. En este capítulo las actividades PGP evaluadas fueron el crecimiento en un medio sin fuente de nitrógeno, la solubilización de compuestos de fósforo, la solubilización de compuestos de potasio, la producción de sideróforos, la producción de auxinas y la síntesis de la ACC desaminasa.

6.1.1. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.

El crecimiento en medios libres de nitrógeno fue evaluado de forma presuntiva en un medio sin fuente de nitrógeno, en donde el crecimiento indicaba que el microorganismo podría ser capaz de reducir el nitrógeno del aire y usarlo como fuente de nitrógeno. El estudio del crecimiento en el medio libre de nitrógeno sólo fue realizado en

46 cepas, ya que las bacterias aisladas pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* precisan establecer simbiosis con plantas leguminosas para llevar a cabo esta actividad. Por lo tanto, este método no sirve para evaluar su capacidad de fijación de nitrógeno (Kuan *et al.*, 2016). De estas 46 cepas, únicamente el 34,7% (n=16) fue capaz de crecer en el medio sin nitrógeno (Figura 41 y Tabla 51). Estas bacterias pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Inquilingus*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* y *Xanthomonas*.



Figura 41. Evaluación *in vitro* del crecimiento en el medio sin fuente de nitrógeno. Control negativo sin inocular (izquierda) frente a *Sphingomonas psychrotolerans* CRRU64 con resultado positivo en el crecimiento en el medio sin fuente de nitrógeno (derecha).

Tabla 51. Resumen de las actividades PGP evaluadas *in vitro*.

Cepa	Tejido	Sid.	BiP	TriP	HXP	K	N ₂	AIA	ACC	Cel.	Amil.	Xil
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU02	Raíz	-	-	-	-	-	-	668	N	+	+	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU03	Raíz	+	+	-	-	+	NE	60	N	+	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU04	Raíz	-	-	-	-	-	+	46	N	+	+	+
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU05	Raíz	+	+	+	-	-	-	80	NC	-	+	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU06	Raíz	-	-	-	-	-	NE	0	N	-	+	-
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU07	Raíz	-	-	-	-	-	-	21	CN	+	+	-
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU08	Raíz	-	-	-	-	-	-	0	N	-	+	+
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU09	Raíz	-	+	-	-	-	-	31	-	+	+	-
<i>Novosphingobium silvae</i> CRRU10	Raíz	-	-	-	-	-	-	10	CN	+	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU11	Raíz	-	-	-	-	+	NE	13	CN	-	+	+
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU12	Raíz	-	+	+	-	-	NE	124	N	-	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU13	Raíz	-	+	-	-	-	NE	152	CN	-	+	-
<i>Novosphingobium silvae</i> CRRU14	Raíz	-	-	-	-	-	-	57	-	+	+	-
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU15	Raíz	-	+	-	-	-	-	84	-	-	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU16	Raíz	+	-	-	-	-	NE	55	CN	+	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU17	Raíz	+	+	-	-	-	NE	33	CN	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU18	Raíz	+	+	+	-	-	-	18	CN	-	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU19	Raíz	-	+	-	-	-	-	0	N	-	+	-
<i>Agrobacterium rosae</i> CRRU20A	Raíz	+	+	-	-	-	NE	21	CN	-	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU20B	Raíz	+	+	-	-	-	+	46	CN	-	+	-
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> CRRU21	Raíz	+	-	-	-	-	+	74	CN	-	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU22	Tallo	+	+	-	-	-	-	22	N	-	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU23	Tallo	+	+	-	-	-	-	55	CN	+	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU24	Tallo	+	+	-	-	-	-	34	N	-	+	-

Continúa...

Continuación Tabla 51.

Cepa	Tejido	Sid.	BiP	TriP	HXP	K	N ₂	AIA	ACC	Cel.	Amil.	Xil
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU25	Tallo	-	+	-	-	-	-	18	CN	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU26	Tallo	-	+	-	-	-	-	45	N	-	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU27	Tallo	+	+	-	-	-	-	33	N	-	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU28	Tallo	+	+	-	-	-	-	51	CN	-	-	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU29	Tallo	+	+	+	-	-	+	57	CN	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU30	Tallo	+	+	-	-	-	-	25	CN	-	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU31	Tallo	+	-	-	-	-	-	273	N	+	+	+
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU32	Tallo	+	+	-	-	+	NE	419	N	-	+	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU33	Tallo	-	-	-	-	-	NE	175	CN	-	+	-
<i>Curtobacterium pusillum</i> CRRU34	Tallo	-	+	+	-	-	-	0	N	-	-	+
<i>Pseudomonas silesiensis</i> CRRU35	Tallo	+	+	+	-	-	-	365	CN	+	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU36	Tallo	+	+	-	-	-	+	328	N	+	+	-
<i>Curtobacterium pusillum</i> CRRU37	Tallo	-	-	-	-	-	-	26	CN	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> CRRU38	Tallo	-	+	+	+	+	+	661	N	-	-	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU39	Tallo	+	+	+	-	+	+	18	CN	+	-	-
<i>Pseudomonas lutea</i> CRRU40	Tallo	+	+	-	-	-	+	28	CN	-	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU41	Tallo	+	-	-	-	-	-	315	N	+	+	+
<i>Pantoea septica</i> CRRU42	Tallo	-	-	-	-	-	-	503	N	+	+	+
<i>Agrobacterium rosae</i> CRRU43	Tallo	+	+	+	-	-	NE	0	N	+	-	-
<i>Ferranicluiibacter rubi</i> CRRU44	Tallo	-	-	-	-	-	NE	153	N	+	+	+
<i>Rhizobium soli</i> CRRU45	Tallo	+	+	+	-	-	NE	105	N	-	+	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU46	Tallo	+	+	+	-	+	NE	51	CN	-	+	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU47	Tallo	+	+	+	-	+	-	73	CN	+	+	+
<i>Methylobacterium bullatum</i> CRRU48	Tallo	-	-	-	-	-	NE	15	CN	-	-	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU49	Tallo	+	-	-	-	+	NE	106	N	-	+	-
<i>Inquilineus ginsengisoli</i> CRRU52	Raíz	+	+	+	-	-	+	128	CN	+	-	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU53	Raíz	+	-	-	-	-	-	105	C	+	+	+
<i>Curtobacterium herbarum</i> CRRU54	Tallo	+	+	+	-	-	-	8	N	-	-	-
<i>Novosphingobium fluoreni</i> CRRU55	Tallo	+	+	+	-	-	+	91	-	+	+	+
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU56	Tallo	+	+	+	-	-	+	53	CN	+	+	-
<i>Inquilineus ginsengisoli</i> CRRU57	Raíz	-	-	+	-	-	+	145	CN	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU58	Raíz	-	+	-	-	-	-	19	C	-	+	-
<i>Cellulosimicrobium composti</i> CRRU59A	Raíz	+	-	-	-	-	+	21	CN	+	+	+
<i>Neobacillus drentensis</i> CRRU59B	Raíz	-	-	-	-	-	-	31	CN	+	+	+
<i>Mesorhizobium australicum</i> CRRU60	Raíz	-	+	+	-	-	NE	187	CN	-	+	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU61	Raíz	+	+	+	-	+	NE	39	N	+	-	+
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU62	Raíz	-	-	-	-	-	NE	0	CN	-	+	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU64	Raíz	+	+	-	-	+	+	74	N	+	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU65	Raíz	-	+	-	-	+	NE	62	CN	-	-	-
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU66	Raíz	-	-	-	-	-	-	12	CN	+	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU67	Raíz	-	+	-	-	+	NE	156	CN	-	+	-
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU68	Raíz	+	-	-	-	-	+	840	CN	+	+	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU69	Raíz	-	-	-	-	-	+	0	-	+	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU70	Raíz	-	+	+	-	-	NE	31	CN	+	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU71	Raíz	-	-	-	-	+	NE	165	CN	-	+	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU72	Raíz	-	+	-	-	-	NE	221	CN	+	+	-

Abreviaturas: Sid: producción de sideróforos; BiP: solubilización del fosfato bicálcico; TriP: solubilización del fosfato tricálcico; HXP: solubilización de la hidroxiapatita; K: solubilización del compuesto de potasio; N₂: crecimiento en el medio libre de nitrógeno; AIA: producción de AIA de forma presuntiva (mg/L); ACC: síntesis de la enzima ACC desaminasa; Cel: producción de celulasa; Amil: producción de amilasa; Xil: producción de xilanasa. NA: No Aplica; NE: No Evaluado; C: utilización del ACC como fuente de carbono; N: utilización del ACC como fuente de nitrógeno; CN: utilización del ACC como fuente de nitrógeno y de carbono.

Los microorganismos que pueden llevar a cabo el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico son variados y están divididos principalmente en dos grupos, los de vida libre y los endosimbiontes (Davies-Barnard y Friedlingstein, 2020). Los de vida libre son capaces de fijar el nitrógeno sin interactuar directamente con otro ser vivo, mientras que los endosimbiontes han de establecer una relación con las plantas para llevar a cabo esta función (Kuan *et al.*, 2016). En este último grupo encontramos los miembros del orden Hyphomicrobiales, que solo pueden llevar a cabo la actividad en simbiosis con plantas leguminosas (Mazoyon *et al.*, 2023). Es por ello, que las cepas pertenecientes a este orden no fueron evaluadas.

De las bacterias fijadoras del nitrógeno en vida libre, el género *Bacillus* es uno de los más estudiados, cuya inoculación en las plantas ha mostrado aumentar el contenido de este nutriente (Masood *et al.*, 2020). Sin embargo, de todos los aislados pertenecientes a este género sólo uno, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B presentó la capacidad de crecer en el medio sin fuente de nitrógeno. Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* también han sido estudiadas por ser capaces de aumentar el nitrógeno disponible para las plantas mediante la fijación del nitrógeno atmosférico (Singh *et al.*, 2023). En este caso, el 66,7% (n=4) de las cepas aisladas identificadas dentro del género *Pseudomonas* fueron capaces de crecer en medios sin fuente de nitrógeno. La fijación del nitrógeno en vida libre ha sido observada en multitud de géneros bacterianos, filogenéticamente muy diversos (Davies-Barnard y Friedlingstein, 2020). En esta tesis, algunos de los miembros de los géneros *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Inquilinus*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Pantoea*, *Sphingobium* y *Xanthomonas* mostraron ser capaces de crecer en el medio libre de nitrógeno, por lo que podrían ser capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. De hecho, los miembros de algunos de estos géneros ya han sido previamente descritos por poseer esta actividad (Bizjak *et al.*, 2023; Mazoyon *et al.*, 2023; Sathasivam y Packiaraj, 2021; Sellstedt y Richau, 2013; Singh *et al.*, 2023), pero en otros como los géneros *Inquilinus* o *Sphingobium* no se han sido descritos aun especies con la capacidad de fijar el nitrógeno.

6.1.2. Solubilización de compuestos de fosfato.

En condiciones *in vitro*, la solubilización de compuestos de fosfato fue detectada con los medios PKVII, PKVIII y NBRIP, formulados en base al fosfato bicálcico, el fosfato tricálcico y la hidroxiapatita. En todos ellos, la solubilización fue visible por la aparición de un halo alrededor de la colonia. De las 70 cepas estudiadas, el 61,4% (n=43) fue capaz de solubilizar el fosfato bicálcico, el 28,6% (n=20) fue capaz de solubilizar el fosfato tricálcico y sólo una cepa fue capaz de solubilizar la hidroxiapatita, concretamente *Pantoea agglomerans* CRRU38 (Figura 42 y Tabla 51).

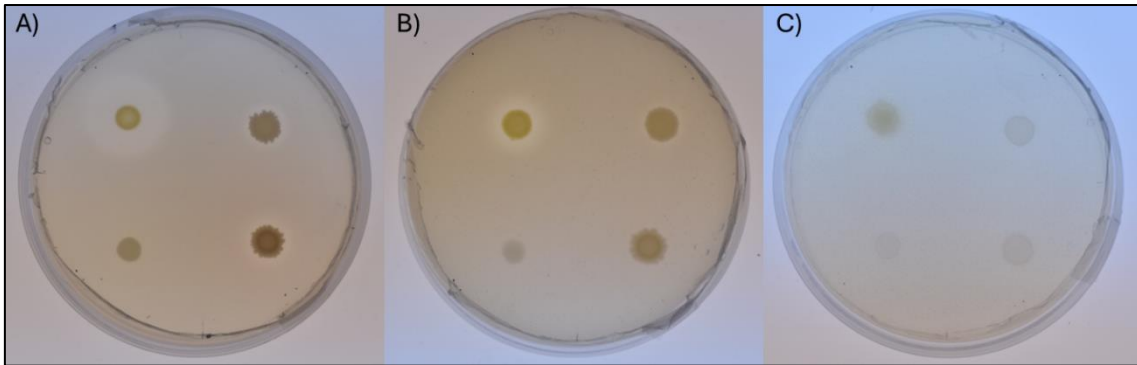


Figura 42. Cepas solubilizadoras de fosfatos en medio A) PKVII, B) PKV III y C) NBRIP. Las cepas de la imagen fueron *Pantoea agglomerans* CRRU38 (arriba izquierda), *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 (arriba derecha), *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (abajo izquierda) y *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B (abajo derecha).

Los miembros del género *Pantoea* ya han sido estudiados por ser capaces de solubilizar los compuestos de fosfato y aumentar la disponibilidad del fósforo para algunas plantas como *Lotus tenuis* o *Triticum aestivum* L. (Cumpa-Velásquez *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2022). La cepa *Pantoea agglomerans* CRRU38 podría ser considerada como la que mayor poder solubilizador presentó, aunque otras cepas de este estudio también mostraron muy buenos resultados, como por ejemplo las cepas *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Curtobacterium herbarum* CRRU54, *Pseudomonas congelans* CRRU56 y *Mesorhizobium australicum* CRRU60. Tres de los géneros bacterianos más eficientes a la hora de solubilizar fosfatos son los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Silva *et al.*, 2023). En esta tesis, el 100% de las cepas identificadas dentro del género *Bacillus* (n=13) y de las cepas identificadas dentro del género *Pseudomonas* (n=6) fueron capaces de solubilizar el medio PKVII, mientras que solo el 7,7 (n=1) y el 8,3% (n=5) respectivamente fueron capaces de solubilizar el PKVIII. Con respecto al género *Rhizobium*, el 75% (n=9) fue capaz de solubilizar el PKVII, y solo el 33,3% (n=4) fue capaz de solubilizar el PKVIII. Además, otros géneros bacterianos han sido descritos como solubilizadores de los compuestos de fosfatos, como *Azospirillum*, *Nitrosomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Enterobacter* y *Pantoea* (Silva *et al.*, 2023). En esta tesis, las dos bacterias del género *Pantoea* mostraron la capacidad de solubilizar los compuestos de fosfatos, mientras que ninguna de las bacterias del género *Xanthomonas* fue capaz de solubilizar ninguno de los medios.

6.1.3. Solubilización de compuestos de potasio.

La solubilización *in vitro* de los compuestos de potasio fue evaluada empleando el medio Aleksandrov (Boubekri *et al.*, 2022), formulado con silicato de aluminio y potasio ($AlKO_6Si_2$). En este medio sólo el 18,6% (n=13) de las cepas fue capaz de solubilizar el compuesto (Figura 43 y Tabla 51).

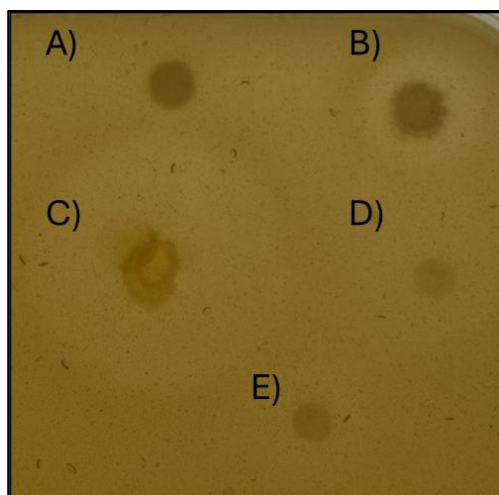


Figura 43. Ensayo de la solubilización del compuesto de potasio A) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B; B) *Pseudomonas silesiensis* CRRU35; C) *Pantoea agglomerans* CRRU38; D) *Rhizobium laguerreae* CRRU65; E) *Ferrancluibacter rubi* CRRU44.

Los resultados mostraron que varias cepas pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Neorhizobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Sphingomonas* fueron capaces de solubilizar el compuesto de potasio. De estos géneros destacó *Rhizobium*, pues el 41,7% (n=5) de los aislados en esta tesis fue capaz de solubilizar el compuesto de potasio. El género *Rhizobium* es uno de los géneros bacterianos descritos por ser capaz de solubilizar los compuestos del potasio (Jain *et al.*, 2022). Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* también han sido descritos por poseer esta actividad (Olaniyan *et al.*, 2022; Pandey *et al.*, 2020). Sin embargo, ninguna de las cepas del género *Bacillus* de esta tesis mostraron poseer esta actividad y sólo el 40% (n=2) de las cepas del género *Pseudomonas* mostraron resultados positivos. Otros géneros bacterianos han sido descritos como solubilizadores de los compuestos del potasio, entre los que se encuentran los géneros *Agrobacterium*, *Pantoea* y *Sphingomonas* (Bakhshandeh *et al.*, 2017; Meena *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2017). De las cepas aisladas, sólo el 40,0% (n=2) de las cepas pertenecientes al género *Agrobacterium*, el 50,0% (n=1) de las cepas pertenecientes al género *Pantoea* y el 33,3% (n=1) de las cepas pertenecientes al género *Sphingomonas* fueron capaces de solubilizar el compuesto del potasio *in vitro*.

6.1.4. Producción de sideróforos.

La producción de sideróforos *in vitro* fue detectada usando el medio de cultivo M9-CAS-Agar, en el que la absorción del hierro del medio por parte de los sideróforos da lugar a un cambio de pH y un viraje de color, produciendo un halo anaranjado alrededor de la colonia (Figura 44). Esta actividad fue estudiada en las 70 cepas aisladas, encontrando que el 51,4% (n=36) tenían la capacidad de producir sideróforos (Tabla 51).

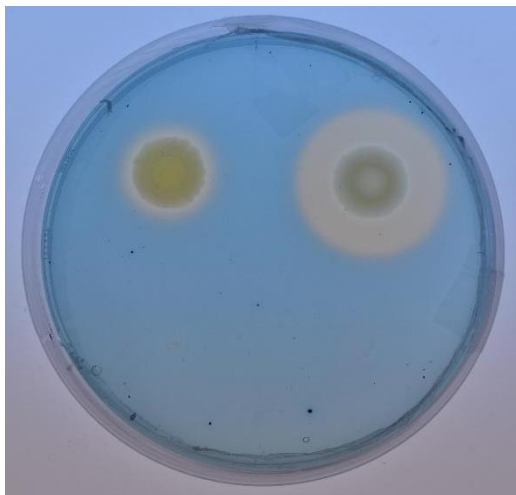


Figura 44. Cepas *Pantoea agglomerans* CRRU38 (superior izquierda) y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 (superior derecha) productoras de sideróforos, frente a *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (inferior izquierda) y *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B (inferior derecha), que muestra resultados negativos en esta prueba.

Del total de cepas que mostraron resultados positivos, el 22,2% (n=8) y el 16,7% (n=6) pertenecieron a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* respectivamente. No fue sorprendente encontrar que los miembros de estos géneros fueran capaces de producir este tipo de moléculas. Ambos géneros han sido ampliamente estudiados y son conocidos por producir una gran variedad de compuestos bioactivos derivados de su metabolismo secundario. Muchas especies del género *Bacillus* son capaces de producir bacilibactina, un sideróforo de la familia de los catecoles con la capacidad de promover la absorción del hierro en algunas plantas como el sésamo (Nithyapriya *et al.*, 2021). Por otro lado, las especies del género *Pseudomonas* también son conocidas por ser productoras de sideróforos como la pioverdina, un hidroxamato (Philippot *et al.*, 2013).

En general, la producción de sideróforos es una actividad bastante común, sobre todo entre las bacterias Gram negativas, de las que se estima que el 90% son capaces de producirlos (Deb y Tatung, 2024). De las bacterias Gram negativas aisladas en esta tesis, el 49% mostró resultados positivos. De estos, varios géneros bacterianos ya han sido estudiados por su capacidad de promover el crecimiento vegetal relacionado con la producción de sideróforos. Por ejemplo, los géneros *Rhizobium* y *Xanthomonas* (Sayyed *et al.*, 2013). De las bacterias aisladas pertenecientes a estos géneros, el 25% (n=3) de las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* y el 100% (n=3) de las bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas* fueron capaces de producir sideróforos.

6.1.5. Producción de auxinas.

La producción de auxinas fue evaluada *in vitro* usando una técnica presuntiva basada en la colorimetría. De las 70 cepas evaluadas, el 91,49% (n=64) de las cepas aisladas en este trabajo mostró ser capaz de sintetizar esta fitohormona en condiciones *in vitro* (Figura 45 y Tabla 51). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en otros trabajos, en los que se consideró que alrededor de un 80% de las bacterias presentes en

asociación con las plantas eran capaces de producir esta fitohormona (Popržen *et al.*, 2023).

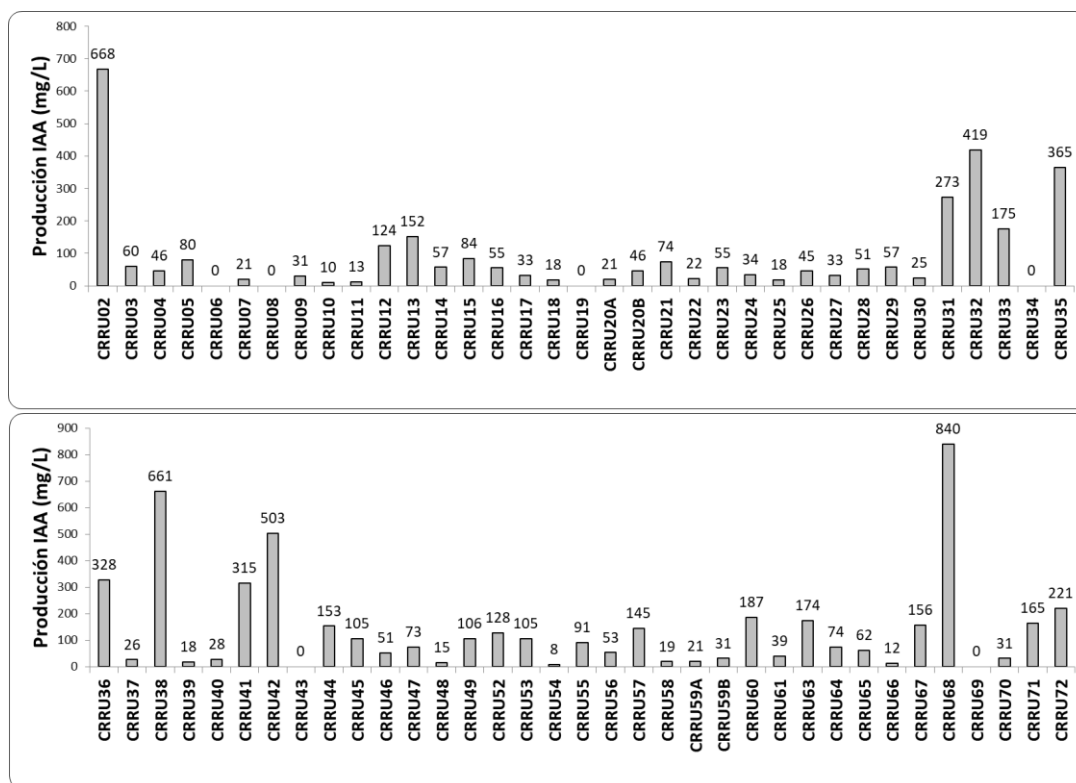


Figura 45. Resultados de la producción presuntiva de auxinas (mg/L).

Tras el estudio, 10 cepas produjeron grandes cantidades de auxinas, superando los 200 mg/L e incluso llegando a superar los 800 mg/L. Estas fueron las cepas *Sphingobium aromaticiconvertens* CRRU02, *Xanthomonas campestris* CRRU31, *Agrobacterium rubi* CRRU32, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Xanthomonas campestris* CRRU36, *Pantoea agglomerans* CRRU38, *Xanthomonas campestris* CRRU41, *Pantoea septica* CRRU42, *Sphingobium aromaticiconvertens* CRRU68 y *Rhizobium laguerreae* CRRU72. La mayoría de estos géneros ya han sido descritos como productores habituales de esta hormona (Costacurta *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2014; Luziatelli *et al.*, 2020). Aunque en términos generales la síntesis de esta fitohormona ayuda al crecimiento de las plantas, también puede jugar diferentes papeles en su desarrollo, dependiendo de la concentración (Spaepen *et al.*, 2007). A menudo, la producción de altas concentraciones ha sido asociada con los niveles de patogenicidad en las interacciones planta-microorganismo patógeno (Fu y Wang, 2011). Uno de los ejemplos más estudiados es el del género *Agrobacterium*, conocido por su capacidad para formar tumores en diferentes plantas, siendo este proceso dependiente de la producción del AIA, un tipo de auxina (Meyer *et al.*, 2019). En esta tesis, la cepa *Agrobacterium rubi* CRRU32 mostró producir altas concentraciones de la hormona, que podría indicar una potencial patogenicidad. Del mismo modo, el género *Xanthomonas* es ampliamente conocido por ser un patógeno común de muchas especies vegetales (Timilsina *et al.*, 2020) y se ha visto que la producción de AIA influye en el grado de patogenicidad en la planta (Fett *et al.*, 1987).

Estos datos son concordantes con los resultados obtenidos para las cepas de *Xanthomonas* aisladas en el presente trabajo, las cuales produjeron altas cantidades de la fitohormona.

Algunos géneros que han destacado por producir un nivel moderado de auxinas fueron los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Pantoja-Guerra *et al.*, 2023). De las bacterias aisladas en esta tesis pertenecientes a estos géneros, la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 produjo 74 mg/L de auxinas, el 91,7% (n=11) de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* produjo auxinas en un rango de entre los 18 y los 55 mg/L, el 100% (n=6) de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* produjo auxinas en un rango de entre los 18 y los 365 mg/L, mientras que el 83,3% (n=10) de las cepas pertenecientes al género *Rhizobium* aisladas en esta tesis produjo auxinas en un rango de entre los 31 y los 221 mg/L. De todos estos géneros, el género *Rhizobium* es el que produjo una concentración moderada de este tipo de hormonas, lo cual podría estar relacionado con la promoción del crecimiento vegetal. Este efecto ya ha sido estudiado en investigaciones previas donde la inoculación de plantas de lechuga y espinacas con cepas del género *Rhizobium* productoras de AIA incrementaba el tamaño de las plantas (Ayuso-Calles *et al.*, 2020; Jiménez-Gómez *et al.*, 2018).

6.1.6. Síntesis de la ACC-desaminasa.

La evaluación de la síntesis de la enzima ACC desaminasa fue llevada a cabo usando diferentes medios suplementados con ACC, pero sin fuente de carbono o de nitrógeno. El crecimiento en estos medios indicaba que la cepa era capaz de usar el ACC como fuente del nutriente que faltaba. Tras el estudio *in vitro*, el 92,9% (n=65) de las cepas fueron capaces de utilizar el ACC. De ellas, el 4,6% (n=3) lo usaban como fuente de carbono, el 38,5% (n=25) como fuente de nitrógeno y el 57,0% (n=37) como fuente de ambos nutrientes (Tabla 51). La enzima ACC desaminasa es bastante común entre las bacterias de origen endofítico, por lo que no es sorprendente que la gran mayoría de los aislados en esta tesis presentasen esta actividad (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2020). Un gran número de bacterias han sido descritas por presentar esta enzima, destacando los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* o *Rhizobium* (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2020). De las cepas aisladas en esta tesis, y pertenecientes a estos géneros, el 100% (n=36) fue capaz de usar el ACC. Únicamente 5 cepas de las aisladas en esta tesis no presentaron esta actividad, estas fueron las cepas *Staphylococcus warneri* CRRU09, *Novosphingobium silvae* CRRU14, *Mucilaginibacter celer* CRRU15, *Novosphingobium fluoreni* CRRU55 y *Sphingomonas psychrotolerans* CRRU69. Sin embargo, todos estos géneros bacterianos han sido descritos previamente como metabolizadores del ACC (Lee *et al.*, 2023; Mazoyon *et al.*, 2023; Rawat *et al.*, 2022). Es posible que estas cepas sólo muestren la actividad cuando se den condiciones específicas, pues a menudo esta actividad es inducida por factores abióticos como la salinidad o la presencia de metales pesados (Chandwani y Amaresan, 2022).

6.2. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LÍTICAS.

La capacidad de colonizar los tejidos vegetales y establecerse en la planta es una cualidad deseable en las bacterias que se quieran emplear en la agricultura. Para que la colonización sea exitosa, la bacteria debe enfrentarse a varios obstáculos, siendo uno de los más importantes la pared vegetal (Santoyo, 2022). La pared vegetal es una matriz extracelular compleja formada por varios componentes, donde el más abundante es la celulosa, la cual se estima que es la macromolécula orgánica más abundante del mundo. Mientras que el segundo más abundante es el xilano (Jayasekara y Ratnayake, 2019). Es por esto que, aunque los componentes de la pared vegetal son muchos, el estudio de su degradación por parte de las bacterias aisladas estuvo basado en estas dos moléculas. De forma adicional, también fue estudiada la degradación del almidón, debido a que es uno de los principales componentes de la superficie de las semillas y la colonización de las mismas también resulta ser una actividad deseable en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Samreen *et al.*, 2021).

6.2.1. Producción de celulasas.

La producción de celulasas *in vitro* fue detectada usando los medios habituales de crecimiento (TSA o TY) suplementados con carboximetilcelulosa, un análogo de la celulosa. Los resultados fueron observados usando el colorante Rojo Congo, que se une a los enlaces β -(1 \rightarrow 4). Alrededor de las cepas productoras de las enzimas, se observó un halo sin coloración roja (Figura 46). De las 70 cepas evaluadas, el 50% (n=35) presentó actividad celulasa (Tabla 51).

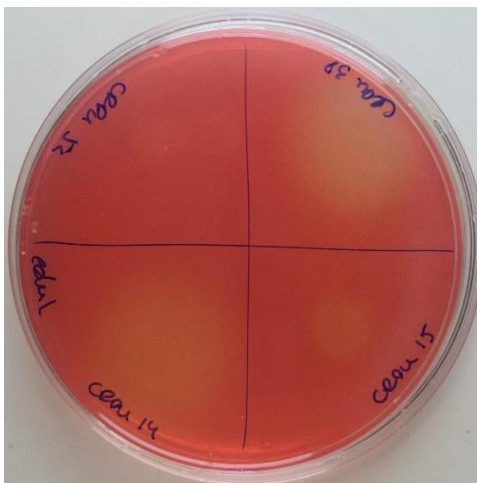


Figura 46. Ensayo de la producción de celulasas. Las bacterias de izquierda a derecha y de arriba a abajo son *Inquilinus ginsengisoli* CRRU52, *Pantoea agglomerans* CRRU38, *Novosphingobium silvae* CRRU14 y *Mucilaginibacter celer* CRRU15.

La celulosa es el componente mayoritario de las células vegetales, formando entre un 40 y un 95% de las plantas, dependiendo de la especie (Waliszewska *et al.*, 2019). Es un homopolímero de glucosas unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4)-glucosídicos (Brigham, 2017). Inicialmente, cabría esperar que un mayor porcentaje de los aislados mostrase resultados positivos, ya que todos los aislados son endófitos. Este tipo de bacterias suelen estar

asociadas con actividades celulolíticas que les permitirían colonizar los tejidos vegetales (Walitang *et al.*, 2017). En este sentido, de las cepas aisladas de raíz, el 53,8% (n=21) presentó la actividad, y de las cepas aisladas de tallo, fue el 45,2% (n=14), por lo que no parece que este tipo de actividad este vinculada al tejido de donde se aislaron las cepas.

La actividad celulolítica ha sido descrita en multitud de bacterias pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* (Rat *et al.*, 2021). Sin embargo, de los miembros aislados pertenecientes a esta familia, sólo el 36,4% (n=8), parecían poseer esta actividad. Los miembros de la familia *Sphingomonadaceae* también han sido relacionados con actividades celulolíticas (Jia *et al.*, 2020). Con respecto a esta familia, el 100% (n=8) de los aislados presentaron esta actividad. Estas dos familias son los representantes mayoritarios de las bacterias aisladas del interior de las raíces. Algunos de los géneros bacterianos descritos previamente como celulolíticos en los estudios anteriores fueron los géneros *Bacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Inquilinus*, *Mucilaginibacter*, *Neobacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Xanthomonas* (Bautista-Cruz *et al.*, 2024; Dobrzyński *et al.*, 2023; Ebu *et al.*, 2023; Oktiarni *et al.*, 2021; Shamshitov *et al.*, 2023; Vu *et al.*, 2021). De los aislados de esta tesis pertenecientes a estos géneros sólo el 16,7% (n=2) de las cepas pertenecientes al género *Bacillus*, el 100% (n=1) de las cepas pertenecientes al género *Cellulosimicrobium*, el 100% (n=2) de las cepas pertenecientes al género *Inquilinus*, el 33,3% (n=1) de las cepas pertenecientes al género *Mucilaginibacter*, el 100% (n=1) de las cepas pertenecientes al género *Neobacillus*, el 50% (n=1) de las cepas pertenecientes al género *Pantoea*, el 83,3% (n=5) de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, el 66,7% (n=2) de las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* y el 100% (n=3) de las cepas pertenecientes al género *Xanthomonas* mostraron poseer esta actividad *in vitro*.

6.2.2. Producción de xilanasas.

La producción de xilanasas *in vitro* fue detectada usando los medios habituales de crecimiento (TSA o TY) suplementados con xilano. Los resultados fueron observados usando el colorante Rojo Congo, que se une a los enlaces β -(1 \rightarrow 4). Alrededor de aquellas cepas productoras de las enzimas, se observó un halo clareado (Figura 47). De las 70 cepas evaluadas, el 24,3% (n=17) presentaron la actividad xilanasas. En este caso, sólo el 29,0% (n=9) y el 25,7% (n=8) de las cepas aisladas en la raíz y el tallo respectivamente presentaron esta actividad (Figura 47 y Tabla 51).



Figura 47. La cepa *Agrobacterium rosae* CRRU43 mostrando actividad xilanasas.

El xilano es un componente de la pared celular secundaria de los vegetales, siendo una de las hemicelulosas más abundantes. Está formado por una estructura principal de residuos repetidos de β -(1 \rightarrow 4) xilosa, ramosa y ácido galacturónico (Wierzbicki *et al.*, 2019). Con respecto a la actividad xilanasas, muy pocas cepas mostraron resultados positivos. Algunas fueron miembros de la familia *Sphingomonadaceae*, concretamente el 22,2% (n=2), las cuales ya han sido asociadas anteriormente con esta actividad (Wilhelm *et al.*, 2019). También produjeron xilanasas algunas cepas del género *Bacillus* como la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU22, de hecho, este género es considerado uno de los que mayor potencial de producción de xilanasas tienen (Chakdar *et al.*, 2016). Por último, la cepa *Agrobacterium rosae* CRRU43 también mostró poseer actividad xilanolítica, la cual en algunos estudios ha sido relacionada con la virulencia de las cepas (Mathews *et al.*, 2019). Otros géneros bacterianos descritos como xilanolíticos han sido los géneros *Arthrobacter*, *Pantoea*, *Staphylococcus* y *Xanthomonas* (Chakdar *et al.*, 2016; Haidar *et al.*, 2021), de estos, las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pantoea septica* CRRU42, *Staphylococcus warneri* CRRU04, *Xanthomonas campestris* CRRU31 y *Xanthomonas campestris* CRRU41 mostraron resultados positivos en la evaluación de esta actividad. Otros géneros aislados en esta tesis con actividad xilanolítica fueron los géneros *Cellulosimicrobium*, *Curtobacterium*, *Neorhizobium* y *Sphingomonas*.

6.2.3. Producción de amilasas.

La detección de la producción de amilasas *in vitro* fue detectada usando un medio compuesto principalmente por almidón. Los resultados fueron observados aplicando lugol, una solución que se intercala en las moléculas de almidón y, en contacto con el aire, presenta una tonalidad morada oscura (Pospiech *et al.*, 2014). Aquellas cepas que degradan el almidón presentan un halo transparente alrededor. De las 70 cepas evaluadas, el 81,4% (n=57) presentaron la actividad amilasa. En este caso, el 89,7% (n=35) y el 71,0% (n=2) de las cepas aisladas en la raíz y en el tallo respectivamente presentaron resultados positivos para esta actividad. Ambos porcentajes fueron bastante elevados y

parecen indicar que no existe correlación entre el poseer esta actividad y el lugar en la planta de donde han sido aisladas (Figura 48 y Tabla 51).



Figura 48. Ensayo de producción de amilasas. Las bacterias de izquierda a derecha y de arriba a abajo son *Rhizobium laguerreae* CRRU65, *Sphingomonas psychrotolerans* CRRU64, *Rhizobium laguerreae* CRRU62, *Neorhizobium galegae* CRRU61, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU30, *Agrobacterium rubi* CRRU32, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU23, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU22, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU27, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU26, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU25, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU24, *Methylobacterium bullatum* CRRU48, *Pseudomonas congelans* CRRU47, *Rhizobium soli* CRRU46, *Rhizobium soli* CRRU45.

El almidón es un carbohidrato insoluble compuesto por repeticiones de α -glucosa. Es sintetizado por las plantas como almacén de energía y suele aparecer en tejidos no fotosintéticos, como las semillas o las raíces (Pfister y Zeeman, 2016). Los géneros bacterianos más importantes asociados con esta actividad son los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Ratnakomala *et al.*, 2019). De las bacterias aisladas en esta tesis, el 84,6% (n=11) de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* y el 83,3% (n=5) de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron capaces de hidrolizar el almidón. Mientras que la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 no mostró resultados positivos para esta actividad. Otros géneros bacterianos en los que la actividad ha sido estudiada son el género *Rhizobium*, del que se observó que el 91,7% (n=11) de los aislados mostraron resultados positivos; el género *Agrobacterium*, del que se observó que el 80% (n=4) de los aislados mostraron resultados positivos; o los miembros de la familia *Sphingomonadaceae* (Paul *et al.*, 2021; Shahar *et al.*, 2022, 2023; J. Wan *et al.*, 2022), de los que el 100% (n=9) de los fueron capaces de hidrolizar el almidón.

En general, la detección de estas actividades es común entre las bacterias asociadas a la rizosfera y a la endosfera de las especies vegetales ya que les permite colonizar activamente el interior de las plantas y aprovechar las fuentes de los nutrientes circundantes (Mengistu, 2020). Sin embargo, la evaluación *in vitro* llevada a cabo en esta tesis sólo es una aproximación del potencial enzimático de estas bacterias, ya que la actividad de estas enzimas puede estar regulada por factores transcripcionales y especificidades de sustrato (Carro y Menéndez, 2020; Jayasekara y Ratnayake, 2019).

Además, las celulasas, las xilanasas y las amilasas no son las únicas enzimas involucradas, sino que hay otros tipos de enzimas implicadas en la degradación de los ejidos vegetales como son por ejemplo las pectinasas o las proteasas (Patel *et al.*, 2021).

6.3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS.

Una vez se obtuvieron los resultados de las pruebas *in vitro*, realizamos una selección de varias cepas candidatas con las que realizar los ensayos posteriores. En este sentido, las bacterias seleccionadas fueron *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiabacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67. Para completar el estudio, se realizó una cuantificación de la producción de AIA por HPLC (Tabla 52).

Tabla 52. Resumen de las actividades PGP evaluadas *in vitro* de las cepas seleccionadas.

Cepa	Tejido	Sid.	BiP	TriP	HXP	K	N ₂	AIA	ACC	Cel.	Amil.	Xil.	HPLC
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU18	Raíz	+	+	+	-	-	-	18	CN	-	+	-	110
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU20B	Raíz	+	+	-	-	-	+	46	CN	-	+	-	73
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> CRRU21	Raíz	+	-	-	-	-	+	74	CN	-	-	+	830
<i>Pseudomonas silesiensis</i> CRRU35	Tallo	+	+	+	-	-	-	365	CN	+	+	-	490
<i>Ferranicluiabacter rubi</i> CRRU44	Tallo	-	-	-	-	-	NE	153	N	+	+	+	140
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU65	Raíz	-	+	-	-	+	NE	62	CN	-	-	-	220
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU67	Raíz	-	+	-	-	+	NE	156	CN	-	+	-	210

Abreviaturas: Sid: producción de sideróforos; BiP: solubilización del fosfato bicálcico; TriP: solubilización del fosfato tricálcico; HXP: solubilización de la hidroxiapatita; K: solubilización del compuesto de potasio; N₂: crecimiento en el medio libre de nitrógeno; AIA: producción presuntiva de auxinas (mg/L); ACC: síntesis de la enzima ACC desaminasa; Cel: producción de celulasa; Amil: producción de amilasa; Xil: producción de xilanasas. HPLC: cuantificación de la producción de AIA por HPLC (ng/mL). NA: No Aplica; NE: No Evaluado; C: utiliza el ACC como fuente de carbono; N: utiliza el ACC como fuente de nitrógeno; CN: utiliza ACC como fuente de nitrógeno y carbono.

6.4. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLÁNTULAS DE TOMATE COMO PLANTA MODELO Y ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN.

Con las cepas seleccionadas se llevaron a cabo ensayos de la colonización, tanto *in vitro* como *in vivo* y ensayos de la promoción del crecimiento vegetal en plantas de tomate, debido a su interés agronómico.

6.4.1. Evaluación de la colonización.

La colonización de las raíces fue evaluada, mediante dos estrategias diferentes, para las siete cepas seleccionadas. Por un lado, estudiamos la capacidad de las cepas de producir *biofilms* y, por otro lado, analizamos la colonización *in vivo* empleando técnicas de marcaje y de microscopía. En esta última, los tejidos vegetales fueron teñidos con el colorante blanco de calcoflúor, mientras que las bacterias fueron, o bien inmunolocalizadas con anticuerpos policlonales específicos acoplados a un fluoróforo

que emite luz a una longitud de onda de 488 nm, o bien conjugadas con un plásmido que contenía la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) que, del mismo modo que en el caso anterior, emite luz a una longitud de onda de 488 nm.

6.4.1.1. Producción de *biofilms*.

Los *biofilms* son agrupaciones de microorganismos, embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), y adheridos a superficies tanto biológicas, como puede ser las plantas, como a superficies no biológicas, como son las rocas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

De las siete cepas evaluadas, todas fueron capaces de producir *biofilms*, pudiéndose distinguir dos patrones claramente diferenciados. Por un lado, las bacterias Gram positivas, es decir, las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B y *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 mostraron un desarrollo rápido del *biofilm*, alcanzando su máximo a las 24 horas. Por otro lado, las bacterias Gram negativas, es decir las cepas *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiabacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, mostraron una leve producción de *biofilm* en las primeras 48 horas, que empezaba a incrementarse a las 72 horas. Por lo tanto, de los aislados analizados, las cepas Gram negativas parecen necesitar más tiempo que las cepas Gram positivas para desarrollar el *biofilm* (Figura 49).

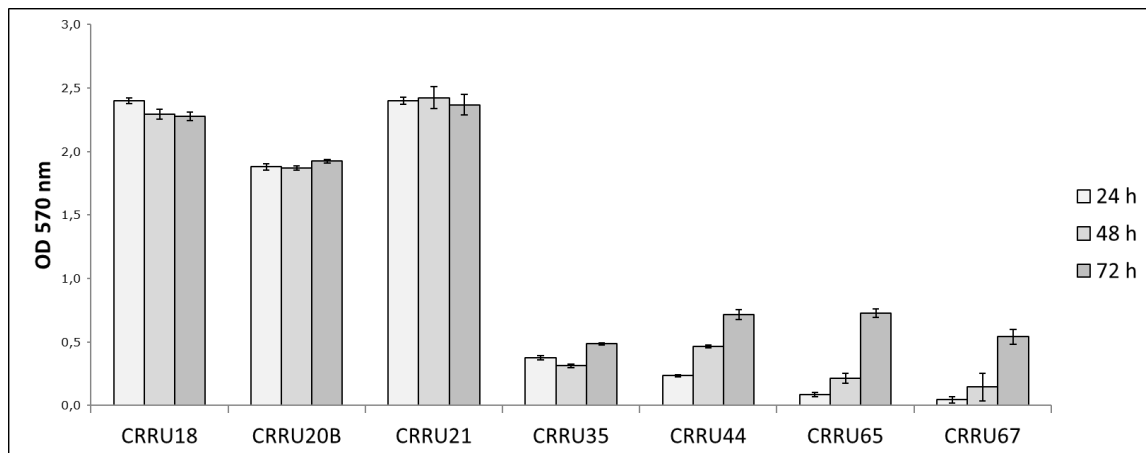


Figura 49. Absorbancia a 570 nm tras 24, 48 y 72 horas. Las cepas evaluadas de izquierda a derecha fueron *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranicluiabacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

La capacidad de producir *biofilms* varía mucho dentro de cada especie microbiana. El género *Bacillus* es conocido por producir *biofilms* con una alta densidad (Wijman *et al.*, 2007), y destacando en concreto, la especie *Bacillus amyloliquefaciens* (Nie *et al.*, 2022). De la misma forma, los géneros *Arthrobacter* y *Pseudomonas* también han sido descritos como grandes productores de *biofilms* (Baum *et al.*, 2009; Dey y Paul, 2018). Esto coincide con los resultados obtenidos, donde vemos que las dos cepas pertenecientes al género *Bacillus* son aquellas que han presentado los mayores valores de densidad

óptica, siendo la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 la que más produjo. La cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fue la otra cepa que más *biofilm* produjo en este ensayo. Este género es, junto con el género *Bacillus*, uno de los más potentes en relación a la producción de *biofilms* (Andreu y del Olmo, 2023). Los tres aislados pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, las cepas *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, también produjeron *biofilms*, aunque en menor medida. La capacidad de producir *biofilms* ha sido estudiada entre las bacterias de este grupo y las leguminosas. Esta estructura es producida por las bacterias como paso previo a la colonización y a la formación de nódulos (Tsyganova *et al.*, 2021). La capacidad de producir *biofilms* también ha sido descrita en especies del género *Pseudomonas* (Chauhan *et al.*, 2023).

La formación de los *biofilms* es un proceso en el que están involucrados diferentes factores que dependen de la especie bacteriana, como son la posesión de apéndices de movilidad o la producción de exopolisacáridos (Kostakioti *et al.*, 2013). Sin embargo, también está influenciada por diversos parámetros físicos y biológicos como son la temperatura, el tiempo de incubación, el pH del medio, la composición del medio, el biomaterial sobre el que crece el *biofilm* o las fuentes nutricionales (Ashrit *et al.*, 2022). En los ensayos *in vitro* como este, tanto las condiciones seleccionadas de crecimiento como el material, son las óptimas para facilitar el desarrollo del *biofilm*. De hecho, el material de las placas usadas es un material polimérico que permite la formación de un fuerte enlace covalente entre el microbio y el sustrato abiótico (Reddy *et al.*, 2020).

La producción de *biofilms* es uno de los factores clave por los que las bacterias PGP son tan eficaces a la hora de interactuar de forma positiva con los cultivos (Seneviratne *et al.*, 2010). Por lo tanto, aunque la capacidad de producir *biofilms* de estas cepas ha mostrado ser eficiente, es necesario llevar a cabo ensayos en planta adicionales.

6.4.1.2. Estudio de la colonización mediante microscopía de fluorescencia.

La visualización de la colonización mostró que, por un lado, las cepas *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 conjugadas con la proteína verde fluorescente exhibían una colonización abundante y generalizada por toda la raíz (Figura 50). Por otro lado, las cepas inmunolocalizadas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 también mostraron una colonización abundante y generalizada por la raíz, mientras que las cepas inmunolocalizadas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B y *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 mostraron una colonización más limitada y específica (Figura 51). La cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B estaba localizada principalmente en las zonas de emergencia de las raíces secundarias. Mientras que la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 presentó una colonización escasa.

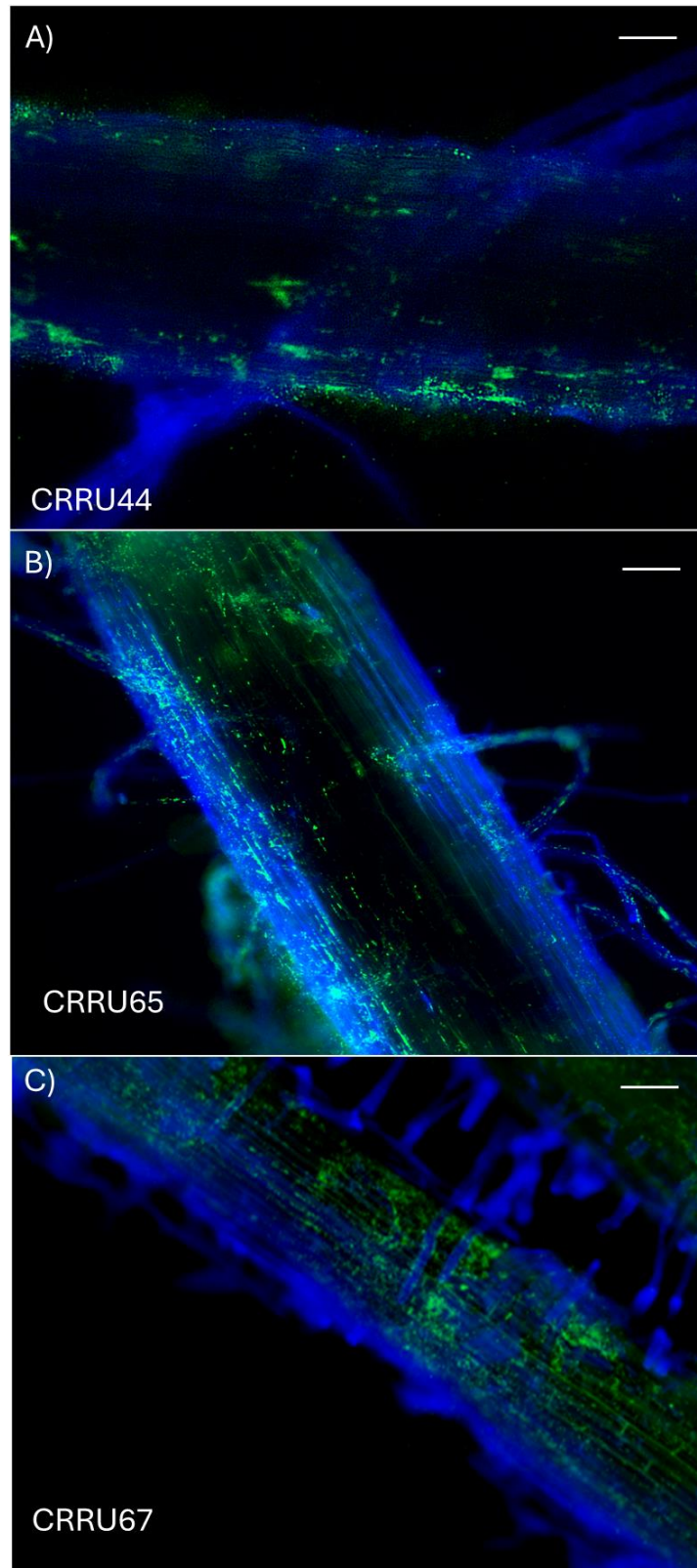


Figura 50. Imágenes al microscopio de fluorescencia de raíces de plántulas de tomate inoculadas con cepas marcadas con proteína fluorescente (verde) y teñidas en contraste con blanco de calcoflúor (azul), siete días después de la inoculación: A) *Ferranicluibacter rubi* CRRU44 (barra 200 μm); B) *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (barra 200 μm); C) *Rhizobium laguerreae* CRRU67 (barra 330 μm).

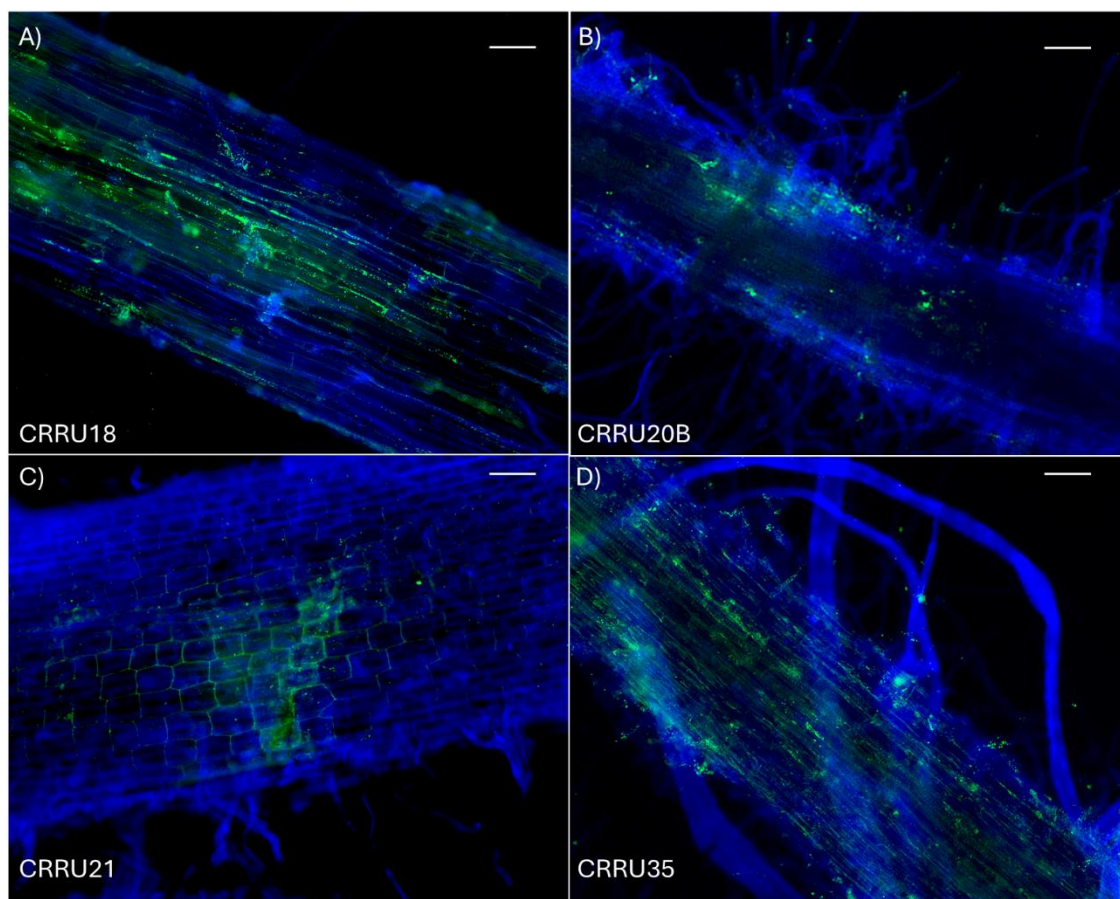


Figura 51. Imágenes al microscopio de fluorescencia de raíces de plántulas de tomate inoculadas con cepas inmunolocalizadas con anticuerpos específicos (verde) y teñidas en contraste con blanco de calcoflúor (azul), siete días después de la inoculación: A) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 (barra 160 μm); B) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B (barra 330 μm); C) *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 (barra 140 μm); D) *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 (barra 120 μm).

Tras un primer paso de adhesión a la superficie de la raíz, las bacterias endofíticas pueden comenzar a penetrar para ingresar al tejido del huésped (Kumar *et al.*, 2020). Durante la colonización, el patrón y los sitios de unión son específicos para cada una de las cepas endofíticas. Algunos géneros como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* han sido descritos como colonizadores de espacios intercelulares (Patel *et al.*, 2021). Durante la colonización, las zonas de preferencia de las bacterias son las zonas de nacimiento de raíces secundarias, el ápice y los pelos radiculares (Taulé *et al.*, 2021). Estudios previos sobre los patrones de colonización de diferentes bacterias endofíticas han mostrado que los *biofilms* de las bacterias del género *Bacillus*, como la cepa *Bacillus axarquiensis* TUBP1, tienden a formarse alrededor de los pelos radiculares, como ocurrió con la colonización mostrada por la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B (Wang *et al.*, 2020). En cambio, otras especies como *Bacillus subtilis* colonizaban los espacios intercelulares de la raíz, al igual que la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 (Dong *et al.*, 2020). La cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5 ha mostrado que es capaz de colonizar los sitios de unión entre las células de la raíz epidérmica, un hecho similar ha sido observado en los ensayos de colonización con la cepa *Pseudomonas silesiensis*

CRRU35 (Jing *et al.*, 2020). Con respecto a las bacterias pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, los estudios previos han mostrado que los patrones de colonización eran visibles en las zonas de unión entre las raíces secundarias y primarias (Naqqash *et al.*, 2024). Las cepas seleccionadas de esta tesis, pertenecientes a esta familia, es decir, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, no parecieron mostrar predilección por esas zonas, sino que mostraron una colonización generalizada por toda la superficie de la raíz. Finalmente, las bacterias pertenecientes al género *Arthrobacter* también han mostrado ser capaces de colonizar las raíces de plantas como el arroz (Chhetri *et al.*, 2022).

La cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 era una buena productora de *biofilms* en los ensayos *in vitro*. Sin embargo, en los ensayos *in vivo*, no mostró el mismo potencial. Este efecto puede ser debido a que en los ensayos *in vitro*, las bacterias crecieron en un medio de cultivo determinado y la superficie de adhesión consistía en una superficie plástica cuyas propiedades físicas presentaban una determinada afinidad con los exopolisacáridos de las bacterias. En cambio, en los ensayos *in vivo* la interacción ocurría en la superficie radicular, la cual presenta unas características físicas diferentes a las del ensayo *in vitro*. En consecuencia, estos ensayos ponen de manifiesto la necesidad de complementar los ensayos de colonización *in vitro* con los ensayos *in vivo*.

6.4.2. Ensayos de la promoción del crecimiento vegetal en plántulas de tomate.

Estudiamos la promoción del crecimiento vegetal por parte de las cepas seleccionadas. Para ello, medimos tres parámetros vegetativos que fueron la longitud de la parte aérea, la longitud de la parte radicular y el número de las raíces secundarias.

En general, dos cepas mostraron resultados estadísticamente positivos en los tres parámetros evaluados. Estas fueron las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44. Por otro lado, la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostró un incremento significativo únicamente en la elongación de la parte aérea (Figura 52).

En la promoción de la elongación de la parte aérea, tres cepas mostraron resultados significativamente positivos frente a los controles, mientras que la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 mostró resultados significativamente negativos, ya que redujo considerablemente la longitud de la parte aérea de la planta. Las tres cepas que mejoraron el crecimiento fueron las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65, incrementando la longitud de la parte aérea en un 194%, 180% y 153% respectivamente, con respecto a los controles (Figura 52.A.).

En la promoción de la elongación de la parte radicular de las plantas, las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, incrementaron significativamente el tamaño en un 151% y 138%, respectivamente. Por

el contrario, la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 redujo significativamente la longitud radicular de las plantas inoculadas (Figura 52.B.).

Por último, en el estudio del incremento del número de las raíces secundarias, de nuevo las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44 mostraron resultados significativos. Ambas cepas aumentaron el número de raíces secundarias en un 157% (Figura 52.C.).

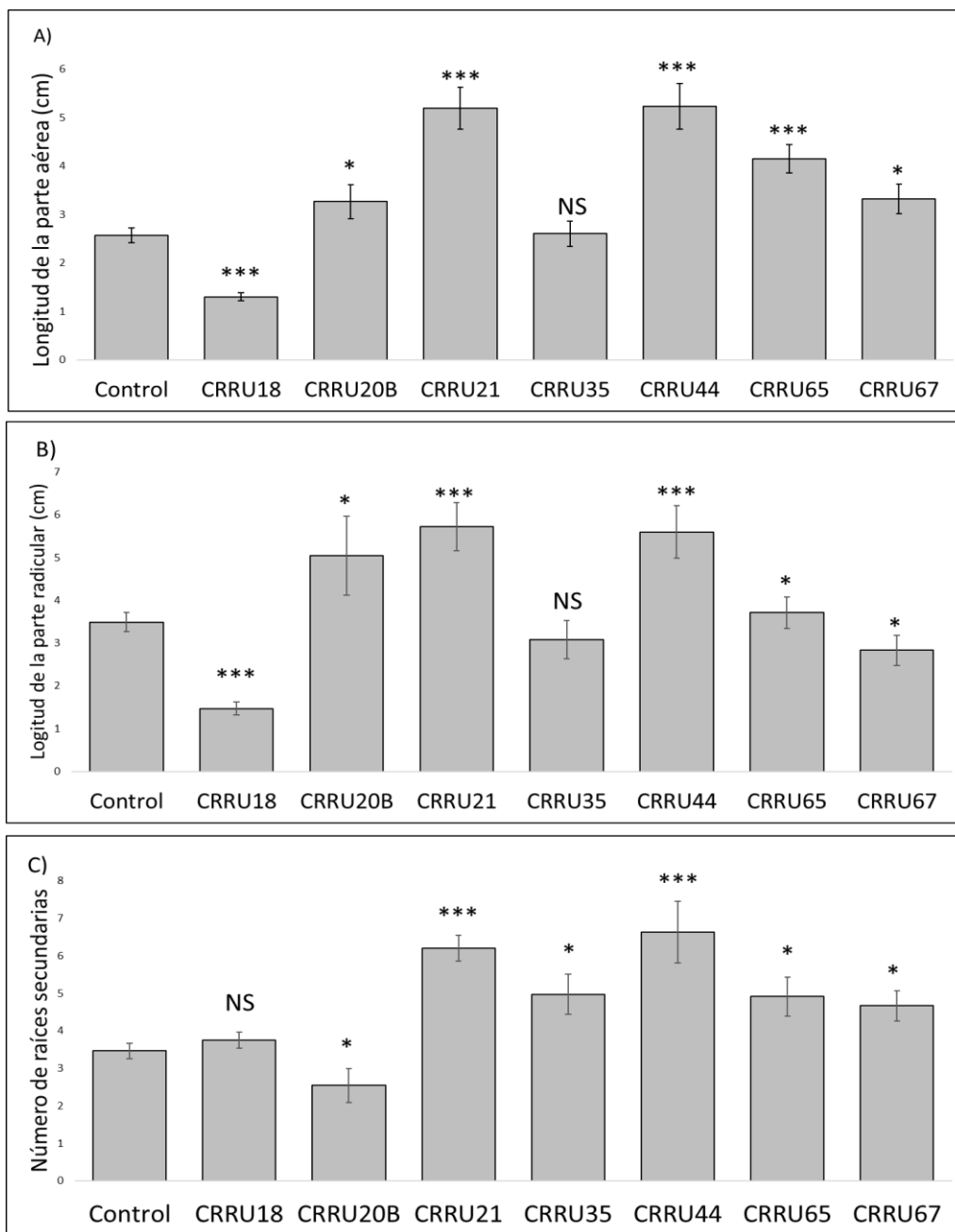


Figura 52. A) Longitud promedio de las partes aéreas del tomate tras ser inoculado con las cepas de estudio. B) Longitud promedio de las raíces de tomate tras ser inoculadas con las cepas de estudio. C) Número promedio de raíces secundarias de tomate tras ser inoculados con las cepas de estudio. Los medios de tratamiento que muestran diferencias significativas con las plantas de control están marcados con asteriscos según el test de Tukey en $p \leq 0,1$ (*), $p \leq 0,05$ (**) y $p \leq 0,01$ (***)

Los aislados *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 fueron las cepas de este estudio que mejores resultados mostraron. Estos resultados coinciden con la bibliografía, donde ya ha sido demostrado el efecto de promoción del crecimiento vegetal al aplicar bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Arthrobacter* a los cultivos (Thomas y Singh, 2019).

La cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 incrementó la longitud de la parte aérea, la longitud de la parte radicular y el número de raíces secundarias. Estos resultados pueden estar vinculados con la producción de ácido indol acético observada, lo cual ha sido relacionado en algunos estudios con la promoción del crecimiento vegetal en plantas como *Xanthium italicum* (Kwon y Song, 2014). En estudios previos, la inoculación de plantas de maíz con la especie *Arthrobacter arilaitensis*, de plántulas de arroz con la cepa *Arthrobacter* sp. GN70 o de *Panax ginseng* con la cepa *Arthrobacter nicotinovorans* JI39, incrementaron tanto la longitud de la parte aérea como la de la parte radicular (Boubekri *et al.*, 2022; Chhetri *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022).

Lo mismo ocurre con las cepas de la familia *Rhizobiaceae*, cuya promoción del crecimiento vegetal ha sido vinculada con la producción de hormonas como el AIA (Jiménez-Gómez *et al.*, 2017; Kurepin *et al.*, 2015). Las cepas *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 produjeron cantidades de AIA considerablemente altas, pudiendo estar relacionadas con la promoción del crecimiento que observamos en este ensayo. Este efecto ha sido documentado y se ha observado que la inoculación de plantas de lechuga con la especie *Rhizobium leguminosarum* incrementó el tamaño de la parte aérea de las plantas o que la inoculación de plantas de tomate con las bacterias *Rhizobium calliandrae* LBP2-1, *Rhizobium mayense* NSJP1-1 y *Rhizobium jaguaris* SJP1-2 incrementó, no solo el crecimiento de la planta, sino también la calidad de la fruta, gracias a la capacidad de estas bacterias de solubilizar fosfatos, de producir sideróforos y de sintetizar AIA (Ayuso-Calles *et al.*, 2023; Gen-Jiménez *et al.*, 2023).

6.5. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS MODELO DE TOMATE Y CUANTIFICACIÓN POR qPCR.

Una vez realizados los ensayos en las plántulas de tomate, quisimos evaluar la promoción del crecimiento vegetal en plantas adultas en condiciones de cámara iluminada para comprobar si los efectos PGP se mantenían. Tras dos meses, los parámetros de la longitud de la parte aérea, el número de hojas, el calibre del tallo y el peso húmedo de la parte aérea fueron medidos y comparados con el control.

Los resultados mostraron que, en todos los parámetros evaluados, las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostraron diferencias significativas frente a las plantas control. La cepa *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 mostró resultados significativos en todos los parámetros menos en el peso

húmedos, la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 únicamente mostró valores significativos en las medidas del peso húmedo (Figuras 53 y 54).

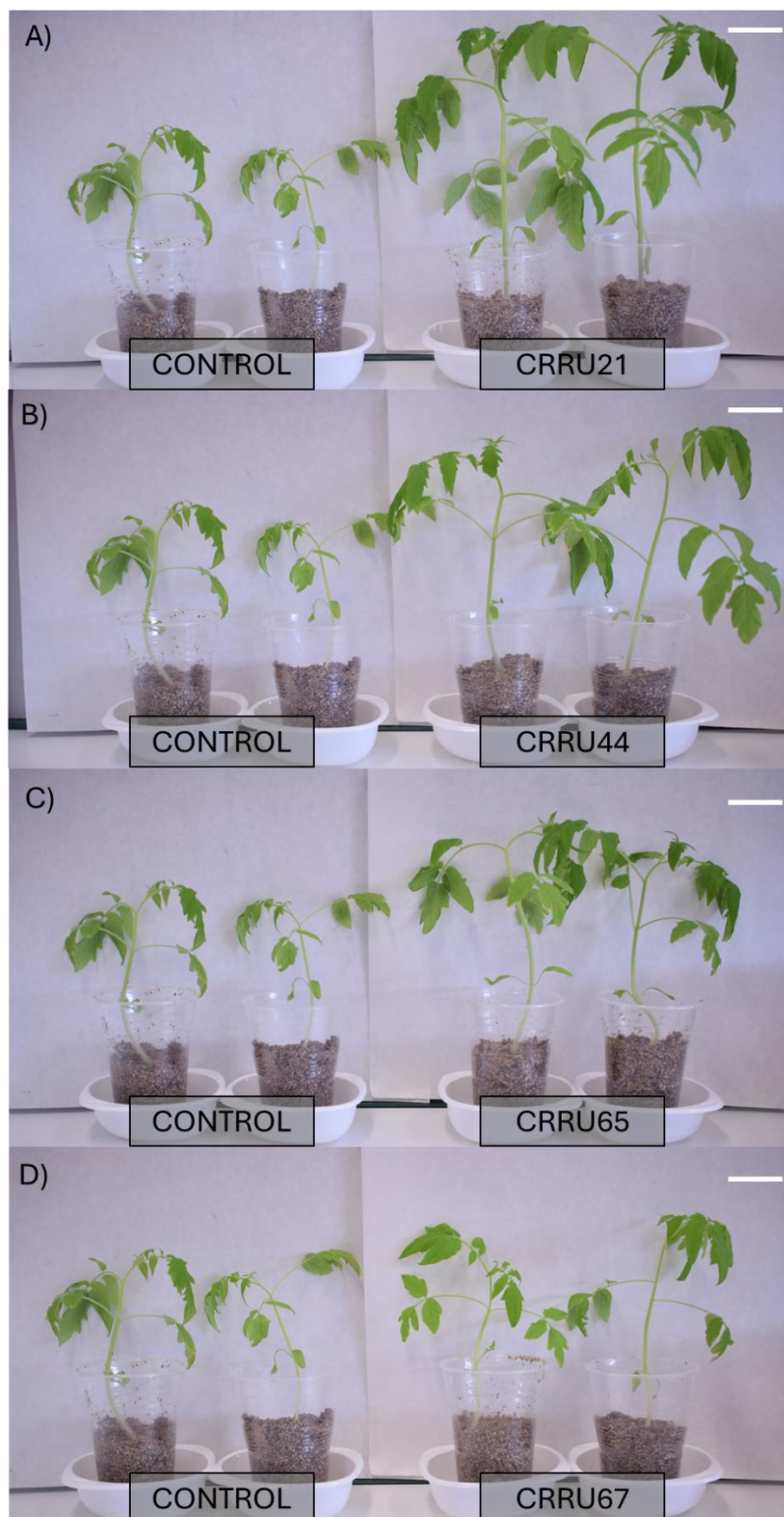


Figura 53. Ensayo de la promoción del crecimiento en las plantas de tomate inoculadas con: A) *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21; B) *Ferranichuibacter rubi* CRRU44; C) *Rhizobium laguerreae* CRRU65; D) *Rhizobium laguerreae* CRRU67. Barra = 5,75 cm.

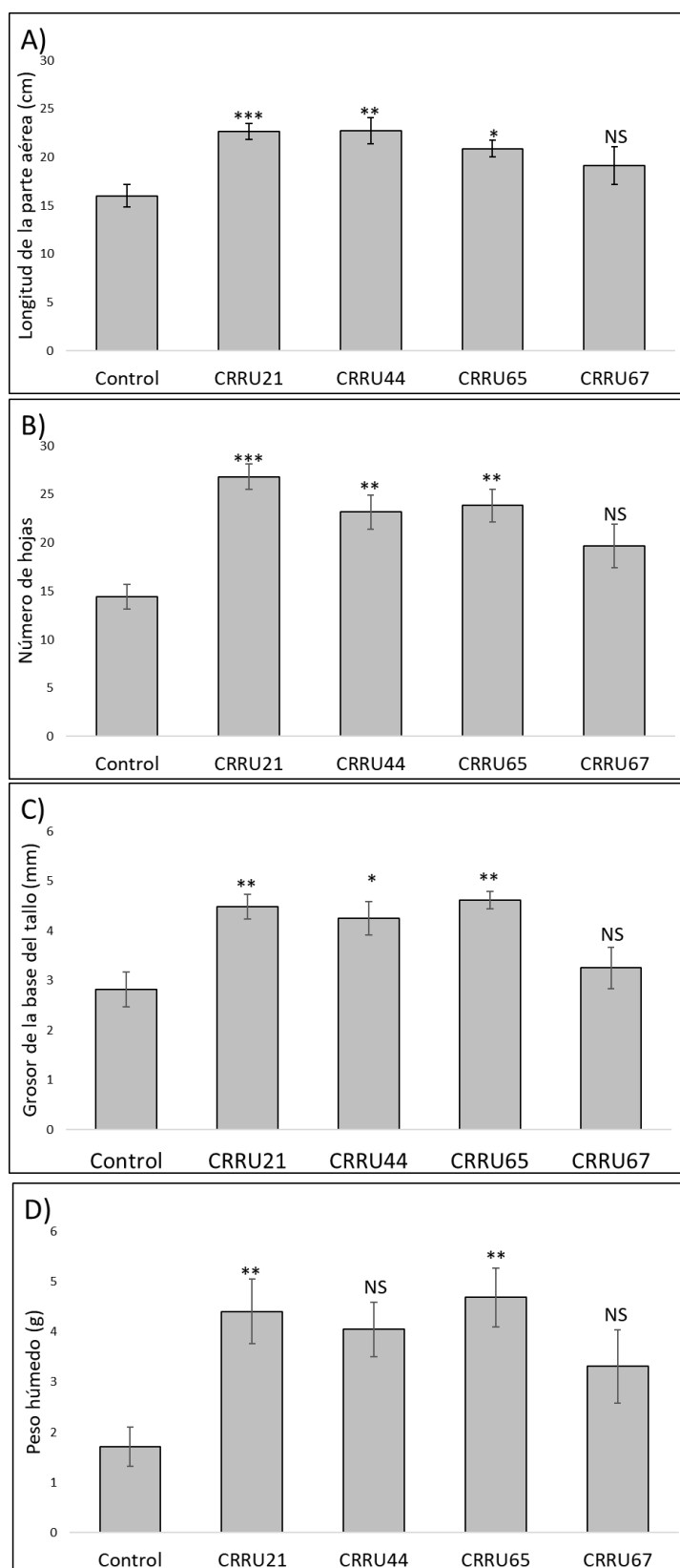


Figura 54. A) Longitud promedio de las partes aéreas del tomate tras ser inoculado con las cepas de estudio. B) Número de hojas promedio del tomate tras ser inoculado con las cepas de estudio. C) Grosor medio de la base del tallo de los tomates tras ser inoculados. D) Peso húmedo medio de los tomates tras ser inoculados. Las diferencias significativas entre las plantas control y las

plantas de los tratamientos están marcados con asteriscos según el test de Tukey en $p \leq 0,1$ (*), $p \leq 0,05$ (**) y $p \leq 0,01$ (***)).

En la promoción de la elongación de la parte aérea de la planta, las inoculaciones con las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 fueron las que mostraron un mayor incremento, un 141,7 y 141,9% respectivamente. Seguidas de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 que incrementó la longitud de la parte aérea en un 130,4% y de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67, que la incrementó en un 119,5%, aunque esta última no fue significativa (Figura 54.A.).

Con respecto al número de hojas, la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fue la que mostró mejores resultados, con un incremento del 185,7%, seguida de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 con un 165,3% y de la cepa *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 con un 160,7%. La cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostró un incremento no significativo del 136,1% (Figura 54.B.).

En el estudio del grosor de la base del tallo, la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostró el mayor incremento en un 164,0%, seguido de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, con un 159,3% y de la cepa *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, con un 150,9%. De nuevo, la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostró un incremento no significativo del 115,5% (Figura 54.C.).

Finalmente, en el parámetro del peso húmedo, la inoculación con las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 mostraron los mejores resultados, incrementándolos en un 273,6% y 257,3% respectivamente, mientras que las cepas *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostraron incrementos no significativos, del 236,7 y 193,5% respectivamente (Figura 54.D.).

A lo largo de este capítulo ya hemos comentado que las bacterias pertenecientes a estos géneros han sido previamente estudiadas por sus capacidades de promoción del crecimiento vegetal, por lo que no es sorprendente que las cepas seleccionadas muestren resultados favorables cuando son testadas en plantas de tomate. Así, algunas especies del género *Arthrobacter* han demostrado que potencian el crecimiento del tomate en condiciones normales, de escasez de fósforo y de alta salinidad (Kwon y Song, 2014; Tchakounté *et al.*, 2020). En otras plantas como la especie *Medicago truncatula*, ha sido observado que la inoculación de *Arthrobacter agilis* UMCV2 facilita la absorción del hierro por parte de la planta, al producir, tanto sideróforos que ponen moléculas de hierro a disposición de la planta como compuestos volátiles que inducen la absorción de estos compuestos (Santoyo *et al.*, 2022). En este sentido, la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 ha mostrado en los ensayos *in vitro* ser una gran productora de sideróforos, por lo que esta actividad junto con los resultados obtenidos *in vitro* puede favorecer la promoción del crecimiento vegetal observada *in vivo* (Miethke y Marahiel, 2007).

Del mismo modo, la capacidad de las cepas del género *Rhizobium* de promocionar el crecimiento vegetal en las plantas fue estudiada ha sido vinculada con mecanismos

PGP, entre ellos, la producción de hormonas vegetales como el ácido indolacético. La inoculación de plantas de soja con bacterias del género *Rhizobium* incrementa la biomasa del cultivo, efecto que ha sido asociado a la producción de AIA (Purwaningsih *et al.*, 2024). Además, también han sido vinculadas otras actividades presentes en cepas del género *Rhizobium*, como la solubilización de los compuestos de potasio y la metabolización del ACC, que incrementaban el crecimiento de las plantas de trigo (Etesami *et al.*, 2009). La inoculación de plantas de tomate con las cepas *Rhizobium calliandrae* LBP2-1, *Rhizobium mayense* NSJP1-1, y *Rhizobium jaguaris* SJP1- 2 incrementó el crecimiento de las plantas y aumentó el tamaño y la cantidad de los frutos por planta (Gen-Jiménez *et al.*, 2023). Del mismo modo, la inoculación con otras cepas del género *Rhizobium* resultó en el aumento de la altura máxima de la planta, del número de frutos por racimo, del número de frutos por planta y del peso y el tamaño del fruto. Todos estos resultados fueron vinculados con diferentes actividades de promoción del crecimiento vegetal como la producción de sideróforos o la síntesis de AIA (Rattan y Sharma, 2023). Las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostraron ser capaces de solubilizar los fosfatos, producir sideróforos, sintetizar AIA y también mostraron usar el ACC como fuente de nitrógeno o carbono. Del mismo modo, la cepa *Ferranichluibacter rubi* CRRU44, que es una bacteria cercana a las bacterias del género *Rhizobium*, también mostró ser capaz de sintetizar la hormona AIA. Por lo tanto, los efectos observados en las plantas inoculadas pueden correlacionarse a las actividades de PGP detectadas *in vitro*.

6.5.1. Determinación cuantitativa de la colonización.

Tras finalizar los ensayos previos, la colonización fue cuantificada mediante la técnica qPCR. En todos los casos, la colonización fue abundante en las plantas inoculadas, mientras que en las plantas control no hubo detección de las bacterias a estudiar. En las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, la detección con los *primers* Art (Tabla 32) mostró una colonización de 10^{12} log UFC/gramo de raíz. De la misma forma, la detección de la cepa *Ferranichluibacter rubi* CRRU44 en las raíces mostró una colonización de 10^{15} UFC/gramo de raíz. Finalmente, la detección de las especies *Rhizobium laguerreae* en las raíces procedentes de los tratamientos inoculados con las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostraron una colonización de 10^{13} UFC/gramo de raíz, respectivamente (Figura 55).

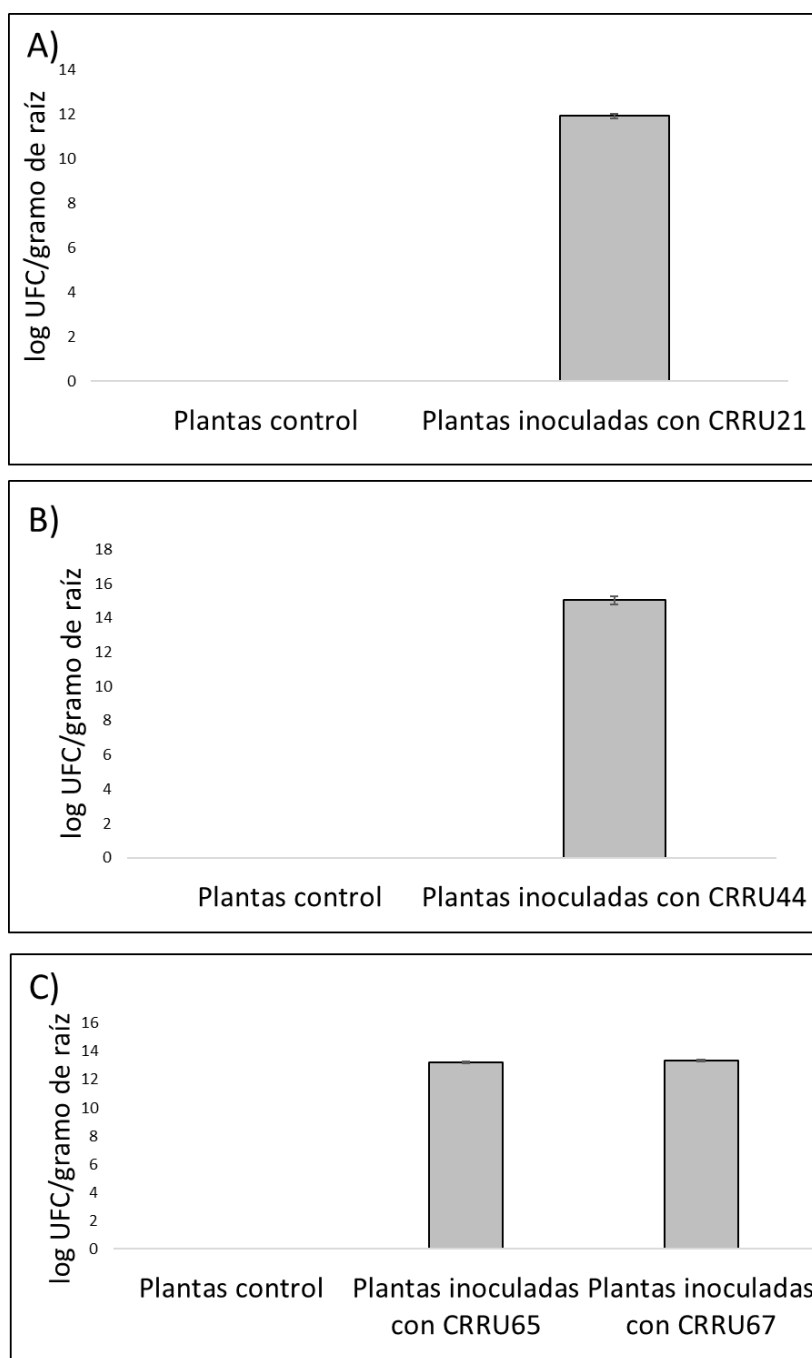


Figura 55. Detección de las bacterias inoculadas en las raíces de las plantas de tomate. A) Detección de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21; B) Detección de la cepa *Ferrancluibacter rubi* CRRU44; C) Detección de las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

Algunos estudios previos mostraron que, tras la inoculación de plantas de maíz con la cepa *Arthrobacter oxydans* ITRH49, la colonización de las raíces tras 45 días alcanzaba las 10^4 UFC/ por gramo de raíz (Ummara *et al.*, 2021). Del mismo modo, la inoculación de plantas de *Nicotiana attenuata* con la cepa *Arthrobacter nitroguajacolicus* E46 mostró una colonización de 10^6 copias del gen ARNr 16S/gramo de peso fresco tras 25 días desde la inoculación (Santhanam *et al.*, 2019). Con respecto a la cuantificación de cepas del género *Rhizobium*, las concentraciones detectadas oscilaron entre 10^3 y 10^5

copias de los genes diana/gramo de raíz (Duodu *et al.*, 2005; Trabelsi *et al.*, 2009). Sin embargo, estos estudios no son comparables con los realizados en esta tesis, pues las condiciones en las que fueron realizados no son equivalentes. Por ejemplo, el estudio de Ummara *et al.* fue realizado en condiciones de contaminación por hidrocarburos, mientras que el estudio de Santhanam *et al.* fue realizado en coinoculación con el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata*. Aunque no son comparables con otros estudios, el uso de técnicas moleculares como la qPCR ha demostrado ser una herramienta eficiente para rastrear la colonización de las bacterias en las plantas (Rilling *et al.*, 2019). Esta técnica permite realizar un seguimiento preciso de las amplificaciones de los genes diana, lo cual puede correlacionarse con la cantidad de biomasa bacteriana.

Los estudios de la colonización basados en las técnicas de microscopía tienen una serie de limitaciones como la subjetividad, por lo que los resultados dan lugar a múltiples interpretaciones. En este sentido, los métodos basados en la detección del ADN se superponen a estas limitaciones. Este método supone un aumento de la sensibilidad y del rango dinámico, en comparación con los estudios de la colonización basados en la microscopía (Maciá-Vicente *et al.*, 2009). A menudo, los resultados obtenidos mediante técnicas de colonización no se corresponden con los obtenidos mediante técnicas moleculares (Santhanam *et al.*, 2019), por lo tanto los resultados obtenidos por ambas técnicas no son comparables, sino que se complementan. La PCR en tiempo real es una técnica valiosa para la cuantificación del contenido total de ácido nucleico de bacterias específicas dentro de los tejidos vegetales que, en combinación con las herramientas de microscopía, permiten realizar una evaluación multifactorial y más eficiente de la colonización (Rilling *et al.*, 2019).

6.6. ESTUDIO DE LOS GENOMAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

Los genomas de las bacterias seleccionadas fueron secuenciados, anotados y estudiados para una mejor comprensión de los mecanismos que poseían. Las características generales de sus genomas, junto con el porcentaje de completitud obtenido mediante el software BUSCO (versión 5.5.) y el porcentaje de contaminación obtenido por el *software* CheckM (versión 1.2.3.), son presentados en la Tabla 53. En todos los casos, el porcentaje de completitud del genoma fue superior al 99,4% y el porcentaje de contaminación inferior al 5%, lo que indica que los genomas obtenidos poseían una buena integridad (Manni *et al.*, 2021; Parks *et al.*, 2015). Para comenzar el estudio, se llevó a cabo una representación del genoma con las regiones de los CDS anotadas con la herramienta antiSMASH (Figura 56 y Tabla 54).

Tabla 53. Características de los genomas de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

Características	CRRU21	CRRU44	CRRU65	CRRU67
Tamaño	4.671.503	5.482.309	7.539.570	7.537.940
Contenido GC (%)	67,9	62,8	60,7	60,7
N50	106.522	381.396	280.285	337.377
L50	15	5	8	8
Número de <i>contigs</i> (con PEGs)	132	59	87	72
Número de subsistemas	298	331	366	366
Número de secuencias codificantes	4.423	5.385	7.743	7.738
Número de ARNs	57	54	49	51
Complejidad (%)	99,4	99,4	99,8	99,8
Contaminación (%)	3,36	0,28	0,16	0,16

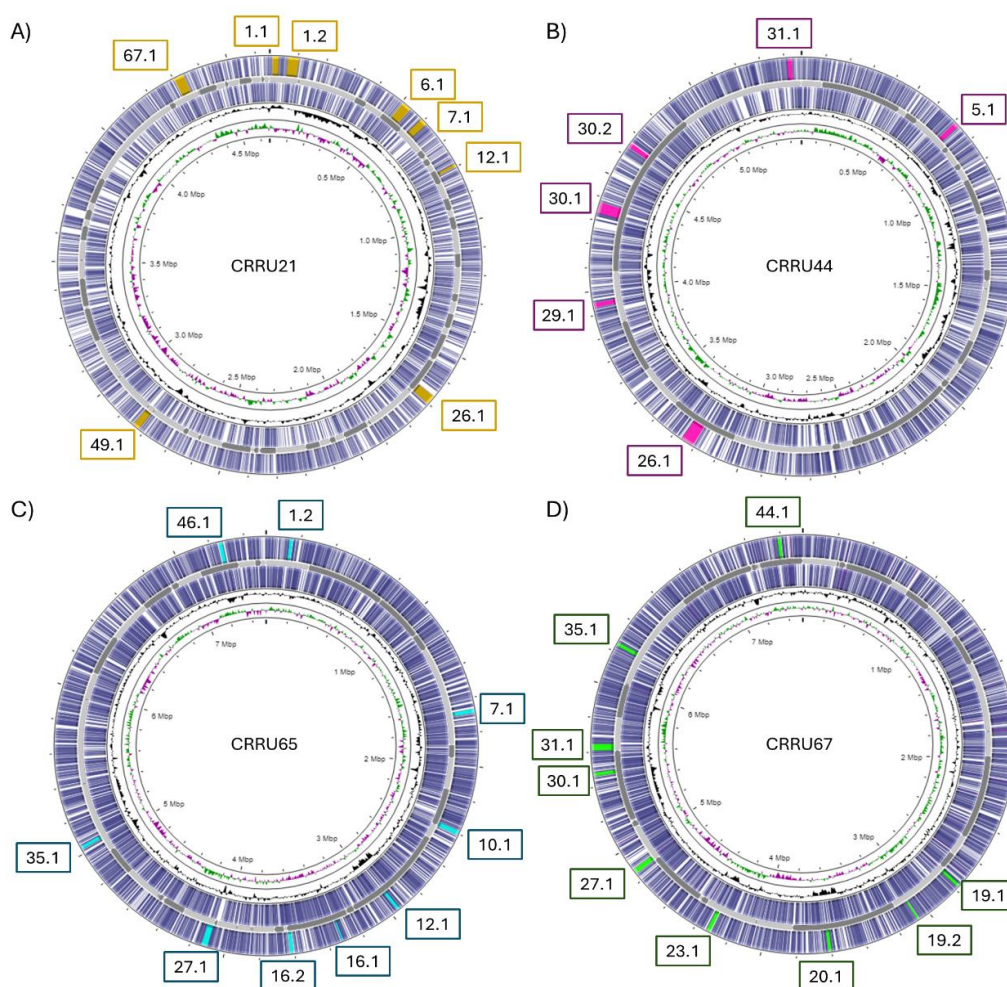


Figura 56. Representación de los genomas de las cepas A) *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, los CDS anotados son representados en morado y los clústeres de genes anotados por antiSMASH en amarillo; B) *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, los CDS anotados son representados en morado y los clústeres de genes anotados por antiSMASH en rosa; C) *Rhizobium laguerreae* CRRU65, los CDS anotados son representados en morado y los clústeres de genes anotados por antiSMASH en azul; D) *Rhizobium laguerreae* CRRU67, los CDS anotados son representados en morado y los clústeres de genes anotados por antiSMASH en verde. La identificación de cada una de las regiones se muestra en la Tabla 54.

Tabla 54. Identificación de las regiones anotadas con la herramienta antiSMASH en los genomas de *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65, *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

Región	Tipo	Clúster más similar	Similitud (%)
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> CRRU21			
1.1	Terpeno	Carotenoide	83
1.2	Sideróforo	Desferroxamina	100
6.1	NAPPA	ϵ -Poli-L-lisina	100
7.1	Betalactona	Microansamicina	7
12.1	Ectoína	Ectoína	100
26.1	T3PKS	-	-
49.1	NAPPA	Estenotricina	27
67.1	NAPPA	Estenotricina	13
<i>Ferranicluiibacter rubi</i> CRRU44			
5.1	2-deoxi-estreptamina aminoglicosido	-	-
26.1	NRPS	Tricisobactina	69
29.1	Homoserin lactona	-	-
30.1	T1PKS	-	-
30.2	Tioamitida	-	-
31.1	Terpeno	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU65			
1.1	Terpeno	-	-
7.1	Tioamitida	-	-
10.1	T3PKS	Orizanaftopirano	10
12.1	Homoserin lactona	-	-
16.1	Ectoína	-	-
16.2	Homoserin lactona	-	-
27.1	Arilpoliene	-	-
35.1	Homoserin lactona	-	-
46.1	Tioamitida	Exopolisacárido	33
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU67			
19.1	Homoserin lactona	-	-
19.2	Ectoína	-	-
20.1	Homoserin lactona	-	-
23.1	Tioamitida	Exopolisacárido	33
27.1	T3PKS	Orizanaftopirano	10
30.1	Homoserin lactona	-	-
31.1	Arilpoliene	-	-
35.1	Tioamitida	-	-
44.1	Terpeno	-	-

En el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fue anotado un clúster para la producción de un terpeno, el cual tenía un 83% de homología con un carotenoide, tres clústeres para la producción de NAPPA (*Non-alpha poly-amino acids*), uno de ellos con un 100% de homología con la ϵ -poli-L-lisina, mientras que los otros dos tuvieron un 27 y un 13% de homología con la estenotricina; un clúster para la producción de un sideróforo, el cual tenía un 100% de homología con la desferroxamina; un clúster para la producción de una betaclactona, con un 7% de homología con la microansamicina; un clúster para la producción de la ectoína; y otro para la producción de una policétido sintasa, tipo III.

En el genoma de la cepa *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44 fueron anotados un clúster para la producción del 2-deoxi-estreptamina aminoglicósido; un clúster para la

producción de la homoserin lactona; un clúster para la producción de un policétido sintasa tipo I; un clúster para la producción de la tioamitida; un clúster para la producción de un terpeno; y un clúster para la producción de un NRPS con un 69% de homología con la tricisobactina.

En el genoma de *Rhizobium laguerreae* CRRU65 fueron anotados un clúster para la producción de un terpeno; dos clústeres para la producción de la tioamitida, una de ellas con un 33% de homología con un exopolisacárido; otro clúster para la producción de un policétido sintasa tipo III, con un 10% de homología con el orizanaftopirano; dos clústeres para la producción de homoserin lactonas; un clúster para la producción de la ectoína; un clúster para la producción de un arilpoliene; y un clúster para la producción de un NRPS con un 69% de homología con la tricisobactina.

En el genoma de *Rhizobium laguerreae* CRRU67 fueron anotados tres clústeres para la producción homoserin lactona, un clúster para la producción de la ectoína, otro para la producción de un policétido sintasa tipo III, con un 10% de homología con el orizanaftopirano, dos clústeres para la producción de tioamitida, una de ellas con un 33% de homología con un exopolisacárido, un clúster para la producción de arilpoliene y otro para la producción de un terpeno. También fue anotado un clúster para la producción de un NRPS con un 69% con la tricisobactina.

De forma general, los terpenos fueron identificados como metabolitos secundarios en las cuatro cepas estudiadas. Estos son un tipo de moléculas con importancia a nivel farmacéutico y comercial. La mayoría son producidos por las plantas, pero también existen algunos que son producidos por las bacterias (Rudolf *et al.*, 2021). Estos compuestos han sido identificados en bacterias de los géneros *Arthrobacter* y *Rhizobium* (Ali *et al.*, 2021; Semenzato *et al.*, 2023). Del mismo modo, las policétido sintasas (PKS) han sido anotadas en los cuatro genomas. Estas son enzimas encargadas de ensamblar varios residuos de ácidos carboxílicos para formar multitud de moléculas (Grininger, 2020). También se han anotado clústeres para la producción de homoserin lactonas en los genomas de las cepas *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67. La homoserin lactona es la principal molécula implicada en el *quorum sensing* y ha sido reportado en numerosas bacterias de la rizosfera, principalmente de la familia *Rhizobiaceae* (Gosai *et al.*, 2020).

6.6.1. Búsqueda de genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal.

El estudio de los genomas estuvo centrado en la profundización de los mecanismos de PGP, enfocándose en los genes responsables de la adquisición de hierro y su metabolismo, metabolismo del nitrógeno, solubilización de fosfato, síntesis de AIA, así como del establecimiento de la colonización de tejidos vegetales (Tabla 55). Dentro del genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fueron anotados un total de 8 genes para la solubilización de fosfatos, 6 para la producción de sideróforos, 3 para la fijación del nitrógeno, 9 para la síntesis de AIA, 3 para la degradación de tejidos

vegetales y 14 para la colonización. En el genoma de la cepa *Ferrancluibacter rubi* CRRU44 fueron anotados un total de 23 genes para la solubilización de fosfatos, 8 para la producción de sideróforos, 9 para la síntesis de AIA, 3 para la degradación de tejidos vegetales y 52 para la colonización. En el genoma de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65, 24 para la solubilización de fosfatos, 8 para la producción de sideróforos, 6 para la fijación del nitrógeno, 10 para la síntesis de AIA, 7 para la degradación de tejidos vegetales y 59 para la colonización. Y en el genoma de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 fueron anotados un total de 26 genes para la solubilización de fosfatos, 8 para la producción de sideróforos, 6 para la fijación del nitrógeno, 10 para la síntesis de AIA, 7 para la degradación de tejidos vegetales y 58 para la colonización.

Tabla 55. Resumen de los genes anotados en los genomas de *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferrancluibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

	CRRU21	CRRU44	CRRU65	CRRU67	
Solubilización de fosfatos					
<i>gcd</i>	Glucosa deshidrogenasa	NA	A	A	A
-	Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)	A	NA	A	A
-	Tirosina fosfatasa	A	A	A	A
-	Fitasas	NA	A	NA	NA
<i>citA</i>	Citrato sintasa	A	NA	A	A
<i>phnA</i>	Proteína PhnA	NA	A	A	A
<i>phnB</i>	Proteína PhnB	A	NA	A	A
<i>phnC</i>	Proteína de unión del ATP del transportador ABC de fosfonatos (TC 3.A.1.9.1)	NA	A	A	A
<i>phnD</i>	Proteína de unión del sustrato del transportador ABC de fosfonatos (TC 3.A.1.9.1)	NA	A	A	A
<i>phnE</i>	Proteína permeasa del transportador ABC de fosfonatos (TC 3.A.1.9.1)	NA	A	A	A
<i>phnF</i>	Regulador transcripcional	NA	A	A	A
<i>phnGHI</i>	Subunidad de alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintasa (EC 2.7.8.37)	NA	A	A	A
<i>phnK</i>	Proteína de unión a ATP de utilización de fosfonatos	NA	A	A	A
<i>phnL</i>	Subunidad de alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintasa (EC 2.7.8.37)	NA	A	A	A
<i>phnN</i>	Ribosa 1,5-bisfosfato fosfocinasa (EC 2.7.4.23)	NA	A	A	A
<i>phnP</i>	Hidrolasas dependientes de metales de la superfamilia de beta-lactamasas I	NA	A	A	A
-	Exopolifosfatasa (EC 3.6.1.11)	A	A	A	A
Metabolismo y adquisición del hierro					
<i>fhuA</i>	Transportador de membrana externa ferricrómico/receptor de fagos	NA	A	A	A
<i>fhuB</i>	Proteína permeasa del sistema de importación de hidroxmató de hierro (3+)	NA	A	A	A
<i>fhuC</i>	Hierro (3+) -hidroxmató importa proteína de unión a ATP	NA	A	A	A
<i>fhuD</i>	Proteína fijadora de hidroxmató de hierro (3+)	NA	A	A	A
<i>sitA</i>	Transportador ABC de manganeso, proteína de unión periplásmica SitA	A	A	A	A
<i>sitB</i>	Transportador ABC de manganeso, proteína de unión a ATP	A	A	A	A
<i>sitC</i>	Transportador ABC de manganeso, proteína permeasa de membrana interna SitC	A	A	A	A
<i>sitD</i>	Transportador ABC de manganeso, proteína permeasa de membrana interna SitD	A	A	A	A
<i>sbnA</i>	2,3-diaminopropionato para la proteína de biosíntesis de sideróforos SbnA	A	NA	NA	NA
<i>sbnB</i>	2,3-diaminopropionato para la proteína de biosíntesis de sideróforos SbnB	A	NA	NA	NA
Metabolismo del nitrógeno					
<i>nodA</i>	Proteína de nodulación A	NA	NA	A	A
<i>nodB</i>	Proteína de nodulación B	NA	NA	A	A
<i>nodC</i>	Proteína C de nodulación	NA	NA	A	A
<i>nodD</i>	Proteína de nodulación D	NA	NA	A	A
<i>narK</i>	Transportador de nitrato/nitrito	A	NA	A	A
<i>narU</i>	Transportador de nitrato/nitrito	A	NA	A	A
<i>narT</i>	Transportador de nitrato/nitrito	A	NA	NA	NA
Degradación de tejidos vegetales					
-	Beta-1,4-glucanasa	NA	A	A	A
-	Beta glucosidasa	A	A	A	A
-	Amilo-alfa-1, 6-glucosidasa	NA	NA	A	A
-	Celulasa	NA	A	A	A
-	Endo-1,4-beta-xilanasas	NA	A	A	A
-	Glucamilasa	A	A	A	A
-	Alfa amilasa	A	A	A	A

Continúa...

Continuación Tabla 55.

		CRRU21	CRRU44	CRRU65	CRRU67
Quimiotaxis, movilidad y fijación					
<i>fliE</i>	Proteína del complejo corporal flagelar gancho-basal FliE	NA	NA	A	A
<i>fliF</i>	Proteína de anillo M flagelar FliF	NA	A	A	A
<i>fliG</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliG	NA	A	A	A
<i>fliH</i>	Proteína de ensamblaje flagelar	NA	NA	NA	NA
<i>fliI</i>	ATP sintasa FliI específica de flagelo	NA	A	A	A
<i>fliJ</i>	Proteína flagelar FliJ	NA	A	A	A
<i>fliK</i>	Proteína de control de la longitud del gancho flagelar FliK	NA	A	A	A
<i>fliL</i>	Proteína asociada al cuerpo basal flagelar FliL	NA	A	A	A
<i>fliM</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliM	NA	A	A	A
<i>fliN</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliN	NA	A	A	A
<i>fliO</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliO	NA	A	A	A
<i>fliP</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliP	NA	A	A	A
<i>fliQ</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliQ	NA	A	A	A
<i>fliR</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliR	NA	A	A	A
<i>cheA</i>	Transducción de señales histidina quinasa CheA	NA	A	A	A
<i>cheB</i>	Regulador de la respuesta a la quimiotaxis proteína-glutamato metilesterasa CheB	NA	A	A	A
<i>cheD</i>	Proteína de quimiotaxis CheD	NA	A	A	A
<i>cheR</i>	Proteína de quimiotaxis metiltransferasa CheR (EC 2.1.1.80)	NA	A	A	A
<i>cheW</i>	Regulador positivo de la actividad de la proteína CheA (CheW)	NA	A	A	A
<i>cheY</i>	Regulador de quimiotaxis: transmite señales de quimiorreceptores a los componentes del motor flagelar CheY	NA	A	A	A
<i>motA</i>	Proteína de rotación del motor flagelar MotA	NA	A	A	A
<i>motB</i>	Proteína de rotación del motor flagelar MotB	NA	A	A	A
<i>motC</i>	Proteína de quimiotaxis motC	NA	A	A	A
<i>motE</i>	Proteína de motilidad flagelar MotE, una chaperona para el plegamiento de MotC	NA	A	A	A
<i>secA</i>	Subunidad de proteína translocasa SecA	A	A	A	A
<i>secB</i>	Proteína de exportación de proteínas SecB	NA	A	A	A
<i>secD</i>	Subunidad de proteína translocasa SecD	A	A	A	A
<i>secE</i>	Subunidad de proteína translocasa SecE	A	A	A	A
<i>secF</i>	Subunidad de proteína translocasa SecF	A	A	A	A
<i>secG</i>	Subunidad de membrana de translocasa de proteína SecG	A	A	A	A
<i>secY</i>	Subunidad de proteína translocasa SecY	A	A	A	A
<i>flhA</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA	NA	A	A	A
<i>flhB</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhB	NA	A	A	A
<i>flgA</i>	Proteína de formación de anillo P del cuerpo basal flagelar FlgA	NA	NA	A	A
<i>flgB</i>	Proteína de bastones del cuerpo basal flagelar FlgB	NA	A	A	A
<i>flgC</i>	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar FlgC	NA	A	A	A
<i>flgD</i>	Proteína de modificación de bastones del cuerpo basal flagelar FlgD	NA	A	A	NA
<i>flgE</i>	Proteína de gancho flagelar FlgE	NA	A	A	A
<i>flgF</i>	Proteína de bastones del cuerpo basal flagelar FlgF	NA	A	A	A
<i>flgG</i>	Proteína de bastones del cuerpo basal flagelar FlgG	NA	A	A	A
<i>flgH</i>	Proteína de anillo L flagelar FlgH	NA	A	A	A
<i>flgI</i>	Proteína flagelar del anillo P FlgI	NA	A	A	A
<i>flgJ</i>	Proteína flagelar FlgJ	NA	A	A	A
<i>flgK</i>	Proteína FlgK asociada al gancho flagelar	NA	A	A	A
<i>flgL</i>	Proteína FlgL asociada al gancho flagelar	NA	A	A	A
<i>flaF</i>	Proteína reguladora de la síntesis flagelar FlaF	NA	A	A	A
<i>fleQ</i>	Proteína reguladora flagelar FleQ	NA	NA	A	A
<i>cpaB</i>	Proteína de ensamblaje de pilus FLP RcpC/CpaB	A	A	A	A
<i>cpaD</i>	Proteína de ensamblaje de pilus FLP CpaD	NA	A	A	A
<i>cpaE</i>	Sistema de secreción tipo II/IV ATPasa TadZ/CpaE, asociado con el ensamblaje del pilus Flp	A	A	A	A
<i>tadB</i>	Proteína de ensamblaje de pilus Flp TadB	A	A	A	A
<i>tadC</i>	Proteína TadC del sistema de secreción tipo II/IV, asociada con el ensamblaje del pilus Flp	A	A	A	A
<i>exoF</i>	Proteína de producción de exopolisacáridos Precursor de ExoF	NA	NA	A	A
<i>exoI</i>	Proteína de biosíntesis de succinoglicano ExoI	NA	NA	A	A
<i>exoQ</i>	Proteína de producción de exopolisacáridos ExoQ	NA	NA	A	A
<i>exoZ</i>	Proteína de producción de exopolisacáridos ExoZ	NA	NA	A	A

Continúa...

Continuación Tabla 55.

		CRRU21	CRRU44	CRRU65	CRRU67
Síntesis de AIA					
<i>TrpE</i>	Antranilato sintasa	A	A	A	A
<i>trpG</i>	Glutamina amidotransferasa, clase I	A	A	A	A
<i>trpD</i>	Antranilato fosforribosiltransferasa	A	A	A	A
<i>trpF</i>	Fosforribosilantranilato isomerasa	A	A	A	A
<i>trpC</i>	Índol-3-glicerol fosfato sintetasa	A	A	A	A
<i>trpA</i>	Cadena alfa de triptófano sintasa	A	A	A	A
<i>trpB</i>	Cadena beta de triptófano sintasa	A	A	A	A
<i>amiE</i>	AmiE amidasa	A	A	A	A
-	Nitrilasa	A	NA	A	A

A: Anotado; NA: No Anotado.

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos para obtener fósforo del medio y mejorar su biodisponibilidad en los suelos. Los más comunes son las fosfatasa y las fitasas, cuya acción consiste en solubilizar los fosfatos orgánicos como los fosfolípidos, y los ácidos orgánicos, encargados de solubilizar los fosfatos inorgánicos como el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Wan *et al.*, 2020). Con respecto a los primeros, los genes para las enzimas fosfatasa alcalina fueron anotados en todos los genomas menos en el de la cepa *Ferraniclui bacter rubi* CRRU44, el gen de la enzima tirosina fosfatasa también fue anotado en todos los genomas y el gen de la enzima fitasa únicamente fue anotado en el genoma de la cepa *Ferraniclui bacter rubi* CRRU44. Todas estas enzimas son producidas habitualmente por procariontes (Fahde *et al.*, 2023). Los fitatos son una clase de fosfatos de inositol que se encuentra ampliamente distribuidos en los suelos. El fosfato de estos compuestos es difícil de obtener debido a la falta de sustancias activas que hidrolicen el fitato, por lo que un microorganismo productor de fitasas podría tener un gran interés a nivel agrícola (Li *et al.*, 2023). Con respecto a los ácidos orgánicos, los genes de la enzima glucosa-1-deshidrogenasa (*gcd*), responsable de la producción del ácido glucónico, y de la enzima citrato sintasa, responsable de la producción del ácido cítrico (Liang *et al.*, 2020) fueron anotados en todos los genomas excepto en el de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y en el de la cepa *Ferraniclui bacter rubi* CRRU44, respectivamente. Esto coincide con los resultados obtenidos *in vitro* donde solo las cepas seleccionadas pertenecientes al género *Rhizobium* fueron capaces de solubilizar los fosfatos inorgánicos del medio (Tabla 51). Aunque estas son las enzimas más comunes, existen otras enzimas relacionadas con la solubilización de los compuestos de fosfatos, como las fosfonatasas que hidrolizan los fosfonatos, unos compuestos de fósforo orgánicos ricos en enlaces C-P y químicamente muy estables. Las fosfonatasas son C-P liasas codificados por el operón *Phn*, que es activado en condiciones de déficit de fosfato (Silva *et al.*, 2023). La mayoría de los genes de este operón han sido anotados en los genomas de las cepas *Ferraniclui bacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

La biosíntesis de sideróforos en las bacterias está relacionada con las péptido sintasas no ribosomales (NRPS), que dan lugar a pequeñas moléculas peptídicas que contienen cadenas laterales y grupos funcionales que pueden dar lugar a un conjunto de ligandos de alta afinidad por los iones férricos. Estas moléculas pueden sufrir una serie de modificaciones que dan lugar a los diferentes sideróforos bacterianos (Swayambhu *et*

al., 2021). Con respecto a las enzimas relacionadas con la producción de los sideróforos, en el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 únicamente fueron anotados los genes *sbnA* y *sbnB*, involucrados en la síntesis del sideróforo estafiloferina (Dale *et al.*, 2004). Esto coincide con los resultados obtenidos *in vitro*, pues esta bacteria fue la única de las cuatro seleccionadas que mostró actividad productora de sideróforos (Tabla 51).

En cuanto a la fijación del nitrógeno, las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 mostraron anotados en su genoma los genes *nodABCD*, necesarios para la formación de nódulos. Estas estructuras son necesarias para que las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* sean capaces de fijar nitrógeno (Swarnalakshmi *et al.*, 2020). A pesar de que la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fue capaz de crecer en medios libres de nitrógeno, ninguna enzima relacionada con la fijación del nitrógeno fue anotada en su genoma. De todas formas, sí fueron anotados los genes *narKUT* implicados en la desnitrificación de NO₃ a N₂ (Nag y Das, 2022). Con respecto a esta actividad ningún gen fue anotado en el genoma de la cepa *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, lo cual parece indicar que esta cepa no tiene la capacidad de fijar el nitrógeno.

El ácido indol acético puede ser producido por diferentes rutas metabólicas, sin embargo, en las bacterias la mayoría de estas rutas usan el triptófano como principal precursor (Spaepen *et al.*, 2007). Los genes para la síntesis del triptófano están codificados por el operón Trp (Xie *et al.*, 2002), y los genes *trpABCDEF* fueron anotados en los cuatro genomas evaluados. A partir del triptófano existen diversas rutas metabólicas para producir el AIA. Una de ellas es la ruta de la indol-3-acetamida (IAM), que es la más común en las bacterias. En esta ruta el triptófano es convertido a IAM, que luego es convertido a AIA por la enzima amidasa alifática *AmiE* (Boss *et al.*, 2022), la cual fue anotada en los genomas de las cepas *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67. Otra de las rutas es la del Indol-3-acetonitrilo (IAN), en que el triptófano es convertido a IAN y este a AIA por la enzima nitrilasa (Remans, 2006). Esta enzima fue anotada en el genoma de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67. En los ensayos de HPLC obtuvimos que todas las cepas eran capaces de producir AIA y el estudio del genoma indica que probablemente es sintetizado a partir de estas rutas.

La colonización de los tejidos vegetales engloba varios procesos en los que están involucrados diferentes tipos de genes. En la colonización entra en juego la quimiotaxis, la capacidad de las bacterias de percibir los exudados radiculares de las plantas para dirigir su movimiento hacia ellas (Feng *et al.*, 2021). Las bacterias poseen numerosas rutas quimiosensoriales para llevar a cabo este proceso, pero existe un *core* de proteínas que están presentes en todas las rutas quimiosensoriales, el complejo Che. La estimulación de los quimiorreceptores modula la actividad de la autoquinasa CheA que a su vez modula la cinética de transfosforilación de CheY. La proporción de CheY

fosforilada y no fosforilada define la salida de señalización. La adaptación de una vía quimiosensorial a la concentración de la señal ambiental es lograda mediante la acción concertada de la CheR y la CheB (Matilla *et al.*, 2022). Los genes *cheABRWY* han sido anotados en todos los genomas salvo en el de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21. Esta ruta controla la actividad del flagelo. Aproximadamente dos tercios de las bacterias poseen flagelos, lo que indica una conservación significativa entre los organismos procariotas. Para la síntesis flagelar se requieren aproximadamente 50 genes entre los que se encuentran los miembros del operón Fli, Flg y Mot (Nedeljkovi'c *et al.*, 2021). De forma general, un flagelo bacteriano está compuesto por un cuerpo basal, un estator, una varilla, un sistema de secreción tipo 3, un gancho y un filamento. EL cuerpo basal a su vez está formado por cuatro anillos (C, MS, P y L) localizados en el citoplasma, la membrana interna, el peptidoglicano y la membrana externa, respectivamente. El anillo C, que conforma a su vez el motor, está formado por múltiples copias de las proteínas FliG, FliN y FliM, el anillo MS por la proteína FliF, el anillo P por las proteínas MotY y FlgI y el anillo L por la proteína FlgH. El estator genera la fuerza que impulsa la rotación del motor y está formado por las proteínas MotA, MotB, MotC y MotD (Calvopina-Chavez *et al.*, 2023); la varilla está formada por las proteínas FliE, FlgB, FlgB flgF y FlgG; el sistema secretor está formado por FliQ, FliO, FliR, FliP, FlhA, FliJ, FliI, FlhB y FliH; el gancho está formado por las proteínas FlgE, FlhK y FlgL; y el filamento flagelar está formado por la proteína FliC (flagelina) y por la proteína de cubierta FliD (Matilla *et al.*, 2022). Todos estos genes han sido anotados en todos los genomas salvo en el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21.

Una vez las bacterias alcanzan las raíces, deben fijarse a ellas. Para ello, muchas recurren a la formación de *biofilms* para lo que necesitan expulsar y agregar sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales constituyen hasta el 90% de la matriz del *biofilm*. Los EPS pueden ser polisacáridos, proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, pero los más estudiados han sido los exopolisacáridos. Su biosíntesis ocurre en el citoplasma a partir de nucleótidos de azúcar precursores (UDP-glucosa, UDP-galactosa y dTDP-ramnosa). Estos monómeros actúan como la unidad básica para la biosíntesis de unidades repetidas. Para alargar la cadena es necesaria la enzima glicosiltransferasas (GT) mientras que los genes necesarios para la modulación y la maquinaria de ensamblaje son más específicos. Uno de los exopolisacáridos más conocidos es el succinoglicano. El succinoglicano es producido a partir de un grupo de 19 genes ubicados en el operón Exo. Los genes *exoC*, *exoB* y *exoN* están implicados en la síntesis de los precursores UDP-galactosa y UDP-glucosa. El gen *exoY*, ayudado por el gen *exoF*, codifica la GT responsable que sintetiza las unidades repetidas transfiriendo el residuo de galactosil. Los genes *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoO*, *exoU* y *exoW* codifican otra GT implicada en el alargamiento de la unidad repetida de octasacáridos mediante la adición de una unidad de glucosa. Los genes *exoP*, *exoQ* y *exoT* ayudan a la translocación, la polimerización y el control de la longitud de la cadena del succinoglicano. Los genes *exoZ* y *exoH* agregan los sustituyentes acetilo y succinilo a la unidad repetitiva. El gen *exoV* agrega el grupo piruvilo a la glucosa terminal. Finalmente, el gen *exoK* codifica para las endoglicanasas

extracelulares que reducen el alto peso molecular del producto (Vandana y Das, 2022). Los genes *exoFIQZ* fueron anotados en los genomas de las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67.

Finalmente, la colonización del interior de los tejidos vegetales puede ocurrir de manera pasiva, en la que las bacterias entran por roturas o heridas, o de manera activa, mediante la secreción de enzimas degradadoras de la pared vegetal, como las celulasas o las xilanasas. En los genomas de las bacterias seleccionadas fueron anotadas diferentes enzimas degradadoras de la celulosa o el xilano, que podrían explicar los resultados obtenidos *in vitro*. Así, la cepa *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, que mostró actividad celulasa, xilanasas y amilasa *in vitro*, mostró enzimas relacionadas con las tres actividades anotadas en su genoma. Por el contrario, las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, en cuyos genomas fueron anotadas también las enzimas, no mostraron las actividades *in vitro*. La cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, que mostró la actividad xilanasas *in vitro*, no mostró anotada ninguna enzima relacionada en su genoma.

En general, en los genomas de las cepas *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 fueron anotadas muchos de los genes implicados en el complejo proceso de colonización de los tejidos vegetales, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de *biofilms*, de microscopía y cuantificación por qPCR. Sin embargo, en el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 los genes anotados relacionados con la colonización fueron muy escasos. Únicamente fueron anotados genes del operón Sec, que están involucrados en la unión de sustratos dentro de la formación de *biofilms* (Rather *et al.*, 2021) y genes de los operones Cpa y Tad, relacionados con la síntesis de *pili*, apéndices bacterianos que, como los flagelos, están involucrados en la movilidad, formación de *biofilms* y fijación de las bacterias a los tejidos vegetales (Carvia-Hermoso *et al.*, 2024). Aunque el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 no proporcionó demasiada información sobre su potencial genético para la colonización, los ensayos de *biofilm*, de microscopía y de cuantificación por qPCR sí han demostrado que esta bacteria posee la capacidad de colonizar los tejidos vegetales. Esto ha sido visto en otros estudios donde cepas de *Arthrobacter* mostraban la capacidad de formación de *biofilms*, a pesar de que la información que aportaban sus genomas resultaba bastante limitada (Wagner *et al.*, 2021).

6.6.2. Búsqueda de otras actividades no evaluadas de promoción del crecimiento vegetal.

Adicionalmente, realizamos una búsqueda de otras funciones relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal usando la herramienta *online* PLABASE.

La fijación de nitrógeno *in vitro* no fue directamente evaluada, pero la herramienta PLABASE permite hacer un estudio sobre esta actividad en base al potencial genético. En la fijación biológica del nitrógeno, la enzima principal es la nitrogenasa, codificada

por los genes del sistema *nif* (Dai *et al.*, 2014). En el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fueron anotados los genes *nifSU*; en el genoma de la cepa *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, los genes *nifMS*; y en los genomas de las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y de *Rhizobium laguerreae* CRRU67, los genes *nifABDEHKMNST*. Estos resultados parecen indicar que, de estas cuatro, sólo las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 deben de ser capaces de realizar esta actividad.

Otra actividad importante fue la producción de sideróforo. Las anotaciones del genoma nos permitieron inferir que tipo de sideróforos podrían estar involucrados. Esta actividad sólo fue observada en la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21. A parte de los genes involucrados en la biosíntesis del sideróforo estafiloferrina ya mencionada, fueron anotados los genes *ectAHI* involucrados en la síntesis del sideróforo eritroquelina y los genes *desACD* involucrados en la síntesis del sideróforo desferroxiamina (Hernández *et al.*, 2021; Heskamp *et al.*, 2021). Por otro lado, aunque han sido anotados algunos genes aislados que podrían estar relacionados con la producción de sideróforos en las cepas *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y de *Rhizobium laguerreae* CRRU67, no son suficientes para afirmar que podrían producirlos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos *in vitro*.

A parte del ácido indol acético, existen otras hormonas vegetales relacionadas con el crecimiento de la planta. La putrescina, la espermidina y la espermina son poliaminas relacionadas con una amplia gama de procesos fisiológicos y celulares, incluyendo el crecimiento, el desarrollo y la división celular, o incluso con la tolerancia a los estreses ambientales como la sequía o la salinidad (Azizul *et al.*, 2020). En todos los genomas analizados se anotaron los genes *speBC* y, además, en los genomas de las cepas *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 también se anotó el gen *gsp*. Los genes del sistema *spe* están involucrados en la biosíntesis de la putrescina mientras que el gen *gsp* es una glutationilespermidinea sintetasa involucrada en la síntesis de espermidina (Krysenko y Wohlleben, 2022; Thongbhubate *et al.*, 2021).

Del mismo modo, las vitaminas son compuestos esenciales para el correcto desarrollo de las plantas. Las vitaminas del grupo B incluyen la vitamina B1 (tiamina y sus derivados), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina, nicotinamida y ribósido de nicotinamida), vitamina B5 (pantotenato), vitamina B6 (piridoxina, piridoxal, piridoxamina y derivados fosforilados), vitamina B7 (biotina), vitamina B9 (folatos y sus derivados) y vitamina B12 (cobalamina). En las plantas, estas vitaminas están involucradas en múltiples procesos donde actúan como cofactores, coenzimas, además participan en las reacciones redox y disminuyen el daño oxidativo (Jiang *et al.*, 2021). Diversos genes relacionados con la síntesis de estas vitaminas fueron anotados en el genoma de las cuatro bacterias. Los genes *thiCDGELO*, *thiCDEFMNO*, *thiDEFKLMNO* y *thiDEFKLMNO* fueron anotados en los genomas de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, respectivamente. Los genes

cobACFGLNPQSTU, *cobACFGLNPQRSTU* y *cobACFGLNPQRSTU* fueron anotados en los genomas de las cepas *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, respectivamente. Los genes *pdxAKST*, *pdxAHJK*, *pdxAHJK* y *pdxAHJK* fueron anotados en los genomas de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, respectivamente. Los genes *ribABDEFH*, *panBCE folABCDEKP* fueron anotados en los cuatro genomas. Los genes de los sistemas *thi*, *cob*, *pdx*, *rib*, *pan* y *fol* están involucrados en la síntesis de la vitamina B1 tiamina, B12 cobalamina, B6 piridoxina, B2 riboflavina, B5 pantotenato y B9 folato, respectivamente (Averianova *et al.*, 2020; D’aimmo *et al.*, 2024; Labuschagne y Divol, 2021; López-Sámano *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2022).

Con respecto a la colonización, también fueron anotados diferentes genes en los genomas. Los genes *bcsA*, *glgCPX* y *manABC*; *bcsABZ*, *glgACPX* y *manBC*; *bcsABZ*, *glgACPX*, *lpxABCDFGHIK* y *manBC*; y *bcsABZ*, *glgACPX* y *manBC* fueron anotados en los genomas de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, respectivamente. Los genes *dltCE* y *rfgADCD*; *dltC* y *rfgADCDEF*; y *dltC* y *rfgADCDEF* fueron anotados en los genomas de las cepas *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, respectivamente. Los genes *lptABCDEFG* fueron anotados en todos los genomas menos en el de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21. Todos estos genes están involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos, necesarios para que las bacterias establezcan relaciones físicas con la planta. Concretamente, los sistemas de los genes *bcs*, *dlt*, *glg*, *lpt*, *man* y *rfb* codifican para la síntesis de la celulosa, los ácidos teicoicos, la trehalosa/ α -glucano, el transporte de lipopolisacáridos, los lípidos A, los oligosacáridos centrales y la manosa (Al-Janabi *et al.*, 2022; Hayles *et al.*, 2024; Krishna *et al.*, 2022; Sraphet y Javadi, 2021; Velichko *et al.*, 2024; Xiang *et al.*, 2020).

Por otro lado, los genes *livFHKM*, *oppABCDF*, *trpEG* y *lsrR*; *livGFHKM*, *oppABCF*, *trpE* y *lsrABCDGKR*; *livGFHKM*, *oppABCDF*, *potABCDFGHI*, *secABDEFGY*, *trpE*, *ddpADCDF* y *lsrR*; y *livGFHKM*, *oppABCDF*, *trpE* y *lsrR* fueron anotados en los genomas de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, respectivamente. Los genes *trbBCDEFGIKL*, *trbBCDEFGIL* y *trbBCDEFGIL* fueron anotados en los genomas de las cepas *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67, respectivamente. Los genes *grpDEFGIK* fueron anotados únicamente en el genoma de la cepa *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44. Estos genes están involucrados en la formación de los *biofilms* en bacterias. Concretamente, los sistemas de genes *liv*, *opp*, *trp*, *lsr* y *trb* codifican para la adquisición de los aminoácidos, el flujo de los aminoácidos, la síntesis de los péptidos con residuos de triptófano, el transporte de la molécula autoinducidora 2 del QS y la formación de los *pili* (Cui *et al.*, 2020; Qianwen Li *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2020; Shang *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2023).

Finalmente, con respecto a la penetración de tejidos vegetales, en el genoma de la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 fueron anotadas 3 enzimas amilasas, 1 enzima glucosidasa, 2 enzimas hidrolasas y 1 enzima trehalasa. En el genoma de la cepa *Ferranicluiibacter rubi* CRRU44 fueron anotadas 2 enzimas amilasas, 2 enzimas glucosidasas, 1 enzima hidrolasa, 1 enzima trehalasa, 1 enzima celulasa, 2 enzimas galactosidasas y 2 enzimas manosidasas. En el genoma de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 fueron anotadas 2 enzimas amilasas, 2 enzimas glucosidasa, 2 enzimas hidrolasas, 1 enzima trehalasa, 1 enzima celulasa, 3 enzimas galactosidasas, 2 enzimas manosidasas, 1 enzima rhamnosidasa, 1 enzima fructofuranosidasa y 1 enzima xilosidasa. En el genoma de la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU67 fueron anotadas 2 enzimas amilasas, 2 enzimas glucosidasa, 2 enzimas hidrolasas, 1 enzima trehalasa, 1 enzima celulasa, 3 enzimas galactosidasas, 2 enzimas manosidasas, 1 enzima rhamnosidasa, 1 enzima fructofuranosidasa y 1 enzima xilosidasa. Todas estas enzimas están implicadas en la degradación de los tejidos vegetales y permitirían la entrada de estas bacterias al interior de las raíces (Dai *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021; Mafa y Malgas, 2023; Pieczywek *et al.*, 2020; Radosavljević *et al.*, 2024; Sharma *et al.*, 2021; Shrestha *et al.*, 2024; Villa-Rivera *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

El análisis de los genomas permite aportar información adicional a los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*, dilucidando los posibles mecanismos que podrían estar involucrados en la promoción del crecimiento vegetal.

7. CAPÍTULO IV:
CARACTERIZACIÓN DEL
POTENCIAL DE LOS AISLADOS EN
EL BIOCONTROL DEL HONGO
FITOPATÓGENO *BOTRYTIS*
CINEREA

Los fitopatógenos son una de las principales amenazas en la agricultura (Bolívar-Anillo *et al.*, 2020). Durante las últimas décadas, muchas enfermedades vegetales han sido combatidas mediante el uso de compuestos químicos (Lian *et al.*, 2017). Sin embargo, el empleo excesivo ha derivado en el desarrollo de cepas resistentes y ha aumentado el daño ambiental debido a la acumulación de estos compuestos en la naturaleza (Jiang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019). La necesidad de encontrar una alternativa ha promovido que la investigación sobre los biopesticidas sea más intensa. Los biopesticidas son productos que proceden de algún organismo vivo y que son utilizados en el control de plagas. Los biopesticidas poseen varias ventajas en comparación con los pesticidas químicos. Son más selectivos, los costes de fabricación son menores, no hay liberación de compuestos tóxicos y el desarrollo de resistencias en los organismos diana es improbable (Chandler *et al.*, 2011; Pertot *et al.*, 2017; Schalchli *et al.*, 2016).

Las bacterias endofíticas son uno de los mejores candidatos para la producción de biopesticidas dirigidos a la agricultura (Jiao *et al.*, 2021; Umesha *et al.*, 2017). Estas bacterias pueden tener diferentes modos de acción contra los fitopatógenos, como son la producción de moléculas antimicrobianas, la producción de enzimas líticas, la competencia por el espacio y los nutrientes o la inducción de la resistencia sistémica en la planta (Constantin *et al.*, 2019; Roca-Couso *et al.*, 2021).

En este capítulo, fue evaluado el potencial biopesticida, de las 70 cepas aisladas en el Capítulo II, frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, ya que es uno de los diez hongos patógenos con mayor relevancia a nivel económico (Díaz Ricci *et al.*, 2020; Priyashantha *et al.*, 2023). En primer lugar, se evaluaron *in vitro* la producción de enzimas hidrolíticas, la acción directa de las bacterias frente al hongo y la acción indirecta del volatilo de las bacterias frente al hongo. Los resultados obtenidos permitieron hacer una selección de aquellas bacterias más eficientes. A continuación, el potencial biofungicida de las cepas seleccionadas fue evaluado en ensayos *in vivo* realizados en plantas de tomate. Cuatro de las cepas analizadas presentaron un volatilo con un gran potencial, por lo que se decidió analizar su genoma, la composición del volatilo y su efecto sobre la regulación de la expresión de genes involucrados en la activación de la resistencia sistémica en la planta.

7.1. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LAS CAPACIDADES ANTIFÚNGICAS.

Los estudios *in vitro* de los diferentes mecanismos de biocontrol de las bacterias permiten hacer una evaluación de las características de las cepas, permitiendo seleccionar las que tengan mayor potencial. En este capítulo los mecanismos de biocontrol evaluados *in vitro* fueron la producción de enzimas hidrolíticas, la producción de compuestos antifúngicos difusibles y la producción de compuestos antifúngicos volátiles.

7.1.1. Producción de enzimas líticas.

No existe una composición específica de las paredes celulares de los hongos. Sin embargo, en la mayoría de las especies de hongos, los principales componentes de la

pared celular son la quitina (alrededor del 20%), los glucanos (entre el 50 y el 60%) y las proteínas (entre el 20 y el 30%) (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Por ello, la producción de enzimas hidrolíticas juega un papel importante en el biocontrol de hongos fitopatogénicos como *Botrytis cinerea*. Estas enzimas son capaces de romper los compuestos poliméricos, como son la quitina, las proteínas, la celulosa, la hemicelulosa e incluso el ADN (Heydari y Pessarakli, 2010), y también pueden interferir con la actividad metabólica de los patógenos (Nicot *et al.*, 2015), inhibir la germinación de los conidios o lisar los tubos germinales (Elad *et al.*, 2004). Por ello, en este apartado fueron estudiadas la producción de las enzimas β -glucosidasas, proteasas y quitinasas por parte de las bacterias aisladas.

7.1.1.1. Producción de β -glucosidasas.

Para la evaluación de cepas productoras de β -glucosidasas fue usado el medio de cultivo EGA (*Esculin Glycerol Agar*), cuyo componente principal es la esculina. Cuando esta es degradada por la actividad enzimática de las bacterias se libera la esculetina, la cual reacciona con los iones de hierro presentes en el medio y produce un precipitado marrón oscuro alrededor de las colonias (Tabla 56 y Figura 57) (Pérez *et al.*, 2011). De las 70 cepas evaluadas, el 68,6% (n=48) mostró actividad β -glucosidasa. De las cepas que mostraron resultados positivos en este ensayo destacaron los miembros de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, donde el 100% (n=12) y el 100% (n=6) respectivamente, mostraron resultados positivos. Del mismo modo destacaron los miembros de la familia *Sphingomonadaceae*, de los cuales el 77,8% (n=7) mostraron poseer la actividad β -glucosidasa. En contraposición, la familia *Rhizobiaceae* destacó porque la mayor parte de sus miembros no presentaron esta actividad, pues sólo el 34,8% (n=8) mostró resultados positivos. El resto de las bacterias que presentaron resultados positivos pertenecieron a los géneros *Cellulosimicrobium*, *Curtobacterium*, *Inquilinus*, *Mucilaginibacter*, *Pantoea*, *Staphylococcus* y *Xanthomonas*.

Tabla 56. Resumen de las actividades antifúngicas evaluadas *in vitro*.

Cepa	Tejido	Sid.	Dif.	Vol.	Endg.	P.L.	P.G.	Chit.
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU02	Raíz	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU03	Raíz	+	-	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU04	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU05	Raíz	+	+	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU06	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU07	Raíz	-	+	-	-	+	+	-
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU08	Raíz	-	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> CRRU09	Raíz	-	-	-	+	-	-	-
<i>Novosphingobium silvae</i> CRRU10	Raíz	-	+	+	+	+	-	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU11	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU12	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU13	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>Novosphingobium silvae</i> CRRU14	Raíz	-	+	-	+	-	-	-
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU15	Raíz	-	+	-	+	-	-	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU16	Raíz	+	+	-	-	-	-	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU17	Raíz	+	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU18	Raíz	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU19	Raíz	-	+	-	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rosae</i> CRRU20A	Raíz	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU20B	Raíz	+	+	-	+	+	+	-
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> CRRU21	Raíz	+	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU22	Tallo	+	-	-	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU23	Tallo	+	+	-	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU24	Tallo	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU25	Tallo	-	+	-	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU26	Tallo	-	+	-	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU27	Tallo	+	+	-	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU28	Tallo	+	+	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU29	Tallo	+	+	-	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU30	Tallo	+	+	-	+	+	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU31	Tallo	+	-	-	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU32	Tallo	+	-	-	+	-	-	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU33	Tallo	-	-	-	+	-	-	-
<i>Curtobacterium pusillum</i> CRRU34	Tallo	-	+	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas silesiensis</i> CRRU35	Tallo	+	+	+	+	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU36	Tallo	+	-	-	+	+	+	-
<i>Curtobacterium pusillum</i> CRRU37	Tallo	-	+	+	+	+	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> CRRU38	Tallo	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU39	Tallo	+	+	-	+	+	+	-
<i>Pseudomonas lutea</i> CRRU40	Tallo	+	-	-	+	+	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> CRRU41	Tallo	+	-	-	+	+	-	-
<i>Pantoea septica</i> CRRU42	Tallo	-	-	-	+	+	+	-
<i>Agrobacterium rosae</i> CRRU43	Tallo	+	+	-	+	+	+	-
<i>Ferrancluibacter rubi</i> CRRU44	Tallo	-	+	-	+	-	-	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU45	Tallo	+	+	-	-	+	-	-
<i>Rhizobium soli</i> CRRU46	Tallo	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU47	Tallo	+	+	+	+	+	+	-
<i>Methylobacterium bullatum</i> CRRU48	Tallo	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agrobacterium rubi</i> CRRU49	Tallo	+	-	-	+	-	-	-
<i>Inquilingus ginsengisoli</i> CRRU52	Raíz	+	-	-	+	-	-	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU53	Raíz	+	-	-	-	-	-	-
<i>Curtobacterium herbarum</i> CRRU54	Tallo	+	+	+	+	+	-	-
<i>Novosphingobium fluoreni</i> CRRU55	Tallo	+	+	-	+	-	-	-

Continúa...

Continuación Tabla 56.

Cepa	Tejido	Sid.	Dif.	Vol.	Endg.	P.L.	P.G.	Chit.
<i>Pseudomonas congelans</i> CRRU56	Tallo	+	+	-	+	+	+	-
<i>Inquilingus ginsengisoli</i> CRRU57	Raíz	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU58	Raíz	-	-	+	+	-	+	-
<i>Cellulosimicrobium composti</i> CRRU59A	Raíz	+	-	-	+	+	-	-
<i>Neobacillus drentensis</i> CRRU59B	Raíz	-	-	-	+	+	-	-
<i>Mesorhizobium australicum</i> CRRU60	Raíz	-	+	+	-	-	-	-
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU61	Raíz	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU62	Raíz	-	+	-	-	+	-	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU64	Raíz	+	+	+	+	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU65	Raíz	-	+	-	-	-	-	-
<i>Mucilaginibacter celer</i> CRRU66	Raíz	-	+	-	+	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU67	Raíz	-	-	-	+	-	-	-
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> CRRU68	Raíz	+	+	-	+	-	-	-
<i>Sphingomonas psychrotolerans</i> CRRU69	Raíz	-	-	-	+	+	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU70	Raíz	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU71	Raíz	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU72	Raíz	-	-	-	-	-	-	-

Abreviaturas: Sid: producción de sideróforos; Dif: producción de moléculas difusibles con capacidad antifúngica; Vol. producción de moléculas volátiles con capacidad antifúngica; Endg: producción de endoglucanasas. P.L. producción de proteasas en medio con leche. P.G. producción de proteasas en medio con gelatina. Quit. producción de quitinasas.

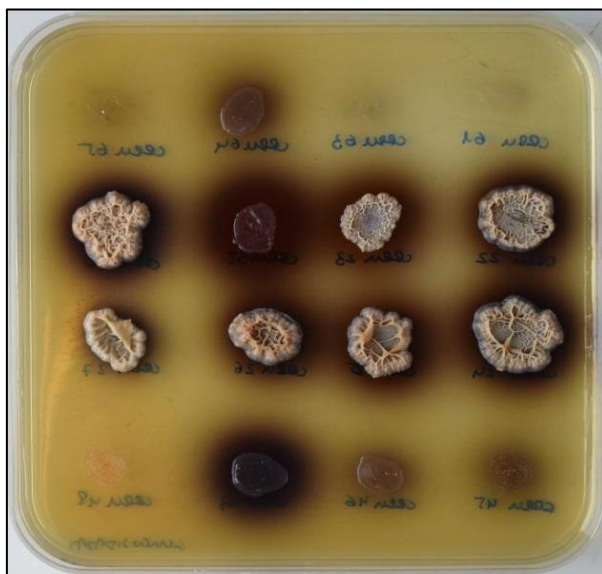


Figura 57. Cepas mostrando actividad β -glucosidasas. De izquierda a derecha y de arriba abajo: *Rhizobium laguerreae* CRRU65, *Sphingomonas psychrotolerans* CRRU64, *Rhizobium laguerreae* CRRU63, *Neorhizobium galegae* CRRU61, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU30, *Agrobacterium rubi* CRRU32, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU23, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU22, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU27, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU26, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU25, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU24, *Methylobacterium bullatum* CRRU48, *Pseudomonas congelans* CRRU47, *Rhizobium soli* CRRU46, *Rhizobium soli* CRRU45. Se considera positivo aquellas colonias en las que aparece una coloración oscura rodeándola.

Por otro lado, atendiendo al tejido en el que fueron aisladas, destacó que el 90,3% (n=28) de las cepas aisladas del tallo mostró resultados positivos en este ensayo, frente al 51,3% (n=20) de las cepas aisladas de la raíz. Estos resultados eran esperables ya que las enzimas β -glucosidasas también están involucradas en la degradación completa de la

celulosa, componente principal de los tejidos vegetales (Zhou *et al.*, 2020). Por lo tanto, era esperable que esta comunidad formada por bacterias endofíticas presentara la capacidad de producir estas enzimas (Singh *et al.*, 2016).

El glucano es el componente principal de las paredes celulares del hongo *Botrytis cinerea* y la degradación de este compuesto puede resultar en la inhibición del patógeno. Este carbohidrato puede ser hidrolizado por dos enzimas principales, la exo- β -1,3-glucanasa y la endo- β -1,3-glucanasa. El primero es capaz de escindir los residuos de la glucosa del extremo no reductor, mientras que el segundo actúa en los enlaces de sitios aleatorios a lo largo de la cadena del polisacárido (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Sin embargo, estas enzimas no son las únicas involucradas en la degradación de los glucanos. Las enzimas β -glucosidasas juegan un papel importante en la completa degradación de este compuesto (Ghio *et al.*, 2020).

Algunos géneros relacionados con la producción de estas enzimas son los géneros *Arthrobacter*, *Luteibacter* y *Pseudomonas* (Lasa *et al.*, 2019). A pesar de esto, la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 no mostró resultados positivos en los ensayos *in vitro*. La actividad β -glucosidasa ha sido asociada con las bacterias rizoféricas pertenecientes a las clases Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Estos datos concuerdan con los resultados presentados en esta tesis, donde el 80% (n=4) de las bacterias pertenecientes a la clase Actinobacteria, el 50% (n=19) de las bacterias pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria y el 92,9% (n=13) de las bacterias pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria aisladas en esta tesis presentaron la actividad (Pathan *et al.*, 2015).

7.1.1.2. Producción de proteasas.

Para la evaluación de cepas productoras de enzimas proteasas se emplearon dos medios, uno formulado con leche y otro formulado con gelatina. De las 70 cepas evaluadas, el 44,3% (n=31) fue capaz de degradar las proteínas de la leche, mientras que sólo el 28,6% (n=20) fue capaz de hidrolizar las proteínas de la gelatina (Tabla 56 y Figura 58). En ambas actividades destacaron los miembros de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. El 100% (n=12) y el 75% (n=9) de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* fueron capaces de hidrolizar las proteínas de la leche y de la gelatina, respectivamente. Con respecto a las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, el 83,3% (n=5) fue capaz de hidrolizar las proteínas de la leche y el 66,7% (n=4) fue capaz de hidrolizar las proteínas de la gelatina. Estos dos géneros ya eran conocidos por producir enzimas proteasas con capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (Wang *et al.*, 2021a).

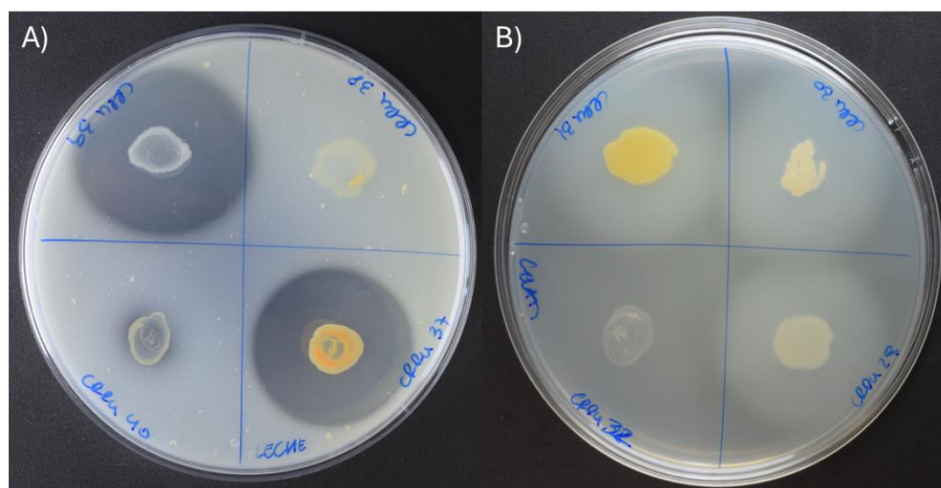


Figura 58. Cepas mostrando actividad proteasa. A) Actividad proteasa frente a proteínas de la leche de las bacterias *Curtobacterium pusillum* CRRU37, *Pantoea agglomerans* CRRU38, *Pseudomonas congelans* CRRU39 y *Pseudomonas lutea* CRRU40. B) Actividad proteasa frente a proteínas de la gelatina de las bacterias *Pseudomonas congelans* CRRU29, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU30, *Xanthomonas campestris* CRRU31 y *Agrobacterium rubi* CRRU32.

Con respecto a la hidrólisis de las proteínas de la leche, otras bacterias que mostraron la actividad pertenecieron a los géneros *Agrobacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Curtobacterium*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas* y *Xanthomonas*. Por otro lado, en la degradación de las proteínas de la gelatina, el resto de las bacterias pertenecieron a los géneros *Agrobacterium*, *Pantoea*, *Sphingomonas* y *Xanthomonas*. Algunos de estos géneros ya han sido documentados por ser capaces de producir proteasas, lo que ha sido relacionado con su capacidad de inhibir fitopatógenos. Por ejemplo, los miembros del género *Pantoea* con actividad proteolítica inhibieron el crecimiento del oomiceto fitopatógeno *Phytophthora capsici* mientras que algunas cepas de los géneros *Agrobacterium* y *Xanthomonas* con actividad proteolítica inhibieron el crecimiento de especies del hongo fitopatógeno *Fusarium* (Admassie *et al.*, 2022; Shurigin *et al.*, 2020).

7.1.1.3. Producción de quitinasas.

Para la evaluación de la producción de quitinasas se empleó un medio formulado en base a quitina coloidal de origen crustáceo. De las 70 cepas evaluadas, sólo una fue capaz de hidrolizar esta quitina. La bacteria en cuestión fue la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18. Esta especie ya ha sido descrita en numerosos artículos por poseer actividad quitinolítica e inhibir el crecimiento de multitud de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, especies de *Fusarium* o el hongo *Rigidoporus microporus* (Amaria *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024a; Yang *et al.*, 2024b).

7.1.2. Ensayo de inhibición por producción de compuestos difusibles.

Las bacterias pueden actuar contra los hongos produciendo metabolitos secundarios con actividad antifúngica que difunden a través del medio y llegan al

patógeno, lo que ralentiza o incluso inhibe su crecimiento (Heydari y Pessarakli, 2010; Lim *et al.*, 2017; Adejumo, 2021). De las 70 cepas evaluadas, el 54,3% (n=38) fue capaz de inhibir el crecimiento de la especie *Botrytis cinerea* cuando ambos microorganismos eran cocultivados en la misma placa (Figura 59 y Tabla 56). Dentro de las bacterias que presentaron resultados positivos destacaron las pertenecientes al género *Mucilaginibacter*, de las cuales el 100% (n=3) fue capaz de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*. Del mismo modo, destacaron las bacterias del género *Bacillus*, pues el 83,3% (n=10) mostró ser capaz de inhibir el crecimiento del hongo. Otro género destacable fue el género *Pseudomonas*, ya que el 83,3% (n=5) de las cepas fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo. Con respecto al resto de las bacterias que mostraron inhibición, destacaron los miembros de los órdenes Hyphomicrobiales y Sphingomonadales, ya que el 34,8% (n=8) y el 66,7% (n=6) mostraron resultados positivos, respectivamente. Del mismo modo, la mayoría de los miembros del filo Actinomycetota, en concreto el 60% (n=3) presentaron resultados positivos. El resto de las bacterias que mostraron resultados positivos fueron algunos miembros de los géneros *Inquilinus*, *Pantoea* y *Staphylococcus*.



Figura 59. Izquierda: placa control con *Botrytis cinerea*. Derecha: Cocultivo de *Botrytis cinerea* con la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU26.

Entre los géneros con actividad antifúngica identificados en este trabajo, destacan los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, cuya actividad ha sido relacionada con la producción de diversos compuestos difusibles entre los que destacan los lipopéptidos cíclicos (LP) (Stein, 2005). Estas moléculas son oligopéptidos anfifílicos, cíclicos y de bajo peso molecular que son sintetizados por los complejos enzimáticos péptidos sintetasas no ribosomales (NRPS) y las policétido sintetasas (PKS) durante el metabolismo secundario (Clements-Decker *et al.*, 2022; Toral *et al.*, 2018). Los LPs poseen una actividad de amplio espectro contra multitud de patógenos de plantas y representan una de las posibles opciones para superar el problema de la resistencia a los antimicrobianos, ya que son menos susceptibles que los antibióticos convencionales al desarrollo de resistencias (De Cesare *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2021). Los lipopéptidos están formados por un grupo principal hidrófilo de aminoácidos considerado como la parte peptídica, unido a una cadena de ácidos grasos hidrófobos, lo que da lugar a su naturaleza anfifílica (Clements-Decker *et al.*, 2022). El modo de acción de estas moléculas consiste en atacar

la membrana plasmática mediante la formación de poros que desestabilizan el equilibrio osmótico (Zhang *et al.*, 2022).

Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son dos de los géneros más estudiados en la producción de lipopéptidos. Los LPs producidos por el género *Bacillus* han sido clasificados en tres grupos según su secuencia aminoacídica, destacando la iturina y la fengicina por sus propiedades surfactantes (Haidar *et al.*, 2021). Sin embargo, también se han identificado otras familias de lipopéptidos, como son la kurstakina, las maltacinas y las polimixinas (Borriss, 2015). En particular, la fengicina y la iturina actúan frente a hongos al abrir poros en la membrana plasmática, produciendo daños en las hifas fúngicas y permeabilizando las esporas, lo que inhibe su germinación (Henry *et al.*, 2011; Souto *et al.*, 2004; Chitarra *et al.*, 2003). Del mismo modo, los LPs producidos por el género *Pseudomonas* fueron clasificados en cuatro grupos principales: la viscosina, la anfisina, la tolaasina y la siringomicina (Raaijmakers *et al.*, 2010). En este sentido, el 72,7% (n=8) de los aislados pertenecientes al género *Bacillus* (76,9%) y el 83,3% de los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* mostraron actividad antifúngica al ser cocultivados en la placa con el hongo *Botrytis cinerea*, por lo que esta actividad podría estar relacionada con la producción de LPs. Este efecto ya fue observado en la bibliografía, donde la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 produjo iturina A que inhibió el crecimiento de los hongos *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium italicum* en frutas como el melocotón, las fresas, las manzanas y las mandarinas (Calvo *et al.*, 2019). La cepa *Bacillus* sp. XT1 fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea in vitro* con tasas de inhibición del 19-72%, dependiendo de la concentración de lipopéptido aplicada (Toral *et al.*, 2018). La cepa *Bacillus subtilis* NCD-2 productora de surfactina y fengicina, también mostró actividad antifúngica contra el hongo *Botrytis cinerea* (Su *et al.*, 2020).

Aunque son de los más estudiados, los LPs no son los únicos metabolitos antifúngicos producidos por las bacterias. Muchos otros han sido descritos, como el ácido ftálico, el ácido hept-3-ilisobutílico y el ácido 2-hidroxiopropanoico, que son producidos por la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* VB7, y que mostraron tasas de inhibición del hongo *Botrytis cinerea* hasta el 46% (Nakkeeran *et al.*, 2020). Otros compuestos como son el 2,4-diacetilfloroglucinol, la pirrolnitrina y la fenazina, producidos por especies del género *Pseudomonas*, también mostraron tener actividad antifúngica (Adejumo *et al.*, 2021).

Además, dentro de los metabolitos difusibles con actividad antifúngica destacan también los sideróforos. Esta actividad ya fue evaluada en el Capítulo III, en el apartado 6.1.4. De las 70 cepas estudiadas, el 51,4% (n=36) fue capaz de producir sideróforos. El hierro es un micronutriente esencial que está presente en un alto porcentaje en los suelos. Sin embargo, este elemento tiene una solubilidad baja en las condiciones habituales del suelo (pH > 6), lo que dificulta su adquisición para los seres vivos (Vellasamy y Hariharan, 2015). En este sentido, la biodisponibilidad del hierro resulta ser un factor limitante que puede llevar a la competencia entre organismos. La restricción en la

disponibilidad de hierro reduce la tasa de germinación de esporas y crecimiento micelial en el hongo *Botrytis cinerea* (Vellasamy y Hariharan, 2015). Por ello, la actividad de algunos sideróforos específicos contra estos hongos ha sido demostrada y estudiada (Haidar, 2017). Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron estudiadas por producir gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica contra el hongo *Botrytis cinerea*. Por ejemplo, la cepa *Pseudomonas fluorescens* fp-5 prevenía la infección de las plantas después del tratamiento precosecha gracias a la producción de sideróforos del tipo hidroxamato (Haggag *et al.*, 2012). Algunos ejemplos de este tipo de sideróforos con actividad antifúngica producidos por las bacterias del género *Pseudomonas* son la pioverdina o la pseudobactina, que son capaces de suprimir al hongo *Fusarium oxysporum* (Beneduzi *et al.*, 2012). Además, la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK mostró tener un efecto protector en plantas de tomate contra el hongo *Botrytis cinerea* cuando producía los sideróforos pioquelina y piocianina, y en plantas de la especie *Arabidopsis thaliana* cuando producía el sideróforo pioverdina, (Aznar y Dellagi, 2015; Trapet *et al.*, 2016). Del mismo modo, la relación entre la producción de sideróforos y la actividad antifúngica ha sido estudiada en los miembros del género *Bacillus*. Por ejemplo, la producción del sideróforo bacilibactina inhibía el crecimiento de algunos hongos patógenos, como *Macrophomina*, *Phaseolina*, *Fusarium moniliforme* y *Botrytis cinerea* (Dimopoulou *et al.*, 2021; Nifakos *et al.*, 2021; Pal *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2011). Además, la producción de sideróforos por otras bacterias también se ha asociado con la actividad antifúngica mostrada contra el hongo *Botrytis cinerea*. Por ejemplo, la aplicación en manzanas infectadas de la especie bacteriana *Kosakonia radicincitans*, productora del sideróforo enteroquelina, reducía la descomposición en un 52% (Lambrese *et al.*, 2018). La cepa *Acinetobacter calcoaceticus* HIRFA32 producía un sideróforo de tipo catecol que inhibía el crecimiento micelial fúngico en un 46,9% *in vitro* y en un 71,5% *in planta* (Gull y Hafeez, 2012; Maindad *et al.*, 2014).

7.1.3. Producción de compuestos volátiles.

Los compuestos orgánicos volátiles suelen ser compuestos pequeños (<C15), olorosos y de baja masa molecular (<300 Da) (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). Algunos de ellos interactúan con otros microorganismos y son considerados como unos buenos mecanismos de acción para el biocontrol (Lim *et al.*, 2017). Aunque estas moléculas no han recibido tanta atención como otros mecanismos antagonistas, presentan algunas ventajas sobre otros procesos como que son eficaces en bajas concentraciones, difunden a través de los poros llenos de aire del suelo y pueden actuar sobre los patógenos sin establecer contacto físico real con ellos (Belda *et al.*, 2017; Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Además, también pueden promover el crecimiento de las plantas, mejorar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico e inducir la resistencia sistémica (Pertot *et al.*, 2017). De las 70 cepas evaluadas, el 18,6% (n=13) fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* mediante la producción de compuestos volátiles (Figura 60 y Tabla 56). En este caso, sólo tres cepas pertenecientes al género *Bacillus* y dos cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron capaces de inhibir el hongo mediante la producción de VOCs, destacando las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y

Pseudomonas silesiensis CRRU35, que también mostraron resultados positivos en la actividad anterior. Del resto de las cepas estudiadas, solo un aislado de los géneros *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Mesorhizobium*, *Novosphingobium*, *Rhizobium* y *Sphingomonas* presentó la actividad.

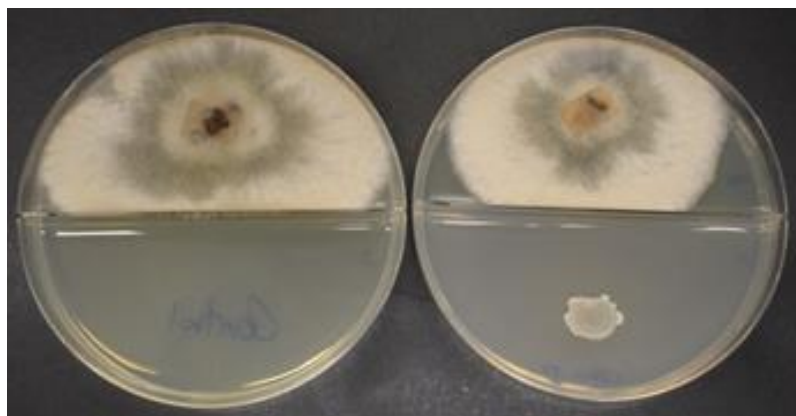


Figura 60. Izquierda: placa control con *Botrytis cinerea*. Derecha: Cocultivo de *Botrytis cinerea* con la bacteria *Novosphingobium silvae* CRRU10.

Entre las bacterias, las pertenecientes al género *Bacillus* son conocidas por ser grandes productoras de metabolitos secundarios, incluidos los VOCs (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Algunos han sido estudiados por su acción contra el hongo *Botrytis cinerea*. Así, la cepa *Bacillus velezensis* ZSY-1 fue identificada como productora de varios compuestos volátiles, como son la pirazina (2,5-dimetilo), el benzotiazol, el fenol (4-cloro-3-metilo) y el fenol-2,4-bis. (1,1-dimetiletilo), cuyas tasas de inhibición contra la especie *Botrytis cinerea in vitro* fueron del 100, el 100, el 100 y el 91,19 %, respectivamente (Gao *et al.*, 2017). Otros miembros del género *Bacillus*, como las cepas *Bacillus nakamurai* TR2, *Bacillus pseudomycooides* DHT2, *Bacillus proteolyticus* H2F1 y *Bacillus thuringiensis* H1R2, fueron descritas como productoras de VOCs contra *Botrytis cinerea*, como son el 3-metilbutan-1-ol, la 2-heptanona y el dodecanal (Chaouachi *et al.*, 2021). Además, la producción de los compuestos volátiles puede verse influenciada por la presencia de este patógeno. En este sentido, la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* VB 7 produjo VOCs adicionales cuando era cocultivada con biomasa de la especie *Botrytis cinerea*. Algunos fueron el oxirano, el 3,5-octadiino y el ácido fórmico. La producción de estos compuestos volátiles pudo estar relacionada con la actividad antifúngica mostrada tanto *in vitro* como *in planta*, que llegó a inhibir en un 46% al hongo (Nakkeeran *et al.*, 2020).

De la misma manera, las especies del género *Pseudomonas* también son grandes productoras de metabolitos secundarios (Chaouachi *et al.*, 2021). Por ejemplo, la actividad antifúngica de la cepa *Pseudomonas chlororaphis* ZL3 fue evaluada, encontrándose un total de 23 VOCs que podrían estar relacionados con la actividad (Wang *et al.*, 2021b). La cepa *Pseudomonas protegens* CHAo fue evaluada en la inhibición de varios hongos, destacando la especie *Botrytis cinerea* cuya inhibición fue debida a la producción de dos moléculas volátiles, el amoníaco y el trisulfuro de dimetilo (Prigigallo

et al., 2021). La cepa *Pseudomonas aeruginosa* LV, produjo ácido fenazina-1-carboxílico, que redujo el crecimiento micelial de la especie *Botrytis cinerea* en un 50% (Simionato *et al.*, 2017).

Además, otras bacterias pertenecientes a otros géneros también han sido estudiadas por producir VOCs antifúngicos. Por ejemplo, la cepa *Streptomyces* sp. S97 que inhibió el 87% de los síntomas producidos por la especie *Botrytis cinerea* gracias a la producción de VOCs como son el 3-careno 2,5-diona, la geosmina, el β -cubebeno y un compuesto fenólico (Ayed *et al.*, 2021). La cepa *Pantoea* sp. MQT16M1 también fue estudiada por su actividad antifúngica contra la especie *Botrytis cinerea* y mostró una reducción del crecimiento micelial en un 90%, debido a la producción de VOCs, como el alcohol feniletílico (Haidar *et al.*, 2021; Miles *et al.*, 2012). Finalmente, la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* UFG 121 también demostró tener actividad antifúngica contra la especie *Botrytis cinerea*, reduciendo su concentración entre un 40-80%: Esto fue asociado con una reducción del pH, que podría ser debida a la producción de ácido feniláctico y de ácido 4-hidroxifeniláctico (De Simone *et al.*, 2021; Chaudhari y Gokhale, 2016).

7.2. SELECCIÓN DE LAS CEPAS.

Tras esta caracterización *in vitro*, se llevó a cabo una selección teniendo en cuenta las diferentes características fenotípicas estudiadas y considerando aquellas cuya identificación genotípica hubiera demostrado que no presentaban filiación dentro de un taxón patógeno. Según estos criterios, las cepas seleccionadas fueron *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (Tabla 57).

Tabla 57. Resumen de las actividades PGP evaluadas *in vitro* de las cepas seleccionadas.

Cepa	Tejido	Sid.	Dif.	Vol.	Endg.	Prot. Leche	Prot. Gel	Chit.
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU16	Raíz	+	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU18	Raíz	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU20B	Raíz	+	+	-	+	+	+	-
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> CRRU21	Raíz	+	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas silesiensis</i> CRRU35	Tallo	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ferranichuibacter rubi</i> CRRU44	Tallo	-	+	-	+	-	-	-
<i>Inquilingus ginsengisoli</i> CRRU57	Raíz	-	+	-	+	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU65	Raíz	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium laguerreae</i> CRRU67	Raíz	-	-	-	+	-	-	-

Abreviaturas: Sid: producción de sideróforos; Dif: producción de moléculas difusibles con capacidad antifúngica; Vol. producción de moléculas volátiles con capacidad antifúngica; Endg: producción de endoglucanasas. P.L. producción de proteasas en medio con leche. P.G. producción de proteasas en medio con gelatina. Quit. producción de quitinasas.

7.3. CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DE LAS CAPACIDADES ANTIFÚNGICAS.

La capacidad antifúngica de las cepas seleccionadas fue evaluada mediante ensayos *in vivo* en plantas de tomate. Dos tipos de ensayo fueron llevados a cabo, uno en el que las plantas de tomate eran inoculadas con la bacteria e infectadas con el hongo, por lo que ambos microorganismos estaban en contacto; y otro ensayo en el que las plantas eran infectadas por el hongo, pero la bacteria permanecía separada tanto del hongo como de la planta, lo que permite evaluar la capacidad de inhibir el fitopatógeno mediante la producción de compuestos volátiles.

7.3.1. Reducción de la infección por contacto con el hongo.

En este ensayo se cuantificó el número de plantas vivas en cada tratamiento. Las plantas control, infectadas con el hongo *Botrytis cinerea*, mostraron un 0% de supervivencia. Las plantas inoculadas con las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65, aunque mostraron tasas de supervivencia del 20, 0, 13, 7, 0 y 7% respectivamente, no representaron una diferencia significativa. Sin embargo, la inoculación con las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B sí presentó diferencias significativas en la supervivencia de las plantas, alcanzando tasas del 67 y 40% de supervivencia, respectivamente (Figura 61).

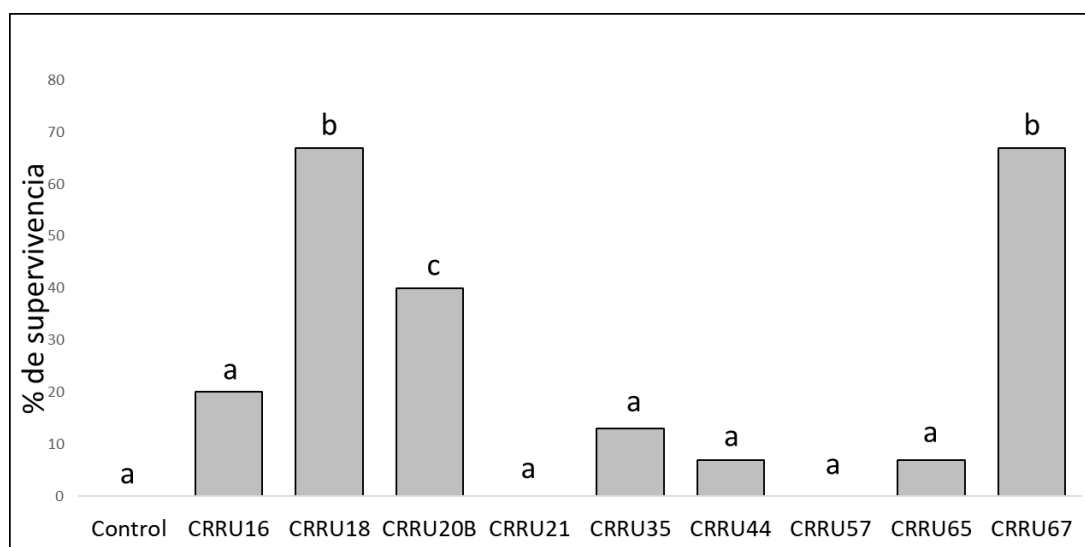


Figura 61. A) Porcentaje de plantas vivas en los ensayos de antibiosis *in planta* por contacto entre el hongo y la bacteria. B) Porcentaje de plantas vivas en los ensayos de antibiosis *in planta* sin contacto entre el hongo y la bacteria. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Chi cuadrado.

La especie *Bacillus amyloliquefaciens* es una bacteria que ya ha demostrado en numerosas ocasiones tener actividad antifúngica frente a numerosos patógenos, incluso en condiciones *in vivo*. En los diferentes estudios, estas actividades han sido correlacionadas con la habilidad de producir sideróforos, lipoproteínas cíclicas o enzimas

líticas (Debez *et al.*, 2024; Maung *et al.*, 2021; Russi *et al.*, 2024). Por ejemplo, las cepas *Bacillus* sp. XT1 y *Bacillus subtilis* NCD-2 produjeron lipopéptidos que redujeron el micelio del hongo *Botrytis cinerea* en ensayos desarrollados en uvas, fresas y tomates infectados (Su *et al.*, 2020; Toral *et al.*, 2018).

En este sentido, las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B podrían ejercer su control de la enfermedad mediante alguno de estos mecanismos, ya que ambos mostraron ser capaces de producir sideróforos y de hidrolizar casi todos los sustratos que se evaluaron.

7.3.2. Reducción de la infección mediante la producción de VOCs.

Para evaluar la capacidad de bioncontrol mediante la producción de moléculas volátiles se realizó un segundo ensayo en el que la bacteria no estaba en contacto con la planta infectada con el hongo *Botrytis cinerea*. En este ensayo, las plantas control infectadas por el patógeno *Botrytis cinerea* mostraron una supervivencia del 40%. Las plantas inoculadas con las bacterias *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU20B, *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 e *Inquilius ginsengisoli* CRRU57, aunque mostraron una mejoría en las tasas de supervivencia alcanzando el 80, el 80 y el 60%, no representaron una diferencia significativa. Sin embargo, la inoculación con las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44 y *Inquilius ginsengisoli* CRRU57 sí presentaron diferencias significativas en la supervivencia, alcanzando tasas del 93, el 97, el 97 y el 100% de supervivencia respectivamente (Figura 62).

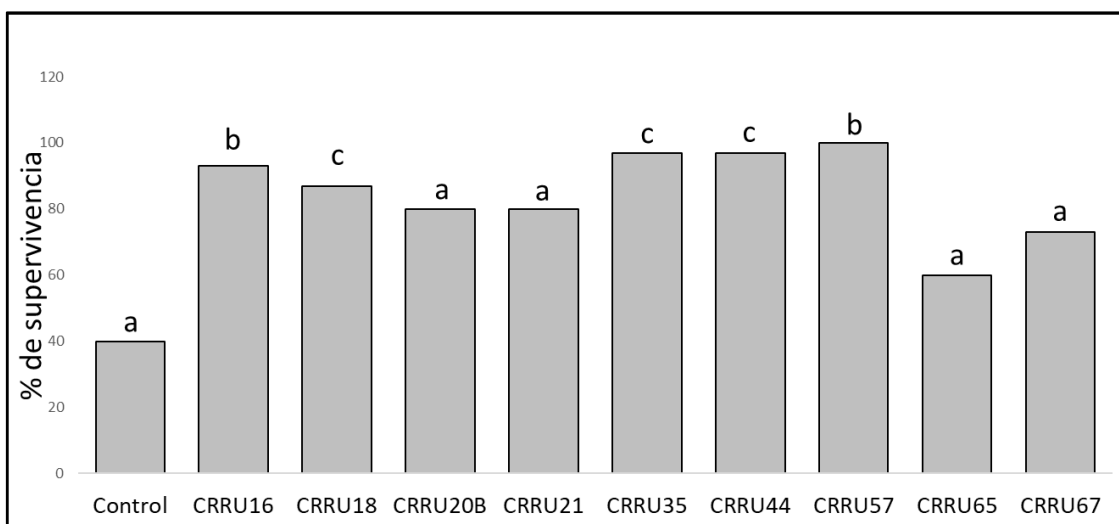


Figura 62. A) Porcentaje de plantas vivas en los ensayos de antibiosis *in planta* por contacto entre el hongo y la bacteria. B) Porcentaje de plantas vivas en los ensayos de antibiosis *in planta* sin contacto entre el hongo y la bacteria. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Chi cuadrado.

El género *Bacillus* es bien conocido por ser un gran productor de metabolitos secundarios con potencial antifúngico contra *Botrytis cinerea*, incluidos los VOCs (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019) y su actividad *in vivo* ha sido estudiada. Por ejemplo,

en los frutos de cereza, los VOCs producidos por las cepas *Bacillus atrophaeus* L193, *Psychrobacillus vulpis* Z8 y *Bacillus velezensis* XT1 redujeron la infección por el hongo *Botrytis cinerea* en un 100, un 48 y un 68%, respectivamente (Toral *et al.*, 2018). Las bacterias del género *Pseudomonas* también fueron estudiadas por su actividad antifúngica contra el hongo *Botrytis cinerea*. La cepa *Pseudomonas* sp. AN3A02 demostró reducir el daño en un 71,4% por este hongo en arándanos infectados debido a la producción de VOCs como son el 1-octanol, el paraldehído, el butirato de etilo, la 2-nonanona, el linalol, el D-limoneno y el 2,4-di-terc-butilfenol. La cepa *Pseudomonas fluorescens* ZX produjo VOCs como el trisulfuro de dimetilo y el formiato de geranilo que resultaron en la completa inhibición de la especie *Botrytis cinerea*. Finalmente, esta es la primera vez que se describe que alguna cepa de los géneros *Neorhizobium* e *Inquilingus* posea actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*.

Con estos ensayos, la importancia del volatiloма fue visible, pues los resultados fueron más prometedores en este campo. Por lo tanto, las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 fueron seleccionadas para los ensayos posteriores que fueron centrados en el estudio del volatiloма.

7.4. ESTUDIO DE LOS GENOMAS.

Para profundizar en el estudio de la producción de compuestos volátiles de estas cepas, los genomas de las cuatro bacterias seleccionadas fueron secuenciados, anotados y estudiados. Las características generales de sus genomas, junto con el porcentaje de completitud obtenido mediante el software BUSCO (versión 5.5.) y el porcentaje de contaminación obtenido por el software CheckM (versión 1.2.3.), son presentados en la Tabla 58. En todos los casos, el porcentaje de completitud del genoma fue superior al 99,4% y el porcentaje de contaminación inferior al 5%, lo que indica que los genomas obtenidos poseían una buena integridad (Manni *et al.*, 2021; Parks *et al.*, 2015).

Tabla 58. Características de los genomas de las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57.

	CRRU16	CRRU18	CRRU35	CRRU57
Tamaño	8.111.545	3.976.137	6.272.183	7.960.204
Contenido GC (%)	61,1	46,5	57,1	69,0
N50	331.282	979.171	134.590	622.210
L50	7	2	16	38
Número de <i>contigs</i> (con PEGs)	106	53	137	357
Número de subsistemas	370	328	355	360
Número de secuencias codificantes	8.236	4.078	5.995	7.712
Número de ARNs	48	95	63	49
Completitud (%)	99,8	99,3	99,5	98,6
Contaminación (%)	1,53	0,00	0,32	2,55

Para comenzar el estudio, se llevó a cabo una representación del genoma con las regiones de los CDS anotadas con la herramienta antiSMASH (Figura 63 y Tabla 59).

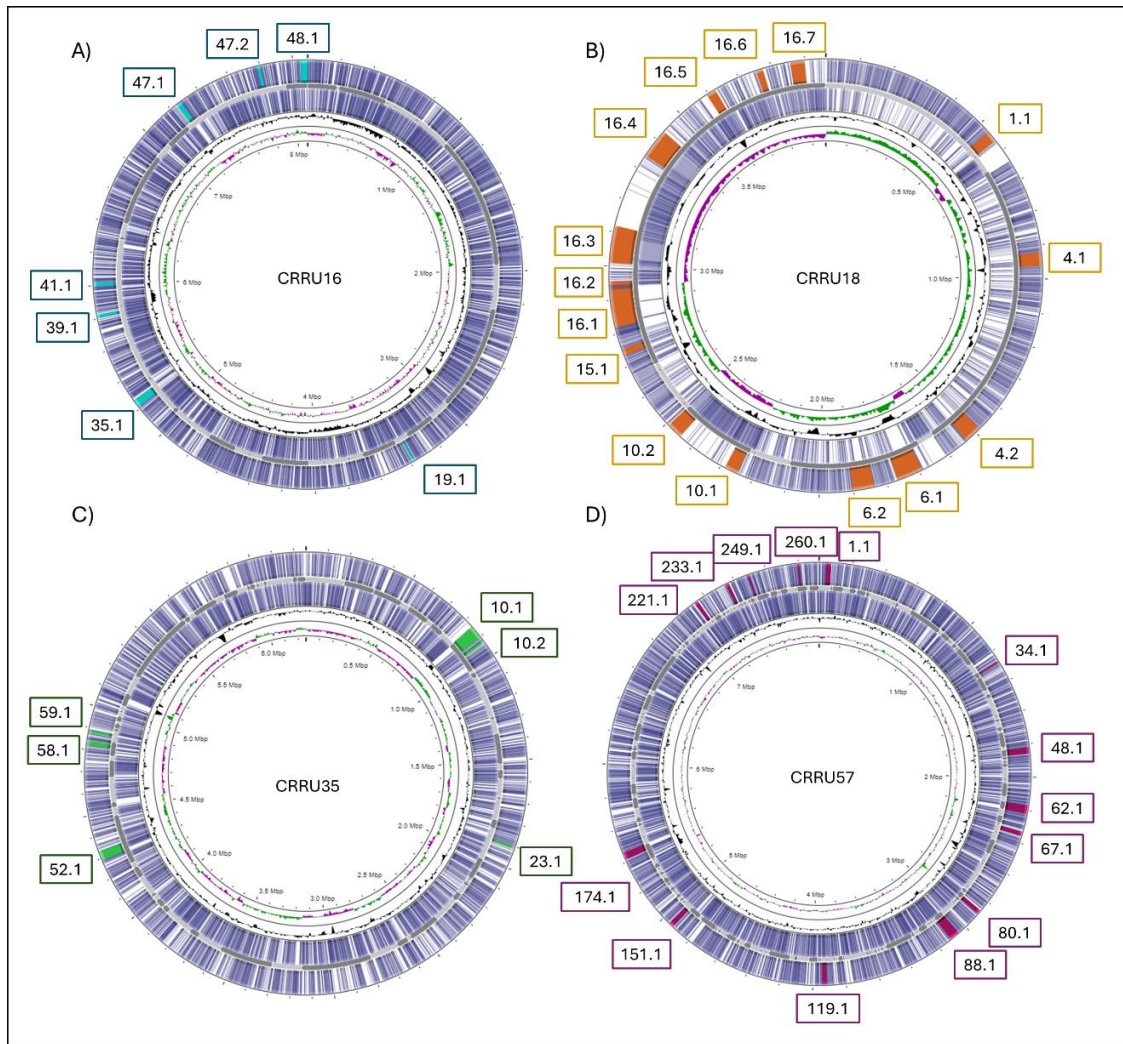


Figura 63. Representación de los genomas de las cepas A) *Neorhizobium galegae* CRRU16 con los clústeres de genes anotados por antiSMASH en amarillo; B) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 con los clústeres de genes anotados por antiSMASH en rosa; C) *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 con los clústeres de genes anotados por antiSMASH en azul; D) *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 con los clústeres de genes anotados por antiSMASH en verde. La identificación de cada una de las regiones se muestra en la Tabla 59.

Tabla 59. Identificación de las regiones anotadas con la herramienta antiSMASH en los genomas de *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57.

Región	Tipo	Clúster más similar	Similitud (%)
<i>Neorhizobium galegae</i> CRRU16			
19.1	Cianuro de hidrógeno	-	-
35.1	T1PKS	Polisacárido capsular	11
39.1	Terpeno	-	-
41.1	Tioamitida	-	-
47.1	Sideróforo	Roseobactina	33
47.2	Tioamitida	Tanafactina	22
48.1	T1PKS	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CRRU18			
1.1	TransAT-PKS	Dificidina	46
4.1	Otro	Bacilisina	100
4.2	Metalóforo	Bacilibactina	100
6.1	NRPS	Locolomicina	28
6.2	NRPS	Surfactina	82
10.1	T3PKS	-	-
10.2	TransAT-PKS	Dificidina	53
15.1	TransAT-PKS	Dificidina	26
16.1	Terpeno		
16.2	NRPS	Fengicina	100
16.3	T3PKS	Bacilaene	100
16.4	TransAT-PKS	Macrolactina H	100
16.5	Lantipéptido clase II	-	-
16.6	Terpeno	-	-
16.7	PKS	Butirosina A / B	7
<i>Pseudomonas silesiensis</i> CRRU35			
10.1	Metalóforo	Taiwaquelina	33
10.2	NAGGN	-	-
23.1	Cianuro de hidrógeno	-	-
52.1	Arilpoliene	APE Vf	40
58.1	Cofactor redox	Lancacidina C	13
59.1	Cianuro de hidrógeno	-	-
<i>Inquilinus ginsengisoli</i> CRRU57			
1.1	Fosfonato	Fosfinotricintripéptido	6
34.1	Producto peptídico	-	-
48.1	T1PKS	-	-
62.1	Metalóforo	Variobactina A / B	42
67.1	NRPS	Croquelina	20
80.1	NRPS	-	-
88.1	T1PKS	Prodigiosina	26
119.1	T3PKS	Alquilopirona	4
151.1	T1PKS	Mediomicina A	32
174.1	T1PKS	-	-
221.1	NRPS	Xenotetrapéptido	100
233.1	Terpeno	-	-
249.1	Cofactor redox	Lancacidina C	13
260.1	Cianuro de hidrógeno	-	-

En el genoma de la cepa *Neorhizobium galegae* CRRU16 fue anotado un clúster para la producción de un sideróforo, el cual tenía un 33% de homología con la roseobactina y dos clústeres para la producción de tioamitidas, una de ellas con un 22% de homología con un tanafactina.

En el genoma de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 fueron anotados cuatro clústeres para la producción de TransAT-PKS (Trans-AT policétido sintasas), tres de ellas con homologías del 26, el 46 y el 53% con la difigidina y el cuarto con la macrolactina H al 100%. También fueron anotados tres clústeres para la producción NRPS (*Non Ribosomal Peptide Synthetases*), con homología del 28, el 82 y el 100% con la locolomicina, la surfactina y la fengicina, respectivamente. También se anotaron un clúster con homología del 100% para la producción de la bacilisina y un clúster para la producción de un lantipéptido clase II y de un metalóforo con un 100% de homología con la bacilibactina.

En el genoma de la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 fue anotado un clúster para la producción de un metalóforo con un 33% de homología con la taiwaquelina, un clúster para la producción de NAGGN (N-acetilglutaminilglutamina amida), un clúster para la producción del arilpoliene y otro para la producción de un cofactor redox con un 13% de homología con la lancacidina C.

En el genoma de la cepa *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 se anotaron tres clústeres para la producción de NRPS, dos de ellos con homología del 20 y el 100% con los metabolitos croquelina y xenotetrapéptido, respectivamente. También se anotó un clúster para la producción de un fosfonato, con homología del 6% con un fosfinotricintripéptido, un clúster para la producción de un metalóforo con homología del 42% con la variobactina A / B y otro para la producción de un cofactor redox con un 13% de homología con la lancacidina C.

De forma general, varios metabolitos secundarios fueron anotados en todas las cepas menos en la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35. Por un lado, las policétido sintasas (PKS) son enzimas que poseen un amplio espectro de diversidad estructural y muchas de ellas han sido descritas por poseer actividades antifúngicas (Wang *et al.*, 2023a). Otro de los metabolitos identificados fue el cianuro de hidrógeno, el cual también ha sido estudiado por su capacidad antifúngica (Ashour y Afify, 2024). Finalmente, se han identificado clústeres para la producción de terpenos, los cuales son un tipo de compuestos volátiles con capacidad antifúngica (Rudolf *et al.*, 2021). Por lo tanto, en este tipo de compuestos podría residir la capacidad que antifúngica observada *in planta* en los ensayos anteriores.

Los terpenos no son los únicos compuestos volátiles producidos por las bacterias. Estas producen y secretan diversos compuestos volátiles orgánicos, y los más comunes son alquenos, los alcoholes, las cetonas, los terpenos, los benzoides, las pirazinas, los ácidos y los ésteres (Veselova *et al.*, 2019). Los precursores habituales de estos compuestos son los intermediarios del metabolismo de los ácidos grasos. Las reacciones

de descarboxilación dan como resultado la formación de los alcanos, los alquenos y las metilcetonas, mientras que la reducción del grupo carboxilo da como resultado la síntesis de los aldehídos y de los alcoholes alifáticos (Figura 64) (Lammers *et al.*, 2022). Dichos alcoholes y ácidos pueden fusionarse en los ésteres mediante la acción de enzimas aciltransferasas, lo que da lugar a ésteres de cadena corta, aunque también existen otras rutas hacia los ésteres (Schulz *et al.*, 2020).

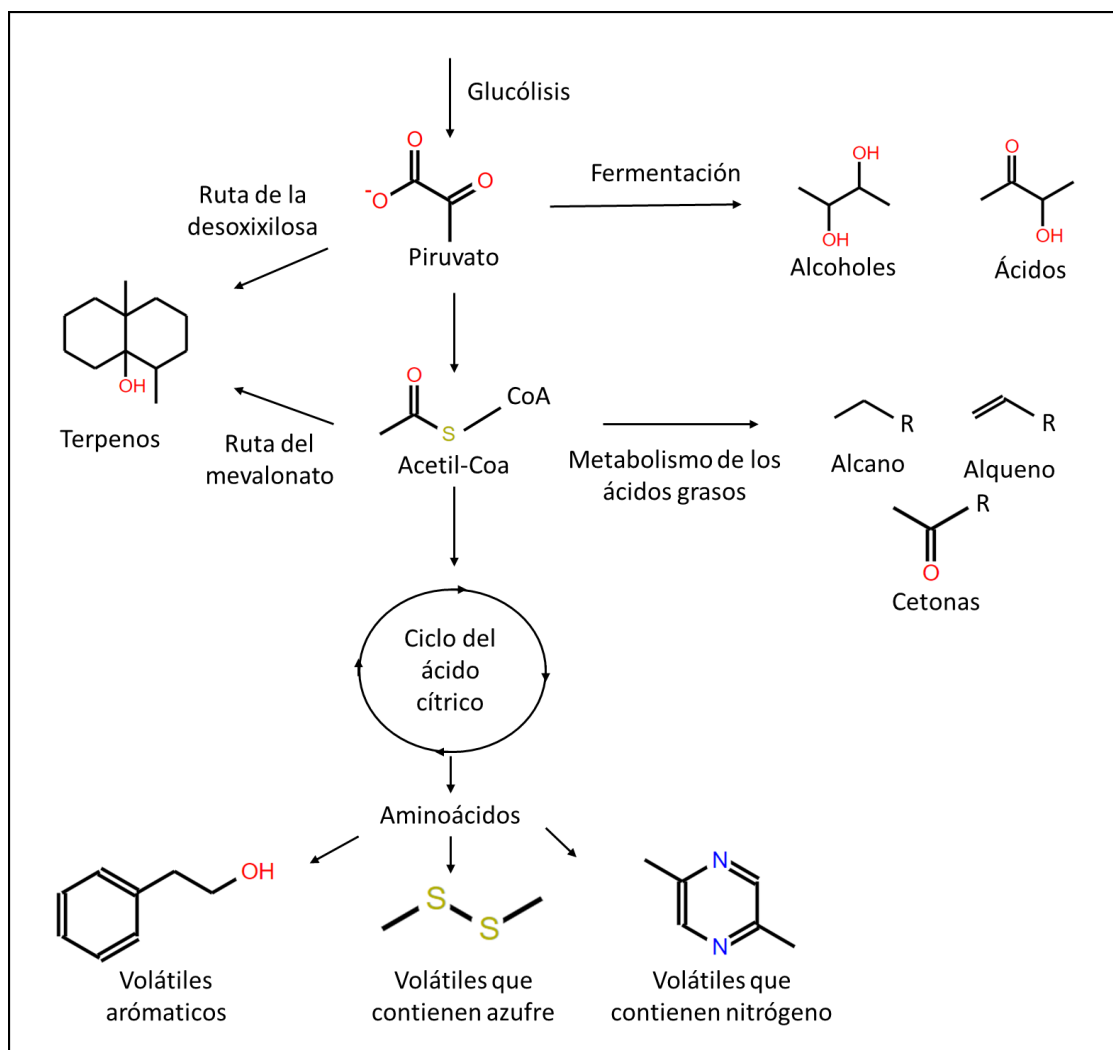


Figura 64. Descripción general de las principales rutas bioquímicas para la producción de compuestos volátiles bacterianos (Lammers *et al.*, 2022).

Otros compuestos volátiles son originados durante las fermentaciones del lactato, de los carbohidratos y de otros precursores. Los compuestos resultantes incluyen, por ejemplo, el etanol, la acetona, la butanona, el 1-butanol, el ácido acético, el ácido butírico y muchos otros compuestos pequeños y es de especial interés la formación de acetoína, que es producida por muchas bacterias (Schulz *et al.*, 2020).

En condiciones aeróbicas, el piruvato se metaboliza a acetil-CoA y puede entrar en el anabolismo de los ácidos grasos, en el ciclo del ácido cítrico o convertirse en terpenos. El metabolismo de los ácidos grasos produce los alcanos, los alquenos, los alcoholes alifáticos y las cetonas. La biosíntesis de ácidos grasos comienza generalmente

con acetyl-CoA, que se extiende con unidades de malonato para finalmente ensamblar ácidos grasos que contienen un número par de carbonos. Cada uno de los intermediarios puede ser un potencial precursor de compuestos volátiles emitidos por bacterias (Schulz y Dickschat, 2007).

El genoma de las cuatro cepas seleccionadas fue estudiado para evaluar si poseían genes de algunas de las principales rutas implicadas en la síntesis de compuestos volátiles, como son la síntesis de la acetoina, la ruta de la fermentación de la acetona-butanol-etanol (ABE), la ruta de las metilcetonas o la ruta de biosíntesis de los terpenos. En el genoma de la cepa *Neorhizobium galegae* CRRU16 se anotaron un total de 21 genes relacionados con estas rutas, en el genoma de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 se anotaron 33, en el genoma de la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 se anotaron 27 y en el genoma de la cepa *Inquilius ginsengisoli* CRR57, 29 (Tabla 60).

Tabla 60. Resumen de los genes anotados en *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 y *Inquilius ginsengisoli* CRRU57.

Genes anotados	CRRU16	CRRU18	CRRU35	CRRU57
Biosíntesis de la acetoina				
2,3-butanediol deshidrogenasa (EC 1.1.1.4)	-	+	-	-
Acetolactato sintasa subunidad grande (EC 2.2.1.6)	+	+	+	+
Acetolactato sintasa subunidad pequeña (EC 2.2.1.6)	+	+	+	+
Alfa-acetolactato decarboxilasa (EC 4.1.1.5)	-	+	-	-
Dihidrolipoamida deshidrogenasa de la acetoina deshidrogenasa (EC 1.8.1.4)	-	+	-	-
Activador transcripcional de la acetoina deshidrogenasa operon AcoR	-	+	-	-
Regulados transcripcional del alfa-acetolactato operon AlsR	-	+	-	-
Fermentación del acetyl-CoA a butirato				
3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.35)	+	-	-	-
3-hidroxiobutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.30)	+	+	+	+
3-hidroxiobutiril-CoA epimerasa (EC 5.1.2.3)	-	-	+	-
3-ketoacil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.16)	-	+	+	+
3-oxoadipil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.174)	-	-	-	+
4-ácido piridoxico deshidrogenasa	-	-	-	+
Acetoacetyl-CoA reductasa (EC 1.1.1.36)	-	-	-	+
Acetyl-CoA acetyltransferasa (EC 2.3.1.9)	-	+	+	+
Delta(3)-cis-delta(2)-trans-enoil-CoA isomerasa (EC 5.3.3.8)	-	-	+	-
Flavoproteína del electrón de transferencia, subunidad alfa	-	+	+	+
Flavoproteína del electrón de transferencia, subunidad beta	-	+	+	+
Flavoproteína del electrón de transferencia-ubiquinona oxidoreductasa (EC 1.5.5.1)	-	-	-	+
Enoil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.17)	-	-	-	+

Continúa...

Continuación Tabla 60.

Genes anotados	CRRU16	CRRU18	CRRU35	CRRU57
Biosíntesis del butanol				
2-isopropilmalate sintasa (EC 2.3.3.13)	+	+	+	+
3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.157)	+	-	-	+
3-isopropilmalato deshidratasa subunidad grande (EC 4.2.1.33)	+	+	+	+
3-isopropilmalato deshidrogenasa (EC 1.1.1.85)	+	+	+	+
Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1)	+	+	+	+
Cinamil alcohol deshidrogenasa/reductasa (EC 1.1.1.195)	-	-	+	-
Enoil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.17)	+	+	+	+
Síntesis de las metil cetonas				
3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa [fadN-fadA-fadE operon] (EC 1.1.1.35)	-	+	-	+
3-ketoacil-CoA tiolasa [fadN-fadA-fadE operon] (EC 2.3.1.16)	-	+	-	-
3-ketoacil-CoA tiolasa 2 [fadN-fadA-fadE operon] (EC 2.3.1.16)	-	-	-	+
3-oxoacil reductasa (EC 1.1.1.100), FadG	+	-	-	-
Acetil-CoA acetiltransferasa (EC 2.3.1.9), FadA2	-	-	+	-
Acil-CoA deshidrogenasa 2 [fadN-fadA-fadE operon] (EC 1.3.8.7)	-	-	+	-
Enoil-CoA hidratasa [fadN-fadA-fadE operon] (EC 4.2.1.17)	-	+	-	+
Cadena larga acil-CoA deshidrogenasa [fadN-fadA-fadE operon] (EC 1.3.8.8)	-	+	+	-
Terpenoids backbone biosynthesis				
(2E,6E)-farnesil difosfato sintasa (EC 2.5.1.10)	+	+	+	+
1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (EC 1.1.1.267)	+	+	+	+
1-deoxi-D-xilulosa 5- fosfato sintasa (EC 2.2.1.7)	+	+	+	+
2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (EC 4.6.1.12)	+	+	+	+
2-C-metil-D-eritritol 4- fosfato citidililtransferasa (EC 2.7.7.60)	+	+	+	+
4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa (EC 2.7.1.148)	+	+	+	+
Heptaprenil difosfato sintasa componente I (EC 2.5.1.30)	-	+	-	-
Heptaprenil difosfato sintasa componente II (EC 2.5.1.30)	-	+	-	-
Hidroxiacetilglutaril-CoA reductasa (EC 1.1.1.34)	+	-	-	-
Isopentenil-difosfato delta-isomerasa, FMN-dependiente (EC 5.3.3.2)	-	+	-	-
Enzima NAD-dependiente (EC 1.1.1.38)	+	+	+	-
Undecaprenil difosfato sintasa (EC 2.5.1.31)	+	+	+	+

7.4.1. Síntesis de acetoína.

La acetoína (AC) es un compuesto interesante no sólo por sus actividades propias, sino porque es el precursor de otras moléculas de interés como son el 2,3-butanodiol, los combustibles de hidrocarburos líquidos y los compuestos heterocíclicos (Cui *et al.*, 2022). En las bacterias, la síntesis de la acetoína comienza con la α -acetolactato sintasa (ALS, EC 2.2.1.6), que descarboxila el piruvato en hidroxietil-TPP-E. Luego, este reacciona con otro piruvato para generar α -acetolactato. La acetoína existe en dos formas estereoisoméricas: la (3R)-AC y la (3S)-AC. La (3R)-AC es producida a partir del α -acetolactato a través de la enzima α -acetolactato descarboxilasa (ALDC, EC 4.1.1.5). En cambio, para la formación la (3S)-AC, la α -acetolactato es convertida a diacetilo mediante una descarboxilación oxidativa no enzimática (NOD), que luego es reducido a (3S)-AC mediante una enzima alcohol deshidrogenasa secundaria (Figura 65). La isoforma (3R)-AC suele ser mucho más abundante que la (3S)-AC debido a que la eficiencia de ALDC es mucho mayor que la de NOD (Meng *et al.*, 2022b). A partir de acetoína, el 2,3-butanodiol es obtenido mediante una reacción irreversible llevada a cabo por la enzima acetoína reductasa (EC 1.1.1.4) (Wang *et al.*, 2023b).

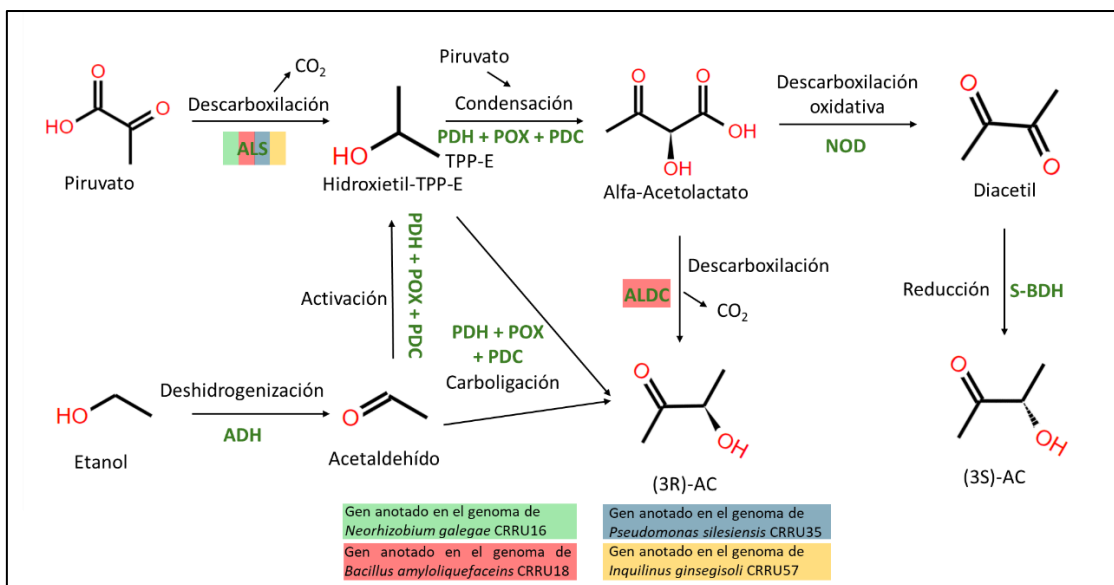


Figura 65. Rutas biosintéticas para la síntesis (3R)-AC y (3S)-AC. Abreviaturas: ADH, etanol deshidrogenasa; AHAS, acetohidroxiácido sintasa; ALS, α -acetolactato sintasa; S-BDH, alcohol deshidrogenasa secundaria específica de (S); NDC, descarboxilación no enzimática; NOD, descarboxilación oxidativa no enzimática; PDC, piruvato descarboxilasa; PDH, complejo de piruvato deshidrogenasa; POX, piruvato oxidasa. Adaptada de Meng *et al.* (2022b).

Con respecto a la biosíntesis de la acetoina, dos genes fueron anotados en los genomas de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 y, mientras que en la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 fueron anotados los ocho genes involucrados en su síntesis. Las enzimas EC 2.2.1.6; 4.1.1.5 y 1.1.1.4 han sido anotadas en el genoma de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18. En su genoma la enzima AlsR también ha sido anotada. Esta es la enzima responsable de la transcripción de ALS y ALDC (Renna *et al.*, 1993). Otra forma de catabolizar la acetoina es mediante acetoina deshidrogenasa (AoDH ES), que está codificado por el operón *acoABCL*, el cual está regulado de forma positiva por el gen *acoR*. Aunque este último sí ha sido anotado en el genoma de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, los miembros del operón *acoABCL* no (Peng *et al.*, 2020) (Tabla 60).

7.4.2. Fermentación de la acetona-butanol-etanol (ABE).

El butanol es producido a partir de la ruta de la fermentación de acetona-butanol-etanol (ABE) (Veza *et al.*, 2021). La ruta comienza con la condensación de dos acetil-CoA para formar el acetoacetyl-CoA, reacción catalizada por una tiolasa. Luego, el acetoacetyl-CoA sufre una deshidratación llevada a cabo por la enzima 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa para dar 3-hidroxi-butiril-CoA, la cual sufre una reducción mediada por la enzima crotonasa, y forma el crotonil-CoA. El siguiente paso es catabolizado por el complejo butiril-CoA deshidrogenasa (Bcd) y la flavoproteína transmisora de electrones (Etf). A continuación, se da lugar otra deshidratación mediada por la butiril-CoA deshidrogenasa para formar butiril-CoA. A partir de ahí, la ruta se bifurca. El butiril-

CoA puede ser reducido a butiraldehído y luego a 1-butanol utilizando una enzima alcohol/aldehído deshidrogenasa bifuncional; o puede hidrolizarse a butirato (Figura 66) (Chen y Liao, 2016).

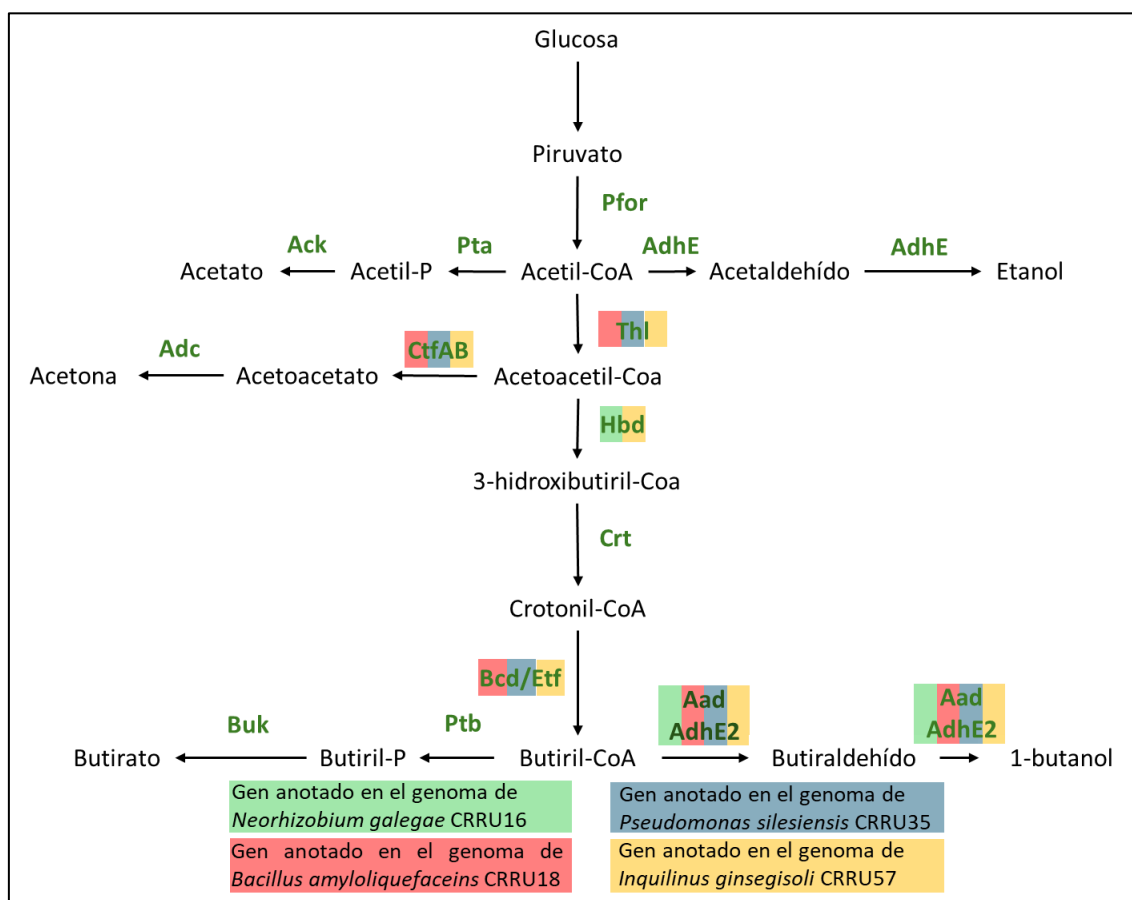


Figura 66. Ruta metabólica de la fermentación ABE. Pfor, piruvato ferredoxina oxidorreductasa; HydA, hidrogenasa; Fnor, ferredoxina: NAD(P)⁺ oxidorreductasa; Pta, fosfotransacetilasa; Ack, acetato quinasa; Ptb, fosfotransbutirilasa; Buk, butirato quinasa; CtfAB, acetoacetil-CoA: acil-CoA transferasa; Adc, acetoacetil-CoA descarboxilasa; Thl, tiolasa; Hbd, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa; Crt, crotonasa; Bcd, butiril-CoA deshidrogenasa; Etf, flavoproteína de transferencia de electrones; Fd, ferredoxina; Aad y AdhE2 son alcohol/aldehído deshidrogenasa bifuncional; se cree que el primero es la enzima principal para la producción de 1-butanol (Chen y Liao, 2016).

Con respecto a esta ruta, un total de 21 genes fueron anotados en los diferentes genomas. De ellos, 9 fueron anotados en el genoma de la cepa *Neorhizobium galegae* CRRU16, 11 en el genoma de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, 14 en el genoma de la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 y 17 en el genoma de la cepa *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 (Tabla 60).

7.4.3. Metilcetonas.

Las metilcetonas son sintetizadas en la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos (Figura 67). La ruta de la β -oxidación comienza con la conversión de los ácidos grasos en acil-CoA mediante la enzima acil-CoA sintasa, FadD. Luego, la acil-CoA puede oxidarse a trans-2-enoil-CoA mediante la acil-CoA deshidrogenasa, FadE. A

continuación, el complejo 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/enoil-CoA hidratasa FadB/FadN β -hidroxila y oxida esta especie, produciendo la β -cetoacil-CoA. Esta molécula es catabolizada a β -cetoácidos por la enzima tioesterasa FadM, los cuales son descarboxilizados a metilcetonas de forma espontánea (Carroll *et al.*, 2016).

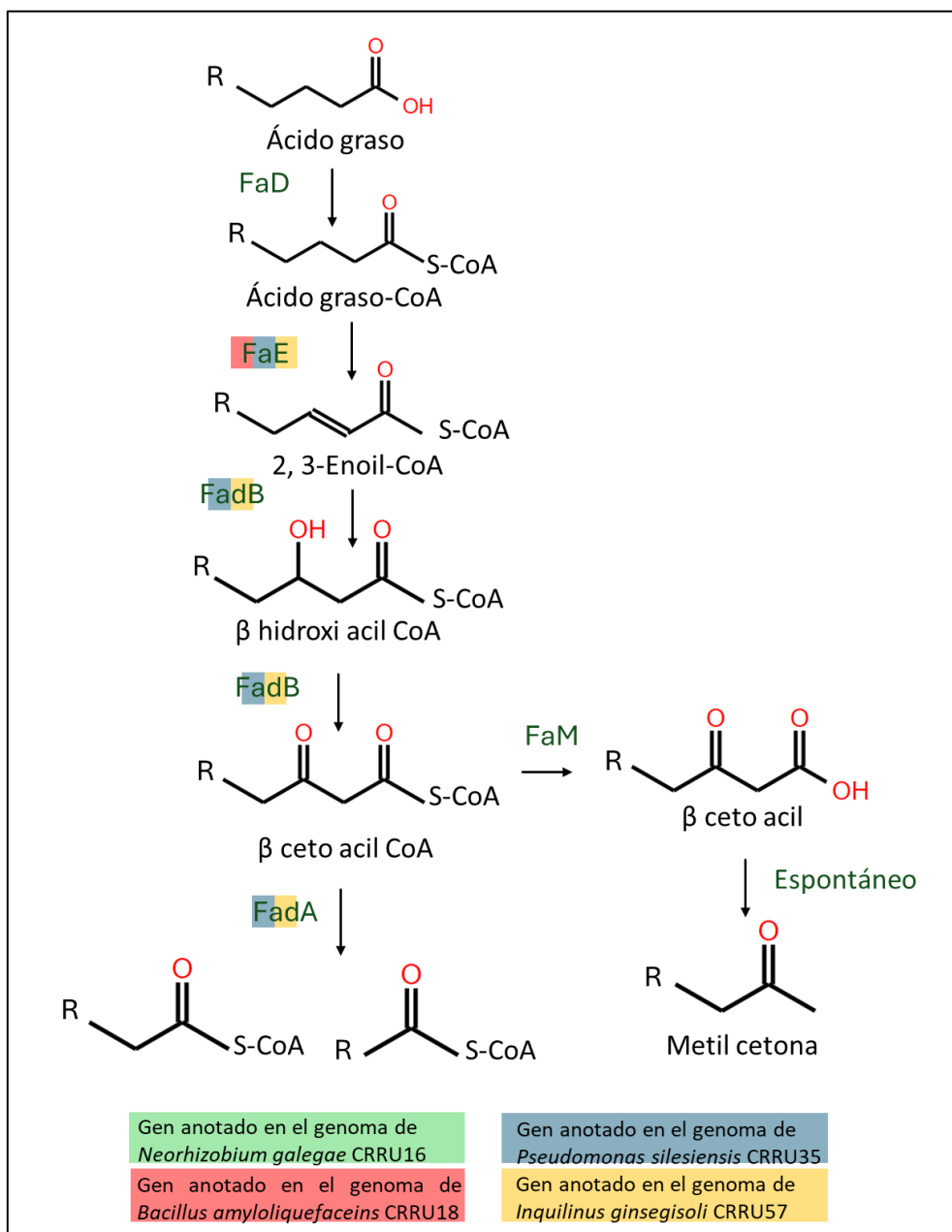


Figura 67. Ruta metabólica de la síntesis de metilcetonas. FadD: acyl-CoA synthase; FadE: acyl-CoA dehidrogenasa; FadB: beta-hidroxilasa; FadA: tiasa; FadM: tioesterasa.

Con respecto a esta ruta, un total de 8 genes fueron anotados en los diferentes genomas. De ellos, 1 fue anotados en el genoma de *Neorhizobium galegae* CRRU16, 4 en el genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, 3 en el genoma de *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 y 3 en el genoma de *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 (Tabla 60).

7.4.4. Terpenos.

La mayor parte de los terpenos son originados a partir de los sustratos C5 dimetilalil difosfato (DMAPP) y isopentenil difosfato (IPP). Normalmente DMAPP es condensada con una o más moléculas de IPP en forma “de cabeza a cola” para formar (C10) difosfato de geranilo (GPP), (C15) difosfato de farnesilo (FPP) o (C20) difosfato de geranilo (GGPP). El FPP y el GGPP pueden luego condensarse de forma “cabeza a cabeza” para formar diversos terpenoides. Los terpenos también pueden ser ciclados para formar innumerables productos terpénicos naturales como los monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) o diterpenos (C20).

Diferentes enzimas han sido anotadas con respecto a la formación de estos compuestos. Así, en el genoma de la cepa *Neorhizobium galegae* CRRU16 han sido anotadas 9 enzimas, en el genoma de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 han sido anotadas 11, en el genoma de la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 han sido anotadas 8 y en el genoma de la cepa *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 han sido anotados 7 (Tabla 60).

7.5. ESTUDIO DEL VOLATILOMA.

El análisis de los genomas parecía indicar que las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 eran capaces de sintetizar compuestos volátiles. Por lo tanto, se llevó a cabo un estudio de su volatiloма. Un total de 36 VOCs con interés antifúngico fueron identificados entre los cuatro volatilos bacterianos (Tabla 61). La composición de los cuatro volatilos fue diversa y la mayoría de los VOCs sólo estuvieron presentes en una de las bacterias.

Tabla 61. Composición de los volátiles bacterianos de las cepas.

VOCs	RT (min)	Identificador m/z	R match	CRRU16 (UA) (10 ⁷)	CRRU18 (UA) (10 ⁷)	CRRU35 (UA) (10 ⁷)	CRRU57 (UA) (10 ⁷)
Alcoholes							
1-Butanol	2,5	41,3/42,3/43,3	920	N.A.	77,2	7,2	N.A.
2-butil-1-Octanol	19,1	42,3 / 43,3 / 69,2	865	N.A.	N.A.	N.A.	2,1
2-metil-2-Undecanetriol	12,3	43,3 / 56,2/ 69,2/83,2	858	N.A.	42,4	N.A.	N.A.
2-Nonen-1-ol	15,9	43,3 / 71,2	802	N.A.	67,0	N.A.	N.A.
2,4-Di-tert-butilfenol	23,9	41,3 / 56,3 / 91,2 / 191,3	776	N.A.	N.A.	0,8	3,9
3-Decin-2-ol	18,1	45,2 / 67,2	787	0,6	N.A.	N.A.	N.A.
3-metil-1-Butanol	3,4	55,2 / 70,2	852	N.A.	N.A.	20,7	N.A.
3,5-bis(1,1-dimetil-etil)-Fenol	23,9	55,2 / 57,2 / 191,3	778	1,0	N.A.	N.A.	N.A.
Aldehídos							
Ciclobarbitol	26,0	40,3	490	0,0	N.A.	N.A.	N.A.
Alcanos							
2-metil-decano	18,5	43,3 / 71,2	860	N.A.	N.A.	N.A.	0,9
2,3-dimetil-, cis-oxirano	2,1	43,2	888	N.A.	250,7	N.A.	N.A.
2,2,4,6,6-pentametil-heptano	9,6	56,2 / 57,2	892	N.A.	17,9	15,4	N.A.
3,5-dimetil-octano	10,3	43,3 / 71,2	914	N.A.	N.A.	N.A.	23,9
5,8-dietil-dodecano	21,3	43,2 / 71,2	615	0,5	N.A.	0,3	N.A.
6-metil-octadecano	18,5	57,2 / 71,2	747	1,2	N.A.	N.A.	N.A.
Aminas							
Isobutilamina	15,6	43,3 / 73,2 / 95,2	712	0,1	N.A.	N.A.	N.A.
Alquenos							
trans-Z- α -Bisaboleno epoxide	22,8	41,3 / 56,2 / 91,2	713	N.A.	0,1	N.A.	N.A.
1-Deceno	12,7	41,3 / 42,3 / 69,2	917	N.A.	N.A.	286,8	N.A.
Ácidos carboxílicos							
2-metil-ácido butanoico	6,0	41,3 / 56,2 / 74,1	762	N.A.	N.A.	496,7	N.A.
Éster							
Etil Acetato	2,1	43,2	947	N.A.	N.A.	22,1	N.A.
Cetonas							
1-hidroxi-2-Propanona	3,2	43,2	868	N.A.	N.A.	7,2	N.A.
2-Heptanona	6,8	43,2	806	0,9	N.A.	N.A.	N.A.
2-Nonanona	12,6	41,3 / 43,2	874	0,4	N.A.	N.A.	2,5
2-Pentanona	2,8	43,2	928	N.A.	N.A.	21,9	N.A.
2-Undecanona	18,4	41,3 / 43,2 / 71,2	827	N.A.	3,0	N.A.	N.A.
2,6-bis(1,1-dimetil-etil)-2,5-Ciclohexadiena-1,4-diona	22,8	41,3 / 43,3 / 67,2	668	0,1	N.A.	N.A.	N.A.
6-metil-2-Heptanona	8,5	41,3 / 43,2	854	N.A.	N.A.	N.A.	37,9
Acetoína	3,7	45,2	852	N.A.	439,5	N.A.	N.A.
Metil Isobutil Cetone	3,5	41,3 / 43,2 / 58,2	916	N.A.	N.A.	N.A.	417,9
Pirazinas							
2,6-dimetil-pirazina	7,5	42,2 / 43,3 / 108,2	780	N.A.	2,2	N.A.	N.A.
Sulfidos							
Dimetil-Pentasulfido	16,2	45,2 / 48,2 / 79,1	715	N.A.	N.A.	0,4	N.A.
Metil tiolacetato	2,9	43,2	872	N.A.	N.A.	23,1	N.A.
S-Metil propanoate	4,6	45,2 / 57,2	926	25,8	N.A.	N.A.	N.A.
Terpenos							
1,2,3-trimetil-Benzeno	9,0	45,2/48,2/79,1/105,2/126	758	N.A.	N.A.	4,5	N.A.
α -Pino	8,0	41,3 / 93,2	918	4,2	N.A.	N.A.	18,7
trans- β -Ocimeno	8,0	41,3 / 93,2	930	N.A.	8,0	4,6	N.A.

Abreviaturas: TR: Tiempo de Retención; UA: Unidades Arbitrarias. N.A. No aplica.

Los VOCs identificados en la cepa *Neorhizobium galegae* CRRU16 fueron el 3-Decyn-2-ol, el 3,5-bis(1,1-dimetil-etil)-fenol, el ciclobarbitol, el 5,8-dietil-dodecano, el 6-metil-octadecano, la isobutilamina, la 2-heptanona, la 2-nonanona y la 2,6-bis(1,1-

dimetiletil)-2,5-ciclohexadien-1,4-diona. En la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 fueron identificados el 1-butanol, el 2-metil-2-undecanol, el 2-nonen-1-ol, el 2,3-dimetil-cis-oxirano, el 2,2,4,6,6-pentametil-heptano, el epóxido de trans-Z- α -bisaboleno, la 2-undecanona, la acetoína, el 2,6-dimetil-pirazina y el trans- β -ocimeno. Los VOCs identificados en la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 fueron el 1-butanol, el 2,4-di-tert-butilfenol, el 3-metil-1-butanol, el 2,2,4,6,6-pentametil-heptano, el 5,8-dietil-dodecano, el ácido 2-metil-butanoico, el acetato de etilo, la 1-hidroxi-2-propanona, la 2-pentanona, el dimetil-pentasulfuro, el tiolacetato de metilo, el 1-deceno, el 1,2,3-trimetil-benceno y el trans- β -ocimeno. Finalmente, en la cepa *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57, fueron el 2-butil-1-Octanol, el 2,4-Di-tert-butilfenol, el 2-metil-decano, el 3,5-dimethyl-octano, la 2-nonanona, 6-metil-2-heptanona, la metil isobutil cetona y el α -Pineno.

Todos estos compuestos volátiles fueron descritos en la bibliografía por poseer actividad antifúngica, ya sea porque fueron aislados y testados contra hongos o porque formaban parte de un volatilo microbiano que, en su conjunto, tenía actividad antifúngica. Así, algunos de los compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento de los hongos por sí solos fueron la 2-heptanona, producida por bacterias como la cepa *Bacillus subtilis* DZSY21, que consiguió una inhibición del 80% del crecimiento del micelio del hongo *Curvularia lunata* (Xie *et al.*, 2020); la 2-nonanona inhibió el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* y del hongo *Monilinia fructicola* (Calvo *et al.*, 2020); la isobutilamina mostró tener actividad antifúngica contra los hongos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum audouini* y *Trichophyton rubrum* (Cronk *et al.*, 1959); la actividad del 1-butanol frente al hongo *Botrytis cinerea* fue evaluada, obteniéndose una inhibición del 100% del crecimiento del hongo (Wang *et al.*, 2022a); el 3-metil-1-butanol también fue descrito como un inhibidor del crecimiento y germinación de las esporas del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Kong *et al.*, 2020); el 2,4-di-tert-butilfenol fue efectivo contra los hongos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium chrysogenum* (Ramírez *et al.*, 2022; Varsha *et al.*, 2015); y el α -pineno contra los hongos *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, y *Verticillium dahliae* (Achimón *et al.*, 2021).

El volatilo de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* ha sido estudiado en diferentes investigaciones. Algunos de los VOCs identificados en el volatilo de estas cepas también fueron identificados en el volatilo de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, como son el 1-butanol, la 2-undecanona, la acetoína o la 2,3-dimetilpiracina; mientras que otros, como son el 2-metil-ácido butanoico, la 6-metil-2-heptanona, la 2-heptanona, la 2-nonanona y el 3-metil-1-butanol fueron identificados en otras cepas del género *Bacillus* pero no en la evaluada en esta tesis (Calvo *et al.*, 2020; Gutiérrez Santa Ana *et al.*, 2020).

El volatilo de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* también fue caracterizado. Algunos de los VOCs identificados en el volatilo de estas cepas también fueron identificados en el volatilo de la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 como el 3-metil-1-butanol o el metil tioacetato, mientras que otros como la 2-nonanona y la 2-

undecanona fueron identificados en otras cepas del género *Pseudomonas* pero no en la evaluada en esta tesis (Naz *et al.*, 2022).

Hasta la fecha, esta es la primera vez que se evalúa la composición del volatilo de alguna cepa perteneciente a los géneros *Neorhizobium* e *Inquilinus*. El volatilo de cepas de géneros cercanos como el género *Rhizobium* sí ha sido evaluado, mostrándose que estaba compuesto por VOCs como el α -pineno, identificado también en el volatilo de la cepa *Neorhizobium galegae* CRRU16 (Ayuso-Calles *et al.*, 2023).

7.6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA EN LA PLANTA.

Los ensayos *in vivo* mostraron que la actividad antifúngica era más potente en los ensayos mediados por compuestos volátiles. Además, el estudio del volatilo identificó varios compuestos volátiles que ya han sido descritos en la bibliografía por su actividad antifúngica. Sin embargo, los VOCs también pueden estar involucrados en el desarrollo de la resistencia sistémica de la planta (Constantin *et al.*, 2019). Esta resistencia es activada normalmente tras la colonización endofítica de las raíces y prepara el sistema inmunológico de la planta para resistir futuros ataques de patógenos. Los endófitos pueden desencadenar la resistencia sistémica inducida (ISR) a través de las fitohormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), lo que resulta en una respuesta inmune más rápida y fuerte después del ataque de patógenos (Timothy y Adejumo, 2021). Además, los endófitos también pueden estimular la respuesta sistémica adquirida (SAR), dependiente del ácido salicílico (Vallad y Goodman, 2004). En este apartado vamos a evaluar si el efecto antifúngico derivado del volatilo observado *in planta* induce algún tipo de respuesta de resistencia en la planta mediante el análisis de la expresión de cinco genes reporteros: el gen inhibidor de la proteinasa 1 (*pi-1*), el factor de respuesta de etileno *pti4*, el receptor del etileno (*etr4*), el gen relacionado con la patogenicidad 1a (*pr1a*) y el gen de la fenilalanina amoníaco-liasa (*pal*).

7.6.1. Gen relacionado con la patogenicidad 1a (*pr1a*).

El análisis de la expresión del gen *pr1a* mostró que la expresión no variaba en las plantas expuestas al volatilo de la cepa *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57, mientras que en las plantas expuestas al volatilo de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 hubo una infraexpresión significativa (Figura 68).

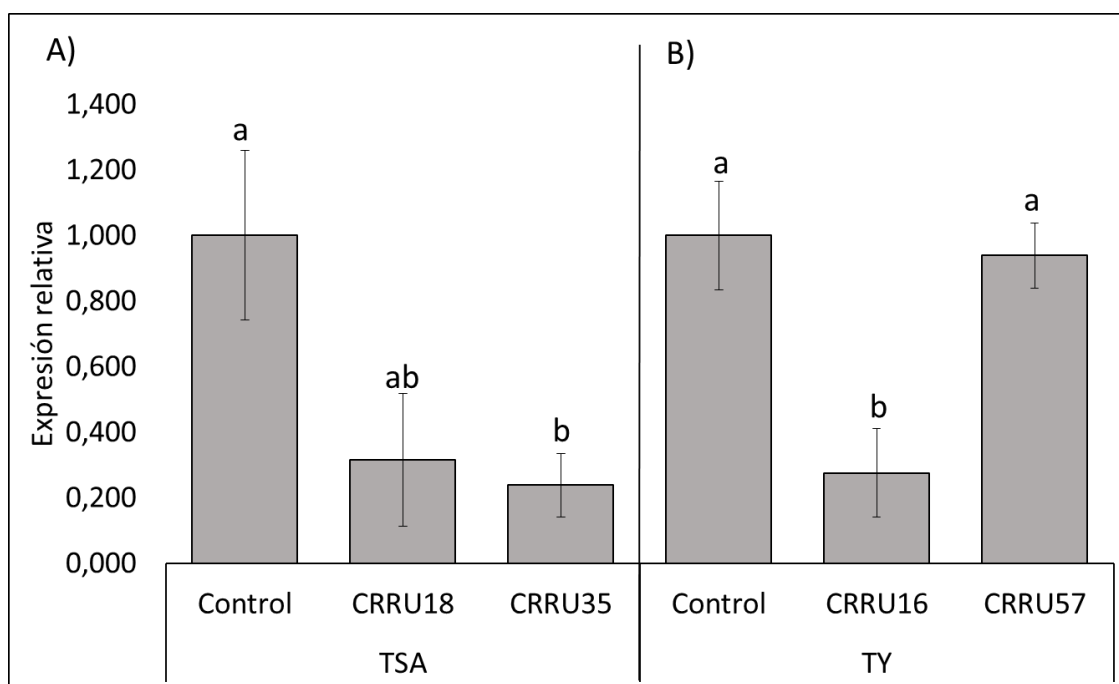


Figura 68. Análisis de la expresión relativa del gen relacionado con la patogenicidad 1a (*pr1a*) en plantas de tomate expuestas a A) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35; B) *Neorhizobium galegae* CRRU16 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57. Las letras diferentes indican diferencias significativas.

La activación de los sistemas de defensa en las plantas da lugar a la acumulación de las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR). Estas proteínas desempeñan un papel clave en la defensa de las plantas, ya que pueden reducir el daño y la mortalidad causados por los patógenos. Pueden inhibir el crecimiento o la germinación de las esporas, ya sea porque tienen acción antimicrobiana, hidrolasa o porque actúan como inhibidores de las proteinasas (dos Santos y Franco, 2023). Las proteínas PR han sido clasificadas según su actividad biológica en 19 familias. En esta tesis hemos estudiado la acumulación de la PR1, la cual tiene un rol antifúngico en plantas como el tabaco o el tomate (Islam *et al.*, 2023).

El efecto del volatiloma bacteriano en este gen también ha sido estudiado y se ha visto que, los compuestos volátiles como el 2,3-butanediol producido por la cepa *Bacillus subtilis* SYST2, induce la expresión del gen *pr1a*, responsable de la producción de las proteínas PR1 (Poulaki y Tjamos, 2023). Sin embargo, en otros estudios similares, la expresión del gen *pr1a* en plantas del género *Arabidopsis* no aumentaba al ser expuestas al volatiloma de bacterias productoras de acetoína, pertenecientes al género *Bacillus* (Ryu *et al.*, 2004).

En este sentido, las bacterias evaluadas en esta tesis tampoco parecieron aumentar la expresión de este gen en las plantas de tomate. No solo eso, sino que, el volatiloma de las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 redujeron significativamente la expresión del gen *pr1a*. Este efecto no es inusual, pues para establecer la colonización, las bacterias han de

evadir el sistema de defensa de las plantas, por lo que la reducción en la expresión de los genes de defensa es un mecanismo habitual (Santoyo, 2022).

7.6.2. Inhibidor de la proteinasa 1 (*pi-I*).

El análisis de la expresión del gen *pi-I* mostró que la expresión en las plantas inoculadas con las cuatro bacterias disminuía significativamente en comparación con las plantas control (Figura 69).

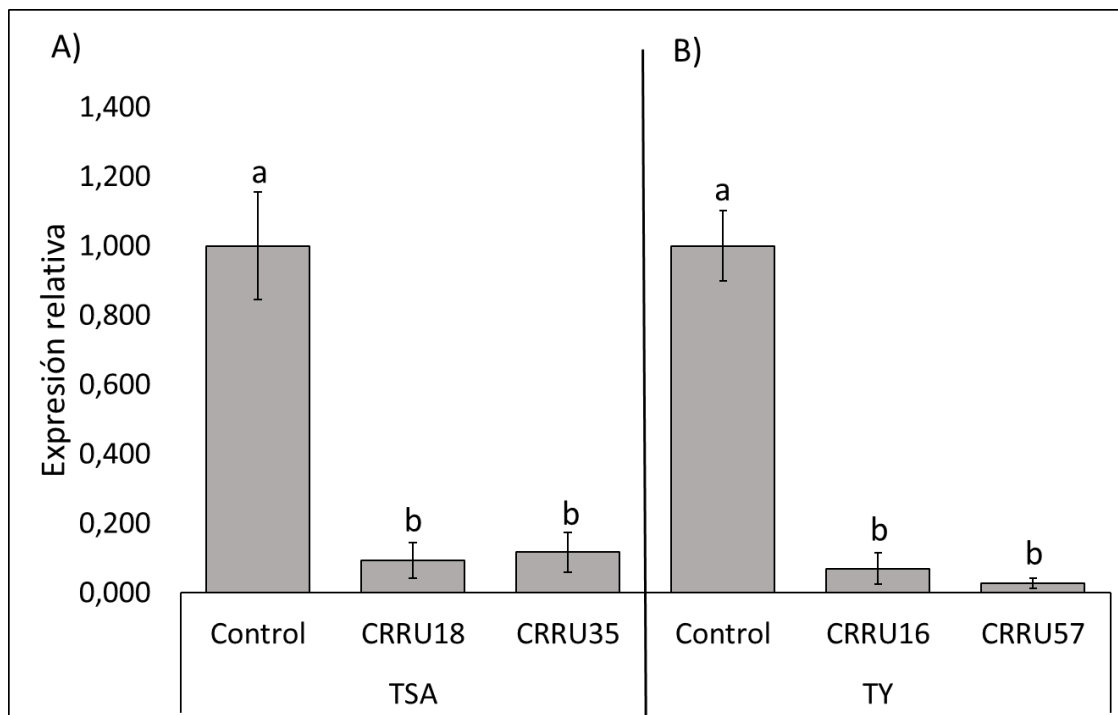


Figura 69. Niveles de la expresión relativa del inhibidor del gen de la proteinasa (*pi-I*) en las plantas de tomate expuestas a A) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35; B) *Neorhizobium galegae* CRRU16 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57. Las letras diferentes indican diferencias significativas.

Las proteínas inhibidoras de las proteinasas (PIs) son otro tipo de proteína PR de las plantas, cuyo mecanismo de acción consiste en neutralizar las proteasas de los fitopatógenos (dos Santos y Franco, 2023). La activación de estos genes suele estar inducida por la síntesis de JA, la cual es una molécula de señalización central en las respuestas inducidas contra herbívoros (Heil y Bostock, 2002). Sin embargo, se han dado ejemplos en las que el volatilo de las bacterias no patógenas inducen la expresión de los genes de las PI, indicando que estas bacterias pueden activar la defensa de las plantas vía la señalización del JA. Así, por ejemplo, la inoculación de plantas de tomate con la bacteria *Pseudomonas* sp. 23S ha mostrado aumentar la expresión del gen *pi-II*, que codifica para el inhibidor de la proteinasa II (Takishita *et al.*, 2018). Del mismo modo, los compuestos volátiles producidos por la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a activaron la expresión del gen de las proteínas inhibidoras de las proteinasas en plantas de pimiento (Choi *et al.*, 2014). Sin embargo, el volatilo de las especies estudiadas en esta tesis redujo significativamente la expresión de este gen.

7.6.3. Factor de respuesta de etileno (*pti4*).

El análisis de la expresión del gen *pti4* mostró que la expresión en las plantas inoculadas con las cuatro bacterias disminuía significativamente en comparación con las plantas control (Figura 70).

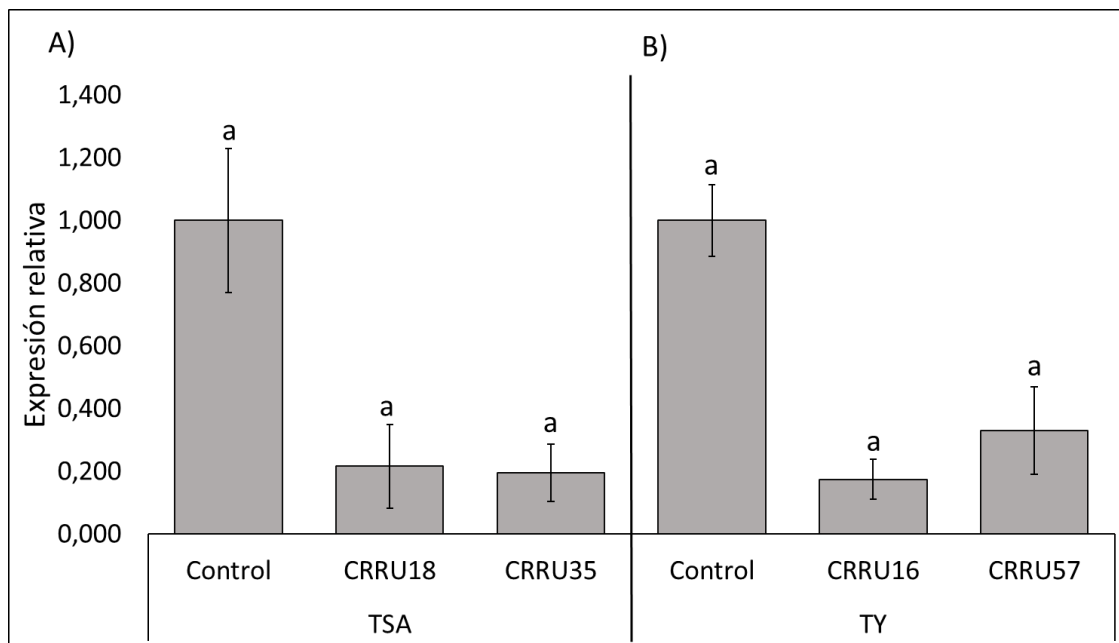


Figura 70. Niveles de la expresión relativa del gen inhibidor de la proteinasa del gen factor de respuesta de etileno (*pti4*) en plantas de tomate expuestas a A) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35; B) *Neorhizobium galegae* CRRU16 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57. Las letras diferentes indican diferencias significativas.

Los factores de respuesta al etileno son una familia de proteínas moduladas por las rutas de señalización del ácido salicílico (SA), del jasmonato (JA) y del etileno y que regulan la expresión de diversos genes relacionadas con la defensa de las plantas (Sun *et al.*, 2022). En concreto, el *pti4* fue estudiado en las plantas de tomate por estar involucrado en la resistencia a las enfermedades, ya que su expresión inducía la activación de multitud de PRs que a su vez estaban involucrados en la síntesis ácido salicílico (Gu *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2018). La exposición de las plantas al volatiloma de varias bacterias no patógenas demostró aumentar la expresión de los genes de los factores de respuesta al etileno. Por ejemplo, en las plantas de tabaco, la expresión aumentó tras la exposición al volatiloma de la cepa de *Bacillus subtilis* SYST2, debido a la producción de compuestos volátiles como el albuterol y el 1,3-propanediol (Gao *et al.*, 2022; Tahir *et al.*, 2017). En el caso de plantas como las del género *Arabidopsis*, la expresión de este tipo de genes aumentó tras la exposición al volatiloma de las bacterias *Serratia plymuthica* y *Stenotrophomonas maltophilia*, y más en concreto al 2,3-butanediol y a la acetoína producidas por la cepa *Bacillus subtilis* GB03 (Kwon *et al.*, 2010; Wenke *et al.*, 2012)

Aunque en esta tesis también fue evaluada una especie del género *Bacillus*, el cual parecía tener efecto en la reducción de la infección por *Botrytis cinerea* en plantas mediadas por compuestos volátiles y que además fue productora del compuesto volátil

acetoina, ni la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 ni el resto de las cepas evaluadas mostraron aumentar la expresión de los factores de respuesta al etileno.

7.6.4. Gen del receptor de etileno (*etr4*).

El análisis de la expresión del gen *etr4* mostró que la expresión no varió con respecto a las plantas control tras la exposición al volatiloma de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, pero aumentó en las plantas expuestas al volatiloma de la cepa *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57, sugiriendo que esta última puede estar relacionada con la activación de la síntesis del etileno (Figura 71).

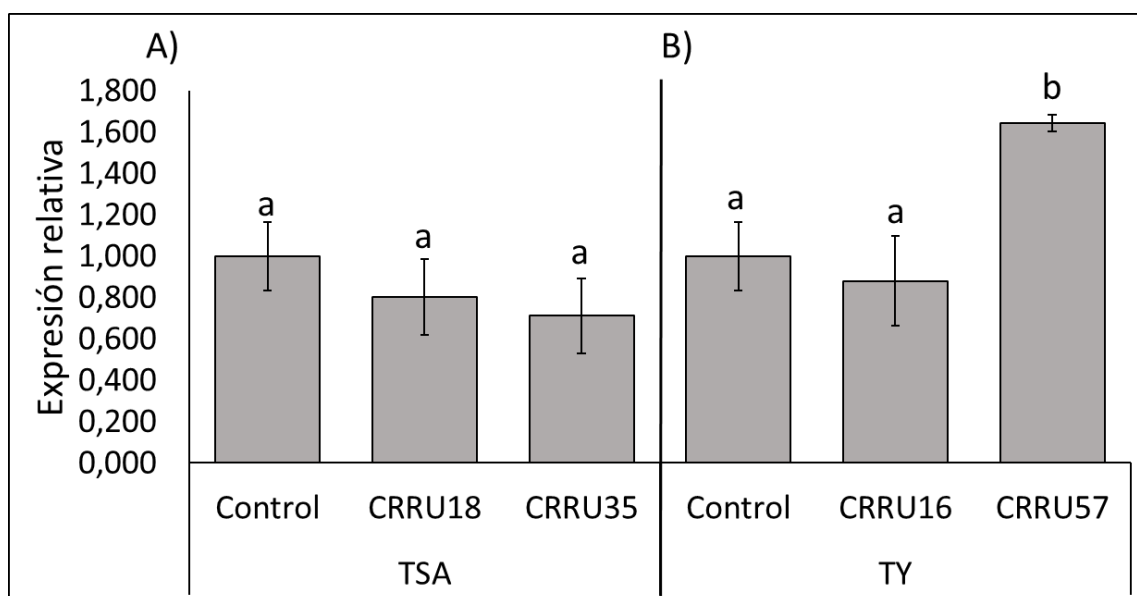


Figura 71. Niveles de expresión del inhibidor de la proteinasa del gen del receptor de etileno (*etr4*) en plantas de tomate expuestas a A) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35; B) *Neorhizobium galegae* CRRU16 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57. Las letras diferentes indican diferencias significativas.

El etileno es una hormona vegetal relacionada con diversos procesos, entre ellos, la defensa de la planta. Una vez producido, el etileno actúa como una molécula de señalización uniéndose a los receptores (ETR), lo cual induce la activación en la planta de diversos genes de defensa (Nguyen *et al.*, 2023). Los altos niveles de ET pueden inducir la germinación de las semillas, la maduración de los frutos y luego la senescencia; por el contrario, niveles bajos de ET estimulan la expansión celular, promoviendo el desarrollo del cabello radicular y pueden participar en procesos de señalización que conducen a la activación de ISR (Elías *et al.*, 2018). De hecho, los estudios en la inactivación de estos receptores demostraron que los receptores actuaban como reguladores negativos de las respuestas al etileno. Este modelo predijo que cuantos menos receptores hay, mayor es la sensibilidad al etileno, mientras que cuantos más receptores haya, menor es la sensibilidad (Klee y Tieman, 2002). En este sentido, la infraexpresión que observamos en los experimentos de esta tesis debido a la exposición de las plantas al volatiloma de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens*

CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 podría indicar un aumento de la sensibilidad de la planta al etileno, permitiendo una respuesta de defensa más temprana a los estreses bióticos.

7.6.5. Fenilalanina amoníaco-liasa (*pal*).

El análisis de la expresión del gen *pal* mostró que la expresión disminuyó tras la exposición al volatilo de las cepas *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilius ginsengisoli* CRRU57 con respecto a las plantas control, pero que aumentó en las plantas expuestas al volatilo de *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, sugiriendo que el efecto observado en los ensayos *in vivo* podría estar relacionado con la activación de la síntesis del ácido salicílico (Figura 72).

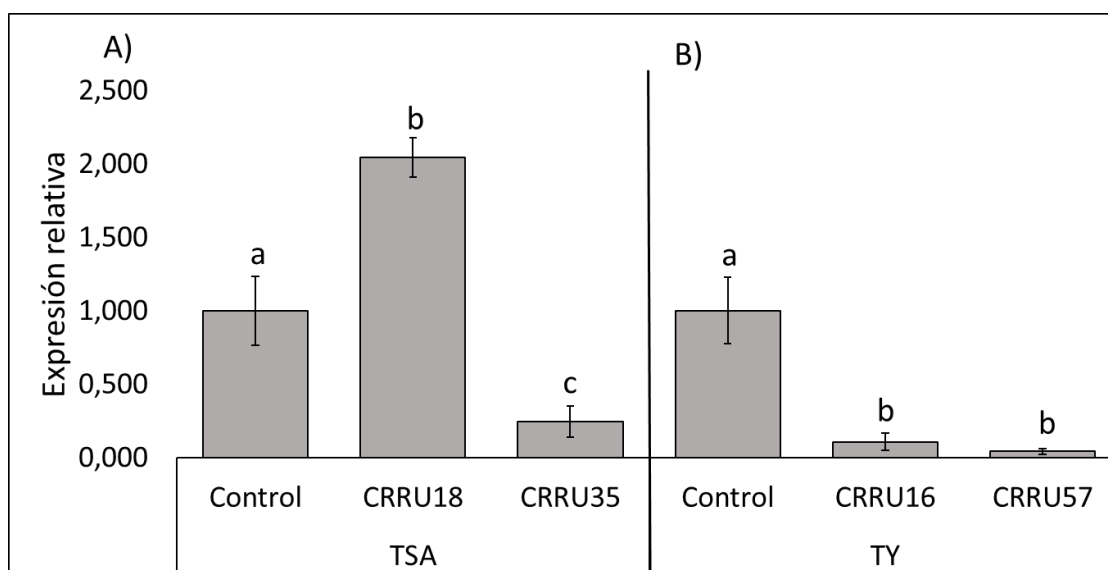


Figura 72. Niveles de la expresión relativa del gen de la enzima fenilalanina amoníaco-liasa (*pal*) en plantas de tomate expuestas a A) *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 y *Pseudomonas silesiensis* CRRU35; B) *Neorhizobium galegae* CRRU16 e *Inquilius ginsengisoli* CRRU57. Las letras diferentes indican diferencias significativas.

La enzima fenilalanina amoníaco-liasa (PAL), es una de las enzimas principales en la ruta de biosíntesis del ácido salicílico (Wang *et al.*, 2021c). Las PAL pueden catalizar la desaminación de la L-fenilalanina para formar ácido transcinámico, que es un precursor de la lignina, del SA, de los flavonoides, de las fitoalexinas y de las fenolamidas bioactivas. Por lo tanto, contribuye tanto a la defensa física como a la defensa química de las plantas (You *et al.*, 2020). La exposición de las plantas al volatilo de las bacterias no patógenas ha demostrado aumentar la expresión de este gen. Esto ha sido visto en plantas de tabaco ante la exposición al compuesto albuterol y al 1,3-propanediol producidos por la cepa *Bacillus subtilis* SYST2 o en las plantas de *Agrostis soionifera* tras la exposición al butanediol producido por rizobacterias (Jiang *et al.*, 2018; Tahir *et al.*, 2017).

La poca expresión de los genes reporteros de la biosíntesis del JA, el ET y el SA parece indicar que la actividad antifúngica observada durante el capítulo era derivada de

una actividad directa de los propios compuestos volátiles sobre los hongos. Esto ya ha sido descrito en otros estudios donde, a pesar de ver una reducción de la incidencia de la infección de los patógenos sobre la planta, no había un aumento de la expresión de los genes reporteros (Ahmad *et al.*, 2020). Además, algunos de los compuestos volátiles identificados en el volatiloма han sido estudiados por su capacidad de inhibir la actividad patogénica de algunos hongos. El 2-metil-ácido butanoico, componente mayoritario del volatiloма de la cepa *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, ha sido descrito por inhibir la esporulación del hongo *Magnaporthe oryzae* a concentraciones mínimas de 500 mM y el crecimiento de su micelio a una concentración de 250 mM; también produjeron alteraciones morfológicas en las esporas del hongo *Alternaria alternata*; e inhibieron el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* (Grahovac *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2023; Surovy *et al.*, 2023). Este VOC ha sido descrito multitud de veces como un componente del volatiloма de cepas del género *Bacillus* aunque de forma esporádica también ha aparecido como un componente de los volatiloomas de especies del género *Pseudomonas* (Wang *et al.*, 2022b).

El volatiloма de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 podría estar implicado en la inducción de la síntesis del ácido salicílico. El volatiloма de esta bacteria está compuesto por algunos VOCs como la acetoína, que induce la activación de las rutas de señalización hormonal (SA, ET y/o JA) provocando la ISR de la planta contra los patógenos; la 2-undecanona, que ha sido estudiado por inducir el ISR en las plantas de tomate frente a la infección por *Meloidogyne incognita*; o la 2,6-dimetil-pyrazina que ha sido relacionada con el aumento de la expresión del gen *pal* en plantas de chili (Ayaz *et al.*, 2021; Kashyap *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022b). Del mismo modo, en el volatiloма de la cepa *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 estuvo compuesto por compuestos volátiles como la 2-nonanona, que activa la resistencia sistémica de las plantas de tomate; o el α -pineno que ha sido estudiado por inducir la SAR y la acumulación de ácido salicílico (H. Gao *et al.*, 2021; Riu *et al.*, 2022).

A pesar de esto, varios artículos concuerdan en que la inducción de la resistencia sistémica de las plantas mediada únicamente por la producción de VOCs no es un mecanismo común entre las bacterias rizosféricas y, por lo tanto, tampoco de las endosféricas (Frag *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2016; Ryu *et al.*, 2004). En este sentido, parece que los compuestos volátiles bacterianos actúan como señales multifactoriales, secuenciales o simultáneas tanto en el patógeno como en los huéspedes y contribuyen de manera directa e indirecta a las propiedades antifúngicas reportadas por las bacterias (Bailly y Weisskopf, 2017).

**8. CAPÍTULO V:
INOCULACIÓN DE PLANTAS DE
ZARZAMORA CON LAS
BACTERIAS SELECCIONADAS Y
ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA MEJORA NUTRACÉUTICA
DE LOS FRUTOS.**

Hasta ahora, las cepas seleccionadas han mostrado ser capaces de promover el crecimiento vegetal en las plantas de tomate y de actuar como agentes para el biocontrol del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Sin embargo, las aplicaciones de estas bacterias podrían ir más allá. Por eso, en este último capítulo fue evaluada la posibilidad de usar dos de las cepas seleccionadas para mejorar la producción de los cultivos de *Rubus ulmifolius* Schott tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo. En ambos experimentos, las plantas alcanzaron la fase de producción y los frutos fueron evaluados tanto en términos cualitativos como cuantitativos.

8.1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE MORAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO

El uso de bacterias en la agricultura ha cobrado gran importancia debido a su relación con la mejora del rendimiento de los cultivos (Nosheen *et al.*, 2021). En este sentido, las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65, fueron seleccionadas para este ensayo ya que presentaron los mejores resultados en la promoción del crecimiento vegetal en el Capítulo III.

Durante el ensayo en invernadero se tomaron datos del contenido en clorofila y, al finalizar el ensayo, la producción total de las plantas fue recogida y evaluamos el contenido en compuestos fenólicos. Además, con los frutos obtenidos analizamos si la inoculación bacteriana influía en las características nutraceuticas de las moras. Para ello, realizamos un ensayo con el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, para evaluar si la exposición del nemátodo a los extractos de mora, inoculadas con las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65, variaban en el animal la tolerancia al estrés oxidativo y la expresión génica de genes relacionados.

8.1.1. Mejora de la producción en términos cuantitativos.

Durante el ensayo de producción en condiciones de invernadero evaluamos el contenido en clorofila, que fue medido en tres ocasiones, entre la aparición de la primera hoja (t=0) y la aparición del primer fruto (t=28). Los resultados mostraron que el contenido en clorofila permaneció prácticamente constante durante el ensayo, descendiendo ligeramente en el momento antes de la producción de los frutos. Este efecto ha sido previamente estudiado, en plantas como el mango, la fresa o el pistacho, donde en el momento de la producción se producen alteraciones en el contenido de diferentes compuestos, entre ellos la clorofila (Pandey y Tyagi, 1999; Schaffer *et al.*, 1986; Vemmos, 1994) (Figura 73.A.). La inoculación no pareció alterar el contenido en clorofila, indicando que el tratamiento con las bacterias seleccionadas no produce un impacto significativo en la capacidad fotosintética de las plantas.

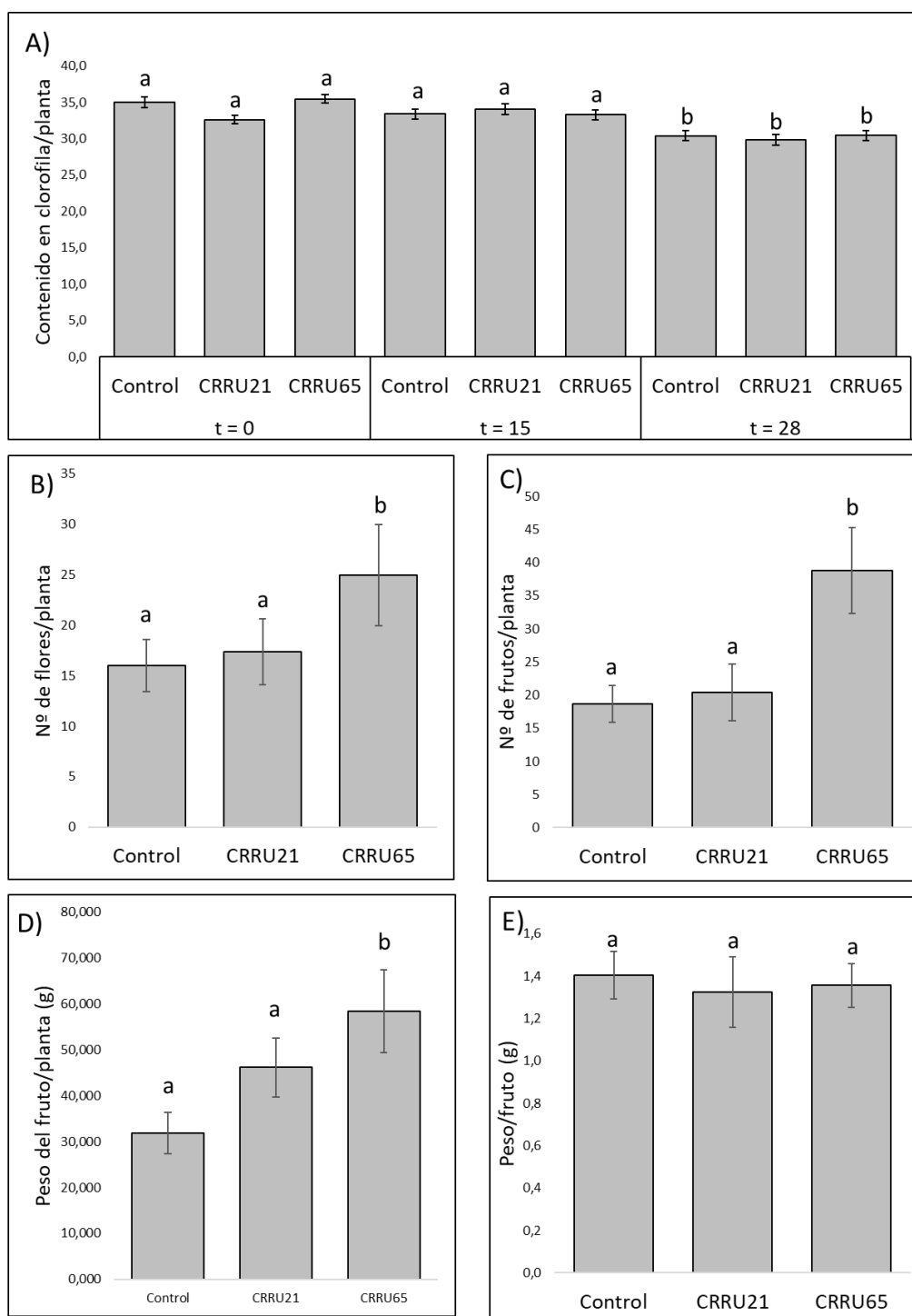


Figura 73. A) Contenido de clorofila por tratamiento por tiempo medido. B) Número promedio de flores por planta por tratamiento. C) Número promedio de frutos por planta por tratamiento. D) Peso promedio de fruto por tratamiento por tratamiento. E) Peso promedio de fruto por tratamiento. Las letras a–b indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos según lo determinado por el análisis de Tukey.

Con respecto a los parámetros de producción, se midieron el número de flores por planta, el número de frutos por planta y el peso de los frutos. Con respecto a la floración, esta aumentó significativamente un 155,9% en aquellas plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (Figura 73.B.). Este incremento floral incidió en la

producción de frutos, ya que aumentó significativamente en un 207,7% en aquellas plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (Figura 73.C., 73.D. y 73.E.). El peso de los frutos se mantuvo constante con respecto a las moras recogidas de las plantas control sin inocular. Por otro lado, en las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, ninguno de los parámetros evaluados mostró diferencias significativas con respecto a las plantas control (Figura 73.B., 73.C., 73.D. y 73.E.).

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* han sido estudiadas por mejorar la producción de los cultivos de otras especies vegetales. Por ejemplo, en cultivos de edamame, la aplicación de cepas del género *Rhizobium* incrementó la floración de las plantas. En los árboles de mango, la inoculación con la cepa *Rhizobium* sp. XXV aumentó el número de flores y, por consiguiente, el número de frutos, y en las plantas de tomates inoculadas con las cepas *Rhizobium calliandrae* LBP2-1, *Rhizobium mayense* NSJP1-1 y *Rhizobium jaguaris* SJP1- 2 aumentó tanto el número como el tamaño de los frutos (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Gen-Jiménez *et al.*, 2023; Lestari *et al.*, 2021). Todos estos efectos fueron vinculados con un aumento de la producción de fitohormonas, de entre las que destacó la síntesis de ácido indol acético, una hormona relacionada con la floración (Fahde *et al.*, 2023). Del mismo modo, la inoculación de bacterias capaces de solubilizar los compuestos de fosfatos del suelo ha mostrado ser capaz de incrementar el número de flores por planta y, a su vez, el número de frutos en las plantas de tomate (Haile *et al.*, 2023). En los ensayos *in vitro* llevados a cabo en el Capítulo III, la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 demostró capacidad para solubilizar tanto el fosfato bicálcico como el fosfato tricálcico, y de producir auxinas, en especial IAA. Por lo tanto, el aumento de la producción de frutos de mora observado tras la aplicación de la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 podría estar relacionado con estas dos actividades.

8.1.2. Análisis del contenido en compuestos fenólicos de los frutos de zarzamora obtenidos en condiciones de invernadero.

El análisis de los extractos obtenidos a partir de las moras recogidas de las plantas de zarzamora del ensayo en condiciones de invernadero permitió la detección de un total de 5 ácidos fenólicos, 18 flavonoides y 2 compuestos desconocidos que no pudieron ser identificados ni por su masa ni por su perfil de fragmentación iónica (Tabla 62). En todas las muestras, los compuestos más abundantes del grupo de los ácidos fenólicos fueron el ácido elágico y el pentósido del ácido elágico, mientras que los compuestos más abundantes del grupo de los flavonoides fueron la sanguina H6, su isómero y la cianidina-3-o-glucósido (Figura 74).

Tabla 62. Contenido en compuestos fenólicos (g/kg) de las plantas de zarzamora (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero. Valores expresados como media \pm error estándar. Las letras situadas a la derecha del error estándar representan las diferencias estadísticamente significativas, en base a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tipo de compuesto	Rt	m/z	ms2	Compuesto	Control	CRRU21	CRRU65
Ácidos fenólicos	10,78	353	169	Ácido cafeoilquinico (ácido clorogénico)	0,182 \pm 0,020a	0,234 \pm 0,021a	0,213 \pm 0,028a
	40,07	301	301	Ácido elágico	5,186 \pm 0,452a	4,232 \pm 0,062a	6,511 \pm 0,338a
	37,96	433	301	Pentósido del ácido elágico	5,484 \pm 0,612a	4,214 \pm 0,425a	6,047 \pm 0,308a
	15,92	198	163	Desconocido	2,548 \pm 0,096a	1,876 \pm 0,211a	3,196 \pm 0,174a
	6,75	198	163	Desconocido	0,398 \pm 0,076a	0,303 \pm 0,015a	0,521 \pm 0,013a
Flavonoides	22,01	346	327	Acetilhexósido de kaempferol	0,441 \pm 0,0772a	0,658 \pm 0,029b	0,766 \pm 0,0324c
	43,41	505	301	Acetilhexósido de quercetina	0,497 \pm 0,046a	0,521 \pm 0,020a	0,474 \pm 0,050a
	26,68	449	287	Cianidina-3-o-glucósido	41,337 \pm 3,684b	51,198 \pm 2,488c	46,115 \pm 2,422b
	28,9	419	287	Cianidina-3-o-pentósido	4,127 \pm 0,460a	3,867 \pm 0,185a	3,659 \pm 0,180a
	38,5	535	287	Cianidina-3-O-malonilglucósido	0,579 \pm 0,011a	0,466 \pm 0,018a	0,462 \pm 0,036a
	32,82	433	271	Cianidina-3-o-pentósido	0,218 \pm 0,043a	0,128 \pm 0,011a	0,156 \pm 0,027a
	19,69	585	465/301	Derivado del pentósido de quercetina	2,433 \pm 0,168a	2,571 \pm 0,086a	3,138 \pm 0,275a
	24,84	280	289	Epicatequina	11,122 \pm 0,771a	8,745 \pm 0,710a	9,000 \pm 0,845a
	26,04	449	287	Hexósido de eriodictiol	0,398 \pm 0,076a	0,303 \pm 0,015a	0,521 \pm 0,130a
	40,3	463	301	Hexósido de quercetina	0,791 \pm 0,069a	0,856 \pm 0,025a	0,765 \pm 0,106a
	41,07	463	191/161	Hexósido de quercetina	0,478 \pm 0,044a	0,460 \pm 0,051a	0,442 \pm 0,038a
	39,7	609	301	Rutina	0,335 \pm 0,012a	0,256 \pm 0,017a	0,275 \pm 0,030a
	39,4	593	287	Rutinósido de kaempferol	0,256 \pm 0,032a	0,227 \pm 0,039a	0,300 \pm 0,032a
	36,91	419	287	Pelargonidina-3-O-glucósido	1,755 \pm 0,161a	1,874 \pm 0,095a	1,839 \pm 0,337a
	26,29	477	301	Quercetina-3-O-glucurónido	0,309 \pm 0,118a	0,205 \pm 0,051a	0,256 \pm 0,049a
21,21	577	425/407/289	Dímero de procianidina tipo B	3,014 \pm 0,182a	2,153 \pm 0,391a	2,910 \pm 0,384a	
Taninos	18,53	331	169	Glucogalina	10,043 \pm 1,215b	4,782 \pm 0,377a	4,628 \pm 0,433a
	35,05	934	631/469/301	Isómero de la sanguina H6	383,954 \pm 16,112b	338,068 \pm 13,126a	441,678 \pm 20,469d
	17,61	937	465/301	Trigaloil HHDP glucosa	20,516 \pm 0,494ab	18,036 \pm 1,654a	24,120 \pm 2,420b
	32,7	934	631/469/301	Sanguina H6	180,960 \pm 7,071a	171,033 \pm 7,721b	215,279 \pm 17,677c
Total Ácidos fenólicos					13,798 \pm 1,256	10,859 \pm 0,734	16,488 \pm 0,861
Total Flavonoides					68,09 \pm 5,836	74,488 \pm 4,231	69,078 \pm 5,261
Total Taninos					597,139 \pm 24,992	531,919 \pm 22,878	685,705 \pm 40,999
Total Compuestos fenólicos					679,027 \pm 32,084	617,266 \pm 27,843	771,271 \pm 47,121

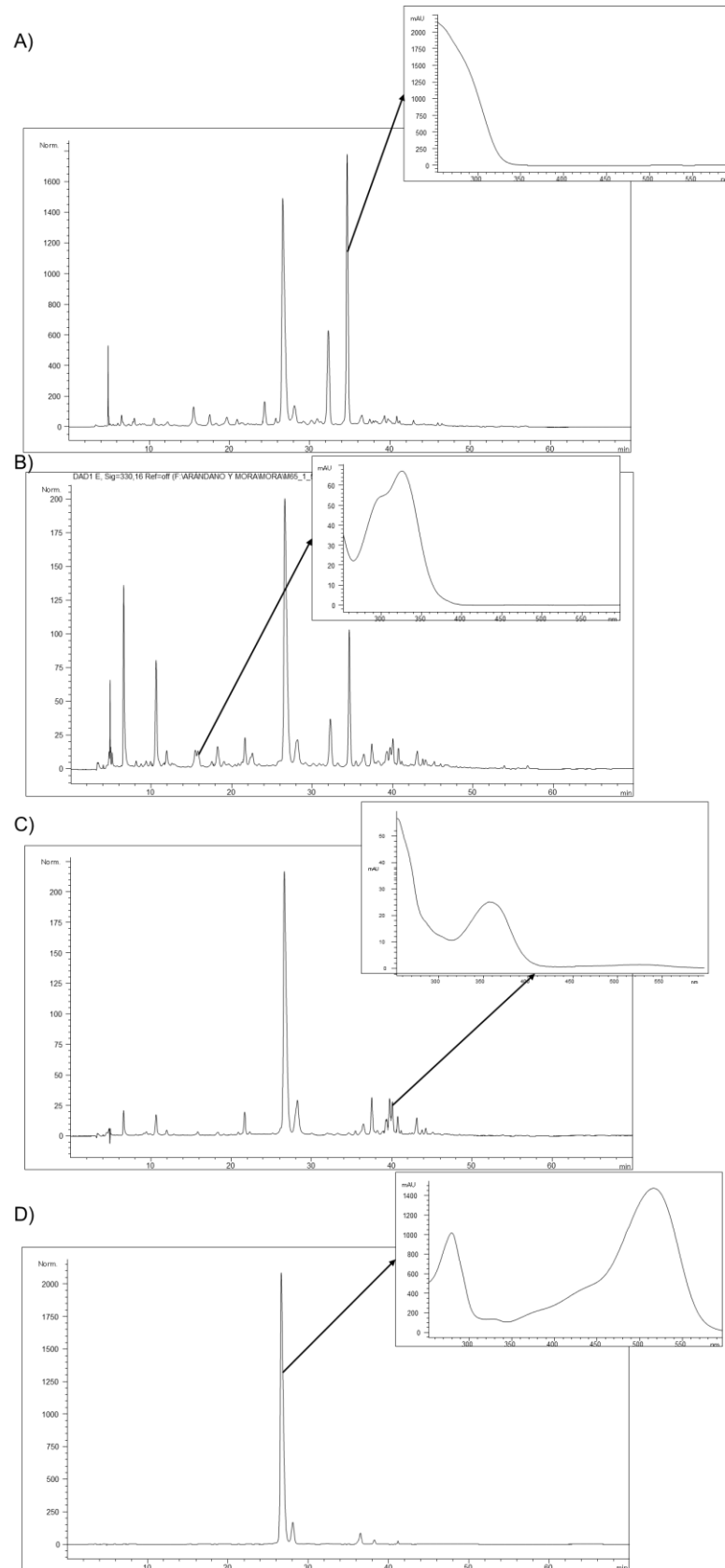


Figura 74. Cromatogramas de los compuestos fenólicos. A) Cromatograma del isómero de la sanguina H6 (280 nm). B) Cromatograma del ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico) (330 nm). C) Cromatograma del hexósido de quercetina (360 nm). D) Cromatograma de la cianidina-3-*o*-glucósido (520 nm).

Las moras, como la mayoría de los frutos rojos, son una gran fuente de compuestos fenólicos. Aunque la composición y concentración de estos compuestos puede variar dependiendo de multitud de factores como la especie vegetal, la localización, el cultivar o el tiempo de la cosecha, en general, en las moras los compuestos fenólicos más abundantes son los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos (Bhuyan y Dutta, 2021; Meng *et al.*, 2022a). Dentro de los ácidos fenólicos, el ácido elágico es detectado en las moras con asiduidad (Vuolo *et al.*, 2019). La concentración de este ácido varía mucho entre las especies y los cultivares de las plantas de zarzamora, oscilando entre los 30,0 y los 54,8 mg/100 g peso fresco (PF) (Komorsky-Lovrić y Novak, 2011). En concentraciones menores, también se han detectado otros ácidos fenólicos en las moras, como el ácido gálico (3,4–6,4 mg/100 g PF), el ácido cafeico (1,38–3,64 mg/100 g PF), el ácido p-cumárico (0,40–2,08 mg/100 g PF) y el ácido ferúlico (2,99–3,51 mg/100 g PF) (Djurić *et al.*, 2014). En los extractos de mora analizados en este ensayo, la composición de ácidos fenólicos fue reducida, oscilando entre el 6 y el 7% de todos los compuestos fenólicos identificados. De estos, el ácido elágico fue el más abundante, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía, aunque el contenido fue algo superior al reportado (Komorsky-Lovrić y Novak, 2011). Otro de los ácidos fenólicos detectados en las moras, aunque de forma minoritaria, fue el ácido cafeoilquínico (ácido clorogénico). Este compuesto fenólico también es detectado con frecuencia en la composición de otros frutos rojos como la grosella (Cosme *et al.*, 2022). Sin embargo, ni el ácido gálico, ni el ácido cafeico ni el ácido p-cumárico fueron detectados. Con respecto a los ácidos fenólicos de las moras, la inoculación de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 no pareció alterar su composición.

Los flavonoides son uno de los compuestos fenólicos detectados con mayor frecuencia en las moras. Entre ellos, destacan los compuestos (+)-catequina y (-)-epicatequina, que son producidos durante la maduración de las frutas (Robinson *et al.*, 2020). Las concentraciones en moras de la catequina y la epicatequina oscilan entre los $378,7 \pm 24,5$ $\mu\text{g}/100$ g y los $448,4 \pm 7,5$ $\mu\text{g}/100$ g de materia seca, respectivamente (Schulz *et al.*, 2019). En la composición de las moras estudiadas en esta tesis, la epicatequina fue el segundo compuesto flavonoide más abundante. Además, la inoculación de las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 no pareció alterar su concentración. Otros de los flavonoides importantes en la composición de las moras son las antocianinas, responsables del color azul oscuro de las moras (Liu *et al.*, 2021b). La cianidina-3-O-glucosido es la antocianina principal en las moras (Robinson *et al.*, 2020), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis (Tabla 62). Normalmente, la composición de antocianinas oscila entre los 70,3 y los 201 mg/100 g de PF. Aproximadamente, 100 g de mora contienen 170 mg de antocianinas (Williamson, 2017). En este caso, la cianidina-3-o-glucósido fue el compuesto principal del total de compuestos flavonoides, correspondiéndose con un 67,8 – 71,0% del total. Además, en este caso la inoculación con las bacterias mostró diferencias significativas en su concentración. La concentración de la cianidina-3-o-glucósido aumentó en un 123,9% en las moras recogidas de las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes*

CRRU21 y en un 111,6% en las moras recogidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65. A parte de estos compuestos mayoritarios, también fueron detectadas diferencias significativas en la concentración de un compuesto flavonoide minoritario, el acetilhexósido de kaempferol. Este compuesto también ha sido identificado como parte de la composición de los frutos de otras especies del género *Rubus*, siendo un componente minoritario en especies como *Rubus glaucus* y *Rubus alpinus*, aunque en otras especies como *Rubus alutaceus* la abundancia es algo mayor (Moreno-Medina *et al.*, 2023).

Por último, los taninos son el grupo de compuestos fenólicos más abundante en las moras de este estudio, ya que el porcentaje casi alcanza el 90% del total de compuestos fenólicos identificados. Los taninos se clasifican como hidrolizables o PACs (proantocianidinas). Los elagitaninos, un ejemplo de taninos hidrolizables, son compuestos en los que el ácido gálico está unido al ácido hexahidroxidifénico (HHDp) y se clasifican en las formas monoméricas (derivados del ácido elágico), las oligoméricas (Sanguina H-6) y las poliméricas de elagitaninos. Estos compuestos han sido identificados en multitud de frutos como las frambuesas, las fresas, los arándanos y las moras (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021). En las moras, los elagitaninos son principalmente una mezcla de sanguina H-6/lambertianina A y lambertianina C. El contenido total de los elagitaninos suele oscilar entre los 23 y los 343 mg por cada 100 g de PF, por lo que son relativamente abundantes en comparación con otras frutas (Robinson *et al.*, 2020). La sanguina H6 por sí sola es uno de los taninos más reportados en la composición de la mora aunque su concentración es variable, ya que oscila entre el 1 y los 294 mg/100 g de PF (Liao *et al.*, 2020). En este sentido, la sanguina H6 y un isómero de la misma fueron los compuestos más abundantes identificados en las moras de esta tesis, no sólo entre los taninos, sino entre todos los compuestos fenólicos, ya que juntos comprendieron entre el 57,8 y el 60,3% del total. Además, la inoculación pareció modificar significativamente la concentración de la sanguina H6 y de su isómero. Por un lado, las moras recogidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostraron un descenso de la concentración de ambos compuestos, la sanguina H6 a un 94,5% y el isómero de la sanguina H6 a un 88,0%. Mientras que, las moras recogidas de las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 mostraron un aumento de la concentración de ambos compuestos, la sanguina H6 a un 119,0% y el isómero de la sanguina H6 a un 115,0%.

Todos estos compuestos identificados en las moras son responsables de las propiedades nutraceuticas asociadas al consumo de este tipo de fruto. Los compuestos fenólicos contribuyen al gran poder antioxidante de las moras, e incluso algunos estudios apuntan a que su consumo puede reducir el riesgo de obesidad, enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas y diversas formas de cáncer (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021). Por ejemplo, la ingesta de antocianinas ha sido asociada con una reducción de la resistencia a la insulina, un menor riesgo de infarto de miocardio y una moderación de la respuesta inflamatoria (Ruddock y Facey, 2024). Por otra parte, el consumo del ácido elágico puede reducir el riesgo de cáncer y mitigar la respuesta

inflamatoria en humanos (Larrosa *et al.*, 2010; Muñoz-Espín *et al.*, 2013). En este sentido, realizamos diferentes ensayos con el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* para evaluar si las diferencias observadas entre la concentración de los compuestos fenólicos de las moras recogidas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y las moras recogidas de las plantas control afectaban al potencial antioxidante de los frutos.

8.1.3. Ensayos con el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

El genoma del organismo modelo *Caenorhabditis elegans* comparte entre un 60 y un 80% de homología con el del ser humano y por ello este nemátodo ha sido empleado en el análisis de algunas enfermedades humanas (Markaki y Tavernarakis, 2020). Así, *Caenorhabditis elegans* ha sido empleado para estudiar los diferentes procesos metabólicos involucrados en el desarrollo de numerosas enfermedades como el Alzheimer, la diabetes o la obesidad (Yue *et al.*, 2021). Del mismo modo, también ha sido usado para estudiar diferentes rutas bioquímicas relacionadas con los procesos del envejecimiento y de la respuesta al estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2020b). El envejecimiento y el estrés oxidativo están intrínsecamente ligados a la acumulación de radicales libres (ROS) (Maldonado *et al.*, 2023). Los radicales libres son agrupaciones de átomos reactivos que contienen uno o más electrones desapareados producidos tanto por procesos metabólicos *in vivo*, como por estímulos externos, como la contaminación ambiental y la irradiación ultravioleta (UV) (Miranda-Vizuet y Veal, 2017). La producción y la toxicidad de los radicales libres aumentan con la edad y con los estímulos externos adversos.

Una forma de mantener los niveles de ROS a una concentración segura es mediante el consumo de compuestos antioxidantes, como los compuestos fenólicos presentes en las moras (Robinson *et al.*, 2020). En este sentido, el organismo *Caenorhabditis elegans* también sirve como modelo para estudiar cómo la ingesta de las distintas sustancias bioactivas naturales afecta a la producción de los ROS, y cómo esto impacta en la esperanza de vida de los nemátodos y en la salud general de los mismos (Ye *et al.*, 2020). Los ensayos realizados en este apartado nos permitieron determinar si las diferencias en composición observadas entre las diferentes moras obtenidas de los ensayos en invernadero poseían algún efecto antioxidante adicional con respecto a las moras sin inocular.

8.1.3.1. Análisis de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* bajo condiciones de estrés.

Para el análisis de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*, realizamos un estudio previo con el fin de determinar cuál era la concentración del extracto necesaria que debíamos utilizar. Según la teoría dosis-efecto, tanto una concentración demasiado baja como una excesivamente alta podría tener efectos adversos (Dilberger *et al.*, 2021). Esta es la primera vez que se usan los frutos de la planta de la zarzamora para realizar este tipo de ensayos. Sin embargo, los frutos de otras especies del género *Rubus* y otros

frutos rojos sí han sido evaluados. En la bibliografía consultada los ensayos eran realizados con diferentes concentraciones de extractos desde 6 µg/mL hasta 200 mg/mL (Jayarathne *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2018), siendo 50 – 400 µg/mL las concentraciones más comunes en este tipo de frutos (Li *et al.*, 2022). En base a estos estudios, se seleccionaron las concentraciones 100 y 200 µg/mL para realizar unos ensayos previos y determinar cuál debería ser la concentración de los extractos para realizar los ensayos posteriores. Tras obtener los resultados, determinamos que la concentración adecuada de trabajo sería de 200 µg/mL.

Los datos fueron tomados en el día 2 de la etapa adulta del organismo *Caenorhabditis elegans*, tras 6 y 8 horas de exposición al estrés térmico, y en el día 9 de la etapa adulta, también tras 6 y 8 horas de exposición al estrés térmico. En términos generales, salvo en el día 2 a las 6 horas, hubo diferencias significativas entre los controles sin mora y los tratamientos de nemátodos expuestos a las moras obtenidas de las plantas control sin inocular, lo que indica que, la mora ya de por sí, tiene la capacidad de reducir el estrés oxidativo en estos organismos. Esta es la primera vez que se describe este efecto por la exposición a extractos de mora, aunque un efecto similar ha sido descrito tras la exposición de *Caenorhabditis elegans* a extractos de otras bayas como los arándanos, las frambuesas o las grosellas (Li *et al.*, 2022).

El resto de los resultados mostraron que, en el día 2 de la etapa adulta, tras 6 horas de exposición al estrés térmico, la tasa de supervivencia de los nemátodos aumentaba de un 89,4%, en el ensayo sin extractos de mora, a un 95,7% en el ensayo con moras obtenidas de las plantas control sin inocular. Además, los ensayos realizados con los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con las cepas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 mostraron diferencias significativas con respecto a los ensayos realizados como control sin extractos de mora, en los que se incrementó la tasa de supervivencia de los nemátodos del 89,4% al 97,9% (Figura 75.A.).

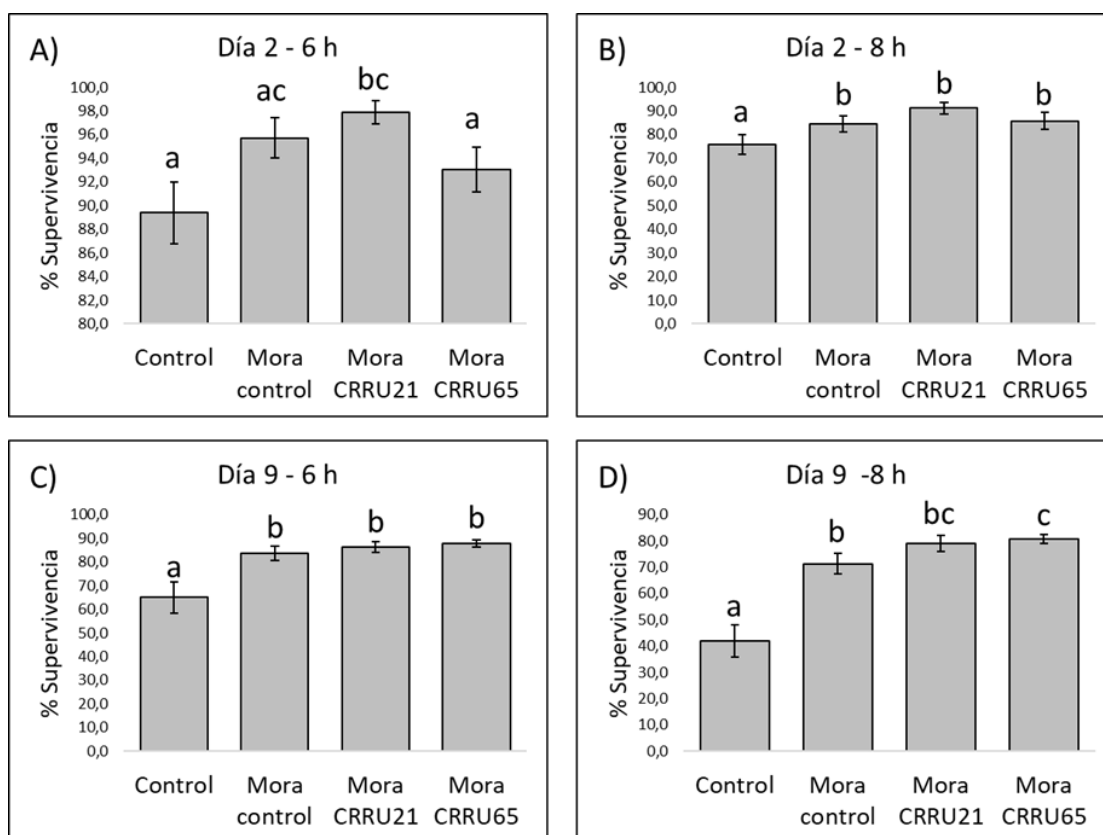


Figura 75. Porcentaje de supervivencia en: A) Día 2 de la etapa adulta tras 6 horas de exposición al estrés térmico; B) Día 2 de la etapa adulta tras 8 horas de exposición al estrés térmico; C) Día 9 de la etapa adulta tras 6 horas de exposición al estrés térmico; D) Día 9 de la etapa adulta tras 8 horas de exposición al estrés térmico. Las letras a–b indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos según lo determinado por el análisis de Tukey.

En el día 2 de la etapa adulta, tras 8 horas de estrés térmico, y en el día 9 de la etapa adulta tras 6 horas de estrés térmico, los resultados fueron similares. Las diferencias significativas fueron dadas entre el ensayo realizado sin los extractos de la mora y los ensayos realizados con los extractos de las moras obtenidas de las plantas control sin inocular, de las plantas inoculadas con la bacteria *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Sin embargo, las tasas de supervivencia obtenidas en los tres ensayos realizados con los extractos de moras no mostraron diferencias significativas entre ellas (Figura 75.B. y 75.C.).

Finalmente, en el día 9 de la etapa adulta, tras 8 horas de estrés térmico, los resultados mostraron que la exposición de los nemátodos a los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 incrementaba significativamente la tasa de supervivencia de los nemátodos en comparación con el ensayo realizado sin extractos de mora y con el ensayo realizado con los extractos de las moras obtenidas de las plantas control sin inocular. En estos casos, la tasa de supervivencia aumentó del 41,8%, observado en los ensayos sin extractos de mora, y del 71,4% observado en los ensayos realizados con extractos de mora obtenidas de las plantas control, al 80,7%. Por el contrario, los nemátodos expuestos a los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes*

CRRU21 sólo mostraron diferencias significativas frente al ensayo realizado sin los extractos de mora (Figura 75.D.).

Los frutos rojos, categoría en la que se encuentran las moras, contienen abundantes ingredientes bioactivos que exhiben una amplia gama de actividades que promueven la salud, incluidas actividades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras (Li *et al.*, 2022). Muchas de las investigaciones vinculan estas actividades con la presencia de compuestos fenólicos en su composición. La exposición de *Caenorhabditis elegans* a extractos de este tipo de frutos ha demostrado tener efecto en la esperanza de vida del nemátodo. Por ejemplo, algunos trabajos informan de que la exposición a extractos de arándanos (*Vaccinium vitis-idaea*) aumenta su vida media en un 128,6 – 135,7% dependiendo de la dosis, mientras que la exposición a extractos de frambuesa (*Rubus idaeus*) aumenta la esperanza de vida entre un 113,6 y un 129,7% (Scerbak *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2020a).

No solo se ha observado el aumento en la esperanza de vida, sino que la exposición de los nemátodos a los extractos de este tipo de frutos influye también en la resistencia a las situaciones de estrés. La temperatura es una de las condiciones ambientales críticas en la vida de *Caenorhabditis elegans* y la alteración térmica puede influir sobremano en la esperanza de vida del nemátodo. En este sentido, la temperatura óptima para el correcto desarrollo del nemátodo oscila entre los 15 y 25 °C (Wilson *et al.*, 2006) y el aumento de la temperatura ambiental hasta los 30 – 35 °C incrementa el daño oxidativo en el organismo, lo cual es inducido por la acumulación de las ROS (Ayuda-Durán *et al.*, 2019a). Algunos ensayos realizados sobre la tolerancia al estrés térmico mostraron que la exposición de los nemátodos a los extractos de arándanos en concentraciones de 50, 100 y 200 mg/mL aumentaba las tasas de supervivencia de los nemátodos en un 28,0 %, 40,0 % y 56,0 % respectivamente, en comparación con el grupo de control (Wang *et al.*, 2018).

En esta tesis se estudia por primera vez la tolerancia al estrés térmico del organismo *Caenorhabditis elegans* relacionada con la exposición a los extractos de la mora. Sin embargo, un estudio similar ha sido realizado con los extractos de la frambuesa. En este, la exposición de *Caenorhabditis elegans* a los extractos de frambuesa (*Rubus idaeus*) en concentraciones de entre 20 y 80 mg/mL aumentaba la tolerancia al estrés térmico entre un 114,5 y un 137,2% (Song *et al.*, 2020a). Debido a las diferencias en la metodología, los ensayos realizados con los extractos de frambuesa y los realizados en esta tesis no son comparables. En el estudio de Song *et al.*, los nemátodos estuvieron en contacto con los extractos de frambuesa durante 5 días para luego ser sometidos a una temperatura ambiente de 35 °C hasta que toda la población muriese, mientras que en esta tesis los nemátodos fueron expuestos a los extractos de mora desde el momento de su nacimiento y solamente fueron sometidos a los 35 °C durante 6 y 8 horas.

Los resultados obtenidos en el ensayo de supervivencia al estrés térmico podrían estar relacionados con las diferencias observadas en la concentración de los compuestos fenólicos de las moras obtenidas de las plantas sin inocular y de las plantas inoculadas con las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae*

CRRU65. Algunas de las diferencias observadas fueron en la concentración del kaempferol y en la de la cianidina-3-o-glucósido. En algunos estudios previos, la exposición del nemátodo *Caenorhabditis elegans* al compuesto fenólico kaempferol incrementó significativamente su esperanza de vida media, lo cual se relacionó con una reducción en la carga de las ROS mitocondriales en los nemátodos (Grünz *et al.*, 2012). Del mismo modo, la exposición de *Caenorhabditis elegans* al extracto de la col roja, el cual contiene altas cantidades de diferentes tipos de cianidinas, aumentó la tasa de supervivencia del nemátodo en un 31,64% cuando los individuos eran sometidos a temperaturas de 35°C durante 4 horas (Zhang *et al.*, 2021). Las antocianinas son las principales responsables del poder antioxidante asociado a las bayas y a los frutos rojos (Liu *et al.*, 2021b). Además, la mayoría de los beneficios para la salud asociados al consumo de las moras son debidos a la actividad biológica de las antocianinas (Jakobek y Seruga, 2012). Por lo tanto, los resultados observados en los ensayos de la tolerancia al estrés térmico podrían estar relacionados con el aumento de la concentración de la cianidina-3-o-glucósido en las moras obtenidas de las plantas inoculadas con las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65.

Los estudios apuntan a que el aumento de la longevidad y de la resistencia al estrés térmico reportados por la exposición de los nemátodos a los extractos formulados en base a los frutos rojos como la mora, podrían estar relacionados con la activación de diferentes rutas metabólicas en el organismo *Caenorhabditis elegans*. Muchas rutas han sido descritas por influir en la longevidad y en la salud de los nemátodos, entre las que destaca la ruta de señalización de la insulina (IIS).

8.1.3.2. Estudio de la ruta de la señalización de la insulina/IGF-1 (IIS)

Una de las rutas involucradas en la regulación del estrés oxidativo, y que además se encuentra altamente conservada en los mamíferos, es la ruta de la señalización de la insulina/IGF-1 (IIS) (Li *et al.*, 2022) (Figura 76). Esta ruta regula la entrada en el núcleo de los factores de transcripción DAF-16 (homólogo de FoxO en humanos), HSF-1 y SKN-1 (homólogo de Nrf en humanos) (Ayuda-Durán *et al.*, 2020). En el núcleo, estos factores de transcripción modifican la expresión de diferentes genes implicados en la mitigación del estrés oxidativo. Alguno de estos genes codifican para enzimas como las superóxido dismutasas, que convierten el anión superóxido en peróxido de hidrógeno; las catalasas que convierten el peróxido de hidrógeno en agua; o las glutatión S-transferasas, relacionadas con la desintoxicación de las formas endógenas de las ROS (Miranda-Vizuet y Veal, 2017; Tian *et al.*, 2019). Por otro lado, el factor de transcripción HSF-1 activa la expresión de los genes que codifican para chaperonas moleculares, como la proteína HSP-16 o la proteína HSP-70. Los miembros de esta familia de proteínas participan en la longevidad y la termotolerancia del organismo *Caenorhabditis elegans* (Ye *et al.*, 2020).

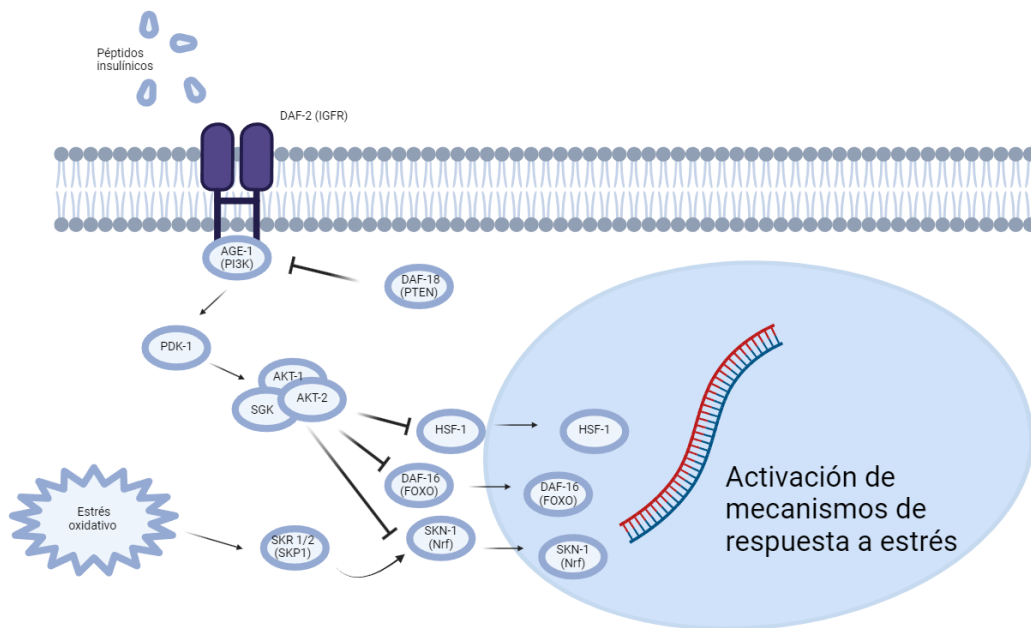


Figura 76. Ruta de señalización de la insulina (IIS) en *Caenorhabditis elegans*. La activación de IIS depende de una cascada de fosforilación que promueve el secuestro citoplasmático de los factores de transcripción DAF-16/FOXO, HSF-1 y SKN-1/Nrf.

En la ruta IIS, los péptidos similares a la insulina (ILP) se unen al receptor insulínico DAF-2, homólogo del receptor de insulina/IGF-1 (IGFR) de los humanos. La activación desencadena una cascada de fosforilaciones a través de diferentes serina/treonina quinasas (AGE-1/PI3K, PDK-1, AKT-1/2 y SGK-1), que eventualmente dan lugar a la fosforilación y el secuestro de los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1. Esta acción puede ser contrarrestada por la lípido fosfatasa DAF-18/PTEN, lo que reprime la cascada y permite la entrada de los factores de transcripción en el núcleo (Zhang *et al.*, 2020b).

En este apartado estudiamos la expresión de los genes de los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1 y de algunos de los genes que son activados tras su entrada en el núcleo, concretamente los genes de la enzima catalasa-1 (*ctl-1*), de la enzima glutatión S-transferasa-7 (*gst-7*) y de la proteína del choque térmico (*hsf-16*).

Los resultados mostraron que, en general, la expresión de los diferentes genes evaluados no presentaba variaciones significativas al comparar a los nemátodos del ensayo de las placas control sin los extractos de mora, con los nemátodos expuestos a los extractos de las moras recogidas de las plantas de zarzamora sin inocular. La única excepción fue en la expresión del gen de la catalasa 1, que mostró un aumento significativo de la expresión en los nemátodos expuestos a los extractos de las moras recogidas de las plantas de zarzamora sin inocular (Figura 77.E.). En términos generales, la expresión de estos genes no se vio alterada por la exposición de los nemátodos a ninguno de los extractos obtenidos a partir de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con las bacterias. Las diferencias significativas en la expresión de estos genes sólo se dieron en dos casos concretos.

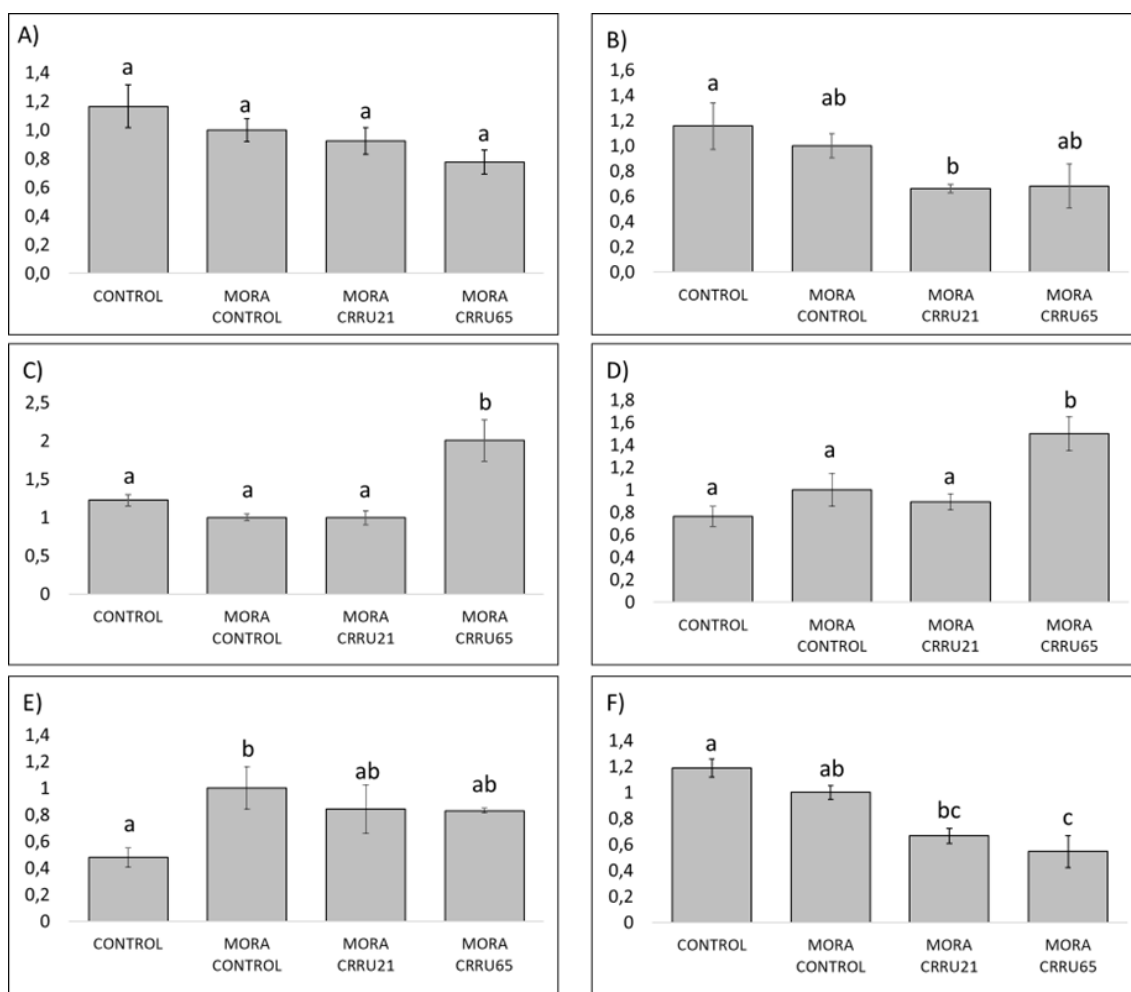


Figura 77. Análisis de la expresión relativa del gen A) *hsf-1*; B) *daf-16*; C) *skn-1*; D) *hsp-16*; E) *clt-1*; F) *gst-7* en los organismos *Caenorhabditis elegans* en las placas control, las placas suplementadas con las mora sin inocular (MORA CONTROL), las placas suplementadas con el extracto de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 (MORA CRRU21) y las placas suplementadas con el extracto de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (MORA CRRU65). Las letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Por un lado, la expresión de los genes *daf-16* y *gst-7* fue significativamente inferior en aquellos nemátodos que estuvieron expuestos a los extractos de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, en comparación con la expresión en los nemátodos que no estuvieron expuestos a ningún tipo de extracto de mora (Figuras 77.B. y 77.F.). Por otro lado, la expresión de los genes *skn-1* y *hsp-16* fue significativamente superior en aquellos nemátodos que estuvieron expuestos a los extractos de las moras recogidas de las plantas de zarzamora inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 en comparación con la expresión en los nemátodos de los otros ensayos. Por lo tanto, el aumento de la tasa de supervivencia bajo las condiciones de estrés térmico observado en el apartado anterior podría estar relacionado con el aumento de la expresión de estos dos genes (Figuras 77.C. y 77.D.).

Los resultados de los apartados anteriores mostraron que la inoculación de las plantas de zarzamora con las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 modificaban la concentración de los compuestos fenólicos de las moras y que, además, la exposición de los organismos modelo a estas moras aumentaba su tolerancia a las condiciones de estrés térmico. La exposición de este organismo a otros compuestos fenólicos como el ácido 3-O-cafeoilquínico ha mostrado tener un efecto similar, ya que aumentaba la supervivencia. Además, este efecto parecía estar relacionado con la activación de la ruta de la señalización de la insulina (Carranza *et al.*, 2020). De todas formas, resulta difícil relacionar el aumento de la supervivencia o el aumento de la expresión relativa de un gen a un único compuesto fenólico. La mayoría de los estudios realizaron los ensayos a partir de extractos de diferentes tipos de frutos, los cuales están compuestos por diferentes compuestos a diferentes concentraciones. Por lo tanto, el efecto observado tras la exposición de *Caenorhabditis elegans* a los extractos de los frutos suele relacionarse con la actividad del extracto en conjunto y no con la de un único compuesto (González-Paramás *et al.*, 2020).

En el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el factor de transcripción SKN-1 es un ortólogo de las proteínas Nrf de los mamíferos, las cuales inducen la respuesta de detoxificación de fase 2, defienden al organismo contra el estrés oxidativo y actúan en múltiples rutas relacionadas con la longevidad (Wang *et al.*, 2018). La exposición del organismo *Caenorhabditis elegans* a los extractos de frambuesas o de arándanos ha demostrado que aumenta la vida media y la resistencia al estrés por parte del nemátodo. A su vez, los efectos de estos frutos en los nemátodos han sido relacionados con un aumento de la expresión del gen *skn-1* (Song, *et al.*, 2020a, Zheng, *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2018).

Los genes *hsp* producen las proteínas llamadas *heat shock proteins* (HSPs) que son sintetizadas por las células en condiciones de estrés. En concreto, los genes *hsp-16* de *Caenorhabditis elegans* son inducidos por la acumulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hong *et al.*, 2004). La sobreexpresión de este gen también ha sido vinculada con la exposición de los nemátodos a diferentes extractos vegetales. Por ejemplo, la exposición del organismo a los extractos del fruto de la especie *Eugenia uniflora* L., el cual posee un alto contenido en antocianinas, mejoró la supervivencia, la tasa de reproducción y la esperanza de vida de *Caenorhabditis elegans*. Al analizar la expresión de los genes se encontró una sobreexpresión del gen *hsp-16*, entre otros (Tambara *et al.*, 2018). Del mismo modo, la combinación de la exposición a extractos de cáscara de manzana y a extractos de arándano incrementó la esperanza de vida de *Caenorhabditis elegans* y, tras analizar la expresión de algunos genes, se observó un aumento en el gen *hsp-16* (Song, *et al.*, 2020b, Wang, *et al.*, 2020). Por lo tanto, el aumento de la supervivencia de los nemátodos al estrés térmico observado en el apartado anterior, podría deberse al aumento de la expresión de los genes *skn-1* y *hsp-16*, la cual pudo ser inducida por la exposición del nemátodo a los extractos de las moras obtenidas de las plantas inoculadas con *Rhizobium laguerreae* CRRU65.

8.2. ENSAYO EN CAMPO.

Los ensayos previos han demostrado que la inoculación con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mejoraba significativamente la producción de moras en condiciones del invernadero. Sin embargo, este estudio precisa de una validación a nivel de campo para asegurar que el efecto observado es aplicable en condiciones reales. En el campo, las bacterias tienen que hacer frente a multitud de estreses bióticos o abióticos que no están presentes en los ensayos de laboratorio o de invernadero (Masmoudi *et al.*, 2023). Por ello, para determinar si la actividad observada en los ensayos anteriores sigue presente, se planteó un ensayo de campo en un cultivo de plantas de zarzamora de la especie *Rubus* sp. variedad *Cherokee*. La cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 fue la única que fue inoculada en los ensayos en campo debido a los resultados obtenidos en el ensayo en el invernadero.

Entre los consumidores, la popularidad de las moras no se debe sólo a su alto valor nutricional, sabor y aroma característicos, sino también a sus propiedades beneficiosas para la salud. Como ya hemos mencionado anteriormente, las moras son una fuente de vitaminas, minerales y otros compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos. En los últimos años se ha observado una tendencia creciente en la demanda de alimentos con alto contenido en compuestos fenólicos, principalmente debido a sus propiedades antioxidantes. Las moras son extremadamente ricas en estos compuestos bioactivos, los cuales contribuyen a su alto potencial antioxidante (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021).

8.2.1. Análisis del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de zarzamora en condiciones de campo.

En los extractos obtenidos a partir de las moras recogidas de las plantas de zarzamora del ensayo en condiciones de campo, se detectaron un total de 11 compuestos de flavonoides, 4 taninos y 4 compuestos desconocidos (Tabla 63). En las dos muestras, las moras obtenidas de las plantas control sin inocular y las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65, los compuestos más abundantes fueron la sanguina H6, su isómero y la cianidina-3-o-glucósido (Figura 78).

Tabla 63. Contenido en compuestos fenólicos (g/kg) de las plantas de zarzamora (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero. Valores expresados como media \pm error estándar. Las diferencias estadísticas se indican con * de acuerdo con el test de t-Student y un valor de $p < 0,05$.

Tipo de compuesto	Rt	m/z	ms2	Compuesto	Control	CRRU65
Flavonoides	27,46 5	449	287	Cianidina-3-o-glucósido	25,517 \pm 0,564	21,455 \pm 1,001*
	28,80 6	419	287	Cianidina-3-o-pentósido	1,964 \pm 0,038	1,469 \pm 0,067*
	39,79 3	535	287	Cianidina-3-O-malonilglucósido	0,672 \pm 0,024	0,500 \pm 0,041 *
	37,01 1	433	271	Cianidina-3-o-pentósido	1,197 \pm 0,051	0,974 \pm 0,068
	40,97 7	479	303	Glucorónido de quercetina	2,007 \pm 0,038	1,676 \pm 0,099
	40,24 3	465	303	Hexósido de quercetina	2,215 \pm 0,039	1,800 \pm 0,090 *
	43,21 3	287	-	Kaemferol	1,291 \pm 0,032	1,032 \pm 0,075
	37,75 8	593	287	Rutinósido de kaemferol	0,326 \pm 0,010	0,323 \pm 0,009
	39,57	593	287	Rutinósido de kaemferol	1,039 \pm 0,022	0,837 \pm 0,037*
	42,66 6	609	303	Rutinósido de quercetina	1,284 \pm 0,033	0,946 \pm 0,081 *
	38,60 9	419	287	Pelargonidina-3-O-glucósido	0,609 \pm 0,017	0,521 \pm 0,028
	43,91 4	303	-	Quercetina	0,479 \pm 0,023	0,376 \pm 0,028
	7,99	294	258/230/212	Desconocido	1,196 \pm 0,367	1,410 \pm 0,367
	15,99	537	487/325/307/227 /209/157	Desconocido	0,264 \pm 0,135	9,551 \pm 0,607
	30,09	423	331/313/219/163	Desconocido	0,940 \pm 0,018	0,715 \pm 0,032 *
20,01	577	425/407/289	Dímero de procianidina tipo B	0,957 \pm 0,029	1,265 \pm 0,173	
Taninos	34,94	934	631/469/301	Isómero de la sanguina H6	115,137 \pm 4,292	91,865 \pm 1,751
	12,47	803	303/277	Galoil-O-galoil-HHDP- α -d-glucosa	10,614 \pm 1,395	9,551 \pm 0,607
	32,73	934	631/469/301	Sanguina H6	110,834 \pm 14,397	137,527 \pm 5,281*
Total Flavonoides					40,157 \pm 1,44	44,841 \pm 2,762
Total Taninos					236,585 \pm 20,084	238,943 \pm 7,639
Total Compuestos fenólicos					276,742 \pm 21,524	283,784 \pm 10,401

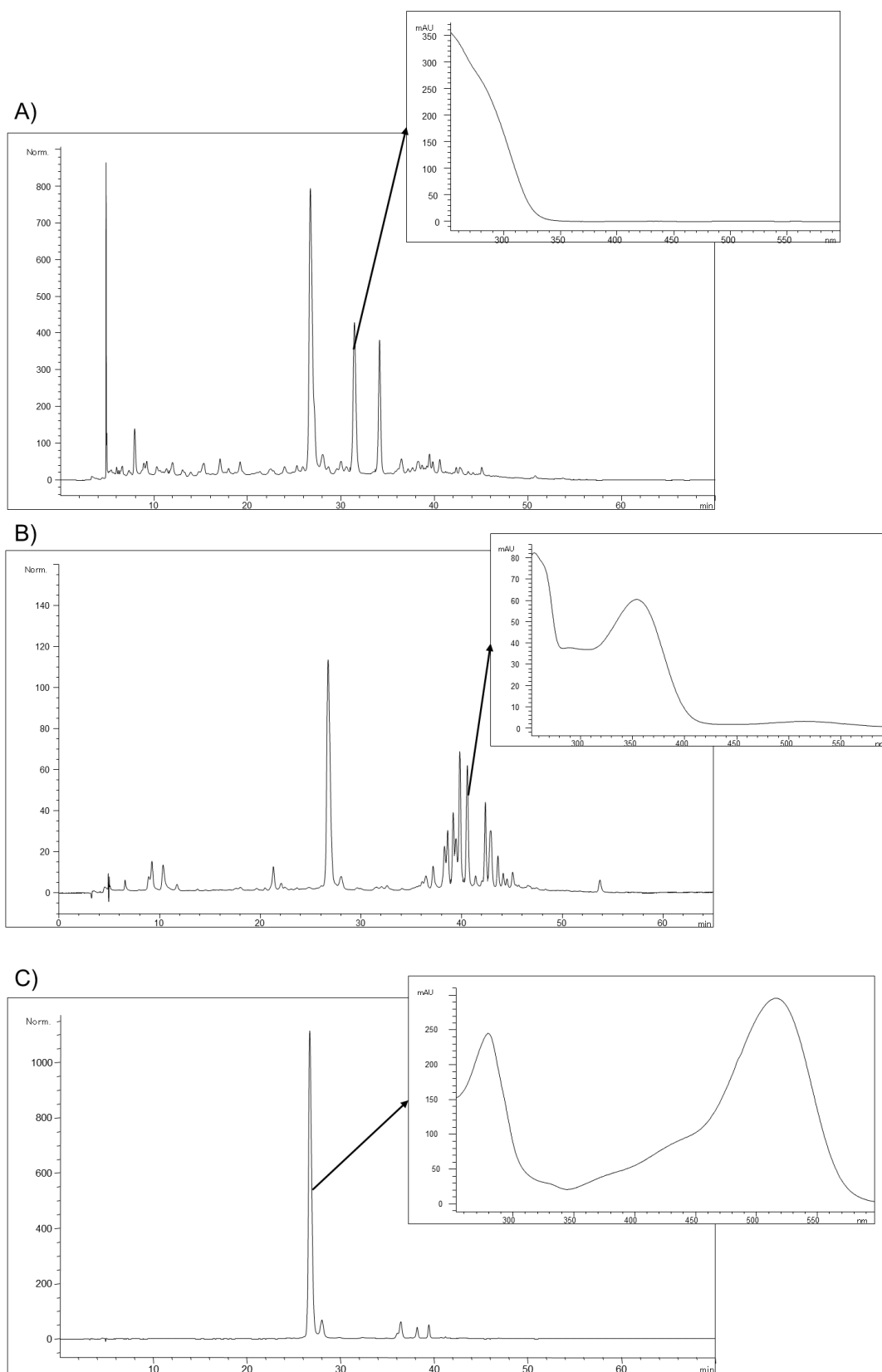


Figura 78. Cromatogramas de los compuestos fenólicos. A) Cromatograma de la sanguina H6 (280 nm). B) Cromatograma del hexósido de quercetina (360 nm). C) Cromatograma de la cianidina-3-o-glucósido (520 nm).

Las moras recogidas de los ensayos en campo presentaron una composición ligeramente diferente a la de las moras recogidas de los ensayos en invernadero, siendo la principal diferencia que en las moras recogidas del campo no se detectó ningún ácido fenólico. De todas formas, los compuestos mayoritarios fueron los mismos que los de las moras recogidas del ensayo en el invernadero, los cuales han sido descritos como los compuestos fenólicos principales de las moras (Liao *et al.*, 2020; Robinson *et al.*, 2020). No obstante, los resultados obtenidos de las moras recogidas de las plantas del ensayo en el invernadero y de las moras recogidas del ensayo en el campo no son comparables ya que la composición y la concentración de los compuestos fenólicos de las frutas dependen en gran medida de las condiciones ambientales, la especie vegetal o incluso la variedad (Bhuyan y Dutta, 2021; Meng *et al.*, 2022a).

La inoculación de la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 alteró la concentración de unos pocos compuestos fenólicos con respecto a las moras obtenidas de las plantas sin inocular. La concentración de la cianidina-3-o-glucósido, la cianidina-3-o-pentósido, la cianidina-3-O-malonilglucósido, el hexósido de quercetina, el rutinósido de kaemferol y el rutinósido de quercetina disminuyó significativamente en las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 en comparación con las moras obtenidas de las plantas control. La sanguina H6 fue el único compuesto que aumentó significativamente su concentración en las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 en comparación con las moras obtenidas de las plantas control sin inocular.

8.2.2. Mejora de la producción.

La calidad de la cosecha y del fruto es sumamente importante, tanto para el consumidor como para el agricultor. Además, es importante recordar que la fruta de alta calidad tiene un mayor valor de mercado (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021). Por ello, se han analizado diferentes parámetros en las moras recogidas del ensayo en el campo, con el fin de averiguar si la inoculación de la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 afectó a la calidad del cultivo y de las moras.

8.2.2.1. Parámetros de producción.

Los parámetros evaluados fueron la producción total, el número medio de frutos por planta, el peso medio de los frutos, el diámetro medio de los frutos y la altura media de los frutos. Todos estos parámetros fueron evaluados en cada uno de los cinco tiempos de recogida, salvo la producción total, que fue evaluada a tiempo final.

En primer lugar, se evaluó la producción acumulada total de cada uno de los tratamientos. Las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 aumentaron la producción de moras a un 248,8% (Figura 79).

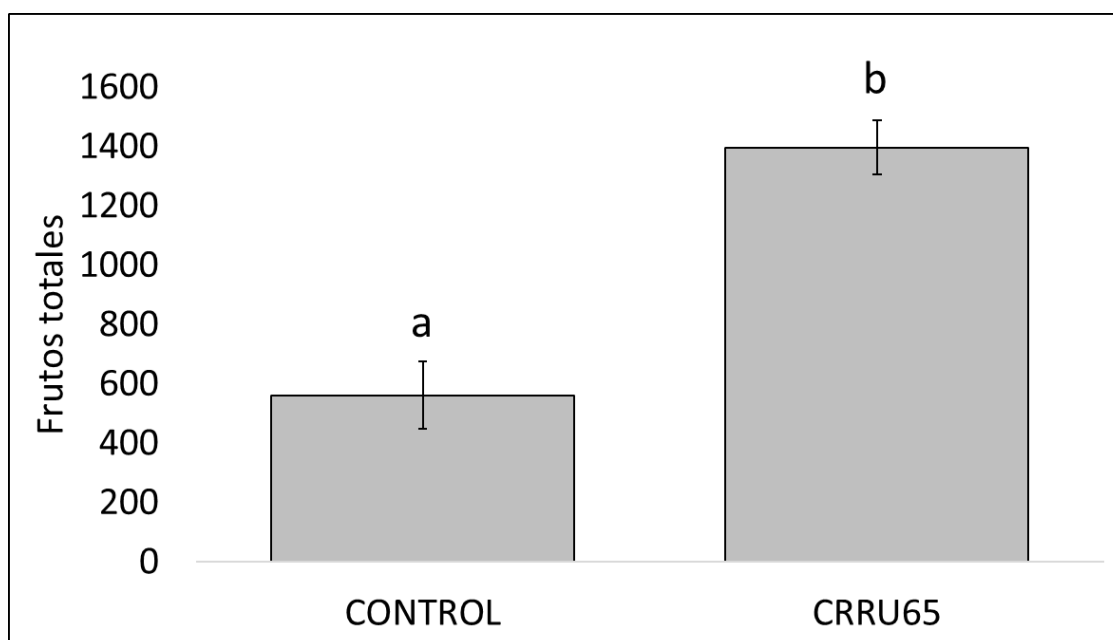


Figura 79. Resultados de la producción total de frutos recogida las plantas control sin inocular y el tratamiento de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Las letras diferentes indican diferencias significativas según el test de t-student ($p < 0,05$).

La inoculación con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostró un aumento significativo de la producción del número de los frutos. Este efecto ya fue observado en los ensayos realizados en el invernadero, donde la inoculación de las plantas de zarzamora con esta bacteria produjo un aumento del número de flores y, en consecuencia, del número de frutos. En este sentido, la bacteria pudo haber tenido el mismo efecto en las plantas del campo. El aumento de la producción vegetal debido a la aplicación de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* en condiciones de campo es un efecto que ya ha sido estudiado en otras especies vegetales. Por ejemplo, la inoculación de plantas de arándano, de zanahoria, de lechuga y de fresa con la bacteria *Rhizobium laguerreae* PEPV16 incrementó la producción en todos estos cultivos (Flores-Félix *et al.*, 2024).

Un análisis más exhaustivo de los parámetros de producción mostró que la producción en el número de frutos por planta siguió una distribución normal, tanto en el tratamiento control sin inocular como en las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Sin embargo, el número de frutos recogidos por planta fue superior en las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 (Figura 80.A.). Con respecto al peso de los frutos, fue significativamente superior en las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Además, cabe destacar que, en este tratamiento, el peso del fruto se mantuvo uniforme durante toda la cosecha, obteniéndose una media de 3,8 g por fruto. En cambio, el peso de los frutos recogidos de las plantas control sin inocular experimentó fluctuaciones a lo largo de la cosecha, variando de los 2,0 g a los 3,5 g (Figura 80.B.). En cuanto a las dimensiones del fruto de la mora, en general, tanto el diámetro como la altura fueron constantes en las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65,

mientras que las moras obtenidas de las plantas control experimentaron más fluctuaciones en el tamaño, sobre todo en el tiempo de recogida 4, donde se observó una disminución considerable de ambos parámetros. Con respecto a las diferencias entre los tratamientos, las más evidentes fueron observadas en el tiempo de recogida 4, aunque también hubo diferencias significativas en el tiempo de recogida 1 (Figuras 80.C. y 80.D.).

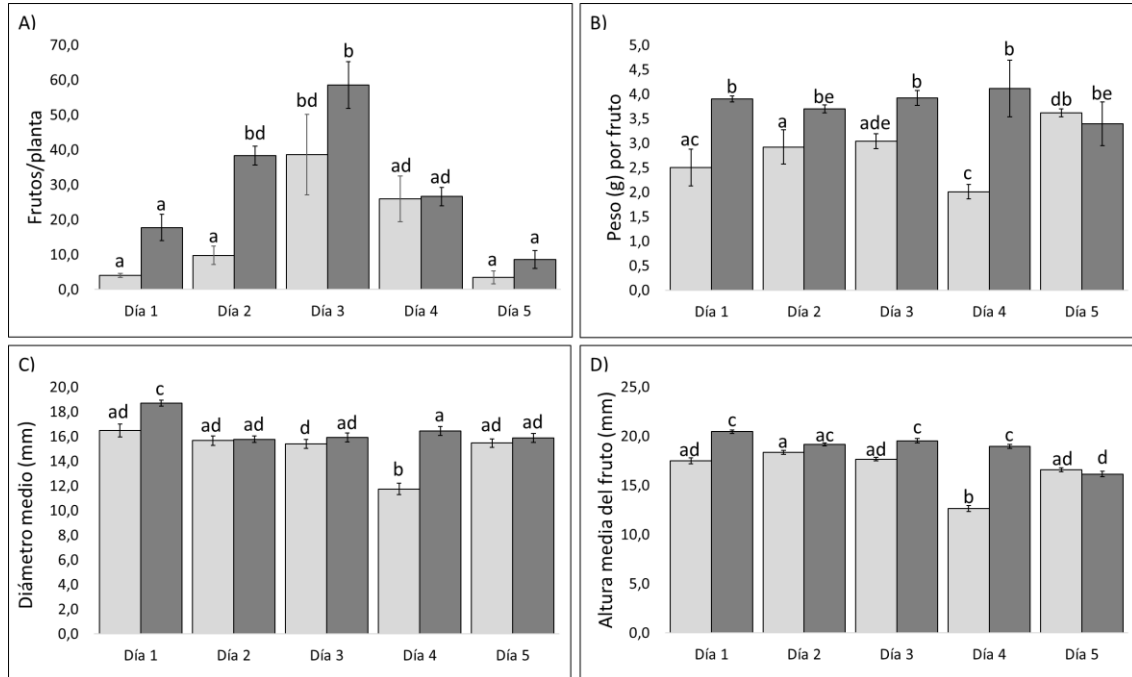


Figura 80. Resultados de la recogida de la producción. A) Frutos por planta. B) Peso medio de los frutos en gramos. Los resultados son presentados en los cinco días de recolección. Día 1: el 22 de junio; Día 2: el 27 de junio; Día 3: el 03 de julio; Día 4: el 11 de julio; Día 5: el 21 de julio. Las barras de color gris claro representan el tratamiento control y las barras de gris oscuro representan el tratamiento inoculado con *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Las letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

La inoculación de las plantas en condiciones de campo ha demostrado aumentar tanto el rendimiento de los cultivos como el tamaño de los frutos. Por ejemplo, la inoculación de manzanos con las bacterias *Bacillus* sp. M3 y *Bacillus* sp. OSU-142 incrementó el número de frutos por árbol y el peso medio de las manzanas. Del mismo modo, la inoculación de plantas de fresa con varias bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* incrementó el número de frutos por planta (Basile *et al.*, 2020; Zenginbal *et al.*, 2023).

8.2.2.2. Parámetros fisicoquímicos.

Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron el pH, el porcentaje de ácido cítrico, los sólidos totales solubles (TSS), el índice de palatabilidad, el porcentaje de humedad y el porcentaje de cenizas. En general, la inoculación de las plantas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 no alteró ninguno de estos parámetros con respecto a las moras obtenidas de las plantas control sin inocular.

Los valores del pH no mostraron diferencias entre los dos tratamientos. Solamente los resultados obtenidos en el tiempo 4 fueron estadísticamente significativos. En ambos tratamientos, el pH mostró valores cercanos a 3 al comienzo de la cosecha y fue aumentando a medida que avanzaba la cosecha hasta alcanzar el pH 4 (Figura 81.A.). En cambio, el porcentaje de acidez fue reduciéndose a medida que avanzaba la cosecha en ambos tratamientos. Al principio de la cosecha osciló entre el 2,3 – el 3,1% y fue disminuyendo hasta alcanzar el 0,9 – 1,4% al final de la cosecha (Figura 81.B.). Los valores de TSS fueron aumentando en los dos tratamientos a medida que avanzaba la cosecha (Figura 81.C.). El índice de palatabilidad, obtenido a partir de los datos de TSS y acidez, mostró un aumento moderado en los cuatro primeros tiempos de la cosecha, y experimentó un gran aumento en el último tiempo de la cosecha en ambos tratamientos. Entre los tratamientos, las diferencias significativas solo fueron observadas en el tiempo 5 (Figura 81.D.). Con respecto a los porcentajes de humedad y de cenizas, estos fueron constantes a lo largo del periodo de cosecha en ambos tratamientos y además no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Figuras 81.E. y 81.F.).

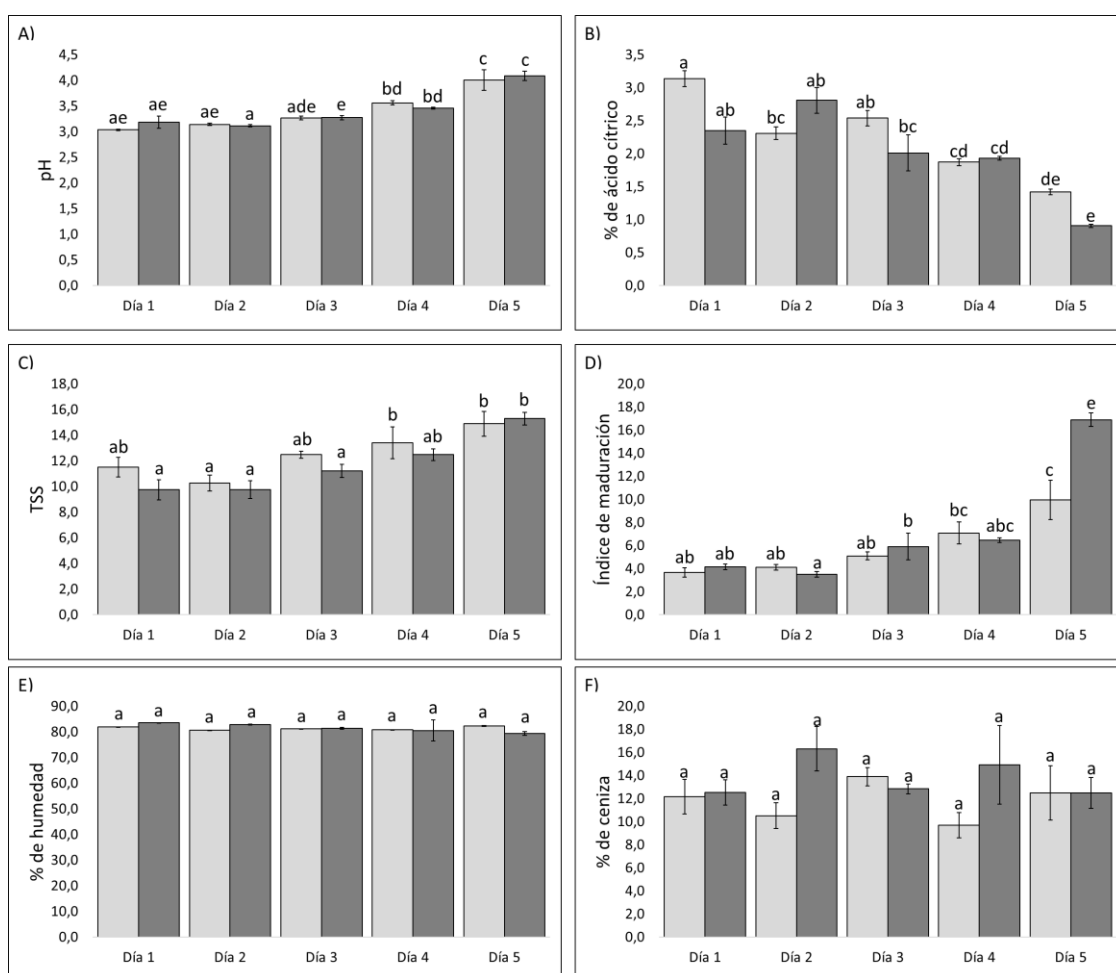


Figura 81. Resultados de la recogida de la producción. A) pH. B) Porcentaje de ácido cítrico. C) Solubles sólidos totales. D) Índice de maduración. E) Porcentaje de humedad. F) Porcentaje de cenizas. Los resultados son presentados en los cinco días de recolección. Día 1: el 22 de junio; Día 2: el 27 de junio; Día 3: el 03 de julio; Día 4: el 11 de julio; Día 5: el 21 de julio. Las barras de color gris claro representan el tratamiento control y las barras de gris oscuro representan el

tratamiento inoculado con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Las letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

En comparación con otras frutas, los valores de pH en las moras suelen ser bastante bajos, y oscilan entre el 2,7 y el 3,9, dependiendo de la especie (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021; Moraes *et al.*, 2020; Segantini *et al.*, 2017). En las moras recogidas en este ensayo, el pH estuvo comprendido en ese rango. La acidez, expresada en porcentaje de ácido cítrico, suele oscilar en las moras entre 0,5 y el 5%, dependiendo de la especie (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021; Moraes *et al.*, 2020; Samaniego *et al.*, 2020; Segantini *et al.*, 2017). Las moras recogidas en este ensayo mostraron valores comprendidos en ese rango.

La composición en azúcares es un parámetro importante en términos de sabor, aceptación del consumidor y procesamiento de los productos frutícolas. En muchos cultivos, las frutas que presentan un contenido elevado de azúcares suelen ser adecuadas para el consumo directo, mientras que aquellas con contenido bajo suelen ser procesadas para elaborar productos derivados, como mermeladas o licores (Proietti *et al.*, 2019). En las moras obtenidas de las plantas del género *Rubus*, el valor TSS reportado osciló entre los 6,9 y los 14, dependiendo de la especie vegetal (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021; Moraes *et al.*, 2020; Segantini *et al.*, 2017). En las moras recogidas en este estudio, el TSS fue ligeramente superior, pues osciló entre los 10 y los 16.

La correlación entre los sólidos solubles y la acidez se utiliza como parámetro para indicar la palatabilidad de la fruta, la cual está relacionada con su sabor y es un atributo importante para el consumo de la fruta fresca. En general, cuanto mayor sea el ratio (>5), mejor será el sabor de la fruta (Moraes *et al.*, 2020). En este caso, las moras obtenidas de ambos tratamientos tendrían un sabor más ácido al principio de la cosecha debido a su alto contenido en acidez, y su bajo contenido en TSS. Sin embargo, a partir del tiempo 3 de la cosecha, se observó una disminución de la acidez y un aumento de los TSS, lo que se tradujo en un aumento de la palatabilidad. Cabe destacar, que este aumento de la palatabilidad fue observado antes en las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 que en las moras obtenidas de las plantas control sin inocular.

La textura es otro de los atributos organolépticos valorados por el consumidor, y el principal contribuyente a la textura de las frutas frescas es la turgencia. Aunque en este estudio no se evaluó la turgencia directamente, el porcentaje de agua es una medida indirecta porque es el factor que controla la rigidez de las células (Shah *et al.*, 2023; Sousa *et al.*, 2007). Por otro lado, el contenido en cenizas está relacionado con la cantidad de minerales, los cuales son micronutrientes necesarios para realizar funciones vitales en el desarrollo del cuerpo humano (Moraes *et al.*, 2020). En ambos casos, los porcentajes de humedad y de cenizas fueron constantes a lo largo de la cosecha y no se observaron diferencias significativas entre las moras obtenidas de ambos tratamientos.

8.2.2.3. Parámetros del color.

Los parámetros evaluados dentro de la categoría del color fueron los determinados por la escala CIELab. El valor L^* representa la luminosidad. Al evaluar los resultados dentro del mismo tiempo, observamos que no hubo diferencias significativas entre la luminosidad de las moras recolectadas de las plantas control sin inocular y las moras recolectadas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65. Sin embargo, las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostraron una luminosidad constante durante toda la cosecha, mientras que las moras obtenidas de las plantas control mostraron fluctuaciones en este parámetro (Tabla 64).

Tabla 64. Parámetros de color medidos para los frutos de mora en cada día de recolección. t = 1: el 22 de junio; t = 2: el 27 de junio; t = 3: el 03 de julio; t = 4: el 11 de julio; t = 5: el 21 de julio. Las letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

L^*	t = 1	t = 2	t = 3	t = 4	t = 5
Control	13,4±1,6 a	15,3±2,0 bc	13,5±1,9 ab	15,5±2,9 c	15,8±1,8 c
CRRU65	14,2±1,6 ac	15,4±2,9 c	14,2±3,5 ac	14,5±1,5 ac	15,4±1,6 bc
a^*	t = 1	t = 2	t = 3	t = 4	t = 5
Control	5,8±1,4 abce	5,8±3,6 abce	6,8±2,2 ab	5,3±2,1 ad	3,5±2,5 de
CRRU65	6,3±2,7 abc	7,7±3,5 be	6,7±2,4 ab	4,3±2,1 cd	3,6±1,1 d
b^*	t = 1	t = 2	t = 3	t = 4	t = 5
Control	-0,4±0,5 a	-0,3±1,3 a	0,4±1,5 ab	-0,5±1,1 a	0,0±3,9 ab
CRRU65	-0,4±0,8 a	0,4±2,5 ab	0,3±1,6 ab	1,2±2,3 b	0,9±1,3 ab
C^*	t = 1	t = 2	t = 3	t = 4	t = 5
Control	5,8±1,4 abc	5,9±3,7 abc	6,9±2,2 bc	5,4±2,1 ab	4,4±3,5 ab
CRRU65	5,3±3,4 bc	7,9±3,9 c	6,9±2,6 bc	4,7±2,8 ab	3,8±1,2 a
h^*	t = 1	t = 2	t = 3	t = 4	t = 5
Control	94.8±5.6 ab	96.2±6.7 ab	88.1±12.0 abce	97.8±13.1 ab	77.6±28.9 de
CRRU65	95.7±7.2 ab	91.0±10.3 ab	90.2±10.9 ab	77.8±10.3 cd	75.5±15.7 d

El siguiente parámetro de color analizado fue el valor a^* , que varía desde valores negativos (verde) hasta positivos (rojo). De nuevo, no hubo diferencias significativas entre las moras recogidas de las plantas control sin inocular y las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65. En ambos tratamientos, los valores fueron constantes al principio de la cosecha, pero descendieron significativamente hacia el final de esta.

Otro parámetro del color es el b^* , que varía desde valores negativos (azul) hasta positivos (amarillo). En general, todos los valores obtenidos estaban en torno al 0. Únicamente en el tiempo de recolección cuatro, se obtuvieron diferencias significativas entre las moras recogidas de las plantas control sin inocular y las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65.

El valor C^* representa la intensidad o la pureza del color, donde los valores próximos a 0 indican colores poco saturados, cercanos al gris neutro. De nuevo, los valores fueron bastante constantes, estando casi todos los valores en torno al 0.

Finalmente, el valor h^* representa el valor de Hue, el cual posiciona a un color dentro de un círculo cromático estándar, lo que permite describir y clasificar a los colores según el tono dominante (Figura 82). Los valores obtenidos al analizar las moras fueron similares en las moras obtenidas de ambos tratamientos y oscilaron entre el 96° y el 77° , lo cual indica predominancia del color amarillo. El valor Hue va descendiendo a medida que avanza la cosecha, y el descenso fue más rápido en las moras recogidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65, el cual tomó valores de 75° en el tiempo 4 de la recolección, mientras que las moras recogidas de las plantas control sin inocular no presentaron estos valores hasta el último día de la cosecha.

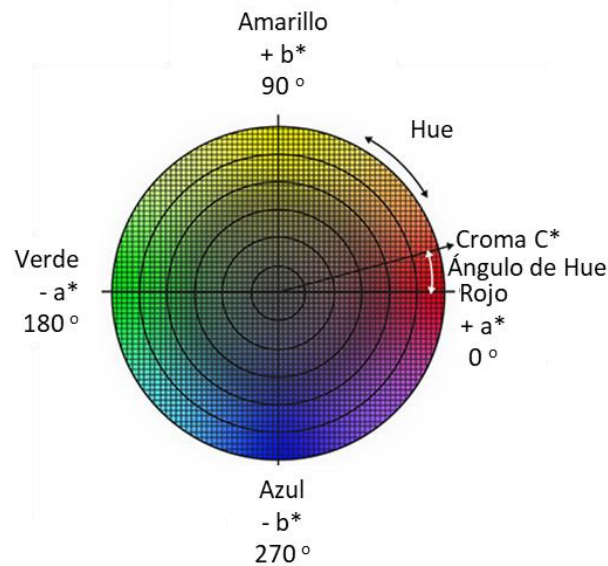


Figura 82. Representación del espacio del color en el que incluyen los valores a^* , b^* , C^* y el valor de Hue.

Aunque estos parámetros son analizados para determinar la colorimetría de muchos tipos de alimentos, en el caso de las moras no proporcionan excesiva información. Las moras obtenidas de la especie *Rubus* sp. variedad *Cherokee* son negras. El negro en el sistema CIELab es representado por un valor de L^* cercano a 0, independientemente de los valores de a^* y b^* . Además, el ángulo de matiz (valor de Hue) solo describe el matiz del color, es decir, la tonalidad del color en el círculo cromático. El valor de L^* (luminosidad) determina cuán claro u oscuro es el color. Por lo tanto, el matiz por sí solo no describe completamente la apariencia del color en términos de luminosidad. El negro, en el sistema CIELab, debe mostrar valores de L^* y de C^* próximos a 0 mientras que los valores de a^* , b^* y Hue pueden ser cualquier color, ya que el matiz no es aplicable cuando la luminosidad es 0 (Sharma, 2003).

El color es probablemente una de las características más importantes que determinan la elección del consumidor a la hora de seleccionar la fruta en los mercados (Flores-Félix *et al.*, 2024). Los consumidores suelen querer moras de color púrpura, extremadamente oscuro y una apariencia brillante. El color oscuro de las moras es determinado por el valor L^* y suele tomar valores de entre el 19,8 a 23,9, indicando que

el fruto es extremadamente oscuro, casi negro. Por otro lado, el brillo es determinado por el valor C*, que suele oscilar entre el 22,7 y el 25,5. Cuanto mayor es el valor C, más intenso es el color de la fruta y, en consecuencia, más atractiva para el consumidor (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021). En las moras en esta tesis de ambos tratamientos los valores de L* y C* son más bajos que los descritos anteriormente, indicando que esta variedad de mora presenta una tonalidad de negro más intenso.

En general, la inoculación de la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mejoró la producción por planta y el tamaño de los frutos, pero no afectó a los parámetros fisicoquímicos ni de color, lo que podría indicar que la inoculación no altera las cualidades organolépticas de las moras y que la aceptación por parte del consumidor será la misma que suelen tener las moras obtenidas normalmente en este cultivo.

9. DISCUSIÓN GENERAL

Los compuestos químicos como los fertilizantes y los pesticidas juegan un papel fundamental en la agricultura moderna, ya que de su uso depende hasta la mitad de la producción agrícola mundial (Srivastav, 2020). Por desgracia, su aplicación en los suelos no es del todo eficiente. En general, entre el 60% y el 90% de los fertilizantes o de los pesticidas aplicados se pierde y se acumula en los suelos (Baweja *et al.*, 2020). Para aumentar su eficiencia, estos compuestos químicos han sido aplicados de forma masiva en los campos de cultivo, lo que ha provocado una acumulación excesiva en los suelos y, eventualmente, ha llegado a contaminar las reservas de agua dulce (Rashmi *et al.*, 2020). Esto ha dado lugar a un impacto negativo en la acuicultura y también a un aumento de los costes del tratamiento del agua potable (Srivastav, 2020). Este no es el único problema derivado del uso excesivo de los compuestos químicos, sino que también ha provocado una acidificación de los suelos debido a la carga excesiva de nutrientes, lo que también contribuye a la emisión de gases de efecto invernadero y al cambio del pH (Krein *et al.*, 2023; Prashar y Shah, 2016). Por estos motivos, en los últimos años, la Comisión Europea ha promovido la investigación y la innovación para fomentar el diseño de enfoques más sostenibles en la agricultura (Garske *et al.*, 2020). En este sentido, esta tesis se alinea con las necesidades de los gobiernos y plantea el uso de alternativas basadas en el uso de microorganismos que mejoren la salud y la productividad de los cultivos, sin causar ningún daño al ecosistema. Esta alternativa ya ha sido previamente abordada por diversas investigaciones y promete ser una herramienta eficiente para la consecución de los objetivos (Antoszewski *et al.*, 2022; Batool y Iqbal, 2019). Así, en la presente tesis doctoral se aborda un enfoque multifactorial que trata de mejorar la agricultura en tres de sus ámbitos principales como son el crecimiento vegetal, la protección frente a amenazas biológicas y la mejora nutricional de la producción de los cultivos.

Los microorganismos usados en la agricultura son diversos y provienen de multitud de ambientes diferentes. Entre todos ellos destacan los microorganismos rizosféricos (Mueller y Sachs, 2015) que habitan en el suelo circundante a la raíz, y los endofíticos, que habitan en el interior de los tejidos vegetales (Singh *et al.*, 2022a). Estos últimos tienen una ventaja con respecto al resto y es que ya están adaptados al establecimiento de las relaciones con las plantas, por lo que puede ser que las interacciones que establezcan se den más a largo plazo (Ngalimat *et al.*, 2021). La diversidad endofítica de muchas especies vegetales ya ha sido evaluada, aunque la mayoría de las investigaciones se ha limitado al estudio de las comunidades endofíticas de las raíces (Bulgari *et al.*, 2014; Manzotti *et al.*, 2020; Rat *et al.*, 2021; Riva, 2022; Saati-Santamaría *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2017). El estudio de la diversidad endofítica de otros tejidos vegetales, diferentes a la raíz, podría desentrañar un nuevo potencial metabólico que podría ser de gran ayuda en el desarrollo de nuevos compuestos de interés agrícola. En esta tesis, por primera vez se ha estudiado la diversidad bacteriana del interior de las raíces, los tallos y las hojas de varias plantas de zarzamora, *Rubus ulmifolius* Schott, localizadas en tres nichos con condiciones ambientales diferentes. El análisis de la diversidad en los diferentes tejidos de las plantas recogidas de los diferentes ambientes parecía indicar que esta diversidad era constante dentro del mismo tejido,

independientemente de la localización de la planta. Sin embargo, la comparación de las comunidades entre los tejidos dentro de un mismo individuo sí que mostraron diferencias. Varios estudios han proclamado que el origen de la mayoría de los microorganismos endófitos debe de ser el suelo circundante (Santoyo, 2022). El estudio de esta tesis parecía corroborar esta teoría pues la diversidad descendió de forma escalonada según la distancia entre el suelo y el tejido muestreado. Además, los resultados mostraron un enriquecimiento de taxones específicos en las muestras de los tallos y las hojas. En general, este enriquecimiento fue el mismo, independientemente de la localización de la planta. Así, estos datos parecían coincidir con las teorías previas que establecen que las plantas reclutan y ejercen selección sobre las bacterias del suelo (Morella *et al.*, 2020) y que la colonización de los tejidos superiores debe de estar restringida a aquellas bacterias que sean capaces de atravesar la barrera que existe entre cada órgano, la cual impide que el resto de bacterias puedan establecerse en la parte superior de la planta (Kandel *et al.*, 2017). La caracterización preliminar del poder metabólico de las poblaciones de los diferentes tejidos parecía indicar que el interior de las plantas de zarzamora podrían ser una fuente de nuevos microorganismos con potencial aplicación en la industria de la agricultura.

El aislamiento fue realizado en los dos tejidos que habían presentado mayor diversidad, es decir la raíz y el tallo. La clasificación taxonómica de estos se hizo en base a la secuenciación del gen ARNr 16S, el cual se ha usado tradicionalmente para la identificación de los organismos procariotas (Shukitt-Hale *et al.*, 2007). Aunque ya se ha demostrado que la secuenciación de este gen es insuficiente para determinar la clasificación taxonómica a nivel de especie (Chun *et al.*, 2018), es útil para llevar a cabo una clasificación preliminar de bajo coste. De todas formas, en las cepas seleccionadas se realizó un análisis más exhaustivo basado en la secuenciación del genoma, el análisis filogenómico y la utilización de las herramientas ANIb y dDDH. Los análisis filogenéticos y filogénomicos mostraron que algunas cepas podían ser nuevas especies o incluso géneros bacterianos nuevos como la cepa CRRU44, descrita en esta tesis como *Ferraniclubacter rubi*. Estos resultados ponen de manifiesto que los entornos endofíticos son un nicho que alberga una gran diversidad bacteriana. De hecho, en los últimos años se han aislado multitud de especies bacterianas nuevas del interior de otros tejidos de las plantas diferentes a la raíz, como el tallo o las hojas (Chen *et al.*, 2021b; Chen *et al.*, 2021c; Cueva-Yesquén *et al.*, 2024; Ibrahim *et al.*, 2020; Kaewkla *et al.*, 2020; Madhaiyan *et al.*, 2020; Mo *et al.*, 2022; Pitiwittayakul *et al.*, 2024; Seo *et al.*, 2022; Yue *et al.*, 2024). Por lo tanto, este descubrimiento corroboró la idea inicial de que el interior de los tejidos vegetales era un nicho de diversidad bacteriana aun por caracterizar (Gouda *et al.*, 2016).

La caracterización *in vitro* de los diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y de biocontrol, sumada al estudio de los genomas *in silico*, permite seleccionar de manera eficiente aquellas bacterias que puedan representar una potencial herramienta para el desarrollo de bioinoculantes (Flores-Félix *et al.*, 2021). La colonización es un paso clave en la determinación de un bioestimulante pues es necesaria

para que la interacción entre las plantas y los microorganismos sea más eficiente (Santoyo, 2022). En esta tesis hemos realizado una aproximación multifactorial sobre el estudio de la colonización, combinando estudio *in vitro*, con estudio *in planta* en los que se incluyeron métodos tradicionales como la microscopía de fluorescencia y métodos moleculares como la PCR cuantitativa. Los resultados de los diferentes ensayos han sido variables debido a que estudian la colonización desde diferentes puntos de vista (Santhanam *et al.*, 2019). En este sentido, los resultados de los diferentes ensayos de colonización se complementan entre ellos, aportando una visión más completa de la capacidad de colonización de las cepas (Rilling *et al.*, 2019).

Otro aspecto relevante en la interacción planta-microorganismo es el relativo al volatilo bacteriano que ha empezado a ser considerado en los últimos años como un mecanismo de biocontrol que aporta ciertas ventajas frente al resto de mecanismos. Estos compuestos son eficaces a bajas concentraciones, difunden a través de los poros del suelo y pueden actuar sobre los patógenos sin establecer contacto físico (Belda *et al.*, 2017, Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Por ello, el efecto del volatilo de los aislados fue evaluado *in vitro* frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. La eficiencia de las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57 en los ensayos en placa, nos hizo querer profundizar en el estudio de la composición del volatilo, de su efecto en las plantas infectadas con el hongo y de como el volatilo podría alterar la expresión génica de algunos genes relacionados con la inducción de la resistencia sistémica. Estos efectos ya han sido abordados con anterioridad en la bibliografía (Ayed *et al.*, 2021; Lammers *et al.*, 2022; Morita *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2020). Sin embargo, la mayoría de los estudios de biocontrol mediados por el volatilo se centran en las especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Calvo *et al.*, 2020; He *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2018; Surovy *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022a; Zhang *et al.*, 2020a). En este sentido, esta tesis aporta por primera vez información sobre la composición del volatilo de las especies *Neorhizobium galegae* CRRU16 e *Inquilingus ginsengisoli* CRRU57. Además, algunos autores han vinculado el efecto del volatilo con una activación de la resistencia sistémica de la planta (Constantin *et al.*, 2019; Ryu *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando analizamos la expresión de varios genes reporteros tras la exposición al volatilo de estas bacterias, únicamente el volatilo de *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 parecía aumentar la expresión del gen de la fenilalanina amoníaco-liasa (*pal*) en las plantas de tomate, una de las enzimas principales involucradas en la ruta de biosíntesis del ácido salicílico (Wang *et al.*, 2021c). Este efecto ha sido a menudo relacionado con la producción de acetoína y de 2,3-butanediol por parte de bacterias del género *Bacillus* (Ayaz *et al.*, 2021; Kwon y Song, 2014; Ryu *et al.*, 2004; Wenke *et al.*, 2012). La acetoína fue el componente principal del volatilo de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, lo que podría indicar que este compuesto está involucrado en la activación de la respuesta sistémica en la planta. La activación de la defensa sistémica de la planta mediante la producción de compuestos volátiles no es un mecanismo común (Farag *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2016; Ryu *et al.*, 2004). En este sentido, el efecto antifúngico mostrado

por el volatilo de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18 podría deberse a una combinación de mecanismos en los que se unen el ataque directo con el ataque indirecto (Bailly y Weisskopf, 2017).

Las bacterias endofíticas *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 fueron capaces de promocionar el crecimiento vegetal en las plantas de tomate. Estos géneros bacterianos ya han sido descritos en la bibliografía por ser capaces de promocionar el crecimiento vegetal (Ayuso-Calles *et al.*, 2023; Boubekri *et al.*, 2022; Chhetri *et al.*, 2022; Gen-Jiménez *et al.*, 2023; Jiménez-Gómez *et al.*, 2017; Kurepin *et al.*, 2015; Kwon y Song, 2014). Por un lado, las bacterias del género *Rhizobium* han sido estudiadas frecuentemente en la promoción del crecimiento vegetal de plantas leguminosas (Dashadi *et al.*, 2011). Esto es así, porque estas bacterias tienden a establecer una relación de estrecha simbiosis con este tipo de plantas, debido a la formación de nódulos en sus raíces que les permiten fijar nitrógeno atmosférico (Flores-Félix *et al.*, 2020). Sin embargo, la aplicación de estas bacterias ha ido más allá y se ha extendido a otro tipo de cultivos (Etesami *et al.*, 2009; Purwaningsih *et al.*, 2024). En estos sistemas, las bacterias del género *Rhizobium* han mostrado ser capaces de promocionar el crecimiento vegetal gracias a que poseen diferentes mecanismos entre los que destacan la producción de ácido indol acético (Gen-Jiménez *et al.*, 2023; Rattan y Sharma, 2023). Por otro lado, las bacterias del género *Arthrobacter* pertenecen al filo Actinomycetota el cual también ha sido ampliamente estudiado por ser capaces de promover el crecimiento vegetal en multitud de cultivos vegetales (Miethke y Marahiel, 2007; Tchakounté *et al.*, 2020). No sólo eso, si no que la importancia de este grupo bacteriano radica en su gran poder metabólico, ya que el 45% de los 22.500 compuestos con actividad biológica conocidos actualmente son extraídos de las bacterias pertenecientes al filo Actinomycetota (Mesquita y Bandeira, 2023). En este sentido, las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 podrían tener un efecto aun mayor en el desarrollo de los cultivos, influenciando incluso en la producción. Además, estas dos especies mostraron una colonización muy efectiva de los sistemas radiculares de las plantas, lo que las convierte en unos potenciales candidatos para el desarrollo de bioestimulantes a largo plazo.

En los últimos años, la demanda de alimentos con propiedades nutraceuticas ha aumentado de manera considerable (Cosme *et al.*, 2022). El consumidor medio es ahora más exigente y requiere de productos, no solo de buena calidad, si no que aporten beneficios para la salud. Las moras se incluyen dentro de las frutas con un gran potencial antioxidante, el cual es derivado del alto contenido en compuestos fenólicos (Larrosa *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2022a; Robinson *et al.*, 2020; Vuolo *et al.*, 2019). La inoculación de los cultivos de zarzamora con bacterias promotoras del crecimiento podría alterar esta composición y afectar así a sus capacidades antioxidantes (Gupta *et al.*, 2017). Las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21 y *Rhizobium laguerreae* CRRU65 fueron inoculadas en plantas de zarzamora en condiciones de invernadero. El análisis de las moras recolectadas mostró que la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 no solo era capaz de aumentar esa producción, sino que además modificaba la concentración de los

compuestos fenólicos de las mismas con respecto a las moras recogidas de las plantas control. Este efecto ya fue estudiado en otros cultivos como la lechuga o el arándano, donde se vio que la inoculación de estas plantas con bacterias del género *Rhizobium* modificada la concentración de los compuestos fenólicos (Ayuso-Calles *et al.*, 2023; Flores-Félix *et al.*, 2024). Debido a esta alteración, el potencial antioxidante de las moras podría haberse modificado, por lo que se llevó a cabo un estudio en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (Ayuda-Durán *et al.*, 2020). Este organismo ha sido usado durante años como modelo biológico para estudios clínicos relacionados con humanos, donde se incluyen el estudio de enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson y de condiciones como la obesidad o el envejecimiento (Markaki y Tavernarakis, 2020; Ye *et al.*, 2020; Y. Yue *et al.*, 2021). En todos estos procesos, un factor clave es la acumulación de especies reactivas de oxígeno, que aumentan el daño celular y aceleran o inducen estas enfermedades (Maldonado *et al.*, 2023; Miranda-Vizueté y Veal, 2017). Los compuestos antioxidantes ayudan a reducir el daño oxidativo y prevenir tanto el envejecimiento como las enfermedades derivadas de él (Robinson *et al.*, 2020; Shukitt-Hale *et al.*, 2007; Tomás-Barberán y Clifford, 2000). Esta es la primera vez que se evalúa el efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la capacidad antioxidante de las moras. Los nemátodos expuestos a las moras obtenidas de las plantas inoculadas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostraron un aumento de la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo. Este efecto parecía estar relacionado con el aumento en la concentración de compuestos fenólicos, en concreto con el aumento del compuesto cianidina-3-o-glucósido que ha sido descrito como uno de los principales responsables del poder antioxidante de las moras (Morales *et al.*, 2020; Moreno-Medina *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

Caenorhabditis elegans es un organismo modelo muy usado para el estudio de rutas metabólicas pues, entre el 60 y el 80% de sus genes tienen un homólogo en el genoma de los humanos, por lo que es usado para multitud de estudios de rutas bioquímicas relacionadas con las enfermedades y el envejecimiento humano (Markaki y Tavernarakis, 2020; Miranda-Vizueté y Veal, 2017; Tissenbaum, 2015; Yue *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020b). En este sentido, quisimos vincular el aumento de la tolerancia al estrés térmico observado en los nemátodos expuestos a las moras recogidas de las plantas inoculadas con *Rhizobium laguerreae* CRRU65 con el aumento de la expresión de los genes de la ruta de la señalización por insulina/IGF-1 (IIS), una de las rutas que regulan los niveles de especies reactivas de oxígeno y que está altamente conservada en los seres humanos (Zhang *et al.*, 2020b). Los genes *skn-1* y *hsp-16* parecieron aumentar su expresión en los nemátodos expuestos a las moras recogidas de las plantas inoculadas con la cepa *Rhizobium laguerreae* CRRU65. El aumento de la expresión de estos genes está relacionado con la reducción del estrés oxidativo (Song *et al.*, 2020; Tambara *et al.*, 2018). El consumo de frutos del tipo baya ya ha sido vinculado con una reducción del estrés oxidativo y un aumento de la expresión de los genes de la ruta de la señalización por insulina/IGF-1 (IIS) (Hidalgo y Almajano, 2017; Li *et al.*, 2022; Scerbak *et al.*, 2018). Sin embargo, esta es la primera vez que se vincula al consumo de moras. Además, también

es la primera vez que se relaciona la inoculación de plantas con bacterias promotoras del crecimiento y el aumento de la composición de compuestos fenólicos en los frutos que a su vez impacta en el potencial antioxidante mediante la activación de la ruta de la insulina.

Finalmente, los ensayos en campo son necesarios para evaluar si el efecto observado anteriormente se mantiene en un sistema agrícola más complejo (Jaiswal *et al.*, 2021; Masmoudi *et al.*, 2023). En esta tesis se realiza por primera vez un ensayo de la inoculación de bacteria promotoras del crecimiento vegetal en plantas de zarzamora en condiciones de campo. El cultivo comercial de zarzamora fue inoculado con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y la producción total fue recogida. De nuevo, la inoculación pareció afectar a la composición en compuestos fenólicos de los frutos, lo que podría indicar un aumento del potencial antioxidante de los mismos. Por otro lado, el rendimiento de los cultivos es un factor importante para los agricultores, donde el número de frutos por planta y el peso del fruto cobran gran importancia (Flores-Félix *et al.*, 2024; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021). La inoculación de las plantas con la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 mostró un aumento tanto en el número de moras por planta como en el tamaño y el peso de las bayas. Además, las características organolépticas de las frutas son un parámetro importante que impacta en la aceptación del producto por los consumidores. Por esa razón, varios parámetros fisicoquímicos que afectan al sabor, la textura y el olor, y parámetros visuales de coloración fueron evaluados (Flores-Félix *et al.*, 2024; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2021; Moraes *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2007; Zakrzewski *et al.*, 2017). La inoculación no pareció tener efecto en ninguno de estos parámetros por lo que se deduce que las moras obtenidas de las plantas inoculadas deberán tener el mismo nivel de aceptación que las moras obtenidas de manera habitual en esta plantación comercial.

Los resultados obtenidos en esta tesis han confirmado la idea de que los tejidos vegetales albergan multitud de microorganismos que podrían tener aplicación en el campo de la agricultura debido al potencial metabólico que poseen. Las bacterias aisladas del interior de las plantas de zarzamora han mostrado ser capaces tanto de promover el crecimiento vegetal como de proteger a la planta frente al ataque del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. En este sentido, las bacterias seleccionadas podrían ser candidatas al desarrollo de compuestos bioinoculantes para la mejora de los cultivos. De hecho, estas bacterias no solo influyeron en los parámetros vegetativos de las plantas, sino que además, la inoculación de las plantas de zarzamora mostró un incremento de la producción, tanto en número como en tamaño de los frutos. Todo esto, sin alterar las características fisicoquímicas de los mismos. Además, la inoculación pareció aumentar las propiedades nutraceúticas de los frutos, las cuales fueron influenciadas por el aumento de la concentración de algunos de los compuestos fenólicos de las moras. Este efecto fue corroborado al exponer al organismo modelo *Caenorhabditis elegans* a los extractos de las moras recogidas de las plantas inoculadas. En los ensayos observamos un aumento de la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo ligado a un aumento de la expresión de algunos genes involucrados en las rutas metabólicas de la tolerancia al estrés. En este sentido, esta tesis pone de manifiesto el beneficio que supone el uso de bacterias

endofíticas en los cultivos agrícolas, las cuales no solo representan una ventaja para los agricultores, que obtendrían cultivos más eficientes, sino que también supone una ventaja para los consumidores, pues obtendrían frutos de mayor calidad nutricional.

10. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, hemos podido establecer las siguientes conclusiones:

1. La composición endofítica bacteriana de la planta *Rubus ulmifolius* es esencialmente la misma en los diferentes ambientes estudiados. Las diferencias observadas en la composición estaban influidas principalmente por factores del tejido vegetal, lo que demuestra que las plantas de *Rubus ulmifolius* Schott son capaces de seleccionar a las comunidades bacterianas que habitan en el interior de sus tejidos.
2. El interior de los tejidos vegetales de las plantas de zarzamora presenta una elevada biodiversidad de microorganismos aún sin explorar, siendo una fuente de nuevas especies bacterianas con capacidad de llevar a cabo potenciales actividades de interés biotecnológico.
3. La nueva especie *Ferraniclubacter rubi* CRRU44^T aislada del interior de tallos de zarzamora es un buen candidato para ser aplicado como bioestimulante, pues la inoculación de las semillas de tomate, plantas en los primeros estadios y tomates en fase adulta mejora de manera significativa el desarrollo vegetal.
4. Las bacterias *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferraniclubacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65 y *Rhizobium laguerreae* CRRU67 presentan la capacidad de colonizar el sistema radicular y de promover el crecimiento vegetal de plantas de tomate, por lo que podrían ser consideradas como posibles candidatas para su uso como bioestimulantes en la agricultura.
5. El volatiloма de las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 es una herramienta prometedora para el control del fitopatógeno *Botrytis cinerea* mediante una acción directa sobre el hongo.
6. Los análisis de la expresión génica de cinco genes reporteros de la inducción de la resistencia sistémica de las plantas de tomate sugieren que el volatiloма de las bacterias *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35 e *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 no induce la activación de la defensa sistémica de las plantas de tomate, probablemente porque las bacterias endofíticas deben evadir los sistemas de defensa para lograr una colonización eficiente.
7. La inoculación de la bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 en los cultivos de zarzamora ha resultado ser una importante herramienta para la mejorar de la actividad antioxidante de las moras, ya que incrementa la concentración de los compuestos fenólicos, lo que a su vez mejora en la tolerancia al estrés oxidativo, como se ha demostrado en el modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*.

11. CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this doctoral thesis, we established the following conclusions:

1. Bacterial endophytic composition of the *Rubus ulmifolius* plants is essentially the same in the different environments studied. The differences observed in the composition were mainly influenced by plant tissue factors, which demonstrates that *Rubus ulmifolius* Schott plants are able to select selecting the bacterial communities that inhabit their inner tissues.
2. The inside of blackberry plant tissues shows a high biodiversity of unexplored bacteria, and it is a source of new bacterial species with may possess potential activities with biotechnological interest.
3. New species *Ferranichuibacter rubi* CRRU44^T isolated from the inside of blackberry stems is a good candidate for its application as a biostimulant, since the inoculation of tomato plants in both first stages and during adult phase adult phase significantly improves plant development.
4. *Arthrobacter crystallopoietes* CRRU21, *Ferranichuibacter rubi* CRRU44, *Rhizobium laguerreae* CRRU65, and *Rhizobium laguerreae* CRRU67 have the ability to colonize the root system and promote plant growth of tomato plants, so they could be considered as possible candidates for their use as agricultural biostimulants.
5. The volatilome of the bacteria *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, and *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 is a promising tool for the biocontrol of the phytopathogen *Botrytis cinerea* through direct action on the fungus.
6. Gene expression analysis of five reporter genes related with induction of systemic resistance in tomato plants suggest that the volatilome of the bacteria *Neorhizobium galegae* CRRU16, *Bacillus amyloliquefaciens* CRRU18, *Pseudomonas silesiensis* CRRU35, and *Inquilinus ginsengisoli* CRRU57 does not induce systemic defenses activation on tomato plants, probably because endophytic bacteria must evade defense systems in order to stablish colonization.
7. Inoculation of blackberry plants with the bacteria *Rhizobium laguerreae* CRRU65 has resulted to be an important tool for improved antioxidant activity, since it increased phenolic composition concentrations, which enhances oxidative stress tolerance on *in vivo* model organism *Caenorhabditis elegans*.

12. BIBLIOGRAFÍA

Achimón, F., Brito, V. D., Pizzolitto, R. P., Ramirez Sanchez, A., Gómez, E. A., & Zygadlo, J. A. (2021). Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 292–303. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2020.12.001>

Adeleke, B. S., & Babalola, O. O. (2022). Meta-omics of endophytic microbes in agricultural biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102332. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2022.102332>

Admassie, M., Woldehawariat, Y., & Alemu, T. (2022). *In Vitro* Evaluation of Extracellular Enzyme Activity and Its Biocontrol Efficacy of Bacterial Isolates from Pepper Plants for the Management of *Phytophthora capsici*. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6778352>

Afridi, M. S., Ali, S., Salam, A., César Terra, W., Hafeez, A., Sumaira, Ali, B., S. AlTami, M., Ameen, F., Ercisli, S., Marc, R. A., Medeiros, F. H. V., & Karunakaran, R. (2022a). Plant Microbiome Engineering: Hopes or Hypes. *Biology 2022*, Vol. 11, Page 1782, 11(12), 1782. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11121782>

Afridi, M. S., Javed, M. A., Ali, S., De Medeiros, F. H. V., Ali, B., Salam, A., Sumaira, Marc, R. A., Alkhalifah, D. H. M., Selim, S., & Santoyo, G. (2022b). New opportunities in plant microbiome engineering for increasing agricultural sustainability under stressful conditions. *Frontiers in Plant Science*, 13, 899464. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.899464/BIBTEX>

Ahlawat, O. P., Yadav, D., Walia, N., Kashyap, P. L., Sharma, P., & Tiwari, R. (2024). Root Exudates and Their Significance in Abiotic Stress Amelioration in Plants: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 43(6), 1736–1761. <https://doi.org/10.1007/S00344-024-11237-7/FIGURES/5>

Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M. del M., Luthe, D. S., Shakeel, S. N., & Barbercheck, M. E. (2020). Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. *Biological Control*, 144, 104167. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2019.104167>

Ait Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J. C., & Belarbi, A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24(2), 135–142. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00034-8)

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *The Plant Cell Wall*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26928/>

Aleksandrov, V.G., Blagodyr, R.N. and Illev, I. P. (1967). Liberation of Phosphoric Acid from Apatite by Silicate Bacteria. *Mikrobiology Zh*, 29, 111–114.

- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Aleynova, O. A., Suprun, A. R., Nityagovsky, N. N., Dubrovina, A. S., & Kiselev, K. V. (2021). The influence of the grapevine bacterial and fungal endophytes on biomass accumulation and stilbene production by the *in vitro* cultivated cells of *Vitis amurensis* rupr. *Plants*, 10(7), 1276. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10071276/S1>
- Ali, S., Hameed, S., Shahid, M., Iqbal, M., Lazarovits, G., & Imran, A. (2020). Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiological Research*, 232, 126389. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126389>
- Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Dias, B. H. S., de Sant'Anna Freitas, C., Coerini, L. F., Ryu, C. M., & de Castro Oliveira, J. V. (2023). The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13, 951130. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.951130/BIBTEX>
- Amaria, W., Sinaga, M. S., Mutaqin, K. H., Supriadi, & Widodo. (2024). Bacterial biocontrol potential against *Rigidoporus microporus*: Hydrolytic enzyme activity and antibiotic inhibition. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 23(4), 289–299. <https://doi.org/10.1016/J.JSSAS.2023.12.006>
- Amaro, F., Pinto, J., Rocha, S., Araújo, A. M., Miranda-Gonçalves, V., Jerónimo, C., Henrique, R., Bastos, M. de L., Carvalho, M., & de Pinho, P. G. (2020). Volatilomics Reveals Potential Biomarkers for Identification of Renal Cell Carcinoma: An *In Vitro* Approach. *Metabolites* 2020, Vol. 10, Page 174, 10(5), 174. <https://doi.org/10.3390/METABO10050174>
- Antoszewski, M., Mierek-Adamska, A., & Dąbrowska, G. B. (2022). The Importance of Microorganisms for Sustainable Agriculture—A Review. *Metabolites*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/METABO12111100>
- Arif, I., Batool, M., & Schenk, P. M. (2020). Plant Microbiome Engineering: Expected Benefits for Improved Crop Growth and Resilience. *Trends in Biotechnology*, 38(12), 1385–1396. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2020.04.015>
- Ashour, A. Z. A., & Afify, A. H. (2024). Antifungal Activity of *Bacillus* Species against Damping-off Fungi. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 15(3), 53–57. <https://doi.org/10.21608/JACB.2024.273932.1078>
- Auch, A. F., Von Jan, M., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2, 117–134. <https://doi.org/10.4056/sigs.531120>

- Ayamba, B. E., Abaidoo, R. C., Opoku, A., & Ewusi-Mensah, N. (2023). Mechanisms for nutrient interactions from organic amendments and mineral fertilizer inputs under cropping systems: a review. *PeerJ*, *11*, e15135. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.15135/SUPP-1>
- Ayaz, M., Ali, Q., Farzand, A., Khan, A. R., Ling, H., & Gao, X. (2021). Nematicidal volatiles from *Bacillus atropheus* gbsc56 promote growth and stimulate induced systemic resistance in tomato against *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 5049. <https://doi.org/10.3390/IJMS22095049/S1>
- Ayed, A., Kalai-Grami, L., Ben Slimene, I., Chaouachi, M., Mankai, H., Karkouch, I., Djebali, N., Elkahoui, S., Tabbene, O., & Limam, F. (2021). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces* sp. strain S97 against *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1947982>
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Gil-Sánchez, I., Victoria Moreno-Arribas, M., Bartolomé, B., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Matarromera, B., & Ctra San Bernardo, S. (2019a). Antioxidant Characterization and Biological Effects of Grape Pomace Extracts Supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods* <https://doi.org/10.3390/foods8020075>
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2020). *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism to Evaluate the Antioxidant Effects of Phytochemicals. *Molecules*, *25*(14). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25143194>
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Miranda-Vizueté, A., Dueñas, M., Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2019b). Epicatechin modulates stress-resistance in *C. elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway. *PLOS ONE*, *14*(1), e0199483. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0199483>
- Ayuso-Calles, M., Flores-Félix, J. D., Amaro, F., García-Estévez, I., Jiménez-Gómez, A., de Pinho, P. G., Escribano-Bailón, M. T., & Rivas, R. (2023). Effect of *Rhizobium* mechanisms in improving tolerance to saline stress in lettuce plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/S40538-023-00463-Y>
- Ayuso-Calles, M., García-Estévez, I., Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J. D., Escribano-Bailón, M. T., & Rivas, R. (2020). *Rhizobium laguerreae* Improves Productivity and Phenolic Compound Content of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) under Saline Stress Conditions. *Foods*, *9*(9), 1166. <https://doi.org/10.3390/foods9091166>
- Aznar, A., & Dellagi, A. (2015). New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*, *66*(11), 3001–3010. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERV155>

- Babenko, L. M., Kosakivska, I. V., & Romanenko, K. (2022). Molecular mechanisms of N-acyl homoserine lactone signals perception by plants. *Cell Biology International*, 46(4), 523–534. <https://doi.org/10.1002/CBIN.11749>
- Bailly, A., & Weisskopf, L. (2017). Mining the Volatilomes of Plant-Associated Microbiota for New Biocontrol Solutions. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01638>
- Bakhshandeh, E., Pirdashti, H., & Lendeh, K. S. (2017). Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. *Ecological Engineering*, 103, 164–169. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2017.03.008>
- Banerjee, S., & van der Heijden, M. G. A. (2022). Soil microbiomes and one health. *Nature Reviews Microbiology* 2022 21:1, 21(1), 6–20. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00779-w>
- Basile, B., Roupheal, Y., Colla, G., Soppelsa, S., & Andreotti, C. (2020). Appraisal of emerging crop management opportunities in fruit trees, grapevines and berry crops facilitated by the application of biostimulants. *Scientia Horticulturae*, 267, 109330. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2020.109330>
- Batool, S., & Iqbal, A. (2019). Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1400–1410. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.024>
- Baweja, P., Kumar, S., Kumar, G., Baweja, P., Kumar, S., & Kumar, G. (2020). Fertilizers and Pesticides: Their Impact on Soil Health and Environment. *Soil health* 265–285. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44364-1_15
- Becker, M. F., Hellmann, M., & Knief, C. (2022). Spatio-temporal variation in the root-associated microbiota of orchard-grown apple trees. *Environmental Microbiomes*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S40793-022-00427-Z/TABLES/1>
- Beckers, B., De Beeck, M. O., Weyens, N., Boerjan, W., & Vangronsveld, J. (2017). Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. *Microbiome* 2017 5:1, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S40168-017-0241-2>
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2017). The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. *Toxins*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/TOXINS9040112>
- Bell-Dereske, L. P., Benucci, G. M. N., da Costa, P. B., Bonito, G., Friesen, M. L., Tiemann, L. K., & Evans, S. E. (2023). Regional biogeography versus intra-annual dynamics of the root and soil microbiome. *Environmental Microbiome*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S40793-023-00504-X>

- Benaissa, A., & Boumediene-El-Alia Bab Ezzouar Algiers, H. (2024). Rhizosphere: Role of bacteria to manage plant diseases and sustainable agriculture—A review. *Journal of Basic Microbiology*, 64(3), 2300361. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202300361>
- Beneduzi, A., Ambrosini., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 (suppl)), 1044–1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>
- Berg, G., & Cernava, T. (2022). The plant microbiota signature of the Anthropocene as a challenge for microbiome research. *Microbiome*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40168-021-01224-5/FIGURES/1>
- Berg, G., Kusstatscher, P., Abdelfattah, A., Cernava, T., & Smalla, K. (2021). Microbiome Modulation-Toward a Better Understanding of Plant Microbiome Response to Microbial Inoculants. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.650610>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G. S., Selvin, J., Soares Correa de Souza, R., van Overbeek, L., Singh, B. K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A. & Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00875-0/FIGURES/7>
- Bhattacharya, A. (2019). Changing Environmental Condition and Phosphorus-Use Efficiency in Plants. In *Changing Climate and Resource Use Efficiency in Plants* (pp. 241–305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816209-5.00005-2>
- Bhuyan, B., & Dutta, A. (2021). A review on the phytochemical, pharmacological and traditional profile on the *Rubus* genus in north-eastern and western parts of India. *Current Trends in Pharmaceutical Research*. www.dibru.ac.in/ctpr
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2022.08.024>
- Bilous, S., Likhanov, A., Boroday, V., Marchuk, Y., Zelena, L., Subin, O., & Bilous, A. (2023). Antifungal Activity and Effect of Plant-Associated Bacteria on Phenolic Synthesis of *Quercus robur* L. *Plants* 2023, Vol. 12, Page 1352, 12(6), 1352. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12061352>
- Birt, D. F., & Jeffery, E. (2013). Flavonoids. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(5), 576–577. <https://doi.org/10.3945/AN.113.004465>

Blandón, L. M., Marín, M. A., Quintero, M., Jutinico-Shubach, L. M., Montoya-Giraldo, M., Santos-Acevedo, M., & Gómez-León, J. (2022). Diversity of cultivable bacteria from deep-sea sediments of the Colombian Caribbean and their potential in bioremediation. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *115*(3), 421–431. <https://doi.org/10.1007/S10482-021-01706-4/FIGURES/4>

Bolívar-Anillo, H. J., Garrido, C., & Collado, I. G. (2020). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*, *19*(3), 721–740. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/S41587-019-0209-9>

Borriss, R. (2014). Bacillus, a plant-beneficial bacterium. In *Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture* (pp. 379-391). Cham: Springer international publishing.

Boubekri, K., Soumare, A., Mardad, I., Lyamlouli, K., Ouhdouch, Y., Hafidi, M., & Kouisni, L. (2022). Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: A review. *Microbiological Research*, *261*, 127059. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127059>

Bray, J.R. & Curtis, J.T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, *27*(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>

Brigham, C. (2017). Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics. In *Green Chemistry: An Inclusive Approach* (pp. 753–770). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00027-3>

Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host and Microbe*, *17*(3), 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>

Bulgari, D., Casati, P., Quaglino, F., & Bianco, P. A. (2014). Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection

process. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-198/TABLES/6>

Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2019). The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiology*, *82*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.01.010>

Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, *166*, 111208. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2020.111208>

Cantu, D., Carl Greve, L., Labavitch, J. M., & Powell, A. L. T. (2009). Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, *113*(12), 1396–1403. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.006>

Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>

Carranza, A. del V., Saragusti, A., Chiabrando, G. A., Carrari, F., & Asis, R. (2020). Effects of chlorogenic acid on thermal stress tolerance in *C. elegans* via HIF-1, HSF-1 and autophagy. *Phytomedicine*, *66*, 153132. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2019.153132>

Carroll, A. L., Desai, S. H., & Atsumi, S. (2016). Microbial production of scent and flavor compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, *37*, 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2015.09.003>

Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. In *3 Biotech* (Vol. 6, Issue 2). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>

Chandler, D., Bailey, A. S., Mark Tatchell, G., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *366*(1573), 1987. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0390>

Chandra, S., Askari, K., & Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.09.001>

Chaouachi, M., Marzouk, T., Jallouli, S., Elkahoui, S., Gentzbittel, L., Ben, C., & Djéballi, N. (2021). Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive

compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 172, 111389.

Charmet, G. (2011). Wheat domestication: Lessons for the future. In *Comptes Rendus - Biologies* (Vol. 334, Issue 3, pp. 212–220). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.013>

Chaudhari S.S. & Gokhale, D.V. (2016). Phenyllactic acid: a potential antimicrobial compound in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access, Volume 2*(Issue 5). <https://doi.org/10.15406/JBMOA.2016.02.00037>

Chaudhary, T., Gera, R., & Shukla, P. (2021). Deciphering the Potential of *Rhizobium pusense* MB-17a, a Plant Growth-Promoting Root Endophyte, and Functional Annotation of the Genes Involved in the Metabolic Pathway. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 617034. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.617034/BIBTEX>

Chávez Díaz, L., González, P., Rubio, E., & Melchiorre, M. (2013). Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1153–1165. <https://doi.org/10.1007/S00374-013-0814-6>

Chazarra-Bernabé, A., Lorenzo Mariño, B., Romero Fresneda, R., & Moreno García, J. V. (2022). *Evolución de los climas de Köppen en España en el periodo 1951-2020*. <https://doi.org/https://doi.org/10.31978/666-22-011-4>

Chen, C. T., & Liao, J. C. (2016). Frontiers in microbial 1-butanol and isobutanol production. *FEMS Microbiology Letters*, 363(5), 20. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNW020>

Chen, M. S., Li, F. N., Chen, X. H., Huang, Z. H., Yan, X. R., & Tuo, L. (2021b). *Jiella mangrovi* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from leaf of *Rhizophora stylosa*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 114(10), 1633–1645. <https://doi.org/10.1007/S10482-021-01629-0/TABLES/5>

Chen, W. C., Ko, C. H., Su, Y. S., Lai, W. A., & Shen, F. T. (2021a). Metabolic potential and community structure of bacteria in an organic tea plantation. *Applied Soil Ecology*, 157, 103762. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2020.103762>

Chen, X. H., Li, F., Li, F. N., Chen, M. S., Yan, X. R., He, Z. B., Li, S. L., Wu, Y. L., & Tuo, L. (2021c). *Nocardioides acrostichi* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from leaf of *Acrostichum aureum*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 114(4), 479–486. <https://doi.org/10.1007/S10482-021-01535-5/TABLES/1>

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), 5183–5191. <https://doi.org/10.1128/jb.180.19.5183-5191.1998>

Cheng, Y., Narayanan, M., Shi, X., Chen, X., Li, Z., & Ma, Y. (2023). Phosphate-solubilizing bacteria: Their agroecological function and optimistic application for enhancing agro-productivity. *Science of The Total Environment*, 901, 166468. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.166468>

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., & Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3497–3500. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG500>

Chhetri, G., Kim, I., Kang, M., So, Y., Kim, J., & Seo, T. (2022). An Isolated *Arthrobacter* sp. Enhances Rice (*Oryza sativa* L.) Plant Growth. *Microorganisms*, 10(6), 1187. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10061187/S1>

Chitarra, G.S., Breeuwer, P., Nout, M.J.R., van Aelst, A.C., Rombouts, F.M. & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 159–166. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2003.01819.X>

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X. W., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461–466. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002516/CITE/REFWORKS>

Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4), 1–74. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>

Clements-Decker, T., Kode, M., Khan, S., & Khan, W. (2022). Underexplored bacteria as reservoirs of novel antimicrobial lipopeptides. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1025979. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.1025979/BIBTEX>

Coale, T. H., Loconte, V., Turk-Kubo, K. A., Vanslebrouck, B., Mak, W. K. E., Cheung, S., Ekman, A., Chen, J. H., Hagino, K., Takano, Y., Nishimura, T., Adachi, M., Le Gros, M., Larabell, C., & Zehr, J. P. (2024). Nitrogen-fixing organelle in a marine alga. *Science (New York, N.Y.)*, 384(6692), 217–222. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ADK1075>

Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P., & Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *The New Phytologist*, 209(2), 798. <https://doi.org/10.1111/NPH.13697>

- Comeau, D., Novinscak, A., Joly, D. L., & Fillion, M. (2020). Spatio-Temporal and Cultivar-Dependent Variations in the Cannabis Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00491>
- Constantin, M. E., de Lamo, F. J., Vlieger, B. V., Rep, M., & Takken, F. L. W. (2019). Endophyte-Mediated Resistance in Tomato to *Fusarium oxysporum* Is Independent of ET, JA, and SA. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00979/FULL>
- Contreras, M., Loeza, P. D., Villegas, J., Farias, R., & Santoyo, G. (2016). A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genetics and Molecular Research*, *15*(3). <https://doi.org/10.4238/gmr.15038542>
- Cosme, F., Pinto, T., Aires, A., Morais, M. C., Bacelar, E., Anjos, R., Ferreira-Cardoso, J., Oliveira, I., Vilela, A., & Gonçalves, B. (2022). Red Fruits Composition and Their Health Benefits—A Review. *Foods*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/FOODS11050644>
- Cosseboom, S. D., Schnabel, G., & Hu, M. (2020). Competitive ability of multi-fungicide resistant *Botrytis cinerea* in a blackberry planting over three years. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *163*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2019.11.008>
- Costacurta, A., Mazzafera, P., & Rosato, Y. B. (1998). Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. *FEMS Microbiology Letters*, *159*(2), 215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12863.x>
- Cronk, D. H., Zopf, L. C., & Jones, J. W. (1959). Synthesis and Antifungal Studies on Sorbic Acid Derivatives. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, *48*(8), 455–457. <https://doi.org/10.1002/JPS.3030480809>
- Cueva-Yesquén, L. G., Sartoratto, A., da Silva Santos, A., de Melo, I. S., & Fantinatti-Garboggini, F. (2024). *Pseudomonas flavocrustae* sp. nov., an endophyte with plant growth promoting traits isolated from *Passiflora incarnata*. *Scientific Reports 2024 14:1*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64349-1>
- Cui, Z., Wang, Z., Zheng, M., & Chen, T. (2022). Advances in biological production of acetoin: a comprehensive overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, *42*(8), 1135–1156. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1995319>
- Custer, G. F., Gans, M., van Diepen, L. T. A., Dini-Andreote, F., & Buerkle, C. A. (2023). Comparative Analysis of Core Microbiome Assignments: Implications for Ecological Synthesis. *MSystems*, *8*(1). https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.01066-22/SUPPL_FILE/REVIEWER-COMMENTS.PDF
- da Silva, L. P., Pereira, E., Pires, T. C. S. P., Alves, M. J., Pereira, O. R., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). *Rubus ulmifolius* Schott fruits: A detailed study of its

nutritional, chemical and bioactive properties. *Food Research International*, 119, 34–43. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.052>

Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 6, pp. 470–478). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1160>

Dashadi, M., Khosravi, H., Moezzi, A., & Nadian, H. (2011). Co-Inoculation of *Rhizobium* and *Azotobacter* on Growth Indices of Faba Bean under Water Stress in the Green House Condition. *Advanced Studies in Biology*, 3(8), 373–385.

Dastogeer, K. M. G., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A., & Chakraborty, A. (2020). Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Current Plant Biology*, 23. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2020.100161>

De Cesare, G. B., Cristy, S. A., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2020). Antimicrobial peptides: A new frontier in antifungal therapy. *MBio*, 11(6), 1–21. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02123-20>

De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K., & Gillis, M. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 715–733. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-715/CITE/REFWORKS>

de los Santos-Villalobos, S., de Folter, S., Délano-Frier, J. P., Gómez-Lim, M. A., Guzmán-Ortiz, D. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2013). Growth Promotion and Flowering Induction in Mango (*Mangifera indica* L. cv “Ataulfo”) Trees by *Burkholderia* and *Rhizobium* Inoculation: Morphometric, Biochemical, and Molecular Events. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), 615–627. <https://doi.org/10.1007/S00344-013-9329-5/FIGURES/4>

de Matos Nascimento, A., Maciel, A. M., Silva, J. B. G., Mendonça, H. V., de Paula, V. R., & Otenio, M. H. (2020). Biofertilizer Application on Corn (*Zea mays*) Increases the Productivity and Quality of the Crop Without Causing Environmental Damage. *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(8), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11270-020-04778-6/TABLES/7>

de Simone, N., Capozzi, V., de Chiara, M. L. V., Amodio, M. L., Brahim, S., Colelli, G., Drider, D., Spano, G., & Russo, P. (2021). Screening of lactic acid bacteria for the bio-control of *Botrytis cinerea* and the potential of *Lactiplantibacillus plantarum* for eco-friendly preservation of fresh-cut kiwifruit. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040773>

de Souza, R. S. C., Okura, V. K., Armanhi, J. S. L., Jorrín, B., Lozano, N., Da Silva, M. J., González-Guerrero, M., De Araújo, L. M., Verza, N. C., Bagheri, H. C., Imperial, J.,

- & Arruda, P. (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP28774>
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. In *Genetics and Molecular Biology* (Vol. 38, Issue 4, pp. 401–419). Brazilian Journal of Genetics. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Deb, C. R., & Tatung, M. (2024). Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*, 165, 153–162. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.12.031>
- Debez, I. B. S., Alaya, A. Ben, Karkouch, I., Khiari, B., Garcia-Caparros, P., Alyami, N. M., Debez, A., Tarhouni, B., & Djébal, N. (2024). *In vitro* and *in vivo* antifungal efficacy of individual and consortium Bacillus strains in controlling potato black scurf and possible development of spore-based fungicide. *Biological Control*, 193, 105527. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2024.105527>
- Delaux, P. M., & Schornack, S. (2021). Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6531). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA6605>
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, 45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Diakite, A., Dubourg, G., Dione, N., Afouda, P., Bellali, S., Ngom, I. I., Valles, C., Tall, M. L., Lagier, J. C., & Raoult, D. (2020). Optimization and standardization of the culturomics technique for human microbiome exploration. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66738-8>
- Díaz Ricci, J. C., González-Candelas, L., Prusky, D. B., Moser, C., & Baraldi, E. (2020). Editorial: Interplay Between Fungal Pathogens and Fruit Ripening. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11, p. 275). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00275>
- Dilberger, B., Wepler, S., & Eckert, G. P. (2021). Phenolic acid metabolites of polyphenols act as inductors for hormesis in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 198, 111518. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2021.111518>
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D. G., & Skandalis, N. (2021). Direct Antibiotic Activity of Bacillibactin Broadens the Biocontrol Range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *MSphere*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00376-21>
- Dinesh Kumar, S., Suhameena, B., Uma Devi, S., & Shyamala Gowri, R. (2020). Utilization of *Azospirillum* as a biofertilizer-An overview. *Article in International*

Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 62(2), 141–145.
www.globalresearchonline.net

Dini-Andreote, F. (2020). Endophytes: The Second Layer of Plant Defense. *Trends in Plant Science*, 25(4), 319–322. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2020.01.007>

Dinno, A. (2015). Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn’s test. *The Stata Journal*, 15(1), 292–300.

Djurić, M., Maškovic, P., Murtić, S., Veljković, B., Čurčić, S., Paunović, G., & Rakočević, L. B. (2014). Quantitation of ellagic acid in blackberries. *Hemijska Industrija*, 68(2), 241–245. <https://doi.org/10.2298/HEMIND130306048D>

dos Santos, C., & Franco, O. L. (2023). Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. *Plants 2023, Vol. 12, Page 2226*, 12(11), 2226. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12112226>

Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology* 2020 38:6, 38(6), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>

Dsouza, M., Taylor, M. W., Turner, S. J., & Aislabie, J. (2015). Genomic and phenotypic insights into the ecology of *Arthrobacter* from Antarctic soils. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1220-2>

Duangjan, C., Rangsinth, P., Gu, X., Wink, M., & Tencomnao, T. (2019). Lifespan Extending and Oxidative Stress Resistance Properties of a Leaf Extracts from *Anacardium occidentale* L. in *Caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9012396>

Dueñas, M., Martínez-Villaluenga, C., Limón, R. I., Peñas, E., & Frias, J. (2015). Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Research International*, 70, 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.01.018>

Eida, A. A., Bougouffa, S., Alam, I., Saad, M. M., & Hirt, H. (2020). Complete genome sequence of the endophytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. JZ28 isolated from the root endosphere of the perennial desert tussock grass *Panicum turgidum*. *Archives of Microbiology*, 202(6), 1563–1569. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-01859-2/FIGURES/1>

Ekyastuti, W., Astiani, D., & Roslinda, E. (2022). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Viability of biofertilizer bacteria Rhizobium spp based on household waste You may also like Population of Rhizosphere Bacteria on Several Species of Crops In The Tailings of Ex-Gold Mine*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/980/1/012009>

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (2004). *Botrytis*: Biology, pathology and control. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Issue September, pp. 1–403). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>

Elías, J. M., Guerrero-Molina, M. F., Martínez-Zamora, M. G., Díaz-Ricci, J. C., & Pedraza, R. O. (2018). Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Plant Biology*, 20(3), 490–496. <https://doi.org/10.1111/PLB.12697>

Etesami, H., Etesami, H., Alikhani, H. A., & Akbari, A. A. (2009). Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes. *World Applied Sciences Journal*, 6(11), 1576–1584.

Fahde, S., Boughribil, S., Sijilmassi, B., & Amri, A. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture 2023*, Vol. 13, Page 1279, 13(7), 1279. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE13071279>

Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017b). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 237721. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00022/BIBTEX>

Fan, F., Hamada, M. S., Li, N., Li, G. Q., & Luo, C. X. (2017a). Multiple Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Greenhouse Strawberries in Hubei Province, China. *Plant Disease*, 101(4), 601–606. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1227-RE>

FAO STATISTICS. (2023). <https://doi.org/10.4060/cc8166en>

Farag, M. A., Zhang, H., & Ryu, C. M. (2013). Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 1007–1018. <https://doi.org/10.1007/S10886-013-0317-9/FIGURES/4>

Farda, B., Mattedi, A., Djebaili, R., Pace, L., Del Gallo, M., & Pellegrini, M. (2022). Microbial Community Investigation of Wild Brambles with Root Nodulation from a Calcareous Nitrogen-Deficient Soil. *Soil Systems*, 6(4), 96. <https://doi.org/10.3390/SOILSYSTEMS6040096/S1>

Feng, H., Fu, R., Hou, X., Lv, Y., Zhang, N., Liu, Y., Xu, Z., Miao, Y., Krell, T., Shen, Q., & Zhang, R. (2021). Chemotaxis of Beneficial Rhizobacteria to Root Exudates: The First Step towards Root–Microbe Rhizosphere Interactions. *International Journal of Molecular Sciences 2021*, Vol. 22, Page 6655, 22(13), 6655. <https://doi.org/10.3390/IJMS22136655>

Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F. M., & Dewdney, J. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent

of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology*, *144*(1), 367–379. <https://doi.org/10.1104/pp.107.095596>

Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., González-Buitrago, J. M., & Velázquez, E. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. *PLoS ONE*, *6*(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0020223>

Fett, W. F., Osman, S. F., & Dunn, M. F. (1987). Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(8), 1839–1845. <https://doi.org/10.1128/aem.53.8.1839-1845.1987>

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. In *Nature* (Vol. 484, Issue 7393, pp. 186–194). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nature10947>

Flores-Félix, J. D., Carro, L., Cerda-Castillo, E., Squartini, A., Rivas, R., & Velázquez, E. (2020). Analysis of the Interaction between *Pisum sativum* L. and *Rhizobium laguerreae* Strains Nodulating This Legume in Northwest Spain. *Plants*, *9*(12), 1755. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9121755>

Flores-Félix, J. D., Gonçalves, A. C., Meirinho, S., Nunes, A. R., Alves, G., Garcia-Viguera, C., Moreno, D. A., & Silva, L. R. (2024). Differential response of blueberry to the application of bacterial inoculants to improve yield, organoleptic qualities and concentration of bioactive compounds. *Microbiological Research*, *278*, 127544. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2023.127544>

Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Marcos-García, M., Celador-Lera, L., Rivas, R., Pastorino, L., & Singh Meena, V. (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 & Biotechnology*, *2*(1), 65–70. <https://doi.org/10.9734/JABB/2015/12444>

Flores-Félix, J. D., Velázquez, E., García-Fraile, P., González-Andrés, F., Silva, L. R., & Rivas, R. (2018). *Rhizobium* and *Phyllobacterium* bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. *Food Research International*, *111*(May), 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.059>

Flores-Félix, J. D., Velázquez, E., Martínez-Molina, E., González-Andrés, F., Squartini, A., & Rivas, R. (2021). Connecting the lab and the field: Genome analysis of *Phyllobacterium* and *Rhizobium* strains and field performance on two vegetable crops. *Agronomy*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy11061124>

- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2019 35:10, 35(10), 1–19. <https://doi.org/10.1007/S11274-019-2728-4>
- Fu, J., & Wang, S. (2011). Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 2(NOV). <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00074>
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 195–206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00044.x>
- Fuke, P., T, M. M., Kumar, M., Sawarkar, A. D., Pandey, A., & Singh, L. (2021). Role of microbial diversity to influence the growth and environmental remediation capacity of bamboo: A review. *Industrial Crops and Products*, 167, 113567. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113567>
- Gagné-Bourque, F., Bertrand, A., Claessens, A., Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2016). Alleviation of drought stress and metabolic changes in timothy (*Phleum pratense* L.) colonized with *Bacillus subtilis* B26. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAY2016), 584. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00584/BIBTEX>
- Galicia-Campos, E., García-Villaraco, A., Montero-Palmero, M. B., Gutiérrez-Mañero, F. J., & Ramos-Solano, B. (2022). *Bacillus* H47 triggers *Olea europaea* metabolism activating DOXP and shikimate pathways simultaneously and modifying leaf extracts' antihypertensive activity. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1005865>
- Gan, R. Y., Chan, C. L., Yang, Q. Q., Li, H. Bin, Zhang, D., Ge, Y. Y., Gunaratne, A., Ge, J., & Corke, H. (2019). Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. *Sprouted Grains: Nutritional Value, Production, and Applications*, 191–246. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00009-9>
- Gao, H., Guo, M., Song, J., Ma, Y., & Xu, Z. (2021). Signals in systemic acquired resistance of plants against microbial pathogens. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3747–3759. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06344-7/FIGURES/1>
- Gao, S., Zhang, Y., Jiang, N., Luo, L., Li, Q. X., & Li, J. (2015). *Novosphingobium fluoreni* sp. nov., isolated from rice seeds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(5), 1409–1414. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000111>
- Gao, Y., Feng, J., Wu, J., Wang, K., Wu, S., Liu, H., & Jiang, M. (2022). Transcriptome analysis of the growth-promoting effect of volatile organic compounds produced by *Microbacterium aurantiacum* GX14001 on tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *BMC Plant Biology*, 22(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12870-022-03591-Z/TABLES/1>
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., & Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds

against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>

Garbeva, P., & Weiskopf, L. (2020). Airborne medicine: bacterial volatiles and their influence on plant health. *New Phytologist*, 226(1), 32–43. <https://doi.org/10.1111/NPH.16282>

García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Fernández, M. T., Mateos, P. F., Rivas, R., Igual, J. M., Martínez-Molina, E., Peix, Á., & Velázquez, E. (2012). Rhizobium Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. *PLOS ONE*, 7(5), e38122. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0038122>

Garske, B., Heyl, K., Ekardt, F., Weber, L. M., & Gradzka, W. (2020). Challenges of Food Waste Governance: An Assessment of European Legislation on Food Waste and Recommendations for Improvement by Economic Instruments. *Land 2020, Vol. 9, Page 231*, 9(7), 231. <https://doi.org/10.3390/LAND9070231>

Gelman, R., Potruch, A., Oster, Y., Ishay, Y., Gur, C., Beeri, R., & Strahilevitz, J. (2022). Native aortic valve *Staphylococcus warneri* endocarditis after COVID-19 infection: a case report and a review of literature. *APMIS*, 130(5), 270–275. <https://doi.org/10.1111/APM.13217>

Gen-Jiménez, A., Flores-Félix, J. D., Rincón-Molina, C. I., Manzano-Gomez, L. A., Rogel, M. A., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Rincón-Molina, F. A., & Rincón-Rosales, R. (2023). Enhance of tomato production and induction of changes on the organic profile mediated by *Rhizobium* biofortification. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1235930. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1235930/FULL>

Ghio, S., Bradanini, M. B., Garrido, M. M., Ontañon, O. M., Piccinni, F. E., Marrero Diaz de Villegas, R., Talia, P. M., & Campos, E. (2020). Synergic activity of Cel8Pa β -1,4 endoglucanase and Bgl1Pa β -glucosidase from *Paenibacillus xylanivorans* A59 in beta-glucan conversion. *Biotechnology Reports*, 28, e00526. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2020.E00526>

Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23(6), 80–84. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>

Glick, B. R., & Gamalero, E. (2021). Recent Developments in the Study of Plant Microbiomes. *Microorganisms*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9071533>

Gohil, R. B., Raval, V. H., Panchal, R. R., & Rajput, K. N. (2022). Plant Growth-Promoting Activity of *Bacillus* sp. PG-8 Isolated From Fermented Panchagavya and Its

Effect on the Growth of *Arachis hypogea*. *Frontiers in Agronomy*, 4, 805454. <https://doi.org/10.3389/FAGRO.2022.805454/BIBTEX>

Gonçalves, A. C., Sánchez-Juanes, F., Meirinho, S., Silva, L. R., Alves, G., & Flores-Félix, J. D. (2022). Insight into the Taxonomic and Functional Diversity of Bacterial Communities Inhabiting Blueberries in Portugal. *Microorganisms*, 10(11), 2193. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10112193/S1>

González-Paramás, A. M., Brighenti, V., Bertoni, L., Marcelloni, L., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Pellati, F., & Santos-Buelga, C. (2020). Assessment of the *In Vivo* Antioxidant Activity of an Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Using the *Caenorhabditis elegans* Model. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 509, 9(6), 509. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9060509>

Gottel, N. R., Castro, H. F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D. A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E. D., Tuskan, G. A., Vilgalys, R., Doktycz, M. J., & Schadt, C. W. (2011). Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of *Populus deltoides* Roots across Contrasting Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 5934. <https://doi.org/10.1128/AEM.05255-11>

Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1538. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01538/BIBTEX>

Govrin, E. M. & Levine, A. (2002). Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Molecular Biology*, 48(3), 267–276. <https://doi.org/10.1023/A:1013323222095>

Gow, N. A. R., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. In *The Fungal Kingdom* (Vol. 5, Issue 3, pp. 267–292). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>

Grahovac, J., Pajčin, I., & Vljakov, V. (2023). *Bacillus* VOCs in the Context of Biological Control. *Antibiotics* 2023, Vol. 12, Page 581, 12(3), 581. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12030581>

Grover, J. P., Scott, J. T., Roelke, D. L., & Brooks, B. W. (2022). Competitive superiority of N-fixing cyanobacteria when fixed N is scarce: Reconsiderations based on a model with heterocyst differentiation. *Ecological Modelling*, 466, 109904. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLMODEL.2022.109904>

Grünz, G., Haas, K., Soukup, S., Klingenspor, M., Kulling, S. E., Daniel, H., & Spanier, B. (2012). Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2011.11.005>

Gu, Y. Q., Wildermuth, M. C., Chakravarthy, S., Loh, Y. T., Yang, C., He, X., Han, Y., & Martin, G. B. (2002). Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *14*(4), 817–831. <https://doi.org/10.1105/TPC.000794>

Guerra, C. A., Heintz-Buschart, A., Sikorski, J., Chatzinotas, A., Guerrero-Ramírez, N., Cesarz, S., Beaumelle, L., Rillig, M. C., Maestre, F. T., Delgado-Baquerizo, M., Buscot, F., Overmann, J., Patoine, G., Phillips, H. R. P., Winter, M., Wubet, T., Küsel, K., Bardgett, R. D., Cameron, E. K., ... Eisenhauer, N. (2020). Blind spots in global soil biodiversity and ecosystem function research. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-17688-2>

Guevara-Avenidaño, E., Bravo-Castillo, K. R., Monribot-Villanueva, J. L., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J. A., & Reverchon, F. (2020). Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(3), 861–873. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00249-6>

Guha, S., Natarajan, O., Murbach, C. G., Dinh, J., Wilson, E. C., Cao, M., Zou, S., & Dong, Y. (2014). Supplement Timing of Cranberry Extract Plays a Key Role in Promoting *Caenorhabditis elegans* Healthspan. *Nutrients*, *6*(2), 911. <https://doi.org/10.3390/NU6020911>

Gull, M., & Hafeez, F. Y. (2012). Characterization of siderophore producing bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(33), 6308–6318. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1285>

Gupta, A., Rai, S., Bano, A., Sharma, S., Kumar, M., Binsuwaidan, R., Suhail Khan, M., Upadhyay, T. K., Alshammari, N., Saeed, M., & Pathak, N. (2022). ACC Deaminase Produced by PGPR Mitigates the Adverse Effect of Osmotic and Salinity Stresses in *Pisum sativum* through Modulating the Antioxidants Activities. *Plants (Basel, Switzerland)*, *11*(24). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11243419>

Gupta, R., Saikia, S. K., & Pandey, R. (2017). Bioconsortia Augments Antioxidant and Yield in *Matricaria recutita* L. Against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood Infestation. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, *87*(2), 335–342. <https://doi.org/10.1007/S40011-015-0621-Y/FIGURES/4>

Gupta, S., & Pandey, S. (2019). ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French Bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JULY), 1506. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01506>

Gutiérrez Santa Ana, A., Carrillo-Cerda, H. A., Rodríguez-Campos, J., Velázquez-Fernández, J. B., Patrón-Soberano, O. A., & Contreras-Ramos, S. M. (2020). Dynamics

of volatiles emitted during cross-talking of plant-growth-promoting bacteria and the phytopathogen, *Fusarium solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(10), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11274-020-02928-W/TABLES/1>

Gutierrez, A., & Grillo, M. A. (2022). Effects of Domestication on Plant-Microbiome Interactions. *Plant & Cell Physiology*, 63(11), 1654–1666. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCAC108>

Gutierrez-Zetina, S. M., González-Manzano, S., Ayuda-Durán, B., Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2021). Caffeic and Dihydrocaffeic Acids Promote Longevity and Increase Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Modulating Expression of Stress-Related Genes. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1517, 26(6), 1517. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26061517>

Haggag, W. M., Abo, M., & Soud, E. (2012). Production and Optimization of *Pseudomonas fluorescens* Biomass and Metabolites for Biocontrol of Strawberry Grey Mould. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 836–845. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.37101>

Haidar, R., Amira, Y., Roudet, J., Marc, F., & Patrice, R. (2021). Application methods and modes of action of *Pantoea agglomerans* and *Paenibacillus* sp. to control the grapevine trunk disease-pathogen, *Neofusicoccum parvum*. *OENO One*, 55(3), 1–16. <https://doi.org/10.20870/OENO-ONE.2021.55.3.4530>

Haidar. (2017). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(3), 301–322. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18079

Haile, D., Tesfaye, B., & Assefa, F. (2023). Tomato Production under Synergistic Application of Phosphate Solubilizing Bacteria and Phosphate Amendments. *Advances in Agriculture*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/4717693>

Hantke, I., Schäfer, H., Janczikowski, A., & Turgay, K. (2019). YocM a small heat shock protein can protect *Bacillus subtilis* cells during salt stress. *Molecular Microbiology*, 111(2), 423–440. <https://doi.org/10.1111/MMI.14164>

Hao, H. T., Zhao, X., Shang, Q. H., Wang, Y., Guo, Z. H., Zhang, Y. B., Xie, Z. K., & Wang, R. Y. (2016). Comparative Digital Gene Expression Analysis of the *Arabidopsis* Response to Volatiles Emitted by *Bacillus amyloliquefaciens*. *PLOS ONE*, 11(8), e0158621. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0158621>

Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A., Mach, E., & Michele All’adige, S. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>

- Harrison, J. G., & Griffin, E. A. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? *Environmental Microbiology*, 22(6), 2107–2123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968>
- Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207–220. <https://doi.org/10.1016/J.EJAR.2020.08.007>
- He, C. N., Ye, W. Q., Zhu, Y. Y., & Zhou, W. W. (2020). Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. *Molecules*, 25(15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153360>
- Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Annals of Botany*, 89(5), 503–512. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCF076>
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2011). The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cellular Microbiology*, 13(11), 1824–1837. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2011.01664.X>
- Hernández-Fernández, M., Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M., & Cantoral, J. M. (2021). Culturable yeasts as biofertilizers and biopesticides for a sustainable agriculture: A comprehensive review. *Plants*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/plants10050822>
- Herpell, J. B., Alickovic, A., Diallo, B., Schindler, F., & Weckwerth, W. (2023). Phyllosphere symbiont promotes plant growth through ACC deaminase production. *The ISME Journal* 2023 17:8, 17(8), 1267–1277. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01428-7>
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273–290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- Hidalgo, G. I., & Almajano, M. P. (2017). Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. *Antioxidants*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>
- Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., & Numata, K. (2016). A Screening Method for the Isolation of Polyhydroxyalkanoate-Producing Purple Non-sulfur Photosynthetic Bacteria from Natural Seawater. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1509. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01509>

- Hirpara, K. R., Hinsu, A. T., & Kothari, R. K. (2024). Metagenomic evaluation of peanut rhizosphere microbiome from the farms of Saurashtra regions of Gujarat, India. *Scientific Reports 2024 14:1*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61343-5>
- Hong, M., Kwon, J. Y., Shim, J., & Lee, J. (2004). Differential Hypoxia Response of hsp-16 Genes in the Nematode. *Journal of Molecular Biology*, 344(2), 369–381. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2004.09.077>
- Houben, M., & Van de Poel, B. (2019). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in Plant Science*, 10, 464815. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00695/BIBTEX>
- Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7(AUG2016), 205693. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00984/BIBTEX>
- Hsu, S. C., & Lockwood, J. L. (1975). Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Applied Microbiology*, 29(3), 422–426. <https://doi.org/10.1128/AM.29.3.422-426.1975>
- Hu, H.-W., & He, J.-Z. (2018). Manipulating the soil microbiome for improved nitrogen management. *Microbiology Australia*, 39(1), 24–27.
- Hu, L., Xia, M., Gao, X., Huo, Y. X., & Yang, Y. (2021). *Cellulosimicrobium composti* sp. Nov., a thermophilic bacterium isolated from compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(7), 004905. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004905/CITE/REFWORKS>
- Hu, W., Sarengaowa, W., Guan, Y., & Feng, K. (2022). Biosynthesis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1782. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.906069/BIBTEX>
- Huang, L., Fu, Y., Liu, Y., Chen, Y., Wang, T., Wang, M., Lin, X., & Feng, Y. (2024). Global insights into endophytic bacterial communities of terrestrial plants: Exploring the potential applications of endophytic microbiota in sustainable agriculture. *Science of The Total Environment*, 927, 172231. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.172231>
- Huang, R., Feng, H., Xu, Z., Zhang, N., Liu, Y., Shao, J., Shen, Q., & Zhang, R. (2022). Identification of Adhesins in Plant Beneficial Rhizobacteria *Bacillus velezensis* SQR9 and Their Effect on Root Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 35(1), 64–72. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-21-0234-R>
- Huang, T. R., Chen, J. H., Hummer, K. E., Alice, L. A., Wang, W. H., He, Y., Yu, S. X., Yang, M. F., Chai, T. Y., Zhu, X. Y., Ma, L. Q., & Wang, H. (2023). Phylogeny of

Rubus (*Rosaceae*): Integrating molecular and morphological evidence into an infrageneric revision. *TAXON*, 72(2), 278–306. <https://doi.org/10.1002/TAX.12885>

Huerta-Olalde, A. M., Hernández-García, A., López-Gómez, R., Fernández-Pavía, S. P., Zavala-Páramo, M. G., & Salgado-Garciglia, R. (2022). *In vitro* selection of blackberry (*Rubus fruticosus* 'Tupy') plants resistant to *Botrytis cinerea* using gamma ray-irradiated shoot tips. *Plant Biotechnology (Tokyo, Japan)*, 39(2), 165–171. <https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.22.0312B>

Ibrahim, A., Tanney, J. B., Fei, F., Seifert, K. A., Cutler, G. C., Capretta, A., Miller, J. D., & Sumarah, M. W. (2020). Metabolomic-guided discovery of cyclic nonribosomal peptides from *Xylaria ellisii* sp. nov., a leaf and stem endophyte of *Vaccinium angustifolium*. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61088-x>

Islam, M. M., El-Sappah, A. H., Ali, H. M., Zandi, P., Huang, Q., Soaud, S. A., Alazizi, E. M. Y., Wafa, H. A., Hossain, M. A., & Liang, Y. (2023). Pathogenesis-related proteins (PRs) countering environmental stress in plants: A review. *South African Journal of Botany*, 160, 414–427. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.07.003>

Jaiswal, S. K., Mohammed, M., Ibny, F. Y. I., & Dakora, F. D. (2021). Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.619676>

Jakobek, L., & Seruga, M. (2012). Influence of Anthocyanins, Flavonols and Phenolic Acids on the Antiradical Activity of Berries and Small Fruits. *International Journal of Food Properties*, 15(1), 122–133. <https://doi.org/10.1080/10942911003754684>

Jansson, J. K., McClure, R., & Egbert, R. G. (2023). Soil microbiome engineering for sustainability in a changing environment. *Nature Biotechnology* 2023 41:12, 41(12), 1716–1728. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01932-3>

Jayarathne, S., Ramalingam, L., Edwards, H., Vanapalli, S. A., & Moustaid-Moussa, N. (2020). Tart Cherry Increases Lifespan in *Caenorhabditis elegans* by Altering Metabolic Signaling Pathways. *Nutrients*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/NU12051482>

Jennings, S. N. (2018). Advances in *Rubus* Breeding. In *Raspberry* (pp. 17–28).

Jiang, C. H., Liao, M. J., Wang, H. K., Zheng, M. Z., Xu, J. J., & Guo, J. H. (2018). *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 126, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.017>

Jiang, H. Y., Zhang, J. L., Yang, J. W., & Ma, H. L. (2018). Transcript Profiling and Gene Identification Involved in the Ethylene Signal Transduction Pathways of Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*) during ISR Response Induced by Butanediol.

Molecules 2018, Vol. 23, Page 706, 23(3), 706.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES23030706>

Jiao, X., Takishita, Y., Zhou, G., & Smith, D. L. (2021). Plant Associated Rhizobacteria for Biocontrol and Plant Growth Enhancement. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12, p. 17). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796>

Jiménez-Gómez, A., Celador-Lera, L., Fradejas-Bayón, M., & Rivas, R. (2017). Plant probiotic bacteria enhance the quality of fruit and horticultural crops. *AIMS Microbiology*, 3(3), 483. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2017.3.483>

Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J. D., García-Fraile, P., Mateos, P. F., Menéndez, E., Velázquez, E., & Rivas, R. (2018). Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*, 8(1), 295. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18632-z>

Jiménez-Gómez, A., García-Estévez, I., García-Fraile, P., Escribano-Bailón, M. T., & Rivas, R. (2020). Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2742–2749. <https://doi.org/10.1002/JSFA.10306>

Jini, D., Ganga, V. S., Greeshma, M. B., Sivashankar, R., & Thirunavukkarasu, A. (2023). Sustainable agricultural practices using potassium-solubilizing microorganisms (KSMs) in coastal regions: a critical review on the challenges and opportunities. *Environment, Development and Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/S10668-023-03199-9>

Johnson, T. E. (2003). Advantages and disadvantages of *Caenorhabditis elegans* for aging research. *Experimental Gerontology*, 38(11–12), 1329–1332. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.10.020>

Jones, P., Garcia, B. J., Furches, A., Tuskan, G. A., & Jacobson, D. (2019). Plant host-associated mechanisms for microbial selection. *Frontiers in Plant Science*, 10(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00862>

Kaewkla, O., Koomsiri, W., Thamchaipenet, A., & Franco, C. M. M. (2020). *Microbispora clausenae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a thai medicinal plant, *Clausena excavala* burm. f. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6213–6219. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004518/CITE/REFWORKS>

Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. In *International Journal of Agronomy* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>

Kalpana, K., Montenegro, D., Romero, G., Peralta, X., Oksuz, B. A., Heguy, A., Tsuji, M., & Kawamura, A. (2019). Abundance of Plant-Associated Gammaproteobacteria

Correlates with Immunostimulatory Activity of *Angelica sinensis*. *Medicines*, 6(2), 62. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES6020062>

Kamran, M., Imran, Q. M., Ahmed, M. B., Falak, N., Khatoon, A., & Yun, B. W. (2022). Endophyte-Mediated Stress Tolerance in Plants: A Sustainable Strategy to Enhance Resilience and Assist Crop Improvement. *Cells*, 11(20). <https://doi.org/10.3390/CELLS11203292>

Kandel, S. L., Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2017). Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5040077>

Karagöz, K., Ateş, F., Karagöz, H., Kotan, R., & Çakmakçı, R. (2012). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. *European Journal of Soil Biology*, 50, 144–150. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2012.01.007>

Kashyap, A. S., Manzar, N., Nebapure, S. M., Rajawat, M. V. S., Deo, M. M., Singh, J. P., Kesharwani, A. K., Singh, R. P., Dubey, S. C., & Singh, D. (2022). Unraveling Microbial Volatile Elicitors Using a Transparent Methodology for Induction of Systemic Resistance and Regulation of Antioxidant Genes at Expression Levels in Chili against Bacterial Wilt Disease. *Antioxidants*, 11(2), 404. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11020404/S1>

Kassam, A., & Kassam, L. (2021). Paradigms of agriculture. *Rethinking Food and Agriculture: New Ways Forward*, 181–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816410-5.00010-4>

Kaul, S., Sharma, T., & Dhar, M. K. (2016). “Omics” tools for better understanding the plant–endophyte interactions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 183603. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00955/BIBTEX>

Kers, J. G., & Saccenti, E. (2022). The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Frontiers in Microbiology*, 12, 796025. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.796025/BIBTEX>

Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A., & Lee, I. J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 58–64. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2016.02.001>

Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L., Jung, H. Y., & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(8), 689–695. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>

- Khan, A., Abbas Khan, R., Ali, M., & Khan Shinwari, Z. (2023b). Impact of plant growth promoting rhizobacteria biofertilizers on biochemical attributes, antioxidant activities, nutritional values and productivity of maize. *Pak. J. Bot*, 55(6), 2057–2066. [https://doi.org/10.30848/PJB2023-6\(33\)](https://doi.org/10.30848/PJB2023-6(33))
- Khan, M., Ali, S., Al Azzawi, T. N. I., Saqib, S., Ullah, F., Ayaz, A., & Zaman, W. (2023a). The Key Roles of ROS and RNS as a Signaling Molecule in Plant–Microbe Interactions. *Antioxidants* 2023, Vol. 12, Page 268, 12(2), 268. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12020268>
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 2363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Khan, S. S., Verma, V., & Rasool, S. (2020). *Diversity and the role of endophytic bacteria: a review*. 44(2), 103–120. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB2002103K>
- Kim, Y. C., Hur, J. Y., & Park, S. K. (2019). Biocontrol of *Botrytis cinerea* by chitin-based cultures of *Paenibacillus elgii* HOA73. *European Journal of Plant Pathology*, 155(1), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01768-1>
- Kimes, N. E., López-Pérez, M., Flores-Félix, J. D., Ramírez-Bahena, M. H., Igual, J. M., Peix, A., Rodríguez-Valera, F., & Velázquez, E. (2015). *Pseudorhizobium pelagicum* gen. nov., sp. nov. isolated from a pelagic Mediterranean zone. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(5), 293–299. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2015.05.003>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Klee, H., & Tieman, D. (2002). The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum*, 115(3), 336–341. <https://doi.org/10.1034/J.1399-3054.2002.1150302.X>
- Komorsky-Lovrić, Š., & Novak, I. (2011). Abrasive Stripping Square-Wave Voltammetry of Blackberry, Raspberry, Strawberry, Pomegranate, and Sweet and Blue Potatoes. *Journal of Food Science*, 76(6), C916–C920. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2011.02256.X>
- Kong, W. L., Rui, L., Ni, H., & Wu, X. Q. (2020). Antifungal Effects of Volatile Organic Compounds Produced by *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 Against *Colletotrichum gloeosporioides* in *Liriodendron chinense* × *tulipifera*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 542393. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01114/BIBTEX>

- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., & Rubel, F. (2006). World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, *15*(3), 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>
- Kozhar, O., & Peever, T. L. (2018). How does *Botrytis cinerea* infect red raspberry? *Phytopathology*, *108*(11), 1287–1298. https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-18-0016-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-01-18-0016-R_F8.JPEG
- Krein, D. D. C., Rosseto, M., Cemin, F., Massuda, L. A., & Dettmer, A. (2023). Recent trends and technologies for reduced environmental impacts of fertilizers: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology* *2023* *20:11*, *20*(11), 12903–12918. <https://doi.org/10.1007/S13762-023-04929-2>
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- Kumar Patel, A., Banjare, U., Kumari, A., Kumar Singh, R., & Deo Pandey, K. (2020). Temperature tolerant *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Strains with Plant Growth Promotion Traits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *14*(4), 2603–2609. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.4.36>
- Kumar, V., Raghuvanshi, N., Kumar, A., Rithesh, L., Rai, A., & Pandey, A. K. (2023). Deciphering phytomicrobiomes for sustainable crop production: Recent findings and future perspectives. *Plant Stress*, *10*. <https://doi.org/10.1016/J.STRESS.2023.100285>
- Kurepin, L. V., Park, J. M., Lazarovits, G., & Bernards, M. A. (2015). *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion is associated with endogenous changes in plant growth hormone levels. *Plant Growth Regulation*, *75*(1), 199–207. <https://doi.org/10.1007/S10725-014-9944-6>
- Kuzmanović, N., Fagorzi, C., Mengoni, A., Lassalle, F., & Dicenzo, G. C. (2022). Taxonomy of *Rhizobiaceae* revisited: proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *72*(3). <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005243>
- Kwon, S. T., & Song, H. G. (2014). Growth Promotion of Tomato by Application of Immobilized *Arthrobacter woluwensis* ED in Alginate Beads. *Korean Journal of Microbiology*, *50*(1), 40–45. <https://doi.org/10.7845/KJM.2014.4010>
- Kwon, Y. S., Ryu, C. M., Lee, S., Park, H. B., Han, K. S., Lee, J. H., Lee, K., Chung, W. S., Jeong, M. J., Kim, H. K., & Bae, D. W. (2010). Proteome analysis of *Arabidopsis* seedlings exposed to bacterial volatiles. *Planta*, *232*(6), 1355–1370. <https://doi.org/10.1007/S00425-010-1259-X/FIGURES/4>

Kyung Choi, H., Cheol Song, G., Yi, H.-S., & Ryu, C.-M. (2014). Field Evaluation of the Bacterial Volatile Derivative 3-Pentanol in Priming for Induced Resistance in Pepper. *Journal of Chemical Ecology* <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0488-z>

Lambrese, Y., Guíñez, M., Calvente, V., Sansone, G., Cerutti, S., Raba, J., & Sanz, M. I. (2018). Production of siderophores by the bacterium *Kosakonia radicincitans* and its application to control of phytopathogenic fungi. *Bioresource Technology Reports*, 3(June), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.06.003>

Lammers, A., Lalk, M., & Garbeva, P. (2022). Air Ambulance: Antimicrobial Power of Bacterial Volatiles. *Antibiotics* 2022, Vol. 11, Page 109, 11(1), 109. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11010109>

Larrosa, M., González-Sarrías, A., Yáñez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., Tomás-Barberán, F., Dolara, P., & Espín, J. C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(8), 717–725. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2009.04.012>

Lasa, A. V., Mašínová, T., Baldrian, P., & Fernández-López, M. (2019). Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. *PLOS ONE*, 14(3), e0214422. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0214422>

Lazarovits, G., Turnbull, A., & Johnston-Monje, D. (2014). Plant Health Management: Biological Control of Plant Pathogens. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (Vol. 4, Issue 2012). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00177-7>

Lefort, V., Desper, R., & Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2798–2800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>

Lei, X., Shen, Y., Zhao, J., Huang, J., Wang, H., Yu, Y., & Xiao, C. (2023). Root Exudates Mediate the Processes of Soil Organic Carbon Input and Efflux. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/PLANTS12030630>

Leroux, P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 195–222. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_12

Lestari, T., Apriyadi, R., & Amandha, G. (2021). Growth and yield of edamame soybean in post-tin mining land with application of *Rhizobium* bacteria and organic fertilizer. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 694(1), 012038. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/694/1/012038>

Li, C. W., Song, R. Q., Yang, L. Bin, & Deng, X. (2015). Isolation, Purification, and Structural Identification of an Antifungal Compound from a *Trichoderma* Strain.

Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(8), 1257–1264.
<https://doi.org/10.4014/JMB.1410.10027>

Li, R., Tao, M., Xu, T., Pan, S., Xu, X., & Wu, T. (2022). Small berries as health-promoting ingredients: a review on anti-aging effects and mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *Food & function*, 13(2), 478-500.

Lian, Q., Zhang, J., Gan, L., Ma, Q., Zong, Z., & Wang, Y. (2017). The biocontrol efficacy of *Streptomyces pratensis* LMM15 on *Botrytis cinerea* in Tomato. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9486794>

Liang, J. L., Liu, J., Jia, P., Yang, T. Tao, Zeng, Q. Wei, Zhang, S. Chang, Liao, B., Shu, W. sheng, & Li, J. tian. (2020). Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *ISME Journal*, 14(6), 1600–1613. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0632-4>

Liao, X., Greenspan, P., Srivastava, A., & Pegg, R. B. (2020). Characterizing the phenolic constituents of U.S. Southeastern blackberry cultivars. *Journal of Berry Research*, 10(2), 311–327. <https://doi.org/10.3233/JBR-190475>

Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H., & Kim, J. C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*, 33(5), 488–498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>

Lin, F., Huang, Z., Chen, Y., Zhou, L., Chen, M., Sun, J., Lu, Z., & Lu, Y. (2021). Effect of combined Bacillomycin D and chitosan on growth of *Rhizopus stolonifer* and *Botrytis cinerea* and cherry tomato preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(1), 229–239. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10635>

Lin, H., & Peddada, S. Das. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-17041-7>

Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>

Ling, N., Wang, T., & Kuzyakov, Y. (2022). Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9>

Liriano González, R., Pérez Ramos, J., Pérez Hernández, Y., Placeres Espinosa, I., Rodríguez Jiménez, S. L., & Peña Alonso, D. (2019). Improvement of the agricultural productivity of lettuce and radish by using efficient microorganisms. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 8937–8943. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n3.76967>

- Liu, H., Brettell, L. E., Qiu, Z., & Singh, B. K. (2020). Microbiome-Mediated Stress Resistance in Plants. *Trends in Plant Science*, 25(8), 733–743. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2020.03.014>
- Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2017). Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>
- Liu, H., Li, J., Carvalhais, L. C., Percy, C. D., Prakash Verma, J., Schenk, P. M., & Singh, B. K. (2021a). Evidence for the plant recruitment of beneficial microbes to suppress soil-borne pathogens. *The New Phytologist*, 229(5), 2873–2885. <https://doi.org/10.1111/NPH.17057>
- Liu, L., Guo, P., Wang, P., Zheng, S., Qu, Z., & Liu, N. (2021b). The Review of Anti-aging Mechanism of Polyphenols on *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 635768. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.635768/BIBTEX>
- Liu, M., Li, N., Lu, X., Shan, S., Gao, X., Cao, Y., & Lu, W. (2022). Sweet tea (*Rubus suavissimus* S. Lee) polysaccharides promote the longevity of *Caenorhabditis elegans* through autophagy-dependent insulin and mitochondrial pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, 883–892. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.03.138>
- Liu, N., Sun, H., Tang, Z., Zheng, Y., Qi, G., & Zhao, X. (2023). Transcription Factor Spo0A Regulates the Biosynthesis of Difficidin in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiology Spectrum*, 11(4). https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01044-23/SUPPL_FILE/SPECTRUM.01044-23-S0001.PDF
- Liu, Y., Xu, Z., Chen, L., Xun, W., Shu, X., Chen, Y., Sun, X., Wang, Z., Ren, Y., Shen, Q., & Zhang, R. (2024). Root colonization by beneficial rhizobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 48(1). <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAD066>
- López-Millán, A.-F., Grusak, M. A., Abadía, A., & Abadía, J. (2013). Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science*, 4(JUL), 254. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00254>
- Luxem, K. E., Kraepiel, A. M. L., Zhang, L., Waldbauer, J. R., & Zhang, X. (2020). Carbon substrate re-orders relative growth of a bacterium using Mo-, V-, or Fe-nitrogenase for nitrogen fixation. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1397–1408. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14955>
- Luziatelli, F., Ficca, A. G., Bonini, P., Muleo, R., Gatti, L., Meneghini, M., Tronati, M., Melini, F., & Ruzzi, M. (2020). A Genetic and Metabolomic Perspective on the Production of Indole-3-Acetic Acid by *Pantoea agglomerans* and Use of Their

Metabolites as Biostimulants in Plant Nurseries. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1475. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01475>

Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Blom, J., Smits, T. H. M., Rezzonico, F., Kim, S. J., Weon, H. Y., Kwon, S. W., Whitman, W. B., & Ji, L. (2020). *Phytobacter palmae* sp. nov., a novel endophytic, N₂ fixing, plant growth promoting gammaproteobacterium isolated from oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 841–848. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.003834/CITE/REFWORKS>

Maharana, P. K., Plant, R., & Centre, R. (2019). Isolation and characterization of IAA producing plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from rhizospheric soil of ornamental (Marigold) plant. *International Journal of Life Science*, 7 (2)(June), 333–336.

https://www.researchgate.net/publication/334095640_Isolation_and_characterization_of_IAA_producing_plant_growth_promoting_rhizobacteria_PGPR_from_rhizospheric_soil_of_ornamental_Marigold_plant

Maindad, D. V., Kasture, V. M., Chaudhari, H., Dhavale, D. D., Chopade, B. A., & Sachdev, D. P. (2014). Characterization and fungal inhibition activity of siderophore from wheat rhizosphere associated *Acinetobacter calcoaceticus* strain HIRFA32. *Indian journal of microbiology*, 54, 315-322.

Maja, M. M., & Ayano, S. F. (2021). The Impact of Population Growth on Natural Resources and Farmers' Capacity to Adapt to Climate Change in Low-Income Countries. *Earth Systems and Environment 2021 5:2*, 5(2), 271–283. <https://doi.org/10.1007/S41748-021-00209-6>

Maldonado, E., Morales-Pison, S., Urbina, F., & Solari, A. (2023). Aging Hallmarks and the Role of Oxidative Stress. *Antioxidants 2023, Vol. 12, Page 651*, 12(3), 651. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12030651>

Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22(1), 35–45. <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>

Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO: assessing genomic data quality and beyond. *Current Protocols*, 1(12), e323.

Manzotti, A., Bergna, A., Burow, M., Jørgensen, H. J. L., Cernava, T., Berg, G., Collinge, D. B., & Jensen, B. (2020). Insights into the community structure and lifestyle of the fungal root endophytes of tomato by combining amplicon sequencing and isolation approaches with phytohormone profiling. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAA052>

Marian, M., Antonielli, L., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2023). Endophytic bacterial communities of alpine *Rosaceae* plants are affected by the plant tissue, collection site

and host plant and culturable psychrotolerant isolates contribute to plant freezing stress tolerance. *BioRxiv*, 2023.11.18.567389. <https://doi.org/10.1101/2023.11.18.567389>

Markaki, M., & Tavernarakis, N. (2020). *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. *Current Opinion in Biotechnology*, 63, 118–125. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.12.011>

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>

Martins, M. S., Gonçalves, A. C., Alves, G., & Silva, L. R. (2023). Blackberries and Mulberries: Berries with Significant Health-Promoting Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/IJMS241512024>

Masih, E. I., Alie, I., & Paul, B. (2000). Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? *FEMS Microbiology Letters*, 189(2), 233–237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09236.x>

Masmoudi, F., Alsafran, M., Jabri, H. A. L., Hosseini, H., Trigui, M., Sayadi, S., Tounsi, S., & Saadaoui, I. (2023). Halobacteria-Based Biofertilizers: A Promising Alternative for Enhancing Soil Fertility and Crop Productivity under Biotic and Abiotic Stresses—A Review. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 1248, 11(5), 1248. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11051248>

Massoni, J., Bortfeld-Miller, M., Jardillier, L., Salazar, G., Sunagawa, S., & Vorholt, J. A. (2019). Consistent host and organ occupancy of phyllosphere bacteria in a community of wild herbaceous plant species. *The ISME Journal* 2019 14:1, 14(1), 245–258. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0531-8>

Mathews, S. L., Hannah, H., Samagaio, H., Martin, C., Rodriguez-Rassi, E., & Matthyse, A. G. (2019). Glycoside hydrolase genes are required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens* on *Bryophyllum daigremontiana* and tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(15). <https://doi.org/10.1128/AEM.00603-19>

Matilla, M. A., Velando, F., Monteagudo-Cascales, E., & Krell, T. (2022). Flagella, Chemotaxis and Surface Sensing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1386, 185–221. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_7/FIGURES/2

Maung, C. E. H., Baek, W. S., Choi, T. G., & Kim, K. Y. (2021). Control of grey mould disease on strawberry using the effective agent, *Bacillus amyloliquefaciens* Y1. *Biocontrol Science and Technology*, 31(5), 468–482. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1867707>

McClements, D. J. (2019). Nutraceuticals: Superfoods or Superfads? In *Future Foods* (pp. 167–201). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-12995-8_6

Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Harish, Tripathi, Y. N., Zehra, A., Marwal, A., & Upadhyay, R. S. (2020). PGPR-mediated induction of systemic

resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. In *Journal of Basic Microbiology* (Vol. 60, Issue 10, pp. 828–861). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000370>

Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>

Melanie Böhm, Thomas Hurek, B. R.-H. (2007). Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact* ., *20*(5), 526–533. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0526>

Menéndez, E., Flores-Félix, J. D., Ramírez-Bahena, M. H., Igual, J. M., García-Fraile, P., Peix, A., & Velázquez, E. (2020a). Genome Analysis of *Endobacterium cerealis*, a Novel Genus and Species Isolated from *Zea mays* Roots in North Spain. *Microorganisms*, *8*(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8060939>

Meng, Q., Manghwar, H., & Hu, W. (2022a). Study on Supergenous *Rubus* L.: Edible, Medicinal, and Phylogenetic Characterization. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 1211, *11*(9), 1211. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11091211>

Meng, W., Ma, C., Xu, P., & Gao, C. (2022b). Biotechnological production of chiral acetoin. *Trends in Biotechnology*, *40*(8), 958–973. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.01.008>

Mengistu, A. A. (2020). Endophytes: Colonization, Behaviour, and Their Role in Defense Mechanism. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2020/6927219>

Mesquita, A., & Bandeira, L. (2023). Co-inoculation of Rhizobia and Other Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers: A Biotechnological Overview. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, *14* (1), 01-16. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7558384>

Meyer, T., Thiour-Mauprivez, C., Wisniewski-Dyé, F., Kerzaon, I., Comte, G., Vial, L., & Lavire, C. (2019). Ecological Conditions and Molecular Determinants Involved in *Agrobacterium* Lifestyle in Tumors. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 978. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00978/BIBTEX>

Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00012-07>

Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Hudina, M., Zorenc, Z., Koron, D., & Senica, M. (2021). Fruit quality characteristics and biochemical composition of fully ripe blackberries harvested at different times. *Foods*, *10*(7), 1581. <https://doi.org/10.3390/FOODS10071581/S1>

Milani, P., Torres-Aguilar, P., Hamaker, B., Manary, M., Abushamma, S., Laar, A., Steiner, R., Ehsani, M., de la Parra, J., Skaven-Ruben, D., de Kock, H., Hawkes, C., Covic, N., Mitchell, C., & Taylor, J. (2022). The whole grain manifesto: From Green Revolution to Grain Evolution. *Global Food Security*, 34, 100649. <https://doi.org/10.1016/J.GFS.2022.100649>

Miles, L. A., Lopera, C. A., González, S., de García, M. C. C., Franco, A. E., & Restrepo, S. (2012). Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *BioControl* 2012 57:5, 57(5), 697–710. <https://doi.org/10.1007/S10526-012-9442-6>

Miranda-Vizueté, A., & Veal, E. A. (2017). *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. *Redox Biology*, 11, 708. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2016.12.020>

Mo, P., Chen, Y., Zou, F., Zhou, J., Zou, W., & Gao, J. (2022). *Nocardioopsis eucommiae* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(12), 005654. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005654/CITE/REFWORKS>

Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638–649. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>

Moraes, D. P., Lozano-Sánchez, J., Machado, M. L., Vizzotto, M., Lazzaretti, M., Leyva-Jimenez, F. J. J., da Silveira, T. L., Ries, E. F., & Barcia, M. T. (2020). Characterization of a new blackberry cultivar BRS Xingu: Chemical composition, phenolic compounds, and antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, 322, 126783. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.126783>

Morella, N. M., Weng, F. C. H., Joubert, P. M., Jessica, C., Lindow, S., & Koskella, B. (2020). Successive passaging of a plant-associated microbiome reveals robust habitat and host genotype-dependent selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(2), 1148–1159. https://doi.org/10.1073/PNAS.1908600116/SUPPL_FILE/PNAS.1908600116.SAPP.PDF

Moreno-Medina, B. L., Casierra-Posada, F., & Medina-Vargas, O. J. (2023). Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Blackberry Fruits (*Rubus* spp) Grown in Colombia. *Erwerbs-Obstbau*, 65(4), 1047–1056. <https://doi.org/10.1007/S10341-022-00793-5/FIGURES/3>

Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., & Someya, T. (2019). Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds

produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, 5(6), e01817.
<https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2019.E01817>

Moroenyane, I., Tremblay, J., & Yergeau, É. (2021). Temporal and spatial interactions modulate the soybean microbiome. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1).
<https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAA206>

Mostafa, R. M., Kamel, Z., Ibrahim, M., & Salah, M. G. (2020). Characterization of *Novosphingobium nitrogenifigens* rmm20, a diazotrophic endophyte with multiple plant-growth promotion traits. *Plant Archives*, 20(2), 6929–6934.
www.ncbi.nlm.nih.gov

Msimbira, L. A., & Smith, D. L. (2020). The Roles of Plant Growth Promoting Microbes in Enhancing Plant Tolerance to Acidity and Alkalinity Stresses. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 564220.
<https://doi.org/10.3389/FSUFS.2020.00106/BIBTEX>

Mueller, U. G., & Sachs, J. L. (2015). Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in Microbiology*, 23(10), 606–617.
<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2015.07.009>

Munro, N. (2003). Small game, the Younger Dryas, and the transition to agriculture in the southern Levant. *Mitteilungen Der Gesellschaft Für Urgeschichte*, 12(January 2003), 47–72.
http://www.geo.uni-tuebingen.de/fileadmin/website/arbeitsbereich/ufg/urgeschichte_quartaeroekologie/publikationen/GFU/2003/gfu12_5.pdf

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., & Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.10.019>

Nakkeeran, S., Priyanka, R., Rajamanickam, S., & Sivakumar, U. (2020). *Bacillus amyloliquefaciens* alters the diversity of volatile and non-volatile metabolites and induces the expression of defence genes for the management of *Botrytis* leaf blight of *Lilium* under protected conditions. *Journal of Plant Pathology*, 102(4), 1179–1189.
<https://doi.org/10.1007/s42161-020-00602-6>

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1999.TB13383.X>

Navarro-Hortal, M. D., Romero-Márquez, J. M., Esteban-Muñoz, A., Sánchez-González, C., Rivas-García, L., Llopis, J., Cianciosi, D., Giampieri, F., Sumalla-Cano, S., Battino, M., & Quiles, J. L. (2022). Strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Romina) methanolic extract attenuates Alzheimer’s beta amyloid production and oxidative stress

by SKN-1/NRF and DAF-16/FOXO mediated mechanisms in *C. elegans*. *Food Chemistry*, 372. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131272>

Naz, R., Khushhal, S., Asif, T., Mubeen, S., Saranraj, P., & Sayyed, R. Z. (2022). Inhibition of Bacterial and Fungal Phytopathogens Through Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas* sp. *Secondary Metabolites and Volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion*, 95–118. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07559-9_6/TABLES/1

Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>

Neu, A. T., Allen, E. E., & Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(51), e2104429118. https://doi.org/10.1073/PNAS.2104429118/SUPPL_FILE/PNAS.2104429118.SD01.XLSX

Ngalimat, M. S., Hata, E. M., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Zainudin, N. A. I. M., Saidi, N. B., & Yusof, M. T. (2021). Plant Growth-Promoting Bacteria as an Emerging Tool to Manage Bacterial Rice Pathogens. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040682>

Nguyen, T. M. V., Hertog, M. L. A. T. M., Van de Poel, B., Tran, D. T., & Nicolai, B. (2023). Targeted system approach to ethylene biosynthesis and signaling of a heat tolerant tomato cultivar; the impact of growing season on fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1195020. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1195020/BIBTEX>

Nicot, P. C., Stewart, A., Bardin, M., & Elad, Y. (2015). Biological control and biopesticide suppression of *Botrytis*-incited diseases. In *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 165–187). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_9

Nifakos, K., Tsalgatiidou, P.C., Thomloui, E. E., Skagia, A., Kotopoulis, D., Baira, E., Delis, C., Papadimitriou, K., Markellou, E., Venieraki, A. & Katinakis, P. (2021). Genomic Analysis and Secondary Metabolites Production of the Endophytic *Bacillus velezensis* Bvell: A Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* Causing Bunch Rot in Post-Harvest Table Grapes. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1716. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10081716>

Nithyapriya, S., Lalitha, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., Dailin, D. J., El Enshasy, H. A., Luh Suriani, N., & Herlambang, S. (2021). Production, purification, and characterization of bacillibactin siderophore of *Bacillus subtilis* and its application for

improvement in plant growth and oil content in sesame. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/su13105394>

Nosheen, S., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. *Sustainability 2021, Vol. 13, Page 1868*, *13*(4), 1868. <https://doi.org/10.3390/SU13041868>

Novo, L. A. B., Castro, P. M. L., Alvarenga, P., & da Silva, E. F. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Assisted Phytoremediation of Mine Soils. In *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation* (pp. 281–295). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812986-9.00016-6>

Nwachukwu, B. C., & Babalola, O. O. (2022). Metagenomics: A Tool for Exploring Key Microbiome With the Potentials for Improving Sustainable Agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *6*, 886987. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2022.886987/BIBTEX>

O’Gara, F., & Shanmugam, K. T. (1976). Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia export of fixed N₂ as NH₄⁺. *BBA - General Subjects*, *437*(2), 313–321. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(76\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90001-5)

O’Hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1989). Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(8), 1870–1876. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.8.1870-1876.1989>

Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of The Total Environment*, *743*, 140682. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140682>

Orozco-Mosqueda, M. C., Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Santoyo, G., Flores-Cortez, I., Alfaro-Cuevas, R., & Valencia-Cantero, E. (2013). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) *in vitro* via dimethylhexadecylamine emission. *Plant and Soil*, *362*(1–2), 51–66. <https://doi.org/10.1007/S11104-012-1263-Y/FIGURES/6>

Orozco-Mosqueda, M. del C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, *235*, 126439. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2020.126439>

Ortúzar, M., Trujillo, M. E., Román-Ponce, B., & Carro, L. (2020). *Micromonospora metallophores*: A plant growth promotion trait useful for bacterial-assisted phytoremediation? *The Science of the Total Environment*, *739*, 139850–139850. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139850>

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., & Stevens,

- R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D206. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1226>
- Page, M. G. P. (2019). The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Suppl 7), S529–S537. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz825>
- Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R., Saxena, A. K., Dey, R. & Singh, C. S. (2001). Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 156(3), 209–223. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00103>
- Pan, H., Zhou, Z. Q., He, G. W., Zhou, J., Jin, K., Liu, H. H., Wang, C., Yang, H., Yu, Y. Bin, & Tian, Y. (2022). *Neorhizobium xiangyangii* sp. nov., isolated from a highland barley cultivation soil in Qamdo, Tibet. *Archives of Microbiology*, 204(6), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S00203-022-02961-3/FIGURES/2>
- Pandey, S., & Tyagi, D. N. (1999). Changes in chlorophyll content and photosynthetic rate of four cultivars of mango during reproductive phase. *Biologia Plantarum*, 42(3), 457–461. <https://doi.org/10.1023/A:1002446125960/METRICS>
- Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., & Uhlik, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology Advances*, 44, 107614. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107614>
- Park, I., Seo, Y. S., & Manna, M. (2023). Recruitment of the rhizo-microbiome army: assembly determinants and engineering of the rhizosphere microbiome as a key to unlocking plant potential. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1163832. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1163832/BIBTEX>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043-1055.
- Pathan, S. I., Ceccherini, M. T., Hansen, M. A., Giagnoni, L., Ascher, J., Arenella, M., Sørensen, S. J., Pietramellara, G., Nannipieri, P., & Renella, G. (2015). Maize lines with different nitrogen use efficiency select bacterial communities with different β -glucosidase-encoding genes and glucosidase activity in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 51(8), 995–1004. <https://doi.org/10.1007/S00374-015-1045-9/FIGURES/4>
- Patz, S., Gautam, A., Becker, M., Ruppel, S., Rodríguez-Palenzuela, P., & Huson, D. (2021). PLaBAs: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of plant-associated bacteria. *BioRxiv*, 2021.12.13.472471. <https://doi.org/10.1101/2021.12.13.472471>

Pawlowski, K., & Sirrenberg, A. (2003). Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J Exp Biol.*, 41(10), 1165–1183.

Peng, G., Yuan, Q., Li, H., Zhang, W., & Tan, Z. (2008). *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 9), 2158–2163. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.65632-0>

Peng, Q., Zhao, X., Wen, J., Huang, M., Zhang, J., & Song, F. (2020). Transcription in the acetoin catabolic pathway is regulated by AcoR and CcpA in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Research*, 235, 126438. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2020.126438>

Pereira, A. C., & Cunha, M. V. (2020). An effective culturomics approach to study the gut microbiota of mammals. *Research in Microbiology*, 171(8), 290–300. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2020.09.001>

Pereira, A., Moreira, H., Del, M., Orozco-Mosqueda, C., Santoyo, G., & Glick, B. R. (2023). Recent Advances in the Bacterial Phytohormone Modulation of Plant Growth. *Plants 2023, Vol. 12, Page 606, 12(3)*, 606. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12030606>

Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: Application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 47–55. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0425-4>

Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., de Hollander, M., & Raaijmakers, J. M. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-018-0519-Z>

Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., & Mugnai, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*, 97, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.010>

Petković, M., Miletić, N., Pantelić, V., Filipović, V., Lončar, B., & Mitrović, O. (2024). Physical and Chemical Properties of Convective- and Microwave-Dried Blackberry Fruits Grown Using Organic Procedures. *Foods 2024, Vol. 13, Page 791, 13(5)*, 791. <https://doi.org/10.3390/FOODS13050791>

Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology 2013 11:11, 11(11)*, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes.

Annual Review of Phytopathology, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-082712-102340>

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species – ScienceOpen. *Mikrobiologiya*, 17, 362–370. <https://www.scienceopen.com/document?vid=44a8aa7f-fad0-4038-a97b-a766d1a3b6fb>

Pini, F., Galardini, M., Bazzicalupo, M., & Mengoni, A. (2011). Plant-Bacteria Association and Symbiosis: Are There Common Genomic Traits in Alphaproteobacteria? *Genes*, 2(4), 1017. <https://doi.org/10.3390/GENES2041017>

Pitiwittayakul, N., Yukphan, P., Charoenyingcharoen, P., & Tanasupawat, S. (2024). *Endosaccharibacter trunci* gen. nov., sp. nov. and *Rhizosaccharibacter radialis* gen. nov., sp. nov., two novel bacteria of the family *Acetobacteraceae* isolated from sugarcane. *Heliyon*, 10(12), e32825. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32825>

Pospiech, M., Petrášová, M., Tremlová, B., & Randulová, Z. (2014). Detection of native starches in meat products using histochemical lugol calleja method. *Potravinarstvo*, 8(1), 77–81. <https://doi.org/10.5219/335>

Poulaki, E. G., & Tjamos, S. E. (2023). *Bacillus* species: factories of plant protective volatile organic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 134(3), 1–10. <https://doi.org/10.1093/JAMBIO/LXAD037>

Prashar, P., & Shah, S. (2016). *Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. Sustainable Agriculture Reviews*, 19, 331–361. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_8

Prigigallo, M. I., De Stradis, A., Anand, A., Mannerucci, F., L'Haridon, F., Weisskopf, L., & Bubici, G. (2021). Basidiomycetes Are Particularly Sensitive to Bacterial Volatile Compounds: Mechanistic Insight Into the Case Study of *Pseudomonas protegens* Volatilome Against *Heterobasidion abietinum*. *Frontiers in Microbiology*, 0, 1382. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.684664>

Priyashantha, A. K. H., Karunarathna, S. C., Lu, L., & Tibpromma, S. (2023). Fungal Endophytes: An Alternative Biocontrol Agent against Phytopathogenic Fungi. *Encyclopedia 2023, Vol. 3, Pages 759-780*, 3(2), 759–780. <https://doi.org/10.3390/ENCYCLOPEDIA3020055>

Purwaningsih, S., Dewi, T. K., Sutisna, E., & Nugroho, A. A. (2024). Effectiveness of *Rhizobium* bacteria as biofertilizer on the growth of soybean (*Glycine max* L.) in the greenhouse. *AIP Conference Proceedings*, 2973(1). <https://doi.org/10.1063/5.0184608/3271305>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved

data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. In *Nature Biotechnology* (Vol. 35, Issue 9, pp. 833–844). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2010.00221.X>

Rabari, A., Ruparelia, J., Jha, C. K., Sayyed, R. Z., Mitra, D., Priyadarshini, A., Senapati, A., Panneerselvam, P., & Das Mohapatra, P. K. (2023). Articulating beneficial rhizobacteria-mediated plant defenses through induced systemic resistance: A review. *Pedosphere*, 33(4), 556–566. <https://doi.org/10.1016/J.PEDSPH.2022.10.003>

Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. del R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J. A., & Baez, A. (2022). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 470–482. <https://doi.org/10.1111/JAM.15179>

Rashmi, I., Roy, T., Kartika, K. S., Pal, R., Coumar, V., Kala, S., & Shinoji, K. C. (2020). Organic and inorganic fertilizer contaminants in agriculture: Impact on soil and water resources. *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management*, 3–41. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_1/FIGURES/4

Rat, A., Naranjo, H. D., Krigas, N., Grigoriadou, K., Maloupa, E., Alonso, A. V., Schneider, C., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Tsafantakis, N., Fokialakis, N., & Willems, A. (2021). Endophytic Bacteria From the Roots of the Medicinal Plant *Alkanna tinctoria* Tausch (Boraginaceae): Exploration of Plant Growth Promoting Properties and Potential Role in the Production of Plant Secondary Metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 12, 633488. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.633488/BIBTEX>

Rattan, P., & Sharma, A. (2023). Effect of microbial inoculants on growth, yield and quality attributes of tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Pharma Innovation Journal*, 11, 1503-1511. <https://www.researchgate.net/publication/373842436>

Renna, M. C., Najimudin, N., Winik, L. R., & Zahler, S. A. (1993). Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *Journal of Bacteriology*, 175(12), 3863–3875. <https://doi.org/10.1128/JB.175.12.3863-3875.1993>

Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome

- comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929–931.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Rilling, J. I., Acuña, J. J., Nannipieri, P., Cassan, F., Maruyama, F., & Jorquera, M. A. (2019). Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 130, 205–219.
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2018.12.012>
- Riu, M., Kim, M. S., Choi, S. K., Oh, S. K., & Ryu, C. M. (2022). Elicitation of Innate Immunity by a Bacterial Volatile 2-Nonanone at Levels below Detection Limit in Tomato Rhizosphere. *Molecules and Cells*, 45(7), 502–511.
<https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2022.2009>
- Riva, V., Mapelli, F., Bagnasco, A., Mengoni, A., & Borin, S. (2022). A Meta-Analysis Approach to Defining the Culturable Core of Plant Endophytic Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6). <https://doi.org/10.1128/AEM.02537-21>
- Rivas, Raúl, Velázquez, E., Valverde, Á., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*, 22(6), 1086–1089.
[https://doi.org/DOI: 10.1002/1522-2683\(200106\)22:6<1086::AID-ELPS1086>3.0.CO;2-6](https://doi.org/DOI:10.1002/1522-2683(200106)22:6<1086::AID-ELPS1086>3.0.CO;2-6)
- Rivas, Raul, Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. B., & Martínez-Molina, E. (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5217–5222.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5217-5222.2002/ASSET/55EEF543-C5CF-4FAB-A48D-B32F7DBCE8A2/ASSETS/GRAPHIC/AM1120607005.JPEG>
- Robinson, J. A., Bierwirth, J. E., Greenspan, P., & Pegg, R. B. (2020). Blackberry polyphenols: review of composition, quantity, and health impacts from *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Food Bioactives*, 9, 40–51.
<https://doi.org/10.31665/JFB.2020.9217>
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Mechanisms of Action of Microbial Biocontrol Agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi 2021*, Vol. 7, Page 1045, 7(12), 1045. <https://doi.org/10.3390/JOF7121045>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339.
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3(0), 1–24. <https://doi.org/10.7831/ras.3.1>

- Ruddock, P. L., & Facey, P. (2024). Tannins. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications, and Strategies, Second Edition*, 211–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18657-8.00015-3>
- Rudolf, J. D., Alsup, T. A., Xu, B., & Li, Z. (2021). Bacterial terpenome. *Natural product reports*, 38(5), 905-980. <https://doi.org/10.1039/d0np00066c>
- Russi, A., Granada, C. E., & Schwambach, J. (2024). Optimization of *Bacillus velezensis* S26 sporulation for enhanced biocontrol of gray mold and anthracnose in postharvest strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 210, 112737. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2023.112737>
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017. <https://doi.org/10.1104/PP.103.026583>
- Saati-Santamaría, Z., Vicentefranqueira, R., Kolařík, M., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2023). Microbiome specificity and fluxes between two distant plant taxa in Iberian forests. *Environmental Microbiome*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S40793-023-00520-X/FIGURES/7>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salazar, F., Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2020). A Strong Antifungal Activity of 7-O-Succinyl Macrolactin A vs Macrolactin A from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. *Current Microbiology*, 77(11), 3409–3413. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-02200-2/FIGURES/3>
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. In *Microbiological Research* (Vol. 208, pp. 85–98). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.010>
- Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., & Stoll, A. (2018). Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity—An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology*, 166(9), 601–612. <https://doi.org/10.1111/jph.12718>
- Salwan, R., Sharma, M., Sharma, A., & Sharma, V. (2023). Insights into plant beneficial microorganism-triggered induced systemic resistance. *Plant Stress*, 7, 100140. <https://doi.org/10.1016/J.STRESS.2023.100140>
- Samaniego, I., Brito, B., Viera, W., Cabrera, A., Llerena, W., Kannangara, T., Vilcacundo, R., Angós, I., & Carrillo, W. (2020). Influence of the Maturity Stage on the Phytochemical Composition and the Antioxidant Activity of Four Andean Blackberry

Cultivars (*Rubus glaucus* Benth) from Ecuador. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1027, 9(8), 1027. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9081027>

Sánchez-Juanes, F., Ferreira, L., Alonso De La Vega, P., Valverde, A., Barrios, M. L., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., González-Buitrago, J. M., Trujillo, M. E., & Velázquez, E. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of *Bradyrhizobium* species: Application to the identification of *Lupinus* nodulating strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(8), 565–571. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2013.09.003>

Sansone, G., Rezza, I., Fernández, G., Calvente, V., Benuzzi, D., & Sanz, M. I. (2011). Inhibitors of polygalacturonase and laccase of *Botrytis cinerea* and their application to the control of this fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 243–247. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2010.09.010>

Santhanam, R., Menezes, R. C., Grabe, V., Li, D., Baldwin, I. T., & Groten, K. (2019). A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. *Molecular Ecology*, 28(5), 1154–1169. <https://doi.org/10.1111/MEC.15012>

Santos, L. F., & Olivares, F. L. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology*, 26, 100198. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2021.100198>

Santoyo, G. (2022). How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of Advanced Research*, 40, 45–58. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2021.11.020>

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2015.11.008>

Saravanakumar, D., Ciavorella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.11.006>

Sasser, M. (2001). Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. *Technical Note*, 101(February), 1–6.

Satyanarayana, T., Raghukumar, C., & Shivaji, S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current science*, 89(1). <https://drs.nio.res.in/drs/handle/2264/330>

Sauceda-Gálvez, J. N., Roca-Couso, R., Martínez-García, M., Hernández-Herrero, M. M., Gervilla, R., & Roig-Sagués, A. X. (2019). Inactivation of ascospores of *Talaromyces macrosporus* and *Neosartorya spinosa* by UV-C, UHPH and their

combination in clarified apple juice. *Food Control*, 98, 120–125. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.11.002>

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 2019 3:3, 3(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

Scerbak, C., Vayndorf, E., Hernandez, A., McGill, C., & Taylor, B. (2017). Lowbush cranberry acts through DAF-16/FOXO signaling to promote increased lifespan and axon branching in aging posterior touch receptor neurons. *Geroscience*, 40, 151–162. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0016-0>

Schaffer, B., Barden, J. A., & Williams, J. M. (1986). Net photosynthesis, dark respiration, stomatal conductance, specific leaf weight, and chlorophyll content of strawberry plants as influenced by fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111(1), 82–86.

Schalchli, H., Tortella, G. R., Rubilar, O., Parra, L., Hormazabal, E., & Quiroz, A. (2016). Fungal volatiles: An environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), 144–152. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.946466>

Scharf, A., Pohl, F., Egan, B. M., Kocsisova, Z., & Kornfeld, K. (2021). Reproductive Aging in *Caenorhabditis elegans*: From Molecules to Ecology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 718522. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.718522/BIBTEX>

Scheuerl, T., Hopkins, M., Nowell, R. W., Rivett, D. W., Barraclough, T. G., & Bell, T. (2020). Bacterial adaptation is constrained in complex communities. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14570-z>

Schubert, S., & Kostrzewa, M. (2017). MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: Current trends. *Current Issues in Molecular Biology*, 23, 17–20. <https://doi.org/10.21775/cimb.023.017>

Schulz, M., Seraglio, S. K. T., Della Betta, F., Nehring, P., Valese, A. C., Daguer, H., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2019). Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food Research International*, 122, 627–634. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.034>

Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4), 814–842. <https://doi.org/10.1039/B507392H>

Schulz, S., Schlawis, C., Koteska, D., Harig, T., & Biber, P. (2020). Structural Diversity of Bacterial Volatiles. *Bacterial Volatile Compounds as Mediators of Airborne Interactions*, 93–121. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7293-7_3

Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Garbeva, P. (2017). Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484>

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Segantini, D. M., Threlfall, R., Clark, J. R., Brownmiller, C. R., Howard, L. R., & Lawless, L. J. R. (2017). Changes in fresh-market and sensory attributes of blackberry genotypes after postharvest storage. *Journal of Berry Research*, 7(2), 129–145. <https://doi.org/10.3233/JBR-170153>

Seitz, V. A., Chaparro, J. M., Schipanski, M. E., Wrighton, K. C., & Prenni, J. E. (2023). Cover Crop Cultivar, Species, and Functional Diversity is Reflected in Variable Root Exudation Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(30), 11373–11385. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C02912/ASSET/IMAGES/LARGE/JF3C02912_0006.JPEG

Sellstedt, A., & Richau, K. H. (2013). Aspects of nitrogen-fixing *Actinobacteria*, in particular free-living and symbiotic *Frankia*. *FEMS Microbiology Letters*, 342(2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12116>

Seo, J., Peng, Y., Jiang, L., Lee, S. B., Jeong, R. D., Park, S. J., Kim, C. Y., Choi, M. S., & Lee, J. (2022). *Flavobacterium endoglycinae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L. cv. Gwangan) stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(2), 005220. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005220/CITE/REFWORKS>

Shah, H. M. S., Singh, Z., Kaur, J., Hasan, M. U., Woodward, A., & Afrifa-Yamoah, E. (2023). Trends in maintaining postharvest freshness and quality of *Rubus* berries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(6), 4600–4643. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13235>

Shahid, M., Singh, U. B., Khan, M. S., Singh, P., Kumar, R., Singh, R. N., Kumar, A., & Singh, H. V. (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1132770. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1132770/BIBTEX>

Shanmugaiah, V., Nithya, K., Harikrishnan, H., Jayaprakashvel, M., & Balasubramanian, N. (2015). Biocontrol Mechanisms of Siderophores against Bacterial Plant Pathogens. In *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria* (pp. 167–190). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18892-9>

- Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2021). Advances in understanding fungicide resistance in botrytis cinerea in China. *Phytopathology*, 111(3), 455–463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-07-20-0313-IAT1.JPEG>
- Sharifi, R., Jeon, J. S., & Ryu, C. M. (2022). Belowground plant–microbe communications via volatile compounds. *Journal of Experimental Botany*, 73(2), 463–486. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAB465>
- Sharma, G. (2003). *Digital Color Imaging H A N D B O O K*.
- Sharma, U. C., Datta, M., & Sharma, V. (2023). Soil microbes and biofertilizers. In *Soils in the Hindu Kush Himalayas: Management for Agricultural Land Use* (pp. 117-144). Cham: Springer International Publishing.
- Shukitt-Hale, B., Carey, A. N., Jenkins, D., Rabin, B. M., & Joseph, J. A. (2007). Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiology of Aging*, 28(8), 1187–1194. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.031>
- Shurigin, V., Egamberdieva, D., Samadiy, S., & Mardonova, G. (2020). Endophytes from Medicinal Plants as Biocontrol Agents against Fusarium Caused Diseases. *Mikrobiol Z*, 82, 41-52. <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj82.04.041>
- Sikirić, B. B., Stajković-Srbinović, O. S., Saljnikov, E. R., Litvinovich, A. V., Jovković, M. V., & Mrvić, V. V. (2022). Microelements Changes in Leaves and Fruits of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Under the Influence of Ameliorative Measures. *International Journal of Fruit Science*, 22(1), 358–369. <https://doi.org/10.1080/15538362.2022.2040404>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV351>
- Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., de Jesus, M. L. A., Barazetti, A. R., da Silva, C. S., Simões, G. C., Balbi-Peña, M. I., de Mello, J. C. P., Panagio, L. A., de Almeida, R. S. C., Andrade, G., & de Oliveira, A. G. (2017). The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. *Frontiers in Microbiology*, 0(JUN), 1102. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01102>
- Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1(9), 784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>

Singh, G., Verma, A. K., & Kumar, V. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>

Singh, S. K., Wu, X., Shao, C., & Zhang, H. (2022b). Microbial enhancement of plant nutrient acquisition. *Stress Biology* *2022* *2:1*, *2*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/S44154-021-00027-W>

Singh, S., Singh, S., Singh, A., & Kalra, A. (2022a). Endophytic microbes mitigate biotic-abiotic stresses and modulate secondary metabolite pathway in plants. *Microbial Syntrophy-Mediated Eco-Enterprising*, 87–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99900-7.00001-8>

Smets, W., Chock, M. K., Walsh, C. M., Vanderburgh, C. Q., Kau, E., Lindow, S. E., Fierer, N., & Koskella, B. (2023). Leaf side determines the relative importance of dispersal versus host filtering in the phyllosphere microbiome. *MBio*, *14*(4), e0111123. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01111-23>

Sohrabi, R., Paasch, B. C., Liber, J. A., & He, S. Y. (2023). Phyllosphere Microbiome. *Annual Review of Plant Biology*, *74*(Volume 74, 2023), 539–568. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-102820-032704/CITE/REFWORKS>

Song, B., Wang, H., Xia, W., Zheng, B., Li, T., & Liu, R. H. (2020b). Combination of apple peel and blueberry extracts synergistically induced lifespan extension via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, *11*(7), 6170–6185. <https://doi.org/10.1039/D0FO00718H>

Song, B., Zheng, B., Li, T., & Liu, R. H. (2020a). Raspberry extract promoted longevity and stress tolerance via the insulin/IGF signaling pathway and DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, *11*(4), 3598–3609. <https://doi.org/10.1039/C9FO02845E>

Song, J., Ling, L., Xu, X., Jiang, M., Guo, L., Pang, Q., Xiang, W. S., Zhao, J., & Wang, X. (2023). Biological control of gray mold of tomato by *Bacillus altitudinis* B1-15. *Biological Control*, *183*, 105247. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2023.105247>

Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. In *Plants* (Vol. 9, Issue 8, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>

Soumare, A., Sarr, D., & Diédhiou, A. G. (2023). Potassium sources, microorganisms and plant nutrition: Challenges and future research directions. *Pedosphere*, *33*(1), 105–115. <https://doi.org/10.1016/J.PEDSPH.2022.06.025>

Sousa, M. B., Canet, W., Alvarez, M. D., & Fernández, C. (2007). Effect of processing on the texture and sensory attributes of raspberry (cv. Heritage) and blackberry (cv.

Thornfree). *Journal of Food Engineering*, 78(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.08.047>

Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur M. & García, A.F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1247–1256. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02408.X>

Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2007.00072.X>

Srivastav, A. L. (2020). Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination. *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation: Pesticides and Chemical Fertilizers*, 143–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00006-4>

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. In *Molecular Microbiology* (Vol. 56, Issue 4, pp. 845–857). Mol Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>

Su, Z., Chen, X., Liu, X., Guo, Q., Li, S., Lu, X., Zhang, X., Wang, P., Dong, L., Zhao, W., & Ma, P. (2020). Genome mining and UHPLC–QTOF–MS/MS to identify the potential antimicrobial compounds and determine the specificity of biosynthetic gene clusters in *Bacillus subtilis* NCD-2. *BMC Genomics*, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07160-2>

Sultana, U., Desai, S., & Reddy, G. (2016). Successful colonization of roots and plant growth promotion of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by seed treatment with *Pseudomonas putida* and *Azotobacter chroococcum*. *World Journal of Microbiology*, 3(1), 43–49.

Sun, B., Gu, L., Bao, L., Zhang, S., Wei, Y., Bai, Z., Zhuang, G., & Zhuang, X. (2020a). Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced the nitrogen loss in agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 148, 107911. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2020.107911>

Sun, F., Ou, Q., Wang, N., Guo, Z. xuan, Ou, Y., Li, N., & Peng, C. (2020b). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. *Global Ecology and Conservation*, 23, e01141. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2020.E01141>

Sun, M., Qiu, L., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Qin, Y., Mao, Y., Zhou, M., Du, X., Qin, Z., & Dai, S. (2022). Pto Interaction Proteins: Critical Regulators in Plant Development and Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 13, 774229. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.774229/BIBTEX>

- Sun, W., Hesam Shahrajabian, M., & Cheng, Q. (2021). Nitrogen Fixation and Diazotrophs-A Review. *Romania. All Rights Reserved Rom Biotechnol Lett*, 26(4), 2834–2845. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.4/2834.2845>
- Sun, Y., Liang, B., Wang, J., Kai, W., Chen, P., Jiang, L., Du, Y., & Leng, P. (2018). SIPTi4 Affects Regulation of Fruit Ripening, Seed Germination and Stress Responses by Modulating ABA Signaling in Tomato. *Plant and Cell Physiology*, 59(10), 1956–1965. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCY111>
- Surovy, M. Z., Rahman, S., Rostás, M., Islam, T., & von Tiedemann, A. (2023). Suppressive Effects of Volatile Compounds from *Bacillus* spp. on *Magnaporthe oryzae* *Triticum* (MoT) Pathotype, Causal Agent of Wheat Blast. *Microorganisms*, 11(5), 1291. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11051291/S1>
- Swarnalakshmi, K., Yadav, V., Tyagi, D., Dhar, D. W., Kannepalli, A., & Kumar, S. (2020). Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9111596>
- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Safdar, A., Huang, Z., Rajer, F. U., & Gao, X. (2017). Effect of volatile compounds produced by *Ralstonia solanacearum* on plant growth promoting and systemic resistance inducing potential of *Bacillus* volatiles. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12870-017-1083-6/FIGURES/9>
- Takishita, Y., Charron, J. B., & Smith, D. L. (2018). Biocontrol Rhizobacterium *Pseudomonas* sp. 23S Induces Systemic Resistance in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Against Bacterial Canker *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02119>
- Tambara, A. L., de Los Santos Moraes, L., Dal Forno, A. H., Boldori, J. R., Gonçalves Soares, A. T., de Freitas Rodrigues, C., Mariutti, L. R. B., Mercadante, A. Z., de Ávila, D. S., & Denardin, C. C. (2018). Purple pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 639–650. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.07.057>
- Tamiru, G., & Muleta, D. (2018). The Effect of Rhizobia Isolates Against Black Root Rot Disease of Faba Bean (*Vicia faba* L) Caused by *Fusarium solani*. *The Open Agriculture Journal*, 12(1), 131–147. <https://doi.org/10.2174/1874331501812010131>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tao, C., Li, R., Xiong, W., Shen, Z., Liu, S., Wang, B., Ruan, Y., Geisen, S., Shen, Q., & Kowalchuk, G. A. (2020). Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil

Pseudomonas populations to enhance plant disease suppression. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00892-z>

Tchakounté, G. V. T., Berger, B., Patz, S., Becker, M., Fankem, H., Taffouo, V. D., & Ruppel, S. (2020). Selected Rhizosphere Bacteria Help Tomato Plants Cope with Combined Phosphorus and Salt Stresses. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 1844, 8(11), 1844. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111844>

Thakur, N., Kaur, S., Tomar, P., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A. N., Thakur, S., Tyagi, N., Thakur, R., & Mehta, D. K. (2022). Organic agriculture for agro-environmental sustainability. *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy*, 699–735. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91595-3.00018-5>

Thomas, L., & Singh, I. (2019). *Microbial Biofertilizers: Types and Applications*. 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_1

Thomas, P., & Sahu, P. K. (2021). Vertical Transmission of Diverse Cultivation-Recalcitrant Endophytic Bacteria Elucidated Using Watermelon Seed Embryos. *Frontiers in Microbiology*, 12, 635810. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.635810/BIBTEX>

Tian, R., Seim, I., Ren, W., Xu, S., & Yang, G. (2019). Contraction of the ROS Scavenging Enzyme Glutathione S-Transferase Gene Family in Cetaceans. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 9(7), 2303. <https://doi.org/10.1534/G3.119.400224>

Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E. A., Liyanapathirana, P., Iruegas-Bocardo, F., White, F. F., Goss, E. M., & Jones, J. B. (2020). *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 8, pp. 415–427). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>

Timothy O. Adejumo, R. T. V. (2021). *Biopesticides: Botanicals and Microorganisms for Improving Agriculture and Human Health* (L. V. Berlin (Ed.)).

Tindall, B. J. (1990). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters*, 66(1–3), 199–202. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90282-U](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90282-U)

Tissenbaum, H. A. (2015). Using *C. elegans* for aging research. *Invertebrate Reproduction & Development*, 59, 59–63. <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.940470>

Tiwari, S., Prasad, V., & Lata, C. (2019). *Bacillus*: Plant growth promoting bacteria for sustainable agriculture and environment. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biotechnology in Agro-environmental Sustainability* (pp. 43–55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00003-1>

- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). *Review Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7)
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN), 1315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., Mazurier, S., Lemanceau, P., Wendehenne, D., & Besson-Bard., A. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. *Plant Physiology*, *171*(1), 675–693. <https://doi.org/10.1104/PP.15.01537>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* *2020 18:11*, *18*(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Ullah, A., Nisar, M., Ali, H., Hazrat, A., Hayat, K., Ayaz, & Keerio, A., Ihsan, M., Laiq, M., Ullah, S., Fahad, S., Khan, A., Aamir, & Khan, H., Akbar, A., & Yang, X. (2019). *Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10045-4>
- Umesha, S., Singh, P. K., & Singh, R. P. (2017). Microbial biotechnology and sustainable agriculture. In *Biotechnology for Sustainable Agriculture: Emerging Approaches and Strategies* (pp. 185–205). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812160-3.00006-4>
- Vallad, G. E., & Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, *44*(6), 1920–1934. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
- Van Langenhove, L., Depaepe, T., Vicca, S., van den Berge, J., Stahl, C., Courtois, E., Weedon, J., Urbina, I., Grau, O., Asensio, D., Peñuelas, J., Boeckx, P., Richter, A., Van Der Straeten, D., & Janssens, I. A. (2020). Regulation of nitrogen fixation from free-living organisms in soil and leaf litter of two tropical forests of the Guiana shield. *Plant and Soil*, *450*(1–2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/S11104-019-04012-1/TABLES/2>
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 103, Issue 9, pp. 753–765). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1023/A:1008638109140>
- Vanderstraeten, L., & van Der Straeten, D. (2017). Accumulation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: Current status, considerations for future research and agronomic applications. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00038>

- Vargas, L., Brígida, A. B. S., Mota Filho, J. P., De Carvalho, T. G., Rojas, C. A., Vaneechoutte, D., Van Bel, M., Farrinelli, L., Ferreira, P. C. G., Vandepoele, K., & Hemerly, A. S. (2014). Drought Tolerance Conferred to Sugarcane by Association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A Transcriptomic View of Hormone Pathways. *PLOS ONE*, 9(12), e114744. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114744>
- Varsha, K. K., Devendra, L., Shilpa, G., Priya, S., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.06.025>
- Vega-Celedón, P., Bravo, G., Velásquez, A., Cid, F. P., Valenzuela, M., Ramírez, I., Vasconez, I. N., Álvarez, I., Jorquera, M. A., & Seeger, M. (2021). Microbial Diversity of Psychrotolerant Bacteria Isolated from Wild Flora of Andes Mountains and Patagonia of Chile towards the Selection of Plant Growth-Promoting Bacterial Consortia to Alleviate Cold Stress in Plants. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 538, 9(3), 538. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9030538>
- Vellasamy, S., & Hariharan, H. (2015). Controlling Strategies (Diagnosis/Quarantine/Eradication) of Plant Pathogenic Bacteria. *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*, May, 98–127. <https://doi.org/10.1201/b18892-9>
- Vemmos, S. N. (1994). Net photosynthesis, stomatal conductance, chlorophyll content and specific leaf weight of pistachio trees (cv. Aegenes) as influenced by fruiting. *Journal of Horticultural Science*, 69(5), 775–782. <https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516512>
- Verbon, E. H., & Liberman, L. M. (2016). Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. In *Trends in Plant Science* (Vol. 21, Issue 3, pp. 218–229). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
- Veselova, M. A., Plyuta, V. A., & Khmel, I. A. (2019). Volatile Compounds of Bacterial Origin: Structure, Biosynthesis, and Biological Activity. *Microbiology* 2019 88:3, 88(3), 261–274. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030160>
- Veza, I., Muhamad Said, M. F., & Latiff, Z. A. (2021). Recent advances in butanol production by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 144, 105919. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2020.105919>
- Vicente-Orellana, J. A., & Galán-de-Mera, A. (2022). *Rubus carpetanus* (Rosaceae), a new species from the Iberian Peninsula. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 156(1), 180–186. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1845844>
- Videira, S. S., De Araujo, J. L. S., Da Silva Rodrigues, L., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (2009). Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria

associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiology Letters*, 293(1), 11–19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01475.x>

Viscardi, S., Marileo, L., Barra, P. J., Durán, P., & Inostroza-Blancheteau, C. (2020). From farm to fork: it could be the case of Lactic Acid Bacteria in the stimulation of folates biofortification in food crops. *Current Opinion in Food Science*, 34, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.08.002>

Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*, 33–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>

Walitang, D. I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y. K., Kang, Y., & Sa, T. (2017). Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiology*, 17(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>

Walters, K. E., & Martiny, J. B. H. (2020). Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLOS ONE*, 15(9), e0233872. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0233872>

Wan, W., Qin, Y., Wu, H., Zuo, W., He, H., Tan, J., Wang, Y., & He, D. (2020). Isolation and Characterization of Phosphorus Solubilizing Bacteria With Multiple Phosphorus Sources Utilizing Capability and Their Potential for Lead Immobilization in Soil. *Frontiers in Microbiology*, 11, 752. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00752>

Wang, C., Duan, T., Shi, L., Zhang, X., Fan, W., Wang, M., Wang, J., Ren, L., Zhao, X., & Wang, Y. (2022a). Characterization of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus siamensis* YJ15 and Their Antifungal Activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 106(9), 2321–2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0230-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-01-22-0230-REF5.JPEG>

Wang, C., Wang, Y., Wang, L., Fan, W., Zhang, X., Chen, X., Wang, M., & Wang, J. (2021b). Biocontrol potential of volatile organic compounds from *Pseudomonas chlororaphis* ZL3 against postharvest gray mold caused by *Botrytis cinerea* on Chinese cherry. *Biological Control*, 159, 104613. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104613>

Wang, D., Li, Y., Yuan, Y., Chu, D., Cao, J., Sun, G., Ai, Y., Cui, Z., Zhang, Y., Wang, F., & Wang, X. (2022b). Identification of non-volatile and volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* LZ88 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. *Biological Control*, 169, 104901. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.104901>

- Wang, H., Liu, J., Li, T., & Liu, R. H. (2018). Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food & function*, 9(10), 5273–5287. <https://doi.org/10.1039/c8fo01680a>
- Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021a). Pathogen Biocontrol Using Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR): Role of Bacterial Diversity. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 1988, 9(9), 1988. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9091988>
- Wang, L., Lu, H., & Jiang, Y. (2023a). Natural Polyketides Act as Promising Antifungal Agents. *Biomolecules* 2023, Vol. 13, Page 1572, 13(11), 1572. <https://doi.org/10.3390/BIOM13111572>
- Wang, W., Yang, Y., Deng, Y., Wang, Z., Yuan, Y., Yang, S., Qi, J., Wu, J., Fu, D., Wang, W., & Hao, Q. (2021c). Overexpression of isochorismate synthase enhances salt tolerance in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 139–149. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2021.02.032>
- Wang, X., Jia, L., & Ji, F. (2023b). Structural and enzymatic characterization of *Bacillus subtilis* R,R-2,3-butanediol dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1867(4), 130326. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2023.130326>
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucoleri, R., Lee, S. Y., Fischbach, M. A., Müller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E., & Medema, M. H. (2015). AntiSMASH 3.0-A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W237–W243. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv437>
- Wellner, S., Lodders, N., & Kämpfer, P. (2011). Diversity and biogeography of selected phyllosphere bacteria with special emphasis on *Methylobacterium* spp. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(8), 621–630. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2011.08.005>
- Wenke, K., Wanke, D., Kilian, J., Berendzen, K., Harter, K., & Piechulla, B. (2012). Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY18 function. *The Plant Journal*, 70(3), 445–459. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3113X.2011.04891.X>
- Wierzbicki, M. P., Maloney, V., Mizrachi, E., & Myburg, A. A. (2019). Xylan in the middle: Understanding xylan biosynthesis and its metabolic dependencies toward improving wood fiber for industrial processing. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10, pp. 1–29). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00176>
- Williamson, G. (2017). The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin*, 42(3), 226–235. <https://doi.org/10.1111/NBU.12278>
- Wilson, M. A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D. K., Joseph, J. A., & Wolkow, C. A. (2006). Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in

Caenorhabditis elegans. *Aging Cell*, 5(1), 59. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00192.X>

Xie, S., Liu, J., Gu, S., Chen, X., Jiang, H., & Ding, T. (2020). Antifungal activity of volatile compounds produced by endophytic *Bacillus subtilis* DZSY21 against *Curvularia lunata*. *Annals of Microbiology*, 70(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01553-0>

Xiong, C., Singh, B. K., He, J. Z., Han, Y. L., Li, P. P., Wan, L. H., Meng, G. Z., Liu, S. Y., Wang, J. T., Wu, C. F., Ge, A. H., & Zhang, L. M. (2021). Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome. *Microbiome*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S40168-021-01118-6/FIGURES/5>

Yan, H., Jin, H., Fu, Y., Yin, Z., & Yin, C. (2019). Production of Rare Ginsenosides Rg3 and Rh2 by Endophytic Bacteria from *Panax ginseng*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(31), 8493–8499. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B03159/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2019-031598_0006.JPEG

Yan, H., Yan, J., Sui, X. H., Wang, E. T., Chen, W. X., Zhang, X. X., & Chen, W. F. (2016). *Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2910–2916. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001120>

Yan, S., Zeng, M., Wang, H., & Zhang, H. (2022). Micromonospora: A Prolific Source of Bioactive Secondary Metabolites with Therapeutic Potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(13), 8735–8771. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.2C00626/ASSET/IMAGES/LARGE/JM2C00626_0030.JPEG

Yang, B. Y., Yang, J. X., Wang, G., Dong, W. P., Xu, P. L., Zheng, Y., Yang, W., Yao, X. F., Xu, J. H., Guo, J. H., Luo, Y. M., Niu, D. D., Yu, Y. Y., & Jiang, C. H. (2024a). Tacrolimus analogue produced by *Bacillus amyloliquefaciens* HSSN09 suppresses watermelon Fusarium wilt by antagonizing FON. *Biological Control*, 189, 105447. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2024.105447>

Yang, L., & Chen, J. (2022). A comprehensive evaluation of microbial differential abundance analysis methods: current status and potential solutions. *Microbiome*, 10(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S40168-022-01320-0/FIGURES/7>

Yang, P., Yuan, P., Liu, W., Zhao, Z., Bernier, M. C., Zhang, C., Adhikari, A., Opiyo, S. O., Zhao, L., Banks, F., & Xia, Y. (2024b). Plant Growth Promotion and Plant Disease Suppression Induced by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain GD4a. *Plants* 2024, Vol. 13, Page 672, 13(5), 672. <https://doi.org/10.3390/PLANTS13050672>

- Yang, R., Liu, P., & Ye, W. (2017). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia* Sect. Moutan) roots and leaves. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 695. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.02.009>
- Ye, Y., Gu, Q., & Sun, X. (2020). Potential of *Caenorhabditis elegans* as an antiaging evaluation model for dietary phytochemicals: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3084–3105. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12654>
- Yi, L., Dong, X., Grenier, D., Wang, K., & Wang, Y. (2021). Research progress of bacterial *quorum* sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics. *Science of The Total Environment*, 763, 143031. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143031>
- Yoon, S. H., Ha, S. min, Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(10), 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/S10482-017-0844-4/FIGURES/3>
- You, X., Fang, H., Wang, R., Wang, G.-L., & Yuese, N. (2020). Phenylalanine ammonia lyases mediate broad-spectrum resistance to pathogens and insect pests in plants. *Science Bulletin*, 65, 1425–1427. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.05.014>
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138–145. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2010.11.001>
- Yue, H., Yue, W., Jiao, S., Kim, H., Lee, Y.-H., Wei, G., Song, W., & Shu, D. (2023). Plant domestication shapes rhizosphere microbiome assembly and metabolic functions. *Microbiome*, 11(70). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40168-023-01513-1>
- Yue, J., Yang, F., Xiao, Y., Lin, S., He, Z., Wang, S., Zhao, J., Yuan, J., Li, L., & Liu, L. (2024). *Comamonas endophytica* sp. nov., a novel indole acetic acid producing endophyte isolated from bamboo in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(1), 006217. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.006217/CITE/REFWORKS>
- Yue, Y., Li, S., Shen, P., & Park, Y. (2021). *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. *Current Research in Food Science*, 4, 692–697. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.09.008>
- Yun, H. S., Sul, W. J., Chung, H. S., Lee, J. H., & Kwon, C. (2023). Secretory membrane traffic in plant–microbe interactions. *New Phytologist*, 237(1), 53–59. <https://doi.org/10.1111/NPH.18470>
- Zakrzewski, M., Proietti, C., Ellis, J. J., Hasan, S., Brion, M. J., Berger, B., & Krause, L. (2017). Calypso: a user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-

environment interactions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(5), 782–783. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW725>

Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. A., Mills, D. A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D., & Gilbert, J. A. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02527-14>

Zboralski, A., & Fillion, M. (2020). Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3539–3554. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.11.025>

Zeder, M. A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11597–11604. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0801317105>

Zenginbal, H., Öztürk, A., & Faizi, Z. A. (2023). Bacterial strains promote the growth of peach, sweet cherry and plum saplings in the regions with the short growing season. *Rhizosphere*, 27, 100716. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2023.100716>

Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18(5), 821–829. <https://doi.org/10.1101/GR.074492.107>

Zhang, B., Xu, L., Ding, J., Wang, M., Ge, R., Zhao, H., Zhang, B., & Fan, J. (2022). Natural antimicrobial lipopeptides secreted by *Bacillus* spp. and their application in food preservation, a critical review. *Trends in Food Science & Technology*, 127, 26–37. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2022.06.009>

Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z., & Zhu, J. (2020a). Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196>

Zhang, J., Singh, D., Guo, C., Shang, Y., Peng, S., Zhang, J., Singh, D., Guo, C., Shang, Y., & Peng, S. (2020c). Rhizobia at Extremes of Acidity, Alkalinity, Salinity, and Temperature. *Microbial Versatility in Varied Environments: Microbes in Sensitive Environments*, 51–65. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3028-9_4

Zhang, N., Jiao, S., & Jing, P. (2021). Red Cabbage Rather Than Green Cabbage Increases Stress Resistance and Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10060930>

Zhang, S., Li, F., Zhou, T., Wang, G., & Li, Z. (2020b). *Caenorhabditis elegans* as a Useful Model for Studying Aging Mutations. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 554994. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.554994/BIBTEX>

- Zhang, Y., Berman, A., & Shani, E. (2023). Plant Hormone Transport and Localization: Signaling Molecules on the Move. *Annual Review of Plant Biology*, 74(Volume 74, 2023), 453–479. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-070722-015329/CITE/REFWORKS>
- Zhao, X., Yu, Z., & Ding, T. (2020). Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 425, 8(3), 425. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030425>
- Zhong, R., Cui, D., & Ye, Z. H. (2019). Secondary cell wall biosynthesis. *New Phytologist*, 221(4), 1703–1723. <https://doi.org/10.1111/NPH.15537>
- Zhong, T., Wang, Z., Zhang, M., Wei, X., Kan, J., Zalán, Z., Wang, K., & Du, M. (2021). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX as potential biological fumigants against gray mold on postharvest grapes. *Biological Control*, 163, 104754. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2021.104754>
- Zhou, C., Zhu, J., Qian, N., Guo, J., & Yan, C. (2021). *Bacillus subtilis* SL18r Induces Tomato Resistance Against *Botrytis cinerea*, Involving Activation of Long Non-coding RNA, MSTRG18363, to Decoy miR1918. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2317. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.634819>
- Zhou, W., Xue, P., & Xu, D. (2024). Exploring disparities in employment location and structure: The influence of off-farm employment on reducing chemical fertilizer usage. *Journal of Cleaner Production*, 440, 140720. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2024.140720>
- Zhou, Z., Wang, C., & Luo, Y. (2020). Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16881-7>
- Zhu, A., Zheng, F., Zhang, W., Li, L., Li, Y., Hu, H., Wu, Y., Bao, W., Li, G., Wang, Q., & Li, H. (2022a). Oxidation and Antioxidation of Natural Products in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11040705>
- Zhu, L., Huang, J., Lu, X., & Zhou, C. (2022b). Development of plant systemic resistance by beneficial rhizobacteria: Recognition, initiation, elicitation and regulation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 952397. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.952397/BIBTEX>