

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA  
INSTITUTO HISPANOLUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

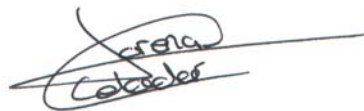


TESIS DOCTORAL

---

Selección de bioinoculantes agrícolas mediante la caracterización molecular y funcional de bacterias asociadas a *Zea mays* y su análisis práctico en la mejora del rendimiento de cultivos de maíz, canónigos, albahaca, berros y rúcula.

Memoria presentada por **Lorena Celador Lera** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.



Fdo. Lorena Celador Lera

Salamanca, 2017



**Dr. Raúl Rivas González, Profesor Titular del área de Microbiología y Dra. Esther Menéndez Gutiérrez.**

**AUTORIZAN:**

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Selección de bioinoculantes agrícolas mediante la caracterización molecular y funcional de bacterias asociadas a *Zea mays* y su análisis práctico en la mejora del rendimiento de cultivos de maíz, canónigos, albahaca, berros y rúcula”, elaborada por Doña Lorena Celador Lera y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del grado de Doctora.

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 16 de Noviembre de 2017.



Fdo.: Dr. D. Raúl Rivas González



Fdo.: Dr. Dña. Esther Menéndez Gutiérrez



*A mis padres*

*A mi hermano*

*A David*



*“Si lo intentas quizás, si no jamás”*





## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Raúl Rivas González por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo y de conocer a la maravillosa gente que lo conforma. También a mi codirectora la Dra. Esther Menéndez Gutiérrez por su inestimable ayuda ofrecida a lo largo de este camino y sobre todo por su amistad.

Al Catedrático Eustoquio Martínez Molina, gracias por estar ahí cuando lo he necesitado. Al Catedrático Pedro Mateos González gracias por las charlas aclaratorias, por enseñarme el arte del Photoshop, el mundo de las celulasas y por acompañarlo todo con su alegría y un buen café. A la Catedrática Encarna Velázquez, gracias por enseñarme tanto, desde la microbiología hasta la Sindonología pasando por el Planeta X. Y porque sin duda eres una mujer admirable.

Y... qué sería de esta tesis sin mi **LABORATERAPIA**, a todos los que habéis hecho que hacer una tesis haya merecido la pena únicamente por conoceros. Ale, Alex, Esther, Lina, Lore Carro, Marta, Paula, Pepe, Pi, Xavier y Zaki. También a los que no siendo que este labo, siempre han sido parte de esta gran familia, Rebe, Pepín y Primo. Gracias a cada uno de vosotros, por las risas diarias, por los videos, por los viajes (Irlanda, Inglaterra, Rusia...), por los congresos (Girona, León, Budapest...), por los cafés, por las cenitas, por las cañas, por los karaokes, por las *scaperooms*, por el *puenting*, por la escalada... A los ensayos de campo por la meseta castellana, que aunque el día fuese duro, siempre le sacábamos el lado bueno. A las horas de las comidas y de café junto a vosotros, en los que hablamos de todo y de nada. Y por los miles de momentos que recuerdo y me sale una sonrisa solo de pensarlo.

Gracias a la gente que de una manera u otra, han aportado su granito de arena en esta etapa: Inma, Toñi, Fernando (MALDI), Fernando (técnico), Nieves, Laura Ramudo, Ricardo, Pilar, Mamen, Tomi, Manolo, Angie, Tomás, Belén, Irene, Marta Robledo, etc.

En especial, quiero agradecer a Alexandra, su amistad y compañía de los años en los que parecía que el destino no quería que nos separásemos ni un momentito, ya que juntas hicimos el Máster de Agrobiotecnología, que como nos supo a poco decidimos hacer otro jaja, al *running* mañanero y como no, a nuestra inolvidable *summer school* en Heidelberg que con tanto cariño recuerdo y que además terminamos con la visita a Paula (y su maravillosa familia) en Praga.

También, quiero agradecer a los garridenses los *afterworks* de cañas, Gilbertos, kwaks... por los buenos ratos que me han hecho pasar y por vuestra compañía y amistad.

A mis compañeros del Máster de Agrobiotecnología Pablo, Jorge, Valentina, Leyre y Ale, por los buenos momentos que pasamos en el CIALE y también en el Gatsby.

A mis compañeros de carrera, mi grupito Grulla, Cris, Sergio y Marta por vuestra amistad y por los buenos momentos junto a vosotros.

A mis amigas, Arantza, Carmen, Laura, María, Mary Mar, Raquel y Sandra por formar parte de mi vida desde que teníamos poco más que seis años, porque soy muy afortunada de teneros a mi lado. Y como esta gran familia crece... a los peques Asier y Ainhoa.

Ahora toca el turno a mis padres y mi hermano. Gracias por el cariño que me dais cada día, por apoyar mis decisiones, por estar ahí en los buenos y en los malos momentos. Nunca dejaré de agradecer el inmenso cariño que me dais día a día. Porque vosotros sois el secreto de mi felicidad. Os quiero.

También quiero agradecer a mi familia, el apoyo recibido. En especial a mis abuelos, que siempre han estado muy orgullosos de mí y quiero decir, que soy yo la que estoy orgullosa de ellos.

A mi compañero de viaje, David, gracias por el cariño y el apoyo que me has dado siempre y por demostrarme tanto. Porque estar escribiendo estas palabras, significa que pronto nos toca empezar una vida juntos, al menos ahora, sin distancias. Te quiero. También quiero agradecer a su familia, su cariño y su constante interés por mi trabajo, porque con ellos siempre me he sentido como una más.

Y por último, gracias a mi Tambor, por hacerme compañía y estar siempre a mis pies, en las interminables horas de ordenador.

# ÍNDICE



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### INTRODUCCIÓN.

<b>1. LA AGRICULTURA Y SU EVOLUCIÓN.</b>	<b>3</b>
<b>2. BACTERIAS ENDÓFITAS Y SU COLONIZACIÓN EN LA PLANTA.</b>	<b>4</b>
<b>3. MECANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.</b>	<b>6</b>
3.1 Síntesis de sustancias asimilables por las plantas.	7
3.1.1 Fijación de nitrógeno.	7
3.1.2 Fitohormonas.	8
3.2 Movilización de nutrientes.	10
3.2.1 Solubilización de fosfato.	10
3.2.2 Solubilización de potasio.	10
3.2.3 Producción de sideróforos.	10
3.3 Control biológico frente a patógeno.	12
3.4 Antibiosis.	12
3.5 Inducción de resistencia en plantas.	13
3.6 Enzimas que degradan la pared celular vegetal.	14
<b>4. BACTERIAS PGPR UTILIZADAS COMO BIOFERTILIZANTES.</b>	<b>16</b>
4.1 Bacterias endófitas de cereales utilizadas como biofertilizantes.	16
4.2 Bacterias PGPB en cultivos de maíz.	18
4.3 Bacterias PGPB en cultivos hortícolas.	20
4.3.1 <i>Eruca sativa</i> Mill.	21
4.3.2 <i>Ocimum basilicum</i> L.	22
4.3.3 <i>Valerianella locusta</i> L.	22
4.3.4 <i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	23
<b>5. IMPORTANCIA DE LA APLICACIÓN DE BIOINOCULANTES SEGUROS.</b>	<b>25</b>
<b>6. LA CONTRIBUCIÓN DE LA SECUENCIACIÓN DE GENOMAS BACTERIANOS EN EL CONOCIMIENTO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LAS ASOCIACIONES MUTUALISTAS PLANTA-MICROORGANISMO.</b>	<b>26</b>

### OBJETIVOS.

Objetivos	33
-----------	----

### MATERIALES Y MÉTODOS.

<b>1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.</b>	<b>37</b>
1.1 Recolección de muestras.	37
1.2 Aislamiento de cepas.	37
1.3 Mantenimiento y conservación de cepas.	38
<b>2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.</b>	<b>38</b>
2.1 Caracterización fenotípica.	38
2.1.1 Morfología.	38
2.1.2 pH.	38
2.1.3 Temperatura.	38
2.1.4 Salinidad.	38
2.1.5 Resistencia a antibióticos.	38
2.1.6 Caracterización de los aislados por métodos enzimáticos.	39
2.1.7 Determinación cualitativa de la producción de celulosa.	40

2.1.8	Determinación de la formación de biofilms en placas de microtitulación de poliestireno.	40
2.2	Características PGPR.	41
2.2.1	Producción de sideróforos.	41
2.2.2	Solubilización de fosfato.	42
2.2.3	Producción de ácido indol-acético.	43
2.2.4	Estudios antibiosis <i>in vitro</i> .	45
2.3	Caracterización adicional para la identificación de la nueva especie.	46
2.3.1	Determinación del contenido en G+C.	46
2.3.2	Pruebas bioquímicas utilizando sistemas comerciales.	47
2.3.3	Antibiograma.	47
<b>3.</b>	<b>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.</b>	<b>48</b>
3.1	Caracterización genotípica.	48
3.1.1	Extracción de DNA.	48
3.1.1.1	Extracción de DNA total para secuenciación del genoma.	48
3.1.1.2	Extracción de DNA total.	48
3.1.2	Amplificación de DNA.	49
3.1.2.1	Obtención de perfiles RAPD.	49
3.1.3	Electroforesis.	50
3.1.4	Secuenciación del gen ribosómico 16S.	50
3.1.4.1	Análisis de las secuencias de DNA.	51
3.1.5	Secuenciación y análisis de los genomas.	51
3.2	Clonajes y fragmentos de interés.	51
3.3	Transformación de bacterias.	53
3.3.1	Transformación bi-triparental de <i>Rhizobium</i> .	53
3.3.2	Construcción de la sobreexpresión heteróloga del gen CelC2 de <i>R. leguminosarum</i> <i>bv trifolii</i> ANU843 en la cepa CRZM52R.	55
3.3.3	Transformación de <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> .	56
<b>4.</b>	<b>TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.</b>	<b>57</b>
4.1	Detección de actividad celulítica.	57
4.1.1	Detección de actividad celulásica en cultivo celular.	
	Ensayos en placa de doble capa.	58
4.1.2	Obtención de extractos celulares por sonicación.	58
4.1.3	Detección de actividad celulítica de los extractos celulares.	
	Ensayos en doble capa.	59
4.2	Método Bradford (Bio-Rad).	59
4.3	Electroforesis vertical de proteínas (SDS-PAGE).	60
4.3.1	Preparación de geles de poliacrilamida.	60
4.4	Cuantificación de la actividad celulolítica. Valoración de grupos reductores o BCA.	63
4.5	Reacción de valoración de grupos reductores.	64
<b>5.</b>	<b>TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.</b>	<b>65</b>
5.1	Western Blot.	65
5.1.1	Preparación de muestras el Western.	65
5.1.2	Transferencia a membrana de nitrocelulosa.	66
<b>6.</b>	<b>ENSAYOS EN PLANTA.</b>	<b>68</b>
6.1	Desinfección y germinación de semillas.	68
6.2	Inoculación de semillas en placa.	69
6.3	Inoculación de plantas en cámara iluminada.	69
6.4	Inoculación de plantas en invernadero.	70
6.4.1	Ensayo de plantas de maíz.	70
6.4.2	Ensayo de plantas hortícolas.	71
6.4.3	Estudios de antibiosis en invernadero.	71

6.5 Ensayos en plantas de <i>Zea mays</i> en campo.	72
6.6 Análisis de macro/microelementos.	73
6.6.1 Análisis del suelo.	73
6.6.2 Análisis del material vegetal.	73
<b>7. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.</b>	<b>74</b>
7.1 Montaje de muestras para observación del microscopio.	74
7.1.1 Observación de las células de una colonia al microscopio.	74
7.1.2 Para la observación de raíces al microscopio.	74
7.1.3 Preparación cortes transversales de raíces.	74
7.1.4 Preparación de muestras para microscopía electrónica.	74
7.2 Tipos de microscopía utilizada.	75
7.2.1 Microscopía óptica convencional.	75
7.2.2 Microscopía óptica de fluorescencia.	75
7.2.3 Microscopía óptica confocal.	76
7.2.4 Microscopía electrónica de transmisión.	76
7.3 Cuantificación de la colonización en el interior de las raíces.	76
<b>8. SOFTWARES UTILIZADOS.</b>	<b>77</b>

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### *Capítulo I*

#### *Estudio de la biodiversidad bacteriana en raíz y tallo de *Zea mays*.*

<b>1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS AISLADAS.</b>	<b>83</b>
<b>2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS.</b>	<b>85</b>
2.1 Microscopía y tinción de gram.	85
2.2 Estudio del crecimiento de los aislados sometidos a diferentes estreses.	85
2.2.1 Salinidad.	86
2.2.2 Temperatura.	86
2.2.3 pH.	87
2.3 Resistencia a Antibióticos.	89
2.4 Producción de exoenzimas.	92
<b>3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.</b>	<b>96</b>
3.1 Análisis de la diversidad mediante perfiles RAPD.	96
3.2 Análisis de secuencias del gen ARN ribosómico del 16S.	98
3.3 Caracterización de una nueva especie aislada del interior de las raíces de <i>Zea mays</i> .	106
3.3.1 Caracterización genotípica.	106
3.3.2 Quimiotaxonomía: ácidos grasos.	110
3.3.3 Caracterización fenotípica.	111
3.3.4 Descripción de <i>Rhizobium zeae</i> sp. nov.	112

## Capítulo II

### *Análisis del potencial PGPR de los aislados.*

<b>1. MECANISMOS PGPB (PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA) IN VITRO.</b>	<b>117</b>
1.1 Producción de sideróforos.	117
1.2 Solubilización de fosfato.	119
1.3 Producción de ácido indol acético.	120
1.4 Capacidad de crecimiento en medio sin fuente de nitrógeno.	122
1.5 Producción de celulasas	123
<b>2. PROTECCIÓN FRENTE A PATÓGENOS VEGETALES EJERCIDA POR LA CEPA <i>STREPTOMYCES GRISEOAURANTIACUS</i>.</b>	<b>126</b>
2.1 Estudios <i>in vitro</i> .	126
2.2 Ensayos <i>in planta</i> .	128

## Capítulo III

### *Análisis de la colonización e infección de bacterias seleccionadas en plantas de maíz.*

<b>1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ASOCIADAS A LA COLONIZACIÓN.</b>	<b>135</b>
1.1 Producción de celulosa.	135
1.2 Determinación de la formación de biofilms <i>in vitro</i> .	137
<b>2. INOCULACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN SEMILLAS DE <i>ZEA MAYS</i>.</b>	<b>140</b>
<b>3. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE LA COLONIZACIÓN DE LOS AISLADOS EN RAÍCES DE <i>ZEA MAYS</i>.</b>	<b>142</b>
<b>4. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA INFECCIÓN DE LOS AISLADOS EN LAS RAÍCES DE <i>ZEA MAYS</i>.</b>	<b>147</b>

## Capítulo IV

### *Análisis del genoma de las especies seleccionadas*

<b>1. CEPAS SELECCIONADAS PARA LA SECUENCIACIÓN DE GENOMAS.</b>	<b>155</b>
<b>2. SECUENCIACIÓN DE LOS GENOMAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.</b>	<b>158</b>
<b>3. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL.</b>	<b>160</b>
3.1. Genes implicados en la producción de sideróforos.	160
3.2. Genes implicados en la solubilización de fosfato.	162
3.3. Genes implicados en la tolerancia a la salinidad y la solubilización de potasio	163
3.4. Genes implicados en la producción de ácido indol acético.	164
3.5. Genes implicados en la fijación de nitrógeno y simbiosis.	165
<b>4. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN ENDOFÍTICA.</b>	<b>166</b>
4.1. Genes implicados en la producción de enzimas implicadas en biosíntesis, procesamiento y degradación de polisacáridos.	166
4.2. Genes implicados en la biosíntesis de celulosa.	168
4.3. Otros genes implicados en la colonización y producción de biofilms.	174
<b>5. PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS ASOCIADAS A LA CEPA DE <i>STREPTOMYCES CRZM149R</i>.</b>	<b>175</b>



*Capítulo V**Obtención y caracterización bioquímica de un mutante superproductor de celulasa CelC2 en Rhizobium leucaenae.*

<b>1. OBTENCIÓN DE LA CEPA TRANSFORMANTE DE <i>R. LEUCAENAE</i> QUE EXPRESA HETERÓLOGAMENTE LA CELULASA CELC2</b>	<b>183</b>
1.1. Detección de la actividad celulásica	183
1.1.1. Detección de la actividad celulásica en cultivo celular y en extractos mediante la técnica de difusión en placa de doble capa.	183
1.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y zimograma.	184
1.1.3. Cuantificación de la actividad celulolítica.	185
1.1.4. Detección de la proteína CelC2 mediante Inmunoblot.	186
<b>2. EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE CELULASA CELC2 EN LA BIOSÍNTESIS DE CELULOSA Y FORMACIÓN DE BIOFILMS.</b>	<b>187</b>
<b>3. EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA CELULASA CELC2 EN EL DESARROLLO RADICULAR DE PLÁNTULAS DE <i>ZEA MAYS</i>.</b>	<b>189</b>
<b>4. EVALUACIÓN DE LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN DE <i>R. LEUCAENAE</i> CRZM52RC2<sup>+</sup> EN RAÍCES DE <i>ZEA MAYS</i>.</b>	<b>191</b>
4.1. Ensayos de colonización mediante microscopía confocal.	191
4.2. Ensayos de colonización mediante microscopía óptica y electrónica.	194
<b>5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRANSFORMANTE EN EL DESARROLLO VEGETAL DEL MAÍZ EN ENSAYO DE CÁMARA CLIMATIZADA.</b>	<b>199</b>

*Capítulo VI**Ensayos de producción del maíz.*

<b>1. EVALUACIÓN DE LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN CONDICIONES CONTROLADAS.</b>	<b>203</b>
<b>2. ENSAYOS DE MICROCOSMOS EN INVERNADERO.</b>	<b>205</b>
<b>3. ENSAYO DE CAMPO.</b>	<b>209</b>
3.1. Análisis de los valores obtenidos en campo.	211
3.2. Análisis del suelo.	213
3.3. Análisis del contenido nutricional del grano de maíz.	215

*Capítulo VII.**Estudios de la acción PGPR de Rhizobium en plantas hortícolas.*

<b>1. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA INTERACCIÓN DE LOS AISLADOS CON LAS RAÍCES DE RÚCULA, ALBAHACA, CANÓNIGOS Y BERROS.</b>	<b>219</b>
<b>2. ANÁLISIS DE LA PROMOCIÓN RADICULAR EN SEMILLAS DE RÚCULA, ALBAHACA, CANÓNIGOS Y BERROS.</b>	<b>223</b>
<b>3. ENSAYOS DE MICROCOSMOS EN INVERNADERO.</b>	<b>225</b>
3.1. Análisis cuantitativo de los elementos esenciales de las hojas.	229

**DISCUSIÓN GENERAL.**

Discusión general.

233

**CONCLUSIONES.**

Conclusiones.

247

**BIBLIOGRAFÍA.**

Bibliografía.

251

°C	Grados centígrados	ml	Mililitros
®	Marca registrada	ORF	"open reading frame"
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico	pb	Pares de bases
bv	Biovar	PAGE	"polyacrilamide gel electrophoresis"
cm	Centímetros	PCR	"polymerase chain reaction"
CMC	Carboximetilcelulosa	R	"reverse"
dNTP	Desoxinucleótidos-5'-fosfato	rpm	Revoluciones por minuto
D.O	Densidad óptica	'	Minutos
EDTA	Ácido etilendiaminoetetracético	"	Segundos
<i>et al.</i>	y colaboradores	SDS	Dodecilsulfato sódico
F	"forward"	sp	Especie
g	Gramos	TAE	Tris acético EDTA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	TEMED	Tetrametilendiamida
sp	Especie	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Kb	kilobase	TY	Tryptone Yeast (medio)
l	Litro	UV	Ultravioleta
lacZ	Operón lacZ	VRB	Violet Red Agar (medio)
LB	Luria-Berthani (medio)	X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactósido
M	Molar	YMA	Yeast Mannitol Agar (medio)
µg	Microgramos	wt	<i>Wild type</i> /cepa silvestre
µl	Microlitros	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
µM	Micromolar	CAZY	Carbohydrate Active enZymes
µm	Micromoles	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
mg	Miligramos	RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
AIA	Ácido indol acético		



# INTRODUCCIÓN



## 1. LA AGRICULTURA Y SU EVOLUCIÓN.

Las bases de las civilizaciones comenzaron a establecerse cuando los seres humanos fueron capaces de obtener alimentos mediante técnicas agrícolas y ganaderas. La primera práctica agrícola fue la domesticación de diferentes especies vegetales (Khush 2001). Los restos arqueológicos se establecen en Mesopotamia, donde el trigo y la cebada se cultivaron en primer lugar. El resto del mundo siguió poco después; por ejemplo, en América los nativos comenzaron a cultivar y cosechar maíz, tomate y patata entre otros cultivos, mientras que en Asia comenzaron a cultivar arroz (Carpanetto and Bianchini 2011).

Junto con la migración de la población a las grandes ciudades, la tierra para la agricultura y la capacidad de producir cultivos más productivos tuvieron que aumentar, para evitar poner en peligro la estabilidad social (Zanden 1991; Ang et al. 2010).

Fue a principios del siglo XX, donde surgieron nuevas tecnologías como los equipos mecánicos que facilitaban el aumento de la producción agrícola. Además, la rotación de cultivos, las semillas de mejor calidad y el uso de fertilizantes comenzaron a ser prácticas comunes (Zanden 1991). Años después (1966-1985), tuvo lugar la llamada Revolución Verde, donde aumentaron los rendimientos de los cultivos gracias a la mejora genética (Pingali 2012), realizando una selección de los mejores rasgos genéticos, adaptación a diferentes ambientes, resistencia a factores abióticos nocivos, resistencia al estrés biótico y períodos de cosecha reducidos (Skorov 1973; Khush 2001).

También fueron muy importantes, las mejoras en el riego, los métodos de cultivo, los tiempos de siembra-cosecha, la aplicación de fertilizantes químicos y el control de malezas y plagas (Skorov 1973; Conway and Barbie 1988; Peng et al. 1999). Por ejemplo, las tierras empleadas para el cultivo de cereales aumentaron sólo en un 30%, mientras que la producción de cereales aumentó en un 90%. Si evaluamos los cultivos más importantes desde el comienzo de la Revolución Verde hasta el nuevo milenio, todos ellos aumentaron sus rendimientos: 208% en trigo, 157% en maíz, 109% en arroz y 78% en patata, entre otros (Pingali 2012).

A pesar de estas mejoras la Revolución Verde conllevaba también desventajas, ya que aumentaron las plagas y enfermedades y se utilizaron de manera desproporcionada los fertilizantes químicos. Dicho uso inadecuado puede afectar la salud humana y contaminar las aguas subterráneas, causando consiguientes efectos en los sistemas acuáticos y la pérdida de diversidad genética, entre otros (Conway and Barbie 1988).

En la actualidad, el planeta aumenta unos 70 millones de personas cada año y se calcula que la población mundial llegará a unos 9.500 millones de personas en 2050 (Soby 2013), por lo que existe una necesidad de aumentar la producción de alimentos sin afectar al medio ambiente (Sayer and Cassman 2013).

En este sentido, los biofertilizantes basados en microorganismos beneficiosos, sobre todo bacterias, suponen una potencial solución a esta problemática, ya que algunas cepas bacterianas (PGPB: Plant Growth Promoting Bacteria) tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos, denominados generalmente mecanismos PGP (Plant Growth Promoting mechanisms) (García-Fraile et al. 2015). Algunos de ellos son habitantes comunes de la rizosfera (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Otros viven como epífitas sobre los tejidos vegetales o incluso dentro de su huésped vegetal,

## Introducción

como los endófitos, sin inducir ninguna enfermedad (PGPBE: Plant Growth Promoting Bacterial Endophytes). En algunos casos, como en la simbiosis rizobio-leguminosa, las bacterias viven dentro de los nódulos, órganos de las plantas específicamente creados para hospedarlos y fijar nitrógeno en él. Las combinaciones de una o varias de estas cepas bacterianas se formulan en productos y se aplican a los campos como biofertilizantes, aumentando el rendimiento de los cultivos por la disponibilidad y absorción de nutrientes minerales para las plantas, sin una dependencia total de los fertilizantes químicos (García-Fraile et al. 2017).

Los cultivos de cereales como el maíz, de gran importancia en las regiones climáticas templadas y semiáridas, requieren grandes cantidades de fertilizantes por lo que se están estudiando nuevas formas de fertilización para satisfacer su creciente demanda. Ferreira et al. (2013), mostraron que los rendimientos de grano se incrementaron hasta el 29% cuando *Azospirillum brasilense* Ab-V5 y nitrógeno se aplicaron a los campos, en comparación con el tratamiento con sólo fertilización con nitrógeno. Por otra parte, Egamberdiyeva (2007) mostró que la inoculación de maíz con *Mycobacterium phlei* MbP18 aumentó significativamente (38%) la materia seca total de este cultivo, en comparación con el control no inoculado.

Por otro lado, hoy en día los consumidores son más conscientes del sistema de producción, seguridad alimentaria y calidad (Trienekens and Zuurbier 2008) y debido a la conciencia ambiental general, muchos países están aceptando e incluyendo en su legislación políticas más sostenibles con el medio ambiente. Estas iniciativas incentivan el consumo de hortalizas y frutas ricas en sustancias bioactivas. Sus efectos beneficiosos y la relación con la salud humana se han analizado en muchos estudios (Sun-Waterhouse 2011; Jiménez-Gómez et al. 2017).

## 2. BACTERIAS ENDÓFITAS Y SU COLONIZACIÓN EN LA PLANTA.

Como hemos podido observar durante muchos años, científicos de todo el mundo han desarrollado y publicado estudios que tratan sobre el gran potencial que algunas cepas bacterianas tienen para promover el crecimiento de las plantas, siendo éstas las ya citadas PGPB (García-Fraile et al. 2015). Muchas de estas bacterias son endófitas, es decir, viven dentro del tejido vegetal ('*endo*', dentro, '*phyte*', planta). Por tanto, las bacterias endófitas capaces de influir en el crecimiento de las plantas, se denominan PGPBE (Plant Growth Promoting Bacterial Endophytes) (Gaiero et al. 2013). El potencial de los PGPBE para mejorar la salud de las plantas ha llevado a un gran número de estudios que examinan su uso como inoculantes, principalmente en cultivos agrícolas (García-Fraile et al. 2015, 2017). Debido a estas cualidades, los PGPBE son candidatos importantes para ser utilizados como inoculantes para reducir la necesidad de productos químicos, tales como pesticidas y fertilizantes, obteniendo gran importancia en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. En general, es más probable que los endófitos muestren mayores efectos promotores del crecimiento de las plantas que aquellas bacterias que colonizan exclusivamente la rizosfera (Conn et al. 1997; Chanway et al. 2000).

Esto implica el requerimiento de características específicas para la competencia de dichos endófitos, es decir, la capacidad de colonizar con éxito la planta huésped. La colonización y los procesos de infección en planta por las bacterias endófitas pueden realizarse



de varias formas y no necesariamente de manera activa, también pueden entrar de forma pasiva (Compant et al. 2010). Estos modos de entrada pueden ser i) infección intercelular, (ii) infección via “cracks”/heridas e (iii) infección intracelular. Dentro de esta última modalidad de entrada se también engloban los procesos de infección de los rizobios en leguminosas (Murray 2011). Las zonas de emergencia de raíces laterales y las zonas de elongación de las raíces son zonas activas de colonización e infección, debido a que en esas zonas, los tejidos vegetales están ligeramente debilitados y/o las paredes celulares están en remodelación. Además, la entrada por espacios intercelulares es la más extendida dentro de las bacterias con comportamiento endofítico (Reinhold-Hurek and Hurek 2011).

Debido a que las bacterias endófitas son capaces de penetrar en la raíz del huésped, se suponen mejores candidatos para su uso como PGPB en plantas que aquellas bacterias encontradas en la rizosfera que no son capaces de entrar o colonizar activamente como endófitos (Verma et al. 2004). Se ha reportado la existencia de mecanismos activos y pasivos para los procesos de translocación de las bacterias endófitas dentro de sus huéspedes, lo que les permite avanzar desde el rizoplano hasta la corteza del sistema radicular (Figura 1) (Compant et al. 2010). Una vez que una bacteria alcanza la zona cortical de la raíz, una barrera como la endodermis puede bloquear la colonización hacia los tejidos internos; solamente algunas bacterias son capaces de pasar a través de la endodermis (Gregory 2008). Es probable que los endófitos capaces de pasar a través de la endodermis puedan poseer CWDEs permitiéndoles continuar la colonización en el interior (James et al. 2002) o mediante la hidrólisis localizada de los pelos radicales, en el caso de las leguminosas (Robledo et al. 2008, 2011b).

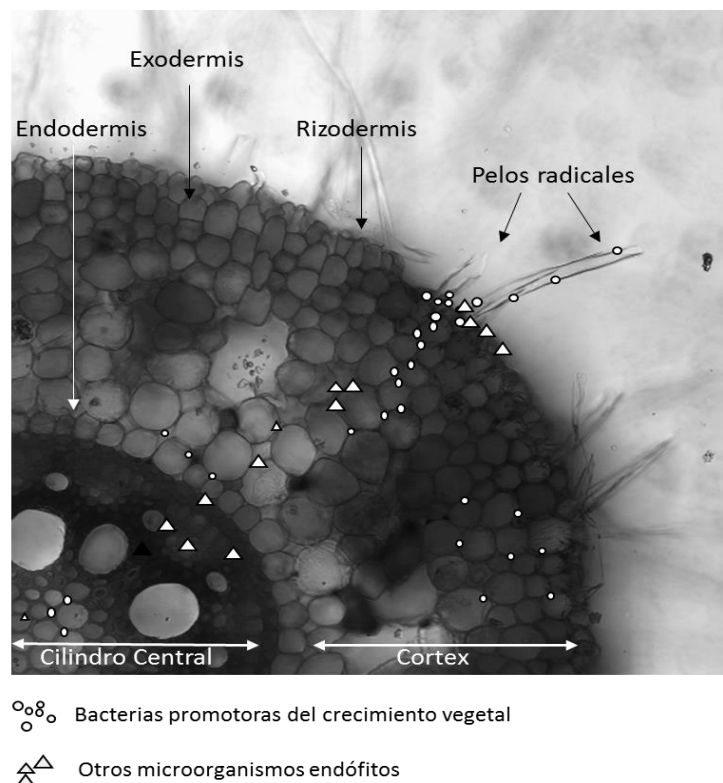


Fig. 1. Lugares de colonización de la planta por bacterias endófitas. Los círculos blancos representan a las bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal (PGPBE) y los triángulos blancos representan otros microorganismos endófitos. Adaptada de Celador-Lera et al (2017).

## Introducción

Por otro lado, algunas bacterias pueden entrar pasivamente, ya que una parte de esta capa celular endodérmica está a menudo interrumpida, debido por ejemplo al crecimiento de las raíces secundarias (Gregory 2008). Por ejemplo, *Azorhizobium caulinodans* puede entrar en el interior de las raíces de arroz por las grietas existentes producidas por la emergencia de las raíces laterales y después se mueven por los espacios intercelulares (Goormachtig et al. 2004). La colonización de las raíces laterales del arroz también se observó con la inoculación de *Azospirillum brasilense*, donde la colonización fue estimulada por la naringenina y otros flavonoides (Jain and Gupta 2003). Además, algunas cepas pueden tener la capacidad de infectar los tejidos de la raíz del arroz a través de los pelos radiculares localizados en las raíces laterales emergentes y extenderse ampliamente a lo largo de la raíz del arroz (Ladha et al. 1996). Perrine-Walker et al. (2007) observaron estructuras similares a canales de infección (“*infection thread-like structures*”) a lo largo de los pelos radiculares de arroz inducidos por una cepa de *R. leguminosarum* bv. trifolii. También se ha observado la colonización por parte de algunos rizobios en las raíces laterales emergentes de arroz, trigo, maíz y colza (Cocking 2003; Bashan et al. 2014; Sakha and El- 2016).

### **3. MECANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.**

La estimulación del crecimiento debido a los microorganismos puede ser una consecuencia causada por mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno la producción de fitohormonas, el control biológico de fitopatógenos en la zona de la raíz (a través de la producción de los agentes antifúngicos o antibacterianos, la producción de sideróforos, la competencia de nutrientes y la adquisición sistemática de resistencia o inmunidad) (Sevilla et al. 2001; Hurek and Handley 2002; Iniguez et al. 2004) o de la mejora de la disponibilidad de minerales (Sturz and Nowak 2000; Sessitsch et al. 2002) (Figura 2). A continuación, agruparemos estos mecanismos según su modo de acción.

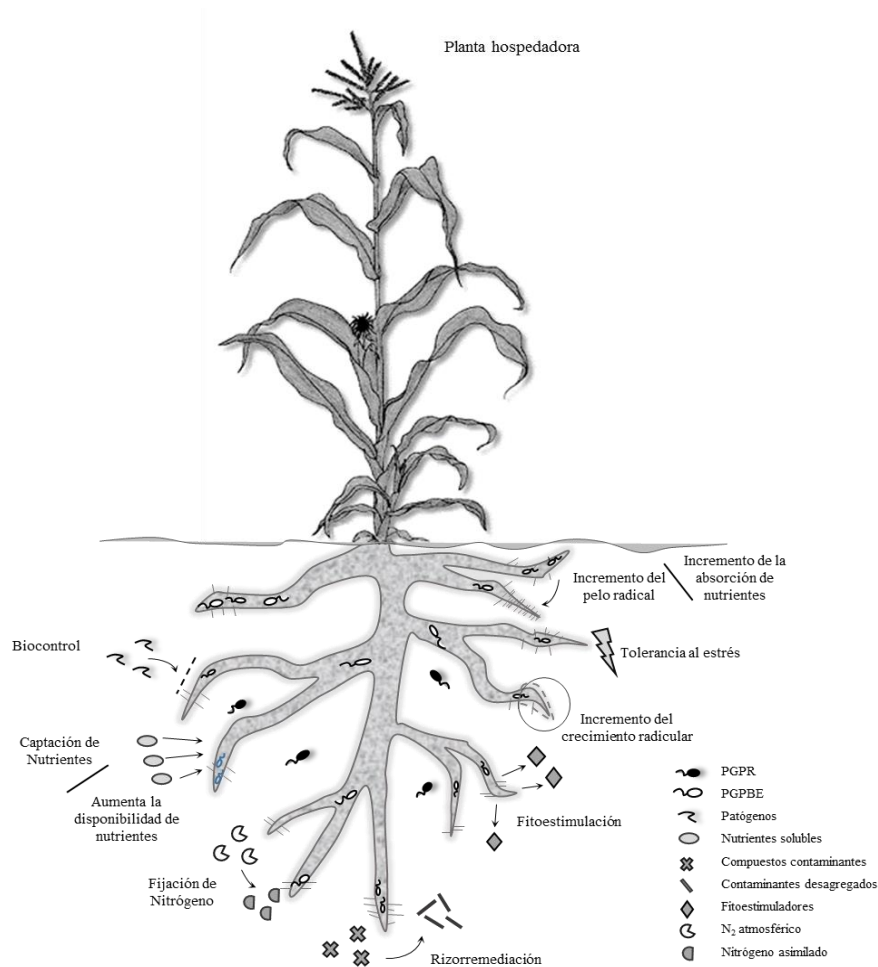


Fig. 2. Representación de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal ejercida por las bacterias endófitas. Adaptada de (Celador-Lera et al. 2017).

### 3.1 Síntesis de sustancias asimilables por las plantas.

#### 3.1.1 Fijación de nitrógeno.

El nitrógeno es el principal elemento nutricional esencial para el desarrollo y productividad de los cultivos, ya que es el nutriente más limitante para las plantas y a su vez es necesario para la formación de aminoácidos y proteínas (Vessey 2003; Khan et al. 2007).

En ausencia de fertilizantes nitrogenados o residuos de animales, la dinámica de los agroecosistemas depende completamente de un grupo de microorganismos que tienen la habilidad para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio, a través de la síntesis de un complejo enzimático denominado nitrogenasa. Este nitrógeno orgánico es convertido a diferentes formas químicas, las cuales pueden ser utilizadas por las plantas y por los mismos microorganismos para suplir total o parcialmente sus requerimientos de síntesis de proteínas y otros compuestos orgánicos (Geisseler et al. 2010).

La capacidad para fijar nitrógeno está restringida a procariontes, siendo las proteobacterias las que mayor cantidad de diazotrofos incluyen (Kneip et al. 2007). Por otro lado, las bacterias pertenecientes al grupo de los rizobios y al de las Actinobacterias, son capaces de formar orgánulos especializados, llamados nódulos, donde se fija el nitrógeno,

estableciendo simbiosis con plantas actinorrhizas y con leguminosas, respectivamente (Brewin 1991; Benson and Silvester 1993).

En otras plantas no leguminosas de importancia agrícola como el maíz, arroz, caña de azúcar, trigo y pastos pueden beneficiarse de esta asociación con diversas bacterias diazotróficas (James 2000). Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno se localizan en vida libre o de forma intercelular en gramíneas, como es el caso de *Azospirillum* y *Klebsiella* (Bashan and Holguin 2004). En el caso de *Azospirillum*, se asocia con plantas no leguminosas comúnmente cereales de las zonas templadas (Tejera et al. 2005) y son capaces de mejorar los rendimientos de los cultivos de arroz, entre otros (Sahoo et al. 2014); el género *Beijerinckia*, que está asociado con las plantaciones de caña de azúcar en las zonas tropicales (Dobereiner 1961); y el género *Azotobacter*, que desempeña un papel importante en la fijación de nitrógeno en los cultivos de arroz y se utiliza como un biofertilizante para el trigo, cebada, arroz, girasoles, maíz, remolacha, tabaco, té, café y cocos (Wani et al. 2013; Sahoo et al. 2014). Algunas especies pertenecientes a los géneros *Gluconacetobacter* (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado 2003), *Azospirillum* (Berg et al. 1980) y *Herbaspirillum* (Vargas and Padua 2003), son endófitas de la caña de azúcar y contribuyen a su fertilización nitrogenada. Algunos estudios muestran como algunas cepas pertenecientes a los géneros de *Azoarcus*, *Azospirillum* y *Burkholderia* entran en las raíces del arroz y aumentan la cantidad de compuestos nitrogenados en el cultivo (Hurek and Reinhold-Hurek 2003; Kao et al. 2003). Otras bacterias diazotróficas endófitas como *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhanella*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Rhizobium* and *Brevundimonas* también contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo del maíz (Montañez et al. 2009). Más recientemente, Puri et al. (2015) observaron que *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R era capaz de fijar nitrógeno y de promover el crecimiento del maíz. Kifle and Laing (2015, 2016) realizaron diversos ensayos tanto en condiciones controladas de laboratorio, en invernadero y en campo con diazotrofos aislados del propio maíz, que pertenecían principalmente a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella* y *Pantoea*. De ambos estudios los principales resultados que obtuvieron fueron que las cepas seleccionadas promovían la germinación y el desarrollo en los primeros estadios de crecimiento de las plántulas de maíz, y que aplicadas en campo tardaban un tiempo en estimular el crecimiento de las plantas, además de producir mayores rendimientos cuando no había aplicación de N adicional en forma de fertilizante. Sin embargo, además de mediante fijación biológica de nitrógeno (FBN), estas bacterias diazotróficas pueden promover el crecimiento vegetal a través de otros mecanismos y de hecho varios autores han publicado estudios y comentarios sobre este tema (Friesen et al. 2011; Norman et al 2017).

### 3.1.2 Fitohormonas.

Por otro lado, las hormonas vegetales son moléculas orgánicas involucradas en varios procesos de crecimiento y desarrollo de plantas. Un amplio espectro de bacterias beneficiosas producen fitohormonas que participan en la promoción del crecimiento de las plantas (Spaepen 2015). Las auxinas actúan como moléculas clave, regulando la mayoría de los procesos de la planta directa o indirectamente (Tanimoto 2005), capaces de estimular el alargamiento celular en las plantas. El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más conocida y más activa en las plantas (Hayat et al. 2010). Diversas bacterias secretan auxinas, que parecen actuar como moléculas de señalización para la comunicación bacteriana con el fin de coordinar actividades (Ouzari et al. 2008). Esitken et al. (2010) mostraron que la producción de auxinas

por parte de *Bacillus* spp. ejercen un efecto positivo en el desarrollo de la patata. Verma et al. (2011) mostraron como endófitos de *Streptomyces* aislados de *Azadirachta indica* producen AIA y son potenciales promotores del crecimiento de las plantas. Las cepas rizobianas que producen AIA mejoran el crecimiento de varios cultivos como *Capsicum annum*, *Solanum lycopersicum*, *Fragraria x ananassa*, *Lactuca sativa* y *Daucus carota* (García-Fraile et al. 2012b; Flores-Félix et al. 2013, 2015a).

Las citoquininas promueven la citocinesis, la sensibilidad del cambium vascular, la diferenciación vascular y la dominancia apical de la raíz (Aloni et al. 2006). Cepas de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megaterium* son capaces de producir citoquininas y promover el crecimiento del pepino (Sokolova et al. 2011). Ortiz-Castro et al. (2008) también describieron cómo *Bacillus megaterium* promueve el crecimiento de las plantas mediante la síntesis de citoquininas.

Las giberelinas están involucradas en la germinación y emergencia de las semillas, el crecimiento de tallos y hojas, la inducción floral y el desarrollo de flores y frutos (Bottini et al. 2004). Plantas de tomate inoculadas con una cepa de *Sphingomonas* sp. LK11 productoras de giberelinas mostraron un incremento significativo en varios atributos de crecimiento (Khan et al. 2014). *Azospirillum brasilense* Cd y *A. lipoferum* USA5b, ambas cepas productoras de giberelinas, provocaron un mayor crecimiento de las plantas de maíz y de arroz (Cassan et al. 2001); además, *Acinetobacter calcoaceticus* SE370, cepa solubilizadora de fosfato y productora de giberelinas, promovía el crecimiento del pepino, del repollo chino y de *Chrysanthemum coronarium* (Kang 2009).

El etileno es una hormona vegetal conocida por regular varios procesos como la maduración de los frutos, la apertura de las flores o la abscisión de las hojas (Reid et al. 1981). Sin embargo, también promueve la germinación de las semillas, la formación de raíces secundarias y el alargamiento del pelo de la raíz (KeCpczynski and KeCpczynska 1997). La cepa de *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 emite etileno y contribuye a la elongación de la raíz del pelo en *Arabidopsis thaliana* (Galland et al. 2012)

Sin embargo, la producción de altos niveles de etileno en condiciones de estrés, pueden inhibir ciertos procesos como el alargamiento de las raíces o la fijación de nitrógeno en las leguminosas y contribuir a la senescencia prematura (Ahmad et al. 2013). Algunas bacterias producen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa, para hidrolizar ACC, la molécula precursora de etileno en las plantas (Yang and Hoffman 1984), para obtener amoníaco y  $\alpha$ -cetobutirato, que pueden utilizarse como fuentes de nitrógeno y carbono (Klee et al. 1991). Por lo tanto, estas bacterias disminuyen los niveles de etileno en las plantas y así previenen algunos de los efectos negativos producidos por altas concentraciones de etileno (Saleem et al. 2007). Shaharoon et al. (2008) reportaron que dos cepas de *Pseudomonas* que producían ACC-desaminasas mejoraron el crecimiento y rendimiento de los cultivos de trigo, con niveles variables de nutrientes NPK. Además, las cepas de *Rhizobium leguminosarum* que producen ACC-desaminasa promovieron el crecimiento de las plantas de pimienta y tomate (García-Fraile et al. 2012b).

### 3.2 Movilización de nutrientes.

#### 3.2.1 Solubilización de fosfato.

Después del nitrógeno, el fósforo es el segundo nutriente esencial en términos de las cantidades de absorción necesarias en las plantas (Sharma et al. 2013). Este elemento es bastante insoluble en los suelos (Zou et al. 1992) y, en consecuencia, la agricultura tradicional se ha basado en la aplicación de fertilizantes químicos fosfatados. Sin embargo, cuando se aplica como fertilizante a los campos, éste pasa rápidamente a convertirse en insoluble y, por tanto, no está disponible para las plantas (Norrish and Rosser 1983; Lindsay and Vlek 1989).

Por consiguiente, el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato representan un eficaz sustituto para los fertilizantes químicos. Se han reportado cepas pertenecientes a los géneros *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium* como eficientes solubilizadoras de fosfato (Dastager et al. 2010).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato promueven el crecimiento de *Daucus carota* y *Latuca sativa* (Flores-Félix et al. 2013). Además, las cepas PETP01 y TPV08, pertenecientes a la especie *Rhizobium leguminosarum*, son capaces de solubilizar el fosfato y tienen efecto PGPR para las plantas de pimiento y tomate (García-Fraile et al. 2012b). Por otra parte, una cepa de *Phyllobacterium* es capaz de solubilizar fosfato mejorando la calidad de las fresas (Flores-Félix et al. 2015b).

#### 3.2.2 Solubilización de potasio.

El potasio es el tercer nutriente esencial necesario para el crecimiento de las plantas. Algunas rizobacterias son capaces de solubilizar las formas de potasio insoluble (Shanware et al. 2014). Se ha reportado que la cepa NBT de la especie *Bacillus edaphicus* aumenta la captación de potasio en el trigo (Sheng and He 2006); por otro lado, la cepa IISRBK2 de *Paenibacillus gluconolyticus*, también solubilizadora de potasio, aumenta el peso seco de la pimienta negra (Sangeeth and Bhai 2012). Además, la combinación de una cepa solubilizadora de potasio *Bacillus mucilaginosus* con una cepa solubilizadora de fosfato perteneciente a la especie *Bacillus megaterium* promovieron el crecimiento de plantas de berenjena, pimienta y pepino (Han and Lee 2005, 2006).

#### 3.2.3 Producción de sideróforos.

Bajo condiciones limitadas de hierro, las células bacterianas liberan sideróforos. Estos sideróforos forman un complejo con el hierro férrico insoluble y se une a la superficie de la célula bacteriana. El complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo se transporta dentro de la célula y el hierro férrico insoluble ( $\text{Fe}^{3+}$ ) se convierte en la forma ferrosa soluble ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Figura 3). El sideróforo se degrada dentro de la célula o se libera en forma libre fuera de la célula. Las células bacterianas utilizan esta forma ferrosa de hierro para su crecimiento (Saha et al. 2016). Dependiendo de los ligandos de oxígeno para la coordinación de Fe (III), los sideróforos pueden clasificarse en tres tipos:

Los sideróforos de tipo hidroxamato son los que se encuentran en la naturaleza comúnmente. Cada sideróforo es capaz de formar un complejo octaédrico hexadentado con  $\text{Fe}^{3+}$ . Estableciendo una fuerte unión entre el hierro férrico y sideróforo, de manera que

protege los complejos contra la hidrólisis y la degradación enzimática en el medio ambiente (Winkelmann 2007). Son producidos tanto por bacterias como por hongos (Saha et al. 2016). Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* se secreta un tipo de hidroxamato llamado ferribactina (Kannahi and Senbagam 2014), mientras que *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. producen los llamados coprógenos (Vinale and Sivasithamparam 2014) y fusigen (Haselwandter et al. 2013), respectivamente.

Por otro lado los sideróforos de tipo catecolatos que son producidos por diversas bacterias como *Rhizobium* sp. (Joshi et al. 2009) y *Streptomyces* sp. (Fiedler et al. 2001). Por otra parte *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* producen enteroquelina (Dertz et al. 2005) que puede unirse muy fuertemente al ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Otras bacterias como *Erwinia carotovora* pueden producir únicamente sideróforos de tipo catecolato o sideróforos mixtos donde el catecolato es uno de los miembros; como es el caso de algunos miembros de *Pseudomonas* que producen un sideróforo mixto de catecolatos y de hidroxamatos (Leong and Neilands 1982).

El tercer tipo de sideróforo es de tipo carboxilato y es producido principalmente por bacterias como *Rhizobium*, *Staphylococcus* y hongos. Este tipo de sideróforo se une al hierro a través de los grupos carboxilo e hidroxilo (Dave and Dube 2000). La rizobactina, producida por la cepa DM4 de *Rhizobium meliloti*, es el sideróforo de tipo carboxilato mejor caracterizado, tiene un ácido amino policarboxílico que consiste en restos de etilendiamino dicarboxilo y de hidroxil carboxilo que actúan como grupos quelantes de hierro (Smith and Neilands 1984). Uno de los métodos utilizados para detectar este tipo de sideróforos es el método O-CAS (Alexander and Zuberer 1991; Pérez-Miranda et al. 2007) utilizado en nuestro trabajo.

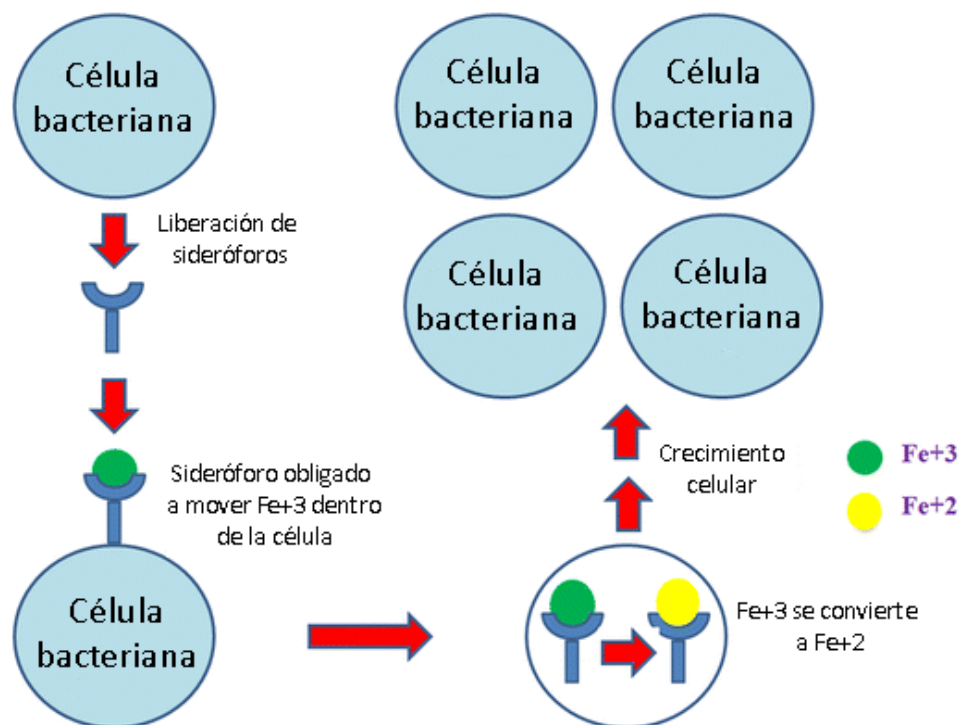


Fig. 3 El complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo se transporta dentro de la célula y el hierro férrico insoluble ( $\text{Fe}^{3+}$ ) se convierte en la forma ferrosa soluble ( $\text{Fe}^{2+}$ ) degradándose dentro de la célula o siendo excretado al exterior. Adaptada de Saha et al. (2016).

### 3.3 Control biológico frente a patógenos.

Entre los mecanismos de biocontrol mediados por rizobacterias ampliamente reconocidos se encuentran: la competencia por un nicho ecológico o sustrato, la síntesis de compuestos inhibitorios como sideróforos, antibióticos, enzimas líticas y detoxificadoras (Bais et al. 2004), así como la inducción de resistencia sistémica en la planta (Matiru and Dakora 2004).

Dos de los agentes de biocontrol más comunes pertenecen a los géneros de *Bacillus* y *Pseudomonas*. Ambos géneros tienen importantes propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Además tienen un rápido crecimiento, utilizan diferentes sustratos como nutrientes y son capaces de sobrevivir en condiciones estresantes para otras bacterias. También producen antibióticos, polisacáridos y sideróforos (Santoyo et al. 2012).

Otros autores consideran que la combinación de organismos con potencial de biocontrol ha demostrado ser más eficiente que el empleo de organismos individuales (Brewer and Larkin 2005). Por otra parte, se ha sugerido aprovechar el potencial de acción de los agentes de biocontrol y combinarlos para su aplicación con productos químicos, métodos físicos o prácticas agronómicas (Vivekananthan et al. 2004; Spadaro and Gullino 2005).

Se han descrito varias especies de actinobacterias que producen metabolitos secundarios con propiedades herbicidas, inhibidores de la germinación o inhibidores del crecimiento del tubo polínico. Estas especies, por lo general, se encuentran dentro de los géneros *Streptomyces*, *Dactylosporangium*, entre otros (Zhao et al. 2011).

Este efecto es ventajoso para las plantas ya que eliminaría competencia y plantas parásitas, lo que le daría una ventaja competitiva enorme. Esto hace que los PGPRs que producen estos metabolitos tengan también un elevado potencial biotecnológico.

### 3.4 Antibiosis.

Se caracteriza por la inhibición o destrucción de un microorganismo por los productos metabólicos de otros, que incluyen antibióticos, enzimas líticas y enzimas detoxificadoras. Diversos autores han planteado que la capacidad de las cepas de *Pseudomonas* spp. de suprimir el desarrollo de patógenos en la rizosfera depende en gran medida de su habilidad para producir metabolitos de naturaleza antibiótica, tales como pyoluteorina, pyrrolnitrina, fenacina-1-ácido carbóxico y 2.4 diacetyl-phloroglucinol (Bangera and Thomashow 1996; Picard et al. 2000).

Berg et al. (2005) aislaron cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, capaces de producir el 2,4-diacetylphloroglucinol, antibiótico responsable de la actividad antifúngica de muchas cepas de *Pseudomonas*. Además, dicho antibiótico unido al ácido cianhídrico desempeñan un importante papel en el control de enfermedades en trigo (Bonsall et al., 1997). Por ejemplo, la cepa CHA0 de *Pseudomonas fluorescens* produce varios antibióticos, entre los cuales se encuentran la pyoluteorina, el 2.4 diacetylphloroglucinol, el ácido



cianhídrico y el ácido salicílico, de esta manera es capaz de suprimir varias enfermedades de las plantas de tabaco causadas por patógenos transmitidos por el suelo (Maurhofer et al. 1994).

Se ha señalado la efectividad de la cepa de *Burkholderia cepacia* PHQM100 en el biocontrol de hongos pertenecientes a los géneros *Pythium* y *Fusarium* en el cultivo del maíz (Mao et al. 1997). También, resultados obtenidos por Bevivino et al. (2000) mostraron que la inoculación de la cepa de *B. cepacia* MC17 en el cultivo del maíz en suelos infestados y no infestados con *Fusarium moniliforme* provocó incrementos en el crecimiento vegetal en ambas condiciones de suelo y el control del 100% del hongo fitopatógeno.

Desde hace unos años se han ido encontrando más y más especies que producían antibióticos, siendo un gran número de ellos pertenecientes a las actinobacterias. Igarashi et al. (2007) demostró, a partir de un estudio de un gran número de muestras, que entre el 10 y el 20% de las cepas aisladas producen algún tipo de metabolito secundario que tiene actividad contra hongos y bacterias fitopatógenas.

Algunos de estos metabolitos sintetizados por actinobacterias han sido analizados por ser moléculas no descritas y su variedad es enorme, desde antifúngicos como la coronamicina proveniente de *Streptomyces* (Ezra 2004) a antibióticos como cefoxitina, estreptomycin, tetraciclina, eritromicina, entre otros (Evangelista-Martínez 2014). Además, no sólo son efectivos contra patógenos vegetales, sino que se han descubierto algunos con posible utilidad en medicina, que podría ser utilizados como nuevos medicamentos, sustituyendo a otros más largamente utilizados y con más posibilidades de haberse convertido en ineficaces por las resistencias.

### 3.5 Inducción de resistencia en plantas.

La resistencia inducida es definida como un perfeccionamiento de la capacidad defensiva de la planta contra un amplio espectro de patógenos y plagas adquirida después de un estímulo apropiado (Hammerschmidt and Kuć 1995). Por parte de los PGPR, esta resistencia está condicionada por diferentes factores, es decir, que puede variar dependiendo de las condiciones limitantes de hierro, la cepa bacteriana, la planta hospedera y de las condiciones de cultivo (Ramamoorthy et al. 2001). La respuesta de defensa se manifiesta a dos niveles llamados resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR) (Hammerschmidt and Kuć 1995).

La respuesta SAR, es expresada a un máximo nivel cuando el organismo que la induce produce necrosis, mientras que la ISR puede ser inducida por PGPBs sin causar ningún síntoma de necrosis en la planta hospedera (van Loon et al. 1998). Se ha demostrado que las PGPBs inducen resistencia en las plantas contra enfermedades fúngicas, bacterianas y virales (Maurhofer et al. 1998). También se ha señalado su efectividad contra insectos y nematodos (Sikora 1988). Existen varios mecanismos involucrados en la inducción de resistencia sistémica por PGPR, encontrándose entre los más importantes los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las membranas celulares, los sideróforos y el ácido salicílico (van Loon et al. 1998).

## Introducción

Mao et al. (1997), utilizaron una cepa de *B. cepacia* para controlar las enfermedades causadas por *Pythium* spp. y *Fusarium* spp. en el cultivo del maíz. En el cultivo del arroz, los tratamientos de las semillas con las cepas de *P. fluorescens* Pf1 y Pf7 redujeron los índices de infección provocados por *Rhizoctonia solani* (Vidhyasekaran and Muthamilan 1999; Nandakumar et al. 2001).

Diversos autores han demostrado que ciertas bacterias rizosféricas tienen la capacidad de producir ácido salicílico, siendo este metabolito responsable de la ISR en plantas. Se considera que la producción de ácido salicílico por *P. aeruginosa* 7NSK2 es esencial para la inducción de resistencia a *B. cinerea* (De Meyer and Höfte 1997).

### 3.6 Enzimas que degradan la pared celular vegetal.

La degradación de las paredes celulares de las plantas por los microorganismos tiene un papel importante en el ciclo del carbono. Los componentes principales de la biomasa lignocelulósica son celulosa (40-50%), hemicelulosa (20-40%) y lignina (20-30%) (Horn et al. 2012). Los componentes secundarios son proteínas, lípidos, pectina, azúcares solubles y minerales (Pauly and Keegstra 2008). Los tres polímeros principales están interconectados en una heteromatriz y su abundancia relativa varía dependiendo del tipo de biomasa (Chandra et al. 2007). Estos componentes se degradan enzimáticamente para producir oligómeros más pequeños y eventualmente glucosa, pentosas y otros compuestos de carbono pequeños, que se metabolizan en CO<sub>2</sub> (Doi and Kosugi 2004).

La celulosa es un polisacárido lineal formada a partir de moléculas de β-D-glucosa unidas mediante enlaces de glucosa β-1,4; se pueden agrupar en microfibrillas; son cristalinas y no solubles (Somerville et al. 2004; Parthasarathi and Bellesia 2011). Por otro lado, las hemicelulosas, son heteropolímeros con diferentes grados de ramificación, generalmente más fáciles de degradar enzimáticamente que la celulosa (Agger et al. 2010). Otro heteropolímero, es la lignina, es relativamente hidrófobo y aromático que consta de tres monolignoles. Las enzimas que se sabe que actúan sobre la lignina son en su mayoría oxidoreductasas (Guillén et al. 2005).

Los genes implicados en la degradación de la pared celular son los que codifican para los tres tipos principales de actividades de celulasas basándose en sus modos de acción catalítica: β-1,4-endoglucanasa (EC3.2.1.4), exoglucanasa (incluyendo celobiohidrolasa (EC3.2.1.91) y celodextrinasa (EC3.2.1.74), y β-glucosidasa (EC 3.2.1.21) (Duan and Feng 2010).

Los hongos y las bacterias aerobias poseen por lo general en sus genomas, algunos de los genes citados pudiendo actuar sinérgicamente para atacar las paredes celulares de las plantas (Doi and Kosugi 2004).

Las bacterias celulolíticas más comunes son *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp., *Clostridium* spp., *Erwinia chrysanthemi*, *Thermobispora bispara*, *Ruminococcus albus*, *Streptomyces* spp., *Thermonospora* spp y *Thermobifida fusca* (Sadhu and Maiti 2013; Menéndez et al. 2015). Sin embargo, debido a su interés biotecnológico, se

continúan buscando nuevas especies bacterianas degradadoras de celulosa (Cole et al. 2013; Fujii et al. 2013; Podosokorskaya 2013; Hatamoto and Kaneshige 2014).

La estructura variable y la organización de la hemicelulosa requieren la acción concertada de muchas enzimas para su completa degradación. Para la degradación son necesarios módulos catalíticos de hemicelulasas como las glicosil hidrolasas (GHs) que hidrolizan enlaces glicosídicos, o carbohidratos esterasas (CEs), que hidrolizan enlaces éster de grupos laterales de acetato o ácido ferúlico. La degradación de la hemicelulosa, se lleva a cabo por diversos microorganismos, como *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas fimi*, entre otras (Shallom and Shoham 2003).

Aunque los hongos tienen alta capacidad para degradar la lignina, también se han observado diversos géneros de bacterias capaces de metabolizar la lignina (Brown and Chang 2014), como es el caso, de los actinomicetos (Crawford 1978; Kirby 2005). Gracias al estudio de la cepa T7A de *Streptomyces viridosporus* T7A, se comprobó que las bacterias también poseen un conjunto de enzimas oxidativas extracelulares implicadas en el metabolismo de la lignina (Ramachandra and Crawford 1988; Thomas and Crawford 1998).

En el caso específico de los rizobios, se ha visto que poseen enzimas capaces de degradar la celulosa y otros polisacáridos presentes en la pared celular vegetal. Para su detección, se utilizan técnicas cualitativas de difusión en placas que ponen de manifiesto la capacidad de distintas cepas de rizobios de producir pectinasas, hemicelulasas y celulasas, incluso en concentraciones muy pequeñas (Martinez-Molina and Morales 1979; Morales et al. 1984; Plazinski and Rolfe 1985; Angle 1986; Mateos et al. 1992; Jiménez-Zurdo et al. 1996; Iannetta et al. 1997; Finnie et al. 1998; Michaud et al. 2002). La mejora de la sensibilidad de las técnicas ha permitido detectar y cuantificar actividades enzimáticas incluso cuando se produce en cantidades bajas permitiendo investigar con mayor facilidad el papel de dichas enzimas degradadoras (Mateos et al. 1992).

Así mismo, otros autores han relacionado estos enzimas con el proceso de infección (Verma et al. 1978; Martinez-Molina and Morales 1979; Callaham and Torrey 1981; Chalifour and Benhamou 1989; Mateos et al. 2001). Los estudios realizados por Mateos et al. (2001) mediante microscopía electrónica demostraron que *R. leguminosarum* y *E. meliloti* inducen la formación de erosiones localizadas denominadas "pits" en la superficie de las raíces de sus hospedadores de forma específica.

En este sentido, Mateos et al. (2001) estudió también el fenotipo Hot (*Hole on the tip*) que produce la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 en el punto de infección en los pelos radiculares de la raíz de trébol blanco. Se origina un orificio en el extremo apical del pelo radicular, que mide entre dos y tres micrómetros de diámetro, que serían suficientes para permitir la entrada del microorganismo en la planta (Mateos et al. 2001). Este hallazgo se vio corroborado con la obtención de mutantes knockout del gen *celC* de dicha cepa, que codifica para la proteína CelC2. Dicho mutante no era capaz de producir el fenotipo HoT en los ápices de los pelos radiculares, por lo que la cepa en cuestión era incapaz de entrar dentro del pelo por ese punto (Robledo et al. 2008).

Alrededor de la mitad de las bacterias existentes tienen genes para la degradación de la biomasa vegetal, como pectinasas, celulasas y hemicelulasas (Koeck et al. 2014). Se han

identificados genes relacionados con la actividad celulásica en cepas pertenecientes al género *Rhizobium* (Menéndez et al. 2016), así como en numerosas actinobacterias de los géneros *Actinosynnema*, *Cellulomonas* y *Streptomyces*, entre otros (Koeck et al. 2014).

#### 4. BACTERIAS PGPR UTILIZADAS COMO BIOFERTILIZANTES.

##### 4.1 Bacterias endófitas de cereales utilizadas como biofertilizantes.

Son muchas las bacterias endófitas capaces de promover el crecimiento de cereales y que, además, se han aislado del interior de cereales, como se muestra en la Tabla 1. Estos aislados se utilizan generalmente para reinocular el mismo huésped vegetal resultando en una correcta asociación en la mayoría de los casos por lo que podemos decir que las bacterias pueden estar adaptadas o incluso tener cierta especificidad de hospedador. Este tipo de bacterias tiene un potencial para interactuar con los cereales, debido a los efectos y beneficios producidos, ya comentados anteriormente.

Tabla 1. Bacterias endófitas aisladas de cereales usadas como promotoras del crecimiento vegetal en cereales. Adaptada de Celador-Lera et al. (2017); Menendez et al. (2017).

Bacterias endófitas aisladas de cereales	Re-inoculación en cereales	Efecto (% aumento)	Referencias
<b>Trigo</b>			
<i>Arthrobacter</i> sp. y <i>Bacillus subtilis</i>	Trigo	26 (total peso seco)	(Upadhyay et al. 2012)
<i>Pseudomonas jessenii</i> (R62) y <i>Pseudomonas synxantha</i> (R81)	Trigo	41 (producción de grano)	(Mäder et al. 2011)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	Trigo	24 (Parte aérea trigo peso seco y rendimiento de grano)	(Hilali et al. 2001)
<b>Maíz</b>			
<i>A. brasilense</i>	Maíz	45 y 82 (producción de grano y total N acumulado, respectivamente)	(Salamone and Döbereiner 1996)
<i>Rhizobium etli</i> bv <i>phaseoli</i>	Maíz	20-45 (biomasa total)	(Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero 2001)
<i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Maíz	14 (peso seco)	(Lalande et al. 1989)
<b>Arroz</b>			
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii E11	Arroz	8 a 22 (producción de grano)	(Biswas et al. 2000)
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ARC100 y ARC101	Arroz	19.7 y 6.31 (Peso grano y producción grano, respectivamente)	(Yanni et al. 1997)
<i>Pantoea agglomerans</i>	Arroz	63.5 (biomasa total)	(Verma et al. 2001)
<i>B. vietnamiensis</i> MGK3	Arroz	9.36 (producción de grano)	(Govindarajan et al. 2008)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> LMG6513	Arroz	2.6 (producción de grano)	(Govindarajan et al. 2008)
<i>B. vietnamiensis</i> LMG10929	Arroz	5.4 (producción de grano)	(Govindarajan et al. 2008)
<i>H. seropedicae</i> LMG6513	Arroz	2.6 (producción de grano)	(Govindarajan et al. 2008)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	Arroz	20 (biomasa total)	(Chaintreuil et al. 2000)

Tabla 1. Continuación

<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Arroz	30 (total peso seco)	(Muthukumarasamy et al. 2005)
<i>H. seropedicae</i>	Arroz	38 a 54 (biomasa radicular)	(Elbeltagy et al. 2001)
	Arroz	22 a 50 (biomasa parte aérea)	(Gyaneshwar et al. 2002a)
	Arroz	37.6 (total peso seco)	(James et al. 2002)
	Arroz	52 to 112, 71 (peso fresco y seco)	(Baldani et al. 2000)
<i>Serratia marcescens</i>	Arroz	23 (total peso seco)	(Gyaneshwar et al. 2001)
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii	Arroz	15–22, 8–22 (producción de grano)	(Yanni et al. 1997, 2001)
<i>Pantoea agglomerans</i>	Arroz	63.5 (biomasa total)	(Verma et al. 2001)
<i>B. vietnamiensis</i> LMG10929T	Caña de azúcar	19.5 (rendimiento)	(Govindarajan et al. 2006)
<i>H. seropediceae</i>	Caña de azúcar	5–12 (rendimiento)	(Govindarajan et al. 2008)
<b>Caña de azúcar</b>			
<i>Enterobacter cloacae</i>	Caña de azúcar	55 y 70 (biomasa radicular y parte aérea)	(Mirza MS et al. 2001)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caña de azúcar	13 a 19.5 (biomasa total)	(Govindarajan et al. 2007)
<i>G. diazotrophicus</i> BR 11281, <i>H. seropedicae</i> BR 11335, <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> BR 11504, <i>Azospirillum amazonense</i> BR 11115 y <i>Burkholderia</i> sp. BR 11366	Caña de azúcar	23.5 tallo peso fresco y 27.4 peso seco	(Oliveira et al. 2002)
<i>G. diazotrophicus</i> LMG7603	Caña de azúcar	13–16 (rendimiento)	(Govindarajan et al. 2007)
	Caña de azúcar	26 (peso seco de la planta)	(Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado 2003)
	Caña de azúcar	18.83 a 49.86 (biomasa total)	(Suman et al. 2005)
<i>H. seropedicae</i> y <i>H. rubrisubalbicans</i>	Caña de azúcar	35 (peso seco)	(Oliveira et al. 2002)
<i>G. diazotrophicus</i> LMG7603	Arroz	6.6 (producción de grano)	(Govindarajan et al. 2008)
<b>Leptochloa fusca</b>			
<i>Azoarcus</i>	Arroz	16 (total peso seco)	(Reinhold-Hurek and Hurek 1997)

Actualmente, hay un gran número de estudios publicados que muestran del uso de bacterias endófitas como inoculantes PGPR. Comúnmente, la promoción del crecimiento de las plantas se produce debido a una combinación de diferentes modos de acción, como la mejora del estado nutricional del huésped, la promoción de la superficie de las raíces y el aumento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Pérez-Montaña et al. 2014). Cada cepa bacteriana puede utilizar uno o varios de los comentados mecanismos PGP (Long et al. 2008).

Según Govindarajan et al. (2008), la producción de rendimiento de arroz se incrementó con respecto a un tratamiento de control cuando se aplicó un inoculante bacteriano. Además, el efecto de la inoculación provocó que las plántulas de arroz crecieran mejor bajo condiciones deficientes de nitrógeno. Mäder et al. (2011) mostraron un aumento en el rendimiento de grano de trigo (~31%) después de la inoculación con *Pseudomonas jessenii* R62 y *Pseudomonas synxantha* R81, en comparación con plantas de control no inoculadas.

Sorty et al. (2016) mostraron que las bacterias endófitas podrían aliviar los efectos nocivos del estrés salino y aumentar la germinación de las semillas en el trigo, así como promover el crecimiento de las plantas y aumentar la biomasa seca y los azúcares solubles totales. Las plántulas de trigo fueron capaces de germinar bajo diferentes regímenes de salinidad después de la co-inoculación con *Bacillus subtilis* SU47 y *Arthrobacter* sp. SU18 (Upadhyay et al. 2012).

Uno de los factores clave para analizar en la asociación planta-endófito es la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas), ya que es uno de los mecanismos de estudio más eficaces en relación con la promoción del crecimiento de las plantas (Hardoim et al. 2015). Según los datos presentados por Kudoyarova et al. (2014), *Bacillus subtilis* IB-22 aumentó la rizodeposición de aminoácidos en las raíces de trigo debido a su capacidad para producir citoquininas. Aparte del hecho de que la mayoría de los endófitos descritos presentan los mecanismos explicados anteriormente, algunos endófitos también son inoculados como agentes de control biológico (Herrera et al. 2016; Xu et al. 2017). Según Pan et al. (2015), *Bacillus megaterium* BM1 (cepa entófito aislada del trigo) reduce significativamente la incidencia y gravedad de la infección por *Fusarium graminearum* en los cultivos de trigo.

### **4.2 Bacterias PGPB en cultivos de maíz.**

El maíz (*Zea mays* L.) es una gramínea, de cultivo anual y monoica, por lo que tiene flores masculinas y femeninas. Es un cereal de gran volumen de producción a nivel mundial. Deriva del teosinte a través de mutaciones y por selección natural (Longley 1941). Se acepta el hecho de que el teosinte es el antecesor silvestre y/o allegado al maíz y que ha participado directamente en el origen del maíz cultivado (Iltis 1983; Mangelsdorf 1986; Goodman and Galinat 1988; Doebley 1990) (Figura 4).



Fig. 4. A) Cultivo de maíz; B) Detalle de la hoja de maíz; C) Detalle de las mazorcas en planta y D) Mazorcas.

La producción mundial de maíz, que es el cereal más cultivado del mundo según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), superó los 883 millones de toneladas anuales en 2011, una producción superior a la producción correspondiente de trigo (704 millones de toneladas) y arroz (723 millones de toneladas) (FAO, 2004). México tiene uno de los mayores consumos per cápita de maíz en el mundo, con una producción total de 0,8 millones de toneladas en 2011 (FAO). Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación correspondientes al año 2005, el consumo de maíz per cápita fueron de 70, 104 y 120 Kg en Estados Unidos, Sudáfrica y México, respectivamente (Rosas-Castor et al. 2014)

En España, la superficie destinada en el año 2015 para el cultivo de maíz ascendió a 2.670 hectáreas. Castilla y León junto con Extremadura, son las dos Comunidades Autónomas que producen la mayor parte del cultivo del maíz en España (MAPAMA).

El maíz tiene múltiples usos y constituye un alimento básico para los seres humanos (granos de maíz) en los países en desarrollo de América Latina, África y el Caribe. Asia. Esto se

## Introducción

debe a que tiene un alto valor nutritivo, proporcionando en zonas rurales aproximadamente 50 y 70% de la ingesta proteica y consumo calórico, respectivamente (Serna-Saldivar et al. 2008).

El maíz contiene, aproximadamente un 72% de almidón, un 10% de proteína y un 4% de lípidos, suministrando una densidad de energía de aproximadamente 365 kcal / 100 g. Por esta razón, el maíz se ha integrado en gran medida en la agricultura mundial, la dieta humana y las tradiciones culturales (Nuss and Tanumihardjo 2010). En México, el 60% de la producción total de maíz se utiliza para el consumo humano (Plasencia 2004). En países como Estados Unidos o Brasil, el maíz es un alimento importante para los animales (FAOSTAT; www.fao.org). Además, el maíz constituye un ingrediente clave en la elaboración de bioetanol (Shiferaw et al. 2011).

El maíz juega un papel importante en los medios de subsistencia de millones de agricultores pobres (Shiferaw et al. 2011). Para el año 2020, el mundo tendrá alrededor de 7.700 millones de personas y para 2050 la cifra será de aproximadamente 9.300 millones. Entre ahora y 2050, la demanda de maíz en el mundo en desarrollo se duplicará (Rosegrant et al. 2009).

La naturaleza de la demanda de maíz también está cambiando, ya que el maíz siempre ha sido un importante cultivo alimenticio, pero durante la última década su demanda como alimento para el ganado ha crecido enormemente (Shiferaw et al. 2011). Esto ha sido impulsado en gran medida por el rápido crecimiento económico en regiones muy pobladas como Asia, Medio Oriente y Latinoamérica, lo que ha llevado a una mayor demanda de productos de ganadería (Delgado 2003). El grano de maíz es un ingrediente clave en la alimentación animal y esta demanda agregada ha impulsado el aumento de los precios del grano de maíz y lo ha hecho menos asequible para los consumidores pobres en varias regiones del mundo. El mercado de piensos de maíz crece especialmente en países como China y la India, donde el crecimiento económico permite que muchos obtengan leche, huevos y carne (Shiferaw et al. 2011).

En la Unión Europea se establece que la producción de cultivos energéticos para obtener biocarburantes debe realizarse con criterios de sostenibilidad, para garantizar un enfoque coherente entre las políticas energéticas y la protección medioambiental. Por ello, condiciona las ayudas públicas a su cumplimiento. El cumplimiento de la Directiva 2009/28/CE se revisa cada dos años a partir de 2012 y los estados miembros deben obligar a los agentes económicos a demostrar el cumplimiento de los criterios de sostenibilidad. En este punto cobra especial importancia la sustitución de los fertilizantes químicos por biofertilizantes de origen bacteriano.

### **4.3 Bacterias PGPB en cultivos hortícolas.**

Al igual que en el caso de los cereales, el modelo actual de fertilización química en cultivos hortícolas, causa también pérdidas ambientales y económicas (de Souza et al. 2016). El uso continuado en la agricultura puede causar impactos ambientales negativos (Adesemoye et



al. 2009). Además, su aplicación tiene una baja eficiencia, lo que significa que sólo una parte de los nutrientes aplicados son absorbidos por las plantas (Gyaneshwar et al. 2002b). Estos problemas, han hecho que el interés público exija métodos alternativos o suplementarios menos contaminantes con el fin de alcanzar una agricultura sostenible (Ladha et al. 1997). En este sentido, la inoculación de bacterias PGPB son una alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados, fosforados y potásicos (Çakmakçı et al. 2017). Además, como podemos ver en la tabla 2, están ganando importancia y aceptación, debido al aumento significativo en el crecimiento y rendimiento de los cultivos en respuesta a la inoculación con PGPR en cultivos hortícolas. Por este motivo a lo largo de este trabajo se han inoculado bacterias del género *Rhizobium* en distintos cultivos hortícolas de gran demanda en este momento, con el fin de incrementar el rendimiento y calidad de los mismos.

#### 4.3.1 *Eruca sativa* Mill.

Se utiliza el nombre de rúcula para un colectivo de especies de Brassicaceae, *Eruca sativa*, *Diplotaxis tenuifolia* y *Diplotaxis muralis*, pero principalmente *Eruca sativa* (Figura 5) es la de mayor importancia (Morales and Janick 2002).

La rúcula es una planta anual, con hojas compuestas de color verde mate, que tienen un sabor especiado picante, es de rápido crecimiento y se ha adaptado perfectamente al cultivo en invernadero (Palada and Crossman 1999). Al igual que otras Brassicaceas, contiene glucósidos como sulfocianato de alil mientras que el aceite de la semilla contiene ácido erúxico (Morales and Janick 2002).

Es un tipo de hortaliza ampliamente utilizado en fines culinarios, en algunos países mediterráneos se cultiva para su utilización en ensaladas o cocidas y también se cultiva en Asia como un cultivo de semillas oleaginosas (Alqasoumi et al. 2009). Son cada vez más importantes en el mercado de ensaladas (D'Antuono et al. 2008). Y el comercio de este cultivo está aumentando en todo el mundo en países tan diversos como Estados Unidos, Reino Unido, Italia, España, Marruecos, Israel, India y Australia (Bozokalfa et al. 2011). Es rica en minerales y oligoelementos, carotenoides, flavonoides, vitamina C, A y ácido fólico. Debido a su acción antioxidante cada vez es mayor la importancia esta planta a nivel mundial (Morales and Janick 2002).

Diversos autores han inoculado bacterias PGPB en cultivos de rúcula (Baeshen 2016; Kamran et al. 2016) aunque pocos con cepas del género *Rhizobium* (de Souza et al. 2016; Rubio-Canalejas et al. 2016).



Fig. 5. *Eruca sativa* Mill.

#### 4.3.2 *Ocimum basilicum* L.

El género *Ocimum* comprende más de 150 especies y es considerado como uno de los géneros más grandes de la familia Lamiaceae (Evans 2009). *Ocimum basilicum* L. (albahaca dulce) (Figura 6) es una hierba anual que crece en regiones de todo el mundo. Existen diferentes cultivos de albahaca que varían en su color de hoja (verde o púrpura), color de la flor (blanco, rojo, púrpura) y aroma (Morales and Simon 1996). Las hojas y las copas florales de la albahaca son utilizadas también en medicina popular como plantas carminativas, galactogógicas, estomacales y antiespasmódicas en medicina popular (Chiej 1984; Duke 1992). También han sido estudiadas sus actividades antivirales y antimicrobianas (Baratta et al. 1998; Chiang et al. 2005).



Fig. 6. *Ocimum basilicum* L.

Las hojas pueden ser utilizadas, tanto frescas como secas, para condimentar diversos tipos de comidas (Klimankova et al. 2008). La hojas contienen aceites esenciales que sintetizan y almacenan en los tricomas glandulares en ellas (Sangwan et al. 2001) y se usan como agentes aromatizantes en alimentos y bebidas, como fragancias, fungicidas o insecticidas y en diversos productos farmacéuticos e industriales (Grayer et al. 1996). La mejora cualitativa y cuantitativa de la producción de aceite esencial representa un área de alto interés comercial (Copetta et al. 2006).

La albahaca es una planta económicamente e industrialmente importante (Singh et al. 2013a). La superficie cultivada de albahaca (> 25.000 ha) en la India representa la producción anual de unos 250-300 t de aceite esencial (Singh et al. 2013a). Además de la demanda local, existen buenas posibilidades para su exportación en el mercado mundial (Singh et al. 2013a).

Este cultivo también se ha probado ya con diversas PGPR (Ordookhani et al. 2011; Heidari and Golpayegani 2012; Singh et al. 2013a). Además, Kumar et al. (2017), probaron el efecto de *Azophos*, un producto compuesto por *Azospirillum* y *Phosphobacterium* (1:1) en plantas de albahaca, obteniendo un incremento en el crecimiento y el rendimiento del cultivo. Sin embargo, no encontramos ningún estudio en el que se utilizaran cepas de género *Rhizobium* como PGPR para este cultivo.

#### 4.3.3 *Valerianella locusta* L.

*Valerianella locusta* (Figura 7), conocida también como canónigo, es una planta de la familia de las Valerianaceas común en Europa y oeste de Estados Unidos. (Kittipongpatana et al. 2002). Este cultivo se utiliza fundamentalmente para el consumo de las hojas en fresco o en ensaladas y su demanda está en aumento (Grzegorzewski et al. 2010).



Fig. 7. *Valerianella locusta* L.

Es una planta herbácea anual, sus hojas tienen disposición basal en roseta y las caulinares opuestas son de unos 3-8 centímetros de longitud. Las hojas son radicales, sésiles y de color verde (Krarup and Moreira 1998).

Su consumo se basa en sus hojas en forma de roseta, destacando su aporte nutricional en hierro, betacaroteno, vitamina A y es rica en compuestos fenólicos (Nicola et al. 2001).

Hasta la fecha, únicamente se ha encontrado un estudio de sobre inoculación de estos cultivos con bacterias PGPR por lo que es interesante saber qué beneficios se obtiene al inocular dichas bacterias. Kunova et al. (2016), probaron el efecto biocontrolador de distintas cepas de *Streptomyces*, observando también un incremento en la tasa de germinación de las semillas de canónigos.

#### 4.3.4 *Nasturtium officinale* R. Br.

*Nasturtium officinale*, (Figura 8) conocida vulgarmente como berro, es una planta acuática perteneciente a la familia de las brassicaceas. Sus hojas, son alargadas de forma oval y con los nervios muy marcados. Es una planta de rápido crecimiento, los tallos se encuentran distribuidos a lo largo del suelo o flotando, produciéndose nuevas raíces en los nodos principales (Bown 1995).

El berro contiene una de las concentraciones más altas de glucosinolatos de cualquier vegetal, junto con altas concentraciones de carotenoides como la luteína y el b-caroteno (Rose et al. 2000; O'Neill et al. 2001). Estos fitoquímicos también se han asociado con diversas propiedades antioxidantes y anticarcinógenas (Park et al. 2011). También contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos (Hecht et al. 2004).

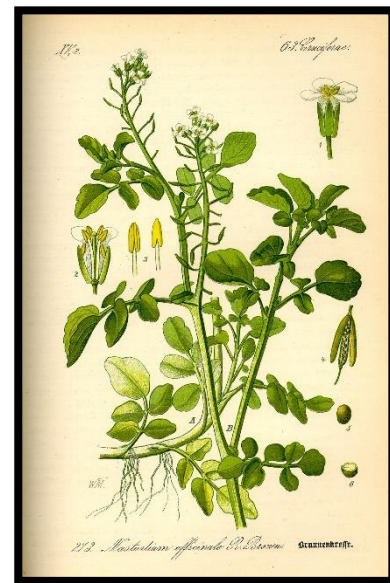


Fig. 8. *Nasturtium officinale* R. Br.

Debido a estos compuestos beneficiosos para la salud, los berros son considerados un alimento muy valioso en la industria de las ensaladas frescas (Pignata et al. 2016).

Solamente se encontró un estudio en este cultivo en el que se utilizasen bacterias PGPB en berros (Pignata et al. 2016).

## Introducción

Tabla 2. Ejemplos de bacterias PGPB inoculadas en diferentes cultivos hortícolas. Adaptado de García-Fraile et al. (2017) y Jiménez-Gómez et al. (2017).

Bacterias PGPB inoculadas	Cultivo inoculado	Efecto producido	Referencias
<i>Pseudomonas</i> sp. 19Fv1T	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento de la vitamina C	Bona et al. (2017)
<i>Bacillus megaterium</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento de la vitamina C	Fei et al. (2016)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB2 y <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento de la vitamina C	Gül et al. (2008)
<i>Pseudomonas putida</i> 41, <i>Azotobacter chroococcum</i> 5, <i>Azospirillum lipoferum</i> OF y AMF	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento de la actividad antioxidante	Ordookhani et al. (2010)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Mejora el contenido total de flavonoides	Ochoa-Velasco and Valadez-Blanco (2016)
<i>Burkholderia tropica</i> MTo-293	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Aumento del número y peso de los frutos	Bernabeu et al. (2015)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SS5	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Aumento del peso y rendimiento del fruto	Ahirwar et al. (2015)
<i>Azotobacter chroococcum</i> y <i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Aumenta el rendimiento	Ramakrishnan and Selvakumar (2012)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> TPV08 y <i>Rhizobium leguminosarum</i> PETP01	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Aumento de rendimiento y calidad	García-Fraile et al. (2012)
<i>Pseudomonas putida</i> P13 y <i>Pantoea agglomerans</i> P5	<i>Cucumis sativus</i>	Aumenta el rendimiento	Isfahani and Besharati (2012)
<i>Pseudomonas putida</i> 41, <i>Azotobacter chroococcum</i> 5, <i>Azospirillum lipoferum</i> OF	<i>Ocimum basilicum</i>	Incremento de la actividad antioxidante	Ordookhani et al. (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus lentus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> .	<i>Ocimum basilicum</i>	Incremento de la actividad antioxidante y contenido de clorofila en las hojas	Heidari and Golpayegani (2012)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PETP01	<i>Capsicum annum</i>	Incremento de la actividad antioxidante	Silva et al. (2014)
<i>Rhizobium</i> sp. PEPV12	<i>Spinacia oleracea</i>	Incremento en el contenido de clorofila	Jiménez-Gómez and Menéndez (2016)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> RC14	<i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i> cv <i>Yalova 1</i>	Incremento del contenido en N, P, K, S, Fe y Cu	Yildirim et al. (2015)
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .	<i>Brassica oleracea</i>	Incremento en el contenido de clorofila	Turan et al. (2014)
<i>Bacillus subtilis</i> BA-142, <i>Bacillus megaterium</i> GC subgrupo A. MFD-2, <i>Acinetobacter baumannii</i> CD-1 y <i>Pantoea agglomerans</i> FF	<i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Cucumis sativus</i>	Incremento del contenido en N, P, Mg, Ca, Na, K, Cu, Mn, Fe y Zn	Dursun et al. (2010)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PEPV16	<i>Daucus carota</i>	Aumenta el peso seco radicular y el contenido de N y P	Flores-Félix et al. (2013)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PEPV16	<i>Lactuca sativa</i>	Aumenta el peso seco de la parte aérea y el contenido de N y P	Flores-Félix et al. (2013)
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	<i>Eruca sativa</i>	Aumentó el contenido de Na, Mg, K, Ca y Cl	Baeshen (2016)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Eruca sativa</i>	Aumentó el crecimiento de la parte aérea y la absorción de Ni	Kamran et al. (2016)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> E15 y <i>Rhizobium radiobacter</i> L5	<i>Eruca sativa</i>	Aumentaron el porcentaje de germinación, la longitud y el peso seco de la parte aérea	de Souza et al. (2016)

Tabla 2. Continuación

<i>Rhizobium sp.</i>	<i>Eruca sativa</i>	Aumento en el número de raíces secundarias	Rubio-Canalejas et al. (2016)
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> y <i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	Incrementan microelementos y actividades antioxidantes	Ordookhani et al. (2011)
<i>Pseudomonades sp.</i> , <i>Bacillus lentus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	Incrementos en actividades antioxidantes y clorofila	Heidari and Golpayegani (2012)
<i>Pseudomonas monteilii</i> CRC1, <i>Cronobacter dublinensis</i> CRC3 y <i>Bacillus spp.</i> AZHGF1	<i>Ocimum basilicum</i>	Incrementan la producción de aceite esencial y la biomasa vegetal	Singh et al. (2013a)
<i>Azophos: Azospirillum</i> y <i>Phosphobacterium</i> (1:1)	<i>Ocimum basilicum</i>	Aumentaron el crecimiento y el rendimiento	Kumar et al. (2017)
<i>Streptomyces rochei</i> CMJ571 y <i>S. anulatus</i> CX14W	<i>Valerianella locusta</i>	Aumentaron la tasa de germinación	Kunova et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Nasturtium officinale</i>	Aumentaron la capacidad antioxidante	Pignata et al. (2016)

## 5. IMPORTANCIA DE LA APLICACIÓN DE BIOINOCULANTES SEGUROS.

La preocupación actual sobre la calidad de los alimentos y de la salud humana, ha llevado a la búsqueda de alternativas para sustituir los agroquímicos por productos biológicos. Es por ello que es imprescindible identificar correctamente cada cepa utilizada como bioinoculante. Los microorganismos que presentan uno o varios de los mecanismos ya mencionados pueden directamente promover el crecimiento de la planta. No obstante, aunque la rizosfera es una buena fuente de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, es también un reservorio de patógenos humanos, como por ejemplo las especies *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* y el género *Acinetobacter*, contienen cepas promotoras del crecimiento vegetal, pero no deben ser utilizadas como biofertilizantes porque estas bacterias pueden causar severas infecciones en humanos (Vial et al. 2011). Es por ello que es fundamental y necesario conocer los efectos beneficiosos y perjudiciales de los microorganismos antes de su uso como fertilizantes biológicos, a fin de utilizar sólo aquellas cepas que son seguras para la salud humana, animal y vegetal.

Para evitar este potencial problema, son varias las técnicas empleadas en la identificación de microorganismos. Por un lado están los métodos fenotípicos, que comprenden todos aquellos métodos que no están dirigidos hacia el ADN o el ARN; por lo tanto, también se incluyen las técnicas químico-taxonomías. Los métodos clásicos de análisis fenotípicos constituyen la base para la descripción formal de los taxones, de especies y subespecies, hasta género y familia. Las características fenotípicas clásicas de las bacterias comprenden características morfológicas, físicas y bioquímicas; las cuales proporcionan información descriptiva que nos permite reconocer taxones (Vandamme et al. 1996).

Sin embargo, los más utilizados comúnmente para la identificación bacteriana son los métodos de recuperación de la información genómica que se dirigen sobre todo hacia las moléculas de ADN o ARN (Flanagan et al. 2007; Shokralla et al. 2012). De esta manera se puede detectar la diversidad intraespecífica y son un apoyo fundamental a los análisis fenotípicos que

tratan de revelar la diversidad de organismos con relación próxima entre ellos (Vandamme et al. 1996).

La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), es un método eficaz para la identificación bacteriana. Actualmente, se utiliza principalmente en aislados de muestras clínicas (Belkum et al. 2015; Nomura 2015), aunque también se utiliza con éxito para la identificación de cepas aisladas de otro tipo de muestras, como por ejemplo de diferentes partes de las plantas (Ziegler et al. 2012; Stets et al. 2013; Velázquez et al. 2016; Zaluga et al. 2011).

Para el estudio de comunidades bacterianas en ambientes naturales, también se utilizan técnicas tanto independientes como dependientes de cultivo. Las técnicas independientes de cultivo detectan e identifican microorganismos sin la necesidad de aislarlos, cultivarlos, puesto que se realiza una extracción directa de ADN o ARN total de los tejidos y/o lugares de interés.

Por otro lado, la técnica dependiente de cultivo implica métodos tradicionales de cultivo mediante el aislamiento de los microorganismos (Temmerman et al. 2004). Tian et al. (2007) combinaron estos dos tipos de métodos, dependientes e independientes de cultivo, para el estudio de la diversidad de endófitos en raíces y tallos de arroz.

En relación a las técnicas que son independientes del cultivo de los microorganismos, la metagenómica se ha convertido en una de las herramientas clave para el estudio de los microorganismos (Simon and Daniel 2009). La metagenómica implica la extracción directa del ADN genómico de muestras ambientales y un análisis posterior, con esta técnica se puede estudiar la composición de las comunidades microbianas y/o construir una biblioteca metagenómica con diversos enfoques (Duan and Feng 2010). Diversos autores han utilizado esta técnica para el estudio de las bacterias endófitas de raíces de arroz (Sessitsch et al. 2012), de *Aloe vera* (Akinsanya et al. 2015) y de *Solanum tuberosum* (Nikolic et al. 2011), entre otros.

## **6. LA CONTRIBUCIÓN DE LA SECUENCIACIÓN DE GENOMAS BACTERIANOS EN EL CONOCIMIENTO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LAS ASOCIACIONES MUTUALISTAS PLANTA-MICROORGANISMO.**

Fleischmann et al. (1995), secuenció por primera vez el genoma de una bacteria *Haemophilus influenzae* mediante la técnica de secuenciación genómica llamada *Whole Genome Shotgun* (WGS). Desde entonces, la combinación de la secuenciación del genoma y el análisis bioinformático de los datos nos ha permitido comprender como funcionan las bacterias, su evolución y la interacción entre ellas, con sus huéspedes y con su entorno (Land et al. 2015).

La secuenciación genómica de varias cepas de una misma especie o de especies filogenéticamente cercanas también proporciona información sobre las relaciones evolutivas

entre ellas. La disponibilidad de genomas completos y el desarrollo de grandes bases de datos de secuencias, así como de herramientas bioinformáticas para su análisis, han facilitado el desarrollo de la genómica comparativa. La genómica comparativa aplicada al estudio de genomas microbianos, por ejemplo en el caso de una cepa patógena y una no patógena del mismo microorganismo, puede proporcionar datos importantes sobre los elementos genéticos responsables de la infección, así como las posibles presiones evolutivas que pueden haber influido en las diferencias entre dichas cepas (Guzmán et al. 2008).

Además, el proceso de secuenciación ha evolucionado considerablemente, ya que los proyectos de secuenciación solían llevar años y tenían costes elevados. Sin embargo, ahora se puede completar el genoma en pocos días y con un coste muy asequible. Las tecnologías de secuenciación han evolucionado de la siguiente manera (Figura 9).

La primera revolución del secuenciado del genoma bacteriano se inició con el *Whole-genome shotgun Sequencing*, con proyectos dirigidos para secuenciar los genomas de organismos modelo, como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Burland et al., 1993; Glaser et al., 1993).

Por otro lado, la segunda revolución se denominó “Secuenciación de alto rendimiento o de nueva generación” que venían acompañados de nuevos enfoques bioinformáticos (Metzker 2010). En este periodo, la llegada en 2007 del Analizador Genómico de Illumina (California, USA) marcó una verdadera revolución en la segunda revolución genómica, ya que permitía que lecturas cortas llegasen a tener aplicaciones significativas en este campo. Esta tecnología se basa en la secuenciación de terminación reversible de ciclo. Tras el fraccionamiento del genoma se realiza una amplificación clonal de los fragmentos sobre una superficie sólida, creando grupos de fragmentos clonados. La secuenciación de los millones de fragmentos de ADN se realiza mediante síntesis empleando nucleótidos marcados que contienen terminaciones reversibles, permitiendo que cada ciclo del proceso de secuenciación ocurra en presencia de los cuatro nucleótidos simultáneamente (Kozich et al. 2013). Debido a su elevada precisión y su bajo coste, esta tecnología se aplica con éxito en secuenciación de genomas y de ARN, ensamblado y análisis (Salipante et al. 2014). Lo que permitió la secuenciación en las universidades y laboratorios públicos (Loman and Pallen 2015).

Y por último, la tercera revolución fue la de la molécula única, secuencia de larga lectura. La primera tecnología de lectura larga para lograr un uso generalizado fue la secuenciación en una sola molécula en tiempo real (SMRT) de Pacific Biosciences (Eid et al. 2009). Publicaciones recientes han demostrado que este enfoque, por sí solo o combinado con una secuencia de lectura corta, puede proporcionar ensamblajes de alta calidad (Bashir et al., 2012; Chin et al., 2013).

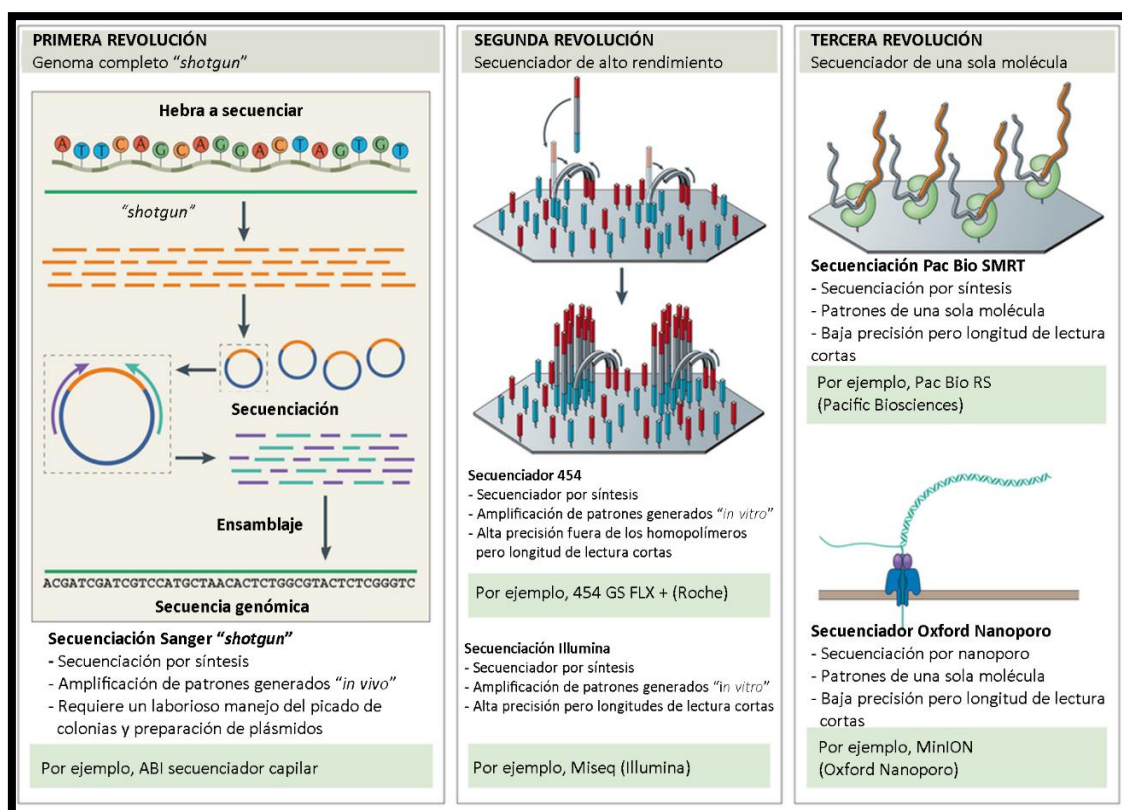


Fig. 9. Revoluciones tecnológicas ocurridas en los últimos 20 años en la secuenciación de los genomas bacterianos. Adaptada de Loman and Pallen (2015).

Diversos autores han analizado el genoma de PGPBs, para identificar los genes implicados en sus potenciales actividades promotoras del crecimiento vegetal, como *Pseudomonas* sp. (Shen et al. 2013; Liu et al. 2016), *Bacillus* sp. (Song et al. 2012; Wang et al. 2012), *Paenibacillus polymyxa* (Li et al. 2014) y *Klebsiella* sp. (Liu et al. 2016), entre otras. En cuanto al análisis de los genomas del género *Rhizobium*, las publicaciones se han centrado en la fijación de nitrógeno (Fauvert et al. 2011; Althabegoiti et al. 2012; Ormeño-Orrillo et al. 2012) y en estudios de taxonomía, como por ejemplo el estudio realizado por López-Guerrero et al. (2012), en el que utilizaron los genomas disponibles de cepas de rizobios para examinar su posición taxonómica y proponer una reclasificación de algunas de ellas. Por otro lado, Ormeño-Orrillo et al. (2015) utilizaron las secuencias de los genomas para reclasificar especies que podrían pertenecer a géneros distintos, como es el caso de ciertos miembros de los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*.

El análisis sistemático de datos de genoma completo y la identificación de genes que contribuyen a la actividad beneficiosa de PGPR ayudará a nuestra comprensión de los mecanismos moleculares de muchas especies bacterianas y también ayudará al desarrollo de multitud de aplicaciones. Varios ejemplos recientes pueden citarse como ejemplos de ello. En este sentido, Gupta et al. (2014) secuenciaron el genoma de tres PGPR de cacao, cacao y *Areca catechu* identificando genes implicados en la tolerancia al choque térmico y al estrés abiótico, entre otros. Oteino et al. (2015) estudiaron los genes responsables de la solubilización de fosfato del genoma de tres cepas endófitas con el fin de inocularlas en plantas de *Pisum sativum* L. cultivadas en suelos limitados en fosfatos solubles, las cuales promovieron el crecimiento de dichas plantas. En este mismo sentido, Kwak et al. (2015), secuenciaron el



genoma de la cepa tipo de *Pseudomonas rhizosphaerae*, que posee genes implicados en solubilización de fosfato, entre otras capacidades PGPR, apuntando además su potencial como biofertilizante multifuncional. Brown et al. (2012) estudiaron 40 cepas bacterianas provenientes de la microbiota de *Populus deltoides*, estimando así varios mecanismos metabólicos y moleculares responsables de las interacciones entre las raíces de *Populus* y los microorganismos. Santoyo et al. (2016) realizaron comparaciones entre genomas de bacterias rizosféricas y endófitas desvelando los genes involucrados en el estilo de vida endofítica de dichas bacterias. Eastman et al. (2014) estudiaron los genomas de cuatro cepas de *Paenibacillus*, para una futura aplicación en ingeniería genética, en agricultura, en industria y en medicina.

Además, diversos estudios muestran como el análisis de los genomas de bacterias PGPR revela que dichas cepas poseen genes codificantes para proteínas que pueden estar implicadas en varios procesos, por ejemplo en la tolerancia a estreses abióticos como la sequía (Zhang et al. 2017), la supervivencia en suelos con alta salinidad (See-Too et al. 2016; Wang et al. 2017) o concentraciones altas de metales pesados, añadiendo un potencial uso de la cepa en cuestión en fitoremediación (Liu et al. 2016; Crovadore et al. 2016) y en biocontrol de enfermedades producidas por bacterias, como el fuego bacteriano producido por *Erwinia amylovora* (Habibi et al. 2017), entre otras aplicaciones posibles.

Debida a la multitud de aplicaciones derivadas de la secuenciación del genoma queda patente el importante papel que podrían desempeñar en el presente estudio.



# OBJETIVOS



En los últimos años, hay una creciente necesidad por mejorar la comprensión de la interacción entre los microorganismos y las plantas, explorando los mecanismos de acción de las bacterias rizosféricas y endofíticas, ya que este entorno se ha revelado como vasto y complejo en cuanto a la diversidad que contiene. El estudio de la diversidad microbiana afecta a múltiples ámbitos de la sociedad incluidos aspectos ambientales, sanitarios o incluso agrícolas ya que muchas de estos microorganismos pueden estar involucrados en procesos de promoción del desarrollo vegetal, pudiendo ser empleadas como biofertilizantes en numerosos cultivos. Por tanto, el objetivo general de este trabajo es estudiar, desde el punto de vista de la interacción microorganismo-planta, la diversidad de bacterias endófitas en raíces y tallos de maíz y seleccionar así bacterias con capacidad para promover el crecimiento vegetal del cultivo de maíz y de diferentes cultivos de hortalizas al ser aplicadas como biofertilizantes. Para cumplir con este objetivo, se han abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Aislamiento de bacterias endófitas a partir de raíces y tallos de *Zea mays* y su posterior caracterización fenotípica y genotípica.
2. Análisis de la colonización e infección de las bacterias seleccionadas en raíces de *Zea mays* mediante microscopía de fluorescencia y confocal.
3. Secuenciación, anotación y análisis de genomas de las cepas seleccionadas.
4. Estudio *in silico* de la similitud de las proteínas CelC de las cepas de interés.
5. Obtención de un transformante que sobreexpresa la celulasa CelC y su posterior estudio en la implicación tanto en la colonización e infección como en el desarrollo vegetal de *Zea mays*.
6. Estudio y análisis de la promoción del crecimiento vegetal de las cepas seleccionadas en el cultivo de *Zea mays* bajo condiciones de invernadero y ensayos de campo.
7. Estudio de la colonización y análisis de la implicación en la mejora de la producción en cultivos de *Eruca sativa*, *Ocimum basilicum*, *Valerianella locusta* y *Nasturtium officinale* empleando cepas seleccionadas en este estudio.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.

### 1.1 Recolección de muestras.

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron aislados de raíz y tallo de plantas de maíz (*Zea mays L.*), sembrado en un suelo de la localidad salmantina de Ciudad Rodrigo, situada a 89 kilómetros al suroeste de la ciudad de Salamanca. Las plantas muestreadas no presentaban, a simple vista, síntomas de enfermedad tales como clorosis, manchas en las hojas u otros tipos de lesiones causadas por patógenos. Todas las plantas fueron desenterradas en el campo y transportadas al laboratorio, donde fueron procesadas en menos de 48 horas para el aislamiento de bacterias endófitas.

### 1.2 Aislamiento de cepas.

Las raíces y tallos se lavaron con agua estéril para eliminar los restos de suelo que pudieran quedar. A continuación, se cortaron pequeños trozos de raíces y tallos de unos 5 mm de longitud, que se trataron en tubos tipo Eppendorf® con etanol al 70% durante dos minutos, posteriormente se introdujeron en una solución de lejía comercial al 20% (1% de cloro activo) durante 10 minutos y por último de nuevo en etanol al 70% durante dos minutos. Después, se realizaron cuatro lavados con agua estéril para eliminar los restos de etanol y lejía. Acto seguido, se trituraron las raíces y tallos con ayuda de una varilla de cristal estéril, con la cual se sembró el triturado en placas Petri con medio de cultivo YMA (Vincent 1970) (Tabla 3). Las placas sembradas se cultivaron a 28°C durante siete días, en los que se produjo el crecimiento de colonias procedentes del interior de las raíces y tallos. A partir de las colonias formadas, se realizaron aislamientos por agotamiento en estría hasta obtener cultivos puros que se sembraron en el mismo medio y a la misma temperatura.

Tabla 3. Composición del medio Yeast Manitol Agar (YMA).

Medio YMA	g/l
Manitol (Fluka®)	7 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0 g
Extracto de levadura (Difco®)	2 g
Agar (Conda®)	15 g
Agua destilada	1 L

### **1.3 Mantenimiento y conservación de cepas.**

El mantenimiento de las cepas para su uso rutinario se realizó en placas de su medio correspondiente, conservándolas a una temperatura de 4°C. Su conservación a largo plazo se realizó por congelación temperatura de -80°C, utilizando una solución crioprotectora de glicerol al 50%, que se repartió en criotubos (500µl) y se esterilizó en autoclave. Posteriormente, a partir de los cultivos crecidos en medio YMA durante 5 días a 28°C, se prepararon suspensiones celulares de cada una de los aislados en agua estéril, añadiendo 500µl de la suspensión por criotubo de glicerol. Cada una de las cepas se preservó en tres criotubos.

## **2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.**

### **2.1 Caracterización fenotípica.**

#### **2.1.1 Morfología.**

Las características morfológicas, la pigmentación y el crecimiento de las colonias fueron observadas directamente sobre placas de YMA y se realizaron fotos en la lupa estereoscópica.

#### **2.1.2 pH.**

Para medir la tolerancia a diferentes pH de las cepas, se utilizó como base el medio TSA (Tryptic Soy Agar, Difco®), salvo aquellas cepas con morfología similar a especies del género *Rhizobium*, las cuales se sembraron en medio YMA. Los medios utilizados se ajustaron a distintos pH (4, 5, 7 y 9) empleando tampones adecuados (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M para pH ácidos y KOH 1M para pH básicos). Todos fueron medidos con un medidor de pH.

#### **2.1.3 Temperatura.**

Para estudiar la tolerancia a temperaturas, placas de TSA e YMA fueron sembradas con las cepas de estudio e incubadas a 4, 10, 28, 37 y 50°C.

#### **2.1.4 Salinidad**

El estudio de la capacidad de tolerancia de las cepas aisladas a la salinidad se realizaron en placas de TSA e YMA al que se le añadieron distintas concentraciones de cloruro sódico: 0.5, 1, 2 y 5 %.

#### **2.1.5 Resistencia a antibióticos.**

Para evaluar la resistencia o sensibilidad de los aislados a distintos antibióticos, todas las cepas fueron inoculadas en placas de TSA e YMA suplementadas con diferentes concentraciones de antibióticos conocidos (Tabla 4). Previamente, se elaboraron soluciones stock en agua destilada de cada uno, a una concentración de 20mg/ml y se esterilizaron por filtración (filtros de 0.22µm), a excepción de la tetraciclina, cuya solución de stock se preparó a 1 mg/ml en una mezcla 1:1 de etanol:agua destilada esterilizada.

Tabla 4. Concentración de antibióticos utilizados para suplementar los medios de cultivo.

Antibiótico	Abreviatura	Concentración
Tetraciclina	Tc5	5 µg/ml
Tetraciclina	Tc10	10 µg/ml
Kanamicina	Km20	20 µg/ml
Kanamicina	Km50	50 µg/ml
Kanamicina	Km100	100 µg/ml
Kanamicina	Km200	200 µg/ml
Ampicilina	Amp200	200 µg/ml
Gentamicina	Gm10	10 µg/ml
Gentamicina	Gm50	50 µg/ml
Apramicina	Apra50	50 µg/ml
Streptomycin	Sm50	50 µg/ml
Streptomycin	Sm200	200 µg/ml
Spectinomycin	Spt50	50 µg/ml
Spectinomycin	Spt200	200 µg/ml
Trimetoprima	Trim10	10 µg/ml

\*Todos los antibióticos son de la casa comercial Sigma.

### 2.1.6 Caracterización de los aislados por métodos enzimáticos.

Para la detección de actividades enzimáticas se utilizaron 32 sustratos cromogénicos derivados del P-Nitrofenol (PNP; Acetato, N-Hidroxisuccinimida, N-Acetil-β-D-Galactosamina, N-Acetil-β-D-Glucosamina, α-L-Arabinopiranosido, β-L- L-Arabinopiranosido, β-D-Celobiosido, Fenilalanina, Fosfato (pH.5), Fosfato (pH.7), Fosfato (pH.8,5), Bis-Fosfato (pH.7), Bis-Fosfato (pH.8,5), Nitrofenil-fosforicolina, α-L-Fucopiranosido, β-D-Fucopiranosido, α-D-Galactopiranosido, β-D- Galactopiranosido, β-D-Galacturonido, α-D-Glucopiranosido, β-D-Glucopiranosido, β-D-Glucuronido, β-D-Lactósido, α-D-Maltósido, β-D-Maltósido, α-D-Manopiranosido, β-D-Manopiranosido, α-L-Ramnopiranosido, Sulfato, Tio β-D-glucopiranosido, α-D-Xilopiranosido, β-D-Xilopiranosido) todos ellos de la casa comercial Sigma-Aldrich. La prueba se lleva a cabo sobre placas multipocillo en las que se depositaron 50µl de una suspensión de cada sustrato al 0.1% (p/p).

Las cepas se sembraron en medio Bergensen (Bergensen 1961) con modificaciones (Tabla 5) durante 7 días a 28°C.

Tabla 5. Composición del medio Bergensen, modificado.

Medio Bergensen	g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0.2 g
NaCl (Panreac®)	0.1 g
Agar (Conda®)	20.0 g
Agua destilada	1 L

\*Ajustar a pH 7,0 y autoclavar.

La incubación de la prueba se lleva a cabo tras añadir 100µl de una suspensión del microorganismo (D.O.630nm=0.5) durante 24-48 horas a 28°C. El revelado de la misma se basó en la aparición de la coloración amarilla en medio básico, tras la adicción de 100 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4%, detectándose de este modo la hidrólisis del sustrato.

La preparación de los sustratos cromogénicos se llevó a cabo resuspendiéndolos en tampón fosfato 0.2M a pH=7.0, excepto los que requieren pH=8.5 que se resuspendieron en tampón Tris-HCl 0.2M y los que requieren pH=5.0 que se resuspendieron en tampón acetato 0.2M. Los sustratos ya disueltos han de conservarse a -20 °C.

### **2.1.7 Determinación cualitativa de la producción de celulosa.**

La capacidad para producir celulosa fue evaluada utilizando el medio de cultivo YMA convencional con 25mg/l de rojo congo. Este compuesto es capaz de unirse a polímeros de 1,4-β glucosa, por lo que es comúnmente utilizado para la detección de celulosa (Mateos et al. 1995). Sobre la superficie del medio se depositaron 5 µl de una suspensión bacteriana, incubando las placas durante 3 días a 28°C.

### **2.1.8 Determinación de la formación de biofilms en placas de microtitulación de poliestireno.**

Estos ensayos se llevaron a cabo según Fujishige et al. (2006), con algunas modificaciones.

1. Se prepara un pre-inóculo incubando la cepa a 28 °C con agitación orbital a 180 rpm, durante 2-3 días o hasta una densidad óptica (DO) a 600 nm de 2,0.
2. Se centrifuga el pre-inóculo a 3500 rpm durante 20 minutos, se elimina el sobrenadante y se resuspende en 4 ml de medio YMB.
3. La densidad óptica a 600 nm debe de ser de 0,2.
4. Cada una de las cepas se inoculará con 100 µl al menos en 6 pocillos de placas de PVC (Falcon, 3911, Dickinson Becton, Franklin Lakes, Nueva York) previamente esterilizadas. Adicionalmente, se dejarán pocillos con YMB sin inocular como control.
5. Realizaremos las placas por triplicado ya que realizaremos tres lecturas, en días consecutivos, a las 24, 48 y 72 horas, incubando las placas a 28°C estáticamente.
6. Pasado el tiempo de incubación, se voltean las placas con un golpe seco para eliminar el contenido de los pocillos.
7. Después, mediante la ayuda de una pipeta multicanal, se agregan 100 µl de una solución de cristal violeta al 0.3% (Sigma®) y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se realizan 3 lavados consecutivos de 5 minutos con 200 µl de agua destilada,
9. Se deja secar durante una hora en la campana de flujo laminar.
10. Después, se añaden 100 µl de una solución de etanol:acetona en una proporción 4:1, se homogeneiza y se incuba durante 15 minutos.
11. Por último, se cuantifica mediante medición de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas ASYS (Biochrom, Reino Unido).

## 2.2 Características PGPR.

### 2.2.1 Producción de sideróforos.

La capacidad de producir sideróforos se evaluó utilizando el medio de cultivo M9-CAS-Agar (Schwyn and Neilands 1987), realizando una modificación que consiste en la adición de un disolvente cationico, HDTMA, que estabiliza el complejo Fe-CAS y le da un color azul característico (Alexander and Zuberer 1991). Finalmente, observaremos halos de diferentes tamaños y tonalidades. Este medio se prepara partiendo de cuatro soluciones diferentes, esterilizadas de forma individual y mezcladas posteriormente en orden.

#### Solución 1

1. Se mezclan 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM (disueltos en HCl 10 mM), con una solución acuosa de 50 ml de CAS (Chromeazurol S) ( $1.21 \text{ mg ml}^{-1}$ ) obteniendo una solución acuosa de intenso color púrpura.
2. Posteriormente, se mezcla con 40 ml de una solución acuosa de HDTMA ( $1.82 \text{ mg ml}^{-1}$ ). La solución resultante tendrá un color azul marino denso, y se autoclava independiente del resto.
3. La solución se mezclará con las restantes cuando su temperatura haya bajado hasta unos  $50^\circ\text{C}$ .

#### Solución 2

En primer lugar obtenemos una solución salina mezclando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , después añadimos PIPES (piperazina-N, N'-bis [ácido 2- ethanesulfónico]) a la solución y ajustamos el pH a 6.8 (Tabla 6).

Tabla 6. Solución 2 de la preparación del medio M9-CAS-Agar.

Solución 2	g/ml
PIPES (Sigma®)	30.24 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Panreac®)	0.3 g
NaCl (Panreac®)	0.5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (Panreac®)	1.0 g
Agar (Conda®)	15 g
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	750 ml

#### Solución 3

Para obtener esta solución se disuelven en 70 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada los compuestos detallados en la Tabla 7.

Tabla 7. Solución 3 de la preparación del medio M9-CAS-Agar.

Solución 3	g/ml
Sacarosa (Panreac®)	2.0 g
Manitol (Fluka®)	2.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	493.0 mg
CaCl <sub>2</sub> (Codex®)	11.0 mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (Panreac®)	1.17 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Panreac®)	1.4 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0.04 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	1.2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Panreac®)	1.0 mg
H <sub>2</sub> O destilada	70 ml

#### Solución 4

La solución 4 es una disolución de 30 ml de cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de caseína) al 10% w/v esterilizada mediante filtración por una membrana de 0,22 µm (Millipore®, Amicon, EEUU).

Una vez preparadas todas las soluciones, se esterilizan en autoclave, mezclándolas posteriormente cuando adquieran una temperatura de 50°C, siendo la solución 4 la última en ser añadida.

De esta manera, tenemos el medio M9-CAS-agar preparado. En las placas preparadas con este medio sembramos las cepas y se incuban durante un mínimo de 3 días a 28°C. Las placas pueden observarse a distintos tiempos para ver la evolución en la producción de sideróforos.

#### 2.2.2 Solubilización de fosfato.

La capacidad para solubilizar fosfatos fue evaluada en el medio YED-P (Peix et al. 2004). Los aislados se inocularon en placas de YED-P (Tabla 8) y se incubaron a 28°C durante 3-4 días. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la presencia o ausencia de halos de solubilización en cada una de las placas.

Tabla 8. Composición del medio YED-P.

Medio YED-P	g/l
Extracto de levadura (Difco®)	5 g
Glucosa (Panreac®)	10 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (Panreac®)	2 g
Agar (Conda®)	20 g
Agua destilada	1 L

### 2.2.3 Producción de ácido indol-acético.

La determinación de la capacidad de las diferentes cepas para producir ácido indol-acético (AIA) y derivados indólicos fue evaluada utilizando el medio JMM (Graham *et al.*, 1989) modificado para determinar que ruta metabólica utilizan estos microorganismos para la producción de AIA.

Las cepas se sembraron en medio sólido YMA y se incubaron durante 5 días a 28°C. Transcurrido este tiempo se realizaron soluciones con los cultivos en agua destilada estéril a una densidad de  $1 \cdot 10^6$  UFC/ml. Con 100  $\mu$ l de estas diluciones inoculamos el medio JMM modificado.

La preparación del medio JMM modificado fue la siguiente:

Se prepara una solución base o medio JMM base (Tabla 9), la cual es autoclavada, exceptuándose la solución de vitaminas, que se añade después del proceso. Para la preparación de la solución de vitaminas, todas ellas se disolvieron en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05M (pH 7,0) y se esterilizaron por filtración empleando filtros de un tamaño de poro de 22 $\mu$ m (Millipore®, Amicon, EEUU). La marca comercial de todas las vitaminas es Fluka®.

Tabla 9. Composición del medio JMM base.

Medio JMM base	C+(Con fuente de nitrógeno)	C- (Sin fuente de nitrógeno)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Panreac®)	0.006 g	0.006 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac®)	0.004 g	0.004 g
NaCl (Panreac®)	0.002 g	0.002 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (Sigma®)	0.02 g	-
Glucosa (Panreac®)	0.04 g	0.04 g
Manitol (Fluca®)	0.08 g	0.08 g
Piruvato sódico (Sigma®)	0.08 g	0.08 g
Elementos traza (Tabla 11)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Solución de vitaminas (Tabla 10)	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	10 ml	10 ml

Tabla 10. Composición de la solución de vitaminas.

Solución de Vitaminas	mg/l
Riboflavina	20.0 mg
Ácido P-amino benzoico	20.0 mg
Ácido nicotínico	20.0 mg
Biotina	20.0 mg
Tiamina-HCl	20.0 mg
Piridoxina-HCl	20.0 mg
Pantotenato cálcico	20.0 mg
Inositol	120.0 mg
Tampón fosfato sódico 0,05M pH7	1 L

\*Todas las vitaminas son de la casa comercial Fluka. Disolver en tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05M pH7 y esterilizar por filtración. Es conveniente realizar una solución stock al menos 20 veces concentrada.

## Materiales y Métodos

Tabla 11. Composición solución de elementos traza.

Solución de Elementos Trazas	mg/ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	145.0 mg
FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125.0 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	59.0 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5.0 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4.3 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	108.0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	125.0 mg

\*Todos los elementos traza son de la casa comercial Panreac.

La producción de AIA por las cepas aisladas fue evaluada en medio con triptona, inductor de la producción de AIA debido a su alto contenido de triptófano, precursor de este metabolito. Para ello se añadió triptófano a una concentración de 0.167 g/l.

Repartimos 2 ml de cada una de las soluciones ya finalizadas, es decir, con glutamato o triptófano, en viales para facilitar la inoculación.

Una vez inoculados con las diferentes cepas, cada uno de los medios finales se incubaron a 28°C durante 72 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante separándolo mediante centrifugado. Se añadió 500 µl de agente Salkowski al sobrenadante, en proporción 2:1 (sobrenadante: agente Salkowski).

\*Agente Salkowski: 2 ml de FeCl<sub>3</sub> 0.5M+98 ml de HClO<sub>4</sub> al 35% (Gordon and Weber 1951).

En los medios donde existía producción de ácido indolacético se produjo una reacción colorimétrica, los cuales se tornaron de color rosado o rojizo una vez añadido el agente Salkowski. Esta reacción se cuantificó mediante espectrometría utilizando un espectrofotómetro de absorción ATI Unicam 8625 (Mattson®, EEUU) a una longitud de onda de 550 nm.

La cantidad de ácido indol acético producida por cada cepa, se determina utilizando la recta de regresión obtenida (Figura 10) a partir de una recta patrón estándar (Tabla 12).



Tabla 12. Recta patrón estándar: medida de la concentración en función de la absorbancia.

Concentración mg/L	Abs 550 nm
0,15	0,367
0,075	0,205
0,0375	0,102
0,01875	0,043
0,009375	0,035
0,004688	0,014
0,002344	0,012
0,001172	0,007
0,000586	0,006
0,000293	0,006
0,000147	0,005
0	0

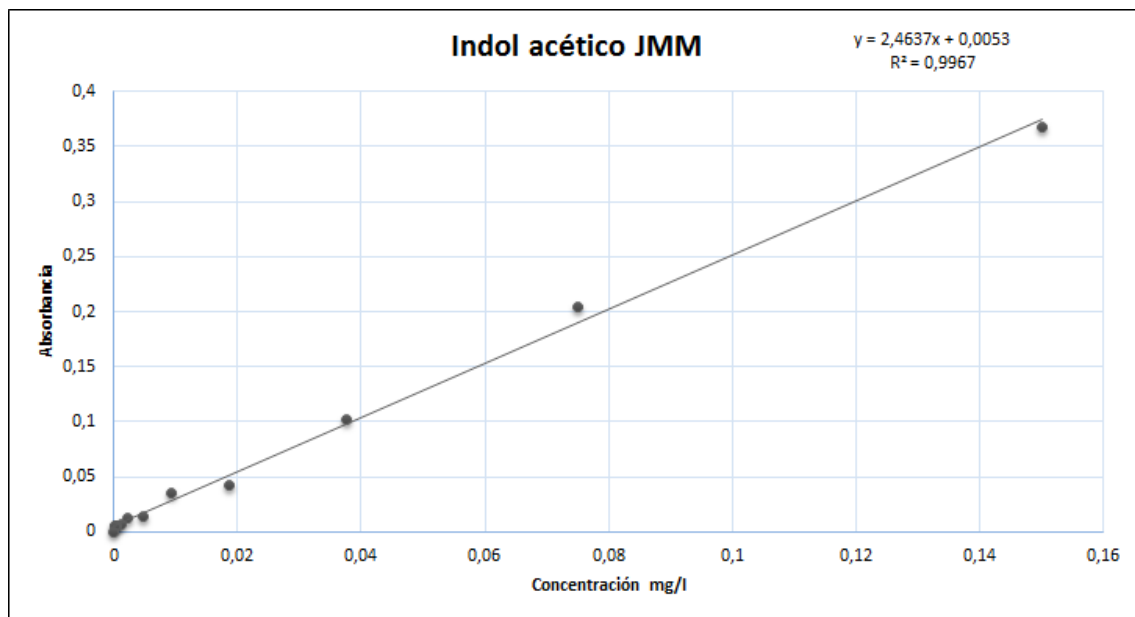


Fig. 10. Gráfico estándar para obtener la concentración de AIA producida por las cepas. Donde la X es la absorbancia en la recta de regresión.

#### 2.2.4 Estudios antibiosis *in vitro*.

El objetivo de este estudio fue determinar si alguna de nuestras cepas producía antibióticos que inhibieran *in vitro* el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas de interés.

Las cepas de hongos y bacterias utilizadas fueron cedidas por el Dr. José Luis Palomo en el Centro de Diagnóstico Biológico de la Junta de Castilla y León en Aldearrubia (Salamanca). Todas las cepas utilizadas son patógenos vegetales de cuarentena, elegidos por su importancia en los cultivos de la península. Las bacterias y hongos utilizados en este estudio aparecen en las tablas 13 y 14.

## Materiales y Métodos

Tabla 13. Bacterias utilizadas en los ensayos de antibiosis.

ORGANISMO	HOSPEDADOR
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pyrus communis</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i> sp. <i>carotovorum</i>	<i>Daucus carota</i>
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Pyrus communis</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>

Tabla 14. Hongos utilizados en los ensayos de antibiosis.

ORGANISMO	HOSPEDADOR
<i>Diplodia seriata</i>	Olivo, vid
<i>Monilinia laxa</i>	Frutas de hueso
<i>Monilinia fructigena</i>	Frutas de hueso
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Tomate
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	Trigo
<i>Rhizoctonia solani</i>	Patata, arroz, maíz

1. Una semana previa al ensayo se sembró la cepa de *Streptomyces*, en medio YEDP en una única estría central, se incubó a 28°C.
2. Pasados 7 días, se sembraron las bacterias patógenas mediante una estría perpendicular a la estría de nuestra cepa, posteriormente se incubaron a 28°C.
3. Los hongos se sembraron mediante plugs a ambos lados de la estría de la cepa de estudio, posteriormente se incubaron a 28°C.

En ambos casos se mantuvieron en estas condiciones durante 6 días más, realizando sucesivas observaciones.

### 2.3 Caracterización adicional para la identificación de la nueva especie.

#### 2.3.1 Determinación del contenido en G+C.

El cálculo del porcentaje de G+C de las cepas de este estudio se realizó empleando el método de fusión (Mandel and Marmur 1968).

El fundamento de este método se basa en el fenómeno de hipercromicidad que se observa en el DNA cuando se desnaturaliza y que es fácilmente observable por los cambios en la absorción de luz U.V. a 260 nm.

La desnaturalización se produce al elevar la temperatura de la muestra de DNA, de forma que los puentes de hidrógeno que mantienen la doble hélice se rompen. Este proceso es denominado fusión. El punto de máxima absorbancia a 260 nm nos da la temperatura de fusión ( $T_m$ ), que es directamente proporcional al porcentaje molar de G+C, puesto que las uniones GC se mantienen por 3 puentes de hidrógeno, mientras que las de A-T están formadas por dobles enlaces y son más fáciles de separar.

La determinación de las absorbancias a 260 nm se llevó a cabo en un espectrofotómetro de luz U.V. modelo Gene Quant, de Pharmacia Biotech® (EEUU). El DNA de cada cepa se disolvió en tampón SSC 1x, con una relación DNA: SSC de 1:9.

Como referencia, se determinó la absorbancia del SSC (Tabla 15) a una temperatura de 50 °C. La absorbancia de las muestras a la misma longitud de onda se midió desde 50 °C hasta 80 °C en intervalos de 5 °C y, posteriormente, en intervalos de 1 °C hasta los 98 °C. La fórmula que relaciona el porcentaje de G+C y la  $T_m$  (Temperatura de *melting*) es la siguiente:

$$\%G + C = K * (T_m - 69.3) * 2.44$$

Tabla 15. Composición del tampón SSC.

Tampón SSC	Concentración	g/l
NaCl (Fluka®)	3.0 M	8,77 g
Na-citrato pH 7.0	0.3 M	4.41 g
Agua destilada		1 L

### 2.3.2 Pruebas bioquímicas utilizando sistemas comerciales.

Según lo descrito por Lorite et al. (2016), para identificar las características bioquímicas de la nueva especie, se utilizaron las galerías comerciales API ID32GN y API 20NE (Biomérieux®) según las especificaciones del fabricante, con una modificación, que fue añadir a la suspensión del inóculo  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  estéril hasta una concentración final de 0.2g/l, con el fin de un crecimiento óptimo para la cepa de *Rhizobium*. Se incuban a 28°C durante 3 días. En el API ID32GN, se observan los resultados directamente por turbidez. En cambio, en el API 20NE, se tienen que revelar con NIT1 y NIT2.

### 2.3.3 Antibiograma.

Se realizó un antibiograma con el fin de determinar la resistencia de la nueva especie descrita a varios antibióticos de distintas concentraciones embebidos en discos de celulosa (Oxoid®).

1. En placas de YMA se extendió por toda la placa, con hisopos estériles, una pequeña cantidad de células de cada uno de los aislados, tanto nuestro aislado como las cepas tipo de referencia.
2. A continuación, se colocan en condiciones asépticas discos conteniendo diferentes tipos y concentraciones de antibióticos (Tabla 16).

Tabla 16. Antibióticos y concentraciones empleados en el antibiograma.

Antibiótico	Concentraciones
Tetraciclina (TE30)	30 µg
Polimixina B (PB300)	300 U.I.
Cefuroxima (CXM30)	30 µg
Gentamicina (GM10)	10 µg
Eritromicina (E2)	2 µg
Ciprofloxacina (CiP5)	5 µg
Ampicilina (AM2)	2 µg
Cloxaciclina (CX1)	1 µg
Neomicina (N30)	30 µg
Penicilina (P10)	10 U.I.

3. Incubamos las placas a 28°C durante 4 días.
4. Observamos los halos que aparecen rodeando a los discos y anotamos los que son positivos (no se observa crecimiento del microorganismo alrededor del disco), negativos (existe crecimiento del microorganismo alrededor del disco) o débiles (el efecto inhibitor del halo es escaso).

### 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

#### 3.1 Caracterización genotípica.

##### 3.1.1 Extracción de DNA.

###### 3.1.1.1 Extracción de DNA total para secuenciación del genoma.

Para obtener un DNA puro de las cepas enviadas a secuenciar el genoma se utilizaron los siguientes kits “UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit” (Mobio) y el kit “ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™” (Zymo Research) y se llevaron a cabo según sus respectivas especificaciones, cuantificándose en ambos casos en el Nanodrop (Bionova) y guardándolos para su conservación a -20°C.

###### 3.1.1.2 Extracción de DNA total.

Con el fin de extraer DNA, las cepas se cultivaron en medio de cultivo YMA y tras 48 horas creciendo a 28°C. Se utilizó para ello un KIT “REDEXtract-N-Amp Plant PCR Kit” de Sigma®. Una vez crecidas, se recogieron células en un tubo tipo Eppendorf® y se añadieron 100 µl de la solución de extracción y se resuspendieron las células mediante un vortex. A continuación, se incubaron los tubos a 95°C durante 10 minutos para provocar la lisis celular. Después, se añadieron 100 µl de la solución de dilución y se centrifugaron a 6.000 rpm durante 4 minutos en una centrifuga de mesa Sorvall Legend MICRO17. Se recogieron 100 µl superiores y se guardan a -20°C para su posterior uso.

### 3.1.2 Amplificación de DNA.

Para realizar la amplificación de DNA se realizó empleando el Kit citado en el apartado anterior que contiene un cóctel que incluye buffer, sales, los nucleótidos (dNTP's) y la Taq polimerasa (REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix). El PCRMix contiene un colorante de seguimiento inerte que permite la carga directa de las reacciones de PCR sobre los geles de agarosa. Para la amplificación del gen 16S rRNA, se utilizaron los primers 27F y 1522R (Tabla 20).

Por otra parte, la amplificación de los genes *recA* y *atpD* se llevaron a cabo con los siguientes pares de primers, *recA*-Rh-4R y *recA*-Rh-1F diseñados a partir de la secuencia del gen *recA* *Rhizobium leguminosarum* VF39 (X59956); y *atpD*-Rh-3R y *atpD*-Rh-1F, a partir de la secuencia del gen *atpD* de *Rhodobacter capsulatus* B100 (X99599) (Tabla 20).

Los reactivos y concentraciones se muestran en la tabla 17 y condiciones de amplificación en la tabla 19.

Tabla 17. Reactivos utilizados en la PCR para la amplificación de genes.

Reactivos	Volumen añadido
REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix	15 µl
Primer F (2 µM)	2.5 µl
Primer R (2 µM)	2.5 µl
H <sub>2</sub> O estéril mili Q	3 µl
DNA	2 µl

#### 3.1.2.1 Obtención de perfiles RAPD.

La obtención de perfiles de RAPD, se realizó una amplificación del DNA utilizando el primer M13 (Tabla 20), diseñado a partir de la región central del fago del mismo nombre (Schönian et al. 1993). Los reactivos empleados se muestran en la tabla 18 y las condiciones de PCR en la tabla 19. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis, bajo las condiciones descritas en el siguiente apartado, para separar las diferentes bandas amplificadas y obtener los perfiles de RAPD.

Tabla 18. Reactivos utilizados en la PCR para la amplificación para el análisis de perfiles RAPD.

Reactivos	Volumen añadido
REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix	12.5 µl
M13 (20 µM)	2.5 µl
H <sub>2</sub> O estéril mili Q	8 µl
DNA	2 µl

Tabla 19. Condiciones de amplificación de DNA para el análisis de los perfiles RAPD y amplificación de genes.

Método		RAPD		16S		recA, atpD	
Predesnaturalización		95 °C	10'	94 °C	5'	95 °C	9'
Desnaturalización	35 ciclos	95 °C	1'	95 °C	1'	94 °C	1'
Anillamiento		45 °C	1'	45 °C	1'	54 °C	1'10''
Extensión		72 °C	2'	72 °C	2'	72 °C	1'
Extensión final		72 °C	7'	72°C	10'	72 °C	7'
		4 °C	∞	4°C	∞	4 °C	∞

### 3.1.3 Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 1% cuando el objetivo fue cortar bandas de DNA para secuenciar un fragmento amplificado y al 1,5% cuando se analizaron los perfiles de RAPD. Tanto para la preparación de estos, como para la electroforesis se utilizó TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8,0, Millipore). A continuación, añadimos bromuro de etidio (Promega) a una concentración final de 0.5µg/ml, colocar el peine adecuado y dejar solidificar. Cargamos la reacción de PCR y ponemos un marcador (GeneRuler® 100bp/1Kb). Para uso rutinario se ponían a 70mV durante 90 minutos. Por último, se observaron con luz U.V. y se fotografiaron, utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad®, EEUU).

### 3.1.4 Secuenciación del gen ribosómico 16S.

Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis. Una vez identificada la banda de interés en cada caso, ésta fue cortada y purificada utilizando el Kit "GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit" (ThermoScientific). La secuenciación se realizó en el servicio de secuenciación de DNA de Nucleus, utilizando el kit "Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" y utilizando un equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem®, EEUU). Para completar la secuenciación del gen 16S rRNA, se requirieron en ocasiones primers adicionales (SR2, SR3, SR4, 800R, 879R) (Tabla 20).

Tabla 20. Secuencias de los primers utilizados a lo largo de este trabajo.

Primers	Secuencia
M13	5'-GAGGGTGGCGTTCT- 3'
SR2	5'-GWATTACCGCGGCKGCTG- 3'
SR3	5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT- 3'
SR4	5'-GGGTTGCGCTCGTTG- 3'
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAG- 3'
800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC- 3'
879F	5'-GCCTGGGGAGTACGGCCGCA- 3'
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA- 3'
<i>recA</i> -Rh-1F	5'-CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA- 3'
<i>recA</i> -Rh-4R	5'-CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT- 3'
<i>atpD</i> -Rh-1F	5'-SCTGGGSCGYATCMTGAACGT- 3'
<i>atpD</i> -Rh-3R	5'-GCCGACACTCCGAACCNGCCTG- 3'
CelCexF	5'-TCGCCCAACTGGCTGTC- 3'
C2R	5'-CACAGACACTCCGGATGC- 3'

#### 3.1.4.1 Análisis de las secuencias de DNA.

Para editar los fragmentos generados, se utilizó el programa BioEdit y para el ensamblaje de las secuencias de una misma cepa se utilizó el programa Seqman (DNASTar Software). Estas secuencias también se compararon con las secuencias del 16S de las cepas tipo de cada especie, utilizando el servidor EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>; Yoon et al. 2017).

#### 3.1.5 Secuenciación y análisis de los genomas.

La secuenciación se llevó cabo en la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias fueron ensambladas mediante Velvet 1.2.10 y la anotación fue llevada a cabo utilizando el programa RAST 4.0

### 3.2 Clonajes y fragmentos de interés.

En este trabajo se utilizaron técnicas de clonación clásica que envuelven el uso de plásmidos, vectores de clonaje, primers y enzimas de restricción. Estos plásmidos y/o vectores contienen un gen de resistencia a un antibiótico y un lugar de clonación múltiple “*multicloning site*, *MCS*” en el que cortan las enzimas de restricción. Este MCS está localizado dentro del operón *lacZ*, que permite la identificación de colonias portadoras del inserto.

Los plásmidos utilizados para la clonación de fragmentos de DNA y obtención de los transformantes que se presentan en este trabajo se detallan a continuación (Tabla 21). El plásmido pBBR1-MCS-2 (Kovach et al. 1994) es un plásmido “mid-copy number”, de amplio rango de hospedador y estable en rhizobia (Figura 11). Pertenece a una serie de plásmidos con distintas resistencias a antibióticos que derivan del pBBR1-MCS. En particular, éste tiene

## Materiales y Métodos

resistencia a Kanamicina. Fue facilitado por la Dra. Clarisse Brígido del Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM-Uévora, Portugal).

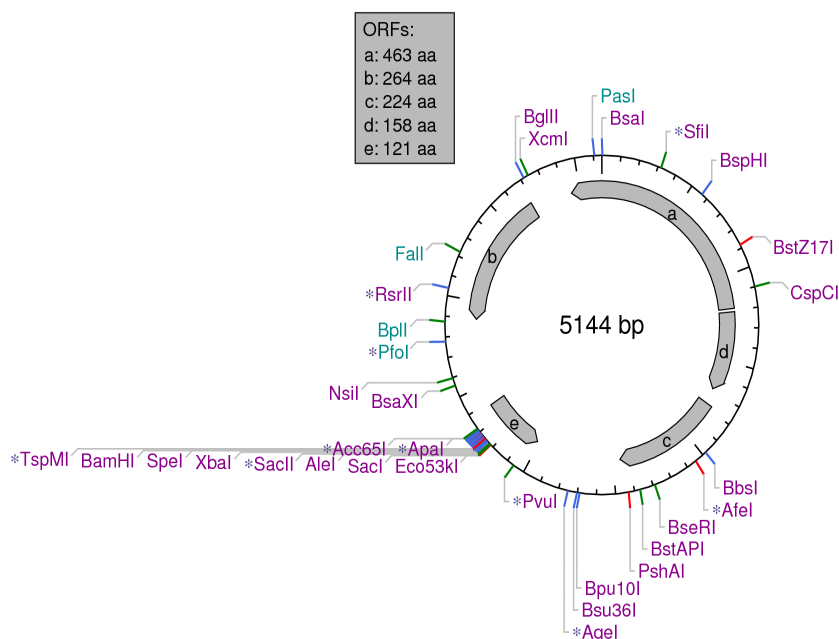


Fig. 11 Plásmido pBBR1-MCS-2 (Kovach et al. 1994), donde se detalla el lugar de corte de las principales enzimas de restricción.

Tabla 21. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencias
pHC60	Derivado de pHC41. Expresa constitutivamente una <i>gfp</i> . Tc <sup>10</sup>	(Cheng and Walker 1998)
pRK2013	Plásmido movilizador con replicón ColE1 y genes <i>tra</i> y <i>mob</i> . Km <sup>50</sup>	(Figurski and Helinski 1979)
pRK600	Derivado de pRK2013 con FT <i>Nm::Tn9</i> . Cm <sup>R</sup>	(Finan et al. 1985)
pJZC2	<i>ceiC</i> insertado entre los sitios <i>XhoI</i> y <i>Sall</i> de pBBR1-MCS-2. Km <sup>50</sup> . (Figura 12)	(Robledo et al. 2011)
pBBR1-MCS-2	Plásmido "mid-copy number", estable en <i>Rhizobium</i> . Km <sup>50</sup>	(Kovach et al. 1994)
pTST101-Mcherry	El promotor que utiliza es ermE*PhiC31. Apra <sup>50</sup>	(Heichlinger and Ammelburg 2011)



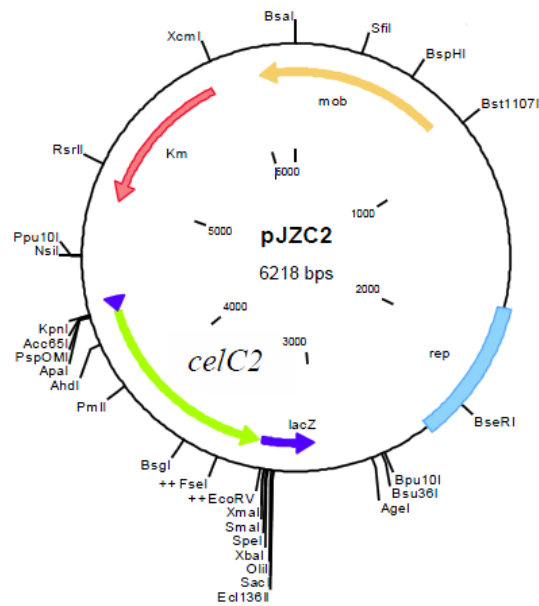


Fig. 12. Plásmido pJzc2 con CelC2 insertado entre los sitios XhoI y SalI de pBBR1-MCS-2.Km50 (Robledo et al. 2011).

### 3.3 Transformación de bacterias.

#### 3.3.1 Transformación bi-triparental de *Rhizobium*.

La transferencia de los plásmidos de interés utilizados en este estudio a cepas de *Rhizobium* se realizó mediante conjugación biparental (*E.coli* S17.1 portadora del plásmido pHc60 (Cheng and Walker 1998)) o triparental, según las características de la cepa donadora. En el caso de la transformación triparental es necesaria una cepa “helper” pRK2013 de *E.coli* (Kovach et al. 1994) (Tabla 22).

Tabla 22. Cepas utilizadas para realizar las combinaciones bi y/o triparentales.

Donador			Helper	Receptor	Nomenclatura de la cepa obtenida
Cepa	Plásmido	Gen de interés			
<i>E.coli</i> S17.1	pHC60	GFP	-	CRZM18R <sup>T</sup>	
<i>E.coli</i> S17.1	pHC60	GFP	-	CRZM52R	CRZM52RGFP
<i>E.coli</i> pJZC2	pJZC2	celC	<i>E.coli</i> pRK2013	CRZM52R	CRZM52RC2 <sup>+</sup>
<i>E.coli</i> S17.1	pHC60	GFP	-	CRZM52RpJZC2	CRZM52RC2 <sup>+</sup> GFP
<i>E.coli</i> pBBR1-MCS-2	pBBR1-MCS-2	-	<i>E.coli</i> pRK2013	CRZM52R	CRZM52REV
<i>E.coli</i> S17.1	pHC60	GFP	-	CRZM52REV	CRZM52REVGFP

1. La cepa de *Rhizobium* a transformar se incubó 3 días a 28°C en medio YMA o en TY en el caso de las cepas que tengan mucha cantidad de exopolisacárido.

## Materiales y Métodos

2. La cepa de *E.coli* (con plásmido de interés) y la cepa “*helper*” (si es necesaria), con un crecimiento “*overnight*” a 37°C en medio LB (Tabla 23) con su correspondiente antibiótico.

Tabla 23. Composición de medio LB.

Medio LB	g/l
Bacto-Triptona (Difco®)	10 g
Extracto de levadura (Difco®)	5 g
NaCl (Panreac®)	10 g
Agua destilada	1 L

3. Con ayuda de un asa de siembra estéril, ir añadiendo los microorganismos, en orden Receptor, *helper* y Donador, en una proporción 2:1:1, sobre medio TY (Tabla 24), realizando pequeños movimientos circulares para homogeneizar todas las cepas.
4. Incubar “*overnight*” a 28°C.
5. Resembrar la mezcla por agotamiento en estría en Medio Mínimo (Tabla 25) (O’Gara and Shanmugam 1976) suplementado con el antibiótico correspondiente a la cepa donadora.
6. Incubar a 28°C hasta la aparición de colonias aisladas.
7. Seleccionar colonias y sembrarlas simultáneamente en Medio Mínimo suplementado con el antibiótico correspondiente (incubar a 28°C) y en medio sólido comercial VRB (Scharlau®) (incubar a 37°C).
8. Seleccionar los transconjugantes negativos para el crecimiento en VRB a las 48 horas.
9. Sembrar en su medio habitual suplementado con el antibiótico correspondiente.

\*Importante incluir controles de transformación.

\*En el caso de una transformación biparental, el procedimiento es igual pero con la diferencia de que la cepa donadora tiene capacidad movilizadora, por lo que no es necesaria la adicción a la mezcla de una cepa *helper*.

Tabla 24. Composición del medio TY.

Medio TY	g/l
Bacto-Triftona (Difco®)	5 g
Extracto de levadura (Difco®)	3 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (Codex®)	0.5 g
Agua destilada	1

Tabla 25. Composición del medio mínimo.

Medio Mínimo	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0.15 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Codex®)	0.05 g
NaCl (Panreac®)	0.1 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Prolabo®)	0.1 g
Manitol (Fluca®)	10 g
Agua destilada	1 L

\*Ajustar a pH 7.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y después de su esterilización se agregaron las cantidades necesarias de las soluciones de vitaminas (1ml/l; tabla 10) y elementos traza (1ml/l: tabla 11).

### 3.3.2 Construcción de la sobreexpresión heteróloga del gen *CelC2* de *R. leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 en la cepa CRZM52R.

Para la obtención de la cepa recombinante que exprese heterológamente la celulasa (*CelC2*) de *R. leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 en *R. leucaenae*. Para su obtención se utilizó un plásmido estable en rizobios que expresa constitutivamente el gen *celC*, denominado pJZC2 (Robledo et al. 2011). Esta transformación se realizó mediante conjugación triparental (apartado 3.3.1), utilizando como donadora *E.coli* DH5α que contenía dicho plásmido, seleccionando las colonias resistentes a kanamicina, resistencia antibiótica del plásmido original pBBR1-MCS-2 (Kovach et al. 1994). Dicho plásmido se utilizó también para realizar el transformante “empty vector” y utilizarlo así como cepa control.

Los transformantes se incubaron en placas de TY suplementado con el antibiótico y concentración seleccionada (kanamicina 50µg/ml). Una vez obtenidas, se confirmaron mediante PCR, utilizando los primers C1F y C2R (tabla 20), que amplifican el fragmento del gen *celC* (Tabla 26) insertado en el plásmido (Tablas 21).

Tabla 26. Reactivos utilizados para la amplificación de la celulasa *celC2* en *R.leucaenae*.

Reactivos cepa heteróloga CRZM52RC2 <sup>+</sup>	Volumen añadido
REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma®)	15 µl
CelCexF [2µM]	2.5 µl
C2R [2µM]	2.5 µl
H <sub>2</sub> O estéril mili Q	9 µl
DNA	2 µl

La confirmación por PCR de estas cepas es suficiente ya que no se consiguió amplificar ningún fragmento en las cepas silvestres con estos primers.

### 3.3.3 Transformación de *Streptomyces griseoaurantiacus*.

Las cepas que se utilizan en este apartado son las siguientes:

- La cepa CRZM149R de *S. griseoaurantiacus* es la cepa final a transformar.
- La cepa de *E.coli* ET12567 (Bierman et al. 1992) contiene el plásmido pTST101-Mcherry (Heichlinger and Ammelburg 2011) que utiliza el promotor ermE\*PhiC31. Construcción cedida amablemente por la Dra. Hasna Boubakri (Université Lyon 1, France).
- Con el fin de inducir la competencia de la cepa *E.coli* ET12567, se electroporó con la cepa *E.coli* S17.1. A esta cepa electroporada, la llamaremos *E.coli*Cherry.

Para una efectiva transformación de la cepa de *Streptomyces* tenemos que realizar un conteo previo de esporas, puesto que para la conjugación necesitamos alrededor de  $10^8$ .

1. Con un asa de siembra, raspamos las esporas producidas por *Streptomyces* y las añadimos a un tubo tipo Eppendorf® con 500 µl de medio 2TY. Esta será la solución madre de esporas.
2. Necesitaremos 6 tubos tipo Eppendorf® de 500 µl de medio 2TY (Tabla 27) con  $10^8$  esporas. Para ello escogemos la dilución en la que obtengamos  $10^9$  UFC y realizamos una dilución más añadiendo 50 µl de la solución madre de esporas en 450 µl de 2TY y así estarán a  $10^8$ .
3. Para realizar un recuento de UFC, realizamos diluciones seriadas a partir de 100 µl de la solución madre de esporas, en tubos tipo Eppendorf® con 400 µl de medio 2TY, sembramos 100 µl en placas de YMA e incubamos a 28°C, durante 72 horas.
4. Guardamos a -20°C para conservarlas hasta su utilización.
5. Electroporamos la cepa de *E.coli* S17.1 con la cepa *E.coli* ET12567.
6. Se prepara un cultivo líquido de la *E.coli*Cherry, en 200 ml de LB Km<sup>30</sup>/Apra<sup>50</sup>, "overnight" a 37°C en agitación.
7. A la mañana siguiente, pasamos 1ml de ese cultivo "overnight" a un matraz con 100 ml de LB Km<sup>30</sup>/Apra<sup>50</sup> hasta de D.O (600nm) entre 0.4 y 0.6.
8. Cuando haya llegado a la densidad deseada añadimos 10 ml del cultivo a un tubo tipo Falcon® y otros 10 ml a otro.
9. Centrifugamos a 5000rpm durante 10min a Tª ambiente
10. Una vez centrifugado descartamos el sobrenadante.
11. Añadimos 10ml (porque es 0.1 del volumen inicial de 100ml de LB) de LB líquido, agitamos y centrifugamos 5000rpm durante 10min a Tª ambiente para lavar las células.
12. Repetimos el paso 8.
13. Una vez lavado eliminamos el sobrenadante y añadimos 1ml de LB líquido en cada tubo tipo, resuspendemos y añadimos 500 µl de LB a cada tubo tipo Eppendorf®.
14. Ponemos los tubos tipo Eppendorf® de las esporas (previamente contadas las UFC a  $10^8$ ) de *Streptomyces* a calentar 10 min a 50°C, y después las ponemos en hielo.
15. Añadimos los 500 µl del medio 2TY con las esporas a  $10^8$  con los 500µl de la *E.coli*Cherry y centrifugamos a 8000rpm durante 5 minutos.
16. Eliminamos 800 µl del sobrenadante y resuspendemos el pellet con los 200µl sobrantes y los sembramos en placas de

17. Al día siguiente, realizamos un lavado de las placas con agua estéril con la intención de retirar las *E.coli* ya que *Streptomyces* podrían quedar agarrados al medio por las hifas.
18. Añadimos sobre la placa 500  $\mu$ l de Apramicina 50  $\mu$ M. Se vuelven a incubar a 28 °C hasta observar alguna colonia con aspecto de *Streptomyces* y la resemebraremos en SFM (Tabla 28)+Apram<sup>50</sup>.

Tabla 27. Composición del medio 2TY.

Medio 2TY	g/l
Bacto -Tryptona (Difco®)	16 g
Extracto de levadura (Difco®)	10 g
Agar (Conda®)	5 g
Agua destilada	1 L

Tabla 28. Composición del medio SFM.

Medio SFM*	g/l
Harina de Soja Ecológica	20 g en 600 ml de Agua del Grifo
Manitol (Fluca®)	20 g en 400 ml de Agua del Grifo
Agar (Conda®)	20 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Panreac®)	10 mM
Agua destilada	1 L

\*Se preparan en matraces por separado, se ponen a agitar y los calentamos hasta alcanzar ebullición. Después los juntamos y los llevamos hasta ebullición. Después enrasamos hasta 1L ya que hemos podido perder agua.

\*Este matraz lo dividimos en dos pirex de 500ml y añadimos 10g de agar a cada uno.

\*Se autoclavan dos veces, con un intervalo de un día.

\*Después de autoclavado se añade el MgCl<sub>2</sub> filtrado.

## 4. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.

La completa caracterización de las cepas transformantes obtenidas en este trabajo (apartado 3.3.2) se lleva a cabo con la realización de técnicas tanto bioquímicas como moleculares. En este apartado se detallan las técnicas bioquímicas que se han utilizado en este trabajo.

### 4.1 Detección de actividad celulítica.

La caracterización bioquímica tanto de los transformantes como de las cepas *wild type* que expresan la celulasa CelC2 y la celulasa de *R. leucaenae* se llevó a cabo mediante ensayos enzimáticos de alta sensibilidad descritos para *Rhizobium* según Mateos et al. (1992).

#### 4.1.1 Detección de actividad celulásica en cultivo celular. Ensayos en placa de doble capa.

1. Incubar las cepas en sus cultivos correspondientes (con Antibiótico si fuese necesario) durante 2 o 3 días a 28°C.
2. Preparar CMC (Sigma) al 1% en agua. Dejar en agitación *overnight* y autoclavar.
3. Preparar un stock de PCA 500mM a pH5 (5X) (Tabla 29). Autoclavar. Diluimos con agua estéril para obtener PCA 100mM pH5 (1X).
4. Para realizar la doble capa en una placa Petri:
  - Capa de abajo: 15mL de YMA y dejar solidificar.
  - Capa de arriba: 5mL de CMC al 0.2% + 0.5% de agarosa (Seakem) en PCA 100mM pH5 (1X). Esta capa la añadimos sobre la capa de abajo solidificada y la dejamos solidificar.
5. Con un asa de 1 µL recoger células y realizar un punto en nuestra placa de doble capa; también se puede partir de una suspensión bacteriana y añadir 5 µL.
6. Incubar a 28 °C durante 3 días.
7. Pasados estos días, retirar con suavidad las células crecidas en la doble capa, con agua destilada y ayudándonos con un asa de siembra de plástico.
8. Teñir con una Solución de Rojo de Congo (Sigma) al 0.1% durante 30 minutos.
9. Realizar varios lavados con NaCl 1M hasta que se diferencien los halos que ponen de manifiesto la presencia de celulasa.
10. Fotografiar. (Para una mejor visualización de los halos dejar la placa a 4 °C *overnight*).

Todas estas soluciones, se deben realizar en frascos bien limpios. Es importante ajustar el pH para que ningún cambio pueda interferir en el resultado.

Tabla 29. Composición de la solución de PCA.

PCA 500mM (5X)	g/500mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac®)	43.55 g
Ácido cítrico (Sigma®)	52.50 g

\*Preparar el fosfato dipotásico en un frasco con 500 mL de agua. Por otro lado, preparamos el ácido cítrico en 200 mL de agua. Vamos añadiendo el ácido cítrico sobre la solución de fosfato dipotásico hasta que el reactivo esté a pH 5. Después enrasar la solución con agua hasta 1L.

#### 4.1.2 Obtención de extractos celulares por sonicación.

1. Inocular las cepas de interés en matraces con 30 mL de medio líquido (con antibiótico si fuese necesario) e incubar en agitación a 180 rpm y 28°C durante 3 días.
2. Verter el cultivo en tubos de 50 mL y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C.
3. Recoger un 1 mL del sobrenadante (Sb1) y descartar el resto.
4. Añadir 20 mL de agua estéril. Resuspender y repetir centrifugación.
5. Recoger un 1 mL del sobrenadante (Sb2) y descartar el resto.
6. Añadir 500 µL de agua estéril y pasarlo a un tubo tipo Eppendorf® de 2 mL.

7. Guardar todos los sobrenadantes a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, de esta manera se para la reacción y facilita el sonicado.
8. Poner las muestras en hielo y sonicar 5 veces cada muestra a 62 micrones durante 10 segundos.
9. Centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$  a 12.000 rpm durante 12 segundos.
10. Llevar el sobrenadante a nuevos tubos tipo Eppendorf® de 2 mL (Sb3).
11. Separar 100  $\mu\text{L}$  para el BCA y otros 100  $\mu\text{L}$  para los ensayos de doble capa y zimograma.
12. Todas las muestras las congelamos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , al igual que el pellet.

#### 4.1.3 Detección de actividad celulítica de los extractos celulares.

##### Ensayos en doble capa.

1. En una placa cuadrada grande,
  - Capa de abajo: 45 mL de agarosa al 0.7% en agua, calentar en el microondas, servir y dejar solidificar.
  - Capa de arriba: 15 mL de CMC al 0.2% + Agarosa al 0.5% en PCA 100 mM pH 5 (1X). Autoclavar. Añadir sobre la capa de abajo y dejar solidificar.
2. Poner 5  $\mu\text{L}$ , de cada uno de los Sobrenadantes del punto anterior. Y con un asa de 1  $\mu\text{L}$  inocular también el pellet.
3. Incubamos la placa a  $37^{\circ}\text{C}$  *overnight*.
4. Revelar la placa con Rojo Congo al 0.1% durante 30 min.
5. Lavar con NaCl 1M repetidas veces hasta ver los halos de hidrólisis enzimática, los cuales no se han teñido con el Rojo Congo.

#### 4.2 Método Bradford (Bio-Rad).

El protocolo Bio-Rad Protein Assay, que está basado en el método de Bradford, es el elegido para la determinación de la proteína total de los extractos celulares obtenidos. Es un ensayo colorimétrico simple y fiable para dicha determinación y puede ser realizado en placas microtiter de 96 pocillos, permitiendo realizar muchas medidas a la vez (Figura 13).

1. Preparar la solución de teñido diluyendo 1:5 el Dye Reagent con agua.
2. Preparar las muestras estándar para la curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA).  
Rango lineal: 0 (solo agua), 0.05, 0.1, 0.2, 0.35, 0.5 mg/mL.
3. Pipetear por triplicado 10  $\mu\text{L}$  de cada solución estándar y de las muestras a ensayar (Sb3). Dejar espacio entre las muestras.
4. Añadir 200  $\mu\text{L}$  del Dye Reagent diluido sobre las muestras y mezclar por pipeteo.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Medir absorbancia a 595 nm en el lector de placas (ASYS UVM340).
7. Con el valor de las medias de las absorbancias menos el valor de la absorbancia del blanco y con la recta patrón se genera una ecuación en el Excel con la que podremos determinar el valor mg/ml que tenemos que añadir de proteína.

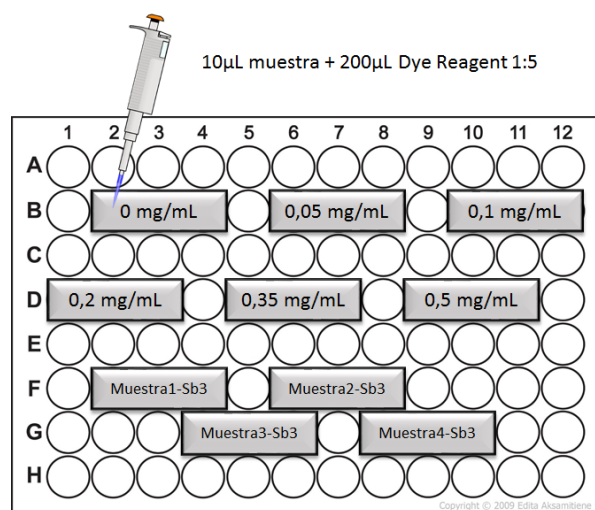


Fig. 13. Ejemplo del método Bradford realizado en una placa microtiter de 96 pocillos.

### 4.3 Electroforesis vertical de proteínas (SDS-PAGE).

Para separar las diferentes proteínas del extracto proteico y determinar sus pesos moleculares, se preparó una electroforesis vertical en condiciones no desnaturalizantes, para permitir la posterior re-naturalización y detección de la proteína (Mateos et al. 1992). Para esto, se siguió un método basado en el descrito por Laemmli (1970).

1. Preparar 50 ml de CMC 0,2%+0,5% agarosa en PCA 100mM pH5 (1X). Autoclavar. Dejar el stock a 4°C.
2. Lavar los cristales de 0,5 mm con agua y etanol, deben quedar bien limpios.
3. Comprobar la parte hidrofílica de la lámina Gel Bond® (añadimos agua y observamos la parte que repele el agua) y ponerla mirando hacia el cristal de 0,5 mm. Humedecer los bordes del cristal. Cubrir con el otro cristal y colocarlo en las pinzas y en el soporte (BioRad).
4. Fundir el gel y calentar ligeramente una pipeta Pasteur.
5. Introducir el gel líquido en la cavidad entre la lámina Gel Bond® y el cristal de 0,5mm evitando burbujas. Dejar solidificar.
6. Extraer con cuidado del soporte y retirar el cristal protector y la lámina, procurando no despegar el gel de dicha lámina. Guardar en film a 4°C hasta su uso.

\* Precaución, solidifica muy rápido. Preparar por duplicado.

#### 4.3.1 Preparación de geles de poliacrilamida.

1. Preparar previamente los tampones a utilizar en este apartado.
2. Limpiar bien los cristales de 0.75 mm y los cobertores con agua y etanol al 70%, aclarar con agua destilada y dejar secar. Asegurarse que los cristales ajusten bien abajo (Figura 14).



3. Preparar APS al 10%. Pesar entre 0.01 g y 0.02 g y añadir 100 µL de agua por cada 0.01g.
4. Para preparar el gel de separación (Tabla 30), añadir los reactivos en orden en un tubo de ensayo de 20 mL.

Tabla 30. Composición del gel de separación.

Gel de Separación 12%	Volumen
(1) Agua destilada	4.5 mL
(2) Tampón Tris-HCl 1.5M pH8.8	2.5 mL
(3) Acri/Bis 40% 37.5:1 (Bio Rad)*	3.0 mL
(4) APS* 10% (Ammonium Persulfate) (Bio Rad)	50 µL
(5) TEMED (Bio Rad)	10 µL

\*Acri/Bis, agitar bien antes de usar.

\*APS, prepararlo en el mismo día.

5. Con una pipeta Pasteur, resuspender bien todos los reactivos y añadirlo entre los dos cristales (Hasta la línea de puntos).
6. Enrasar con el butanol hasta el final del cristal (hace que el gel quede recto, para que todas las muestras partan de la misma altura)
7. Esperar a que solidifique (tomar como referencia el sobrante en el tubo)
8. Retirar el butanol y aclarar con agua. Secar con una tira de papel.
9. Para el gel de empaquetamiento (4%) (Tabla 31), se ponen los siguientes reactivos en un tubo de ensayo de 20 ml en orden.

Tabla 31. Composición del gel de empaquetamiento.

Gel de empaquetamiento (4%)	Volumen
(1) Agua destilada	3.25 ml
(2) Tampón Tris-HCl 0.5 M pH6.8	1.25 ml
(3) Acri/Bis 40% 37.5:1 (Bio Rad)	500 µL
(4) APS 10% (Bio Rad)	25 µL
(5) TEMED (Bio Rad)	10 µL

\*Acri/Bis, agitar bien antes de usar.

\*APS, prepararlo en el mismo día.

10. Añadir el gel encima del anterior y colocar los peines. Añadir más por los bordes. Dejar solidificar.
11. Retirar el peine y secar con papel.
12. Sacar las muestras sonicadas (Sb3) (previa cuantificación en el punto 4.2) y dejar descongelar sobre hielo.
13. Coger 15 µL en un tubo tipo Eppendorf® pequeño y añadir 3 µL de tampón de carga (Tabla 32).
14. Montar la cubeta. Colocar los cristales de manera que el cobertor quede mirando hacia dentro de la cubeta.

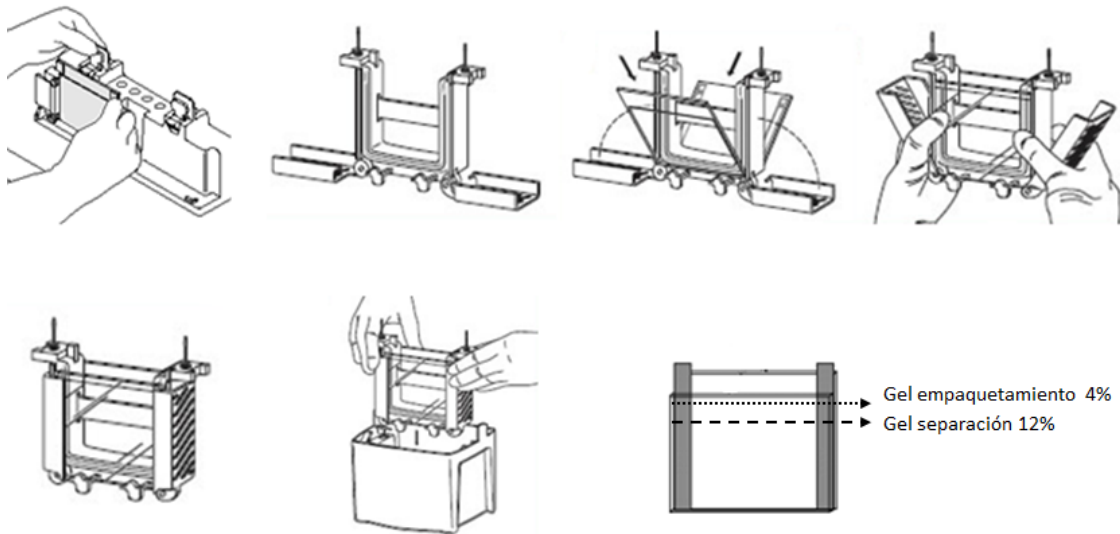


Fig. 14. Imagen que muestra el ensamblaje de los geles de poliacrilamida.

15. Empezar a llenar con tampón de cubeta (Tabla 33) el espacio que queda entre los dos cristales y comprobar que no se va. Llenar hasta arriba. Después llenar por el exterior hasta la marca de 2 geles, en este caso.
16. Cargar los 18  $\mu$ L de muestra, mejor dejar un carril libre entre ellas.
17. Cargar 3  $\mu$ L de marcador Precision Plus Protein (Bio Rad) en un carril libre para ello.
18. Correr la electroforesis a 200 V durante unos 45 min hasta que las muestras lleguen a un límite inferior.
19. Desmontar la cubeta y despegar el cobertor del gel. Retirar el gel de empaquetamiento y hacer una marca al lado contrario del marcador, para saber siempre la orientación de las muestras en el gel.
20. Con el objetivo de renaturalizar las proteínas contenidas en el gel, lo retiramos con cuidado del soporte y lo colocamos en tampón PCA 10 mM pH5. Seguidamente, lavamos el gel en agitación durante 2 horas, cambiando el tampón cada 30 min aproximadamente.
21. Incubamos la membrana (Gel Bond) y el gel resultante a modo de sandwich en una cámara húmeda a 37°C "overnight".
22. Al día siguiente, separar con cuidado el Gel Bond del gel de poliacrilamida.
23. El Gel Bond se tiñe en una solución de Rojo Congo al 0,1% durante 30 minutos. Lavar con NaCl 1M hasta que salga claro y dejarlo hasta el día siguiente a 4°C para fotografiar.
24. El gel de poliacrilamida se lleva a un baño de azul Coomassie (Bio Rad) durante una hora en balanceo. Retirar el líquido y añadir agua durante al menos 30 minutos. Guardar para fotografiar.

Tabla 32. Composición del Tampón de carga.

Tampón de carga	Volumen
SDS (Panreac) (5% en TrisHCl 0.5 M pH6.8)	5 ml
Glicerol (Panreac)	3 ml
Azul de bromofenol (0.5%) (Panreac)	200 $\mu$ l
Agua destilada	1.6 ml

Tabla 33. Composición del Tampón de cubeta.

Tampón de cubeta	g/l
Tris (hidroximetil) aminometano (Fluka)	3 g
Glicocola (BioRad)	14.4 g
SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)	0.5 g
Agua destilada (enrasar)	1 L

#### 4.4 Cuantificación de la actividad celulolítica. Valoración de grupos reductores o BCA.

La actividad celulolítica se cuantificó por valoración de los grupos reductores formados tras la hidrólisis de su sustrato. El procedimiento seguido se fundamenta en el método descrito por Waffenschmidt and Jaenicke (1987), modificado por (Mateos et al. 1992).

1. Poner un termoblock a 40 °C.
2. Preparar la mezcla de reacción BCA (Tabla 34).

Tabla 34. Composición de la mezcla de reacción para el BCA.

Mezcla de reacción	Volumen/muestra
Muestra sonicada (Sb3)	100 $\mu$ L
Muestra blanco, agua.	
CMC al 1% en agua	400 $\mu$ L
PCA 100 mM pH 5 (1X)	1100 $\mu$ L
TOTAL	1600 $\mu$ L

3. Repartimos 800  $\mu$ L de muestra a un tubo tipo Eppendorf® y guardamos a -80 °C. Estas serán nuestras muestras a tiempo 0 (t=0).
4. Los 800  $\mu$ L restantes, se pasan a tubos tipo Eppendorf® nuevos y los incubamos a 40 °C durante 5 horas y guardar -80 °C (t=5).

#### 4.5 Reacción de valoración de grupos reductores.

1. Preparación de reactivos A y B:

##### **Solución A**

Disolver 5.43 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Panreac) y 2.42 g  $\text{NaHCO}_3$  (Panreac) en 80 mL de agua destilada. Después enrasar a 100 mL con agua destilada. Calentamos la solución a 80 °C hasta que se disuelva y añadimos 216 mg de 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina (BCA, Sigma), agitar cada poco tiempo y dejar enfriar.

##### **Solución B**

Añadir 124 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Panreac) y 126 mg L-Serina (Sigma). Enrasar a 100 mL con agua destilada.

\*Conservar a 4°C máximo un mes y en ausencia de luz.

2. Poner el baño a 100°C y preparar tubos de tapón de rosca limpios y secos, 3 por cada muestra y tiempo (t=0 y t=5).
3. Prepara una mezcla 1:1 de las disoluciones A y B calculando 1mL por reacción.
4. Adicionar a cada tubo:
  - 800µL de agua destilada
  - 200 µL de la solución enzimática
  - 1mL de la solución A+B3 repeticiones cada muestra y tiempo. Cerrar bien y vortear.
5. Incubar 15 minutos en el baño de 100°C. Dejar que se enfríe a temperatura ambiente al menos 20 minutos.
6. Comprobar el color antes de medir. Si es muy oscuro (morado) diluir 1:1 con agua y cargar en placas de 96 pocillos y medir a 540 nm en el espectrofotómetro, no olvidando medir el blanco.
7. Extrapolar en una recta patrón de glucosa en concentraciones comprendidas entre 0.4 y 2.0 µg/mL, respecto a las que se cuantificó la actividad celulolítica.
8. Hacer media de las medidas de cada muestra y tiempo y restar el tiempo 0 del tiempo. Calcular:
  - Las unidades enzimáticas ( $U = \mu\text{g}$  de glucosa  $\times 1.48$ ).
  - Las unidades específicas ( $A = U/\text{mg}$  proteína) tenemos que dividir entre los mg de proteína cuantificados por el método de Bradford (apartado 4.2).

Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 nmol del azúcar reductor equivalente (glucosa) por minuto a 40°C y pH 5,0. La actividad enzimática específica se expresó como unidades enzimáticas por miligramo de proteína.

## 5. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

### 5.1 Western Blot.

Para confirmar y localizar la proteína CelC2 en el mutante heterólogo de la cepa CRZM5R, a la que se le había transferido el gen codificante para dicha proteína, se utilizó un anticuerpo previamente diseñado en nuestro laboratorio. Este anticuerpo se diseñó específicamente para una región conservada de dicha celulasa. La secuencia del péptido utilizado es SLHDKPRPAEGFDA (14 aminoácidos). Este péptido perteneciente a la celulasa CelC2, se envió a la empresa Inmunostep del Parque Científico de la Universidad de Salamanca, donde inocularon en un conejo el péptido diseñado para la producción del anticuerpo específico, después se purificó para su utilización.

#### 5.1.1 Preparación de muestras el Western.

1. Poner 15  $\mu\text{L}$  (previa cuantificación en el paso 4.2) de las muestras previamente sonicadas (a veces es necesario diluir con SDW, según la cantidad de proteína total) y 3  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (3X SDS Sample Buffer +DTT 1M, NEB).
2. Recordar añadir a las muestras el control positivo de la celulasa CelC purificada.
3. En el baño María, hervimos todas las muestras 10 minutos. Cargar los 18  $\mu\text{L}$ .
4. Cargar 5  $\mu\text{L}$  de standard de proteína (Precision Plus Protein™ All Blue *Prestained Standard*, Bio-Rad) (Figura 15).

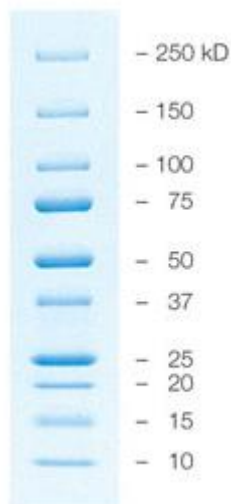


Fig. 15. Marcador de proteína (Precision Plus Protein™ All Blue *Prestained Estándar*, Bio-Rad)

5. Llenar con tampón de cubeta el espacio entre los dos cristales. Añadir también por encima de los pocillos y por los lados hasta que lleguen a la marca.
6. Poner a un voltaje constante de 200V durante 45 minutos aproximadamente.

### 5.1.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.

1. Desmontamos la cubeta y separamos los cristales cuidadosamente
2. Al retirar geles, diferenciarlos haciendo cortes en las esquinas (apuntar).
3. Ponemos los geles en unas cajas limpias cubiertos de tampón de transferencia y los dejamos 15 minutos en agitación.
4. Mientras, ponemos en una bandeja pequeña la membrana (que se encuentra entre dos filtros), entre las dos esponjas, y cubrimos con tampón de transferencia. Esperamos 15 minutos.
5. Después, montamos como indica la figura 16.

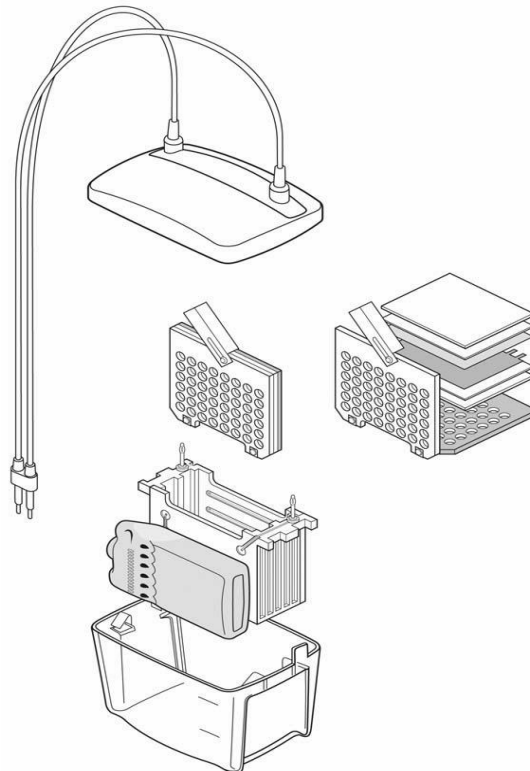


Fig. 16. Imagen que muestra el ensamblaje del sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad).

6. Ponemos en el fondo un imán agitador y en un lateral introducimos un bloque de hielo congelado para mantener la temperatura. (Si no, podemos realizar el proceso de transferencia a 4°C).
7. Llenamos el tanque con tampón de transferencia.
8. Transferir durante 1 hora a 100 V.
9. Mientras, preparamos el tampón de saturación (1% de leche descremada en polvo, Molibco-Sveltesse).
10. Pasada la hora, deshacemos el sándwich, cogemos las membranas, con una tijera las marcamos igual que el gel, las metemos individualmente en las cajas pequeñas, las cubrimos de Rojo Ponceau (Sigma) y las ponemos en agitación durante 10 minutos.
11. Retiramos el colorante y añadimos agua destilada hasta que visualicemos bien las bandas.

\*Opcional: Teñir los geles de poliacrilamida como está descrito en el apartado 4.3.1. Se va a transferir la gran mayoría y no habrá tinción en la mayor parte de los casos

12. Volvemos a poner las membranas en las cajas, añadimos el Tampón de Saturación y lo ponemos en agitación durante 10 minutos. (Tapamos con papel de aluminio, para mantener la oscuridad)
13. Retiramos el tampón, volvemos a añadir Tampón de Saturación y dejamos en agitación otros 20 minutos.
14. En el transcurso de los 20 minutos, preparamos el Tampón de Dilución (Es el Tampón de Saturación diluido en agua 1/3).
  - El anticuerpo que usaremos en este caso es CelC2-Peptido (citada previamente).
  - En un tubo de agua mezclamos 2ml del anticuerpo y 8 ml del Tampón de Dilución. (5ml por cada membrana).
15. Retiramos el tampón de Saturación de las membranas y añadimos lo preparado en el punto anterior.
16. Tapamos las cajas con film y con papel de aluminio. Lo dejamos en agitación "overnight".
17. A la mañana siguiente, lavamos la membrana 3 veces al menos 5 minutos cada vez, con una solución de lavado (0.05% de Tween20 en TBS) (Tabla 35).
18. Después de lavar las membranas, las incubamos con la solución de conjugado (anti-rabbit peroxidasa 1/500) durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.
19. En este tiempo preparamos la solución de Sustrato (Tabla 36).

Tabla 35. Composición del Tampón TBS

Tampón TBS	g/L
Tris 20mM	2.42
NaCl 500mm	29.22

\*Ajustar a pH 7.5 con HCl concentrado.

Tabla 36. Composición de la solución de sustrato.

Solución de Sustrato	2x
Solución A (agitar y mantener en oscuridad)	10 mL metanol 30 mg 4-chloro-naphthol (1 pastilla)
Solución B	50 mL TBS 30 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%

20. Lavamos las membranas con TBS, ahora sin Tween en agitación, 3 veces.
21. Añadimos la solución de sustrato ya mezclada y lo dejamos en agitación hasta que visualicemos las bandas.
22. Cuando aparezcan las bandas, cortamos la reacción añadiendo agua.
23. Dejamos secar en oscuridad y fotografiamos.

## 6. ENSAYOS EN PLANTA.

### 6.1 Desinfección y germinación de semillas.

Para realizar los ensayos que se describen en los siguientes apartados, las semillas seleccionadas se desinfectaron en superficie siguiendo los protocolos referidos en la tabla 37, todos ellos realizados en condiciones asépticas.

Tabla 37. Esterilizaciones realizadas a las semillas utilizadas en este trabajo.

Semillas	Protocolo Desinfección	Tiempo	Referencia
<b>Maíz</b> ( <i>Zea mays</i> )	Etanol (70%)	30 seg	Arruda et al. (2013) con modificaciones
	Hipoclorito sódico	20 min	
	Lavados con agua destilada estéril	5x	
<b>Rúcula</b> ( <i>Eruca sativa</i> )	Hipoclorito sódico (1%)	15 min	Ozdener and Kutbay 2009
	Lavados con agua destilada estéril	5x	
<b>Albahaca</b> ( <i>Ocimum basilicum</i> )	Etanol (70%)	30 seg	Heidari and Golpayegani (2012) con modificaciones
	Hipoclorito sódico (2.5%)	10 min	
	Lavados con agua destilada estéril	5x	
<b>Canónigos</b> ( <i>Valerianella locusta</i> )	Hipoclorito sódico + Tween 80	15 min	Kittipongpatana et al. 2002
	Lavados con agua destilada estéril	5x	
<b>Berros</b> ( <i>Nasturtium officinale</i> )	Etanol (70%)	30 seg	Park et al. 2011
	Hipoclorito sódico (2%)	10 min	
	Lavados con agua destilada estéril	5x	

Una vez desinfectadas las semillas, descartamos el agua y colocamos las semillas en placas con medio Agar-Agua al 1% (Tabla 38). Sellamos la placa con parafilm y la guardamos a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta que se observe germinación y el tamaño radicular sea el necesario para cada tipo de ensayo.

Tabla 38. Composición del medio Agar-Agua.

Medio Agar-Agua	g/l
Agar (Conda®)	20 g
Agua destilada	1 L



## 6.2 Inoculación de semillas en placa.

Para observar el efecto de las cepas seleccionadas en los primeros estadios de crecimiento de las diferentes semillas utilizadas en este estudio realizamos el siguiente ensayo.

1. Desinfectar las semillas.
2. Resembrar las cepas a inocular con el fin de que se encuentren en fase de crecimiento exponencial el día de la inoculación.
3. Preparar medio de Agar - Agua en placas cuadradas (10x10 cm).
4. Cortar la parte superior del medio, con el fin de dejar una cámara de aire para la parte aérea de la planta y colocar un papel de filtro (Resma) previamente esterilizado por tinalización para evitar el riesgo de posible esporas o microorganismos resistentes a altas temperaturas.
5. Colocar 3 semillas previamente pregerminadas por placa.
6. Inocular con 600  $\mu$ l/raíz de una suspensión de la cepa a ensayar a una D.O (600nm) de 0.6. Para ello se resuspende la cepa en unos 30 ml de agua destilada estéril, medir la solución en el espectrofotómetro (bioNova) y ajustar hasta la D.O requerida.  
\*Cuando se requiera un control negativo sin inocular se inocularán las raíces con 600  $\mu$ l de agua destilada estéril.
7. Colocar otro papel de filtro sobre las raíces, con el fin de que crezcan rectas entre los dos filtros.
8. Sellar las placas con parafilm perforado en la parte superior y la parte radicular se cubrió con un papel opaco a la luz, como si se tratara de un suelo artificial.
9. Mantener las placas en vertical en la cámara iluminada, a una temperatura de 24°C, un fotoperiodo de 16 horas de luz diarias, 8 horas de oscuridad y un 60% de humedad relativa.
10. A determinados días post-inoculación, se procedió a tomar los datos pertinentes de cada tipo de ensayo y fotografiar las plántulas obtenidas empleando una cámara digital compacta (Canon PowerShot G12, 10MP, 5x).

## 6.3 Inoculación de plantas en cámara iluminada.

Con el fin de observar el efecto promotor de las cepas seleccionadas en los primeros estadios del crecimiento de las plantas de maíz (*Zea mays* L.), se procedió a realizar un ensayo en cámara iluminada:

1. Desinfectar y germinar las semillas (descrito en punto 6.1).
2. Llenar con vermiculita estéril (por tinalización) 7 vasos de plástico de 1 L de capacidad por cada tratamiento.
3. Una vez germinadas las semillas, se trasplantaron 3 plántulas de maíz por vaso.
4. Inocular con 1 ml/raíz de una suspensión de la cepa a ensayar a una D.O (600nm) de 0.6.

## Materiales y Métodos

5. Para el control negativo y positivo inocular las semillas con raíces con 1 ml de agua destilada estéril.
6. Regar cada 4 días alternando solución de riego (Rigaud and Puppo 1975) (Tabla 39) y agua destilada estéril. La solución de riego llevará nitrógeno únicamente en el control positivo, para el control negativo y el resto de los tratamientos se usará dicha solución sin nitrógeno.
7. Una vez transcurridos los días estimados para el ensayo, se recogieron las plantas y se tomaron diferentes medidas.

Tabla 39. Composición de la solución de Rigaud y Puppo.

Solución Rigaud & Puppo	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.068 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.044 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.174 g
CaSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.120 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0.123 g
Secuestreno (Novartis®)	0.025 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (Sigma®)	0.00011 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.00285 g
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0.00307 g
ZnSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0.00055 g
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0.00002 g
*NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Prolabo®)	0.04 g
Agua destilada	1L

\*Solamente cuando se requiera nitrógeno en la solución de riego.

### 6.4 Inoculación de plantas en invernadero.

Para un mejor desarrollo de las plantas de maíz y las plantas hortícolas, se llevaron a cabo ensayos en el invernadero con temperatura y luz controlada para evitar situaciones de estrés para las plantas. Estos ensayos se realizaron en el Servicio de Invernadero del Parque Científico de la Universidad de Salamanca (PC-USAL), situado dentro de las inmediaciones del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

#### 6.4.1 Ensayo de plantas de maíz.

Para la realización de este ensayo, se seleccionó como sustrato suelo de la vega del río Tormes, ya que es un tipo de suelo similar al que se usará posteriormente en los ensayos de producción.

1. Desinfectar y germinar las semillas (descrito en punto 6.1).
2. Para los ensayos con maíz, utilizamos 12 macetas/tratamiento (5L de capacidad).
3. Para las plantas de albahaca, canónigos y berros se usaron alveolos, para los canónigos macetas de 3 L de capacidad, todos con una mezcla de sustrato de turba:vermiculita (3:1).

4. Una vez germinadas las semillas trasplantarlas a las macetas.
5. Pasados aproximadamente 7 días inocular con 1 ml/planta de una suspensión de la cepa a ensayar a una D.O (600nm) de 0.6.
6. Regar con agua cuando sea necesario.
7. Realizar las medidas periódicamente y cuando se estime retirar las plantas, realizando las medidas oportunas. Además, para obtener el peso seco de cada tratamiento, se realizó un proceso de secado en estufa (50°C) y posteriormente, dichas plantas fueron pesadas.

#### 6.4.2 Ensayo de plantas hortícolas.

1. Desinfectar y germinar las semillas (descrito en el apartado 6.1).
2. Para las plantas de albahaca y berros, se utilizaron alveolos; para las plantas de rúcula y canónigos se utilizaron macetas de 3 L de capacidad; en todos ellos se utilizó un sustrato de turba:vermiculita (3:1).
3. Una vez germinadas las semillas trasplantarlas a las macetas/alveolos.
4. Pasados aproximadamente 7 días inocular con 1 ml/planta de una suspensión de la cepa a ensayar a una D.O (600nm) de 0.6.
5. Regar con agua cuando sea necesario.
6. Realizar las medidas cada cierto tiempo; cuando se requiera sacar las plantas, realizar las medidas estimadas y fotografiar.
7. Además, para obtener el peso seco de cada tratamiento, se realizó un proceso de secado en estufa (50°C) y posteriormente, dichas plantas fueron pesadas.
8. Una vez secas, se trituraron por tratamientos, en el molinillo, y se enviaron al CEBAS-CSIC.

#### 6.4.3 Estudios de antibiosis en invernadero.

El ensayo se realizó en espacios del invernadero cedidos por el Centro de Diagnóstico Biológico de la Junta de Castilla y León en Aldearrubia (Salamanca), los cuales también nos cedieron los hongos fitopatógenos *Fusarium graminearum* y *Rhizoctonia solani*, utilizados en dicho ensayo.

1. Se recogió suelo agrícola, se repartió en macetas de 3 L y se puso una semilla germinada de maíz por maceta.
2. Pasados siete días, de la siembra de las semillas, se realizaron los inóculos correspondientes a las bacterias beneficiosas: *Rhizobium* y *Streptomyces*.
  - a. En el caso de las cepas de *Rhizobium*, se incubaron previamente 48 horas, en YMA, a 28°C.
  - b. En el caso de la cepa de *Streptomyces*, se incubaron siete días previos a la inoculación, en YMA a 28°C, con el fin de que estuviese esporulada.
3. A continuación, en el caso los *Rhizobium*, se recogieron células en agua destilada hasta alcanzar una D.O. 600nm de 0.6. En el caso de la cepa de *Streptomyces*, se realizó un inóculo del orden de 10<sup>9</sup>UFC/ml.
4. En ambos casos, se inoculó 1 ml de de cada inóculo sobre las plántulas de maíz.
5. Pasados 10 días se sacaron las plántulas de maíz, se lavaron con suavidad las raíces para eliminar los restos de tierra.

6. Para la preparación de los inóculos de hongos, se sembraron 6 placas de cada hongo en PDA a 25 °C durante 10 días, con el fin de que estuviesen esporulados.
7. Se retiró con ayuda de un cúter todo el agar con el hongo esporulado y se echó en un recipiente, a continuación se añadió agua destilada, se trituró todo con una batidora y se enrasó el volumen hasta 600 ml.
8. Las raíces se sumergieron en una suspensión de 10<sup>6</sup>/ml de *Fusarium graminearum* y de *Rhizoctonia solani* durante 5 minutos y se volvieron a plantar.
9. Se realizó una evaluación semanal de las plantas durante 6 semanas.
10. Al final el ensayo, se recogieron las hojas de maíz, se secaron y posteriormente se macharcaron con un mortero de cerámica y se pusieron a incubar sobre medio de Sabouraud-Cloranfenicol a 25 °C con el fin de comprobar el crecimiento de los hongos infectados.

### 6.5 Ensayos en plantas de *Zea mays* en campo.

Puesto que las condiciones de invernadero no nos permiten llegar a producción con las plantas de maíz se realizó un ensayo de campo para medir el posible incremento de producción en las mazorcas de maíz. Este ensayo se realizó en el municipio de Pino de Tormes (Salamanca).

Se utilizaron dos parcelas de 378m<sup>2</sup>, una fertilizada y otra sin fertilizar. Cada una de estas parcelas se subdividió en 15 parcelas de 6 m<sup>2</sup> cada una, dejando un espacio de 2m entre cada una de las subparcelas. Se realizaron tres repeticiones con cada tratamiento (Figura 17).

El tipo de semilla utilizada es Pioneer P0023 ciclo 300 (DuPont®). La siembra se realizó con una sembradora y el riego se realizó por aspersión Pivot. En el campo fertilizado se añadió previo a la inoculación, 1kg/Ha de fertilizante Entec®20+10+10 (20 N, 10 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 10 K<sub>2</sub>O). El agricultor sembró los maíces y cuando estaban germinados (15 días aproximadamente) se procedió a la inoculación.

1. Por cada tratamiento a inocular, sembrar 100 placas de en medio YMA, incubar a 28°C durante 5 días.
2. Pasado el tiempo de incubación, preparar un inóculo concentrado en un matraz de 800 ml de agua destilada estéril.
3. Por otro lado, preparar por cada tratamiento 10L de agua estéril (autoclavada).
4. Añadir el inóculo a la garrafa correspondiente el día de la inoculación. El inóculo final se ajusta a una concentración aproximada de 10<sup>8</sup> células/ml.
5. Antes de ir al campo a inocular, ir a delimitar todas las subparcelas y marcar con una estaca cada tratamiento.
6. Inocular aproximadamente, 1.6L de inóculo de cada uno de los tratamientos por subparcela.
7. Pasados unos 7 meses recoger 15 mazorcas de cada subparcela.
8. Realizar las medias estimadas y llevar a cabo el tratamiento estadístico de los resultados.

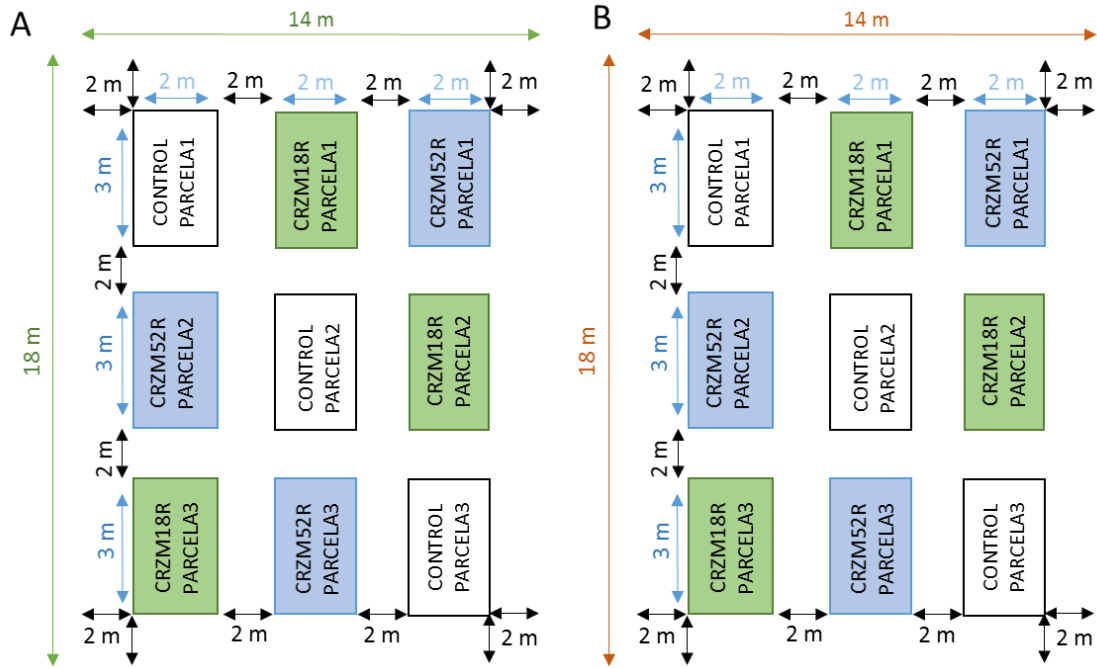


Fig. 17. Distribución realizada en el ensayo de campo. A) Campo sin fertilizar; B) Campo fertilizado.

## 6.6 Análisis de macro/microelementos.

Con el fin de determinar la composición mineral de muestras de suelos y materiales vegetales de este trabajo, se enviaron a analizar al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC. Se midieron entre otros macroelementos como C, N, P, K y S, y microelementos como Ca, Fe, Mg, Mn, Mo y Na.

### 6.6.1 Análisis del suelo.

En el ensayo realizado en campo, se recogieron tres réplicas del suelo sin fertilizar y tres del suelo fertilizado.

### 6.6.2 Análisis del material vegetal.

En los ensayos de plantas hortícolas, se recogieron las partes aéreas secas y se molieron para su posterior análisis. Por otra parte, en los ensayos de campo se recogieron los granos de maíz secos, se molieron y se analizaron. En todos los casos se enviaron las muestras por triplicado.

## 7. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.

### 7.1 Montaje de muestras para observación del microscopio.

#### 7.1.1 Observación de las células de una colonia al microscopio.

1. Se añade una gota de agua destilada sobre un portaobjetos seco y limpio.
2. Con el asa de siembra estéril se realiza una extensión.
3. Observar y fotografiar.
- 4.

#### 7.1.2 Para la observación de raíces al microscopio.

1. Se añaden unas gotas de agua destilada sobre un portaobjetos seco y limpio.
2. Se coloca una raíz previamente cortada con un bisturí estéril.
3. A continuación, se añade agua hasta cubrir totalmente la raíz y se coloca el cubreobjetos intentando que no queden burbujas.
4. Observar y fotografiar.

\*En los casos que se requiera un colorante de contraste para visualizar las posibles estructuras de la raíz, se añade Yoduro de Propidio a 10  $\mu$ M (Sigma) en lugar de agua destilada.

#### 7.1.3 Preparación cortes transversales de raíces.

1. Con ayuda de un bisturí estéril, cortamos aproximadamente 2 cm de la raíz a observar.
2. Cortamos también unos 2 cm de Médula de Saúco (Ventus®) y lo cortamos a la mitad (perpendicular a la base).
3. Con ayuda de unas pinzas, colocamos la muestra en el interior de una mitad del cilindro de Saúco y tapamos con la otra mitad.
4. Con la ayuda de una hoja de cuchilla, realizaremos secciones finas de la muestra montada en la medula de sauco en paralelo a la base.
5. Recoger el trozo de raíz que queda entre las dos partes del saúco y poner sobre un portaobjetos y proceder de la misma manera que en el apartado anterior.
6. Observar y fotografiar.

#### 7.1.4 Preparación de muestras para microscopía electrónica.

1. Con ayuda de un bisturí estéril, cortamos aproximadamente 1 cm de la raíz que queremos observar y lo metemos en un tubo tipo Eppendorf®.
2. Añadimos Solución de Fijación (glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato) hasta cubrir la raíz.
3. Introducimos los tubos con las raíces, en un desecador conectado a una bomba de vacío.

4. Hacemos vacío a las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente.

\*Al finalizar este paso se pueden dejar las muestras a 4 °C y seguir el protocolo al día siguiente.

5. Retirar la Solución de Fijación y realizar al menos 5 lavados con tampón fosfato 0.2 M pH 7.4 (Tabla 40), cada 30 minutos.

6. En este punto, entregamos las muestras al servicio de microscopia (Nucelus) sumergidas en dicho tampón y siguieron el procedimiento.
7. Postfijación en tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 con Sacarosa y Cloruro cálcico al 1% 1-1,5h. a 4 °C.
8. Lavado de 3 a 5 veces en tampón de lavado o con agua destilada.
9. Deshidratación con alcoholes o acetonas: 30x10, 50x10, 70x10.
10. Contraste en bloque con Acetato de Uranilo al 2% en acetona de 70 durante toda la noche.
11. Continuación de la deshidratación: 90x20, 100x20, acetona seca 2x30, óxido de propileno 2x15.
12. Inclusión en resina: 30 minutos en óxido de propileno+resina 3:1, 30 en óxido de propileno+resina 1:1, 30 en óxido de propileno+resina 1:3 y pasar a resina pura durante toda la noche.
13. Pasar a resina pura nueva 1h a 60 °C.
14. Pasar a resina pura nueva 30 minutos a 60 °C.
15. Pasar a las cápsulas y dejar toda la noche.
16. Polimerizar 48h a 60°C en el caso del Durcupan. La temperatura y el tiempo variará en función de la resina empleada
17. A continuación, cortan las muestras en semifino y posteriormente en ultrafino con un Ultramicrotomo (Leica EM UC7), dónde se incluyen en una rejilla para poder visualizar los cortes en el microscopio electrónico.

Tabla 40. Composición del tampón fosfato.

Tampón fosfato 0.2M pH 7.4	g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac)	5.56 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac)	14.34 g
Agua destilada	200 ml

\*Añadimos 19.0 ml de la Solución A y 81.0 ml de la Solución B y enrasamos a un volumen de 200 ml con agua destilada. Ajustamos el pH si fuese necesario.

## 7.2 Tipos de microscopía utilizada.

### 7.2.1 Microscopía óptica convencional.

La morfología de las bacterias fue examinada en un microscopio óptico (Leica FW400). Para la visualización de las colonias crecidas en el medio de cultivo se utilizó una lupa estereoscópica (Nikon SMZ800).

### 7.2.2 Microscopía óptica de fluorescencia.

El microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i), que además de óptico, es de fluorescencia. Por lo que poder visualizar mediante fluorescencia, se necesitan marcar las cepas, en nuestro caso utilizamos GFP y mCherry. También se utilizó para ver los ensayos de colonización e infección con dichas bacterias fluorescentes en las raíces en los primeros estadios de crecimiento.

### 7.2.3 Microscopía óptica confocal.

Se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SP2 en el Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) y Leica TCS SP5 en el caso del Centro de Investigación del Cáncer (CIC), ambos emplean una técnica óptica para construir imágenes tridimensionales. Las bacterias marcadas con la proteína GFP se excitaron a 488nm y el Yoduro de Propidio y las bacterias marcadas con mCherry se excitaron aproximadamente a 617 nm mediante un láser de Argón. Las proyecciones se llevaron a cabo tomando imágenes individuales aproximadamente cada 1-2  $\mu\text{m}$  y ajustándolos con el software del sistema LAS AF.

### 7.2.4 Microscopia electrónica de transmisión.

Se utilizó el microscopio electrónico de Transmisión Tecnai Spirit Twin 120 kv del servicio Nucleus de la USAL. La imagen se crea a través de un haz de electrones que atraviesa la muestra.

## 7.3 Cuantificación de la colonización en el interior de las raíces.

Con el fin de corroborar los datos observados mediante microscopía en el interior de las raíces, realizamos un conteo de bacterias. Realizaremos 3 siembras diferentes, las de la siembra 1 serán las bacterias que quedan adheridas superficialmente a las raíces, las de la siembra 2, son aquellas que están fuertemente adheridas a las raíces y la siembra 3 son aquellas que se encuentran colonizando el interior de la raíz.

1. Seleccionamos una raíz de cada tratamiento y la introducimos en un tubo Falcon® de 15 ml con agua destilada estéril y agitamos.
2. **Bacterias levemente adheridas a la raíz (Siembra nº1)**, recogemos 500  $\mu\text{l}$  del paso anterior y realizamos diluciones seriadas en tubos de agua con 4,5 ml. Siembro 100  $\mu\text{l}$  en medio YMA las diluciones y la muestra original del paso 1.
3. Cortamos 3 cm de la raíz de cada tratamiento, lo pesamos y posteriormente la introducimos en un tubo tipo Eppendorf® con 1ml de TE 1X a pH 7.4 (previamente autoclavado).
4. Sonicamos las muestras durante 1 min los tubos tipo Eppendorf® a temperatura ambiente.
5. Esperamos 1 minuto y repetimos el paso 4.
6. **Bacterias firmemente adheridas a la raíz (Siembra nº2)**, recogemos 500  $\mu\text{l}$  del paso anterior y realizamos diluciones seriadas en tubos de agua con 4,5 ml. Siembro 100  $\mu\text{l}$  en medio YMA las diluciones y la muestra original del paso 5.
7. Cogemos la raíz sonicada y la pasamos a un tubo tipo Eppendorf® nuevo.
8. Añadimos 1 ml de  $\text{HgCl}_2$  al 0.1% durante 2 minutos.
9. Realizamos 5 lavados con agua destilada estéril.
10. En una placa de medio YMA, realizamos una impresión de las raíces para comprobar la eficacia de la esterilización realizada a las raíces.
11. En un mortero previamente esterilizado, ponemos la raíz esterilizada, añadimos 1 ml de 1ml de TE 1X a pH 7.4 estéril y machacamos la raíz.



12. **Bacterias en el interior de la raíz (Siembra nº3)**, recogemos 500 µl del paso anterior y realizamos diluciones seriadas en tubos de agua con 4,5 ml. Siembro 100 µl en medio YMA las diluciones y la muestra original del paso 11.
13. Incubamos las placas de YMA a 28°C durante 48 horas.
14. Contamos las bacterias crecidas en cada dilución y calculamos las UFC/ml.

## 8. SOFTWARES UTILIZADOS.

Para evaluar los perfiles de RAPD obtenidos, se utilizó el programa Bionumerics (Applied Maths, Nv; EEUU). Desarrollando así, una matriz de similitud y construyendo un mapa escalado multidimensional. El coeficiente de correlación utilizado fue el de Pearson.

Para editar los fragmentos generados en la secuenciación, se utilizó el programa BioEdit 7.2.1 (Ibis Bioscience).

Para el ensamblaje de las secuencias de una misma cepa se utilizó el programa Seqman (DNAStar Software).

Para comparar las secuencias del 16S de las cepas tipo de cada especie, utilizando el servidor EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>; Yoon, S. H. et al. 2016).

Para realizar los árboles filogenéticos se utilizó el programa Mega5 (Tamura et al. 2011).

Para el diseño de primers se utilizó el programa Primer3 (Untergasser et al. 2012).

Para ensamblar las secuencias obtenidas en la secuenciación de los genomas se utilizó la herramienta Velvet (Zerbino and Birney 2008).

Para buscar los genes implicados en la producción de metabolitos secundarios se utilizó la herramienta antiSMASH (Medema et al. 2011).

Para enumerar los genes que codifican enzimas activas en carbohidratos (CAZY) se empleó el servidor web dbCAN (Yin et al. 2012).

Para el análisis de los genomas se utilizó el programa RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Overbeek et al. 2013).

Para realizar el análisis y procesamiento de los datos, se utilizó el programa Excel (Microsoft).

Para el tratamiento estadístico de los datos, se realizó un análisis de la varianza y se calcularon las diferencias significativas mediante el test de Fisher (Steel and Torrie 1980), utilizando el programa Statview (Abacus Corporation).

Para incluir citas en el presente trabajo se utilizó el gestor bibliográfico Mendeley (Zaugg et al. 2011).

## Materiales y Métodos

Para la visualización de ácidos nucleicos se utilizó el Gel Doc EZ System (BioRad) y su edición se realizó mediante el software Quantity One (BioRad).

Las imágenes se realizaron con la cámara digital compacta (Canon PowerShot G12, 10MP, 5x).

La edición de las fotos se realizó con el programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe). Las imágenes realizadas en microscopía confocal fueron editadas con el software Leica LCS Suite.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



***Estudio de la biodiversidad bacteriana  
en raíz y tallo de Zea mays***

**Capítulo I**



## 1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS AISLADAS.

El maíz es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial y también uno de los cultivos más importantes en los regadíos de Castilla y León. El grano de maíz, se utiliza en alimentación humana y animal, siendo uno de los principales productos contribuyentes a la dieta alimenticia mundial. Además, las plantas de maíz secas se pueden aprovechar en la alimentación de rumiantes. Por otra parte, el maíz también es utilizado para la generación de materias primas industriales como la fabricación del bioetanol. Debido a su adaptabilidad a diferentes suelos y condiciones climáticas su uso tanto en los países en desarrollo como desarrollados, está en aumento (MAPAMA, 2017).

Puesto que para producir un alto rendimiento en la mayoría de los cultivos no leguminosas, es necesario aplicar fertilizantes minerales al suelo, se produce un desequilibrio en los ecosistemas naturales que conllevan elevados costes (Arruda et al. 2013).

Con el fin de evitar pérdidas económicas importantes y paliar los impactos ambientales generados, estudiaremos si existen microorganismos capaces de incrementar el crecimiento de las plantas y/o disminuir así las cantidades de fertilizantes requeridos.

Por estos motivos, se recolectaron plantas de maíz con aspecto sano y con la raíz en buenas condiciones, en la localidad salmantina de Ciudad Rodrigo en Castilla y León (Figura 18). El suelo donde se recolectaron era franco arenoso y con un pH neutro (pH 7), donde los cultivos de este cereal habían sido recurrentes.



Fig. 18. A) Mapa de España en el que se señala la localidad (Ciudad Rodrigo) en la que se realizó el muestreo. B) Coordenadas del lugar exacto de muestreo (40°34'55"N 6°31'56"W). Fuente: GoogleMaps/Instituto Geográfico Nacional.

A partir de raíces y tallos de *Zea mays* se aislaron y seleccionaron en medio YMA colonias con diversas formas, tamaños, texturas y colores (Figura 19A). A partir de dichas colonias, se realizaron aislamientos por agotamiento en estría hasta obtener cultivos puros (Figura 19B).

Finalmente, se obtuvieron 68 cepas de microorganismos endófitos. La nomenclatura que recibieron las cepas fue CRZM seguido de un número de ordenación y de la procedencia según fuese de la raíz o el tallo, respectivamente R y T.

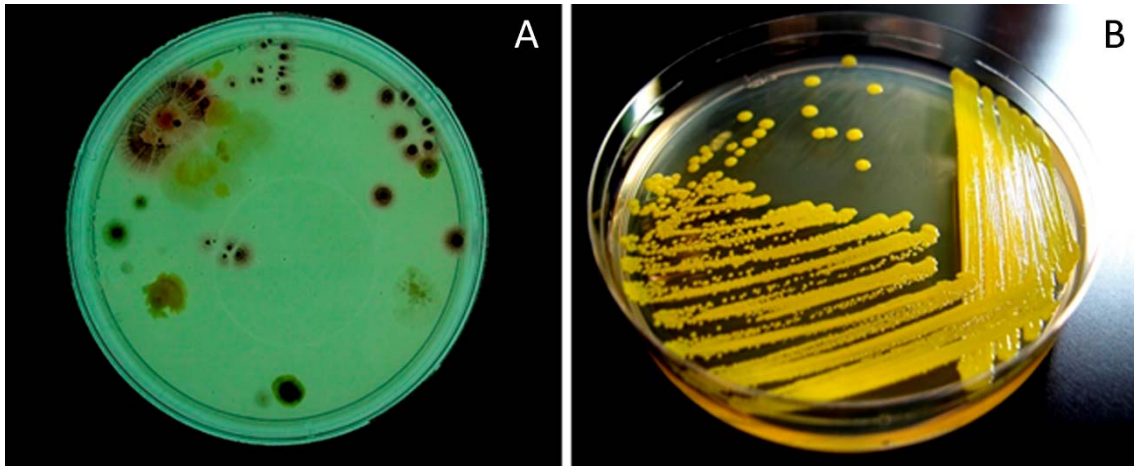


Fig. 19. A) Morfología que presentaban los aislados inicialmente en medio YMA y B) aislamiento por agotamiento en estría de una cepa.

Con la ayuda de la lupa estereoscópica se pudo observar con mayor precisión la morfología de las colonias, quedando patente la alta diversidad morfológica encontrada (Figura 20).

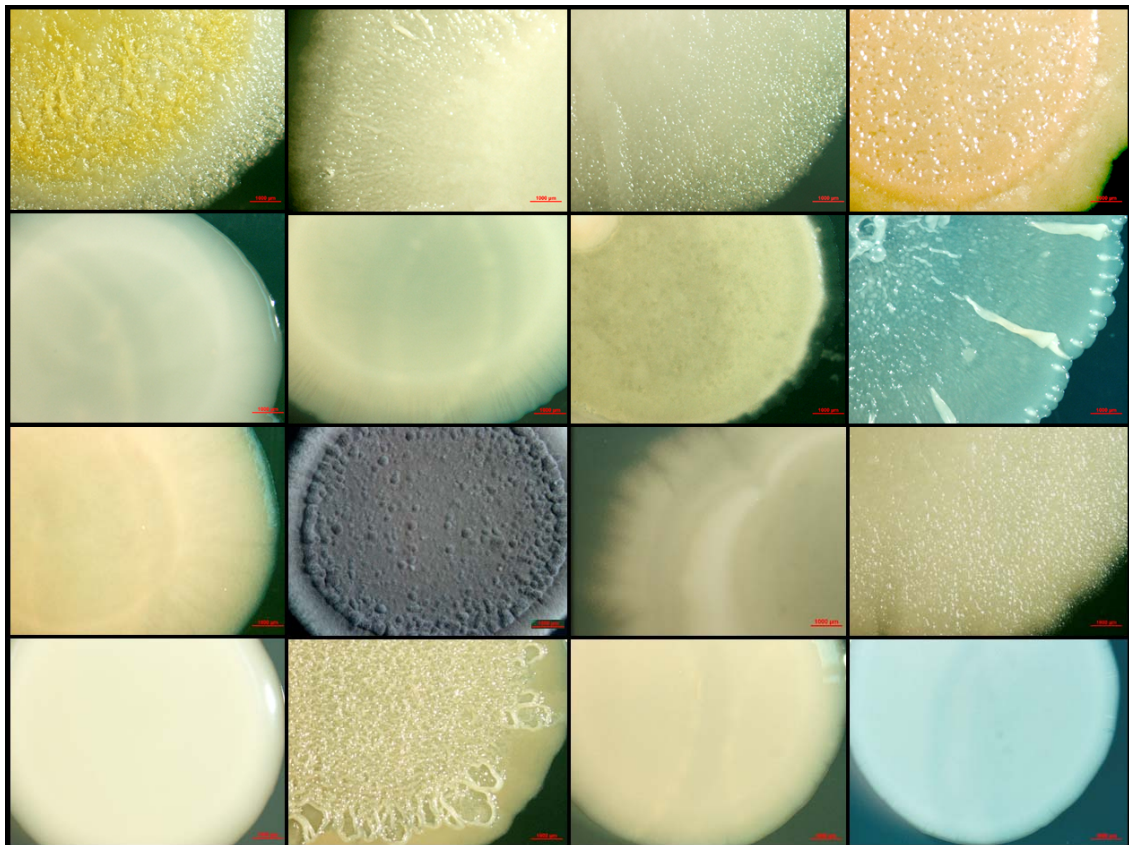


Fig. 20. Diferentes morfologías que presentaban algunas colonias observadas a la lupa estereoscópica.



## 2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS.

### 2.1 Microscopía y tinción de gram.

La morfología celular se observó al microscopio óptico, mediante tinción de Gram. Las bacterias pueden dividirse básicamente en Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram negativas tienen una pared celular formada por una fina capa de peptidoglucano (polímero de N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4) y una membrana exterior de naturaleza fosfolipídica. Las bacterias Gram positivas tienen una pared celular formada por una gruesa capa de peptidoglucano. Clásicamente, éste ha sido un método esencial para la caracterización microscópica de las bacterias ya que el cristal violeta queda retenido en las paredes celulares de las bacterias Gram positivas dándoles una coloración azul oscuro o violeta, mientras que en el caso de las Gram negativas no queda retenido y son teñidas por la safranina que les confiere un color rosado (Figura 21).

Se aislaron un total de 68 bacterias endófitas de la planta de maíz, 10 cepas se aislaron del tallo y 58 cepas de la raíz. De los aislados, 30 cepas eran Gram negativas y 38 cepas eran Gram positivas (Tabla 41).

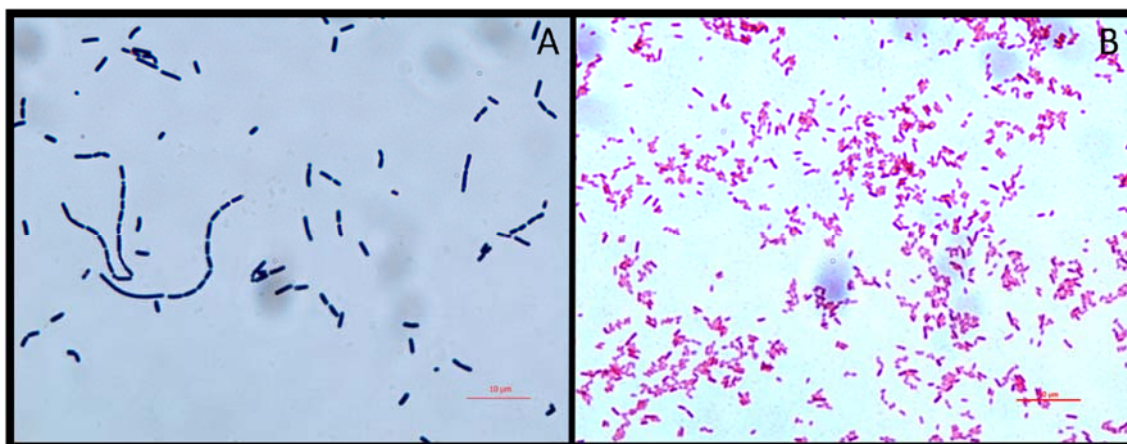


Fig. 21. A) Cepa CRZM 31T (Gram positiva) vista al microscopio tras ser teñidas con la tinción de Gram; B) Cepa CRZM 26R (Gram negativa) vista al microscopio tras ser teñidas con la tinción de Gram.

### 2.2 Estudio del crecimiento de los aislados sometidos a diferentes estreses.

Una vez comprobada la amplia morfología existente entre las cepas aisladas en este estudio, procedimos a realizar una caracterización fenotípica relacionada con su tolerancia a distintos factores de crecimiento, en concreto los parámetros estudiados fueron: salinidad, temperatura y pH (Tabla 41).

### 2.2.1 Salinidad.

La presencia de NaCl en el medio influye en el equilibrio osmótico de las células. Hay microorganismos que requieren presencia de Na<sup>+</sup> para sobrevivir, pero la concentración que tolerarán dependerá de su capacidad de sintetizar solutos compatibles que se almacenarán en el citoplasma para conseguir un equilibrio osmótico y evitar la deshidratación.

Todos los aislados de este estudio eran capaces de crecer sin necesidad de añadir NaCl al medio. Cuando se incrementó la salinidad al 0.5% de NaCl, todas las cepas del estudio excepto una (CRZM52R) crecieron a dicha concentración y tres de ellas lo hicieron de manera débil (CRZM22R, CRZM36T, CRZM84R). Cuando se incrementó la salinidad a un 1% las cepas que anteriormente crecieron de manera débil con esta concentración no se obtuvo crecimiento, al igual que la cepa CRZM87R que tampoco creció; se observó un crecimiento débil en 4 cepas (CRZM90R, CRZM92R, CRZM107R, CRZM149R) y el resto de las cepas crecieron a dicha concentración. A una concentración de salinidad del 2% nueve de las cepas no fueron capaces de crecer (CRZM22R, CRZM36T, CRZM52R, CRZM84R, CRZM86R, CRZM87R, CRZM92R, CRZM98R, CRZM107R) mientras que dos cepas lo hicieron de manera débil (CRZM90R, CRZM149R); el resto de las cepas crecieron a esta concentración. Finalmente, a una concentración del 5% de NaCl, 19 de las cepas del estudio no crecieron en este medio, el resto creció a dicho porcentaje.

El 54,4% de las cepas crecieron a todas las concentraciones de salinidad probadas, lo que indica que estas cepas tienen una gran adaptabilidad a la salinidad.

### 2.2.2 Temperatura.

La temperatura es un factor de enorme importancia para los microorganismos. Debido a su relación superficie/volumen, no es posible mantener una temperatura intracelular diferente a la del medio externo y, en consecuencia, los microorganismos capaces de crecer a temperaturas extremas tienen sistemas metabólicos adaptados a esas condiciones de temperatura.

Todas las cepas fueron capaces de crecer a 28°C. A una temperatura de 37°C el 95,6% de las cepas crecieron también, aunque la morfología presentada era irregular; excepto tres de las cepas que crecieron de manera débil (CRZM18R, CRZM52R, CRZM98R) y cuatro de ellas no fueron capaces de crecer (CRZM22R, CRZM87R, CRZM126T, CRZM149R). A una temperatura de 50°C el 47% de las cepas de este estudio crecieron a dicha temperatura presentando un crecimiento masivo, el 16% de las cepas crecieron de manera débil y el 37% no crecieron. A 4 °C el 53% de las cepas no lograron crecer a esta temperatura; el 32% lo hizo de manera débil y únicamente el 15% de las cepas pudieron crecer a esta temperatura.

El 19,1% de las cepas fue capaz de crecer en todo el rango de temperatura probado (4°C - 50°C), lo que indica que tienen capacidad de adaptación a ambientes con diferentes temperaturas.

### 2.2.3 pH.

Las condiciones de pH del medio externo también son críticas para el crecimiento de los microorganismos pero, al contrario de lo que ocurre con la temperatura, el pH intracelular debe mantenerse dentro de unos límites bastante estrechos ya que, fuera de unos rangos de pH adecuados, el microorganismo muere.

Normalmente, el pH intracelular es ligeramente superior al medio que rodea las células, ya que en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplasmática. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6.0 a 8.0 (Madigan et al. 2015).

Por tanto, los microorganismos capaces de crecer en condiciones de pH extremos, tienen que disponer de mecanismos que les permitan mantener el pH intracelular en el rango adecuado, lo que supone un alto coste energético para la célula.

El 100% de las cepas fue capaz de crecer a pH 7. A un pH básico de 9 todas las cepas salvo cuatro crecieron (CRZM43R, CRZM52R, CRZM84R, CRZM87R) a dicho pH. A un pH ácido de 4.5, el 77.9% de las cepas fueron capaces de crecer mientras que el 22.1% de las cepas no crecieron. La bajada de pH se puede deber a varios factores uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético y/o láctico, entre otros) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos (Madigan et al. 2015).

Tabla 41. Resultados obtenidos de la tinción Gram (positivo, +; negativo, -) y del crecimiento de las cepas del estudio en medios con diferentes concentraciones de salinidad, diversas temperaturas y pH. (++) Crecimiento fuerte; (+) Crecimiento; (d) Crecimiento débil; (-) Sin crecimiento.

	Gram	Salinidad				Temperatura					pH		
		0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl	5% NaCl	4°C	10°C	28°C	37°C	50°C	pH4,5	pH7	pH9
CRZM 01R	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 02R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 03R	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 04R	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 06R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 09R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 13R	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+
CRZM 18R	-	+	+	+	-	-	d	+	d	d	-	+	+
CRZM 21R	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 22R	+	d	-	-	-	-	-	d	-	-	+	+	+
CRZM 23R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
CRZM 25R	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 26R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 27R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+

Tabla 41. Continuación.

CRZM 28R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 30R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
CRZM 31T	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+
CRZM 36T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 39R	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 42R	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 43R	+	+	+	+	d	-	-	+	+	+	+	+	-
CRZM 46T	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 47T	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+
CRZM 51R	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 52R	-	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	+	-
CRZM 55R	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 56R	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+
CRZM 57R	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 58R	+	+	+	+	d	d	+	+	+	-	-	+	+
CRZM 59R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	d
CRZM 60R	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 62R	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 65R	-	+	+	+	+	-	+	+	+	d	+	+	+
CRZM 72R	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+
CRZM 74T	-	+	+	+	+	-	+	+	+	d	+	+	+
CRZM 77R	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 79R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 81R	-	+	+	+	d	-	-	+	+	-	-	+	+
CRZM 84R	+	d	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
CRZM 86R	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
CRZM 87R	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
CRZM 89R	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CRZM 90R	+	+	d	d	d	-	-	+	+	+	d	+	+
CRZM 91R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 92R	-	+	d	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
CRZM 94T	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 96R	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 97R	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 98R	+	+	+	-	-	-	+	+	d	-	+	++	++
CRZM 99R	+	+	+	+	d	d	d	+	+	-	d	+	+
CRZM 100R	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	d	+	+
CRZM 101R	+	+	+	+	d	-	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 102R	-	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	+	+
CRZM 103R	-	+	+	+	+	d	+	+	+	d	+	+	+
CRZM 107R	-	+	d	-	-	-	d	+	+	-	+	+	+
CRZM 111R	+	+	+	+	-	d	+	+	+	-	-	+	+
CRZM 118R	+	+	+	+	-	d	-	+	+	d	d	+	+
CRZM 122R	-	+	+	+	d	-	d	+	+	-	+	+	+
CRZM 125T	+	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+

Tabla 41. Continuación.

CRZM 126T	-	+	+	+	d	d	d	+	-	-	d	+	+
CRZM 129R	+	+	+	+	d	d	d	+	+	d	+	+	+
CRZM 133T	+	+	+	+	d	d	d	+	+	d	-	+	d
CRZM 135R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 139R	-	+	+	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+
CRZM 145T	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-	-	+	+
CRZM 147R	+	+	+	+	+	d	d	+	+	d	+	+	+
CRZM 149R	+	+	d	d	-	-	-	+	-	d	+	+	+
CRZM 155R	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+

En general, se observó que las cepas aisladas tienen una gran adaptabilidad genética y metabólica a diferentes factores ambientales probados, ya que el 22,1% eran capaces de crecer a todas las concentraciones de salinidad, temperatura y pH probadas. Esta gran adaptación de dichas cepas al medio podría conferirle una ventaja selectiva frente a otros competidores que se encuentren en la rizosfera, ya que la microbiota relativa a un hospedador para sobrevivir, tiene que adaptarse a factores ambientales como la temperatura, la radiación UV, la disponibilidad de agua y la biogeografía a la que se encuentre el hospedador (Müller et al. 2016).

### 2.3 Resistencia a Antibióticos.

El espectro de resistencia natural a antibióticos es una prueba habitual en la caracterización de microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, ya que da una idea de la evolución conjunta de diversas especies microbianas que comparten el mismo hábitat.

La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo, lo que les puede conferir ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso en que ese antibiótico esté presente. Por otra parte, la resistencia a antibióticos puede ser adquirida, ya que se puede producir a través de mutaciones o por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias (Fernández Riverón et al. 2003).

Como se puede observar en la tabla 42, el 50% de los aislados fueron resistentes a tetraciclina (5 mg/ml), porcentaje que aumentó al 62% cuando se duplicó la concentración del antibiótico (10 mg/ml). En el caso de la Kanamicina a las concentraciones sucesivas de 20, 50, 100 y 200 mg/ml las cepas fueron resistentes en un 48.9, 35.3, 26.5 y 11.8%, respectivamente. A una concentración de ampicilina 200 mg/ml, el 45.6% mostraron resistencia. A una concentración de gentamicina de 10 mg/ml, el 36.8% fueron resistentes mientras que a una concentración de 50 mg/ml únicamente fueron resistentes el 13.2%. El 64.7% de las cepas crecieron cuando la concentración de apramicina fue 50 mg/ml. A una concentración de estreptomycinina 50 mg/ml, el 70.6% de las cepas fueron resistentes, mientras que a una concentración de 200 mg/ml fueron resistentes sólo el 27.9%; similares valores se obtuvieron con espectinomycinina 50 mg/ml a la que fueron resistentes el 67.6% de las cepas mientras que a una concentración de 200 mg/ml las cepas resistentes fueron el 32.4%; a una concentración de 10 mg/ml de trimetroprima, el porcentaje de cepas resistentes fue del 60.3%.

Los antibióticos a los que las cepas se mostraron más sensibles fueron Kanamicina 100 mg/ml, Kanamicina 200 mg/ml, Gentamicina 50 mg/ml, Estreptomina 200 mg/ml, ya que la aplicación de dichos antibióticos hicieron que el 70% de los aislados no crecieran en su presencia.

Aunque se utilizan diversos métodos experimentales para el estudio de la evolución de las poblaciones microbianas, no se desestiman análisis de antibióticos, pH y limitación de nutrientes, entre otros, debido a su gran utilidad para caracterización de cepas (Struelens et al. 2001). En nuestro trabajo, observamos que las cepas analizadas tienen una gran variabilidad en cuanto a las respuestas producidas cuando son expuestas a diferentes antibióticos y diferentes concentraciones de las mismas. Por tanto, podemos suponer que existe una alta diversidad infraespecífica.

Tabla 42. Resultados obtenidos del crecimiento de las cepas del estudio en medios con diferentes antibióticos y concentraciones de los mismos. (++) Fuerte resistencia; (+) Resistencia; (d) Sensibilidad débil; (-) Sensibilidad.

	<i>Resistencia a antibióticos</i>														
	Tetraciclina5	Tetraciclina10	Kanamicina20	Kanamicina50	Kanamicina100	Kanamicina200	Ampicilina200	Gentamicina10	Gentamicina50	Apramicina50	Etreptomina50	Estreptomina200	Espectinomicina50	Espectinomicina200	Trimetroprima10
CRZM 01R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 02R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CRZM 03R	+	+	+	d	d	-	+	d	-	d	+	-	+	-	+
CRZM 04R	+	+	-	-	-	-	+	d	-	-	+	+	+	d	+
CRZM 06R	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	d	-	-
CRZM 09R	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	d	-	d	-	d
CRZM 13R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CRZM 18R	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	+
CRZM 21R	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	d	+
CRZM 22R	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CRZM 23R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CRZM 25R	+	+	d	d	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
CRZM 26R	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 27R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CRZM 28R	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	d	-
CRZM 30R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
CRZM 31T	+	+	+	d	d	-	+	d	d	d	+	-	+	d	+
CRZM 36T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 39R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	d	-	+	d	+
CRZM 42R	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d	d	+	+	-
CRZM 43R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+
CRZM 46T	-	-	+	+	d	-	-	d	-	+	d	-	d	d	-
CRZM 47T	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	d	-	-	-	-
CRZM 51R	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	d	-	+

Tabla 42. Continuación.

CRZM 52R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 55R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
CRZM 56R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CRZM 57R	+	+	+	+	d	-	+	d	-	d	+	d	+	+
CRZM 58R	-	-	+	d	d	-	-	d	-	+	d	-	d	-
CRZM 59R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 60R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	d	-	+	-
CRZM 62R	+	+	+	+	d	-	+	d	-	d	+	d	+	+
CRZM 65R	+	+	d	d	-	-	+	d	-	-	+	d	+	d
CRZM 72R	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	d	-
CRZM 74T	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 77R	+	d	d	-	-	-	+	-	-	-	d	-	d	-
CRZM 79R	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
CRZM 81R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CRZM 84R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
CRZM 86R	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 87R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 89R	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
CRZM 90R	+	+	+	+	+	d	+	+	d	+	d	d	d	d
CRZM 91R	+	+	+	d	d	d	+	+	-	d	+	-	+	+
CRZM 92R	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
CRZM 94T	-	-	+	+	d	-	-	+	-	+	d	d	d	-
CRZM 96R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 97R	+	d	-	-	-	-	+	-	-	-	d	-	d	-
CRZM 98R	++	++	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	d	-
CRZM 99R	+	d	+	+	+	d	+	+	d	+	d	d	d	d
CRZM 100R	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CRZM 101R	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 102R	+	+	+	+	d	-	+	d	-	d	+	d	+	d
CRZM 103R	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 107R	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 111R	-	-	+	+	d	-	-	d	-	+	d	-	d	-
CRZM 118R	d	-	+	+	d	-	-	d	d	+	d	-	d	-
CRZM 122R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 125T	+	+	+	+	+	d	-	+	d	+	+	+	+	d
CRZM 126T	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	d	-	d	-
CRZM 129R	+	d	+	+	+	d	-	+	d	+	+	+	+	d
CRZM 133T	d	d	+	+	-	d	-	+	d	+	+	+	+	+
CRZM 135R	+	d	d	-	-	-	+	-	-	-	d	-	d	d
CRZM 139R	+	+	-	-	-	-	+	d	-	-	+	d	+	d
CRZM 145T	-	-	+	+	d	-	-	+	-	+	d	d	d	-
CRZM 147R	+	d	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	d
CRZM 149R	-	-	d	d	-	-	+	-	-	d	-	-	-	-
CRZM 155R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

## 2.4 Producción de exoenzimas.

La caracterización bioquímica de los aislados se completó con un ensayo de utilización de 32 sustratos unidos a p-nitrofenol, que actúa como indicador cromogénico de la hidrólisis enzimática. La hidrólisis de dichos sustratos por las distintas cepas del estudio se muestra en la tabla 43.

La mayoría de los sustratos ensayados fueron los que combinan un azúcar con el p-nitrofenol debido a que son éstos los que están disponibles comercialmente y son hidrolizados por enzimas de naturaleza glicosidásica. Todos los aislados del estudio mostraron, en general, una importante actividad glicosidasa.

El sustrato PNP-Acetato fue hidrolizado por todos los aislados, al contrario del sustrato PNP-N-Hidroxisuccinimida que no fue hidrolizado por ningún aislado.

Los sustratos que fueron hidrolizados por más del 50% de los aislados fueron PNP-N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosamina (70,6%), PNP- $\alpha$ -L-Arabinopiranosido (75,0%), PNP- $\beta$ -D-Celobiósido (66,2%), PNP-Fosfato (pH.5) (54,4%), PNP-Fosfato (pH.7) (77,9%), PNP-Fosfato (pH.8,5) (89,7%), PNP-Bis-Fosfato (pH.7) (88,2%), PNP-Bis-Fosfato (pH.8,5) (92,6%), PNP- $\beta$ -D-Fucopiranosido (66,2%), PNP- $\alpha$ -D-Galactopiranosido (80,9%), PNP- $\alpha$ -D-Glucopiranosido (72,1%), PNP- $\beta$ -D-Glucopiranosido (79,4%), PNP- $\alpha$ -D-Maltósido (57,4%), PNP- $\beta$ -D-Maltósido (60,3%), PNP- $\beta$ -D-Manopiranosido (52,9%) y PNP- $\beta$ -D-Xilopiranosido (66,2%). Los demás sustratos fueron asimilados por debajo de este porcentaje.

Los resultados obtenidos en la degradación de sustratos derivados del p-nitrofenol por parte de las cepas, corroboraron la gran variabilidad existente entre ellas, puesto que los resultados fueron muy dispares.

Sin embargo, los resultados obtenidos en las cepas del género *Rhizobium* fueron esenciales para determinar la descripción de la nueva especie, por lo que estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en diversas especies de rhizobia que han mostrado la utilidad de algunos de ellos en la delimitación de especies (Velázquez and Martínez-Romero 2001; Velázquez et al. 2001b; Valverde and Velázquez 2005; Valverde et al. 2006; Zurdo-Pineiro and Rivas 2007; Ramírez-Bahena 2008).

Estos resultados corroboraron la gran variabilidad existente entre ellas, puesto que los resultados fueron muy dispares.

Sin embargo, los resultados obtenidos en las cepas del género *Rhizobium* fueron esenciales para determinar la descripción de la nueva especie, por lo que estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en diversas especies de rhizobia que han mostrado la utilidad de algunos de ellos en la delimitación de especies (Velázquez and Martínez-Romero 2001; Velázquez et al. 2001b; Valverde and Velázquez 2005; Valverde et al. 2006; Zurdo-Pineiro and Rivas 2007; Ramírez-Bahena 2008).



Tabla 43. Resultados obtenidos del crecimiento de las cepas del estudio en contacto con diferentes exoenzimas. (+) Resistencia; (d) Sensibilidad débil; (-) Sensibilidad.

Producción de exoenzimas																																				
	PNP-Acetato	PNP-N-Hidroxisuccinimida	PNP-N-Acetil-β-D-Galactosamina	PNP-N-Acetil-β-D-Glucosamina	PNP-α-L-Arabinopiranosido	PNP-β-L-L-Arabinopiranosido	PNP-β-D-Celobiosido	PNP-Fenilalalina	PNP-Fosfato (pH.5)	PNP-Fosfato (pH.7)	PNP-Fosfato (pH.8,5)	PNP-Bis-Fosfato (pH.7)	PNP-Bis-Fosfato (pH.8,5)	PNP-Nitrofenil-fosforicolina	PNP-α-L-Fucopiranosido	PNP-β-D-Fucopiranosido	PNP-α-D-Galactopiranosido	PNP-β-D-Galactopiranosido	PNP-β-D-Galacturonido	PNP-α-D-Glucopiranosido	PNP-β-D-Glucopiranosido	PNP-β-D-Glucurónido	PNP-β-D-Lactósido	PNP-α-D-Maltósido	PNP-β-D-Maltósido	PNP-α-D-Manopiranosido	PNP-β-D-Manopiranosido	PNP-α-L-Ramnopiranosido	PNP-Sulfato	PNP-Tio β-D-glucopiranosido	PNP-α-D-Xilopiranosido	PNP-β-D-Xilopiranosido				
CRZM 01R	+	-	+	+	d	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-	-	-	+			
CRZM 02R	+	-	-	+	d	+	+	-	-	d	+	+	+	-	-	+	+	d	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CRZM 03R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	d	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+		
CRZM 04R	+	-	+	+	+	-	-	d	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	
CRZM 06R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	D	-	d	+	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
CRZM 09R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	+	+	-	-	d	d	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
CRZM 13R	+	-	+	+	+	+	+	-	-	d	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	
CRZM 18R	+	-	+	+	+	-	+	-	d	d	+	+	+	-	-	+	d	+	-	+	+	-	-	+	+	-	d	-	d	-	-	-	-	-	+	
CRZM 21R	+	-	-	+	-	-	-	-	-	d	d	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CRZM 22R	+	-	-	+	d	+	-	-	-	-	-	-	d	-	d	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
CRZM 23R	+	-	-	+	d	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 25R	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 26R	+	-	-	+	-	-	-	-	-	d	+	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 27R	+	-	d	+	+	-	-	-	d	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 28R	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 30R	+	-	d	+	d	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 43. Continuación.

CRZM 31T	+	-	-	+	+	-	+	d	+	d	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	d	-	-	-	-	+
CRZM 36T	+	-	d	d	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 39R	+	-	-	+	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CRZM 42R	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRZM 43R	+	-	-	d	d	d	-	-	d	d	+	+	+	-	-	-	d	-	-	+	+	-	-	+	d	-	-	-
CRZM 46T	+	-	d	+	+	+	+	-	-	-	d	-	d	-	+	+	+	-	d	+	+	+	-	+	+	+	-	+
CRZM 47T	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CRZM 51R	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CRZM 52R	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	d	d	+	+	-
CRZM 55R	+	-	-	-	+	d	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
CRZM 56R	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
CRZM 57R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	d	+	-	-	+	+	-	-	d	+	-	+	-
CRZM 58R	+	-	-	-	+	d	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CRZM 59R	+	-	-	d	+	-	+	-	-	d	+	+	+	-	-	d	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
CRZM 60R	+	-	-	+	-	-	+	-	d	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CRZM 62R	+	-	-	d	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
CRZM 65R	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
CRZM 72R	+	-	d	+	d	d	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
CRZM 74T	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	-	+	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+	+
CRZM 77R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	+	+	-	-	d	d	-	+	-	-	-	+	-
CRZM 79R	+	-	d	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+
CRZM 81R	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
CRZM 84R	+	-	+	d	+	d	+	-	-	-	+	d	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
CRZM 86R	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-
CRZM 87R	+	-	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CRZM 89R	+	-	-	d	d	-	-	-	+	+	d	-	d	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 43. Continuación.

CRZM 90R	+	-	d	+	+	-	+	-	d	d	d	-	d	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+		
CRZM 91R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	
CRZM 92R	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	d	
CRZM 94T	+	-	d	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	d	+	+	+	d	+	+	+	-	+	-	-	+	+	
CRZM 96R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	
CRZM 97R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	d	d	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
CRZM 98R	+	-	-	+	-	-	-	-	d	d	-	+	+	-	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	
CRZM 99R	+	-	-	-	+	+	+	-	d	-	-	-	-	-	d	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	
CRZM 100R	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	
CRZM 101R	+	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	d	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
CRZM 102R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	d	+	-	-	+	+	-	d	d	+	d	+	-	-	d	-	+	
CRZM 103R	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
CRZM 107R	+	-	-	-	-	-	-	+	d	d	+	+	+	+	-	d	+	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CRZM 111R	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
CRZM 118R	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
CRZM 122R	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CRZM 125T	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	d	d	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	d	+	-	+	-	+	
CRZM 126T	+	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+	d	+	-	-	d	d	-	-	+	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	
CRZM 129R	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	d	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
CRZM 133T	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	d	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	d	-	+	
CRZM 135R	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	+	+	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
CRZM 139R	+	-	-	-	-	-	+	-	+	d	+	d	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	d	+	-	-	-	-	d	-	d	+
CRZM 145T	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
CRZM 147R	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	d	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
CRZM 149R	+	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	+	d	d	-	-	+	-	-	d	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
CRZM 155R	+	-	+	+	+	-	d	-	d	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	d	-	-	-	-	+	

### 3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.

#### 3.1 Análisis de la diversidad mediante perfiles RAPD.

El análisis de perfiles de RAPD (Radom Amplified Polymorfic DNA) destaca entre las técnicas utilizadas actualmente para el análisis de la diversidad genética bacteriana como una de las más útiles, ya que nos permite estudiar genomas complejos sin un conocimiento previo de los mismos. La utilización de un solo primer (Mulcahy et al. 1993) puede ser suficiente para analizar la variabilidad entre cepas como ocurre en el caso de los perfiles de RAPD que se obtienen utilizando un primer de longitud corta que anilla a bajas temperaturas, como por ejemplo el primer M13 (Williams et al. 1990).

Estos perfiles se han utilizado para el estudio de la diversidad dentro de poblaciones de distintos organismos (Mulcahy et al. 1993; Stêpniak et al. 2002; Graham and Vance 2003) y fueron usados por primera vez por Williams et al. 1990 para examinar muestras de DNA humano. Desde entonces, han sido utilizados en numerosos estudios para analizar la biodiversidad bacteriana infraespecífica ya que se ha demostrado que distintos perfiles de RAPD pueden corresponder a cepas que pertenecen a la misma especie (Alves-Santos and Ramos 2002). Estudios recientes que han utilizado esta técnica en sus estudios son Martín and Miera (2014) que caracterizaron por RAPD distintos aislados de *Vitis vinifera*; además, Dubey et al. (2014) utilizaron esta tecnica para caracterizar bacterias que degradasen celulosa. Saxena et al. (2014) también emplearon la técnica de RAPD para realizar un screening de bacterias aisladas de suelo y Pereira et al. (2016) utilizaron dicha técnica para caracterizar aislados de raíces y tallos de *Lavandula dentata*. Otras técnicas como el BOX-PCR, han sido utilizados por diversos autores para agrupar aislados de arroz (Loaces et al. (2011), de maíz (Ikeda et al. 2013) y de trigo (Yang et al. 2011), entre otros.

En nuestro caso, empleamos el primer M13, formado por 15pb y que permite amplificar diversas regiones de ADN en condiciones poco restrictivas. De esta manera, obtenemos fragmentos de ADN de distinto tamaño en función de las variaciones de las secuencias de nucleótidos de las zonas donde se haga efectiva la unión, derivando así en la ausencia y presencia de las diferentes bandas en los perfiles. Posteriormente, se realizó un análisis de los perfiles obtenidos para los 68 aislados utilizando el programa Bionumerics con el cual, aplicando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento UPGMA, se obtuvo el dendrograma que se observa en la figura 22. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la alta diversidad de cepas aisladas del interior del maíz, lo que confirma la utilidad de los análisis de los perfiles de RAPD para la investigación de la biodiversidad de cepas, como se ha mostrado en numerosos trabajos.

Sin embargo, estas técnicas de agrupación de aislados presentan limitaciones, ya que no proporcionan información filogenética sobre la composición bacteriana de la comunidad. Además, el análisis de datos los datos es complicado, puesto que exhiben numerosas bandas de diferentes intensidades. Por lo que finalmente Ranjard et al. (2000) plantean que la utilidad de estas técnicas depende del tipo de comunidad estudiada.

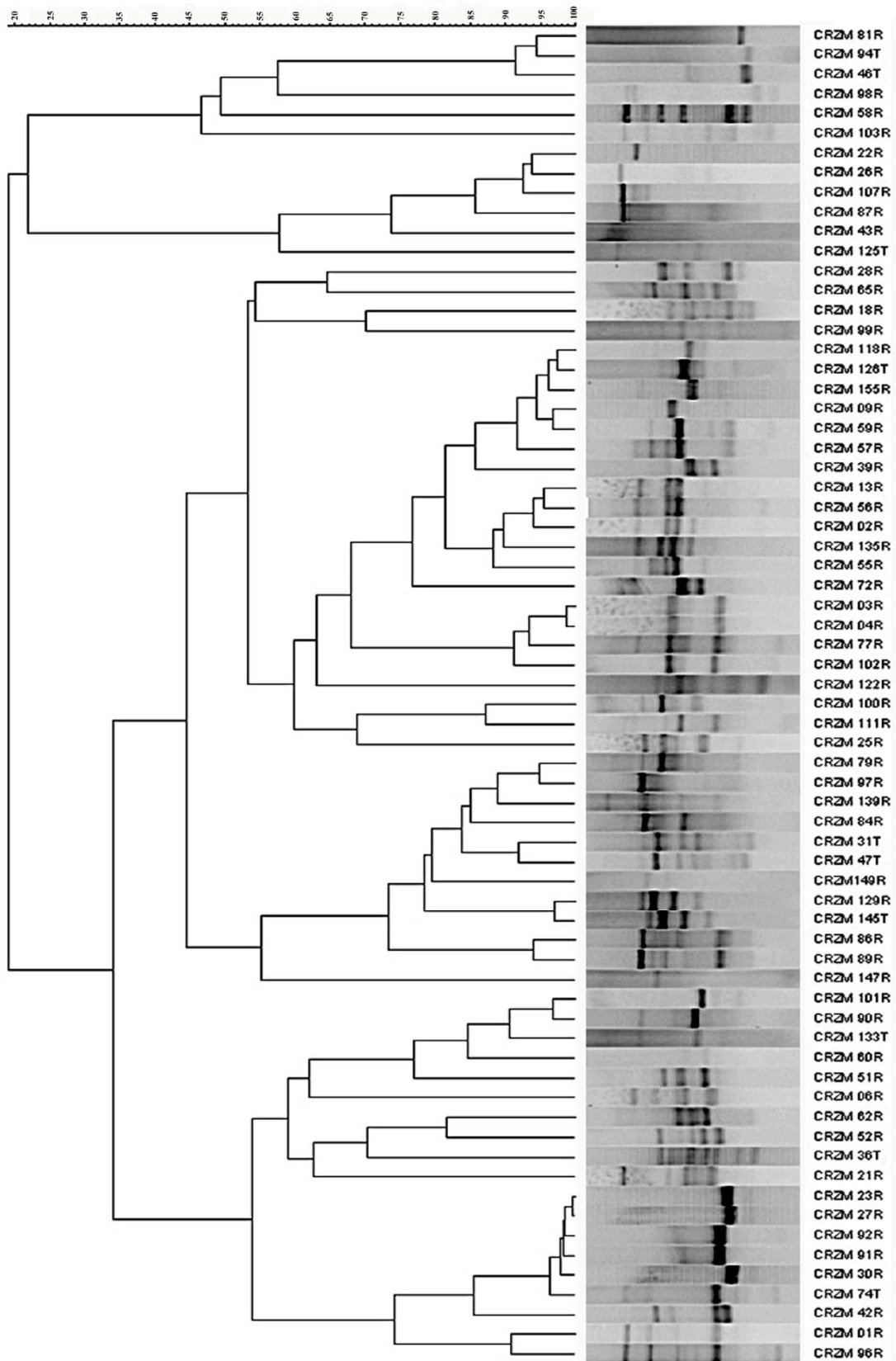


Fig. 22. Dendrograma de las cepas analizadas por M13-RAPD basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson. La línea de puntos roja indica el porcentaje estimado para determinar los grupos.

Por lo que, en el análisis de la biodiversidad de las cepas de nuestro estudio, los perfiles RAPD, no nos supone una óptima herramienta para agrupar las cepas a niveles taxonómicos por lo que se llevó a cabo la secuenciación y análisis del gen ribosómico 16S.

### 3.2 Análisis de secuencias del gen ARN ribosómico del 16S.

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre bacterias. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio and Mendoza 2004).

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970 (Woese and Fox 1977).

Por tanto, debido a la gran diversidad encontrada en la caracterización genotípica se decidió secuenciar el gen ribosómico 16S de todas las cepas aisladas para una mayor fiabilidad de los resultados ya que las cepas eran bastante heterogéneas entre sí. Se secuenció este gen en cada uno de los aislados, obteniéndose secuencias de alrededor de 1500 nucleótidos.

Las secuencias pertenecientes a las bacterias se compararon con las secuencias de los genes ribosómicos 16S de todas las cepas tipo depositadas en las bases de datos públicas a través del servidor EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>; Yoon et al. 2016). En total se analizaron 68 secuencias correspondientes a los aislados, presentado los porcentajes de similitud a las especies tipo más próxima obtenidos en la tabla 44. Todos los valores de similitud se encontraban en un rango de 96 - 100%.

La secuenciación y comparación de la secuencia completa del gen ARNr 16S sirve entre otras cosas para identificar y diferenciar taxones, establecer diferencias entre cepas y para describir nuevas especies y/o géneros. Por lo general, para la descripción de nuevas especies, se admiten diferencias en el porcentaje de similitud en la secuencia nucleotídica de este gen de entre un 97 y un 99% entre el aislado y la cepa tipo de especie. Sin embargo, para que estas diferencias sean válidas para la descripción de un nuevo taxón deben realizarse distintas pruebas y análisis, dependiendo del grupo taxonómico al que pertenezcan, como por ejemplo, características fenotípicas, secuenciación de genes *housekeeping*, hibridación DNA-DNA o determinación de ácidos grasos, entre otros (Kuykendall et al. 2015).

En nuestro grupo de investigación, se han realizado numerosos estudios sobre la implicación de miembros del género *Rhizobium* en la mejora del desarrollo de diversos cultivos con interés agro-económico, como por ejemplo, tomate y pepino (García-Fraile et al 2012), lechuga y zanahoria (Flores-Felix et al 2013), alubia (Diez-Mendez et al 2016) o fresa (Flores-Felix et al., 2016), entre otros. Además, ha sido descrito como un género bacteriano seguro para la salud humana, siendo numerosas de las cepas que componen sus diferentes especies susceptibles de ser utilizadas como biofertilizantes (García-Fraile et al. 2012). En este sentido, decidimos continuar este trabajo caracterizando los aislados pertenecientes a dicho género.

Como podemos ver en la tabla 44, la cepa CRZM 52R, es la única cepa de *Rhizobium* que mostró una similitud del 100% como la cepa tipo *R. leucaenae* USDA 9039<sup>T</sup>. La cepa CRZM87R, muestra una similitud con *R. lusitanum* P1-7<sup>T</sup> del 98,8%; las cepas CRZM91R y CRZM92R mostraron una similitud del 99,9% y 99,7%, respectivamente. La cepa CRZM18R, mostró un 98,3% de similitud con la cepa tipo *R. cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. Debido a que esta última tiene un bajo porcentaje de similitud en comparación con la cepa tipo de la especie más próxima, decidimos profundizar en su estudio y/o caracterización taxonómica para comprobar si este aislado constituía una especie nueva del género *Rhizobium*. Además de estos aislados que pueden asignarse al género *Rhizobium*, encontramos otros posibles candidatos a constituir nuevas especies de su género o incluso otro género diferente, debido a su baja similitud de secuencia con las cepas tipo correspondiente, por ejemplo CRZM21R, CRZM22R, CRZM36T y CRZM126T. Estos resultados abren la posibilidad de futuros estudios para clasificar taxonómicamente dichos aislados.

Tabla 44. Similitud de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de este estudio aisladas del interior del maíz comparadas con las especies tipo depositadas en las bases de datos públicas (<http://www.ezbiocloud.net/>).

Cepa	Especie tipo más próxima	Similitud
CRZM 01R	<i>Pantoea allii</i> LMG 24248 <sup>T</sup>	100
CRZM 02R	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>T</sup>	99,7
CRZM 03R	<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 <sup>T</sup>	100
CRZM 04R	<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 <sup>T</sup>	100
CRZM 06R	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> KRED <sup>T</sup>	100
CRZM 09R	<i>Enterobacter ludwigii</i> EN-119 <sup>T</sup>	99,7
CRZM 13R	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>T</sup>	100
CRZM 18R	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup>	98,3
CRZM 21R	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162 <sup>T</sup>	96,2
CRZM 22R	<i>Kitasatospora saccharophila</i> SK15 <sup>T</sup>	96,7
CRZM 23R	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 <sup>T</sup>	100
CRZM 25R	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> DS-1 <sup>T</sup>	99,8
CRZM 26R	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 <sup>T</sup>	100
CRZM 27R	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 28R	<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 <sup>T</sup>	100
CRZM 30R	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 31T	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b <sup>T</sup>	100
CRZM 36T	<i>Massilia kyonggiensis</i> TSA1 <sup>T</sup>	98,9
CRZM 39R	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 <sup>T</sup>	100
CRZM 42R	<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 <sup>T</sup>	100
CRZM 43R	<i>Streptomyces lannensis</i> TA4-8 <sup>T</sup>	99,4
CRZM 46T	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 <sup>T</sup>	100
CRZM 47T	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b <sup>T</sup>	100
CRZM 51R	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 <sup>T</sup>	100
CRZM 52R	<i>Rhizobium leucaenae</i> USDA 9039 <sup>T</sup>	100
CRZM 55R	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>T</sup>	100
CRZM 56R	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>T</sup>	100
CRZM 57R	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>T</sup>	100
CRZM 58R	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3 <sup>T</sup>	100

Tabla 44. Continuación.

CRZM 59R	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 <sup>T</sup>	100
CRZM 60R	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 62R	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	100
CRZM 65R	<i>Pseudomonas moraviensis</i> CCM 7280 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 72R	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 <sup>T</sup>	100
CRZM 74T	<i>Pantoea allii</i> LMG 24248 <sup>T</sup>	100
CRZM 77R	<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 <sup>T</sup>	100
CRZM 79R	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> DS-1 <sup>T</sup>	100
CRZM 81R	<i>Brevundimonas intermedia</i> ATCC 15262 <sup>T</sup>	100
CRZM 84R	<i>Paenibacillus phyllosphaerae</i> PALXIL04 <sup>T</sup>	99,2
CRZM 86R	<i>Burkholderia caledonica</i> NBRC 102488 <sup>T</sup>	100
CRZM 87R	<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 <sup>T</sup>	98,8
CRZM 89R	<i>Burkholderia graminis</i> C4D1M <sup>T</sup>	99,7
CRZM 90R	<i>Leifsonia soli</i> TG-S248 <sup>T</sup>	100
CRZM 91R	<i>Rhizobium alamii</i> GBV016 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 92R	<i>Rhizobium alamii</i> GBV016 <sup>T</sup>	99,7
CRZM 94T	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 <sup>T</sup>	100
CRZM 96R	<i>Pantoea allii</i> LMG 24248 <sup>T</sup>	100
CRZM 97R	<i>Pseudomonas mediterranea</i> CFBP 5447 <sup>T</sup>	100
CRZM 98R	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513 <sup>T</sup>	99,4
CRZM 99R	<i>Herbiconiux ginsengi</i> DSM19088 <sup>T</sup>	99,6
CRZM 100R	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> DS-1 <sup>T</sup>	99,7
CRZM 101R	<i>Paenibacillus chondroitinus</i> DSM 5051 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 102R	<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 <sup>T</sup>	100
CRZM 103R	<i>Pantoea allii</i> LMG 24248 <sup>T</sup>	100
CRZM 107R	<i>Burkholderia caledonica</i> NBRC 102488 <sup>T</sup>	100
CRZM 111R	<i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651 <sup>T</sup>	100
CRZM 118R	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> DSM 8608 <sup>T</sup>	100
CRZM 122R	<i>Pantoea eucrina</i> LMG 2781 <sup>T</sup>	100
CRZM 125T	<i>Microbacterium arborescens</i> DSM 20754 <sup>T</sup>	100
CRZM 126T	<i>Sphingomonas desiccabilis</i> CP1D <sup>T</sup>	98,1
CRZM 129R	<i>Microbacterium testaceum</i> DSM 20166 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 133T	<i>Agrococcus citreus</i> IAM 15145 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 135R	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 <sup>T</sup>	100
CRZM 139R	<i>Pseudomonas moraviensis</i> CCM 7280 <sup>T</sup>	100
CRZM 145T	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> DSM 20419 <sup>T</sup>	99,9
CRZM 147R	<i>Curtobacterium citreum</i> DSM 20528 <sup>T</sup>	100
CRZM 149R	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> NBRC 15440 <sup>T</sup>	100
CRZM 155R	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> NCIB 3610 <sup>T</sup>	100

Un total de 68 bacterias endófitas fueron aisladas del interior de la raíz y el tallo del maíz, que gracias a la secuenciación del 16S, pudimos asignar a 3 phyla diferentes: Proteobacteria (44%;  $\alpha$ -Proteobacteria (10%)  $\beta$ -Proteobacteria (6%),  $\gamma$ -Proteobacteria (28%)), Firmicutes (34%) y Actinobacteria (22%).



Dentro de esos phyla, los aislados pueden ser asignados a 22 géneros y 45 especies diferentes, lo que corrobora lo obtenido en las pruebas de caracterización genotípica (RAPD), es decir, obtuvimos una alta diversidad de endófitos bacterianos del interior de ambas zonas de la planta de maíz. Como podemos ver en la figura 23, los géneros más comunes son *Bacillus* (22,1%), *Pseudomonas* (11,8%), *Paenibacillus* (10,3%), *Pantoea* (7,4%) y *Rhizobium* (7,4%).

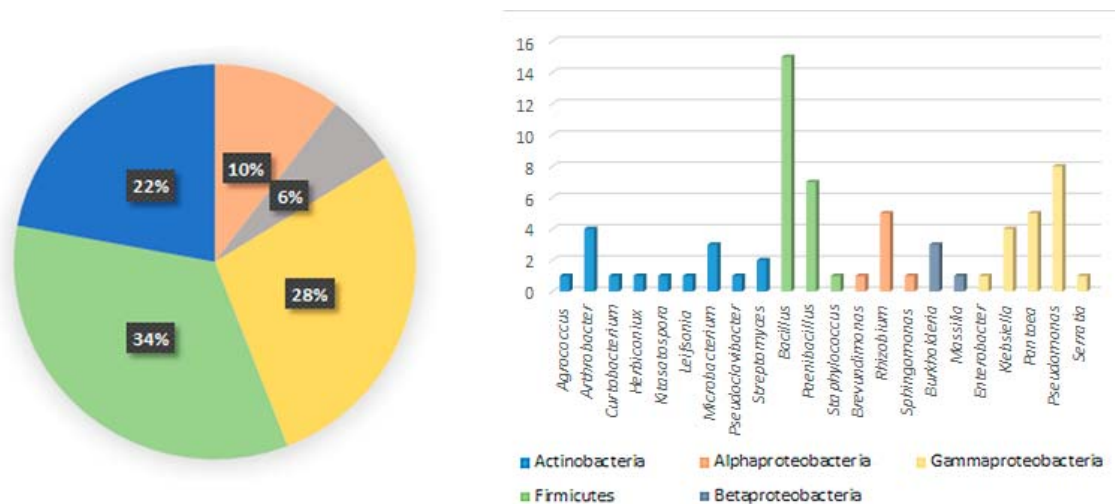


Fig. 23. Gráficos que muestran la distribución por géneros de los aislados.

Con las secuencias obtenidas, se realizó un análisis filogenético, cuyo resultado gráfico se muestra en las figuras 24 y 25, aplicando el método de Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p. Este análisis de las secuencias se realizó para conocer la relación de las cepas con respecto a la cepa tipo más próxima. Este proceso se lleva a cabo utilizando el programa informático Mega 5.0 (Tamura et al. 2011) con el que se calculó la distancia evolutiva y se construyeron los árboles filogenéticos.

Por tanto, encontramos que en la raíz existía una gran cantidad y diversidad de especies, mayor con respecto al tallo, ya que el 85,3% de las especies aisladas en este estudio pertenecían a ésta parte de la planta. En el tallo se encontró una menor diversidad, solamente un 14,7% de las especies se encontraban en esta zona. Estos datos concuerdan con los resultados de aislados en maíz (Pereira and Castro 2014; Rodríguez-Blanco et al. 2015), en caña de azúcar (Pariona-Llanos and Ferrara 2010), en *Solanum nigrum* (Luo et al. 2011) y en *Thlaspi goesingense* (Idris et al. 2004).

Esta diferencia se puede deber a que la población de microorganismos es mayor en la rizosfera de la plantas hospedadora que en el interior de estas, ya que los microorganismos se sienten atraídos por los exudados radiculares que proporcionan un ambiente rico en carbono (Chen et al. 2003). Debido al contacto íntimo que las raíces de las plantas establecen con el suelo mediante el crecimiento y el desarrollo, propician la entrada de algunas bacterias a los tejidos radiculares (Kobayashi and Palumbo 2000). Por otro lado, los endófitos son capaces de persistir más tiempo en las raíces que en los órganos aéreos de las plantas (Junior et al. 2000) y además, la migración de los microorganismos ocurre lentamente de las raíces a los tallos y hojas (Liu et al. 2006).

Además, pudimos observar que cuatro géneros fueron identificados en común en las raíces y en los tallos, estos fueron *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* y *Pantoea*. Estas han sido descritas previamente por diferentes cualidades, el género *Arthrobacter* ha sido descrito

como un potencial promotor del crecimiento vegetal (Morrissey et al. 1976; Chelius and Triplett 2000; Banerjee et al. 2010). Por otra parte, algunas cepas de *Bacillus* se han descrito como endófitas en plantas superiores (Li et al. 2012; White et al. 2014) y además han mostrado capacidad para promover el crecimiento de algunas plantas (Wang et al. 2009; White et al. 2014). Aunque la aparición de cepas de *Microbacterium* como endófitos no ha sido ampliamente estudiada, los datos actuales sugieren que este microorganismo puede ser común en los tejidos de las plantas (Alves et al. 2014). Algunas cepas de *Pantoea*, han mostrado ejercer un buen papel en el biocontrol de enfermedades fitopatógenas (Braun-Kiewnick et al. 2000; Bonaterra et al. 2005). También se han utilizado en biorremediación, para degradar herbicidas (Pileggi et al. 2012). Se ha descrito como un grupo ideal para explorar su adaptación y el oportunismo específicos a los nichos (Walterson and Stavrinides 2015). Esta misma cepa fue aislada del tallo y de la raíz del maíz en los ensayos de Pereira and Castro (2014); por lo que indica que puede ser una excelente colonizadora y además puede ser común que colonice a dicho hospedador.

Por otro lado, las cepas aisladas en las raíces y en los tallos fueron 68, pertenecientes a 22 géneros y 45 especies diferentes, incluidos todos ellos en tres phyla diferentes. La clase a la que pertenecían gran parte de los aislados eran las Proteobacterias al igual que lo que obtuvieron Peiffer et al. (2013) en sus aislados de la rizosfera del maíz. Este hallazgo no es sorprendente, ya que las proteobacterias son bien conocidas por responder a fuentes de carbono lábil, y generalmente se consideran de crecimiento rápido (Fierer et al. 2007) y tienen la capacidad de adaptarse bien a la rizosfera de la planta (Peiffer et al. 2013).

Dentro de las proteobacterias, las más abundantes fueron las  $\gamma$ -Proteobacterias, coincidiendo con lo descrito en otros estudios de aislados de maíz (Johnston-Monje and Raizada 2011; Arruda et al. 2013; Rodríguez-Blanco et al. 2015). Además, el género *Pseudomonas*, representó dentro de las  $\gamma$ -Proteobacterias, el 42% de las cepas, lo que concuerda también con los resultados de (Johnston-Monje and Raizada 2011; Rodríguez-Blanco et al. 2015). El género *Pseudomonas* se ha utilizado en numerosas ocasiones como promotora del crecimiento de las plantas (Gravel et al. 2007; Shaharoon et al. 2008; de Souza et al. 2015; Calvo et al. 2016). Pero, por otro lado, algunas cepas son fitopatógenas pudiendo causar efectos nocivos para las plantas hospedadoras (Andreote and Araújo 2009).

Otro género abundante dentro de las  $\gamma$ -Proteobacterias, fue *Pantoea* que representa el 27% de los aislados de esta clase. Algunas cepas de *Pantoea* son endófitos beneficiosos (Feng et al. 2006) y pueden ser importantes en la protección de semillas contra hongos (Rijavec et al. 2007). Por otro lado, otras especies se consideran patógenos responsables de la podredumbre blanda (Toth et al. 2003; Coutinho and Venter 2009) y otras pueden causar enfermedades en humanos (Cruz et al. 2007).

Por tanto, suponemos que las  $\gamma$ -Proteobacterias están perfectamente asociadas a dicho hospedador (*Zea mays*), independientemente del genotipo de la planta, tipo de suelo y suministro de nutrientes (Rodríguez-Blanco et al. 2015).

Según la bibliografía revisada hasta ahora, hemos observado que los géneros que citamos a continuación ya se han descrito como endófitos de maíz: *Arthrobacter* (McInroy and Kloepper 1995; Pereira and Castro 2014), *Bacillus* (Lalande et al. 1989; McInroy and Kloepper 1995; Orole and Adejumo 2011; Pereira and Castro 2014), *Brevundimonas* (Montañez et al. 2012; Pereira and Castro 2014), *Burkholderia* (McInroy and Kloepper 1995; Montañez et al. 2012), *Curtobacterium* (McInroy and Kloepper 1995; Pereira and Castro 2014), *Enterobacter*

(McInroy and Kloepper 1995; Orole and Adejumo 2011; Liu et al. 2012; Montañez et al. 2012; Pereira and Castro 2014), *Klebsiella* (McInroy and Kloepper 1995), *Microbacterium* (McInroy and Kloepper 1995; Orole and Adejumo 2011; Pereira and Castro 2014), *Paenibacillus* (Liu et al. 2012, 2016), *Pantoea* (McInroy and Kloepper 1995; Liu et al. 2012; Montañez et al. 2012; Pereira and Castro 2014), *Pseudomonas* (Lalande et al. 1989; Orole and Adejumo 2011; Montañez et al. 2012; Pereira and Castro 2014), *Rhizobium* (McInroy and Kloepper 1995; Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero 2001; Montañez et al. 2012), *Serratia* (Lalande et al. 1989; McInroy and Kloepper 1995; Liu et al. 2012), *Sphingomonas* (McInroy and Kloepper 1995; Liu et al. 2012; Pereira and Castro 2014), *Staphylococcus* (McInroy and Kloepper 1995; Orole and Adejumo 2011) y *Streptomyces* (Araújo et al. 2000).

Sin embargo, los géneros *Agrococcus*, *Herbiconiux*, *Kitasatospora*, *Leifsonia*, *Massilia* y *Pseudoclavibacter* hasta la fecha y hasta donde nosotros conocemos no han sido descritos.

Además, puesto que los resultados de secuenciación, mostraron que varias cepas de este estudio presentan una similitud entre el 96% y el 100%, por lo que es posible que algunas de ellas puedan ser especies nuevas. Debido a los bajos porcentajes que presentaban algunas de las cepas de este estudio, nos indica que los microorganismos que se encuentran en el interior de la planta puede ser un nicho interesante de nuevas especies por descubrir, por lo que dejamos también un campo abierto para la investigación de posibles nuevas especies pertenecientes a diversos géneros.

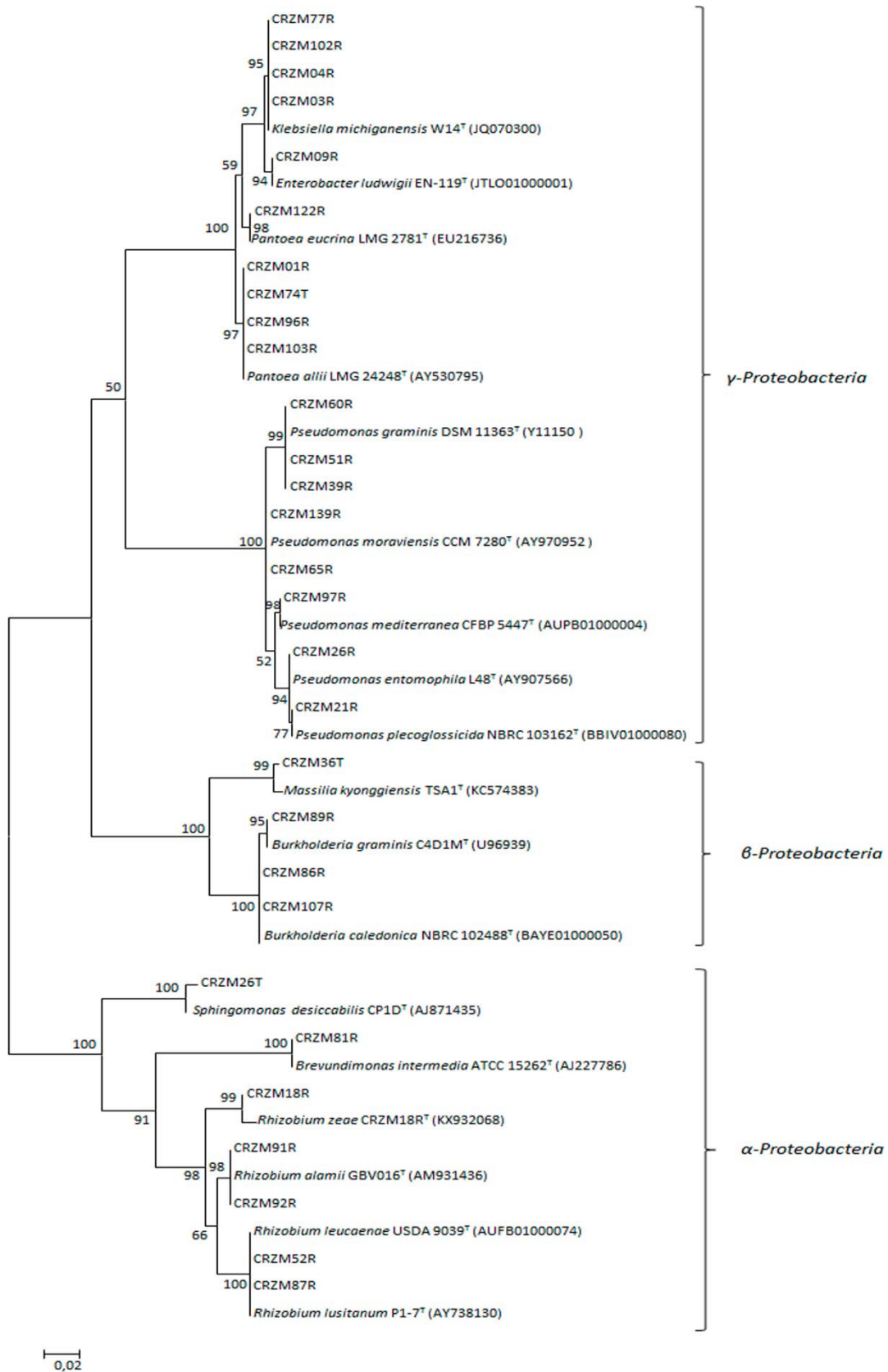


Fig. 24. Análisis filogenético basado en las secuencias obtenidas del gen ribosómico 16S de los aislados de este estudio y sus cepas tipo más próximas de las bacterias pertenecientes a las Gram-negativas. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos. La barra indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

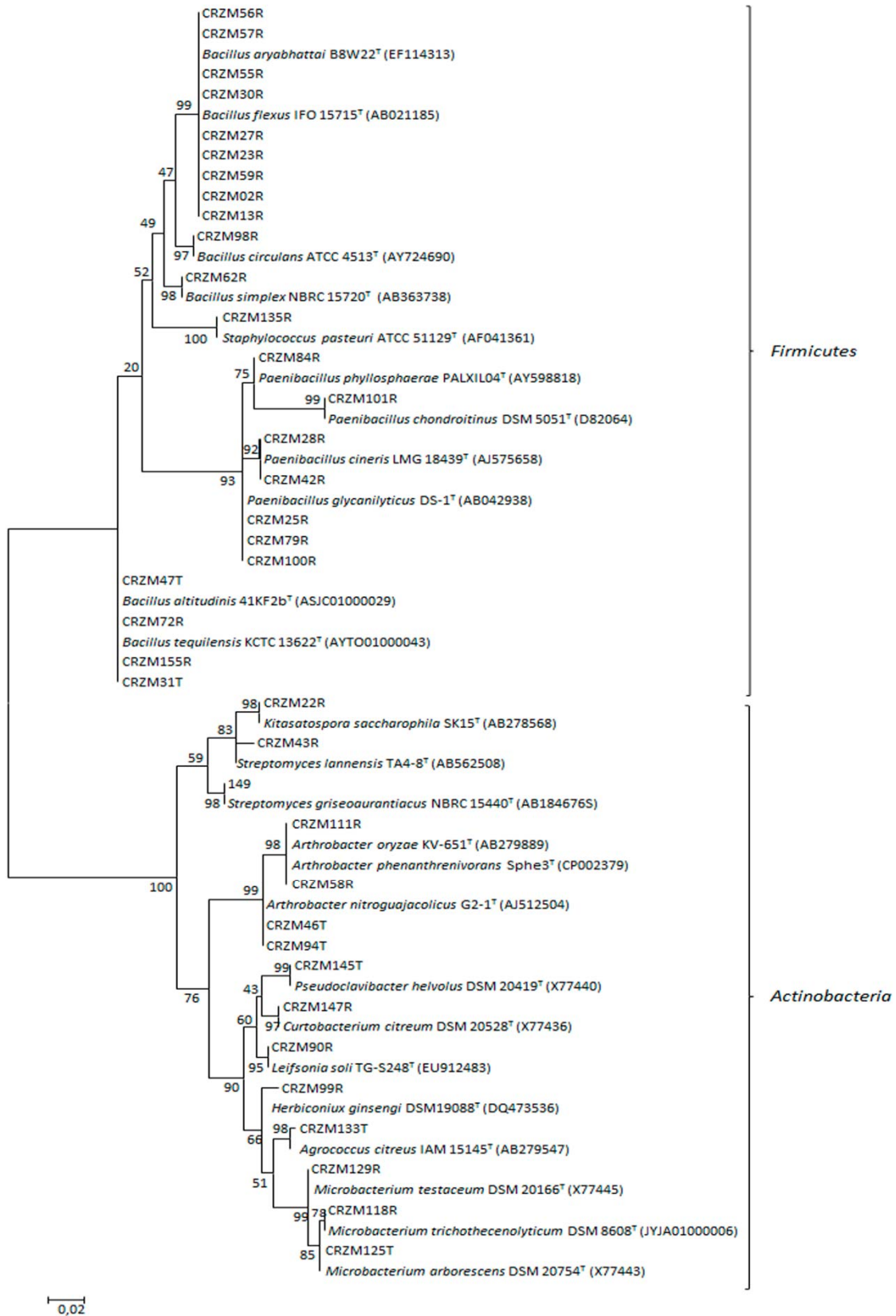


Fig. 25 Análisis filogenético basado en las secuencias obtenidas del gen ribosómico 16S de los aislados de este estudio y sus cepas tipo más próximas de las bacterias pertenecientes a las Gram-positivas. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos. La barra indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

### 3.3 Caracterización de una nueva especie aislada del interior de las raíces de *Zea mays*.

Según LPSN (“*List of Prokaryotes names with Standing in Nomenclature*”; JP EUZEBY; www.bacterio.net), existen 103 especies descritas dentro del género *Rhizobium* en Julio de 2017, donde la especie y cepa tipo del género es *R. leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup>.

Debido a las diferentes evidencias que nos hacían pensar que la cepa de *Rhizobium* CRZM18R, presentaba un porcentaje de similitud bajo con respecto a la especie más próxima observada en las bases de datos (*Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>), caracterizamos una cepa de este trabajo como *R. zae* CRZM18RT, en base a sus características genotípicas, quimiotaxonómicas y fenotípicas (Celador-Lera et al. 2017).

#### 3.3.1 Caracterización genotípica.

En primer lugar, se realizó un análisis filogenético con la secuencia del ARNr 16S de la cepa CRZM 18R y el mismo gen del resto de las especies del género *Rhizobium* (Figura 26).

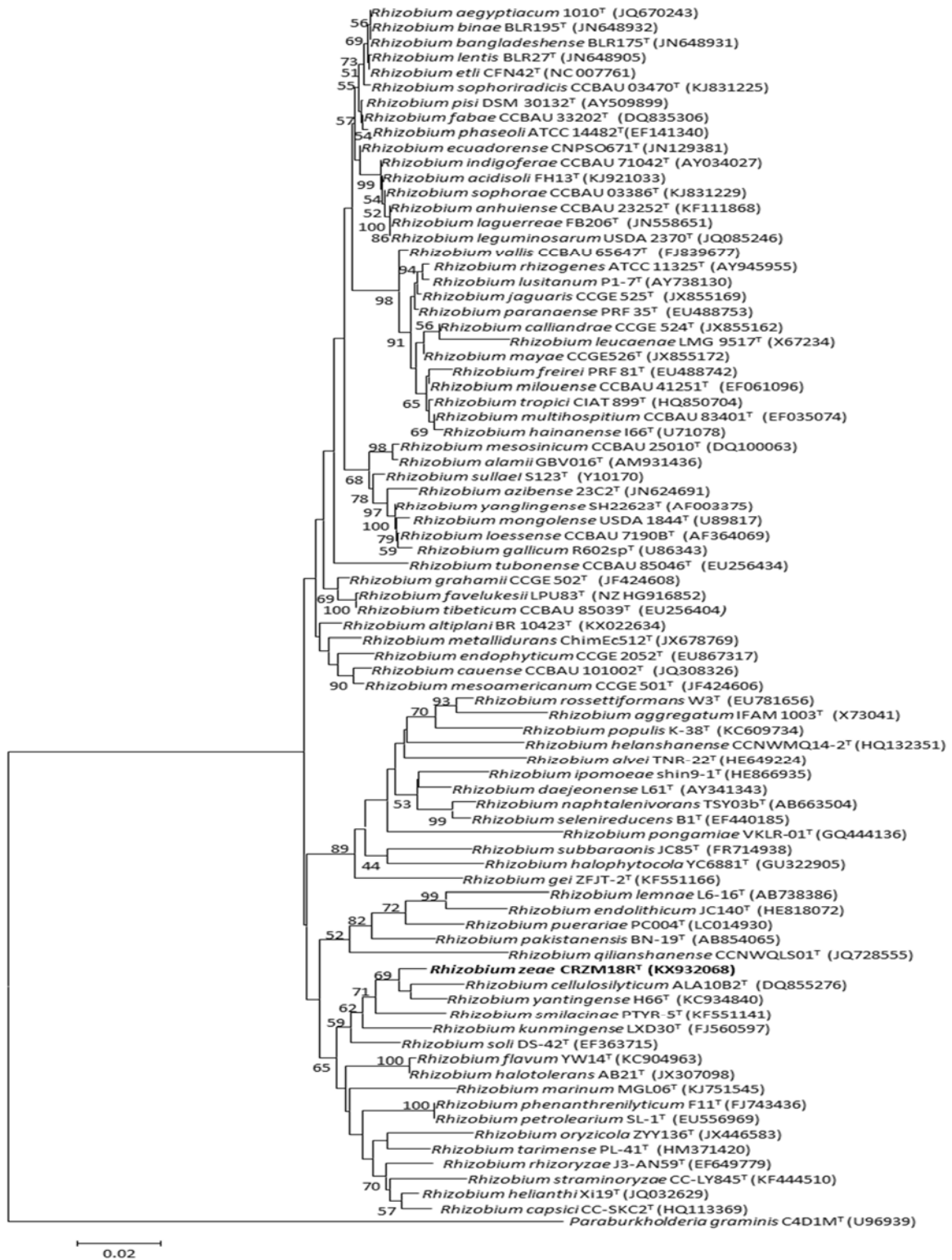


Fig. 26. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-joining a partir de las secuencias del gen ARN ribosómico 16S (posiciones 1385) que muestra la relación entre la cepa CRZM18R<sup>+</sup> y el resto de las especies del género *Rhizobium*. La significancia de cada rama se indica mediante un porcentaje calculado con 1000 repeticiones, mostrando solo aquellos valores que fueron superiores al 50%. La escala indica dos sustituciones de nucleótidos por cada 100.

A continuación se realizó el mismo árbol, con las mismas cepas, pero en este caso con las secuencias concatenadas de los genes *recA* y *atpD* (Figura 27).

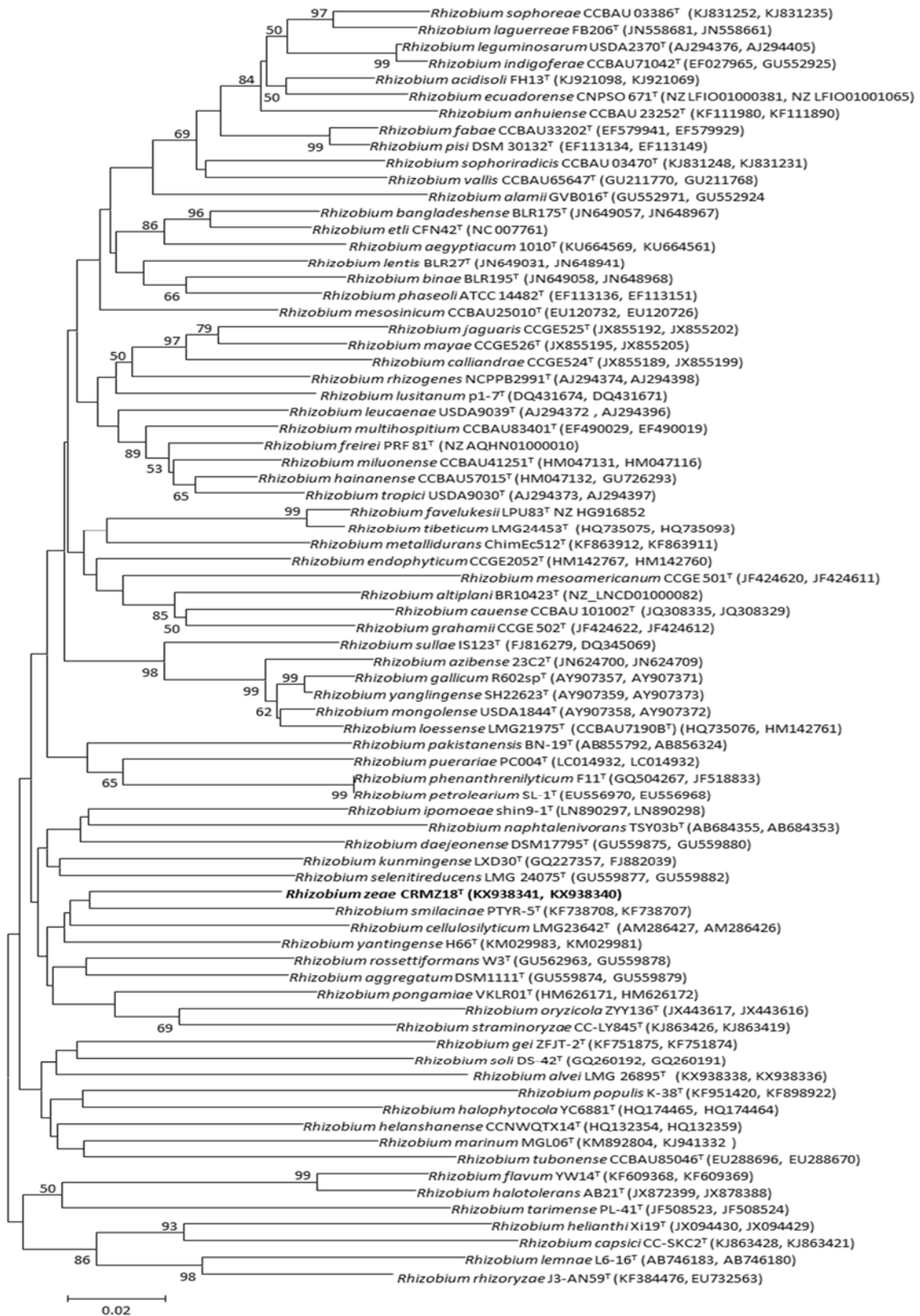


Fig. 27. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-joining a partir de las secuencias concatenadas de los genes *recA* y el *atpD*, por este orden y con un total de 720 posiciones que muestra la relación entre la cepa CRMZ18<sup>T</sup> y el resto de las especies del género *Rhizobium*. La significancia de cada rama se indica mediante un porcentaje calculado con 1000 repeticiones, mostrando solo aquellos valores que fueron superiores al 50%. La escala indica dos sustituciones de nucleótidos por cada 100.



Del mismo modo se realizaron los árboles filogenéticos con la secuencia del ARNr 16S de la cepa CRZM 18R y el mismo gen de las especies tipo representativas del género *Rhizobium* (Figura 28) y de las secuencias concatenadas de los genes *recA* y el *atpD* (Figura 29).

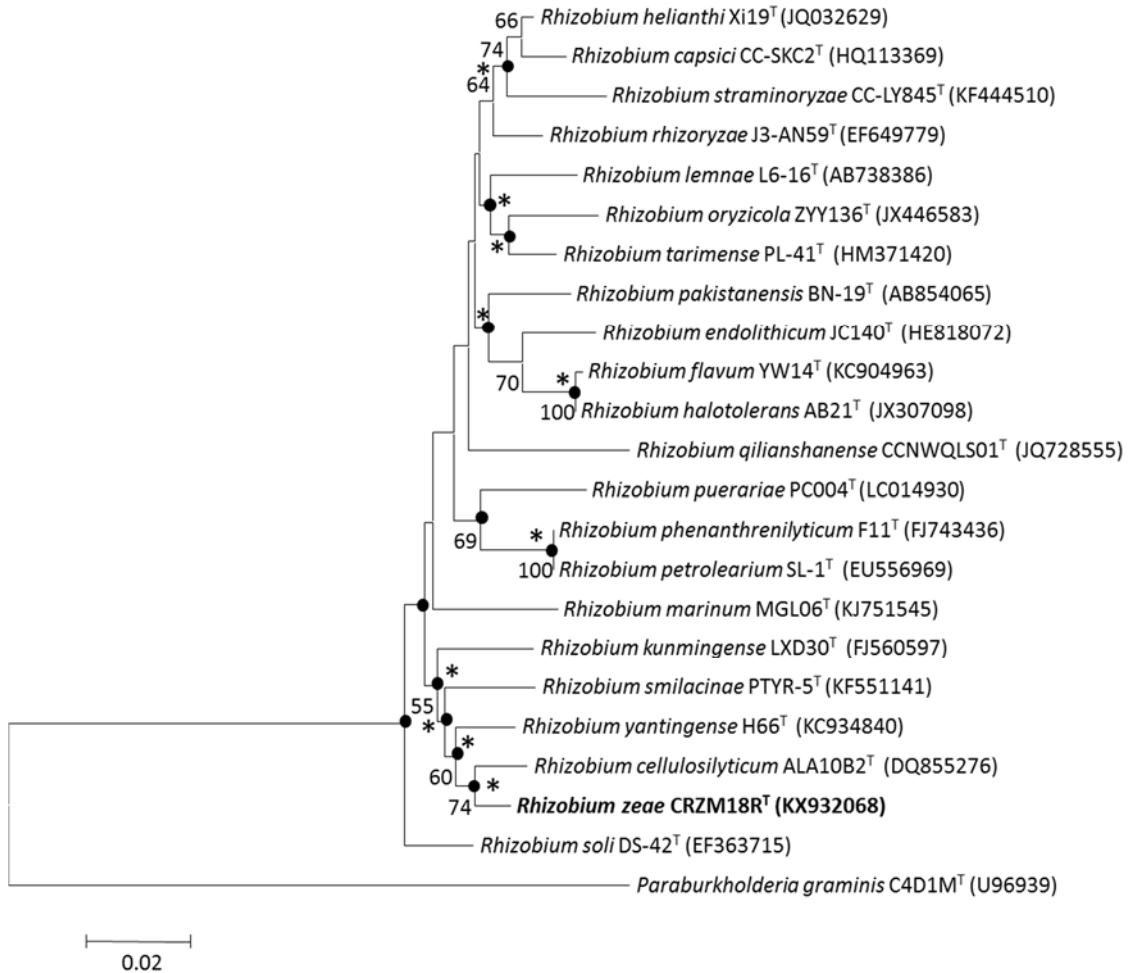


Fig. 28. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-joining a partir de las secuencias del gen ARN ribosómico 16S (posiciones 1385) que muestra la relación entre la cepa CRZM18R<sup>T</sup> y las especies tipo representativas del género *Rhizobium*. La significancia de cada rama se indica mediante un porcentaje calculado con 1000 repeticiones, mostrando solo aquellos valores que fueron superiores al 50%. La escala indica dos sustituciones de nucleótidos por cada 100. Los puntos negros y los asteriscos se obtuvieron con el algoritmo de máxima verosimilitud y algoritmos de parasimonia, respectivamente

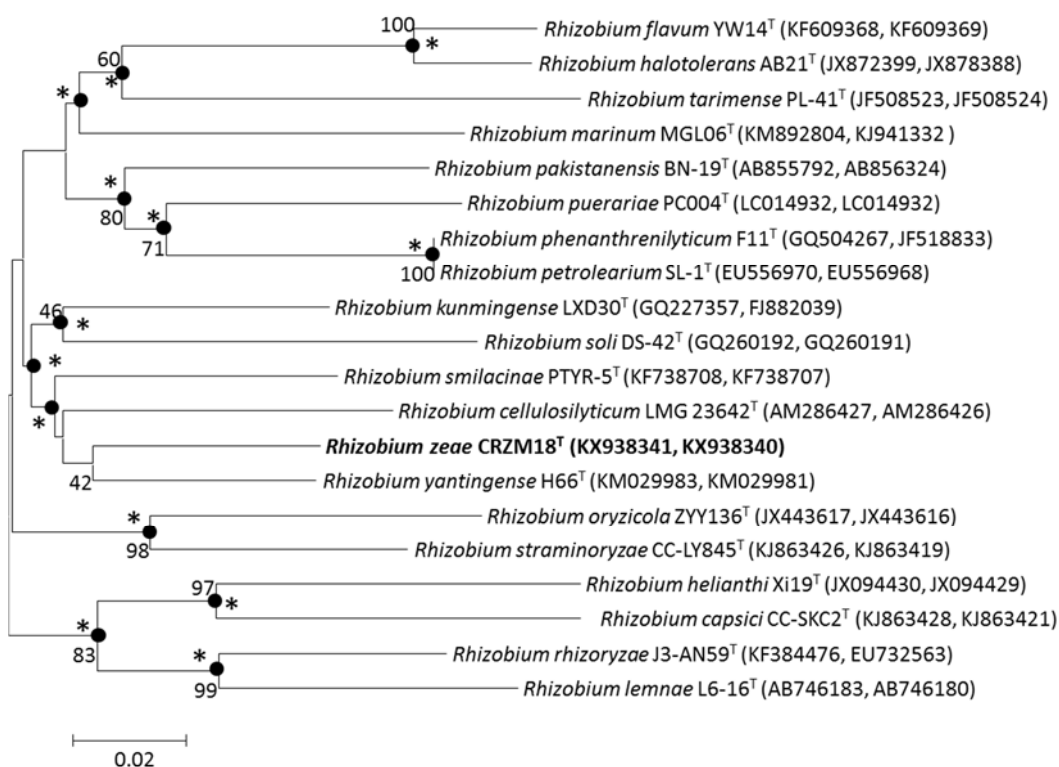


Fig. 29. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-joining a partir de las secuencias concatenadas de los genes *recA* y el *atpD*, por este orden y con un total de 720 posiciones que muestran la relación entre la cepa CRZM18<sup>T</sup> y las especies tipo representativas del género *Rhizobium*. La significancia de cada rama se indica mediante un porcentaje calculado con 1000 repeticiones, mostrando solo aquellos valores que fueron superiores al 50%. La escala indica dos sustituciones de nucleótidos por cada 100. Los puntos negros y los asteriscos se obtuvieron con el algoritmo de máxima verosimilitud y algoritmos de parasimonia, respectivamente

En los árboles filogenéticos obtenidos, se puede observar que existían diferencias nucleotídicas con las cepas tipo más próximas. Estableciendo como especies más próximas las cepas tipo *R. cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup>; *R. yantingense* LMG 28229<sup>T</sup>; *R. smilacinae* LMG 27604<sup>T</sup>; *R. leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup>.

### 3.3.2 Quimiotaxonomía: ácidos grasos.

Los ácidos grasos celulares se analizaron mediante el Sistema de Identificación Microbiana (ID Microbial) Sherlock 6.1 y la biblioteca RTSBA6 de acuerdo con las instrucciones técnicas proporcionadas por este sistema (Sasser 1990).

Para realizar esta prueba se cultivó la cepa CRZM18<sup>T</sup> y las cepas próximas utilizadas para la caracterización, en medio TY a 28°C y se recogieron las células durante la fase de crecimiento exponencial.

Los resultados obtenidos mostraron que los principales ácidos grasos de la cepa CRZM18<sup>T</sup> son los de *summed feature 8* (C<sub>18:1</sub>ω6c / C<sub>18:1</sub>ω7c) y C16:0. Se encontraron ligeras diferencias en el perfil de ácidos grasos de la cepa CRZM18<sup>T</sup> con respecto a las especies próximas, particularmente en el ciclo C8:0 que estaba presente en cantidades mayores que en *R. yantingense* LMG 28229<sup>T</sup> y en cantidades menores que en *R. smilacinae* LMG 27604<sup>T</sup>. Como era de esperar, debido a la distancia filogenética encontrada con respecto a *R. leguminosarum*

USDA 2370<sup>T</sup>, se encontraron diferencias más relevantes con respecto a esta cepa, particularmente en las cantidades de C<sub>18:0</sub> y C<sub>18:1</sub>ω7c11-metilo (Tabla 45).

Tabla 45. Composición de los ácidos grasos de *Rhizobium zeae* CRZM18R<sup>T</sup> (1) y las cepas tipo relacionadas (*R. cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> (2); *R. yantingense* LMG 28229<sup>T</sup> (3); *R. smilacinae* LMG 27604<sup>T</sup> (4); y la cepa tipo del género *Rhizobium*, *R. leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> (5).

Ácidos grasos	1	2	3	4	5
C <sub>16:0</sub>	11.9	12.7	10.9	11.9	7.18
C <sub>17:0</sub>	0.1	0.6	0.4	0.2	nd
C <sub>18:0</sub>	1.0	1.8	2.5	1.0	12.71
C <sub>16:0</sub> 3OH	2.5	2.0	2.5	2.4	nd
C <sub>18:0</sub> 3OH	0.3	nd	1.7	0.3	0.99
C <sub>18:1</sub> ω7c 11-methyl	1.1	nd	0.4	0.7	7.06
C <sub>19:0</sub> cyclo ω8c	5.3	7.5	2.2	9.8	3.74
Summed feature 2	4.1	3.8	2.2	5.1	3.59
Summed feature 3	3.3	2.0	1.9	3.5	1.19
Summed feature 8	68.6	66.5	72.4	63.3	62.77

Summed feature 2: (C<sub>14:0</sub> 3OH/ C<sub>16:1</sub> iso I)

Summed feature 3: (C<sub>16:1</sub>ω7c / C<sub>16:1</sub>ω6c)

Summed feature 8: (C<sub>18:1</sub>ω7c/ C<sub>18:1</sub>ω6c)

### 3.3.3 Caracterización fenotípica.

Se realizaron además diversas pruebas de caracterización fenotípica de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> y de las cepas próximas para establecer las diferencias y completar así las diferencias. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 46.

Para alguna de las pruebas se utilizaron galerías comerciales (API 32GN y API 20NE) diseñadas para la identificación de bacterias clínicas; sin embargo, pueden ser utilizadas para la caracterización de cualquier aislado bacteriano, ya que es un sistema rápido que presenta la ventaja de permitir la estandarización de los resultados y, además, ya han sido empleados para la caracterización de bacterias aisladas de plantas (Vantomme et al. 1987; Rivas et al. 2004).

Tabla 46. Resumen de las características diferenciales entre *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup> y las cepas tipo relacionadas. Cepas: (1) *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup>; (2) *R. cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup>; (3) *R. yantingense* LMG 28229<sup>T</sup>; (4) *R. smilacinae* LMG 27604<sup>T</sup>; (5) *R. leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup>. +, Reacción positiva; -, reacción negativa; d, reacción débilmente positiva. Los datos pertenecen a este estudio. ‡Los resultados difieren de los de Zhang et al. 2014 y Chen et al. 2015.

Características	1	2	3	4	5
Reducción de Nitrato	+	-	-	d	-
Crecimiento a:					
pH 5	-	-	+	+	-
2% NaCl	+	+	+	-	-
Asimilación de:					
Melibiosa	+	-	‡	-	+
5 keto-gluconato	+	-	+	+	-
Citrato	-	-	+	-	-
4-hydroxibenzoato	+	-	-	-	-
L-histidina	-	+	+	-	+
Producción de:					
Lactosidase	+	-	+	+	-
β-xylosidase	+	-	+	-	+
α-arabinosidase	+	-	-	d	+
Resistencia a:					
Cefuroxima (30µg )	+	+	-	-	-

Los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica y genotípica de todos los aislados nos permiten concluir que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> pertenece a una especie nueva del género *Rhizobium*, cuya descripción se expone a continuación.

### 3.3.4 Descripción de *Rhizobium zea* sp. nov.

*Rhizobium zea* (ze'ae. L. gen. n. zea, of *Zea mays*)

Esta especie, es un bacilo gram negativo como las demás especies del género. Tienen un tamaño de un ancho de 0.6 a 0.9µm y un largo de 2.0 a 3.0µm. Las colonias son pequeñas de color blanco perla cuando se observan en medio de YMA. Su temperatura óptima de crecimiento es de 28°C. El pH óptimo es de 7 a 7,5. Se observó crecimiento en presencia al 3,5% (w/v) NaCl, en un rango de temperatura entre 15 a 35°C y en un rango de pH entre 6 y 8. No se observó crecimiento a 40°C, a pH 5 o en presencia de 4% (w/v) NaCl. La reducción de nitrato y nitrito fue positiva. También fueron positivas la oxidasa y la catalasa. La fermentación de la glucosa es negativa. La producción de ureasa y la hidrólisis de esculina son positivas.

La producción de indol, H<sub>2</sub>S, arginina dihidrolasa, caseinasa, almidón y gelatinasa fue negativa en el sistema de API 20NE. Glucosa, L-arabinosa, manosa, manitol, N-acetyl-glucosamina, maltosa, gluconato y malato fueron asimilados en el Sistema de API 20NE, pero no fue el caso de caproato, adipato, citrato y fenilacetato. En el Sistema de API 32GN la asimilación de L-ramnosa, N-acetil-glucosamina, L-ribosa, inositol, sucrosa, maltosa, manitol, glucosa, melibiosa, L-fucosa, L-sorbosa, L-arabinosa, acetato, D, L-lactato, L-alanina, 2 y 5 ceto-gluconato,

4-hidroxibenzoato y L-prolina fue positiva. La asimilación de L-serina fue débil. La asimilación de Itaconato, suberato, malonato, glucógeno, 3-hidroxibenzoato, salicine, propionato, caprato, valerato, citrato, L-histidina y 3-hidroxibutirato fue negativa. Sensible a la ciprofloxacina, tetraciclina, neomicina y gentamicina. Débilmente sensible a la eritromicina. Resistente a la polimixina B, penicilina, ampicilina, cefuroxima y cloxacilina. Los principales ácidos grasos son  $C_{18:1} \omega 6c/C_{18:1} \omega 7c$  (*summed feature 8*),  $C_{16:0}$ ,  $C_{19:0}$  cyclo  $\omega 8c$ ,  $C_{16:0}$  3OH,  $C_{16:1} \omega 6c/C_{16:1} \omega 7c$  (*summed feature 3*),  $C_{14:0}$  3OH/ $C_{16:1}$  iso I (*summed feature 2*),  $C_{8:1} \omega 7c$  11-methyl y  $C_{18:0}$ . El contenido de G + C de la cepa CRMZ18R<sup>T</sup> es 62,7% en moles. La cepa tipo CRMZ18R<sup>T</sup> (= LMG 29735T = CECT 9169T) se aisló de la raíz de *Zea mays* en España.

Por tanto, las pruebas determinantes para definir esta cepa como una nueva especie del género *Rhizobium*, se determinó en base a diferencias genotípicas, quimiotaxonómicas y fenotípicas con las cepas tipo más próximas genotípicamente, que fueron *R. yantingense* aislada de la superficie de roca erosionada (*Purple siltstone*) (Chen et al. 2015); *R. smilacinae* aislada de la superficie esterilizada de la hoja de *Smilacina japonica* (Zhang et al. 2014); y por último con *R. cellulosilyticum* aislada de madera en descomposición de *Populus alba* (García-Fraile et al. 2007).

Ninguna de ellas fue aisladas de plantas leguminosas, por lo que corroboramos que aunque en un principio el género *Rhizobium* se asociase únicamente como endosimbiontes de leguminosas (Peix et al. 2015); se encuentran asociados también a multitud de plantas no leguminosas incluyendo algunos cereales como maíz, arroz y trigo, cuyo crecimiento es promovido por estas bacterias (Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero 2001; Yanni et al. 2016). Siendo algunos de ellos aislados de raíces de cereales como *Rhizobium oryzicola* aislada de arroz (Zhang et al. 2015); Pero nuestro aislado de raíces de maíz, ha sido la primera especie del género *Rhizobium* aislada a partir de raíces de maíz (Celador-Lera et al. 2017).

Por tanto, los resultados presentados en este trabajo mostraron la presencia de una abundante y diversa población de bacterias endófitas dentro de las raíces y tallos de maíz, Indicando que las gammaproteobacterias es la clase de proteobacterias dominantes entre las bacterias asociadas con los cultivos de maíz. Además, el tejido interno del maíz puede ser una fuente de nuevas especies por describir y además, su caracterización fenotípica y genotípica puede ofrecernos la oportunidad de conocer su utilidad en la agricultura como PGPR, en la protección de la planta frente a posibles patógenos, en biotecnología, etc.



***Análisis del potencial PGPR de los  
aislados.***

**Capítulo II**





## **1. MECANISMOS PGPB (*PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA*) IN *VITRO*.**

Debido a que la necesaria fertilización del suelo representa un desembolso económico importante para el agricultor y a su vez, ocasiona un gran impacto ambiental, en las últimas décadas se han incrementado los estudios sobre cómo los microorganismos del suelo pueden jugar un papel importante en la fertilización de la planta. En este sentido, las bacterias beneficiosas para las plantas se denominan PGPB, que cuando se asocian con las raíces y otros tejidos de las plantas, mejoran el suministro de nutrientes a las plantas por varios mecanismos (Kloepper et al. 1989; Saharan and Nehra 2011).

Se ha observado en la bibliografía que las bacterias PGPB pueden promover el crecimiento de las plantas a través de una amplia variedad de mecanismos (Bhattacharyya and Jha 2012a). Estos mecanismos incluyen mecanismos directos como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de minerales como el fosfato o la producción de reguladores del crecimiento, entre otros (García-Fraile et al. 2015). Por otro lado, se encuentran los mecanismos indirectos tales como la síntesis de enzimas extracelulares (Martínez-Viveros et al. 2010), la estimulación del desarrollo de micorrizas, la exclusión competitiva de patógenos y/o la eliminación de sustancias fitotóxicas (Bashan and De-Bashan 2010). Debido a estos mecanismos, diversos autores han utilizado las bacterias PGPB como inoculantes en diversos cultivos agrícolas, en los cuales además de producir un incremento y rendimiento de la producción, son capaces de mejorar el contenido nutricional (García-Fraile et al. 2012; Flores-Félix et al. 2013, Silva et al 2014; Flores-Felix et al 2015; Díez-Méndez et al. 2016).

Por tanto, en este capítulo nos propusimos dar un paso más en la caracterización de los aislados obtenidos una vez identificados. Para ello, se procedió a evaluar las posibles capacidades que podrían poseer para promover el crecimiento vegetal, con el fin de evaluar cuál de ellos podría tener mayor potencial como biofertilizante. En este sentido, determinamos la capacidad de los aislados para producir sideróforos, solubilizar fosfato, producir ácido indol acético, producir celulasas y realizar una primera aproximación de la capacidad de los aislados para fijar nitrógeno atmosférico, creciendo las cepas en medio sin fuente de nitrógeno.

### **1.1 Producción de sideróforos.**

En el medio ambiente, existen ciertas limitaciones para captar el hierro del suelo, ya que la forma férrica del hierro es insoluble a pH neutro; algunas PGPB son capaces de sintetizar sideróforos que son unas pequeñas moléculas, que tienen alta afinidad por el hierro férrico, mejorando la captación del hierro por los microorganismos (Saha et al. 2016). Por tanto, estas bacterias, juegan un papel importante en la agricultura, ya que aumentan la fertilidad del suelo y ejercen de biocontroladores, debido a que influyen en la promoción del crecimiento de las plantas ya sea directamente por el suministro de hierro a la planta o indirectamente limitando la disponibilidad del mismo a los patógenos (Ali and Vidhale 2016). Por tanto, determinar que aislados de este estudio son capaces de producir sideróforos, es un factor determinante para dilucidar su potencial uso como biofertilizante.

En este estudio, se ha valorado la capacidad de todos los aislados para producir sideróforos de forma cualitativa (Figura 30) (Tabla 47). Observamos que el 57,4% de las cepas mostraron capacidad para producir sideróforos, de las cuales el 30.88% producían halos claramente positivos y en el 26,5% de las cepas fueron más débiles. Finalmente, en un 42.65% de las cepas no se observó capacidad de producir sideróforos cuando se evaluaron en condiciones *in vitro*.

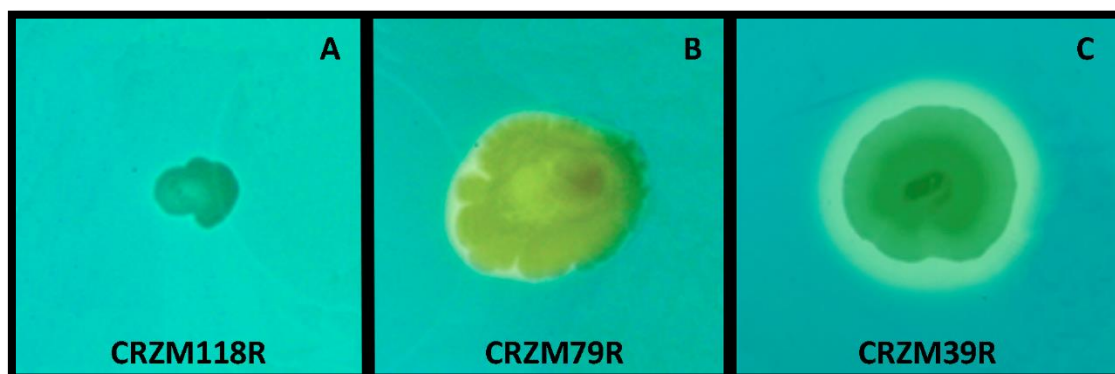


Fig. 30. Cepas sembradas en medio M9-CAS-Agar en las que se observa la producción o ausencia de sideróforos. A) La ausencia de producción obtenida por la cepa CRZM118R; B) Producción débil de sideróforos por la cepa CRZM79R; C) Mayor producción de sideróforos por la cepa CRZM39R.

Entre las cepas que han mostrado mayor capacidad para producir sideróforos se encuentran cepas pertenecientes al género *Pantoea* (CRZM01R, CRZM74, CRZM96, CRZM103), *Klebsiella* (CRZM03R, CRZM04R, CRZM77R, CRZM102R), *Serratia* (CRZM06R), *Bacillus* (CRZM23R, CRZM27R, CRZM30R, CRZM155R), *Pseudomonas* (CRZM39R, CRZM51R, CRZM60R, CRZM97R), *Burkholderia* (CRZM86R, CRZM89R, CRZM107R) y *Paenibacillus* (CRZM101R).

Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en estudios similares, como en el de Pereira y Castro (2014), en el que aislaron endófitos de maíz y analizaron su potencial PGPR para degradar metales en el suelo y, al igual que en nuestro estudio, identificaron los géneros *Pantoea*, *Bacillus* y *Pseudomonas* como productores de sideróforos. Arruda et al. (2013), también encontraron cepas productoras de sideróforos entre sus aislados de maíz, la mayoría pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Otros autores encontraron también los siguientes géneros como productores de sideróforos: *Pseudomonas* (Cornelis and Matthijs 2007), *Klebsiella* Ahmad et al. (2014), *Bacillus*, *Paenibacillus* (Verma et al. 2016) y *Serratia* (Grimont and Grimont 2006; Petersen and Tisa 2012). Por tanto, todos ellos ya se han descrito en la literatura como productores de sideróforos.

Además, existen numerosos estudios en los que sugieren que la producción de sideróforos por parte de los endófitos puede ser un fenotipo general, ya que tienen que competir con las células vegetales, bacterias y hongos por el suministro de hierro (Ali and Vidhale 2016); por tanto, la producción de sideróforos puede ser muy importante para el desarrollo endofítico en las plantas (Pereira and Castro 2014). Por otra parte, en numerosas ocasiones se correlaciona la producción de sideróforos con su capacidad de agente de biocontrol (Cornelis and Matthijs 2007). Por tanto, es imprescindible evaluar esta capacidad para la elección de una cepa como posible componente en la formulación de biofertilizantes.

## 1.2 Solubilización de fosfato.

La mayoría de los suelos agrícolas contienen altas cantidades de fosfato, pero solo una pequeña proporción está disponible para las plantas (Shen et al. 2011), siendo el fósforo un micronutriente esencial para todos los seres vivos. En las plantas, este elemento es esencial para los principales procesos bioquímicos, la fotosíntesis y la respiración (Sharma et al. 2013).

Existen numerosos estudios que muestran como las bacterias son capaces de solubilizar fosfato inorgánico del suelo, estando esta actividad determinada por su capacidad para producir ácidos orgánicos, cuyos grupos carboxilos quelan cationes (especialmente fósforo unido a calcio), liberando así fósforo soluble, el cual queda disponible para la asimilación de las plantas (Zaidi et al. 2009; Venieraki et al. 2011; Mohammadi 2012).

Con el fin de conocer si las bacterias endófitas aisladas de maíz tienen la capacidad de solubilizar fosfato, se realizó una prueba descrita por Peix et al. (2004) en condiciones *in vitro* (Figura 31). Observamos que el 22% de las cepas fueron capaces de solubilizar fosfato (Tabla 47). Entre las cepas que eran capaces de solubilizar fosfato se encuentran cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (CRZM26R, CRZM39R, CRZM51R, CRZM60R, CRZM65R, CRZM139R), *Paenibacillus* (CRZM28R, CRZM42R, CRZM84R), *Arthrobacter* (CRZM46T, CRZM94T, CRZM85R) y *Burkholderia* (CRZM86R, CRZM107R).

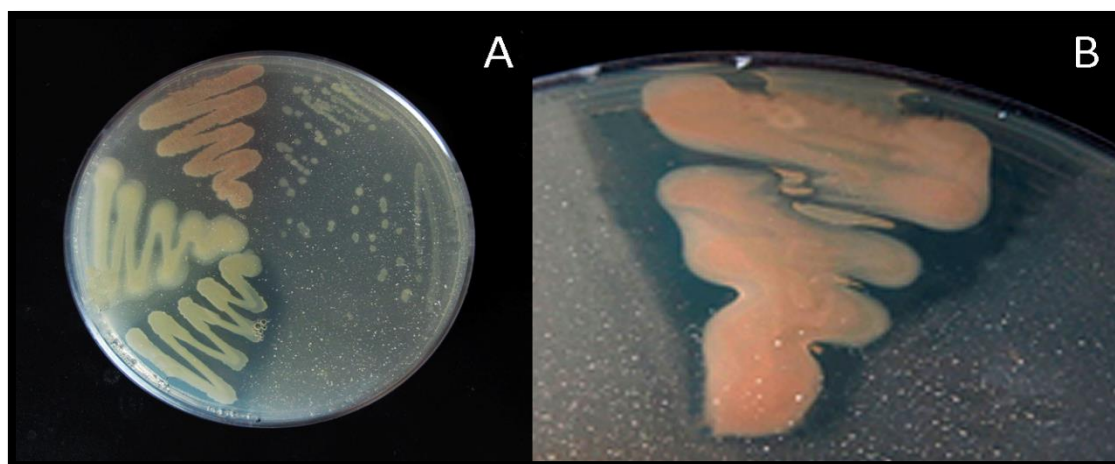


Fig. 31. Ejemplos de aislados solubilizadores de fosfato. A) Placa con medio YED-P donde se puede observar los halos producidos por las cepas de la izquierda y la ausencia de halo producido por las cepas de la derecha; B) Detalle de un halo producido por la cepa CRZM28R, capaz de solubilizar fosfato.

Del *screening* realizado encontramos que el 22,1% de nuestros aislados eran capaces de solubilizar fosfato, los cuales pertenecían a los siguientes géneros: *Pseudomonas* (40%), *Arthrobacter* (20%), *Paenibacillus* (20%), *Burkholderia* (13%) y *Rhizobium* (7%). Por otra parte, destacamos que un 86,7% de los aislados que presentaban capacidades para solubilizar fosfato procedían de las raíces, pudiendo estar relacionado con el potencial para mejorar la disponibilidad de fosforo a las plantas durante la colonización inicial.

El porcentaje total de solubilizadores de fosfato en nuestro estudio fue menor al encontrado en otros, como en el realizado por Pereira and Castro (2014), en el que el 66,7% de los endófitos de maíz procedentes del *screening* realizado eran capaces de solubilizar fosfato,

pero coincidían en las especies que solubilizaban en mayor proporción, siendo estos *Pseudomonas* y *Arthrobacter*. Arruda et al. (2013) también aislaron esos mismos géneros del interior del maíz, describiendo al género *Pseudomonas* con capacidad para solubilizar fosfato; sin embargo, no encontraron *Arthrobacter* dentro de los endófitos solubilizadores de fosfato. Estos mismos géneros, a excepción de *Rhizobium* (que no fue aislado), coincidían también como mayoritarios en la solubilización de fosfato con los aislados de endófitos de semillas de maíz del estudio de (Johnston-Monje and Raizada 2011). Por otra parte, se han descrito cepas pertenecientes al género *Paenibacillus* como solubilizadoras de fosfato y de potasio (Verma et al. 2016). En el *screening* realizado por Arruda et al. (2013), la mayoría de las cepas que tenían capacidad de solubilizar fosfato pertenecían al género *Burkholderia*. También se ha documentado la actividad de solubilización de fosfato *in vitro* por cepas de *Burkholderia* aisladas de diferentes suelos (Song et al. 2008; Park et al. 2010).

### 1.3 Producción de ácido indol acético.

Las auxinas son compuestos que están relacionadas directa o indirectamente con todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Halliday et al. 2009; Grossmann 2010). La auxina natural más importante (y la más común) es el ácido indol-3-acético (AIA), producido por bacterias, plantas y hongos (Duca et al. 2014). Además, es una de las fitohormonas más abundantes y más importante en el desarrollo de las plantas, debido a que esta fitohormona tiene la capacidad de controlar el desarrollo de la planta ya que desempeña un importante papel en la división celular, el alargamiento, el desarrollo de los frutos y la senescencia (Phillips et al. 2011). En el caso de las dicotiledóneas como el maíz, el AIA induce específicamente la formación de la raíz lateral, mientras que en las monocotiledóneas induce la formación de raíces adventicias (McSteen 2010).

Las bacterias poseen diferentes formas para la biosíntesis de AIA, de las cuales cinco usan el triptófano como principal precursor de la biosíntesis de AIA (Spaepen and Vanderleyden 2007; Ahmad et al. 2008). El triptófano está compuesto por un grupo indol y está universalmente presente en los tejidos vegetales, ya sea en forma libre o incorporada (Taiz et al. 2006). Por tanto, en los ensayos llevados a cabo utilizaremos triptófano como precursor.

Debido a la importancia de esta auxina evaluamos la capacidad de todos nuestros aislados para producir ácido indol acético con triptófano como precursor. El resultado de nuestros análisis mostró que todas las bacterias eran capaces de producir en mayor o menor medida ácido indol acético en medio suplementado con L-triptófano (Figura 32).

Las cepas que fueron capaces de biosintetizar ácido indolacético y/o derivados en concentraciones superiores a 200 mg l<sup>-1</sup> constituyeron el 16,1% del total, mientras que el 36,8% de las cepas mostraron valores entre 100 mg l<sup>-1</sup> y 200 mg l<sup>-1</sup> y el 47,1% produjeron valores por debajo de 100 mg l<sup>-1</sup> (Tabla 47).

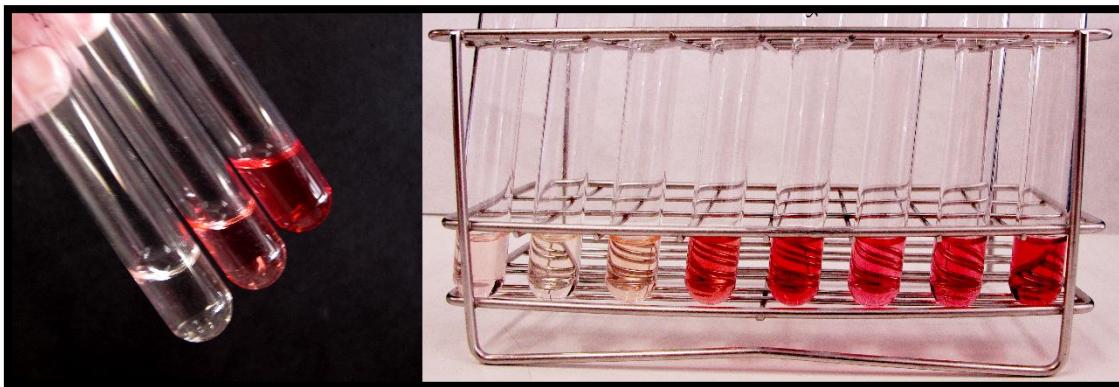


Fig. 32. Diferentes tonalidades obtenidas con la reacción colorimétrica realizada en la prueba de detección de ácido indol acético.

Patten and Glick (1996) estimaron que el 80% de las bacterias aisladas de la rizosfera pueden producir sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Además, debido a que las bacterias pueden sintetizar AIA por varias rutas de forma triptófano-dependientes (indol 3-acetonitrilo, indol 3-pirúvico y indol 3-acetamida), cada cepa induce de manera distinta esta hormona, aumentando así las probabilidades de producción de dicha hormona, siendo ésta una capacidad cepa-dependiente (Korasick and Enders 2013; Liu et al. 2016). Muchas son las especies y géneros bacterianos encontrados en la literatura con capacidad de producir ácido indol-acético como por ejemplo, especies del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, algunas especies de los géneros *Azorhizobium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* así como otros géneros de bacterias que habitan en la rizosfera (Taiz et al. 2006; Tsavkelova et al. 2006; Mehboob et al. 2009; Ali et al. 2010). Además, diversas especies de rhizobia han sido descritas en la literatura como bacterias capaces de producir esta auxina, pudiendo constituir eficaces promotores del crecimiento vegetal (Mehboob et al. 2009). Sin embargo, la producción de AIA debe estar regulada puesto ya que una concentración muy elevada puede contribuir al estrés hormonal de la planta (Davies, 2010), siendo los microorganismos del suelo productores de AIA a bajas concentraciones, los que pueden favorecer el crecimiento vegetal (Duca et al. 2014)

Nuestros resultados muestran que la producción de AIA fue el mecanismo PGP más extendido entre nuestros aislados, ya que todos ellos producían en mayor o en menor medida dicha hormona, lo que concuerda con estudios recientes en los que se presenta este mecanismo PGP como el rasgo más común entre las comunidades de endófitos cultivables aisladas de maíz y en otros cultivos de interés (El-Azeem et al. 2007; Montañez et al. 2012; Arruda et al. 2013). De entre nuestros aislados, las cepas asignadas a los géneros *Klebsiella*, *Paenibacillus* y *Pantoea* presentaron los valores más altos de producción de ácido indol acético (superiores a  $300 \text{ mg l}^{-1}$ ). Los aislados pertenecientes al género *Rhizobium* denotan que esta capacidad está extendida entre las distintas cepas de la especie, obteniéndose diversos valores en cuanto a producción de AIA (entre  $17$  y  $108 \text{ mg l}^{-1}$ ), salvo en el caso de la cepa CRZM 52R, identificada como *Rhizobium leucaenae*, en la que se obtuvo un valor de  $362 \text{ mg l}^{-1}$ .

El rango de valores de AIA obtenido en este trabajo, están comprendidos entre  $1 \text{ mg l}^{-1}$  y  $603 \text{ mg l}^{-1}$ ; por lo tanto, existe una variabilidad en el rango de concentraciones obtenidas de nuestros aislados, incluso dentro de cepas pertenecientes a una misma especie bacteriana. Por

ejemplo, los aislados CRZM39R, CRZM51R y CRZM60R, asignados a una misma especie (*Pseudomonas graminis*), produjeron valores de 199 mg l<sup>-1</sup>, 43 mg l<sup>-1</sup> y 70 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas diferencias en el rendimiento de la producción de AIA pueden atribuirse a las propiedades inherentes de cada cepa bacteriana (ruta metabólica que utilizan, factores externos...), con lo cual podemos decir que esta característica es cepa-dependiente (Sarwar et al. 1992). Por ejemplo, en el *screening* de endófitos de maíz caracterizados por Montañez et al. (2012), se observó que los valores de AIA de cepas de la misma especie, tenían resultados notablemente diferentes como en el caso de *Pseudomonas fluorescens* 130,7 y 56,4 µg ml<sup>-1</sup>. Lo mismo ocurrió entre las cepas de *Enterobacter ludwigii* también aisladas de maíz, con valores de 125,9 y 91,4 mg l<sup>-1</sup> (Pereira and Castro 2014).

#### 1.4 Capacidad de crecimiento en medio sin fuente de nitrógeno.

Se analizó la capacidad de crecimiento *in vitro* de todos los aislados en medios tanto con fuente de nitrógeno como sin nitrógeno.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 47. Todos los aislados mostraron crecimiento en el medio suplementado con nitrógeno, en el 63,2% el crecimiento se observó de manera clara mientras que el 36,8% lo hicieron de manera más débil. Cuando se probaron estos aislados utilizando el mismo medio pero sin el aporte de nitrógeno, se observó que solamente el 2,9% crecía de manera positiva; el 16,2% lo hacía de manera débil y el 80,9% no presentaba crecimiento en este medio sin fuente de nitrógeno.

Son numerosas las especies de bacterias endófitas diazotróficas que se han aislado e identificado en el interior de plantas monocotiledóneas como el maíz, con capacidad de fijar nitrógeno y reduciendo así la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Prakamhang et al. 2009; Lara 2011).

Cuando se evaluó la capacidad de crecimiento de los microorganismos en medio sin nitrógeno, se observó que solo el 2,9% de los aislados era capaz de crecer en este medio con normalidad y el 16,2% crecía de manera débil, de los cuales el 76,9% provienen de las raíces, por lo que probablemente puedan ser bacterias fijadoras de nitrógeno, ya que indicarían que disponen del sistema enzimático que les permite reducir el nitrógeno atmosférico y utilizarlo en su metabolismo. El porcentaje de positivos fue menor que el obtenido por Pérez-Cordero et al. (2014), el 63% de los endófitos de maíz presentaron una actividad positiva para la fijación biológica de nitrógeno, siendo la mayoría de ellos procedentes de la raíz.

Otros trabajos han utilizado medios libres de nitrógeno con el fin de aislar bacterias fijadoras de nitrógeno (Rennie 1981; Baldani et al. 1986). Roesch et al. (2007), realizaron un *screening* con aislados de maíz para evaluar la fijación de nitrógeno *in vitro* cuantificando el nitrógeno total presente en el medio libre sin nitrógeno. También se utilizan otras técnicas para determinar si los microorganismos fijan el isótopo N<sup>15</sup> (Lin et al. 2012).

### 1.5 Producción de celulosas.

Comprobamos también si nuestros aislados eran capaces de producir celulosas, ya que esta enzima podría estar implicada directamente en la rotura de la celulosa vegetal, pudiendo ser un mecanismo de entrada de los endófitos al interior de la planta (Menéndez et al. 2015).

Para determinar la actividad celulolítica usaremos una técnica cualitativa de difusión en placas de agar con carboximetilcelulosa como sustrato (Mateos et al. 1992). Las cepas que producen celulosa presentan un halo visible de hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC, celulosa no cristalina) (Figura 33).

Los resultados de todos los aislados se muestran en la tabla 47. En el 36,7 % de las cepas se observó claramente dicho halo, por tanto, eran capaces de hacer uso de la celulosa como fuente de carbono, el 11,8% lo hacían de manera débil; mientras que el 51,5% de las cepas no eran capaces de degradar la celulosa como fuente de carbono.

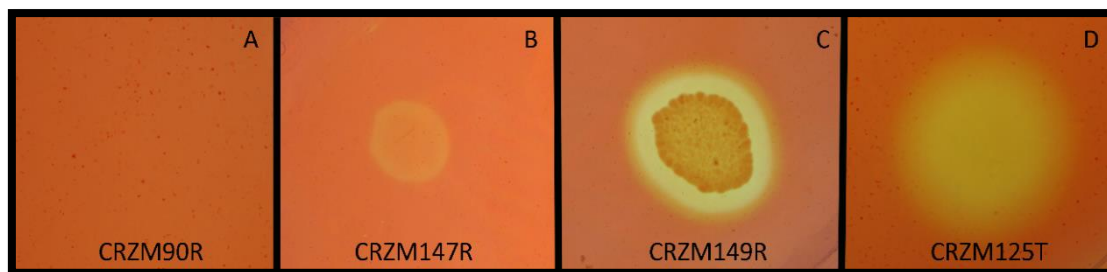


Fig. 33. Placa de doble agar con carboximetilcelulosa teñida con Rojo Congo, en la que podemos ver la producción cualitativa de celulosa. A) Ausencia de celulosas; B) Producción débil de celulosas; C) Producción positiva de celulosas; D) Alta producción de celulosas.

El 46,6% de las bacterias aisladas de la raíz eran capaces de producir celulosas, mientras que un 50% de las bacterias aisladas del interior del tallo producían celulosas. Estos datos se asemejan a otros estudios, como los resultados obtenidos en el estudio de biodiversidad de Pereira and Castro (2014), en el que el 76,5% de las bacterias aisladas del tallo fueron capaces de producir celulosas, mientras que las de la raíz fueron el 18,2%. Y también, en el *screening* realizado por (Johnston-Monje and Raizada 2011) de endófitos de semillas de maíz, encontraron que el 31,9% de los aislados eran capaces de producir dicha enzima. En el caso de los aislados asignados al género *Rhizobium*, 60% mostraron actividad celulásica, lo cual concuerda con lo previamente publicado en nuestro grupo de investigación (Robledo et al. 2008; Menendez et al 2015) y sugiere la posibilidad de que dichas cepas tengan mecanismos de entrada similares a los descritos en leguminosas o que puedan entrar en la raíz mediante *cracks* o zonas de emergencia radicular.

Por otra parte, un dato importante que podemos relacionar con la producción de celulosas, es que en el anterior capítulo, observamos que los géneros de *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* y *Pantoea* habían sido aislados tanto en la raíz como en el tallo del maíz, entre estos aislados destacamos, que a excepción del género *Arthrobacter*, las cepas aisladas del tallo, correspondientes a estos géneros, eran capaces de producir celulosas. Este dato, coincide con el estudio de Pereira and Castro (2014), en el que la única cepa en común aislada de tallo y raíz es *Pantoea allii* y en ambos casos son productoras de celulosas.

Por tanto, estos datos nos sugieren que la consecución de la colonización del tallo por parte de los aislados, está estrechamente relacionada con la capacidad de los mismos para producir enzimas hidrolíticas.

Tabla 47. Caracterización de los mecanismos PGPB *in vitro* producidos por los aislados de este estudio. (++) Fuerte producción; (+) Producción; (d) Producción débil; (-) Sin producción.

	<b><i>In vitro</i> PGPB</b>					
	Sideróforos	Solubilización de Fosfato	AIA (mg l <sup>-1</sup> )	Celulasas	Fijación de Nitrógeno	
					Con nitrógeno	Sin nitrógeno
CRZM 01R	++	-	260	+	+	-
CRZM 02R	-	-	224	-	+	d
CRZM 03R	++	-	201	+	+	-
CRZM 04R	++	-	169	-	+	d
CRZM 06R	++	-	118	d	+	-
CRZM 09R	+	-	208	-	+	-
CRZM 13R	-	-	121	-	+	d
CRZM 18R	+	+	170	+	+	-
CRZM 21R	+	-	46	-	+	-
CRZM 22R	-	-	37	++	+	-
CRZM 23R	++	-	102	-	d	-
CRZM 25R	-	-	112	++	+	-
CRZM 26R	-	+	56	-	+	-
CRZM 27R	++	-	111	-	+	-
CRZM 28R	-	+	112	++	d	-
CRZM 30R	++	-	163	-	d	d
CRZM 31T	-	-	164	+	d	-
CRZM 36T	-	-	152	-	d	-
CRZM 39R	++	+	199	-	+	d
CRZM 42R	-	+	146	+	d	-
CRZM 43R	-	-	20	-	+	-
CRZM 46T	+	+	35	-	+	-
CRZM 47T	-	-	2	d	+	-
CRZM 51R	++	+	43	+	+	-
CRZM 52R	+	-	362	+	+	-
CRZM 55R	-	-	172	+	+	-
CRZM 56R	-	-	248	-	+	-
CRZM 57R	+	-	188	+	+	d
CRZM 58R	++	+	153	-	+	-
CRZM 59R	-	-	203	-	+	-
CRZM 60R	-	+	70	-	+	-
CRZM 62R	-	-	58	-	d	-
CRZM 65R	+	+	31	-	d	-
CRZM 72R	-	-	12	+	d	-
CRZM 74T	++	-	183	+	+	d
CRZM 77R	++	-	462	-	+	d
CRZM 79R	-	-	335	+	d	-



Tabla 47. Continuación.

CRZM 81R	-	-	42	+	+	-
CRZM 84R	-	+	21	+	d	-
CRZM 86R	++	+	32	-	+	-
CRZM 87R	-	-	17	-	+	d
CRZM 89R	++	-	46	-	d	-
CRZM 90R	-	-	170	-	d	-
CRZM 91R	-	-	29	++	+	+
CRZM 92R	+	-	94	-	+	-
CRZM 94T	-	+	19	d	+	+
CRZM 96R	++	-	603	-	+	-
CRZM 97R	++	-	21	d	d	-
CRZM 98R	-	-	21	-	d	-
CRZM 99R	-	-	21	-	d	-
CRZM 100R	-	-	21	-	d	d
CRZM 101R	++	-	52	+	+	-
CRZM 102R	++	-	135	++	+	-
CRZM 103R	++	-	17	++	d	-
CRZM 107R	++	+	289	-	+	-
CRZM 111R	-	-	165	++	+	-
CRZM 118R	-	-	15	-	d	-
CRZM 122R	+	-	1	+	d	-
CRZM 125T	-	-	140	++	+	-
CRZM 126T	+	-	121	d	+	-
CRZM 129R	-	-	3	d	d	-
CRZM 133T	-	-	2	-	+	d
CRZM 135R	-	-	170	d	+	-
CRZM 139R	-	+	20	-	d	-
CRZM 145T	+	-	172	-	d	-
CRZM 147R	+	-	25	d	d	-
CRZM 149R	+	-	14	+	d	-
CRZM 155R	++	-	110	-	+	-

Diferentes estudios versan sobre la multifuncionalidad de algunos aislados, relacionando la capacidad para solubilizar fosfato con la capacidad para producir sideróforos (Vassilev et al. 2006a; Viruel et al. 2011; Brígido et al. 2017). Nuestros resultados concuerdan con dichos estudios ya que el 73.33% de los aislados de nuestro estudio que son capaces de solubilizar fosfato lo son también de producir sideróforos, por otra parte todos ellos tenían además la capacidad para producir ácido indol acético.

Existen numerosas publicaciones que relatan la variedad de mecanismos que tienen las bacterias para mejorar el desarrollo vegetal (Bhattacharyya and Jha 2012a; M. Usha Rani 2012; Garcia-Fraile et al 2015; Pérez-Montaño et al. 2014; Santoyo et al 2016). Además, la capacidad de algunos de los aislados para producir simultáneamente mecanismos como sideróforos, solubilización de fosfato y AIA ha sido reportada por diversos autores (Vassilev et al. 2006,

Brígido et al 2017). En nuestro estudio, las cepas que resultaron ser positivas en los tres mecanismos pertenecían a los géneros *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*.

Pero, los estudios en plantas no leguminosas, revelan que no se ha determinado hasta la fecha las contribuciones relativas de los diferentes procesos responsables que incrementen con éxito el desarrollo vegetal (Bhattacharyya and Jha 2012b). Por tanto, reunir el máximo número de mecanismos podría aumentar las posibilidades de que se mejore el desarrollo de las plantas con alguno de ellos; sin embargo, no debemos descartar la posibilidad de estudiar aislados uni o multifuncionales.

Por tanto, una adecuada caracterización de las PGPB de cada una de las cepas de este estudio facilita el desarrollo de un óptimo inoculante, ya que sería de gran utilidad hacer coincidir correctamente los mecanismos PGPR adecuados para cada cultivo y mejorar así su crecimiento.

## **2. PROTECCIÓN FRENTE A PATÓGENOS VEGETALES EJERCIDA POR LA CEPA *STREPTOMYCES GRISEOANTHUS*.**

Puesto que son numerosas las veces que se han descrito las capacidades antimicrobianas de la especie *Streptomyces* (Valan Arasu et al. 2009; Duraipandiyan et al. 2010; Yekkour et al. 2012), decidimos utilizar una de las cepas de este estudio identificada como *Streptomyces griseoanthus* CRZM149R, la cual presentaba varios mecanismos PGP, para evaluar su capacidad *in vitro* para producir antimicrobianos, frente a diversos hongos y bacterias fitopatógenas de interés.

Después, analizamos su efecto en invernadero en plantas de maíz previamente infectadas con patógenos, con el fin de poder utilizar esta cepa como un posible inoculante para promover el crecimiento vegetal y además, evitar una posible infección por fitopatógenos. Además, el uso de bacterias endófitas implica que ya tienen una asociación con las plantas huésped, son capaces de colonizar la planta y están adaptadas a esos nichos ecológicos (Gray and Smith 2005). Por otra parte, no producen ninguna contraindicación para la salud humana y el medio ambiente (Gerhadson 2002).

Todas las cepas de hongos y bacterias fitopatógenas utilizadas son patógenos vegetales de cuarentena, elegidos por su importancia en los cultivos de la Península. Las bacterias utilizadas en este apartado fueron las siguientes *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *Pseudomonas syringae pv. pisi*, *Pseudomonas syringae pv. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*, *Pectobacterium atrosepticum* y *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* y los hongos fueron *Diplodia seriata*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, *Fusarium pseudograminearum* y *Fusarium graminearum*.

### **2.1 Estudios *in vitro*.**

Para este ensayo, se utilizó un criterio de valoración basado en el halo de inhibición, producido por la cepa CRZM149R frente a las bacterias y hongos fitopatógenos, obteniendo así un análisis semicuantitativo de los resultados (Taechowisan et al. 2017; con modificaciones).

Como podemos observar, la cepa CRZM149R identificada como *Streptomyces griseoaurantiacus* mostró una clara actividad antifúngica frente a todos los hongos fitopatógenos estudiados, a excepción de *Fusarium pseudograminearum* (Figura 34A, B y C). Por el contrario, no se vio afectado el crecimiento de ninguna de las bacterias fitopatógenas enfrentadas a la cepa CRZM149R de *Streptomyces* (Figura 34D).

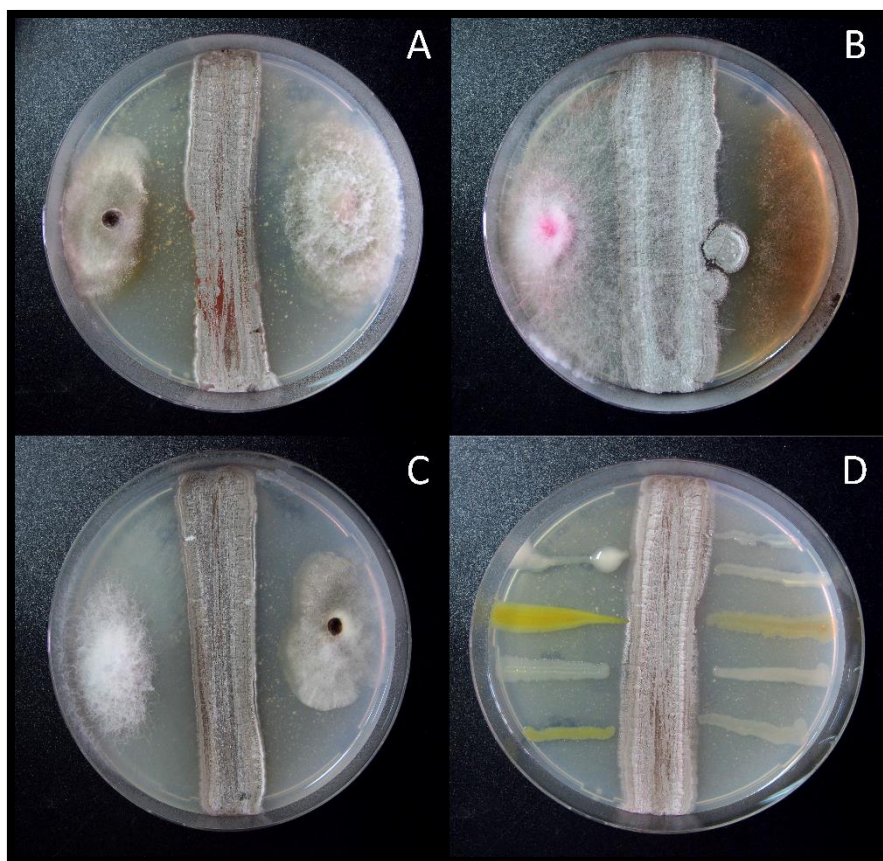


Fig. 34. Ensayo de antibiosis *in vitro* ejercida por la cepa CRZM 149R identificada como *Streptomyces griseoaurantiacus* (estria central), enfrentada a ambos lados con los hongos fitopatógenos seleccionados A) Inhibición del crecimiento de *Diplodia seriata* (izquierda) y *Monilinia laxa* (derecha); B) Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* (derecha) e incapacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium pseudograminearum* (izquierda); C) Inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (izquierda) y *Monilinia fructigena* (derecha); D) ausencia de inhibición del crecimiento de las bacterias fitopatógenas testadas.

Nuestros resultados sugieren que la cepa CRZM149R tiene un gran potencial como agente de biocontrol frente a hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés agrícola. Dichos resultados concuerdan con estudios similares, en los que por medio de los ensayos *in vitro* seleccionan una cepa de *Streptomyces griseorubens* E44G por sus buenos resultados en cuanto a la actividad antifúngica contra *R. solani* (Al-Askar et al. 2015). Por otro lado, Mousa et al. (2015), al igual que en nuestro ensayo evaluaron *in vitro* la capacidad antifúngica frente a *F. graminearum* de aislados endófitos de maíz.

## 2.2 Ensayos *in planta*.

Debido a la eficiente actividad antifúngica encontrada por parte del aislado de *Streptomyces griseoaurantiacus* contra hongos fitopatógenos y puesto que la línea principal de trabajo de esta tesis engloba lo referente al cultivo de maíz, decidimos realizar este ensayo infectando previamente con patógenos de dicha planta e inoculando después con nuestros aislados de interés para observar los resultados.

Además, con el fin de incrementar el posible efecto aditivo de los mecanismos directos de los endófitos de maíz, quisimos evaluar el efecto de coinocular esta cepa de *Streptomyces* con dos cepas del género *Rhizobium* puesto que este género es conocido por sus múltiples interacciones beneficiosas como endófito o como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB), por lo que las cepas de este género junto con las propiedades PGPB y antifúngicas de la cepa de *Streptomyces* podrían ser buenos candidatos para poder ser usadas como biofertilizantes. La combinación de cepas bacterianas en este tipo de ensayos ya ha sido reportada con anterioridad ya que se ha visto que aumenta la actividad de biocontrol de la enfermedad, debida a la comunicación intraespecífica entre las cepas inoculadas (Boer et al. 2003).

Las cepas de *Rhizobium* utilizadas fueron CRZM18R<sup>T</sup>, identificada como *R. zea*, y CRZM52R, identificada como *R. leucaenae*, las cuales habían presentado buenos resultados en las pruebas de PGPB. Por un lado, *R. zea* CRZM18R<sup>T</sup> era capaz de solubilizar fosfato, producir sideróforos y además produjo una cantidad de ácido indol acético de 108 mg l<sup>-1</sup>, mientras que la *R. leucaenae* CRZM52R era capaz de producir sideróforos y producir una cantidad de ácido indol acético de 362 mg l<sup>-1</sup>.

Por otra parte, los hongos fitopatógenos seleccionados para esta prueba fueron *Rhizoctonia solani* y *Fusarium graminearum*, que afectan a la planta de maíz en España, disminuyendo la producción y el rendimiento de sus cultivos (Mousa et al. 2015; Muis and Quimio 2016). El sustrato utilizado fue suelo recogido de tierras que se usan para cultivo de gramíneas, para comprobar de esta manera la adaptabilidad y la competitividad de nuestros aislados.

Todas las plantas de este ensayo fueron infectadas con los hongos seleccionados para este ensayo, por tanto los controles son infectados pero no inoculados con ninguna bacteria PGPB. De esta manera se puede comprobar el efecto que produce el hongo a la planta sin otros factores a tener en cuenta.

A lo largo del ensayo, se realizaron las medidas a los 9, 23 y 38 días después de la infección de las plantas de maíz con los hongos (Tabla 48 y 49) (Figura 35). Se tomaron medidas de la clorofila de las plantas en todos los días observados, por lo que pudimos ver su evolución a lo largo del ensayo. En las plantas infectadas con *R. solani* se pudo observar que el control infectado (solo con el hongo fitopatógeno) mostró siempre valores de clorofila menores a los obtenidos en las plantas inoculadas. Además, a partir del día 23 después de la infección con los hongos, los tratamientos que habían sido coinoculados obtuvieron valores significativamente superiores al control sin inocular. Como es tendencia en las plantas de maíz cultivadas en invernadero, los valores de la clorofila disminuyeron a medida que se pasaban

los días, ya que el contenido de clorofila está directamente relacionado con el contenido en nitrógeno y como las plantas se regaron únicamente con agua, sin añadir ningún compuesto nitrogenado, el contenido en nitrógeno disminuye (Mendoza 1998; Hamblin et al. 2014; Parry et al. 2014; Saravia et al. 2016; Monostori et al. 2016). Lo mismo ocurre con las plantas infectadas con *F. graminearum* pero la disminución en el contenido de clorofila es menor. Los valores de clorofila son similares en todos los tratamientos aunque levemente superiores en los tratamientos inoculados.

En cuanto a la longitud de la parte aérea, en el caso de las plantas de maíz infectadas con *R. solani*, a los 23 dpi, los tratamientos inoculados con las cepas seleccionadas presentaron valores estadísticamente significativos con respecto a su correspondiente control infectado sin inocular. A los 38 dpi, también fueron significativamente mayores los valores del tratamiento coinoculado con las cepas CRZM52R + CRZM149R. Por otro lado, las plantas infectadas con *F. graminearum* mostraron a los 23 dpi que los valores de las plantas inoculadas fueron mayores al control sin inocular pero no mostraron diferencias significativas. Mientras que a los 38 dpi, ocurría de forma similar que en el caso de las plantas infectadas con *R. solani*, donde los valores fueron significativamente superiores con respecto a su correspondiente control infectado sin inocular. Cabe destacar que los valores obtenidos en la coinoculación de las cepas CRZM52R + CRZM149R fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos.

A los 38 dpi se tomaron medidas del peso fresco y del peso seco de la parte aérea. En el caso de las plantas infectadas con *R. solani*, el peso fresco de todos los tratamientos fue estadísticamente superior a las plantas solo infectadas con el hongo y además, el tratamiento coinoculado con las cepas CRZM52R + CRZM149R fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos. En el caso de las plantas infectadas con *F. graminearum*, los tratamientos inoculados presentaron valores significativamente mayores al control solo infectado con el hongo.

En el caso de las medidas del peso seco de las plantas infectadas con *R. solani*, todos los tratamientos mostraron valores significativamente mayores que el control sin inocular. Lo mismo ocurre con las plantas infectadas con *F. graminearum*, todos los tratamientos inoculados obtuvieron valores significativamente superiores al control sin inocular. Por lo que el incremento observado en las plantas inoculadas con respecto a las plantas control, puede indicarnos que las plantas están realizando un esfuerzo para combatir a los hongos fitopatógenos y no en su crecimiento, por lo que se ven favorecidas por las bacterias PGPR inoculadas.

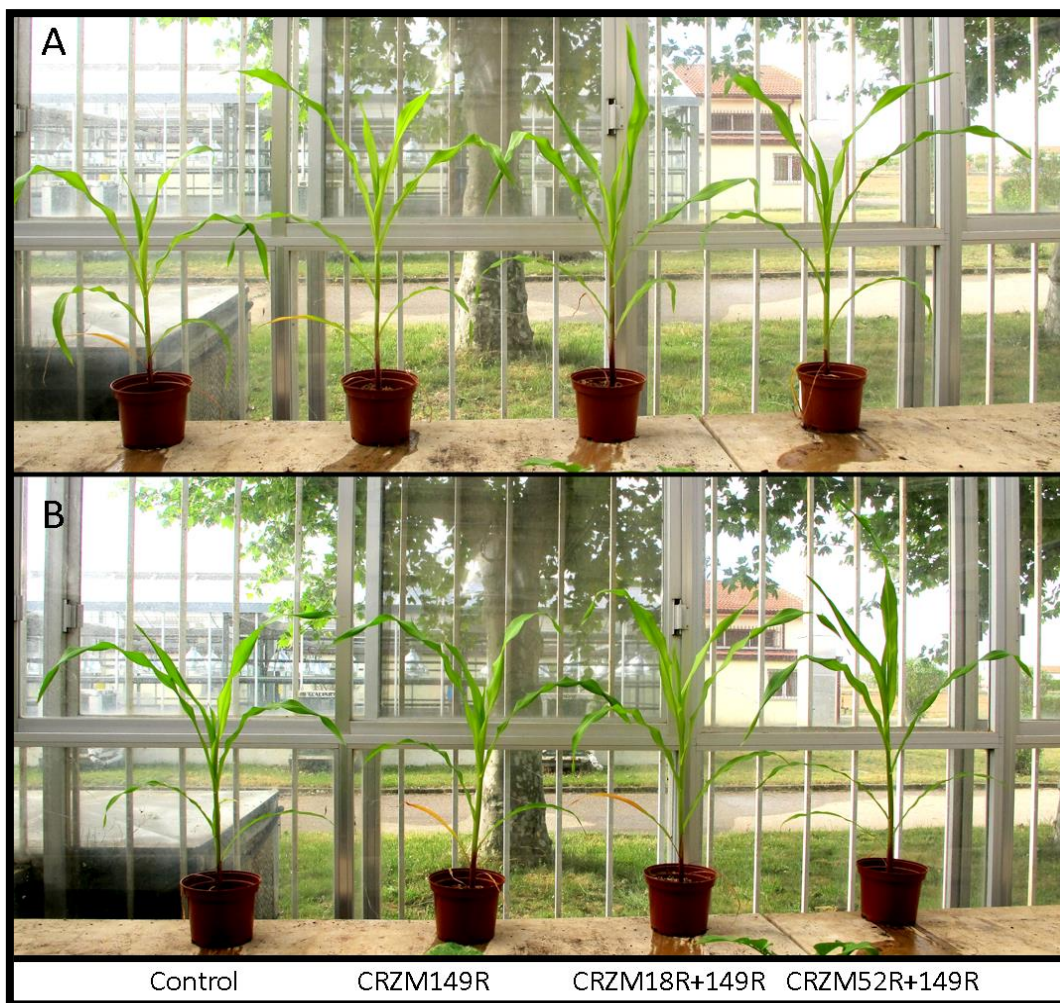


Fig. 35. A) Plantas de maíz representativas de cada uno de los tratamientos a los 38 días después de la infección con *R. solani*; B) Imagen que muestra las plantas de maíz representativas de cada uno de los tratamientos a los 38 días después de la infección con *F. graminearum*.

Tabla 48. Datos recogidos a los 9, 23 y 38 días post infección del hongo *R. solani* en plantas de maíz.

Tratamientos <i>Rhizoctonia solani</i>	dpi	Contenido en Clorofila (Unidades SPAD)	Longitud Parte Aérea (cm)	Peso Fresco Parte Aérea (g)	Peso Seco Parte Aérea (g)
Control	9 dpi	23,37±1,19a	No evaluado		
	23 dpi	23,98±1,07a	41,6±2,21a		
	38 dpi	19,55±0,28a	85,0±0,31a	25,26±0,57a	2,57±0,219a
CRZM149R	9 dpi	25,64±0,93a	No evaluado		
	23 dpi	26,0±0,96a	58,17±3,01b		
	38 dpi	22,68±0,24b	95,17±0,48b	30,8±0,526b	3,36±0,39b
CRZM18R+149R	9 dpi	25,18±0,57a	No evaluado		
	23 dpi	26,96±0,40ab	60,25±0,95b		
	38 dpi	23,2±0,41b	95,75±0,48b	31±0,47b	3,44±0,19b
CRZM52R+149R	9 dpi	25,42±0,60a	No evaluado		
	23 dpi	27,15±0,45ab	63,75±1,44b		
	38 dpi	23,53±0,19b	97,6±0,25c	32,48±0,42c	3,52±0,08b

\*Los valores muestran la media y el error estándar de 10 plantas (±S.E) por ensayo de cada uno de los tratamientos.

\*Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher  $p \leq 0,05$ ).

Tabla 49. Datos recogidos a los 9, 23 y 38 días post infección del hongo *F. graminearum* en plantas de maíz.

Tratamientos <i>Fusarium graminearum</i>	dpi	Contenido en Clorofila (Unidades SPAD)	Longitud de la Parte Aérea (cm)	Peso Fresco Parte Aérea (g)	Peso Seco Parte Aérea (g)
<b>Control</b>	9 dpi	23,26±0,46a	<i>No evaluado</i>		
	23 dpi	24,3±0,58a	63,6±1,29a		
	38 dpi	23,36±0,93a	97,83±0,31a	33,2±0,50a	3,22±0,27a
<b>CRZM149R</b>	9 dpi	24,46±0,74a	<i>No evaluado</i>		
	23 dpi	24,67±0,49a	64,1±1,25a		
	38 dpi	24,82±0,81a	99,8±0,37b	35,53±0,76b	4,12±0,24b
<b>CRZM18RT+149R</b>	9 dpi	24,77±0,62a	<i>No evaluado</i>		
	23 dpi	25,52±0,29a	64,4±0,87a		
	38 dpi	24,98±0,59a	100,8±0,91b	35,54±0,62b	4,12±0,26b
<b>CRZM52R+149R</b>	9 dpi	24,1±0,46a	<i>No evaluado</i>		
	23 dpi	25,72±0,48a	65,8±1,39a		
	38 dpi	25,17±0,69a	102,8±0,74c	37,07±0,31b	4,33±0,17b

\*Los valores muestran la media y el error estándar de 10 plantas ( $\pm$ S.E) por ensayo de cada uno de los tratamientos.

\*Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher  $p \leq 0,05$ ).

Finalmente, con el fin de comprobar que los hongos habían infectado las plantas, una vez recogidas las partes aéreas de las plantas de maíz, se recogió una proporción de las mismas de cada uno de los tratamientos incluido el control con cada uno de los hongos infectados y se incubaron dichas partes aéreas durante 7 días. Al cabo de dicha incubación se observó el crecimiento de un hongo con morfología similar al hongo fitopatógeno con el que estaban infectadas inicialmente las plantas de maíz en ambos casos. Por ello, podemos suponer que la infección se mantuvo durante el tiempo del ensayo.

Por tanto, los resultados obtenidos en nuestro ensayo mostraron que en el caso de las plantas infectadas con *R. solani*, todas las plantas que habían sido inoculadas con nuestras cepas, resultaron tener valores significativamente mayores en todos los parámetros medidos, que el control únicamente infectado con el hongo fitopatógeno. En el caso de *F. graminearum* se observaron diferencias entre tratamientos, pero no igual de evidentes como en el caso de *R. solani*. Estos datos concuerdan con Patil et al. (2010), que encontraron diversas cepas antagonistas contra *R. solani* en condiciones *in vitro* y después analizaron su efecto en invernadero donde pudieron observar mediante microscopía electrónica la reducción de la enfermedad de las plántulas de maíz tratadas con *Streptomyces tricolor* vh85. En nuestro estudio evaluamos la infección por parte de los hongos mediante el posterior reaislamiento de las hojas del maíz. Además, se observó un aumento del peso seco de la parte aérea en las plantas inoculadas, lo que implica una reducción de los efectos causados por los patógenos.

Por otro lado, Mousa et al. (2015), a diferencia de nuestros ensayos, consiguieron alcanzar la producción en ensayos de invernadero, observando que las plantas de maíz tratadas con las bacterias endófitas mostraron una notable reducción de la contaminación de micotoxinas producidas por *F. graminearum*, durante el almacenamiento. En nuestro caso, por causas de tiempo y espacio, no fue posible llegar a producción en condiciones de invernadero. Sin embargo, nuestros resultados permiten extrapolar que ha habido infección, debido al posterior aislamiento del hongo inoculado. Esto concuerda con resultados previos de diversos

estudios en los que no se observan síntomas de infección hasta que la planta de maíz se encuentre en un estado avanzado de desarrollo (Reuveni et al. 2002; Hashem et al. 2010).

Además, tanto en las plantas infectadas con *R. solani* como en las de *F. graminearum*, las cepas seleccionadas estimularon el crecimiento de la parte aérea del maíz y se incrementaron los valores de clorofila obtenidos a lo largo del ensayo. En este sentido, Costa Pinto et al. (2000) relacionaron la disminución del contenido en clorofila en las hojas de maíz con las toxinas producidas por la infección del hongo *Fusarium moniliforme*, ya que su infección afecta al metabolismo del cloroplasto. En nuestro ensayo, los tratamientos control infectados con ambos hongos pero no inoculados presentaban menores valores de clorofila que las plantas inoculadas con las cepas seleccionadas. Estos resultados nos indican, que las plantas inoculadas tienen mejor contenido nutricional que las plantas control y podrían sobrellevar mejor la enfermedad causada por los hongos fitopatógenos.

Este efecto inhibitorio por parte de las cepas inoculadas puede deberse también a que todas las cepas utilizadas eran capaces de producir sideróforos, cualidad importante para los microorganismos utilizados como agentes de biocontrol, ya que mediante la producción de sideróforos privan a los hongos patógenos del acceso al hierro del suelo (Loper and Henkels 1999). Este efecto, fue descrito por primera vez por Kloepper et al. (1980), al observar la importancia de la producción de sideróforos en el control biológico de *Erwinia carotovora* por cepas de *Pseudomonas fluorescens* que promovían el crecimiento de las plantas.

Finalmente, las plantas de maíz inoculadas con las bacterias endófitas pertenecientes al género *Rhizobium* produjeron mayor beneficio a las plantas previamente infectadas con los hongos fitopatógenos (ambos) y co-inoculadas con la cepa CRZM149R, perteneciente al género *Streptomyces*. Por lo que, los resultados obtenidos de nuestro y otros estudios podrían suponer una reducción de las pérdidas económicas causadas por las enfermedades que producen dichos hongos fitopatógenos que tanto afectan al sector agrícola. Además, con el uso de bacterias endófitas, se podría disminuir la contaminación producida por el uso de plaguicidas y fungicidas que entran directa o indirectamente en los ecosistemas y posteriormente se biomagnifican en la cadena alimentaria, poniendo en peligro el ecosistema y la salud pública.

Futuros estudios deberían ser realizados para validar este resultado en condiciones de invernadero o en condiciones que permitieran el óptimo desarrollo del maíz para que se observase el efecto en las mazorcas de maíz y medir los niveles de micotoxinas producidas. La medida de la concentración de micotoxina daría pie a saber si estos niveles se encuentran por debajo de los umbrales de seguridad permitidos en alimentación. En ese caso, la aplicación en maíz de biofertilizantes formulados con las cepas analizadas en este estudio (una coinoculación de *Rhizobium* con *Streptomyces*) podrían mitigar los efectos causados por los hongos fitopatógenos *R. solani* y *F. graminearum*.



***Análisis de la colonización e infección  
de bacterias seleccionadas en plantas  
de maíz.***

**Capítulo III**



## 1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ASOCIADAS A LA COLONIZACIÓN.

Entre los polisacáridos insolubles, la celulosa parece jugar un importante papel en la adhesión firme a las superficies, siendo además esencial para la formación de biofilms maduros (Flemming and Wingender 2010). Por tanto, las cepas que sean capaces de formar celulosa podrían ser unas excelentes candidatas para la formulación de bioinoculantes ya que, a priori, les proporcionará ventajas en la adhesión y colonización de las plantas, y después podrían formar biofilms que contribuirán al crecimiento, desarrollo y defensa de la planta. Por tanto, en este apartado evaluaremos la capacidad de todos los aislados del estudio para biosintetizar celulosa y la capacidad de los aislados seleccionados para formar biofilms.

### 1.1 Producción de celulosa.

Las microfibrillas de celulosa son uno de los polisacáridos bacterianos (Davey and O'toole 2000) esenciales para la adhesión de la bacteria a los pelos radicales y la mantienen en la superficie radicular (Dazzo et al. 1984; Smit et al. 1987; Mateos et al. 1995). Fue en nuestro grupo de investigación donde se consiguieron detectar dichas microfibrillas en cepas del género *Rhizobium* (Mateos et al. 1995).

Más adelante, Robledo et al. (2012), examinaron la capacidad para producir celulosa de una colección de especies pertenecientes a los Rhizobiaceae, encontrando que todas las especies examinadas producían celulosa en mayor o menor grado. Además, comprobaron que existe una enorme variación incluso entre cepas de la misma especie. Para su clasificación, establecieron una escala de coloración que abarcaba desde el rosa pálido al rojo intenso, con los tonos descritos en la "Royal Horticultural Society Color Chart" de la Royal Horticultural Society (1966) (Robledo, TD, 2010). Con el fin de determinar la capacidad de nuestros aislados para producir celulosa se realizaron siembras en medio que contenía una determinada concentración de Rojo Congo (25mg/L) y se siguió la misma escala de coloración citada anteriormente.

Los resultados observados se muestran en la tabla 50 y las distintas tonalidades observada en la figura 36. Se observó que el 52,9% de los aislados eran capaces de producir celulosa en mayor o menor medida, que el 35,3% lo hacían de manera débil y que solamente el 11,8% no era capaz de producir este tipo de polisacárido. Por tanto, el 88,2% de las cepas podrían tener una ventaja para iniciar la colonización de la planta frente a otros microorganismos que no dispongan de esta capacidad.

Tabla 50. Resultados obtenidos por parte de los aislados de este estudio de la producción de celulosa *in vitro*. (++) Fuerte producción; (+) Producción; (w) Producción débil; (-) Sin producción.

<i>Cepa</i>	<i>Celulosa</i>	<i>Cepa</i>	<i>Celulosa</i>
CRZM 01R	+	CRZM 74T	d
CRZM 02R	+	CRZM 77R	d
CRZM 03R	+	CRZM 79R	d
CRZM 04R	+	CRZM 81R	d
CRZM 06R	+	CRZM 84R	-
CRZM 09R	-	CRZM 86R	d
CRZM 13R	d	CRZM 87R	+
CRZM 18R	+	CRZM 89R	d
CRZM 21R	d	CRZM 90R	+
CRZM 22R	-	CRZM 91R	d
CRZM 23R	-	CRZM 92R	d
CRZM 25R	+	CRZM 94T	d
CRZM 26R	-	CRZM 96R	+
CRZM 27R	-	CRZM 97R	d
CRZM 28R	+	CRZM 98R	++
CRZM 30R	d	CRZM 99R	+
CRZM 31T	+	CRZM 100R	+
CRZM 36T	-	CRZM 101R	-
CRZM 39R	+	CRZM 102R	+
CRZM 42R	+	CRZM 103R	+
CRZM 43R	+	CRZM 107R	+
CRZM 46T	d	CRZM 111R	d
CRZM 47T	d	CRZM 118R	+
CRZM 51R	+	CRZM 122R	+
CRZM 52R	+	CRZM 125T	+
CRZM 55R	+	CRZM 126T	+
CRZM 56R	+	CRZM 129R	+
CRZM 57R	+	CRZM 133T	+
CRZM 58R	+	CRZM 135R	d
CRZM 59R	d	CRZM 139R	d
CRZM 60R	d	CRZM 145T	+
CRZM 62R	+	CRZM 147R	+
CRZM 65R	d	CRZM 149R	+
CRZM 72R	d	CRZM 155R	d

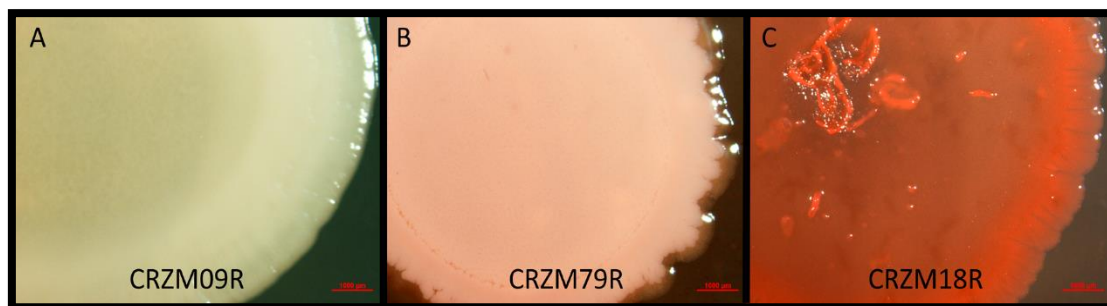


Fig. 36. Placa de YMA con Rojo Congo en la que se puede ver la producción de celulosa. A) Ausencia de celulosa; B) Producción débil de celulosa; C) Producción positiva de celulosa.

### 1.2 Determinación de la formación de biofilms *in vitro*.

La formación de biofilms ofrece ventajas importantes en cuanto a la adhesión, agregación de las células, aprovechamiento de agua, barrera protectora, absorción de componentes orgánicos, absorción de iones orgánicos, fuente de nutrientes, intercambio de electrones, entre otros (Flemming and Wingender 2010). Debido a la importancia que tiene la formación de biofilms por parte de los microorganismos, se realizaron ensayos llevados a cabo según Fujishige et al. (2006). Se utilizaron placas de microtitulación de PVC (cloruro de polivinilo) para determinar la capacidad de adhesión bacteriana a sustratos abióticos permitiendo realizar, de este modo, estimaciones cuantitativas. Las bacterias que sean capaces de adherirse a la superficie abiótica tendrán la capacidad de formar biofilms; por el contrario otras no serán capaces de adherirse, permaneciendo suspendidas en el medio en estado planctónico.

Ya se ha descrito con anterioridad la capacidad de formar biofilms por parte numerosas especies de *Rhizobium*, como por ejemplo *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Fujishige et al. 2006), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Janczarek 2011) o *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* (Fujishige et al. 2006; Bogino et al. 2013), entre otros.

En este estudio, utilizamos la técnica que emplea el colorante cristal violeta para teñir las bacterias, tanto las que han conseguido adherirse a la superficie, como las que se encuentran en suspensión. Tras sucesivos lavados con agua, únicamente permanecerán en el pocillo aquellas que se adhirieron y unieron de forma irreversible al pocillo de la placa. Cuanto más intensa sea la coloración presente, más cantidad de bacteria ha conseguido quedar adherida y formar biofilms. Si a las 72 h una cepa muestra más coloración que la que se midió a las 24 h, es porque el biofilm ha conseguido afianzarse y mantenerse, suponiendo que además la cepa ha continuado creciendo.

Esta prueba se realizó con las cepas del estudio seleccionadas (CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R, CRZM87R, CRZM91R, CRZM92R, CRZM149R), realizando medidas a las 24, 48 y 72 horas, de este modo obtendremos una primera aproximación progresiva del potencial de las bacterias para formar biofilms.

Antes de la tinción con cristal violeta, se midieron las densidades ópticas de los cultivos con el fin de obtener una pequeña curva de crecimiento, al igual que se verificó la ausencia de contaminaciones. Puesto que las cepas de *Rhizobium* presentan una curva de crecimiento

diferente de la cepa de *Streptomyces*, no podemos comparar la formación de biofilms entre ellas, por lo que presentaremos los datos por separado.

En el caso de las cepas de *Rhizobium*, se observaron tres tendencias de formación de biofilms (Figura 37): (i) tendencia de producción de biofilm va aumentando a lo largo del tiempo, como es el caso de las cepas CRZM52R, CRZM87R y CRZM92R; (ii) tendencia que disminuye en las sucesivas medidas tomadas, como es el caso de la cepa CRZM91R, pudiendo deberse a que el biofilm ha comenzado a disgregarse y, (iii) tendencia donde el valor máximo se da a las 48 horas y después este valor disminuye a las 72 horas, como en el caso de la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, pudiendo deberse a que la estructura del biofilm es tan grande que no consigue permanecer adherida y termina por caer o que ha comenzado a disgregarse. Estos resultados se correlacionan con la producción de polisacáridos por parte de las cepas seleccionadas, puesto que las cepas CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM91R y CRZM92R son más mucosas que el resto. Sin embargo, de ellas, la que presenta mayor afinidad por el Rojo Congo, CRZM18R<sup>T</sup>, es decir mayor cantidad de celulosa, es capaz de adherirse de una forma no reversible y formar un biofilm más desarrollado. Los polisacáridos de las cepas CRZM52R y CRZM87R también presentaban afinidad por Rojo Congo, siendo mayoritariamente celulosa y por ello se adhieren y desarrollan biofilms de manera similar a la cepa CRZM18R<sup>T</sup>. La diferencia en la tendencia seguida puede deberse a que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> llegue antes a fase estacionaria de crecimiento que el resto. En cuanto a las cepas CRZM91R y CRZM92R, no presentaron coloración en los ensayos de producción de celulosa, lo que puede correlacionarse con la menor formación de biofilms en este ensayo. Por lo tanto, podemos decir que existe una relación entre la producción de celulosa y la formación de biofilms en las cepas del género *Rhizobium*, lo que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en nuestro grupo de investigación (Robledo et al 2012).

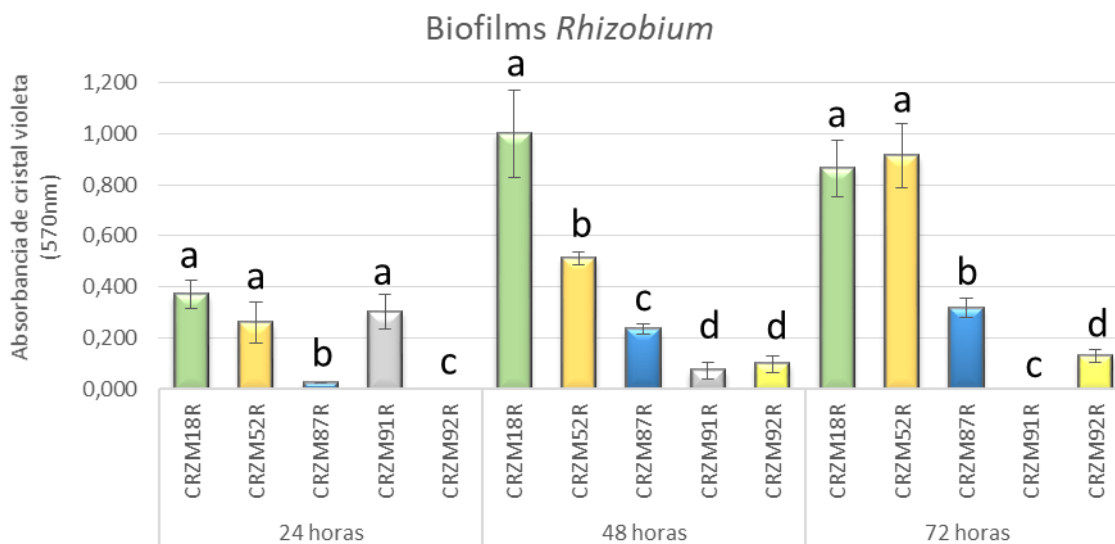


Fig. 37. Resultados de las absorbancias medidas para las cepas correspondientes al género *Rhizobium* a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento a 28°C en YMB. Los valores son la media de 6 medidas tomadas por cada una de las cepas. \*Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p<0,05).

Además, cuando comparamos las tendencias de formación de biofilms descritas anteriormente con las descritas en otros estudios de nuestro grupo de investigación, encontramos que las cepas CRZM52R, CRZM87R y CRZM92R, mostraron una tendencia que aumentaba a lo largo de los días medidos, similar a los obtenidos por *R. leguminosarum* TPV08 (Diez-Mendez et al. 2015), *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. ANU843 (Robledo et al. 2012) y

*Rhizobium* sp. PEPV12 (Jiménez-Gómez et al. 2016). Por otro lado, la tendencia observada en la cepa CRZM91R era similar a la observada en *E. medicae* WSM419 (T.D Menéndez 2014). Por último, la tendencia que presentaba la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, era similar a las observadas en las cepas *R. cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> (Diez-Mendez et al. 2015).

Una tendencia similar a la observada en caso de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> se observó también en el caso de la cepa CRZM149R de *Streptomyces* (Figura 38), la cual presenta un gran aumento de la cantidad de biofilm a las 48 horas y una pequeña disminución producida a las 72 horas. Estudios futuros deben ajustar y/o establecer puntos de lectura adicionales, como por ejemplo, en el caso de la cepa de *Rhizobium* CRZM91R se deberían realizar las lecturas a las 6 y 12 horas. De igual forma, y según su cinética de crecimiento, deberían establecerse diferentes puntos de lectura en el caso de la cepa CRZM149R de *Streptomyces*.

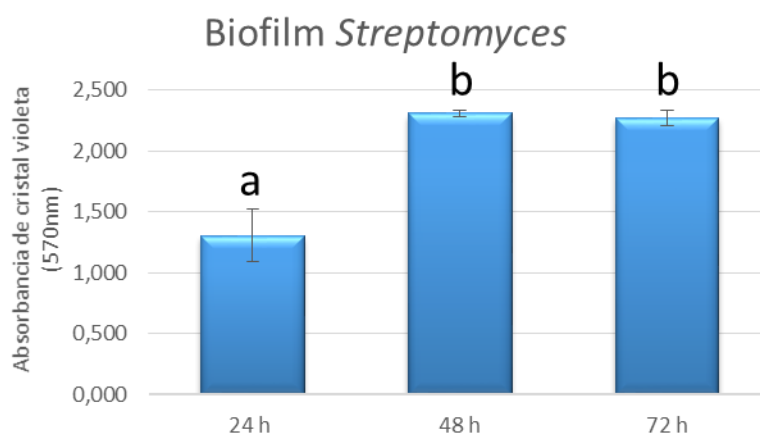


Fig. 38. Resultados de las absorbancias medidas para las cepas correspondientes al género *Streptomyces* a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento a 28°C en YMB. Los valores son la media de 6 repeticiones.\*Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher  $p \leq 0,05$ ).

También son numerosos los autores que han demostrado la capacidad de algunas cepas de *Streptomyces* para formar biofilms como por ejemplo *S. griseus* ATCC13273 (Winn et al. 2014) y *S. venezuelae* ATCC10712<sup>T</sup> (Li et al. 2007), entre otros; además, estas cepas presentaban la misma tendencia de crecimiento que la cepa CRZM149R, en la que el biofilm aumenta de tamaño pero finalmente disminuye. En el caso de la cepa CRZM149R, la producción de celulosa también resultó positiva, el polisacárido producido por esta cepa presentaba afinidad por el Rojo Congo. Nuestros resultados podrían relacionarse con los presentados por De Jong et al. (2009) que determinaron que la adhesión de *S. coelicolor* (formación de biofilms) está mediada por fibras amiloides ancladas a la célula mediante fibras de celulosa, presentando ambas afinidad por Rojo Congo.

## 2. INOCULACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN SEMILLAS DE ZEA MAYS.

Para realizar una primera aproximación de las aptitudes de los microorganismos seleccionados para promover el crecimiento vegetal en el maíz, comenzamos evaluando la capacidad de incrementar el número y el tamaño de raíces secundarias.

Para realizar este ensayo, se inocularon 12 plántulas de maíz por cada tratamiento, con los correspondientes controles sin inocular y se tomaron medidas a los 4dpi, 7dpi y 9dpi. Debido que a los 9dpi, es cuando se obtienen mayores diferencias, son los datos que analizaremos en este ensayo (Figura 39).

Los tratamientos inoculados en este ensayo fueron: inoculaciones simples de las distintas cepas de *Rhizobium* (CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R, CRZM87R, CRZM91R y CRZM92R) y de *Streptomyces* (CRZM149R), además de las respectivas coinoculaciones de las cepas de *Rhizobium* junto con la cepa de *Streptomyces*.

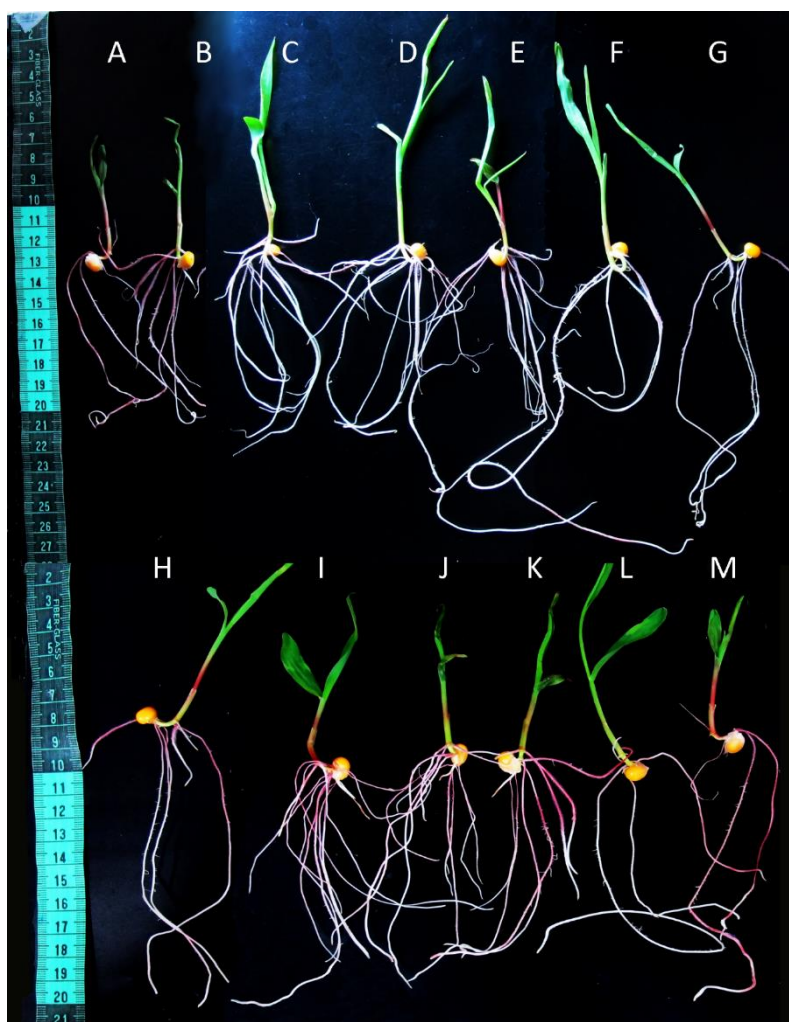


Fig. 39. Aspecto de las plántulas de maíz, a los 9dpi, inoculadas con distintas cepas con los tratamientos: A) control sin inocular; B) CRZM149R; C) CRZM18R<sup>T</sup>; D) CRZM52R; E) CRZM87R; F) CRZM91R; G) CRZM92R; H) control sin inocular; I) CRZM18R<sup>T</sup>+149R; J) CRZM52R+149R; K) CRZM87R+149R; L) CRZM91R+149R; M) CRZM92R+149R.



Cuando se analizaron los datos obtenidos (Tabla 51), se pudo observar que las longitudes de la raíz principal fueron superiores en el caso de las inoculaciones y coinoculaciones respecto al control sin inocular, obteniendo los mejores resultados con las cepas CRZM87R, CRZM91R y CRZM92R+149R, con aumentos del 49,3%, 50% y 40%, respectivamente.

En el caso de las raíces adventicias se obtuvieron los mejores resultados con las inoculaciones simples, siendo los mejores los obtenidos con los tratamientos CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R y CRZM87R, con incrementos del 300%, 403,7% y 241,7%, respectivamente.

Tabla 51. Resultados obtenidos a los 9dpi, inoculando diferentes cepas y sus combinaciones sobre plántulas de maíz.

Tratamiento	Longitud raíz principal (cm)	Número de raíces adventicias
Control	10,00±0,35a	3,00±0,58a
CRZM149R	10,92±0,35b	6,90±0,31b
CRZM18R <sup>T</sup>	11,06±0,50b	12,00±0,42c
CRZM18R <sup>T</sup> +149R	12,18±0,62c	11,00±0,54cd
Control	10,00±0,35a	3,00±0,58a
CRZM149R	10,92±0,35a	6,90±0,31b
CRZM52R	11,38±0,30b	15,11±0,35c
CRZM52R+149R	12,17±0,53b	13,11±0,42cd
Control	10,00±0,35a	3,00±0,58a
CRZM149R	10,92±0,35a	6,90±0,31b
CRZM87R	14,93±0,53b	10,25±0,53c
CRZM87R+149R	11,22±0,36a	7,14±0,34cd
Control	10,00±0,35a	3,00±0,58a
CRZM149R	10,92±0,35a	6,90±0,31b
CRZM91R	15,00±0,26b	6,38±0,38b
CRZM91R+149R	14,64±0,62b	3,17±0,48a
Control	10,00±0,35a	3,00±0,58a
CRZM149R	10,92±0,35b	6,90±0,31b
CRZM92R	13,14±0,51c	4,00±0,31ab
CRZM92R+149R	14,00±0,29d	3,50±0,22ab

\*Los valores representan la media ± el error estándar de 12 plantas por cada uno de los tratamientos.

\*Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher  $p \leq 0,05$ ).

Como hemos podido comprobar todas las plántulas de maíz inoculadas mejoraban tanto su longitud como el número de raíces adventicias en mayor o menor medida. Al igual que en nuestro ensayo, Cassán et al. (2009) también observaron un incremento en el peso seco radicular del maíz en aquellos tratamientos inoculados con *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *A. brasilense* Az39 en comparación con las raíces control sin inocular. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, las inoculaciones no incrementaron la longitud de las raíces.

Estos efectos positivos en el desarrollo radicular pueden ser debidos a la producción de AIA producido por las bacterias inoculadas, ya que las auxinas promueven el crecimiento de las raíces, aunque por otro lado, una alta concentración podría producir un retardo en el crecimiento de las raíces (Facella et al. 2012; Taiz et al. 2015). En este trabajo, pudimos comprobar que todas las cepas utilizadas para la inoculación de las semillas de maíz producían en mayor o en menor medida ácido indol acético. Además, las auxinas controlan otros procesos vegetales como la iniciación de las raíces laterales, la diferenciación vascular y el desarrollo embrionario, entre otros (Hopkins and Huner 2004; Smith 2008; Facella et al. 2012; Muday et al. 2012; Niklas and Kutschera 2012). Estas ventajas podrían dar lugar a una mayor

superficie radicular y por tanto una mayor absorción de agua y nutrientes minerales disueltos en ella, pudiendo repercutir en un mejor desarrollo de la planta. Este incremento está relacionado también con la mejora de la planta para soportar mejor las fluctuaciones ambientales, pues la raíz llega a capas más profundas del suelo y es menos sensible a las situaciones de estrés hídrico o nutricional (Egorshina and Khairullin 2012). De esta manera, podrían producirse una mayor cantidad de asociaciones simbióticas con los microorganismos del suelo, ya que, las raíces de la planta exudan compuestos químicos a la rizosfera que favorecen el crecimiento de gran cantidad de microorganismos (Anaya-López and González-Chavira 2011). Estos exudados, son ricos en compuestos carbonados, aminoácidos, vitaminas y derivados fenólicos, que se caracterizan por la capacidad de atraer especies microbianas específicas mediante quimiotaxis, restringiendo así la colonización de las raíces de las plantas por comunidades bacterianas específicas de toda la población microbiana presente en la rizosfera (Ahmed and Hasnain 2014).

### 3. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE LA COLONIZACIÓN DE LOS AISLADOS EN RAÍCES DE *ZEA MAYS*.

Para evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas para colonizar las raíces de maíz, realizamos ensayos *in vitro* para posteriormente visualizar la colonización mediante microscopía de fluorescencia. Decidimos centrarnos en dos cepas de *Rhizobium* y la cepa perteneciente al género *Streptomyces* CRZM149R. Una de las cepas de *Rhizobium* fue la especie descrita en este estudio como *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup>, con el fin de comprobar los efectos de interacción y promoción con el maíz; la otra cepa fue *Rhizobium leucaenae* CRZM52R, debido a los buenos resultados de promoción radicular que junto a *R. zea* obtuvimos en el ensayo realizado en plántulas. Por otra parte, seleccionamos la cepa de *Streptomyces* CRZM149R debido a su posible potencial como promotor del crecimiento vegetal y como agente de biocontrol. Además, en el ensayo anterior produjo una mejora radicular en las plántulas de maíz cuando fue coinoculada con ambas cepas de *Rhizobium* seleccionadas.

Para ello, las cepas de *Rhizobium* fueron marcadas con el plásmido pHc60 que contiene el gen de la *gfp* que codifica para una proteína verde fluorescente, lo cual nos permite observar la colonización mediante microscopía de fluorescencia. Además, la raíz se tiñó con una solución de contraste, yoduro de propidio, que emite fluorescencia roja. De esta manera se distingue claramente qué espacios de la raíz son colonizados por la bacteria. Muchos autores han demostrado ya el potencial de marcar las bacterias con GFP para la visualización *in situ* de las mismas en las raíces de cereales (Chi et al. 2005; Deng et al. 2014; Ji et al. 2014; Mitra 2014).

Por otro lado, para el marcaje de la cepa de *Streptomyces*, se utilizó el plásmido pTST101-mCherry (Heichlinger and Ammelburg 2011) que contiene un gen que emite para una proteína fluorescente de color rojo. De esta manera, podremos identificar la colonización tanto de las bacterias de *Rhizobium* (verde) como las de *Streptomyces* (rojo) cuando éstas están coinoculadas en la raíz de maíz. En este caso, las raíces no se tiñen puesto que el contraste es del color rojo. Las raíces se observan en campo claro.

Tras la inoculación de las cepas seleccionadas, se realizaron observaciones periódicas al microscopio de fluorescencia, para analizar de qué manera se distribuían y crecían sobre la superficie radicular del maíz.

Debido al rápido desarrollo de la raíz del maíz, determinamos que los días óptimos para este ensayo son a los 10 y a los 14 dpi (días post inoculación), ya que a menos días no da tiempo a observar la colonización por parte de la cepa de *Streptomyces* y después de estos, la raíz del maíz sería demasiado grande para este tipo de ensayo.

En primer lugar, observaremos las inoculaciones simples realizadas en las raíces de maíz. En el caso de la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, a los 10 dpi, colonizaba con éxito la superficie de la raíz del maíz (Fig. 40A), observándose también pequeñas formaciones de biofilms sobre la superficie radicular (Fig. 40B). A los 14 dpi, se puede observar el incremento de la colonización por parte de la cepa de *Rhizobium* (Fig. 40C), así como biofilms de mayor tamaño (Fig. 40D).

En el caso de la inoculación por parte de la cepa CRZM52R, se puede observar a los 10 dpi una colonización difusa de la superficie de la raíz (Fig. 40E) y una predilección por la zona de los pelos radiculares (Fig. 40F), donde se puede observar una especie de hilo de infección (*Infection thread-like*), similar al que forman los rhizobia en los pelos radiculares de plantas leguminosas (Murray 2011). A los 14 dpi, se observa un ligero aumento de la colonización sobre la superficie radicular con alguna pequeña formación de biofilm (Fig. 40G), además se pudo observar una predilección por las bacterias al lugar de emergencia de una de las raíces secundarias (Fig. 40H).

Por otro lado, se hace notable en las imágenes de la colonización de la cepa CRZM149R perteneciente al género *Streptomyces*, que en ambos días observados, desarrolla una colonización más discreta que la observada en el caso de los rhizobia. En las imágenes, se puede apreciar una cierta predilección por colonizar los pelos radicales de la raíz del maíz (Fig. 40 I, J y L) y también unas pequeñas aglomeraciones en forma de biofilms sobre la superficie de la raíz de maíz (Fig. 40K).

Por tanto, se observa que se produce un incremento de la colonización con el paso del tiempo tanto de las cepas de *Rhizobium* como en la de *Streptomyces*. Además, cabe la posibilidad de que las zonas de emergencia de las raíces secundarias sean una ruta de entrada a la planta. Este mecanismo de entrada ha sido observado en raíces de arroz al inocular *Azorhizobium caulinodans* (Senthilkumar et al. 2008) y *Azospirillum brasilense* (Jain and Gupta 2003), entre otros. Además, se pudo confirmar también la capacidad de los aislados para formar biofilms no solo *in vitro*, si no también *in planta*.

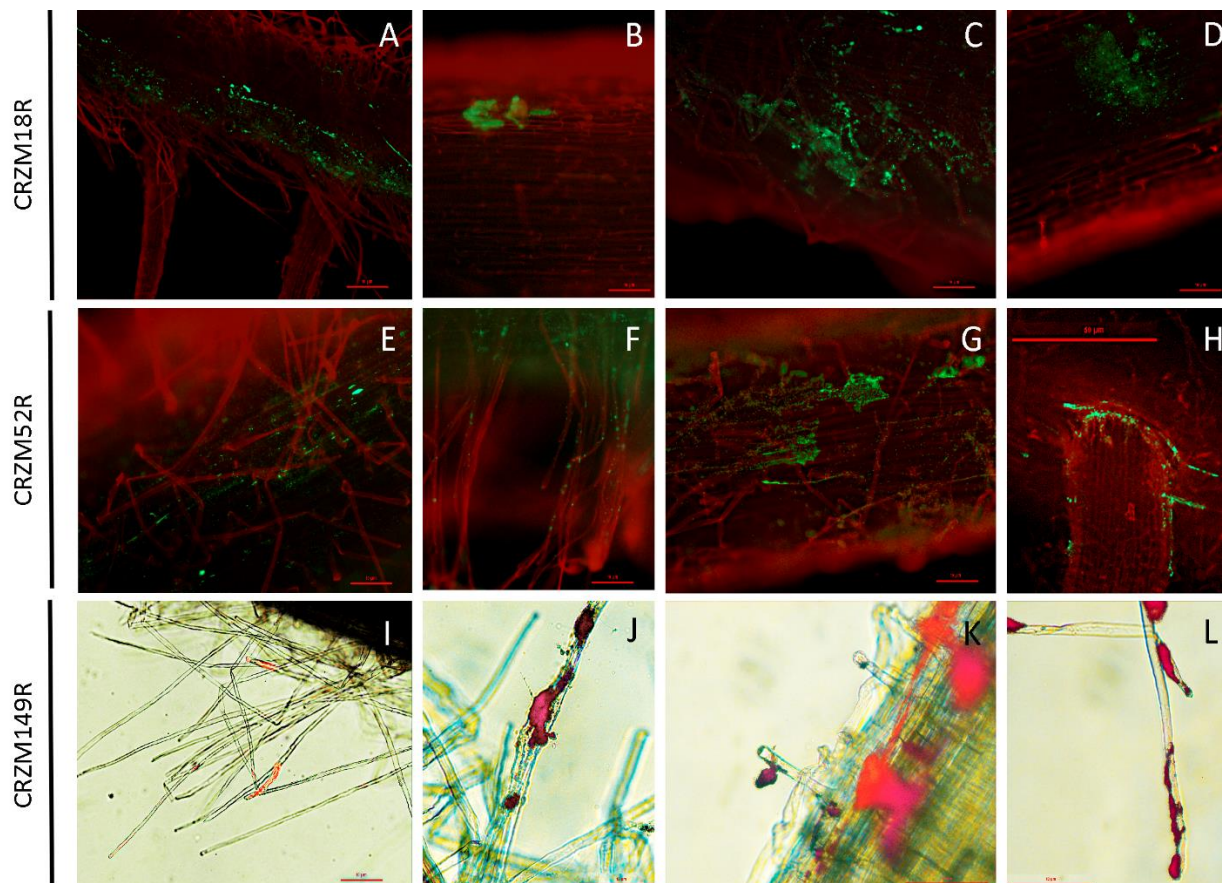


Fig. 40. Microscopía de fluorescencia de raíces de maíz inoculadas con las cepas seleccionadas. A) Vista general de la raíz de maíz colonizada de manera homogénea por la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, a los 10 dpi; B) Detalle de la raíz a los 10 dpi, que muestra una formación de biofilm por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> sobre la superficie del maíz; C) Colonización intercelular de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> de la superficie de la raíz de manera homogénea, a los 14 dpi; D) Detalle de formación de biofilms a los 14 dpi, por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> sobre la superficie de la raíz; E) Superficie de la raíz colonizada de manera homogénea y difusa por la cepa CRZM52R a los 10 dpi; F) En la parte superior de la imagen, se observa la superficie de la raíz a los 10 dpi, colonizada por la cepa CRZM52R de manera homogénea, mostrando además, una abundante colonización sobre los pelos radicales; G) Colonización difusa por la superficie radicular por parte de la cepa CRZM52R a los 14 dpi; H) Detalle de la colonización por parte de la cepa CRZM52R a los 14 dpi, en una zona de emergencia de una de las raíces secundarias; I) Colonización a los 10 dpi, por parte de la cepa CRZM149R de *Streptomyces* en el ápice de algunos pelos radicales; J) Detalle de la colonización a los 10 dpi, por parte de la cepa CRZM149R sobre un pelo radical del maíz; K) Colonización producida por la cepa CRZM149R a los 14 dpi en la superficie de la raíz y en los pelos radiculares; L) Detalle de la colonización producida a los 14 dpi, por la cepa de *Streptomyces* a lo largo de un pelo radical.

En el caso de las coinoculaciones de las cepas de *Rhizobium* con las de *Streptomyces*, pudimos observar que en la coinoculación de las cepas CRZM18R<sup>T</sup>+149R a los 10 dpi, se observa una colonización difusa por la superficie radicular por parte de *Rhizobium* y por parte de la cepa de *Streptomyces* la colonización se producía sobre la punta de algunos pelos radiculares (Fig. 41A y B). Sin embargo, a los 14 dpi, se puede observar que la cepa CRZM149R comienza a colonizar las raíces secundarias y que la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> se incrementa en la superficie radicular alcanzando también las raíces secundarias (Fig. 41C y D). A los 10 dpi, se puede observar en la coinoculación realizada con las cepas CRZM52R+149R una efectiva colonización por parte de la cepa de *Rhizobium* y una gran estructura tridimensional adherida a la superficie de la raíz del maíz por parte de la cepa de *Streptomyces* (Fig. 41E), así como una colonización sobre los pelos radiculares (Fig. 41F). A los 14 dpi, podemos ver la colonización de *Rhizobium* por la superficie de la raíz y la cepa de *Streptomyces* sobre los pelos radiculares y sobre la superficie radicular (Fig. 41G y H).

Por tanto, podemos apreciar que en las coinoculaciones se observa el lento desarrollo de la cepa CRZM149R comparado con la colonización presentada por las cepas de *Rhizobium*, lo que nos hace pensar que a los 10 dpi solo podemos observar una colonización discreta sobre los ápices de los pelos radicales ya que podrían necesitar más días para desarrollarse en las raíces del maíz.

Son pocos los trabajos encontrados de coinoculación de cepas de *Streptomyces* con *Rhizobium* en cultivos de plantas, por ejemplo Li and Alexander (1990) coinocularon el cultivo de soja, con cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Streptomyces* y *Bacillus* con el fin de promover su nodulación; Aung and Takeo (2015) evaluaron la coinoculación de *Bradyrhizobium* y *Streptomyces* en soja y en maíz observando un incremento en el peso seco de las raíces únicamente en el cultivo de soja. Pero hasta la fecha y según nuestro conocimiento, dichos trabajos se han llevado a cabo para promover la nodulación en cultivos de leguminosas, pero no han incluido ensayos donde muestren colonización.

No obstante, la colonización de *Rhizobium* y *Streptomyces* si ha sido estudiada, inoculando varias cepas por separado en cereales. Varias especies y cepas de rizobios son capaces de colonizar la superficie de las raíces o el interior del trigo (Sabry et al. 1997), arroz cultivado y salvaje (Yanni et al. 1997; Chaintreuil et al. 2000; Singh et al. 2009), cebada y canola (Lupwayi et al. 2004), *Arabidopsis* (Stone et al. 2001) y álamo (Doty et al. 2005). En el caso del maíz, varios trabajos estudiaron las capacidades PGPR de distintas cepas de *Rhizobium* y su interacción y efecto promotor del crecimiento en plantas de maíz; sin embargo, no visualizaron las cepas interaccionando con las raíces del maíz (Chabot et al. 1996; Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero 2001; Rosenblueth and Martínez-Romero 2004; Ormeño-Orrillo et al. 2008).

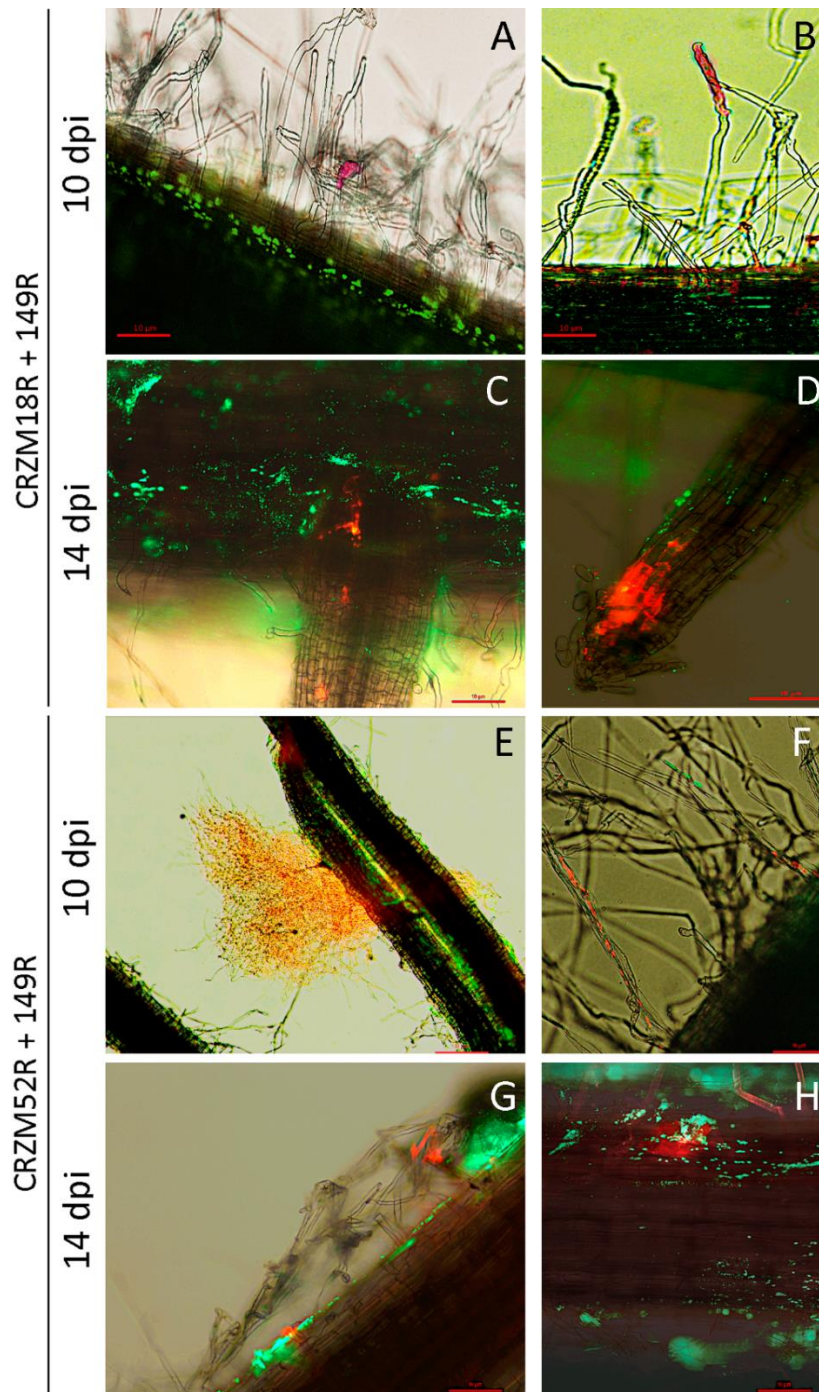


Fig. 41. Microscopía de fluorescencia de raíces de maíz coinoculadas con las cepas seleccionadas. A y B) Coinoculación a los 10 dpi, de las cepas CRZM18R<sup>T</sup> de *Rhizobium* y la cepa CRZM149R de *Streptomyces*, ambas imágenes muestran la colonización en la superficie de la raíz por parte de la cepa de *Rhizobium* y la colonización sobre los pelos radicales por parte de la cepa de *Streptomyces*; C) Colonización extensa y en superficie producida por la cepa de *Rhizobium* CRZM52R y una leve colonización sobre una de las raíces secundarias por parte de la cepa de *Streptomyces* CRZM149R a los 14 dpi; D) Detalle a los 14 dpi de una raíz secundaria en la que se puede observar la colonización por parte de ambas cepas, la cepa de *Streptomyces* es mayoritaria en la zona del ápice mientras que el *Rhizobium* se extiende discretamente a lo largo de la raíz; E) Vista general a los 10 dpi de las raíces secundarias de la raíz del maíz coinoculada con la cepa CRZM52R de *Rhizobium* y la cepa CRZM149R de *Streptomyces*, donde se observa una colonización homogénea por la superficie de la raíz por parte de la cepa de *Rhizobium* y un gran biofilm producido por la cepa de *Streptomyces* sobre la parte de los pelos radicales y otra acumulación en el ápice de una de las raíces; F) Detalle de los pelos radiales de la raíz donde se observa colonización a los 10 dpi por ambas bacterias inoculadas, tanto de *Rhizobium* como de *Streptomyces*; G) Detalle de la superficie del maíz a los 14 dpi, en las que se observa una colonización mayor por parte de la cepa de *Rhizobium*, y donde la cepa de *Streptomyces* coloniza algunos pelos radicales; H) Colonización discreta a los 14 dpi, por parte de ambas cepas en la raíz principal del maíz.

En el caso de *Streptomyces*, también se realizaron estudios de colonización y localización en cereales. A diferencia de nuestro estudio, Coombs and Franco (2003), observaron la colonización ejercida por una cepa endófito de *Streptomyces* en semillas de trigo, desde las 24 horas hasta los 3 dpi, y fue a los 3 dpi, donde comenzaron a observar colonización en el endospermo y en la radícula emergente del embrión, lo que indicaba que la bacteria era capaz de asociarse con el huésped en una etapa muy temprana del desarrollo de la planta. Sin embargo, obtuvimos resultados similares al estudio de Toumatia et al. (2016), que inocularon *S. mutabilis* en raíces de trigo, observando que a los 10 dpi existía colonización en la superficie de la raíz, especialmente en la zona de los pelos radiculares.

Por tanto, como hemos podido comprobar en este trabajo, tanto las cepas de *Rhizobium* y de *Streptomyces* probadas son capaces de colonizar con éxito la superficie radicular del maíz, sin causarles daño alguno, es más, en son capaces de mejorar significativamente el crecimiento radicular de las mismas.

#### **4. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA INFECCIÓN DE LOS AISLADOS EN LAS RAÍCES DE ZEA MAYS.**

La microscopia confocal en combinación con las bacterias marcadas con proteínas fluorescentes es una poderosa herramienta para el estudio de las interacciones planta-microorganismo (Dhandayuthapani et al. 1995; Chi et al. 2004; Liu et al. 2006).

Para discernir si las cepas inoculadas alcanzaban el interior del maíz, realizamos un ensayo a los 14 dpi, en las mismas condiciones y las mismas cepas que en el apartado anterior pero en este caso realizando cortes transversales de las raíces de maíz y utilizando microscopia confocal.

Además, para un mayor contraste y para visualizar mejor la estructura de la planta, se tiñeron con Yoduro de Propidio las raíces de los tratamientos inoculados con las bacterias de *Rhizobium* marcadas con GFP y, tanto los tratamientos de las coinoculaciones como las inoculaciones simples con la cepa de *Streptomyces* marcada con mCherry se observaron en las raíces sin teñir en el campo visible.

El primer tratamiento observado fue el inoculado con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificado como *Rhizobium zea*. Se puede apreciar en la figura 42A que en la zona señalada hay una gran acumulación de bacterias, sugiriendo que existe en ese punto una vía de entrada de las bacterias al interior de la raíz. Se puede apreciar también que existen dos zonas de la corteza ampliamente colonizada por esta cepa e incluso un gran grupo de ellas han conseguido traspasar la endodermis alcanzando colonizar el cilindro central, mayoritariamente en la zona del xilema primario. Por tanto, apreciamos una infección intracelular en las raíces de maíz en los primeros estadios de crecimiento por parte de esta cepa.

La figura 42B, muestra el corte transversal de la raíz de maíz, inoculada con la cepa CRZM52R donde se puede observar colonización a lo largo de los pelos radicales, en la zona de la circunferencia de la rizodermis, una discreta infección de en el córtex de la raíz y algunas

bacterias ya en el interior del cilindro vascular así como en el interior del xilema primario. Además, se puede observar claramente una colonización intracelular.

La figura 42C, muestra en campo claro, la colonización producida por la coinoculación en las raíces de maíz por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> de *Rhizobium* (verde) y de la cepa CRZM149R de *Streptomyces* (rojo). Pudimos apreciar una colonización en el interior de la raíz mucho más discreta por parte de la cepa de *Rhizobium* que cuando fue inoculada sola; prácticamente la colonización se limitó a la zona de la rizodermis y alrededor de los vasos del xilema en el interior del cilindro central. Por otro lado, se puede observar que la cepa de *Streptomyces* ha colonizado los pelos de radicales de la raíz; también se puede ver que comienza a colonizar la zona de la rizodermis que coincide con la zona que más coloniza *Rhizobium* en este tratamiento.

En cuanto al tratamiento de la coinoculación de la cepa de *Rhizobium* CRZM52R con la cepa de *Streptomyces* CRZM149R (Figura 42D), podemos observar que la colonización por parte de la cepa de *Rhizobium* es muy similar a como coloniza cuando es inoculada sola sobre las raíces de maíz; observándose principalmente en las zonas de la rizodermis y en la zona del córtex. Sin embargo, se pudo apreciar que la cepa de *Streptomyces* había avanzado a través de la corteza córtex de la raíz, hecho que pudo venir dado por una entrada facilitada por la cepa de *Rhizobium*.

Cuando se inoculó la raíz de maíz con la cepa de *Streptomyces*, se pudo apreciar que la colonización era en su mayoría por la superficie de la raíz (Figura 42E) y parece tener cierta predilección por los pelos radiculares (Figura 42E y F).



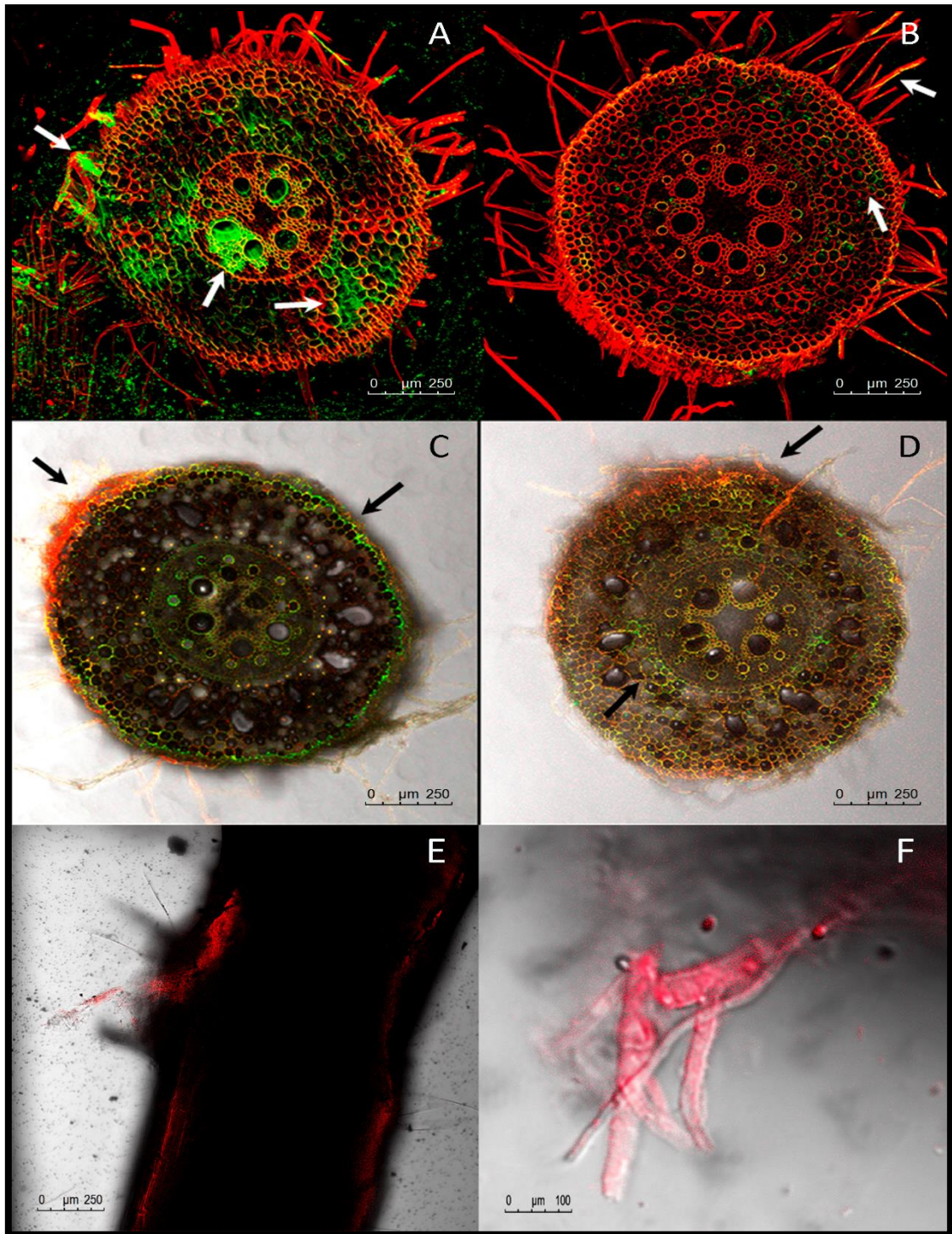


Fig. 42. Microscopía de confocal de raíces de maíz a los 14 días después de inocularlas con las cepas seleccionadas marcadas. A) Corte transversal de la raíz del maíz teñida con Yoduro de Propidio (rojo) donde se ve la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificada como *Rhizobium zeaе* marcada con GFP (verde); B) Corte transversal de la raíz del maíz teñida con Yoduro de Propidio (rojo) donde se ve la colonización por parte de la cepa CRZM52R identificada como *Rhizobium leucaenae* marcada con GFP; C) Corte transversal de la raíz del maíz donde se ve la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> (verde) y CRZM149R (rojo) en campo claro; D) Corte transversal de la raíz del maíz donde se ve la colonización por parte de la cepa CRZM52R (verde) y CRZM149R (rojo) en campo claro; E) Vista general de la raíz del maíz donde se puede apreciar la colonización de CRZM149R en la superficie radicular; F) Detalle de la colonización de la cepa de *Streptomyces* en los pelos radicales del maíz.

Con el fin de confirmar y de algún modo cuantificar, la colonización observada en los cortes transversales de los ensayos de microscopía confocal realizamos conteos de unidades formadoras de colonia (UFC) tanto de bacterias adheridas a la superficie radicular como de las que han entrado en el interior. Los datos de la cuantificación de la colonización en los distintos tratamientos inoculados y en distintas zonas de la raíz se pueden observar en la tabla 52.

Tabla 52. Cuantificación de la colonización por partes de las cepas inoculadas en distintas zonas de la raíz (Valores obtenidos por gramo de raíz).

Tratamiento		Bacterias levemente adheridas a la raíz (UFC/ml)	Bacterias firmemente adheridas a la raíz (UFC/ml)	Bacterias en el interior de la raíz (UFC/ml)
Control		--	--	--
CRZM18R <sup>T</sup>		4,0 x 10 <sup>5</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>
CRZM52R		2,1 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	6,9 x 10 <sup>3</sup>
CRZM149R		1,5 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	2,8 x 10 <sup>3</sup>
CRZM18R <sup>T</sup> +149R	CRZM18R <sup>T</sup>	2,7 x 10 <sup>5</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup>	4,1 x 10 <sup>3</sup>
	CRZM149R	6,6 x 10 <sup>2</sup>	4,1 x 10 <sup>1</sup>	5,8 x 10 <sup>1</sup>
CRZM52R+149R	CRZM52R	1,6 x 10 <sup>5</sup>	7,3 x 10 <sup>3</sup>	6,0 x 10 <sup>3</sup>
	CRZM149R	2,4 x 10 <sup>2</sup>	7,2 x 10 <sup>1</sup>	7,9 x 10 <sup>1</sup>

Por tanto, estos ensayos se correlacionan con lo observado mediante microscopía fluorescencia, pudiendo confirmar que todos los aislados seleccionados fueron capaces de colonizar a los 14 dpi eficazmente tanto la superficie como el interior de la raíz del maíz. En el caso de las cepas de *Rhizobium*, se observó una extensa colonización de las cepas de *Rhizobium* de los espacios intra e intercelulares de la superficie de la raíz primaria, en la zona de emergencia y superficie de las raíces secundarias y también a lo largo de los pelos radiculares. Una vez en el interior, se extienden desde la corteza hasta el interior del cilindro vascular de las raíces de maíz. La colonización realizada por la cepa de *Streptomyces*, se caracteriza por colonizar zonas con pelos radiculares y formar biofilms sobre la superficie. Esta atracción de la cepa de *Streptomyces* por colonizar la superficie de los pelos radiculares ha sido observada en diversos trabajos con distintas especies de *Streptomyces*, *S. mutabilis* en raíces de trigo (Toumatia et al. 2016), *S. lydicus* en guisante (Tokala et al. 2002), *S. griseoviridis* en nabo (Kortemaa et al. 1994) y *S. turgidiscabies* en rábano (Johnson et al. 2008), entre otros. Es posible que este proceso pudiese estar relacionado con las funciones que desempeñan los pelos radiculares de interfase de nutrientes y agua, anclaje y exudación (Mercado-Blanco and Prieto 2012). Diversos estudios han proporcionado evidencias de colonización endófitas sobre los pelos radiculares (Paungfoo-Lonhienne et al. 2010; Prieto et al. 2011), coincidiendo con los resultados obtenidos en este apartado.

Los datos del conteo muestran que en los casos de las bacterias adheridas leve y firmemente a la superficie radicular, no existen diferencias entre los valores de UFC obtenidas en las inoculaciones simples. Sin embargo, cuando se coinocularon las cepas de *Rhizobium* junto con la cepa de *Streptomyces*, se puede apreciar que el número de UFC obtenidas en las inoculaciones simples en el caso de *Rhizobium* se mantienen en las coinoculaciones, pero el número de UFC disminuye drásticamente en el caso de la cepa de *Streptomyces*. Podemos apreciar también que esta disminución, se da también en el interior de las raíces. Este

resultado puede haberse originado debido a una competencia entre las cepas de *Streptomyces* y *Rhizobium* inoculadas o que la cepa de *Streptomyces* tarde más tiempo en penetrar a los tejidos internos de la raíz.

Por tanto, podemos deducir de este ensayo que tanto las cepas de *Rhizobium* como de *Streptomyces* son buenos colonizadores de la rizosfera y también verdaderos endófitos del maíz, cuando se inoculan en tratamientos simples, pero cuando se realizan coinoculaciones con las combinaciones de cepas utilizadas, la cepa de *Streptomyces* no es capaz de ser una buena colonizadora.

Un estudio de similares características realizaron Naher et al. (2009), en el que inocularon una cepa de *Rhizobium* y otra de *Corynebacterium* spp perteneciente al igual que *Streptomyces* al filo de las actinobacterias, en raíces de arroz variedad Mayang Segumpal. Del mismo modo que en nuestro estudio el recuento de bacterias fue superior en el exterior que en el interior y la población de *Rhizobium* superaba a la de *Corynebacterium*, pero a diferencia de nuestro ensayo, en el interior encontraban valores de UFC similares en ambas especies.

El hecho de que la cantidad de microorganismos sea más alta en el exterior que en el interior puede venir dada por el exopolisacárido producido por las bacterias, ya que estas bacterias lo utilizan como fuente de carbono de su propio desarrollo (Burdman et al. 2001). Por otro lado, los flagelos de las bacterias podrían influir en el anclaje de éstas a la superficie (Naher et al. 2009). Burdman et al. (2001) también relacionó el anclaje a la superficie de la planta con el pili de *Azoarcus* sp. Además, Naher et al. (2009) pudieron observar por microscopía electrónica que al igual que lo observado en nuestro ensayo, las bacterias entraban al interior de la raíz a través de las grietas de la emergencia de las raíces laterales. Por tanto, debido a que la colonización de bacterias endófitas en plantas no leguminosas, se realiza por las grietas radiculares, mediante los espacios intercelulares hasta alcanzar el interior del cilindro central (Webster et al. 1998) o mediante la producción de enzimas celulolíticas que inician el proceso de invasión (Reinhold-Hurek and Hurek 1998), es lógico que las bacterias se encuentren en mayor proporción sobre la superficie que en el interior.

Podemos ver que, en líneas generales, las cepas de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R en inoculación simple fueron las cepas que mejor colonizaban tanto la superficie radicular como el interior de la raíz, por lo que podemos suponer que una óptima colonización por parte de la bacteria podría suponer un mayor efecto de los mecanismos PGPB y mejores resultados en la promoción del crecimiento de las plantas de maíz.



***Análisis del genoma de las especies  
seleccionadas.***

**Capítulo IV**



## 1. CEPAS SELECCIONADAS PARA LA SECUENCIACIÓN DE GENOMAS.

Debido al gran potencial que mostraban las cepas de *Rhizobium* (CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R) y la cepa de *Streptomyces* (CRZM149R) para evaluar la capacidad de colonizar y de promover el crecimiento vegetal del maíz, decidimos escoger dichas cepas para secuenciar sus genomas y analizar los genes implicados en diversos mecanismos de mejora del crecimiento vegetal.

En primer lugar realizamos un análisis filogenético de las cepas para localizar en que grupos taxonómicos se encontraban. Los resultados se muestran en las figuras 43 y 44. Este análisis nos sirve para conocer la relación de las cepas con respecto al resto de las especies más próximas dentro de los géneros en los que se encuadran. Este proceso se lleva a cabo utilizando el programa informático Mega 6.0 (Tamura et al. 2013) con el que se calculó la distancia evolutiva y se construyeron dichos árboles filogenéticos.

La cepa CRZM149R, mostró una similitud del 100% con la cepa *S. griseoaurantiacus* NBRC 15440<sup>T</sup> (Figura 43). Mientras que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> ya se describió en este trabajo como *Rhizobium zea* sp nov y la cepa CRZM52R presentaba una similitud del 100% con *Rhizobium leucaenae* USDA 9039<sup>T</sup>. Se puede observar que las dos cepas de *Rhizobium* seleccionadas pertenecen a dos grupos muy diferentes. La cepa de *Rhizobium leucaenae* CRZM52R pertenece al grupo de los *Rhizobium sensu stricto*, puesto que se engloba en el mismo grupo que la cepa tipo de este género *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> (Ormeño-Orrillo et al. 2015), mientras que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> se encuentra en un grupo filogenéticamente alejado de la cepa tipo (Figura 44).

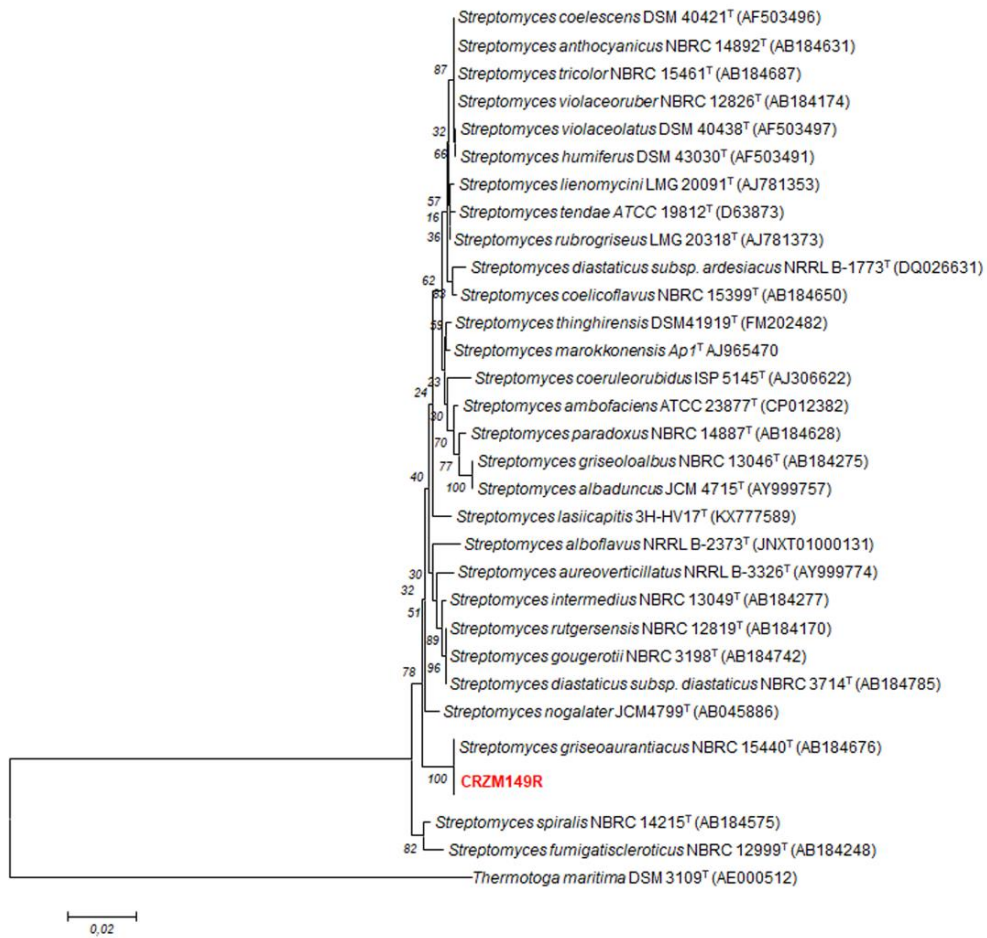


Fig. 43. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de la cepa CRZM149R perteneciente al género *Streptomyces* y de las especies tipo próximas a ésta. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, basándose en 1000 réplicas.



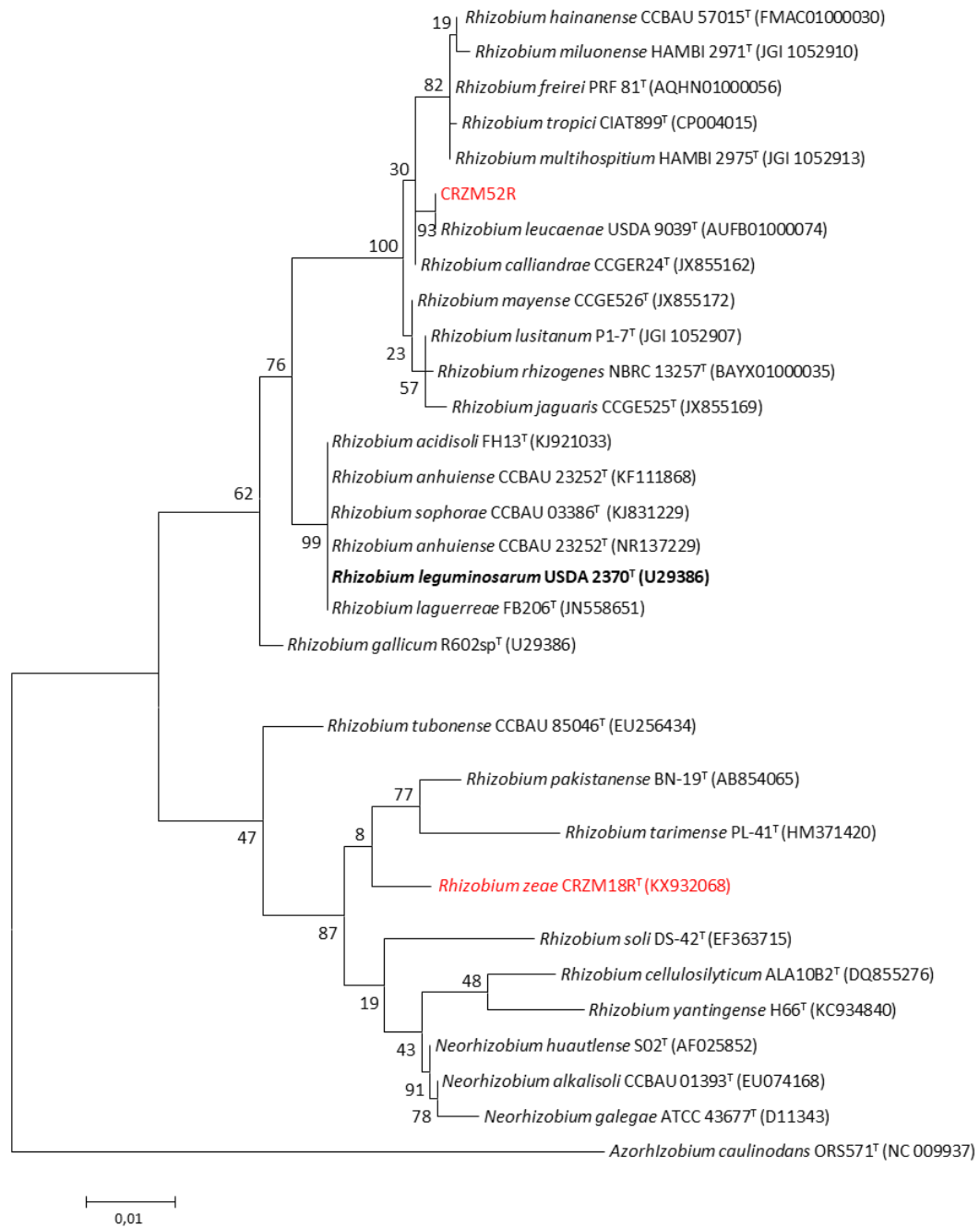


Fig. 44. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R, pertenecientes al género *Rhizobium* y las especies tipo cercanas a éstas. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, basándose en 1000 réplicas.

## 2. SECUENCIACIÓN DE LOS GENOMAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

Los genomas de las cepas descritas anteriormente, se secuenciaron en una plataforma Illumina Miseq y se ensamblaron usando Velvet 1.2.10 (Zerbino and Birney 2008). Finalmente, los genes se anotaron automáticamente con la herramienta RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*), que es un servicio de anotación de procariontes (Aziz et al. 2008; Overbeek et al. 2013).

Las características generales que se obtuvieron de los genomas se presentan en la tabla siguiente (Tabla 53):

Tabla 53. Características generales de los genomas de *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup>, *Rhizobium leucaenae* CRZM52R y *Streptomyces griseoaurantiacus* CRZM149R.

Características	CRZM18R <sup>T</sup>	CRZM52R	CRZM149R
Tamaño (pb)	6.215.185	6.036.781	5.469.840
Número de contigs	639	78	1034
Contenido en G + C (%)	59.4	59.6	72.4
Número de CDSs	6100	6091	6442
rRNA	60	49	52
tRNA	54	46	48

La representación gráfica de la anotación automática realizada por RAST puede observarse en la figura 45, donde los genes se clasifican en grupos funcionales o subsistemas. Por el contrario existen genes a los que el programa no ha asignado un subsistema. Podemos observar que en la cepa de *R. zea* CRZM18R<sup>T</sup> el 43% de los genes han sido asignados automáticamente a una función, mientras que este porcentaje baja a un 29% en la cepa de *R. leucaenae* CRZM52R y disminuye aún más en la cepa de *S. griseoaurantiacus* CRZM149R. Estos porcentajes nos indican que una gran cantidad de los genes no se encuentran anotados. En la actualidad, existen diversos programas bioinformáticos disponibles con la capacidad de anotar genomas. Sin embargo, todavía se están incorporando nuevos procesos que permitan anotar un mayor número de genes. Por lo tanto, algunos de los genes de interés los tendremos que buscar manualmente.

Por lo que hemos podido observar en la bibliografía, hay dos genomas secuenciados de cepas pertenecientes a la especie *Rhizobium leucaenae*. En concreto dos *Rhizobium leucaenae* USDA9039 (BioProject PRJNA195751) y CPAO29.8 (BioProject PRJNA195751). También existe un genoma secuenciado de una cepa de la especie *Streptomyces griseoaurantiacus*. En concreto *Streptomyces griseoaurantiacus* M045 (Li et al. 2011). La cepa CRZM18R<sup>T</sup> de *Rhizobium zea*, es una especie nueva derivada de este trabajo, por lo que aún no existe ningún genoma depositado de dicha especie.

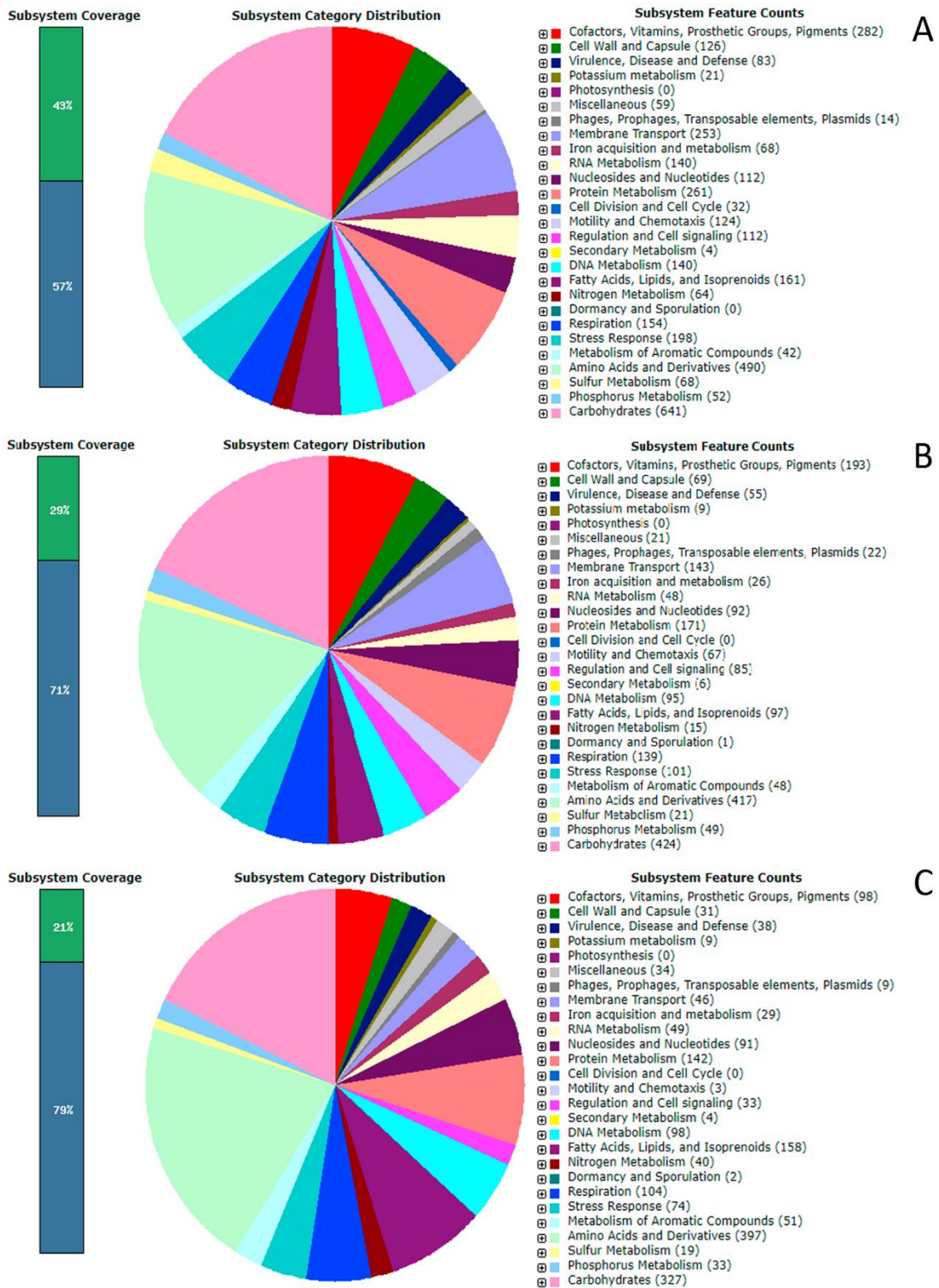


Fig. 45. Resultados del análisis funcional mediante RAST para las cepas seleccionadas: A) CRZM18R<sup>T</sup>; B) CRZM52R y C) CRZM149R. Las barras que se encuentran al margen izquierdo de cada figura, representan los genes asignados a un subsistema (verde) y los que no (azul).

### 3. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

Puesto que las cepas seleccionadas, presentaban buenos resultados en cuanto a los mecanismos PGPB evaluados *in vitro*, se decidió analizar en primer lugar los posibles genes implicados en los mecanismos directos de la promoción del crecimiento de las plantas. Por ello, realizamos una búsqueda de genes implicados en las rutas de producción de sideróforos, de solubilización de fosfato, de solubilización de potasio, de tolerancia a la salinidad, de ácido indol acético, de fijación de nitrógeno y de producción de celulasas.

#### 3.1. Genes implicados en la producción de sideróforos.

Puesto que las tres cepas seleccionadas para este estudio habían sido capaces de producir sideróforos cuando dicha capacidad PGP fue evaluada *in vitro*, analizamos qué posibles genes podrían estar implicados en este proceso. Como cabía esperar, el genoma de todas las cepas presentaba diversos genes y complejos de genes que están implicados en las rutas de biosíntesis de sideróforos y en la adquisición de hierro (Tabla 59).

Para capturar hierro, las bacterias y los hongos pueden producir sideróforos. Las bacterias que producen sideróforos, como algunos *Rhizobia*, pueden utilizar genes que codifican para proteínas implicadas en la biosíntesis de sideróforos de tipo hidroxamato férrico (*fhu*) (Ormeño-Orrillo et al. 2012). No todos los *Rhizobia* son capaces de biosintetizar sideróforos, por lo que se encuentran en desventaja frente a los microorganismos que si son capaces de producirlos (Geetha and Joshi 2013).

En primer lugar, se necesita el gen *fhuA* que codifica para una proteína de membrana externa que actúa como receptor del sideróforo de tipo hidroxamato (Ferguson et al. 2006). A continuación, se necesitan transportadores que internalicen el sideróforo desde la membrana externa al interior de la célula, este complejo transportador es codificado por los genes *fhuB*, *fhuC* y *fhuD* (Mikael et al. 2002). Tanto el transporte como la inducción de este sideróforo requieren transducción de energía del complejo TonB-ExbB-ExbD ubicado en la membrana externa (Geetha and Joshi 2013) y una vez en el periplasma los sideróforos son internalizados en el citoplasma mediante los transportadores de tipo ABC.

Los resultados obtenidos en el análisis de los genomas muestran como ambas cepas de *Rhizobium* poseen los genes que codifican para el complejo TonB. Además, los genes que codifican para las proteínas FhuA, FhuB, FhuC y FhuD se encontraron en la cepa CRZM18R<sup>T</sup>; sin embargo, en el caso de la cepa de *Rhizobium* CRZM52R, únicamente se encontró la proteína FhuB y FhuC, pero puesto que posee parte del sistema de transporte y además dispone del complejo TonB, todo indica que podría tener también los genes que codifican para las proteínas, por lo que realizamos una búsqueda manual, utilizando la secuencia conocida de las proteínas FhuA y FhuC de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> y realizamos un Blastn, obteniendo una similitud del 100% con las respectivas secuencias buscadas en CRZM52R, por lo que esta cepa también dispone de todo el complejo para biosintetizar sideróforos de tipo hidroxamato.

En este sentido, en el estudio publicado por Ormeño-Orrillo et al. (2012) identificaron los genes que están implicados en la biosíntesis de sideróforos de tipo hidroxamato, al igual que en nuestro estudio, observando que *R. tropici* CIAT 899 posee un grupo de genes involucrados en la biosíntesis del sideróforo de tipo hidroxamato, algunos de cuyos genes son similares a los genes *R. leguminosarum* (Carter et al. 2002). Sin embargo, en la cepa de *Rhizobium* sp. PRF 81, no observaron estos genes, planteándose la hipótesis de que la cepa de *R. tropici* estaba adaptada a suelos ácidos donde el  $\text{Fe}^{3+}$  está más disponible, mientras que la cepa de *Rhizobium* sp. PRF 81 evolucionó en suelos neutrales por lo que explicaría la ausencia de estos genes. Otra hipótesis que plantean es que estuviese adaptada para obtener formas de hierro quelado de fuentes externas, una estrategia utilizada por la bacteria endofítica *Azoarcus* sp. BH72 (Krause et al. 2006). En este sentido, existen otros tipos de sideróforos que no son dependientes de un receptor TonB, como es el caso de las cepas que utilizan citrato férrico (Wexler et al. 2002).

Éste podría ser el tipo de sideróforos sintetizado por la cepa de *Streptomyces*, ya que carece del complejo TonB pero si posee los genes que codifican para la enzima citrato sintasa. Además, la utilización de la enzima citrato sintasa ya se ha descrito en el género *Streptomyces*, por lo que las bacterias Gram positivas, o al menos los Actinomicetos como es nuestro caso, podrían utilizar el citrato férrico como fuente de hierro mediante la enzima citrato sintasa (Guerinot et al. 1990).

Las cepas de *Rhizobium* mostraron tener también la enzima citrato sintasa, por lo que podrían ser capaces de sintetizar sideróforos de diferentes tipos. Esta capacidad también se ha descrito en bacterias del género *Rhizobium*, como en el caso de Ormeño-Orrillo et al. (2012), que ambas cepas de *Rhizobium* CIAT 899 y PRF 81 poseen un gen codificante para citrato sintasa, también se ha descrito en *R. tropici* (Hernández-Lucas et al. 1995), en *R. etli* (Resendis-Antonio et al. 2007) y en *R. leguminosarum* (Karunakaran et al. 2009), entre otros.

Además, pudimos observar que ambas cepas de *Rhizobium* de nuestro estudio poseen el gen *rirA* que codifica para un regulador transcripcional sensible al hierro (RirA). Este gen está asociado con las especies de género *Rhizobium* por lo que es predecible que no se encuentre en la cepa de *Streptomyces*, como revela el resultado negativo encontrado en la búsqueda de dicho gen en su genoma (Tabla 59). La proteína RirA en *R. leguminosarum* parece tener funciones muy diversas, controlando la expresión de muy diversos genes implicados en la toma de hierro. Un homólogo de ésta en *E. meliloti* parece estar implicado en controlar la homeostasis del hierro durante el crecimiento de vida libre y la simbiosis (Todd et al. 2002). Por lo que la implicación de esta proteína en nuestras cepas de *Rhizobium* podrían tener una función similar.

También ambas cepas de *Rhizobium* poseen genes *fur*, que codifican para las proteínas que regulan principalmente de los genes sensibles al hierro en la familia de los Rhizobiaceae; y además, poseen un segundo regulador de menor acción en Rhizobiales, denominado *Irr* (Johnston et al. 2007). También poseían dichos genes las cepas de *Rhizobium*, *R. tropici* CIAT 899 y *Rhizobium* sp. PRF 81, utilizadas en el estudio de (Ormeño-Orrillo et al. 2012).

Por lo que sugieren que todas las cepas seleccionadas en el estudio de los genomas, son capaces de producir algún tipo de sideróforo en varias condiciones y mediante varias vías, siendo capaces por tanto de incorporar al citoplasma el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), el cual destinan al almacenamiento o a la incorporación de enzimas importantes tanto para la bacteria como para

su interacción con la planta. Por otra parte, también las hace susceptibles de ser mejores competidoras por la supervivencia en vida libre.

### 3.2. Genes implicados en la solubilización de fosfato.

Puesto que la capacidad para solubilizar fosfato es una característica importante para seleccionar óptimas cepas capaces de promover el crecimiento vegetal, se analizaron si estas cepas disponían de genes implicados en dicho mecanismo.

El regulador de fosfato (Pho) es un complejo de genes reguladores que codifican para un complejo implicado en la captación del fosfato (Santos-Beneit 2015). Pudimos observar que los tres genomas disponían de genes que codifican para este regulador. Estos reguladores se han descrito ya tanto en cepas de *Rhizobium* (Janczarek and Urbanik-Sypniewska 2013) como en *Streptomyces* (Diaz et al. 2005).

La captación inorgánica de fosfato por parte de estas bacterias puede estar promovida por dos sistemas de transporte de fosfato, uno de baja afinidad (Pit) que encontramos tanto en las cepas de *Rhizobium* (CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R) como en las de *Streptomyces* (CRZM149R); y dos de alta afinidad (Pst y Phn). Pst es la proteína encargada de transportar el fosfato inorgánico más conservado en todas las bacterias (Santos-Beneit 2015), de hecho aparece en las tres cepas evaluadas. Por otro lado, se encuentra la proteína transportadora de fosfonatos (Phn) (Gebhard et al. 2014), que encontramos únicamente en la cepa CRZM18R<sup>T</sup>.

La diferencia entre estos tipos de transporte de fosfato se encuentra en que los de alta afinidad se inducen por inanición de fosfato, mientras que el sistema de baja afinidad se basa en la afinidad presentada por una proteína de membrana que se expresa constitutivamente (Gebhard et al. 2009).

Los polifosfatos inorgánicos, poliP, son polímeros lineales de residuos de ortofosfato unidos entre sí, por enlaces pirofosfato (P-O-P), ricos en energía, empleado en multitud de organismos para almacenar fosfato y, cuando es necesario, reutilizarlo (Ghorbel et al. 2006), característica importante en la tolerancia a distintos tipos de estrés. Varias proteínas enzimáticas intervienen en el metabolismo de los poliPs contribuyendo así al mantenimiento de su equilibrio en la célula (Thayil et al. 2011), como por ejemplo la exopolifosfatasa (PPX, EC 3.6.1.11) y la polifosfato quinasa (PPK, EC 2.7.4.1), siendo ésta última la que sintetiza poliP reversiblemente a partir de ATP. Por otro lado, el ácido glucónico es uno de los principales ácidos orgánicos en la mayoría de las bacterias responsables de la solubilización de los fosfatos minerales y es catalizada por la glucosa deshidrogenasa (GDH; EC 1.1.5.2) y su cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ; Liu et al. 2016). Todas las enzimas citadas en este apartado se han encontrado en todos los genomas analizados. Además, en las bacterias del género *Rhizobium* se encontraron también las fosfatasas alcalinas (PhoA, EC 3.1.3.1), que son de las enzimas más comunes inducidas en respuesta a la inanición de fosfato inorgánico en bacterias (Wanner and Chang 1987).

Gupta et al. (2014) encontraron en los genes de dos cepas (CPCRI-1 y 3) PGPR de Enterobacterias los genes transportadores de fosfato *pstA*, *pstB* y *pstC*. También Zhu et al. (2012) encontraron estos mismos genes en *Enterobacter* spp. SP1, PGPR aislado de la caña de azúcar. Además, en las cepas con características PGP de *Pseudomonas* sp. UW4 (Duan et al.

2013) y *Klebsiella* sp. D5A (Liu et al. 2016) se encontraron los sistemas de transporte PstBACS y PhnDCE1E2, así como el transportador de fosfato de baja afinidad Pit (Duan et al. 2013). En todos estos estudios estas cepas fueron descritas como solubilizadoras de fosfato por poseer alguno de los genes descritos anteriormente. Por tanto, al igual que estos autores podemos decir que tanto las cepas de *Rhizobium* como las de *Streptomyces* contienen los genes para solubilizar fosfato.

Estos datos no coinciden con lo que habíamos evaluado en las pruebas *in vitro*, ya que únicamente la cepa CRZM18R<sup>T</sup> fue positiva. Sin embargo, tanto la cepa CRZM52R de *Rhizobium* como la cepa CRZM149R de *Streptomyces*, no fueron positivas en la prueba realizada *in vitro*, pero si observamos que disponen genes para solubilizar el fosfato. Esto se puede deber a que para las pruebas realizadas *in vitro*, se utilizaba el fosfato tricálcico, que es una de las formas de fósforo inorgánico presentes en el suelo, siendo una de las formas menos solubles y así se discrimina con mayor certeza, no queriendo decir que estas bacterias no sean capaces de solubilizar el fosfato en otras formas y condiciones. Por tanto, tanto las cepas de *Rhizobium* (CRZM18RT y CRZM52R) como la cepa de *Streptomyces* CRZM149R, poseen los genes implicados en la solubilización de fosfato por alguna de las vías, en sus genomas.

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

Puesto que el sodio y el potasio se encuentran relacionados, debido a la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, proteína que actúa como un transportador del intercambio existente entre dos solutos en diferentes direcciones (Morth et al. 2011), abordaremos este apartado en conjunto.

El análisis del genoma reveló que las cepas disponen de diversos genes relacionados con la tolerancia a la salinidad. Se encontraron tanto en las cepas de *Rhizobium* como en la de *Streptomyces*, dos de los genes considerados como responsables de la tolerancia a la salinidad (Ren et al 2010). Estos son los genes *betA* y *betB*, que codifican respectivamente para la colina deshidrogenasa y para la betaína aldehído deshidrogenasa. Además, encontramos genes implicados en la biosíntesis de la trehalosa, que puede actuar como un osmoprotector bajo estreses ambientales como alta salinidad, sequía, bajas temperaturas o estrés osmótico en muchos microorganismos (Duan et al 2013). Por ejemplo, la trehalosa se acumula en el arroz transgénico mejorando así la tolerancia al estrés abiótico de la planta (Garg et al 2002). Liu et al (2016) encontraron en el genoma de la cepa PGPB de *Klebsiella* sp. D5A genes que codificaban para complejos proteicos que participaban en dos posibles rutas por las cuales esa cepa podría biosintetizar la trehalosa. Encontramos al menos uno de estos grupos de genes implicados en una de dichas rutas metabólicas en los genomas de todas las cepas de este estudio, ya que tanto existían genes para la trehalosa-6-fosfato sintasa, la cual puede sintetizar trehalosa-6-fosfato a partir de glucosa-6-fosfato como de UDP-glucosa (Liu et al. 2016).

Por otro lado, la captación de K<sup>+</sup> es esencial para los procesos homeostáticos de la regulación de la presión de la turgencia y el mantenimiento del pH citoplasmático (Csonka y Epstein 1996; Stumpe et al., 1996), por lo que buscaremos en los genomas de las cepas seleccionadas genes relacionados con la captación del potasio. En este sentido, se han descrito en *Escherichia coli* K-12 dos tipos principales de sistemas de captación de K<sup>+</sup> (Trk y Kdp) y un sistema de captación menor de K<sup>+</sup> (Kup) (Schleyer y Bakker 1993). El sistema Kdp es inducible bajo respuestas al estrés por alta salinidad y transporta K<sup>+</sup> con alta afinidad (Heermann& Jung,

2010). Encontramos en las cepas de *Rhizobium* (CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R) y en la cepa de *Streptomyces* (CRZM149R) el gen *kdpD*, que está implicado en este sistema de captación de K<sup>+</sup>. Por otro lado el complejo Trk se encuentra muy difundido entre las bacterias y tiene una afinidad moderada por la absorción de K<sup>+</sup>. Encontramos los genes que codifican para la proteína TrkA de unión a NAD requerida para la actividad del sistema de captación del K<sup>+</sup> (Sleator y Hill, 2002) en las cepas CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM149R. Además, encontramos solamente en las cepas de *Rhizobium* genes implicados en el sistema de captación de baja afinidad de K<sup>+</sup>, el sistema Kup (Meena et al 2014). Y por último, encontramos en todas las cepas analizadas en este apartado los genes *kefA* y *kefB*, que forman parte de un grupo de genes que codifican para el sistema de transporte del potasio (Liu et al 2016).

Por tanto, podemos observar que todas las cepas poseen genes implicados en la captación del potasio, por lo que las haría susceptibles de solubilizar el K insoluble del suelo, pudiendo incrementar de esta manera el rendimiento de los cultivos. Además, este rendimiento podría incrementarse también en cultivos que se dan en condiciones edafológicas que sean adversas, ya que como hemos podido comprobar nuestras cepas podrían tolerar mejor el estrés salino.

### 3.4. Genes implicados en la producción de ácido indol acético.

Otro mecanismo que todas las cepas habían mostrado capacidad para producirlo *in vitro* fue el ácido indol acético (AIA), por lo que se evaluaron los posibles genes implicados en este proceso.

Las bacterias pueden sintetizar dicha hormona a partir del triptófano, a través de dos vías biosintéticas, la del indol-3 acetamida o la del indol-3 piruvato (Bianco et al. 2006). Una vía puede convertir mediante nitrilo hidratasa, el indol-3-acetonitrilo en indol-3 acetomida y convertirse finalmente en AIA mediante la amidasa. La otra vía puede convertir mediante indol piruvato descarboxilasa, el indol-3 piruvato en indol-3 acetaldehído y convertirse en AIA mediante el aldehído deshidrogenasa (Liu et al. 2016).

Encontramos que todos los genomas poseen genes codificantes de las enzimas asociadas con el complejo piruvato deshidrogenasa de la ruta del indol-3-piruvato (EC 1.2.4.1). Además, las tres cepas disponen de los genes (*tsa* y *tsb*) que codifican para una triptófano sintasa (EC 4.2.1.20) que cataliza la conversión del fosfato de indol glicerol en triptófano, el paso final en la biosíntesis de triptófano (Last et al. 1991). También participan en esta biosíntesis del triptófano, los genes encontrados que codifican para la enzima Indol-3-glycerol fosfato sintasa (Schlee et al. 2013).

También poseen genes codificantes para la enzima aldehído deshidrogenasa, que es la enzima que convierte el indol-3 acetaldehído en AIA. Un estudio comparativo de cuatro genomas pertenecientes a cuatro cepas del género *Klebsiella*, mostraron que únicamente la cepa de *Klebsiella* sp. D5A, poseía el gen que codificase para la aldehído deshidrogenasa, lo que indicaba que no podían producir AIA por la vía del piruvato (Liu et al. 2016). Son muchas las bacterias que se describen como productoras de AIA, (Khamna et al. 2009; Bhattacharjee et al. 2012; Mohite 2013) pero pocas discriminan que vía utiliza para sintetizar dicha hormona, encontrando que la vía del indol-3 piruvato, es utilizada también por *Azospirillum brasilense* (Spaepen et al. 2008) y *Enterobacter cloacae* (Ryu and Patten 2008) para producir AIA.



Además, encontramos en la bibliografía que una cepa de *Streptomyces* productora de AIA por la vía del indol-3 acetamida (Manulis et al. 1994), así como una cepa de *Rhizobium* por esa misma vía (Kobayashi and Palumbo 2000), lo que nos indica que las cepas producen AIA por la vía del piruvato independientemente de que sean gram positivas o gram negativas.

Como podemos observar de los tres genomas analizados (tabla 59), la cepa CRZM52R poseía más genes implicados con la producción de ácido indol acético que las demás, lo que se puede co-relacionar con el hecho de que fue la cepa que más ácido indol acético producía de las tres en las pruebas y condiciones evaluadas *in vitro*.

### 3.5. Genes implicados en la fijación de nitrógeno y simbiosis.

Realizamos también una búsqueda de genes que pudiesen estar implicados en la simbiosis y en la fijación de nitrógeno. En muchas especies de Rhizobia dichos genes se encuentran en un plásmido simbiótico, pero existen algunas especies en las que estos genes se encuentran en islas genómicas, también denominadas islas simbióticas; estas regiones se han originado por recombinación, transferencia horizontal y transposición (González et al. 2003).

Por ejemplo, en *R. leguminosarum* *bv. viciae* 3841 la mayoría de los genes simbióticos se encuentran en el plásmido pRL10 (Hungria et al. 2003), mientras que en *Mesorhizobium loti* MAFF 303099, recientemente reclasificada en *Mesorhizobium japonicum* (Martínez-Hidalgo et al. 2016), existe una isla genómica de 500 kb que contiene los genes responsables de la simbiosis (Kaneko et al. 2000; Giraud et al. 2007). También *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 y *M. japonicum* MAFF303099 poseen grandes islas genómicas (~500 kb) que contienen todos los genes de nodulación, *nif* y *fix* (Hernandez-Lucas et al. 2006; Ramsay et al. 2009). Sin embargo, hay excepciones, por ejemplo, en *Ensifer* *sp.* NGR 234, los genes *nif* y *nod* se encuentran en un plásmido, mientras que los genes de la fijación de N<sub>2</sub>, están en el cromosoma (Schmeisser et al. 2009). También en *R. etli* CFN 42, el plásmido simbiótico (pSym) p42d contiene la mayoría de los genes necesarios para la simbiosis, pero homólogos de los genes de nodulación se encuentran en otros replicones del genoma (González et al. 2006).

En los genomas analizados en este estudio, no encontramos genes *fix*, ni *nod*, por lo que o no disponen de ellos, o bien podrían estar en algún plásmido o que el servidor utilizado no haya sido capaz de anotarlos automáticamente. Sin embargo, si encontramos en ambas cepas de *Rhizobium* el gen *nifU*, que codifica una proteína que participa en la síntesis de metalocloruros de hierro-azufre (Fe-S) necesarios para la fijación de nitrógeno (Zheng et al. 1993; Dean et al. 1993; Hwang et al. 1996).

Por otro lado, encontramos también los genes *ntrB*, *ntrC*, *ntrX* y *ntrY*, que codifican para proteínas que están implicadas en la regulación del metabolismo del Nitrógeno. Estos mismos genes se encontraron en *Herbaspirillum seropedicae*, una proteobacteria diazotrófica asociada a gramíneas. Pankievicz et al. (2016) demostraron que el crecimiento dependiente de nitrato de dicha bacteria se encontraba regulado por dos componentes reguladores de nitrógeno *ntrB* y *ntrC*, y por dos reguladores específicos del metabolismo del nitrato *ntrY* y *ntrX*. Además, mediante la realización de análisis *in silico* demostraron el papel del sistema *ntrY-ntrX* en la regulación del metabolismo de nitratos en *H. seropedicae*. Por tanto, en este sentido, este sistema podría estar regulando también el metabolismo de nuestras cepas de *Rhizobium*.

## 4. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN ENDOFÍTICA.

Debido a que también hemos podido comprobar la habilidad de las cepas seleccionadas para colonizar con éxito las raíces de maíz, mediante diferentes ensayos realizados *in vitro*, quisimos analizar también que genes podrían estar implicados en la colonización e infección de las plantas por parte de las bacterias, como la producción de celulosa y exopolisacáridos, de biofilms y los mecanismos de entrada de dichas bacterias.

### 4.1. Genes implicados en la producción de enzimas implicadas en biosíntesis, procesamiento y degradación de polisacáridos.

Además de la información obtenida con el RAST, con la ayuda de la herramienta dbCAN (Yin et al. 2012), se pudieron comparar las secuencias proteicas de los genomas con algunas de las secuencias de enzimas existentes en las bases de datos de CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*). Entre ellas, destacamos las glicosil hidrolasas (GHs) que son un amplio grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos para generar glúcidos menores y las glicosil transferasas (GTs) que son enzimas que catalizan la transferencia de grupos glicosil a un aceptor. La biosíntesis de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos implica la acción de cientos de diferentes glicosil transferasas.

Las bacterias celulolíticas han sido ampliamente estudiadas en diversos ambientes desde nichos ambientales e industriales, incluyendo suelos, sedimentos marinos, hasta en la microbiota de animales y humanos (Medie et al. 2012). Estas bacterias poseen enzimas que pertenecen a diferentes familias basadas en secuencias de glicosil hidrolasas (GH), que incluyen, entre otras, celulasas que rompen los enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) de la celulosa (Medie et al. 2012). Utilizamos la herramienta dbCAN para predecir las glicosil hidrolasas en nuestras cepas, en la cepa CRZM18R<sup>T</sup> se predijeron 76, en la cepa CRZM52R se predijeron 86 y en la cepa CRZM149R, se predijeron 113. En cuanto a las GH anotadas en RAST únicamente en la cepa de *Streptomyces* se anotaron las familias a las que pertenecían algunas de estas GH, entre las que pudimos observar GH8 (entre las que se incluyen actividades celulásicas), GH31 (entre las que se incluyen actividades descritas como  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -galactosidasas,  $\alpha$ -manosidasa, etc) y GH48 (entre las que se incluyen actividades descritas como quitinasas, endo- $\beta$ -1,4 glucanasa y celobiohidrolasa), las demás no disponían de funciones definidas en RAST.

También se predijeron varias glicosiltransferasas (GT) en los genomas de estudio, resultando que en la cepa CRZM18R<sup>T</sup> se predijeron 64, en la cepa CRZM52R se predijeron 76 y en la cepa CRZM149R, se predijeron 41. Sin embargo, en los resultados obtenidos en el RAST se anotaron únicamente cuatro GTs pertenecientes al grupo 1, 2, 8 y 25 para la cepa de *R. zeae* CRZM18R<sup>T</sup>; mientras que la cepa de *R. leucaenae* se anotaron solamente GTs de los grupos 1, 2 y 25. Además, para la cepa de *S. griseoaurantiacus* también se anotaron tres GTs pertenecientes a los grupos 1, 2 y 28. En este caso, la herramienta dbCAN nos ofrece un mayor número de grupos predichos de GHs y de GTs que la propia herramienta de predicción utilizada por RAST. Además, cabe añadir que en el caso de las cepas de *Rhizobium*, la batería enzimática de la que disponen está muy poco estudiada. Este estudio aporta nueva

información que tiene aplicación directa en las interacciones de las cepas de *Rhizobium* con las plantas de estudio. Además, completa la información disponible sobre batería enzimática que posee nuestra cepa de *Streptomyces*.

Todas las cepas estudiadas poseen GT1 y GT2, siendo las glicosiltransferasas de la familia 1 las responsables de la glicosilación de varias estructuras orgánicas importantes como los terpenos y esteroides, entre otros; y las glicosiltransferasas de la familia 2, las cuales han sido reconocidas como la familia de enzimas que polimerizan la celulosa directamente a partir de UDP-glucosa (Lairson et al. 2008).

Por otra parte, las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) hidrolizan los enlaces internos en posiciones aleatorias de las regiones menos ordenadas (o amorfas) de la celulosa. Estas enzimas generan extremos de cadena para el procesamiento del segundo tipo de celulasas, las celobiohidrolasas, que son exoglucanasas (Medie et al. 2012). Entre nuestros genomas de estudio, encontramos que todas las cepas tienen en sus genomas genes que codifican para diversas endoglucanasas, lo que se podría relacionar con lo observado en las pruebas *in vitro*, ya que todas habían sido positivas para el ensayo de producción de celulasas. Estas celulasas encontradas podrían también formar parte del proceso de biosíntesis de celulosa, sobre todo en las cepas del género *Rhizobium*, lo que se correlacionaría con lo descrito anteriormente en la bibliografía (Robledo et al. 2012; Menéndez et al. 2016).

Las celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) actúan de manera unidireccional tanto a partir de los extremos no reductores como de la reducción de las cadenas de polisacáridos de celulosa, liberando la celobiosa como principal producto. Un gen que codifica para esta enzima aparece en el genoma de la cepa de *Streptomyces* CRZM149R. Por otro lado, las  $\beta$ -D-glucosidasas (EC 3.2.1.21) hidrolizan además la celobiosa y liberan así el sistema de la inhibición del producto final (Himmel et al. 2007). Genes que codifican para  $\beta$ -D-glucosidasas aparecen en todos nuestros genomas analizados.

Otras enzimas además de las celulasas endoactivas y exoactivas participan en la descomposición de la celulosa. Algunas utilizan un proceso de química oxidativa, como ocurre en la escisión de la quitina (polímero cristalino fibroso de residuos de  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina) por la enzima N-acetylglucosaminidasa. Pudimos ver que la cepa de *Streptomyces* disponía de genes que codificarían tanto la  $\alpha$  como de la  $\beta$ -N-acetylglucosaminidasa, mientras que la cepa CRZM52R únicamente disponía de genes que codifican para  $\beta$ -N-acetylglucosaminidasa. En este sentido se ha demostrado que un homólogo de *Streptomyces coelicolor* de N-acetylglucosaminidasa actuaba sinérgicamente con celulasas en la digestión de celulosa (Forsberg et al. 2011), por lo que nuestra cepa de *Streptomyces* podría actuar de manera similar ya que dispone en su genoma tanto de genes que codifican para las enzimas N-acetylglucosaminidasa como para endoglucanasas.

Por tanto, como hemos podido observar nuestras cepas de estudio poseen genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de la pared celular, y esta capacidad podría ser utilizada por los microorganismos para colonizar el interior de las plantas.

## 4.2. Genes implicados en la biosíntesis de celulosa.

La biosíntesis de celulosa es otra característica de gran importancia para la colonización de la planta por parte de las bacterias. Aunque se trata de una característica ampliamente distribuida entre los rizobios (Robledo et al 2012), la biosíntesis de este polisacárido es un proceso complejo que comparte similitudes con la biosíntesis de celulosa en las plantas (Peng et al. 2002), aunque difieren en complejidad y en las propiedades físico-químicas que poseen dichos polímeros (Ross et al. 1991). La celulosa es un biopolímero que consiste en cadenas de  $\beta$ -(1-4)-D- glucopiranosas, componente esencial de las paredes celulares vegetales.

Los genes implicados en la síntesis de celulosa bacteriana están próximos entre sí, localizados en una región cromosómica denominada operón *celABC* o *bcsABZ*. La regulación de esta ruta biosintética se lleva a cabo por el mensajero secundario di-GMP cíclico y por varias proteínas con dominios GGDEF (Römling 2002). Debido al importante papel que desempeña el operón *celABC* no solo en colonización sino en la simbiosis con plantas (Robledo et al 2012), realizamos una búsqueda de genes que formasen parte de dicho operón en los genomas de nuestras cepas seleccionadas.

Solamente encontramos los tres genes que forman dicho operón en la cepa CRZM52R. Realizamos una comparación de cada uno de los genes identificados en las bases de datos mediante BLAST. En primer lugar, encontramos en el genoma el gen *celA* (*acsA* o *bcsA*) que codifica para una celulosa sintasa que alberga un dominio glicosiltransferasa (GT2) (Tabla 54).

Tabla 54. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidas enfrentando la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la celulosa sintasa anotada en el genoma de *R. leucaenae* CRZM52R, utilizando la herramienta BLAST.

Función descrita	Microorganismo	Similitud %
Celulosa sintasa subunidad catalítica (formadora UDP)	<i>Rhizobium leucaenae</i> CRZM52R	100
Celulosa sintasa	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	84
Celulosa sintasa (formadora UDP)	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	83
Celulosa sintasa (formadora UDP)	<i>Rhizobium sp.</i> 10195	83
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium etli</i> NXC12	81
Celulosa sintasa	<i>Rhizobium etli</i> CFN42	81
Celulosa sintasa (formadora UDP)Proteína CelA	<i>Rhizobium etli</i> bv. mimosae Mim1	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N741	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N871	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N113	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N1341	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium etli</i> N561	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N621	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N6212	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> TAL182	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N1314	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> N731	81
Celulosa sintasa (formadora UDP)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	81
Celulosa sintasa (formadora UDP)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> BIHB1148	81
Celulosa sintasa subunidad CelA	<i>Rhizobium sp.</i> NXC14	81
Celulosa sintasa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> Rt623 74	81

En segundo lugar, encontramos un gen que presenta similitud con los genes *celB* o *bcsB*, que se anotan automáticamente como la subunidad B del complejo celulosa sintasa (Tabla 55). Esta subunidad posee un dominio de unión a di-GMP cíclico, que actúa como un regulador de la biosíntesis de celulosa (Römmling et al. 2013).

Tabla 55. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas codificadas por el gen *celB* putativo anotado en el genoma de *R. leucaenae* CRZM52R enfrentando la secuencia nucleotídica de dicho gen con las secuencias disponibles depositadas en las bases de datos del NCBI, utilizando la herramienta BLAST.

Función descrita	Microorganismo	Similitud %
Proteína precursora Cyclic di-GMP	<i>Rhizobium leucaenae</i> CRZM52R	100
Celulosa sintasa subunidad BcsB	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Vaf10	73
Celulosa sintasa	<i>Rhizobium etli</i> CFN42	73
Celulosa sintasa subunidad BcsB	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Vaf108	73
Celulosa sintasa subunidad BcsB	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	73
Celulosa sintasa subunidad BcsB	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> BIHB1217	73
Celulosa sintasa subunidad BcsB	<i>Rhizobium</i> sp. NXC14	73
Celulosa sintasa subunidad BcsB	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> BIHB 1148	72

Y por último, en tercer lugar comparamos la proteína anotada por RAST como *endoglucanasa* con la base de datos NCBI (Tabla 56). El gen que codifica para esta endoglucanasa se describe en la literatura como *bcsZ* en *E.coli*, también denominado *celC* en *A. tumefaciens* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Robledo et al. 2012). Dicha glicosil hidrolasa (EC 3.2.1.4) encontrada en el genoma está anotada como beta-1,4-glucanasa (celulasa). Además, esta endoglucanasa pertenece a la familia 8 de las glicosil hidrolasas, presente en todas las especies productoras de celulosa (Yanni et al. 2001; Robledo et al. 2011a), por lo que podemos denominar dicho gen como gen *celC*.

Este gen se encuentra ampliamente distribuido y relativamente conservado dentro de los microorganismos capaces de nodular e implicados en la simbiosis. Además, también se ha propuesto como marcador filogenético auxiliar para la diferenciación de las especies del género *Rhizobium* (Robledo et al. 2011a)

Tabla 56. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidas enfrentando la secuencia nucleotídica de la endoglucanasa anotada en el genoma de *R. leucaenae* CRZM52R, utilizando la herramienta BLAST.

Función descrita	Microorganismo	Similitud %
Endoglucanasa	<i>Rhizobium leucaenae</i> CRZM52R	100
Proteína endoglucanasa (Glucósido hidrolasa)	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	81
Endoglucanasa	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 163C	81
Endoglucanasa	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC11325	80
Endoglucanasa	<i>Rhizobium</i> sp. 10195	78
Celulasa	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium</i> sp. N1314	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium</i> sp. N731	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium</i> sp. TAL182	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium</i> sp. N741	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium</i> sp. N871	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium</i> sp. N113	77

Tabla 56. Continuación.

Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium sp.</i> N1341	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium etli</i> N561	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium sp.</i> N621	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium sp.</i> N6212	77
Endoglucanasa	<i>Rhizobium hainanense</i> I66	77
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium sp.</i> NXC14	76
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium sp.</i> N941	75
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium sp.</i> N541	75
Proteína endoglucanasa	<i>Rhizobium sp.</i> N324	75

Como pudimos ver, el gen *celC* que codifica para esta endoglucanasa se encuentra localizado muy próximo a los genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de celulosa bacteriana, con lo que podemos considerar que estos tres genes conforman el operón *celABC* en esta cepa de *R. leucaenae* (Figura 46).

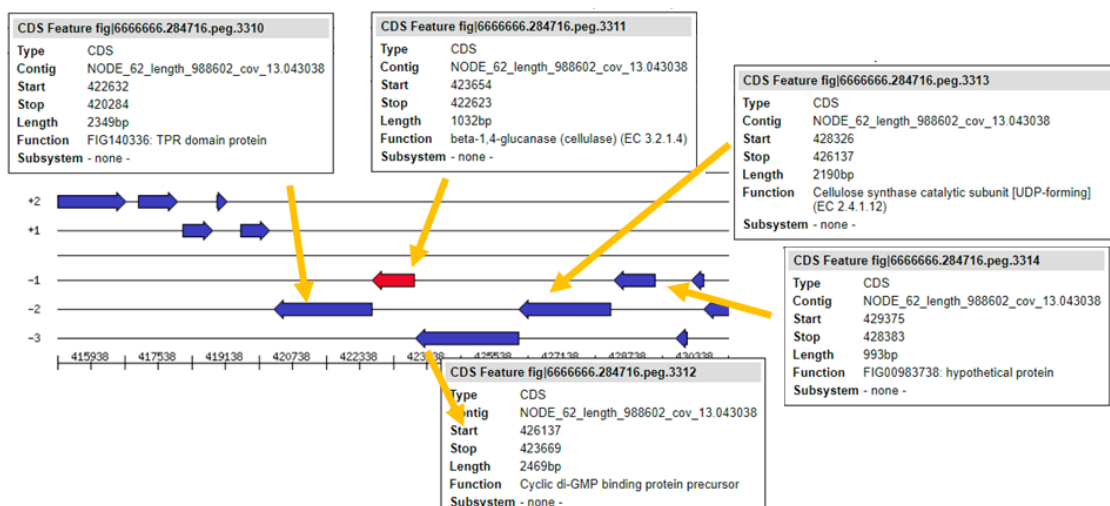


Fig. 46. Esquema correspondiente a los genes que conforman el operón *celABC* de la cepa de *R. leucaenae* CRZM52R.

Por otra parte, en el genoma de la cepa de *Rhizobium leucaenae* CRZM52R, encontramos genes que codifican para otras dos glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.4). En primer lugar, un gen que codifica para otra beta-1,4-glucanasa (celulasa), en este caso perteneciente a la familia 5 de las glicosil hidrolasas. Podríamos pensar que este gen podría formar parte de otro operón *celABC* o similar, pero como podemos ver en la figura 47, la estructura observada no se corresponde. Sin embargo, se encuentra próxima al gen anotado como *exoZ*, implicado en la producción de exopolisacáridos, lo que puede indicar su implicación en dicho proceso.

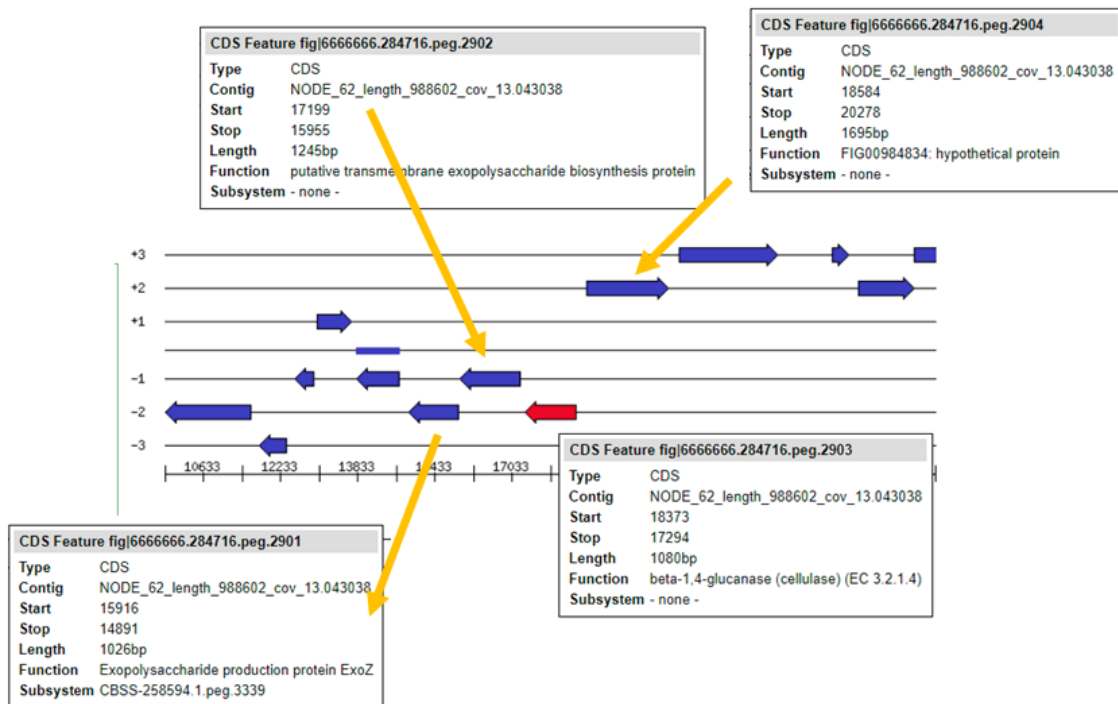


Fig. 47. Esquema correspondiente a los genes próximos a la celulasa anotada en RAST como *beta-1,4-glucanasa* (flecha roja).

Y en segundo lugar, encontramos un gen que codifica para una tercera glicosil hidrolasa de la familia 26 identificada como endoglucanasa H. Como en el caso anterior no se puede decir que forme parte de otro operón *celABC* o similar, pero, como podemos observar en la figura 48, se encuentra precedida por la celulosa sintasa, lo que puede relacionarse con otros procesos de producción de celulosa u otros polisacáridos con enlaces glucano.

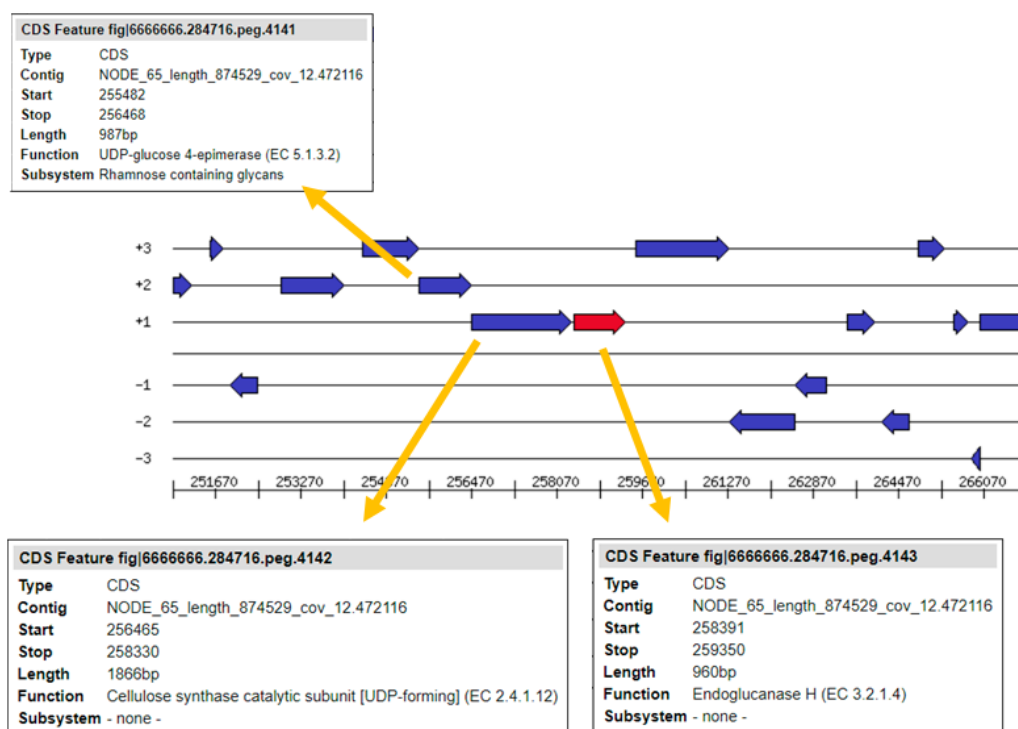


Fig. 48. Esquema correspondiente a los genes próximos a la celulasa anotada en RAST como *endoglucanasa H* (flecha roja).

Los tres genes que conformaban el operón *celABC* en CRZM52R presentan siempre una elevada similaridad con los genes depositados correspondientes a cepas pertenecientes al género *Rhizobium* y *Agrobacterium*. En este sentido, que aparezcan algunos representantes del género *Agrobacterium* no es extraño, ya que éste fue reclasificado en *Rhizobium* (Young et al. 2011). Podemos observar también que la similitud que presentaba el gen *celA* con las veinte primeras cepas, ésta variaba entre el 81% y el 84%; mientras que en el gen *celB*, el buscador encontró únicamente siete cepas con las que presentaba una similitud entre 72 y 73%; por otra parte el gen *celC*, presentaba con las veinte primeras cepas una similaridad comprendida entre 75 y 81%. Estos resultados son similares a los obtenidos en la T.D Menéndez (2014), en la que observó que los porcentajes de similaridad de la *celA* y *celB* de la cepa de *R. leguminosarum* *bv trifolii* ANU843 comparada con las cepas de *Ensifer*, eran mucho más elevados que en el caso del gen *celB*, gen que resultó menos similar entre las especies con genes *celB* más próximos. Este hecho coincide también con Lin et al. (1990), que describen el gen *celA* como el más largo de los genes del operón y además la mejor conservada. Sin embargo, el gen *celB* se describe como el menos conservado y además codifica una subunidad de la celulosa sintasa, que está presente en todas las especies de *Rhizobium* productoras de celulosa. Finalmente, el gen *celC* también se describe como un gen ampliamente conservado entre las especies *Rhizobium* (Robledo et al. 2011a).

En relación con el operón *celABC*, no encontramos ningún operón similar en la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, únicamente posee un gen que codifica una enzima cuya función está relacionada con la actividad celulasa. La secuencia de dicha celulasa se comparó con la base de datos, mediante la herramienta BLAST (Tabla 57). Pudimos comprobar que esta enzima presentaba una homología elevada respecto a otras celulasas pertenecientes al género *Rhizobium*, en las que las funciones identificadas pertenecían a las descritas para glicosil hidrolasas de la familia 5 (GH5).



Tabla 57. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidas enfrentando la secuencia de la celulasa anotada en *R. zeae* CRZM18R<sup>T</sup> obtenida en el genoma, utilizando la herramienta BLAST.

Función descrita	Microorganismo	Similitud %
Celulasa	<i>Rhizobium zeae</i> CRZM18R <sup>T</sup>	100
Glucósido hidrolasa familia 5	<i>Rhizobium sp.</i> TAL182	93
Glucósido hidrolasa familia 5	<i>Rhizobium sp.</i> N1314	93
Glucósido hidrolasa familia 5	<i>Rhizobium sp.</i> N731	93
Celulasa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Vaf-108	85
Celulasa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> BIHB1148	81
Putativa carboximetil celulosa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	81
Glucósido hidrolasa familia 5	<i>Rhizobium sp.</i> NXC14	80
Celulasa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> WSM1689	80

La última de las cepas analizadas fue la cepa de *Streptomyces* CRZM149R, en la que encontramos un gen que codificaría una proteína identificada como *endoglucanasa* (EC 3.2.1.4) (Tabla 58) que pertenece a la familia 5 de las glicosil hidrolasas. Cuando comparamos la secuencia de este gen con la base de datos encontramos que presentaba similitud con otras cepas pertenecientes al género *Streptomyces*, en las que existen glicosil hidrolasas de la familia 1 y 5. La familia GH1, no presenta actividades celulolíticas entre sus funciones, pero sí que presenta actividades *beta-manosidasa*, *beta-glucosidasa* o *beta-xilosidasa*, entre otras.

Tabla 58. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidas enfrentando la secuencia aminocídica de la celulasa anotada en *S. griseoaurantiacus* CRZM149R obtenida en el genoma, utilizando la herramienta BLASTp.

Función descrita	Microorganismo	Similitud %
Endoglucanasa	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> CRZM149R	100
Glucósido hidrolasa	<i>Streptomyces sp.</i> 11-12	84
Aryl-phospho-beta-D-glucosidasa BglC, familia GH1	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> XM201	84
Aryl-phospho-beta-D-glucosidasa BglC, familia GH1	<i>Streptomyces sp.</i> 3124.6	83
Glucósido hidrolasa familia 5	<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu4113	83
Glucósido hidrolasa familia 5	<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL5491	82
Glucósido hidrolasa familia 5	<i>Streptomyces malaysiensis</i> DSM4137	82
Celulasa	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>jinggagensis</i> TL01	82
Glucósido hidrolasa	<i>Streptomyces SP.</i> PBH53	81
Glucósido hidrolasa	<i>Streptomyces reticuli</i> TUE45	81

### 4.3. Otros genes implicados en la colonización y producción de biofilms.

Como ya vimos en capítulos anteriores, las cepas de *Rhizobium* tenían capacidad para sintetizar polisacáridos como la celulosa *in vitro* y además, eran excelentes colonizadores de raíces de maíz, en este caso la cepa CRZM52R. La cepa CRZM149R también mostró capacidad de colonización cuando ésta fue evaluada *in vitro*. Además, en capítulos posteriores veremos como la cepa CRZM18R<sup>T</sup> presenta un comportamiento similar en términos de colonización en raíces de plantas hortícolas. Ambas cepas de *Rhizobium* seleccionadas también mostraron tener capacidad *in vitro* para formar biofilms, característica descrita en otras cepas del género *Rhizobium* capaces de colonizar raíces de leguminosas y no leguminosas (García-Fraile et al. 2012; Robledo et al. 2012; Flores-Félix et al. 2013; Abbamondi et al. 2016; Jiménez-Gómez et al. 2016). En el caso de la cepa de *Streptomyces*, también mostró capacidad de formar biofilms, lo que es consistente con estudios que muestran como especies de *Streptomyces* forman biofilms en diferentes superficies y producen distintos tipos de polisacáridos (Chater et al. 2010). En la formación de biofilms, además de la celulosa, que es importante en el género *Rhizobium* (Robledo et al 2012), hay implicados otros tipos de polisacáridos y moléculas implicadas en su formación y maduración (Rinaudi and Giordano 2010). En este estudio, se han identificado varios genes implicados en su formación en las cepas de *Rhizobium* y también en la cepa de *Streptomyces*.

Entre los genes identificados que codifican para polisacáridos que puedan estar implicados en formación de biofilms se encuentran genes que codifican para lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (CPS), polisacáridos extracelulares (EPS), polisacárido del antígeno K (KPS),  $\beta$ -glucano cíclico (CG; recientemente encontrado en *R. leguminosarum* (Janczarek 2011), polisacárido neutro de alto peso molecular (NP o glucomanano) y polisacárido formador de gel (GPS) (Frayse et al. 2003; Laus et al. 2006). Dentro de los exopolisacáridos (EPS) se han encontrado en *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* 1021, dos tipos de EPS encuentran los succinoglicanos (EPS I) y galactoglucanos (EPS II) (Oliveira et al. 2010).

Observamos que el servidor RAST anotó en la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, varios genes relacionados con la biosíntesis de exopolisacáridos que fueron *exoR*, *exoD*, *exoQ* y *exoF*. No encontramos genes *pps*, relacionados con la producción de EPS de tipo I. Sin embargo, se encontraron genes implicados en las exportaciones de los polisacáridos capsulares (*kpsC*, *kpsT* y *kpsS*). Estos genes *kps* relacionados con el orden Rhizobiales, son polisacáridos ácidos que muestran una analogía estructural con los antígenos K del grupo II de *Escherichia coli* y que, en algunos casos, puede sustituir funcionalmente a los polisacáridos capsulares (CPS) (Becker and Fraysse 2005).

Black et al. (2012) realizaron un estudio de comparación de los genomas de 14 cepas de rhizobia diferentes, en el que encontraron una gran variedad en el contenido de los genes implicados en la producción de biofilms. Por ejemplo, encontraron que las cepas de *Bradyrhizobium* tienen pocos genes *exo* y *pps*, mientras que la cepa de *Mesorhizobium* tiene pocos genes *pps* y bastantes genes *exo*. En nuestro estudio únicamente encontramos cuatro genes *exo* en la cepa de *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup> (*exoD*, *exoF*, *exoR* y *exoQ*) y otros cuatro en la cepa de CRZM52R (*exoF*, *exoR*, *exoQ* y *exoZ*), de forma similar a lo encontrado por Black et al (2012) respecto a número de genes *exo* en los genomas de *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 y en las cepas de *Bradyrhizobium*. Estas diferencias en el número de genes podrían ser

indicativos de una limitada producción de EPS I o que utilizan diferentes estrategias o conjuntos de genes para la producción de estos polisacáridos. El gen *exoR* y otros genes *exo* (*exoAMNOP*) ya fueron identificados anteriormente en cepas de *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Rhizobium* y otros *Rhizobia*, muchos de ellos ampliamente conservados (Reed et al. (1991);Becker et al. (1993); Black et al 2012; Tomlinson et al. 2017).

También se encontraron en la cepa de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup> genes implicados en la síntesis y la exportación de lipopolisacáridos (LPS), como el gen *wzxC*, que codifica una proteína implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos (Janczarek 2011). Este gen también lo encontraron Mazur et al. (2005) en *R.leguminosarum* *bv trifolii* TA1.

Por otro lado, en la cepa de *Streptomyces* encontramos un gen anotado como *adpA*, que codifica para la formación de hifas aéreas. Este gen también se encontró anteriormente en estudios que empleaban una cepa de *Streptomyces griseus* (Ohnishi et al. 1999; O'Toole 2003). También se encontró el gen *opdF*, al igual que en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, que es necesario para el crecimiento anaeróbico de los biofilms de dicha cepa (Sun Yoon et al. 2002), por lo que también puede estar implicado en algún proceso de formación de biofilms de nuestra cepa de estudio CRZM149R.

Por tanto, queda patente que nuestras cepas tienen los genes necesarios para producir biofilms, propiedad que podrá favorecerles a la hora de colonizar la planta huésped.

## 5. PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS ASOCIADAS A LA CEPA DE *STREPTOMYCES* CRZM149R.

Debida a las capacidades antimicrobianas asociadas a las especies pertenecientes al género *Streptomyces*, en el capítulo II mostramos ensayos tanto *in vitro* como *in planta* con la cepa CRZM149R frente a diversos hongos fitopatógenos en el que pudimos observar una disminución de los efectos producidos los mismos. Por esta razón, en el caso particular de la cepa de *Streptomyces* quisimos realizar una búsqueda de genes implicados en antibiosis en su genoma. Además, en este capítulo, también identificamos, que la cepa CRZM149R de *Streptomyces* posee una batería enzimática de degradación de polisacáridos que posiblemente esté implicada en la lucha contra hongos patógenos.

Pudimos observar que contenía gen/es codificantes de la enzima penicilina amidasa, utilizada comercialmente para la producción de penicilinas semisintéticas. Esta enzima se utiliza en la industria farmacéutica para la producción de diversos antibióticos como la carbacefalosporina y el cephalexin. Por lo tanto, tiene un gran interés para la producción y utilización comercial (Wenda et al. 2011).

Encontramos también gen/es codificantes de una enzima  $\beta$ -lactamasa. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, constituyen el 60% del uso mundial de antibióticos, siendo uno de los agentes más efectivos y comúnmente utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Livermore and Woodford 2006). Pero desafortunadamente, la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos va en aumento (Boucher et al. 2009). Entre las diferentes formas de resistencia a los antibióticos de dicho tipo se encuentra la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan el anillo de  $\beta$ -lactama del antibiótico. Las  $\beta$ -lactamasas se

dividen en cuatro clases (Clase A-D) según su similitud de secuencia. Las clases A, C y D funcionan mediante el mecanismo de hidrólisis de éster de serina y específicamente la clase C pertenece al grupo de las cefalofosfonatas (Öztürk et al. 2015). En el genoma de la cepa de *Streptomyces* CRZM149R, encontramos genes que codifican para la  $\beta$ -lactamasa de tipo C. Por tanto, es de gran importancia identificar y estudiar las  $\beta$ -lactamasas para permitir la generación de nuevas hipótesis para una mayor investigación del desarrollo de antibióticos e inhibidores efectivos para patógenos específicos.

Debido al aumento de las resistencias, en las últimas décadas se investigan tanto los mecanismos subyacentes de resistencia, como acabamos de ver, como el descubrimiento de nuevas drogas. En este sentido, se ha observado en la bibliografía que en *Streptomyces rimosus*, conocido como productor de oxitetraciclina (OTC), estaba constituido por el gen de resistencia a OTC, *otrB* (McMurry and Levy 1998) y un gen transportador ABC (putativo), *otrC*. El gen *otrC*, lo encontramos también en nuestra cepa de *S. griseoaurantiacus* CRZM149R. Este gen codifica una proteína con ATPasa y actividades de eflujo multidroga y, por lo tanto, puede representar un objetivo de manipulación de estrategias para mejorar la producción de OTC en las cepas que lo contengan (Yu et al. 2012).

Encontramos también en el genoma de *Streptomyces*, genes que codifican proteínas de resistencia a la biciclomicina (Bcr/CfIA) (Torres-Cortés et al. 2011), así como genes que codifican los componentes de un sistema de regulación que media la resistencia al cobalto, cadmio y zinc (Anton et al. 2004) y un regulador transcripcional de resistencia a antibióticos (Brown et al. 2003).

Además esta cepa mostró poseer genes que codifican para enzimas con actividad quitinasa (EC 3.2.1.14). A través de ellas, la cepa de *Streptomyces* de este estudio podría ser capaz de degradar la pared celular de los hongos fitopatógenos, como está descrito en la bibliografía (Faheem et al 2015), puesto que la quitina es uno de los componentes estructurales de la pared celular de los hongos y se considera esencial para la patogénesis y la transmisión de la enfermedad asociada (Ruiz-Herrera et al., 2006). Las bacterias que tienen esta capacidad de lisis son potenciales candidatos para ser utilizados en el control biológico (Zhao et al 2013).

Algunas cepas de *Streptomyces* con quitinasas han sido efectivas contra fitopatógenos, como por ejemplo *Streptomyces goshikiensis* YCXU contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Faheem et al 2015), *S. griseus* contra *Fusarium oxysporum* (Anitha 2010) y *S. rochei* ACTA1551 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Kanini et al 2013), entre otros.

Por tanto, la capacidad de inhibición *in vitro*, que mostró nuestra cepa de *Streptomyces* contra diversos hongos fitopatógenos podría estar relacionada con la producción de quitinasas. Además como hemos podido ver en este capítulo esta cepa posee además los genes implicados en la producción de sideróforos a través de la enzima citrato sintasa, estando este mecanismo también relacionado con la actividad antifúngica de los microorganismos. Tortora 2011 relacionaron directamente la capacidad inhibitoria de *Azospirillum brasilense* contra *Colletotrichum acutatum* (responsable de la antracnosis en fresa) con la capacidad de esta cepa para formar sideróforos.

Para complementar este apartado realizamos una búsqueda mediante la herramienta Antismash (Medema et al. 2011) de los metabolitos secundarios que podría estar produciendo o podría llegar a producir dicha bacteria. Esta herramienta predijo 24 grupos de genes (clusters), entre los que se encontraron 4 clusters identificados como NRPS (péptidos sintasas

no ribosomales), 4 clusters como diferentes terpenos (compuestos orgánicos), 2 clusters como PKS-1 (poliquetido sintasa tipo 1), 2 clusters como PKS-3 (poliquetido sintasa tipo 3), 2 clusters que se relacionarían con la producción de sideróforos, 6 clusters con ácidos grasos, 1 cluster como furanos (compuestos orgánicos), 1 cluster como bacteriocinas (toxinas proteicas que inhiben el crecimiento de otras bacterias) y otros 2 clusters no específicamente identificados en los que no se ha encontrado ninguna relación con otros clusters de los que se conozca previamente la función de los productos para los que codifican. Cabe destacar que estos clusters podrían codificar la síntesis de nuevas moléculas, no descritas, con capacidad para inhibir el crecimiento de otros microorganismos.

Tabla 59. Proteínas y/o enzimas relacionadas con las características PGPB de los genomas de las cepas CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R y CRZM149R. (Azul: Enzimas/proteínas encontradas en la cepa de *R. zeae* CRZM18R<sup>T</sup>; Verde: Enzimas/proteínas encontradas en la cepa de *R. leucaenae* CRZM52R; Naranja: Enzimas/proteínas encontradas en la cepa de *S. griseoaurantiacus* CRZM149R). EC= Enzyme Commission. TC=Transporter Clasification.

Enzimas/ Proteínas	Clasificación	Actividades conocidas (CaZy)	CRZM18R <sup>T</sup>	CRZM52R	CRZM149R
<b>Producción de sideróforos</b>					
<b>FhuA</b>		Ferric hydroxamate outer membrane receptor	■	■	
<b>FhuB</b>	(TC 3.A.1.14.3)	Ferric hydroxamate ABC transporter, permease component	■	■	■
<b>FhuC</b>	(TC 3.A.1.14.3)	Ferric hydroxamate ABC transporter, ATP-binding protein	■	■	■
<b>FhuD</b>	(TC 3.A.1.14.3)	Ferric hydroxamate ABC transporter, periplasmic substrate binding protein	■	■	■
<b>TonB</b>		Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB	■	■	
<b>Fur</b>		Ferric uptake regulation protein Fur	■	■	
<b>RirA</b>		Iron-responsive repressor RirA	■	■	
<b>Irr</b>		Iron-responsive regulator Irr	■	■	
	(EC 2.3.3.1)	Citrate synthase	■	■	■
<b>Solubilización de fosfato</b>					
<b>PhoA</b>	(EC 3.1.3.1)	Alkaline phosphatase	■	■	
<b>PhoB</b>		Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB (SphR)	■	■	■
	(EC 3.1.1.5)	Lysophospholipase	■	■	
<b>PhoH</b>		Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase	■	■	■
<b>PhoR</b>	(EC 2.7.13.3)	Phosphate regulon sensor protein PhoR (SphS)	■	■	■
<b>PhoQ</b>		response regulator in two-component regulatory system with PhoQ	■	■	
<b>GlpQ</b>	(EC 3.1.4.46)	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	■	■	■
<b>PhnA</b>	(TC 3.A.1.9.1)	Alkylphosphonate utilization operon protein PhnA	■		
<b>PhnE1</b>	(TC 3.A.1.9.1)	Phosphonate ABC transporter permease protein PhnE1	■		
<b>PhnE2</b>		Phosphonate ABC transporter permease protein PhnE2	■		
<b>PhnF</b>		Transcriptional regulator PhnF	■		
<b>PhnH</b>		PhnH protein	■		
<b>PhnI</b>		PhnI protein	■		
<b>PhnJ</b>		PhnJ protein	■		
<b>PhnK</b>		Phosphonates transport ATP-binding protein PhnK	■		
<b>PhnL</b>		Phosphonates transport ATP-binding protein PhnL	■		
<b>PhnM</b>		Metal-dependent hydrolase involved in phosphonate metabolism	■		
<b>PhnO</b>		PhnO protein	■		
<b>PstA</b>	(TC 3.A.1.7.1)	Phosphate transport system permease protein	■	■	■

Tabla 59. Continuación.

<b>PstB</b>	(TC 3.A.1.7.1)	Phosphate transport ATP-binding protein			
<b>PstC</b>	(TC 3.A.1.7.1)	Phosphate transport system permease protein			
	(EC 3.6.1.1)	Inorganic pyrophosphatase			
<b>Pit</b>		Low-affinity inorganic phosphate transporter			
<b>Ppx</b>	(EC 3.6.1.11)	Exopolyphosphatase			
<b>Ppk</b>	(EC 2.7.4.1)	Polyphosphate kinase			
<b>Pqq</b>	(EC 1.1.5.2)	Glucose dehydrogenase, PQQ-dependent			
<b>Tolerancia a la salinidad y Solubilización de potasio</b>					
<b>KdpD</b>	(EC 2.7.3.-)	Osmosensitive K+ channel histidine kinase KdpD			
<b>KefA</b>		Potassium-transporting ATPase subunit A			
<b>KefB</b>		Potassium-transporting ATPase subunit A			
	(EC 5.4.99.16)	Trehalose synthase			
	(EC 3.1.3.12)	Trehalose-6-phosphate phosphatase			
	(EC 2.4.1.15)	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]			
		TrkA-like protein			
		Kup system potassium uptake protein			
<b>Biosíntesis del ácido indol acético</b>					
<b>TSa</b>	(EC 4.2.1.20)	Tryptophan synthase alpha chain			
<b>TSb</b>	(EC 4.2.1.20)	Tryptophan synthase beta chain			
	(EC 1.13.11.11)	Tryptophan 2,3-dioxygenase			
	(EC 6.1.1.2)	Tryptophanyl-tRNA synthetase			
	(EC 1.2.1.3)	Aldehyde dehydrogenase			
	(EC 1.2.1.22)	Aldehyde dehydrogenase B			
	(EC 4.1.1.48)	Indole-3-glycerol phosphate synthase			
	(EC 1.8.1.4)	Dihydrolipoamide dehydrogenase of pyruvate dehydrogenase complex			
	(EC 2.3.1.61)	Dihydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex			
	(EC 1.2.1.10)	Acetaldehyde dehydrogenase			
<b>LorA</b>	(EC 1.2.7.8)	Indolepyruvate oxidoreductase subunit lorA			
<b>LorB</b>	(EC 1.2.7.8)	Indolepyruvate oxidoreductase subunit lorB II			
		Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha and beta subunits			
<b>Fijación de nitrógeno y la simbiosis</b>					
<b>NifU</b>		NifU-like domain protein			
<b>NtrB</b>	(EC 2.7.13.3)	Nitrogen regulation protein NtrB			

Tabla 59. Continuación.

<b>NtrC</b>		Nitrogen regulation protein NtrC			
<b>NtrX</b>		Nitrogen regulation protein NtrX			
<b>NtrY</b>		Nitrogen regulation protein NtrY			
<b>Biosíntesis, procesamiento y degradación de polisacáridos</b>					
	(EC 3.2.1.4)	Glycosyl hydrolase (GH26)			
	(EC 3.2.1.4)	Glycosyl hydrolase (GH5)			
		Glycosyl transferase			
	(EC 3.2.1.91)	Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (non-reducing end)			
	(EC 3.2.1.21)	Beta-glucosidase			
	(EC 3.2.1.50)	Alpha-N-acetylglucosaminidase			
	(EC 3.2.1.52)	Beta-N-acetylglucosaminidase			
<b>Biosíntesis de celulosa</b>					
<b>CelA</b>	(EC 2.4.1.12)	Cellulose synthase catalytic subunit [UDP-forming]			
<b>CelB</b>		Cyclic di-GMP binding protein precursor			
<b>CelC</b>	(EC 3.2.1.4)	Endoglucanase (Glycosyl hydrolase family 8)			
<b>Colonización y producción de biofilms</b>					
<b>ExoD</b>		Exopolysaccharide synthesis ExoD			
<b>ExoF</b>		Exopolysaccharide production protein ExoF precursor			
<b>ExoR</b>		Exopolysacchride production negative regulator ExoR			
<b>ExoQ</b>		Exopolysaccharide production protein ExoQ			
<b>ExoZ</b>		Exopolysaccharide production protein ExoZ			
<b>KpsC</b>		Capsular polysaccharide export system protein KpsC			
<b>KpsT</b>		Capsular polysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein KpsT			
<b>KpsS</b>		Capsular polysaccharide export system protein KpsS			
<b>WzxC</b>		Encoding a lipopolysaccharide biosynthesis protein			
<b>LptB</b>		Lypopolysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein			
<b>AdpA</b>		A-factor-dependent protein AdpA			
<b>OpdF</b>		Outer membrane protein OpdF			



***Obtención y caracterización bioquímica  
de un mutante superproductor de  
celulasa CelC2 en Rhizobium leucaenae***

**Capítulo V**



En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una larga trayectoria en el estudio de las celulasas, en concreto, en la celulasa CelC2 producida por *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843. Esta celulasa presenta una serie de características que la implican en el proceso de infección primaria y secundaria de su hospedador *Trifolium repens* (Robledo et al., 2008; Robledo et al. 2011b). Debido al importante papel que representa dicha enzima en varios puntos de la interacción mutualista *Rhizobium*-leguminosa, decidimos dar un paso adelante y realizar un estudio en cereales, utilizando *Rhizobium leucaenae* CRZM52R, excelente colonizadora de las superficies radiculares de plantas de maíz que, en este caso, expresa de manera heteróloga la celulasa (CelC2) de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843.

## **1. OBTENCIÓN DE LA CEPA TRANSFORMANTE DE *R. LEUCAENAE* QUE EXPRESA HETERÓLOGAMENTE LA CELULASA CELC2.**

Para sobreexpresar la celulasa en la cepa CRZM52R de *R. leucaenae*, se utilizó un plásmido estable en rizobios que expresa constitutivamente el gen *celC*, denominado pJZC2, diseñado previamente por Robledo et al. (2011b). Esta transformación se realizó mediante conjugación triparental, utilizando como donadora la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contenía dicho plásmido, la cepa *helper E. coli* pRK2013 y la cepa receptora de *R. leucaenae* CRZM52R.

Paralelamente, se realizó una conjugación en la que utilizamos como donadora una *E. coli* DH5 $\alpha$  que contenía el plásmido vacío pBBR1-MCS-2 (Kovach et al. 1994), y mediante la misma metodología, se realizó el mutante denominado “*empty vector*”, transformando la cepa silvestre CRZM52R con el plásmido, con el fin de utilizar esta cepa como control. Éste es el plásmido que también se utilizó para la realización del plásmido pJZC2 en Robledo et al. (2011).

### **1.1. Detección de la actividad celulásica.**

Por tanto, una vez obtenidos los transformantes deseados, se llevaron a cabo distintos ensayos enzimáticos para determinar, la actividad celulásica y celolítica tanto de forma cualitativa como cuantitativa de las cepas de estudio.

#### **1.1.1. Detección de la actividad celulásica en cultivo celular y en extractos mediante la técnica de difusión en placa de doble capa.**

En primer lugar, determinamos cualitativamente la existencia de la actividad celolítica por parte de las cepas de estudio mediante cultivos celulares (Fig 49A) y extractos sonificados (Fig 49B). De esta manera podremos establecer diferencias, ya que en las zonas donde existe hidrólisis enzimática del sustrato no se tiñen de Rojo Congo.

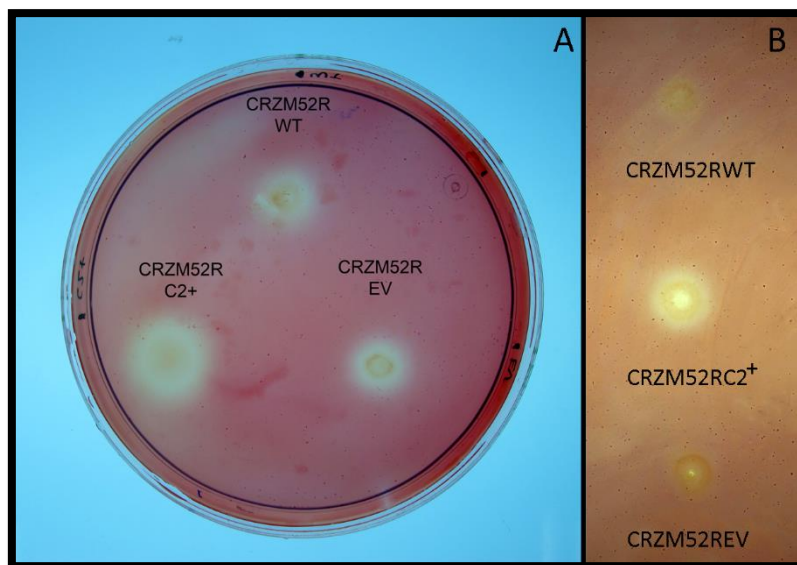


Fig. 49. A) Detección de la actividad carboximetilcelulásica de las cepas de estudio en placas de doble capa A) mediante cultivo celular; B) Actividad celulolítica de los extractos celulares proteicos obtenidos por sonicación de la cepa CRZM52RWT, CRZM52RC2<sup>+</sup> y CRZM52REV.

En ambos ensayos pudimos observar claramente que la actividad celulolítica por parte de la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>, se vio incrementada respecto a las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV. Estos datos confirman la sobreexpresión del gen *celC* en la cepa seleccionada de *R.leucaenae* (CRZM52RC2<sup>+</sup>).

Otros trabajos previamente confirmaron mediante esta técnica la expresión de las cepas superproductoras de la celulasa CelC2 (Robledo et al 2011b, T.D Rivera 2013) T.D Menéndez 2014), obteniendo en todos ellos halos de hidrólisis mayores que en sus respectivas cepas silvestres.

### 1.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y zimograma.

Para determinar las isoenzimas con actividad celulásica en los extractos proteicos de las cepas de estudio, se realizó en primer lugar una separación de las proteínas contenidas en el extracto, realizándose una electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes (Jiménez-Zurdo et al. 1996) (Fig 50A). En segundo lugar, se realizó la detección de actividad poniendo en contacto los geles de poliacrilamida con geles de agarosa que contenían CMC y revelando con Rojo Congo, al igual que se realizó con las placas en doble capa. Con ello, se visualizaron las zonas de hidrólisis que corresponden con la banda detectada de la celulasa CelC2 (Fig 50B).

Podemos observar como en el gel de poliacrilamida se observa una banda más intensa alrededor de 31 Kda en el carril correspondiente al extracto de CRZM52RC2<sup>+</sup>, que no aparecen ni en la cepa CRZM52RWT, ni en la CRZM52REV. En el zimograma podemos comprobar que en el carril correspondiente a la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup> aparece un halo de hidrólisis a la misma altura que aparece la banda más intensa en el gel de poliacrilamida, confirmándose la actividad de esa proteína. Además, tanto en el carril correspondiente a la cepa CRZM52RWT y en el de CRZM52REV se observan dos halos de hidrólisis a una altura un poco superior a la del halo producido por la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>. Estos halos se corresponden con una alta probabilidad con

alguna proteína con actividad celulásica homóloga a la CelC2 de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843. Además, debemos tener en cuenta que existe la posibilidad de que el halo de hidrólisis de la cepa superproductora esté enmascarando el halo correspondiente a su propia celulasa. Este resultado y la aparición de halo en las cepas silvestre y EV en las placas de doble capa nos confirman la existencia de una celulasa propia de *R. leucaenae* CRZM52R, que presente homología con la de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 y posiblemente con otras celulasas CelC presentes en las diferentes especies del género *Rhizobium*, lo que se relaciona con los resultados obtenidos por Robledo et al (2011b), T.D Robledo (2010) y T.D Menéndez (2014), en los que logran identificar genes *celC* en las especies de *Rhizobium* que codifican para proteínas con cierta homología con la celulasa CelC2.

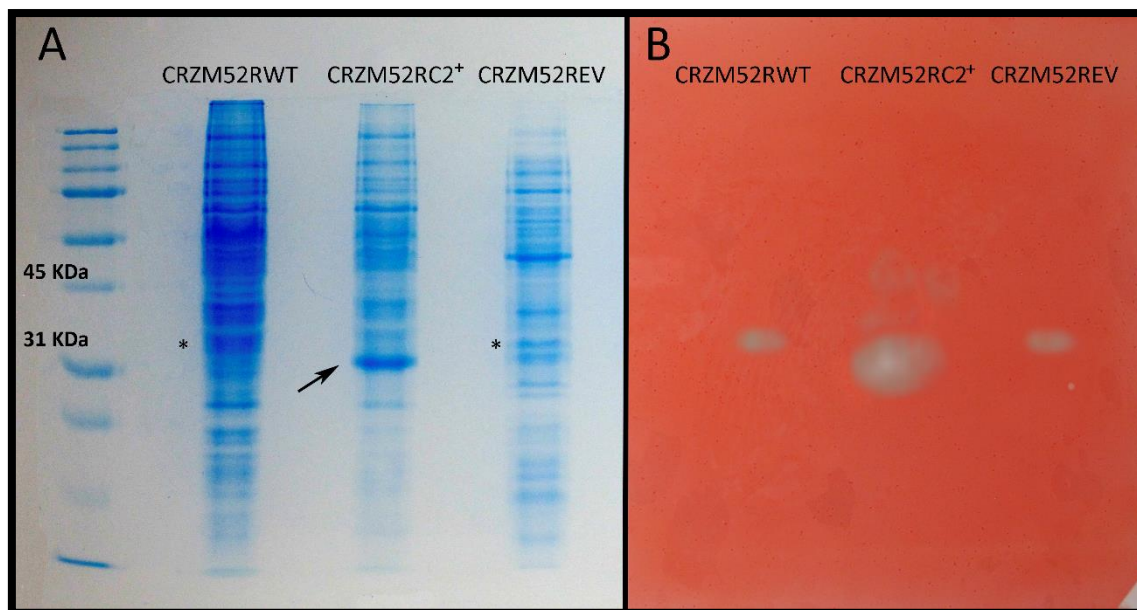


Fig. 50. A) Separación y detección de isoenzimas mediante SDS-PAGE y B) Zimograma, ambos realizados con los extractos de las cepas de estudio. Los asteriscos corresponden a la banda correspondiente a una posible celulasa CelC y la flecha indica la banda correspondiente a la acumulación de CelC2 de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 expresada en *R. leucaenae* CRZM52R.

### 1.1.3. Cuantificación de la actividad celulolítica.

Por último cuantificamos la actividad celulolítica mediante un ensayo de valoración de la reducción de azúcares o BCA (4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina) del extracto sonicado de las cepas de estudio, utilizando para ello el método de valoración de azúcares reductores propuesto por Waffenschmidt and Jaenicke (1987) y modificado por Mateos et al. (1992).

El valor resultante de la actividad enzimática de la cepa transformante CRZM52RC2<sup>+</sup>, triplica los valores obtenidos en las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV (Fig. 51). Por lo que se puede confirmar de manera cuantitativa que existe un incremento en la actividad celulásica con respecto a la cepa silvestre.

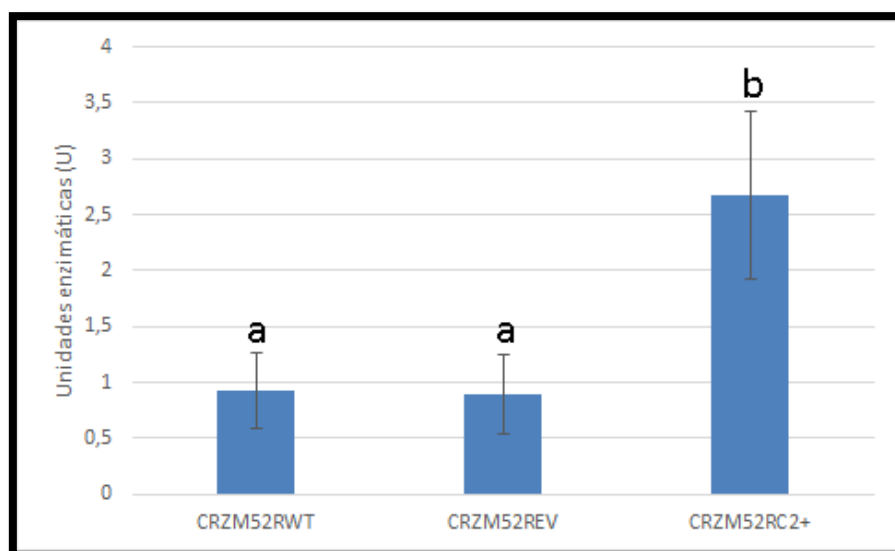


Fig. 51. Cuantificación de la actividad celulásica en extractos celulares por el método BCA. Los resultados se muestran en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que libera un nmol de azúcar reductor equivalente (en este caso glucosa) por minuto a 40°C y pH5. Los resultados corresponden a la media de tres réplicas y las barras de error a la desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

Estos valores se compararon con los obtenidos en estudios anteriores, obteniendo que la actividad de la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup> es superior a la detectada en la cepa WSM419C2<sup>+</sup> y menor a los valores obtenidos en las cepas ANU843C2<sup>+</sup>, 1021C2<sup>+</sup> y E11C2<sup>+</sup>. Estas diferencias en actividad celulolítica entre cepas que sobreexpresan la celulasa CelC2 tanto de manera homóloga como heteróloga pueden deberse al número de copias que posean del plásmido que contiene el gen *celC*, el plásmido pJZC2.

#### 1.1.4. Detección de la proteína CelC2 mediante Inmunoblot.

Para despejar cualquier duda en cuanto a la posibilidad de la existencia de una celulasa con actividad y gracias a la disponibilidad de anticuerpos específicos de la proteína CelC2, se realizó un Western Blot con los extractos sonicados de las cepas de estudio. Disponíamos de la celulasa CelC2 purificada (TD Menendez 2014) y también de los anticuerpos policlonales diseñados contra un fragmento del centro catalítico de dicha proteína. Por ello, y con la premisa de comprobar si los anticuerpos que tenemos pueden también reaccionar con la posible celulasa propia de *R. leucaneae*, realizamos un *Western Blot* (inmunoblot) con los extractos sonicados y normalizados de las cepas de estudio empleados en las pruebas anteriores; además, incluimos un control positivo de la celulasa CelC2 purificada (Fig 52).



Fig. 52. Western blot de los extractos obtenidos de las cepas de estudio. Se incluye también un control de celulasa CelC2 purificada.

Los resultados obtenidos muestran la detección de una banda correspondiente al extracto del transformante heterólogo CRZM52RC2<sup>+</sup>, que coincidía en tamaño con la banda correspondiente a la celulasa CelC2 purificada. No obtuvimos ninguna banda en el caso de la cepa CRZM52RWT y en la cepa CRZM52REV, lo que sugiere que la(s) posible(s) celulasa(s) de dicha cepa no presenta homología en la zona en la cual fue diseñado el anticuerpo policlonal.

## 2. EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE CELULASA CELC2 EN LA BIOSÍNTESIS DE CELULOSA Y FORMACIÓN DE BIOFILMS.

En este apartado determinamos el comportamiento de la cepa silvestre CRZM52RWT y sus derivados, tanto en la producción de celulosa como en la formación de biofilms, es decir, cómo colonizan las superficies abióticas.

Pudimos observar que la producción del exopolisacárido tanto la cepa silvestre (Fig. 53A) como la *empty vector* (Fig.53B) presentaban un color más rojizo que la cepa del transformante heterólogo (Fig. 53C), donde apreciamos un cambio en la estructura y en la coloración, ya que en la zona central el exopolisacárido es de color blanquecino mientras que el cilindro exterior tiene color rojizo similar al de la cepa silvestre.

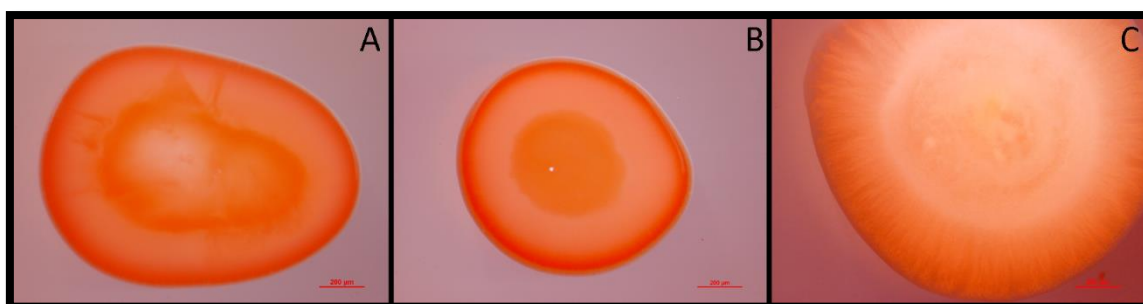


Fig. 53. Producción de celulosa en medio YMA suplementado con Rojo Congo por parte de las cepas: A) CRZM52RWT, B) CRZM52REV y C) CRZM52RC2<sup>+</sup>.

Cuando se compararon nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios de sobreexpresión de la celulasa CelC2, observamos que nuestro resultado no coincidía con el obtenido por ninguno de ellos, ya que a pesar que observamos disminución en la coloración,

seguía siendo una producción de celulosa positivo y además, presentaba un cambio en su estructura. También T.D Menéndez (2014) observó un cambio estructural de la producción de celulosa en la cepa WSM419C2<sup>+</sup>, cuando se comparó con su cepa silvestre, asociándolo con una alteración en la formación de polisacárido. Sin embargo, al igual que la cepa 1021C2<sup>+</sup>, no observaron cambio aparente con sus respectivas cepas silvestres (T.D Menéndez 2014). En cuanto a las cepas de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843C2<sup>+</sup> (Robledo et al. 2012) y E11C2<sup>+</sup> (T.D Rivera 2013), disminuyeron sus coloraciones drásticamente, respecto a sus cepas silvestres.

Cuando analizamos la capacidad para formar biofilms de la cepa CRZM52RWT y sus derivados (Figura 54), observamos que los datos obtenidos siguen la misma tendencia que la obtenida en la producción de celulosa por parte de estas mismas cepas. Los resultados mostraron que la formación de biofilms, es significativamente mayor a las 48 y a las 72 horas, en el caso de las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV, en comparación con la producción por parte de la cepa superproductora de celulosa CelC2.

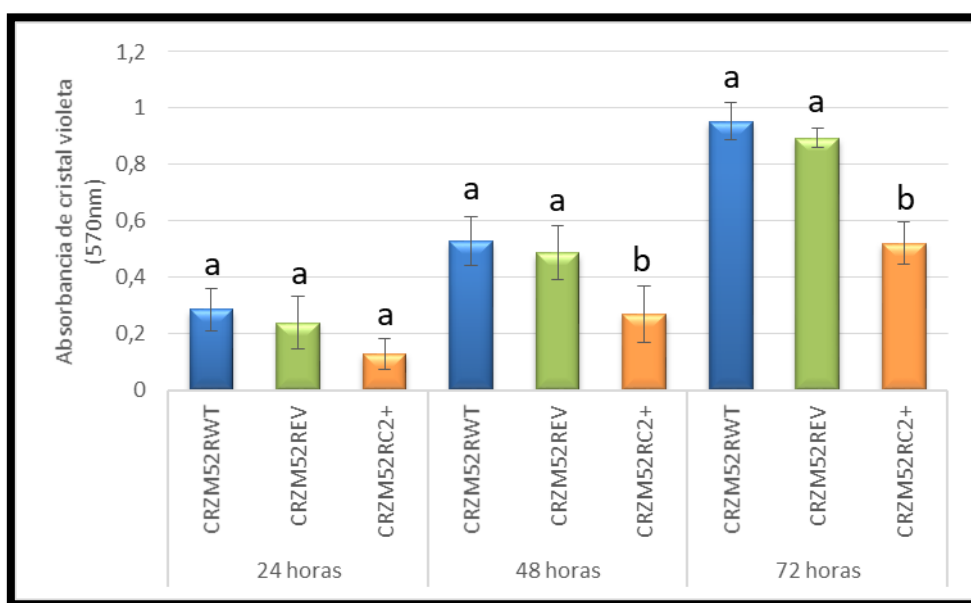


Fig. 54. Ensayo de formación de biofilms en placas de microtitulación de polivinil cloruro (PVC) de las cepas de estudio. El ensayo se realizó a distintos tiempos de crecimiento estático en medio rico suplementado con antibiótico cuando fue necesario. La capacidad de formación de biofilms de las especies de estudio se midió a 570 nm, después de una tinción con Cristal Violeta al 0,3%. Antes de la medida del revelado se realizó una lectura a 595 nm para valorar el crecimiento y que no hubiese diferencias significativas entre ellas. Cada columna representa el valor medio de al menos 8 pocillos. Las barras de error representan el error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher ( $p < 0,05$ ).

Nuestras observaciones son similares a las descritas en Robledo et al. (2012), ya que también la cepa de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843C2<sup>+</sup> presentó una disminución en la formación de biofilms que resultó ser estadísticamente significativa respecto a su cepa silvestre. Además, los resultados presentados en otros trabajos de nuestro grupo de investigación en que se evaluó la producción de celulosa y formación de biofilms en transformantes de *Rhizobium* que sobreexpresaban la celulasa CelC2 (TD Robledo, 2010; TD Rivera, 2013) fueron similares a los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, los resultados presentados por las cepas que producían heterológicamente la celulasa CelC2 en cepas del género *Ensifer* fueron ligeramente diferentes, no presentando diferencias significativas entre los biofilms formados por las cepas silvestre/vector vacío y el transformante CelC2<sup>+</sup> (TD Menéndez, 2014). En el caso de la producción de celulosa en *E. medicae* WSM419C2<sup>+</sup>, la consistencia del polisacárido se veía



afectada, pero no la afinidad por el Rojo Congo. Todos los mutantes superproductores de celulasa CelC2 muestran alterados sus comportamientos en cuanto a la biosíntesis de celulosa y formación de biofilms en un mayor o menor grado. Estos resultados, unidos a los derivados de este estudio indican que la disminución significativa de la producción de biofilms y las diferencias en coloración obtenidas en el ensayo de producción de celulosa en el caso de las cepas superproductoras podría ser una característica asociada a las cepas del género *Rhizobium*, ya que las cepas del género *Ensifer* no muestran resultados tan evidentes, lo que sugiere que existe una cierta especificidad en la celulasa CelC2 a este nivel.

Robledo et al. (2012) sugiere que la reducción de la producción de celulosa en la cepa de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843C2<sup>+</sup> implica que no produzca otras sustancias que se unen fuertemente al rojo Congo y por tanto no contribuyen a la coloración roja. Al mismo tiempo queda reducida también su capacidad para producir biofilms tanto en superficies abióticas como bióticas, puesto que le afectó a la capacidad para producir microfibrillas externas, evitando así que establezcan una estrecha unión al sustrato (Robledo et al. 2012).

Se ha demostrado que las microfibrillas de celulosa producidas por los rizobios facilitan la colonización del hospedador (Dazzo et al. 1984; Mateos et al. 1995), pero no es un factor limitante, ya que por ejemplo la inactivación de la biosíntesis de celulosa en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* no impidió a dicha bacteria a nodular el trébol, en condiciones de laboratorio (Ausmees et al. 1999). Además, como ya hemos podido ver en capítulos anteriores existen otros factores que permiten a las bacterias a colonizar las plantas como los CWDEs (James et al. 2002), la hidrólisis localizada de los pelos radicales, en el caso de las leguminosas (Robledo et al. 2008, 2011), la entrada pasiva por las raíces secundarias (Gregory 2008) o la estimulación de la colonización mediante flavonoides (Jain and Gupta 2003), entre otros.

### **3. EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA CELULASA CELC2 EN EL DESARROLLO RADICULAR DE PLÁNTULAS DE ZEA MAYS.**

Una vez caracterizado el transformante de *R. leucaenae* CRZM52R que expresa heterológamente la celulasa CelC2, nos planteamos evaluar el fenotipo que podría producir *in planta*. En un primer lugar, realizamos un ensayo *in vitro* de interacción de dicha cepa con raíces de plántulas de maíz en los primeros estadios de crecimiento, analizando el número de raíces secundarias y la longitud de la raíz principal a los 6, 10 y 13 dpi. Se incluyen en el ensayo plántulas inoculadas con las cepas silvestre y *empty vector*, además de un control sin inocular (Tabla 60) (Figura 55).

Tabla 60. Resultados obtenidos a los 6, 10 y 13 dpi, inoculando las cepas de estudio sobre plántulas de maíz.

Días post inoculación	Tratamientos	Número de raíces secundarias	Longitud de la raíz principal (cm)
<b>6 dpi</b>	Control	4,600±0,245a	4,500±0,500a
	CRZM52RWT	7,667±0,408b	8,667±0,441b
	CRZM52REV	7,800±0,200b	8,500±0,500b
	CRZM52RC2 <sup>+</sup>	7,000±0,667b	9,000±0,577b
<b>10 dpi</b>	Control	5,250±0,479a	10,733±0,536a
	CRZM52RWT	8,667±0,333b	14,750±0,250b
	CRZM52REV	8,500±0,500b	15,750±0,479b
	CRZM52RC2 <sup>+</sup>	7,333±0,333b	15,125±0,427b
<b>13 dpi</b>	Control	7,583±0,403a	10,733±0,536a
	CRZM52RWT	10,333±0,333b	18,050±0,250b
	CRZM52REV	10,000±0,408b	17,950±0,479b
	CRZM52RC2 <sup>+</sup>	9,250±0,479b	19,125±0,427b

\*Los valores representan la media ± el error estándar de 12 plantas por cada uno de los tratamientos (n=12).

\*Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher (p≥0,05).

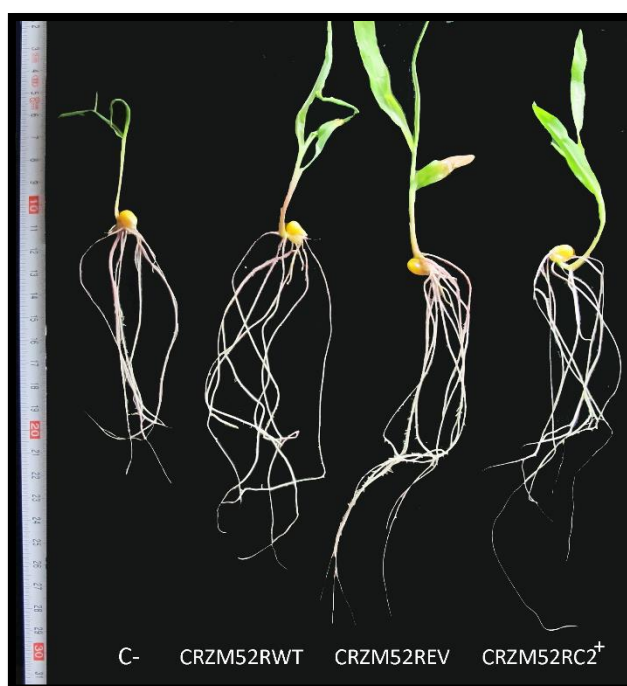


Fig. 55. Fenotipo mostrado por las plantas de *Zea mays*, a los 13 dpi, de izquierda a derecha, control sin inocular, inoculadas con la cepa CRZM52RWT, CRZM52REV y CRZM52RC2<sup>+</sup>.

Los resultados obtenidos muestran como la inoculación con el transformante CRZM52RC2<sup>+</sup> no suponía ninguna alteración visible del fenotipo de la plántula de maíz. Tanto las medidas obtenidas de la longitud de la raíz principal como en los resultados del número de raíces secundarias fueron superiores al control sin inocular. Previamente, comprobamos que la cepa

CRZM52RWT, producía una promoción del crecimiento radicular en los primeros estadíos y que los resultados de las medidas (longitud de la raíz principal y número de raíces) eran estadísticamente significativos con respecto al control sin inocular. El transformante CRZM52REV se comportó de una forma similar a la cepa silvestre. Las plantas inoculadas con el transformante CRZM52RC2<sup>+</sup> mostraron un número de raíces secundarias ligeramente inferior al de las plantas inoculadas con la cepa silvestre y la que contenía el vector vacío. Sin embargo, en cuanto a la longitud de la raíz principal, las plantas inoculadas con el transformante que expresa heterológicamente la celulasa CelC2 presentó unos valores ligeramente superiores a los de las plantas inoculadas con la cepa silvestre y la que contenía el vector vacío. Estos resultados se mantuvieron de una forma similar en todos los días post-inoculación en los que fueron tomadas dichas medidas.

#### **4. EVALUACIÓN DE LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN DE *R. LEUCAENAE* CRZM52RC2<sup>+</sup> EN RAÍCES DE *ZEA MAYS*.**

Debido al importante papel que desempeña la celulasa CelC2 en la colonización de superficies tanto bióticas como abióticas (Robledo et al. 2012), y habiendo evaluado su efecto en superficies abióticas, decidimos evaluar la implicación de la superproducción de celulasa CelC2 en la colonización e infección de las cepas de estudio en las raíces de maíz mediante microscopía confocal, es decir, en superficies bióticas.

##### **4.1. Ensayos de colonización mediante microscopía confocal.**

Para la realización de dicho ensayo transformamos en primer lugar las cepas de estudio con el plásmido pHc60, que expresa una GFP, y posteriormente, inoculamos las raíces para ver su comportamiento mediante microscopía confocal.

Todas las raíces se observaron a los 13 dpi, ya que en el capítulo anterior pudimos ver la colonización óptima entorno a dichos días. Observamos que las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV, colonizaban las raíces de modo similar, apreciándose una efectiva colonización de la superficie radicular (Figura 56A y 56B). En los cortes transversales de la raíz, observamos que las cepas inoculadas colonizan intra e intercelularmente (Figura 56D y 56E). Además, se ha observado infección intracelular en los pelos de la raíz (Figura 56G) y formación de biofilm cerca de éstos (Fig. 56H). La colonización observada en este ensayo se asemeja a la observada por la cepa silvestre CRZM52R en el capítulo anterior, observándose una predilección en la zona de los pelos radicales, colonización intracelular y bacterias que atravesaban desde la corteza hasta el interior del cilindro vascular.

En el caso de las raíces inoculadas con el transformante heterólogo CRZM52RC2<sup>+</sup>, aparentemente se muestra una disminución de la colonización (Figura 56C), pero sin embargo, se observa una mayor infección (Figura 56F). Observamos también una posible infección intracelular de los pelos de la raíz (Figura 56I).

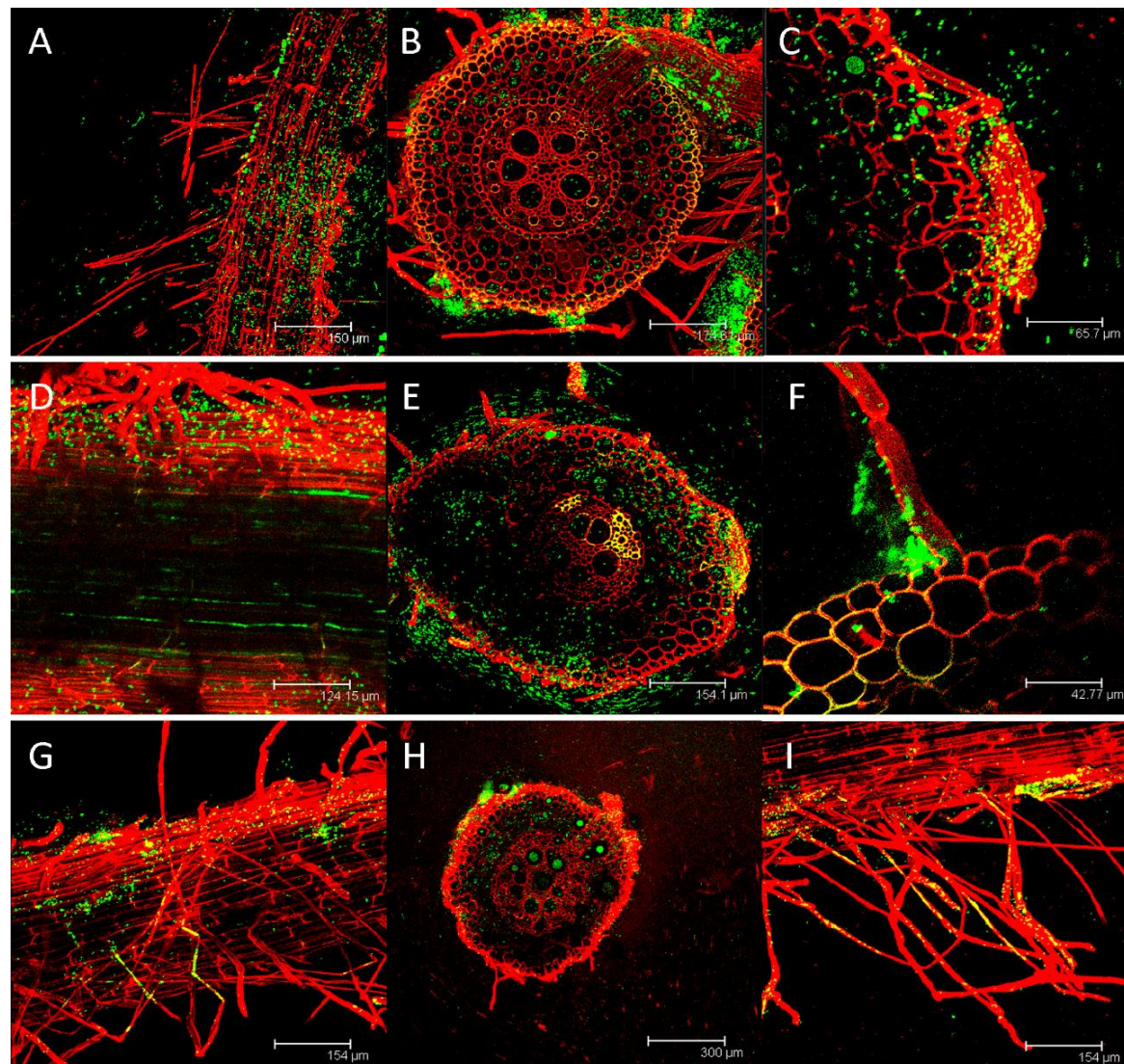


Fig. 56. Raíces de maíz inoculadas con las cepas de estudio transformadas con GFP (verde) y teñidas con yoduro de propidio (rojo) a los X dpi. Raíces de maíz inoculadas con la cepa CRZM52RWT A) Superficie radicular de maíz; B) Sección de la raíz del maíz; C) Detalle de la sección. Raíces de maíz inoculadas con la cepa CRZM52REV D) Superficie radicular de maíz; E) Sección de la raíz del maíz; F) Detalle un biofilm formado en un pelo radicular. Raíces de maíz inoculadas con la cepa CRZM52RC2+ G) Superficie radicular de maíz; H) Sección de la raíz del maíz; I) Detalle de la colonización a lo largo de los pelos radiculares.

Las raíces de maíz inoculadas con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>, comparadas con las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV, presentan una disminución de la colonización superficial, además, se aprecia una disminución de la formación de biofilms y una colonización a lo largo de los pelos radiculares, mientras que en la cepa silvestre y en la *empty vector*, la colonización se acumula en la base de los pelos radiculares.

Cuando se compararon nuestros resultados con otros trabajos en los que se utilizaron cepas de *Rhizobium* y sus derivados que producen homo u heterológamente dicha celulasa para observar la colonización, observamos que al igual que en nuestro ensayo la cepa E11C2<sup>+</sup> de *Rhizobium* (T.D Rivera 2013) tenía disminuida la capacidad de formación de biofilms con respecto a la cepa silvestre en raíces de arroz; sin embargo, en dicho trabajo observaron una predilección por parte de la cepa superproductora por la base de los pelos radiculares mientras que nuestra cepa mostraba una colonización a lo largo de los pelos. Al igual que en nuestro ensayo Robledo et al. (2012), observaron diferencias en los pelos radiculares en la cepa superproductora de *Rhizobium* ANU843C2<sup>+</sup> en raíces de *Trifolium repens*, ya que la cepa silvestre formaba *caps* en el ápice de los pelos radiculares, mientras que la cepa sobreproductora de celulasa CelC2, no formaba dichos *caps*, si no que colonizan los pelos radiculares a lo largo y/o en su base. Este fenotipo también fue observado en raíces de *Medicago truncatula* con la cepa 1021C2<sup>+</sup> de *Ensifer meliloti*, un género afín a *Rhizobium* (T.D Menéndez 2014).

Por otra parte, aunque se ha visto que la biosíntesis de celulosa no es imprescindible para la colonización (Robledo et al. 2012), sí que tiene cierta influencia, lo que se confirma en este estudio, en el que la colonización de la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup> se ha visto influenciada por la sobreexpresión de dicha celulasa. Además, la cantidad de biofilm producido por la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup> se ha visto disminuida, lo que concuerda con los estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre cepas que sobreexpresan la celulasa CelC2 que han visto disminuida en mayor o menor grado su capacidad para producir biofilms (T.D. Robledo 2010; T.D. Rivera 2013; T.D Menéndez 2014). Además, la ausencia de este polímero probablemente afecta a la formación de biopelículas tridimensionales también en la punta de los pelos radicales, tal como ha sugerido (Williams et al. 2008).

Otra hipótesis es que exista una implicación de la planta en la adhesión bacteriana a la superficie de la raíz, bien de forma directa debida a la propia producción de celulosa vegetal o a la inducción por parte de la planta de la biosíntesis de celulosa bacteriana; o de forma indirecta inhibiendo el enzima (CelC2) mediante la producción de proteasas que la degraden u otras moléculas o condiciones que afecten a su acción enzimática. Además, se debe tener en cuenta que existen diferencias entre la capacidad de las cepas de estudio de adherirse a la superficie de la raíz y a los pelos radicales (T.D Menéndez 2014).

Por tanto, se observa que la formación de biofilms se ve alterada tanto en los ensayos realizados *in vitro* como los realizados *in planta*, por las cepas superproductoras de la celulasa CelC2, lo cual permite afirmar que dicha celulasa se encuentra implicada en la adhesión de las bacterias a la planta y en la formación de biofilms, probablemente a través de su implicación en la biosíntesis de celulosa.

## 4.2. Ensayos de colonización mediante microscopía óptica y electrónica.

Para una caracterización más completa de la interacción de las cepas de estudio con las raíces de maíz, se realizó el análisis de la interacción de dichas cepas en raíces de maíz mediante microscopía electrónica de transmisión, lo que nos permite determinar de una forma más fina si existe verdaderamente infección por parte de las bacterias en el interior de las raíces de maíz.

Para llevar a cabo dicho estudio, se inocularon las cepas de estudio sobre raíces de maíz previamente esterilizadas en superficie y germinadas y pasados 14 dpi, se llevaron al servicio Nucleus de la USAL, para la preparación de los cortes semifinos y ultrafinos, y posteriormente observar las muestras en el microscopía electrónica de transmisión.

Previa a la visualización de los cortes ultrafinos en el microscopio electrónico veremos en primer lugar, los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina en el microscopio óptico para tener así una visión general de los cortes transversales a menores aumentos.

En las raíces de maíz control sin inocular, podemos ver que la estructura de la raíz, se encuentra en buen estado y aparentemente no se observan bacterias en el interior (Fig. 57A). Tanto la cepa CRZM52REV como la cepa CRZM52RWT se comportan de manera similar en las raíces de maíz, en ellas apreciamos unas estructuras que se corresponden a las bacterias inoculadas y que no veíamos en las raíces control; además, se pueden observar unas estructuras del tipo de canales de infección, por donde podrían entrar las bacterias desde la zona externa de la raíz al interior de la misma (Fig 57B). También, vemos claramente estructuras tridimensionales, que se asemejan a las formaciones de biofilms creados por las bacterias, y próximo a éstas, apreciamos lo que podría ser una posible entrada de las bacterias entre las células vegetales de la raíz, es decir, colonización intercelular (Fig 57C). En este mismo tratamiento apreciamos de nuevo, los posibles canales de infección, formados por las bacterias para colonizar la raíz (Fig 57D). Sin embargo, en las raíces inoculadas con la cepa que sobreexpresa la celulasa CelC2, CRZM52RC2<sup>+</sup>, apreciamos que la cantidad de bacterias es visiblemente mayor en el interior de las células (Fig 57E). En este mismo tratamiento observamos también tanto formaciones de biofilms en la superficie radicular, como los canales de infección ya observados (Fig 57F).

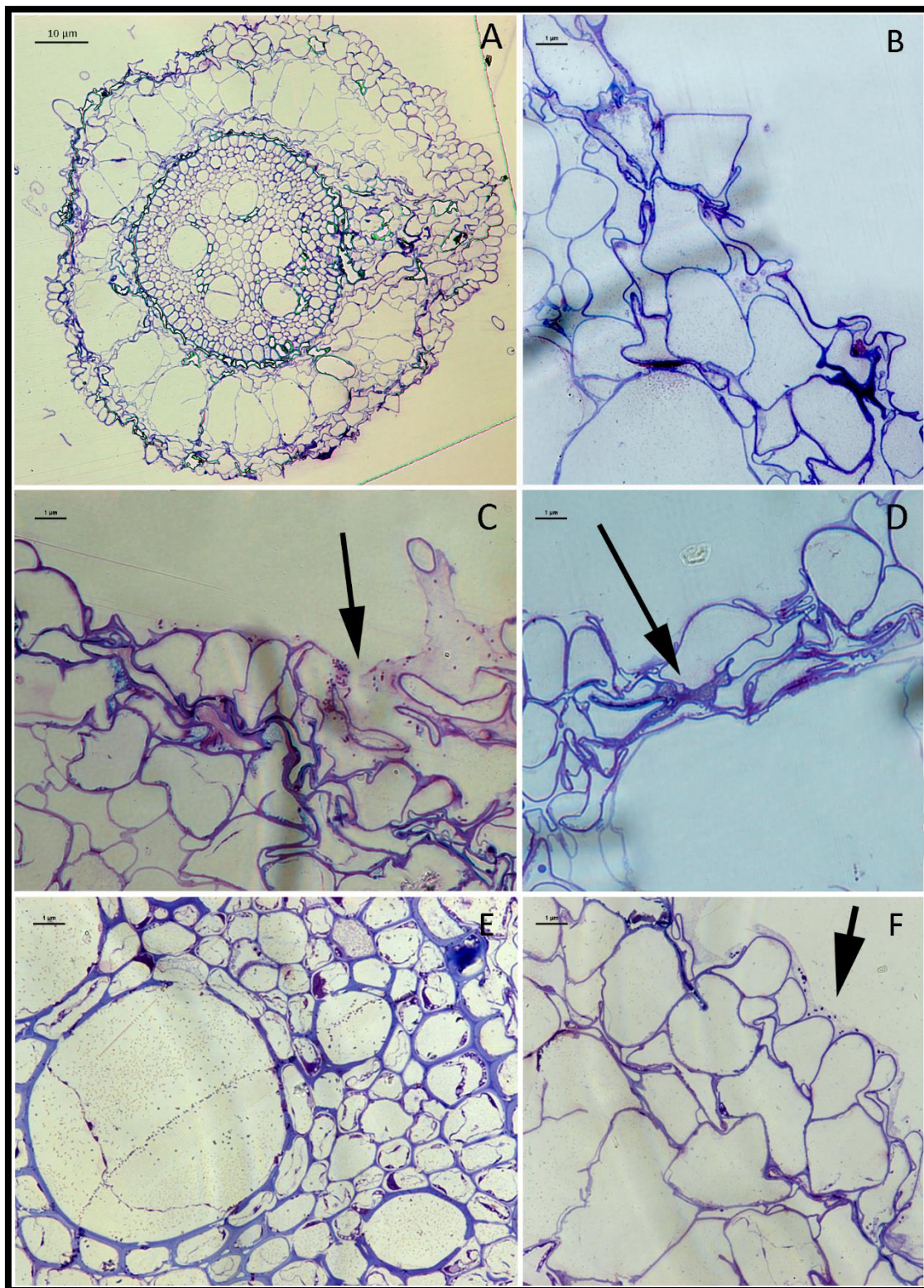


Fig. 57 Cortes transversales semifinos de las raíces de maíz, teñidos con azul de toluidina, observados mediante microscopía óptica de fluorescencia. A) Corte transversal de la raíz de maíz a los 14 dpi sin inocular; B, C, D) Cortes transversales de raíces de maíz a los 14 dpi, inoculadas con la cepa CRZM52RWT; E, F) Cortes transversales de raíces de maíz a los 14 dpi, inoculadas con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>.

Una vez localizadas las bacterias mediante microscopía óptica pasamos a analizar los cortes ultrafinos en el microscopio electrónico. De nuevo, en las muestras de raíces control sin inocular, no observamos ninguna estructura que nos pudiesen indicar la presencia de bacterias, lo que confirma que las raíces control no contenían contaminaciones de tipo microbiano (Fig 58A).

Por otro lado, como en todos los ensayos previos veíamos que la cepa CRZM52REV, se comportaba siempre de manera similar a la cepa CRZM52RWT, nos centramos en los resultados obtenidos en las inoculaciones realizadas con ésta última. En las raíces de maíz inoculadas con la cepa CRZM52RWT, observamos en primer lugar, el contenido casi completo de una de las células de la raíz del maíz, en la que pudimos apreciar que en la zona inferior de la imagen, aparecían unas estructuras que no vimos en ningún caso en las raíces control (Fig 58B).

Cuando aumentamos la imagen, pudimos observar unas formaciones que aparentemente podrían ser bacterias, éstas parecen provenir de una invaginación desde espacio periplásmico hacia el interior, situándose en el citoplasma, pero no en contacto directo, si no formando unas estructuras, similares a las “vesículas” flanqueadas por la membrana plasmática vegetal, lo que les impide quedarse en contacto directo con el citoplasma (Fig 58C). A más aumentos, podemos ver mejor que se trataba de bacterias (Fig 58D)

En el caso de las raíces de maíz inoculadas con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>, podemos observar también las invaginaciones formadas por las supuestas bacterias, de la misma manera que en lo hacían las bacterias CRZM52RWT, invaginándose desde el espacio periplásmico hasta el citoplasma envueltas en la membrana plasmática (Fig 58E). Sin embargo, en este tratamiento pudimos observar en repetidas ocasiones que, a diferencia de los tratamientos anteriores, se encontraban roturas en las células vegetales, posiblemente debidas a una acción localizada de la celulasa (Fig 58F).



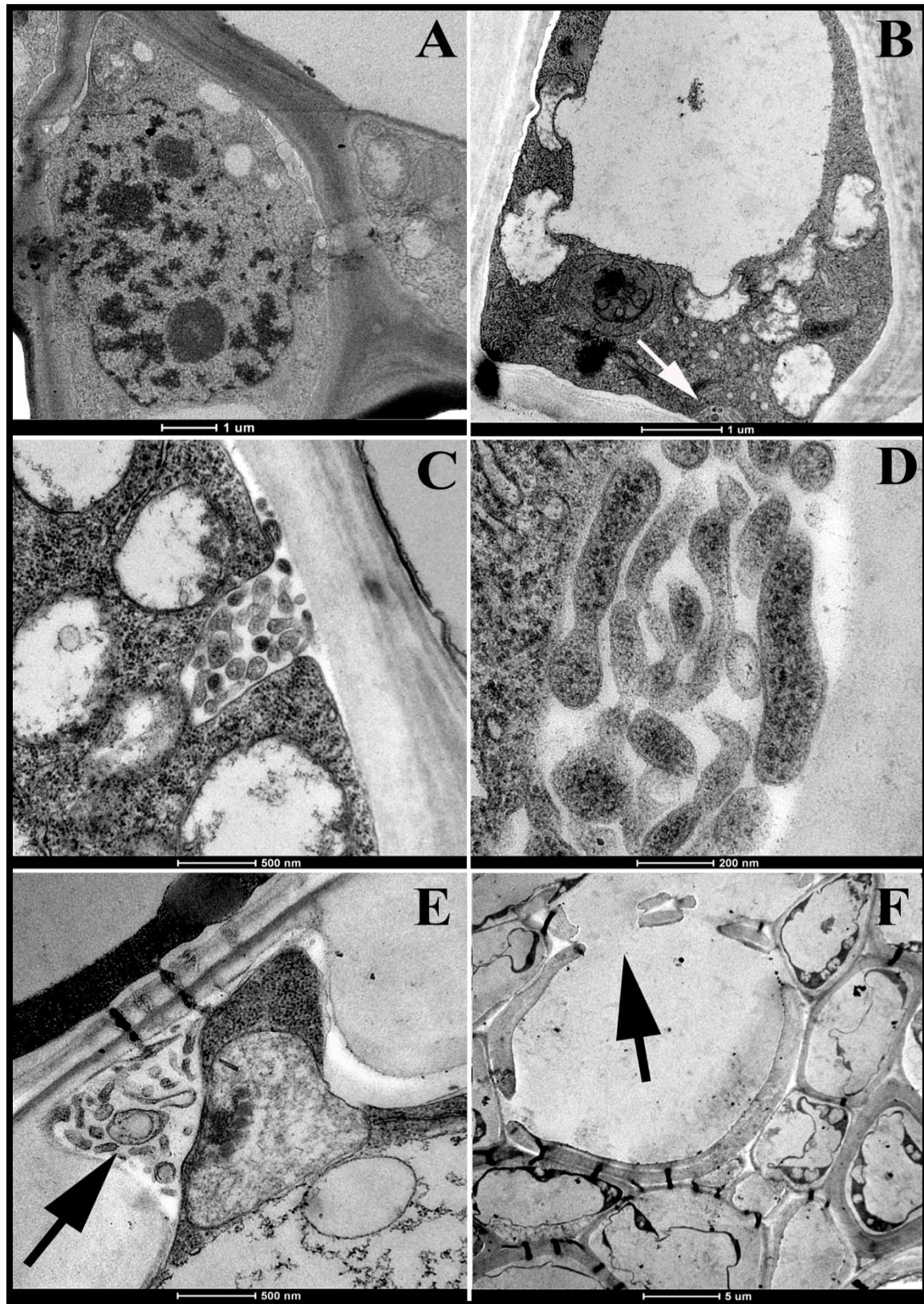


Fig. 58. Micrografías de cortes transversales de raíces de maíz a los 14 dpi, observados mediante microscopía electrónica de transmisión A) Corte transversal de una raíz control sin inocular; B) Corte transversal de una raíz inoculada con la cepa CRZM52REV; C y D) Cortes transversales de la raíz de maíz inoculada con la cepa CRZM52RWT; E y F) Corte transversal de una raíz inoculada con la cepa CRZM52REV; C y D) Cortes transversales de la raíz de maíz inoculada con la cepa sobreexpresora de la celulasa CelC2, CRZM52RC2<sup>+</sup>.

Por tanto, debido a que mediante microscopía confocal determinamos que aparentemente las bacterias se encontraban en el interior del maíz, con este ensayo realizado mediante microscopía electrónica, podemos confirmar dicha hipótesis, ya que bajo las condiciones probadas y las muestras analizadas, observamos la presencia de bacterias en el interior de las raíces de maíz. Las bacterias observadas se encontraban en todos los tratamientos recubiertas de la membrana plasmática por lo que no estaba en contacto directo con el citoplasma, pudiendo ser que de este modo, las bacterias eviten una posible activación de las respuestas de defensa de la planta. Además, pudimos comprobar que la sobreexpresión de la celulasa afectaba a las células vegetales de la raíz del maíz, en el caso de las raíces inoculadas con la cepa CRZM52C2<sup>+</sup>.

Las estructuras formadas por las bacterias nos recuerdan a las estructuras que se forman en el interior de los nódulos que forman los rizobios en simbiosis con leguminosas, denominadas simbiosomas, donde la bacteria se diferencia en bacteroide y comienza a fijar Nitrógeno. Además también recuerda a las estructuras que forman las bacterias del género *Frankia* en simbiosis con plantas leñosas, tras la infección llevada a cabo por el simbiote (Cocking 2005).

Una formación similar a la encontrada en nuestro estudio, fue observada por Christiansen-Weniger (1998), mediante microscopía electrónica, en raíces de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* C3, en la que las bacterias se establecían entre las células corticales de la raíz empaquetadas densamente en de los espacios intercelulares. Sin embargo, en nuestro estudio, las bacterias se encuentran cubiertas por la membrana plasmática sin estar en contacto con el citoplasma. Por otra parte y a diferencia de nuestro estudio, Christiansen-Weniger (1998) no encontraron bacterias dentro del sistema vascular central.

También, Ladha and Reddy (2000), observaron unas estructuras originadas en las raíces laterales similares a los nódulos, cuando inocularon rizobios sobre raíces de arroz, pero estos no eran comparables con los que se dan en las leguminosas, y a diferencia de nuestro ensayo no observaron colonización intracelular.

Otros estudios realizados en cereales, también muestran como las bacterias colonizan el interior de las raíces. Al igual que en nuestro ensayo, (Olivares et al. 1997) mostraron que *Herbaspirillum rubrisubalbicans* y *H. seropedicae* se encontraban adheridos a las raíces de caña de azúcar, en las zonas de emergencia de las raíces laterales, así como en los espacios intercelulares, los vasos del xilema y las células del parénquima. También Christiansen-Weniger (1998), observaron mediante microscopía electrónica cortes de raíces de arroz inoculadas con *Azorhizobium caulinodans* ORS571, que las bacterias son capaces de invadir a través de los *cracks* la zona de la corteza y de la epidermis, por los espacios intercelulares. Además, veían zonas en la pared vegetal interrumpidas por la lisis realizada por parte de las bacterias. Estas zonas las pudimos ver reiteradamente en nuestro trabajo en el caso de las plantas inoculadas con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>.

Por tanto, en nuestro estudio podemos observar como las bacterias entran inter e intracelularmente y se forman unos simbiosomas pero habría que comprobar si son capaces de fijar nitrógeno en la planta por ejemplo a través de la determinación del <sup>15</sup>N incorporado.

## 5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRANSFORMANTE EN EL DESARROLLO VEGETAL DEL MAÍZ EN ENSAYO DE CÁMARA CLIMATIZADA.

Un vez observado que las bacterias de estudio son capaces de penetrar en el interior de la raíz y que además, en los primeros estadios de crecimiento todas las plantas inoculadas, se desarrollaban mejor que las plantas control sin inocular, quisimos evaluar en este ensayo el efecto de las mismas cepas bajo condiciones controladas de luz y de temperatura pasados 34 días después de la inoculación de las plántulas de maíz. Tanto los resultados de los parámetros obtenidos como el fenotipo presentado por las plantas, se muestran en la Tabla 61 y figura 59.

Tabla 61. Datos recogidos a los 34 días post inoculación con las cepas seleccionadas y las coinoculaciones.

Tratamientos	Contenido en Clorofila (Unidades SPAD)	Longitud de la Parte Aérea (cm)	Peso Fresco Parte Aérea (g)	Peso Seco Parte Aérea (g)	Peso Fresco Parte Radicular (g)
Control	31,76±0,443a	40,600±0,245a	0,905±0,091a	0,158±0,009a	0,655±0,075a
CRZM52RWT	36,067±0,385b	47,200±1,000b	1,993±0,188b	0,221±0,006b	1,271±0,081b
CRZM52REV	35,625±0,463b	47,833±0,401b	1,946±0,150b	0,201±0,01b	1,270±0,121b
CRZM52RC2 <sup>+</sup>	35,750±0,268b	45,000±1,000b	1,900±0,133b	0,187±0,012b	1,119±0,141b

\*Los valores muestran la media y el error estándar de 12 plantas (±S.E) por ensayo de cada uno de los tratamientos (n=12).

\*Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p<0,05).

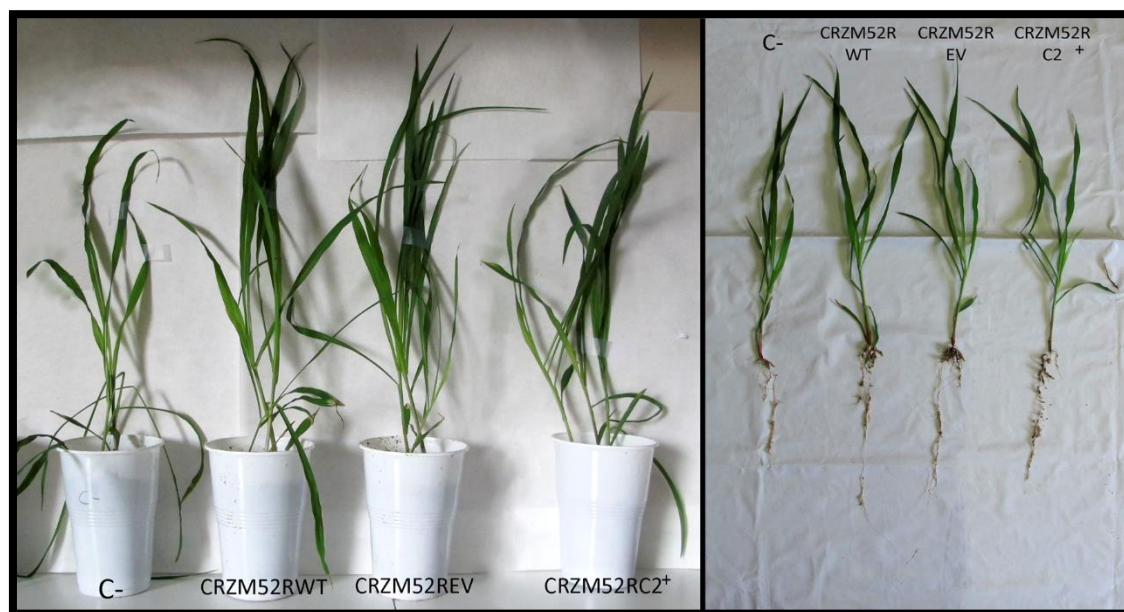


Fig. 59. Fenotipo mostrado por las plantas de maíz a los 34 dpi, bajo condiciones de cámara iluminada, de izquierda a derecha, control sin inocular, inoculada con la cepa *wild type* CRZM52R, inoculada con la cepa *empty vector* CRZM52R e inoculada con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>. A) Fenotipo mostrado en las macetas; B) Fenotipo mostrado una vez que las plantas se sacaron.

Los valores de clorofila (en Unidades SPAD) obtenidos, muestran un aumento significativo en las plantas de maíz inoculados con las cepas de dicho estudio, cuando se compararon con las plantas de maíz sin inocular; los resultados fueron muy similares en todos los tratamientos inoculados. Puesto que el valor de la clorofila se relaciona directamente con el contenido de

nitrógeno de la planta, podemos decir que el estado nutricional de la planta no se ve afectado por la sobreexpresión de la celulasa CelC2.

De la misma manera, los valores de la longitud de la parte aérea muestran un aumento significativo de las plantas de maíz inoculadas respecto a aquellas plantas control que no habían sido inoculadas. En dicho parámetro, se observaron valores similares en los tratamientos con las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV, mientras que las plantas inoculadas con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup> dieron como resultado valores de longitud ligeramente inferiores a estos. Datos similares a los obtenidos en el peso fresco y seco de las partes aéreas y de la parte radicular.

Cuando comparamos nuestros ensayos de plantas, con otro estudio realizado en *Oryza sativa* con mutantes sobreexpresores de celulasa (T.D Rivera 2013), observamos resultados similares a los obtenidos en nuestro ensayo, ya que a los 21 dpi, las plantas de arroz inoculadas con las cepas E11 y E11C2<sup>+</sup>, presentaban una longitud de la parte aérea mayor que le control sin inocular y además, presentaban mejor coloración. Sin embargo, a diferencia de nuestro ensayo, los resultados de las longitudes radiculares mostraron que los valores más pequeños se obtuvieron con las plantas inoculadas con la cepa E11C2<sup>+</sup> y los mayores con el control sin inocular. Cuando realizaron este estudio en el invernadero, observaron que a los 350 dpi y sin aporte de nitrógeno, el mayor incremento de la parte aérea del arroz, se obtuvo con la cepa E11C2<sup>+</sup>, seguido de la cepa silvestre, en comparación con el control sin inocular. Por otro lado, a los 35 dpi, días similares a los de nuestro ensayo, no obtuvieron diferencias entre los tratamientos, sin embargo en nuestro trabajo a los 34 dpi, ya observamos diferencias significativas respecto al control sin inocular.

Por tanto, los mayores incrementos respecto a las plantas de maíz sin inocular, se obtuvieron en las plantas inoculadas con las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV, dicho incremento puede venir dado por la producción de hormonas como el ácido indol acético generadas por dichas cepas. También, se puede observar que en todos los parámetros evaluados los resultados de la cepa salvaje y de la *empty vector*, fueron siempre similares, por lo que podemos confirmar que la presencia del gen *celC* es al que realmente se debe este fenotipo y no al vector en sí.

Podemos apreciar también, que a los 13 dpi, el mayor desarrollo de la longitud principal del maíz venía dado por las plántulas inoculadas con la cepa sobreproductora de celulasa CellaC2<sup>+</sup>, mientras que claramente, a los 34 dpi, el mayor desarrollo de las plantas de maíz viene dado por las plantas inoculadas con las cepas CRZM52RWT y CRZM52REV, seguido de la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>. Corroboramos por tanto que tanto en las plántulas de maíz como en los primeros estadios de crecimiento del maíz, la cepa heteróloga que sobreexpresa la celulasa CelC2, no afecta de manera negativa al crecimiento de las plantas de maíz.

Por tanto, observamos que fenotípicamente, las plantas de maíz no presentan ninguna alteración visible. Además, como se describe en apartados anteriores, la inoculación con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup> no conlleva una desorganización de las estructuras internas de la raíz, solamente se observaron rupturas de la pared celular de una forma muy localizada en el interior de las estructuras similares a un simbiosoma observadas en los ensayos de microscopía electrónica de transmisión. Todo ello indica que la sobreexpresión heteróloga de esta celulasa en *R. leucaneae* no es suficiente para desencadenar efectos negativos en planta y que su acción es muy localizada, sugiriendo una especificidad de acción.

# *Ensayos de producción del maíz*

## **Capítulo VI**



## 1. EVALUACIÓN DE LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN CONDICIONES CONTROLADAS.

Una vez observado y comprobado, que las cepas seleccionadas, eran capaces de colonizar con éxito las raíces de maíz, procedimos a evaluar su efecto PGPR inoculando semillas esterilizadas en superficie en condiciones controladas de luz y temperatura.

Los tratamientos inoculados sobre las plántulas de maíz fueron realizados al igual que en los ensayos de colonización e infección, con las cepas CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R, CRZM149R identificadas respectivamente como *R. zae*, *R. leucaenae*, *S. griseoaurantiacus* y las coinoculaciones de las cepas CRZM18R<sup>T</sup>+CRZM149R y CRZM52R+CRZM149R. Además, se utilizaron dos controles sin inocular; uno positivo suplementado con solución nutritiva con nitrógeno, y un control negativo, que al igual que los tratamientos restantes se suplementaron con una solución nutritiva sin nitrógeno.

Este experimento se llevó a cabo en vasos con vermiculita, tras la inoculación, se incubaron en cámara iluminada, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, y fueron regadas alternando agua destilada estéril y con solución de nutritiva cada cuatro días aproximadamente.

A los 47 días post inoculación, se observaron los resultados (Figura 60).



Fig. 60. Imagen donde se observa el aspecto de las plantas de maíz inoculadas con los distintos tratamientos a los 47 dpi.

Los resultados indicaron claramente un aumento significativo en varios parámetros de crecimiento de la planta en presencia de las cepas seleccionadas cuando estas se compararon con las plantas control sin inocular, tanto suplementadas como no suplementadas con Nitrógeno (Tabla 62).

Tabla 62. Datos de los diferentes tratamientos obtenidos en las plantas de maíz a los 47 dpi.

Tratamientos	Longitud de la Parte Aérea (cm)	Peso Fresco Parte Aérea (g)	Peso Seco Parte Aérea (g)	Longitud Raíces (cm)	Contenido en Clorofila (Unidades SPAD)
C- (-N)	40,00±0,41a	0,93±0,08a	0,09±0,01a	40,00±0,41a	9,39±0,26a
C+ (+N)	44,60±0,40b	1,18±0,07b	0,16±0,01b	55,75±0,25b	11,24±0,21b
CRZM18R <sup>T</sup>	45,83±0,40c	1,33±0,08c	0,19±0,01c	58,33±0,33c	13,47±0,40c
CRZM149R	40,86±0,34a	0,96±0,04a	0,09±0,01a	51,50±0,50d	9,65±0,18a
CRZM18R <sup>T</sup> +149R	43,00±0,58d	1,14±0,07b	0,13±0,0,18b	60,71±0,29e	10,53±0,27b
C- (-N)	40,00±0,41a	0,93±0,08a	0,09±0,01a	40,00±0,41a	9,39±0,26a
C+ (+N)	44,60±0,40b	1,18±0,07b	0,16±0,01b	55,75±0,25b	11,24±0,21b
CRZM52R	44,63±0,26b	1,18±0,03b	0,15±0,01b	58,67±0,33c	10,94±0,29b
CRZM149R	40,86±0,34a	0,96±0,04a	0,09±0,01a	51,50±0,50d	9,65±0,18a
CRZM52R+149R	41,00±0,33a	1,02±0,05a	0,11±0,01a	54,38±0,26e	11,62±0,31b

\*Los valores representan la media ± el error estándar de 21 plantas por cada uno de los tratamientos. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

En el caso de los tratamientos inoculados sólo con *Rhizobium*, los resultados obtenidos en todos los parámetros analizados son significativamente mayores al control sin inocular y sin aporte de Nitrógeno. La inoculación simple de *R. zeae* CRZM18R<sup>T</sup> es la que muestra valores mayores en todos los parámetros estudiados, siendo incluso estadísticamente significativos al control sin inocular con aporte de Nitrógeno. Dicha cepa mostró incrementos significativos respecto al control positivo en el caso de las medidas de longitud y peso seco de la parte aérea, longitud de las raíces y contenido en clorofila, siendo estos aumentos del 2,7%, 18,7%, 4,6% y 19,8%, respectivamente. En el caso de la inoculación simple con *R. leucanae* CRZM52R únicamente se observó un aumento significativo respecto al control negativo suplementado con Nitrógeno en el caso de la longitud de la raíz. Los resultados obtenidos concuerdan con (Singh et al. 2010), quienes obtuvieron a los 30 dpi incrementos tanto en el peso fresco como seco de la parte aérea y en el contenido en clorofila al inocular una cepa de *Rhizobium* sp. en plantas de maíz.

Cuando evaluamos el efecto de la cepa CRZM149R de *Streptomyces*, los resultados obtenidos en la mayoría de los parámetros son similares a los del control sin inocular y sin suplemento de Nitrógeno, excepto en el caso de la longitud de las raíces, que resultó ser significativamente mayor que dicho control. No se observa ningún incremento respecto al control sin inocular suplementado con Nitrógeno en el caso de esta cepa.

En el caso de las coinoculaciones *Rhizobium-Streptomyces*, existen ciertas diferencias entre ambas combinaciones. La coinoculación CRZM18R<sup>T</sup> + CRZM149R presentó valores significativamente mayores a los presentados por el control sin inocular y sin aporte de nitrógeno e incluso similares y significativamente mayores al control con aporte de Nitrógeno en parámetros como pesos de la parte aérea y longitud de la raíz, respectivamente. En el caso de la coinoculación CRZM52R + CRZM149R, los resultados no fueron tan evidentes, siendo muy similares a los del control sin inocular y sin aporte de nitrógeno en la mayoría de los casos, excepto en la longitud de la raíz.

En el parámetro longitud de la raíz, se obtuvieron valores significativamente mayores que en los controles negativos en todos los casos. En las combinaciones realizadas con las cepas CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM149R, se obtuvieron tanto con el tratamiento inoculado con la cepa



CRZM18R<sup>T</sup> como con la coinoculación de las cepas CRZM18R<sup>T</sup>+149R, aumentos significativos con respecto al control positivo del 4,6% y del 8,9%, respectivamente. En las combinaciones realizadas con las cepas CRZM52R y CRZM149R, únicamente el tratamiento CRZM52R, se incrementó significativamente en un 5,2%, respecto al control suplementado con nitrógeno. Sin embargo, la medida de este parámetro puede no ser muy objetivo, ya que las raíces están confinadas en un espacio reducido.

Cabe destacar los resultados obtenidos en el contenido de clorofila, mediados en unidades SPAD. El contenido en clorofila en hojas de maíz ha sido relacionado en numerosas ocasiones con el contenido de nitrógeno total en la planta (Acciaresi et al. 2014; Elos et al. 2016; Rozier et al. 2016). Los resultados muestran que, con respecto al control negativo, todos los tratamientos a excepción del tratamiento inoculado con la cepa CRZM149R, mostraron incrementos significativos, obteniendo además, con el tratamiento inoculado con la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, un incremento significativo del 19,8%, respecto al control suplementado con nitrógeno. Por tanto, un mayor incremento de clorofila en las plantas de maíz inoculadas supone un dato importante, ya que las bacterias no solo incrementarían el desarrollo de la planta, sino también mejorarían su estado nutricional.

En resumen, los resultados confirman que en ambas combinaciones fueron mejores en el caso de los tratamientos de las inoculaciones simples, CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R. Podemos observar que los tratamientos con los que mejores resultados fueron los inoculados con las cepas CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R y CRZM18R<sup>T</sup>+149R. Pero fue, con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificada como *R. zeae* con el que se obtuvieron en algunos de los parámetros evaluados mejores valores que en el tratamiento control suplementado con nitrógeno. Por tanto, a priori, la acción de dicha cepa podría llegar a mejorar incluso los valores obtenidos en un tratamiento en el que se añada un fertilizante nitrogenado.

## 2. ENSAYOS DE MICROCOSMOS EN INVERNADERO.

Los ensayos de invernadero se realizaron para evaluar la eficiencia de las cepas seleccionadas en condiciones cercanas a la realidad (campo). Por este motivo, se utilizó suelo recogido de las proximidades del río Tormes como sustrato, con el fin de realizar este ensayo en un suelo de tipología similar al usado en agricultura para los cultivos de maíz. Las semillas de maíz fueron inoculadas al séptimo día después de la germinación. El ensayo tuvo una etapa de crecimiento corta (59 días después de la inoculación) por lo que no se pudo llegar a producción debido principalmente a la limitación de espacio y de nutrientes. Las plantas fueron regadas con agua cuando fue requerida.

Los tratamientos utilizados fueron los mismos que en el ensayo anterior, inoculaciones simples con las cepas CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R, CRZM149R y coinoculaciones con las cepas CRZM18R<sup>T</sup>+149R y CRZM52R+149R.

Los fenotipos presentados por las plantas de maíz transcurridos 59 dpi, se pueden observar en la figura 61 y los datos de los parámetros tomados en este ensayo, en la tabla 63.

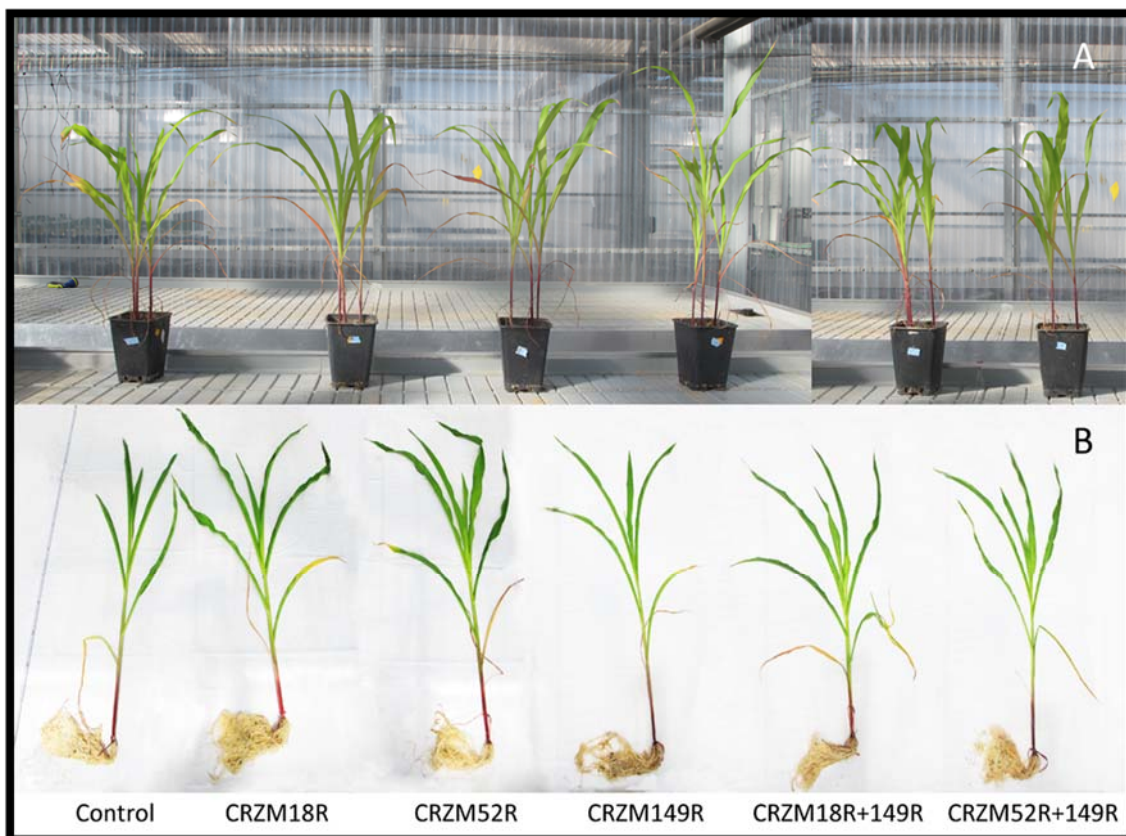


Fig. 61. Fenotipos de las plantas de maíz a los 59 dpi inoculadas con las cepas seleccionadas. A) Fenotipos que muestran las plantas de maíz en las macetas; B) Fenotipos que muestran las plantas de maíz una vez acabado el ensayo.

Tabla 63. Datos recogidos a los 59 días post inoculación con las cepas seleccionadas y las coinoculaciones.

Tratamientos	Longitud de la Parte Aérea (cm)	Peso Fresco Parte Radicular (g)	Peso Fresco Parte Aérea (g)
Control	112,65±0,15a	51,93±0,57a	57,80±0,26a
CRZM18R <sup>T</sup>	132,70±0,30b	57,07±0,22b	84,80±0,50b
CRZM149R	139,53±0,52c	53,95±0,25c	71,03±0,23c
CRZM18R <sup>T</sup> +149R	144,13±0,34d	62,31±0,01d	72,86±0,39d
Control	112,65±0,15a	51,93±0,57a	57,80±0,26a
CRZM52R	142,75±0,42b	55,80±0,20c	79,27±0,58b
CRZM149R	139,53±0,52c	53,95±0,25d	71,03±0,23c
CRZM52R+149R	146,10±0,40d	55,41±0,39c	80,45±0,50d

Tratamientos	Contenido en Clorofila (Unidades SPAD)	Calibre (cm)	Nudos
Control	22,47±0,20a	4,11±0,06a	3,08±0,08a
CRZM18R <sup>T</sup>	21,65±0,19a	4,30±0,08b	3,58±0,19b
CRZM149R	23,17±0,31a	4,13±0,06a	4,00±0,0c
CRZM18R <sup>T</sup> +149R	24,80±0,30b	4,13±0,08a	3,83±0,11b
Control	22,47±0,20a	4,11±0,06a	3,08±0,08a
CRZM52R	25,57±0,27b	4,22±0,04b	3,91±0,08b
CRZM149R	23,17±0,31a	4,13±0,06a	4,00±0,0b
CRZM52R+149R	22,50±0,41a	4,17±0,08a	3,83±0,11b

\*Los valores muestran la media y el error estándar de 12 plantas (±S.E) por ensayo de cada uno de los tratamientos. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,05).

Los resultados obtenidos en las longitudes de las partes aéreas de las plantas de maíz mostraban que los tratamientos inoculados eran significativamente mayores que en control sin inocular, obteniendo los mayores aumentos respecto al control con las coinoculaciones CRZM18R<sup>T</sup>+149R y CRZM52R+149R, con incrementos del 28% y 29,7%, respectivamente. Además, las co-inoculaciones presentaron valores significativamente mayores respecto a cada una de las inoculaciones simples.

Al analizar los valores obtenidos de los pesos de las raíces, se observó que en todos los tratamientos se obtuvieron valores de peso radicular más altos que en el control sin inocular, siendo todos ellos estadísticamente significativos. El mayor aumento obtenido con respecto al control, se obtuvo con el tratamiento CRZM18R<sup>T</sup>+149R con un 20%. En este caso, ambas coinoculaciones también resultaron ser mejores o al menos similares en dicho parámetro con respecto a las inoculaciones simples.

También se observó en los datos del peso fresco de las partes aéreas que los tratamientos inoculados fueron significativamente mayores que los del control sin inocular, obteniéndose el mejor resultado con el tratamiento inoculado con la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, con un aumento respecto al control del 46,7%. Sin embargo, los valores obtenidos en la coinoculación de dicha cepa con la cepa CRZM149R resultaron ser menores que los obtenidos en la inoculación simple de CRZM18R<sup>T</sup>, pero significativamente mayores a los obtenidos con la cepa CRZM149R. En el caso de los tratamientos en los que empleamos la cepa CRZM52R la coinoculación de dicha cepa con CRZM149R vuelve a mostrar la tendencia de los resultados de parámetros anteriores.

En cuanto a los datos de la medida de la clorofila de las hojas de maíz en unidades SPAD, pudimos observar que únicamente los tratamientos CRZM52R y CRZM18R<sup>T</sup>+149R, fueron significativamente mayores cuando se compararon con el control sin inocular, obteniendo incrementos del 13,8% y 10,4%, respectivamente. Además, fueron similares a los resultados obtenidos en el resto de los tratamientos.

Puesto que transcurridos dos meses, las plantas de maíz alcanzan un buen desarrollo de la parte aérea, pudimos evaluar los calibres de los tallos. Los resultados mostraron que en todos los tratamientos inoculados, se obtuvieron promedios superiores al control, siendo además, significativamente superiores en comparación con el control los tratamientos inoculados con las cepas CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R, con aumentos del 4,6% y 2,8% respectivamente.

También pudimos contar en este ensayo los nudos de los tallos, pudiendo observar que los valores resultaron ser significativamente mayores en todos los tratamientos inoculados, destacando entre ellos, el incremento obtenido con los tratamientos CRZM52R y CRZM149R, con un 27,1% y 29,7%, respectivamente. Éste parámetro es el único que resulta favorecido en el caso de la inoculación simple con la cepa CRZM149R.

Debido a que trabajamos con una planta de porte grande y que requiere un amplio espacio para su desarrollo, las condiciones de invernadero y tamaño de las macetas que se emplean no son del todo favorables para su total desarrollo, no llegando así las plantas de maíz a la producción de mazorcas. No obstante, de esta manera se puede observar el efecto promotor ejercido por los inóculos *in planta* en los estadios previos a la floración.

En este sentido, son muchos los autores que estudian el efecto promotor por parte de bacterias PGPR en el invernadero como paso previo al ensayo en campo. Wu et al. (2005)

utilizaron diversas bacterias PGPR para la inoculación de plantas de maíz, en condiciones de invernadero. A los 87 días después de la inoculación, las plantas de maíz inoculadas mostraron un efecto promotor sobre el crecimiento del maíz, aumentando la biomasa y la altura de las plantas, en comparación con las plantas sin inocular. También, Mehnaz and Lazarovits (2006) realizaron un ensayo de maíz bajo condiciones de invernadero, inoculando bacterias con capacidades PGPR, mostraron a los 30 dpi, un aumento en el peso de la raíz y la parte aérea comparadas con las plantas sin inocular. Más recientemente, Kuan et al. (2016) realizaron un ensayo bajo condiciones de invernadero en plantas de maíz, inoculando bacterias PGPR. En su estudio, se obtuvo un incremento de las biomasa seca de la parte aérea y radicular del maíz y además aumentó también el contenido total de nitrógeno en las plantas inoculadas, respecto a las que no habían sido inoculadas, relacionándose este incremento con la producción de AIA por parte de las bacterias PGPR inoculadas. De la misma forma, Arruda et al. (2013) relacionaron la producción de AIA por parte de las cepas utilizadas con un aumento significativo de la materia seca tanto de la parte aérea como de la raíz del maíz de dos cultivares diferentes cuando fueron inoculados con bacterias PGPR. Las cepas utilizadas producían AIA *in vitro* lo que pudo haber afectado al desarrollo de las plantas, ya que el AIA influye positivamente en el crecimiento y desarrollo de las raíces y por lo tanto aumenta la absorción de nutrientes (Khalid et al. 2004). Los incrementos observados en las plantas inoculadas de nuestro ensayo también podrían venir dados por la capacidad de las cepas utilizadas para producir dicha hormona, como se comprobó en el capítulo II.

Sin embargo, el uso del género *Rhizobium* como inoculante bacteriano en plantas de maíz, bajo condiciones de invernadero ha sido menos estudiado. Singh et al. (2013b) inocularon plantas de maíz con dos cepas de *Rhizobium*, *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* RRE6 y *R. undicola* RRE36, en condiciones de invernadero, entre otras cepas. Las plantas inoculadas mostraron un aumento significativo en la altura de la planta, la longitud de la raíz y el peso seco de ambas partes, respecto al control sin inocular. Por tanto, al igual que los datos analizados en nuestro ensayo los resultados mostraron un incremento de los parámetros evaluados en comparación con el control sin inocular.

Por otra parte, no se encontró ningún ensayo probado en plantas de maíz, utilizando como inoculantes bacterianos cepas del género *Streptomyces* ni en inoculaciones simples, ni coinoculados con otras cepas de otros géneros. Sin embargo, se encontraron diversos trabajos de biorremediación en los que inoculaban distintas cepas de *Streptomyces* en plantas de maíz, con el fin de extraer contaminantes, observando una reducción de dichos contaminantes y un aumento en el porte del maíz (Benimeli et al. 2008; Schütze et al. 2014; Al-Askar et al. 2015; Álvarez et al. 2015), pero debido a las condiciones utilizadas, nuestros datos no son comparables a dichos estudios.

Diversos estudios han relacionado el contenido de clorofila medido en unidades SPAD con el contenido de nitrógeno total en la planta (Mendoza 1998; Hamblin et al. 2014; Parry et al. 2014; Saravia et al. 2016; Monostori et al. 2016). En plantas de arroz, demostraron que las unidades SPAD es un valor proporcional al contenido de nitrógeno en estas plantas (Turner and Jund 1991). También se calibró para plantas de trigo, algodón (Wood et al. 1994) y *Festuca* (Kantety et al. 1996). También se ha documentado en varias ocasiones el contenido de clorofila en hojas de maíz (Acciaresi et al. 2014; Elos et al. 2016; Rozier et al. 2016). En todos ellos al igual que en nuestro trabajo, el contenido de clorofila disminuía con el paso de los días.

En nuestro ensayo, los valores de clorofila no se vieron incrementados en todos los tratamientos con respecto al control. Esto se puede deber a que como hemos visto en general,

las plantas inoculadas tienen un mayor desarrollo tanto de la parte radicular como de la parte aérea, por tanto es normal que la planta agote antes los nutrientes del suelo y por tanto disminuya el contenido de nitrógeno en las hojas del maíz.

Además, los nutrientes en las macetas son muy limitados y no se ha realizado ningún aporte de nutriente durante los ensayos, con el fin de observar únicamente los efectos causados por la inoculación de las diferentes cepas y no por otros factores.

Por otra parte, pudimos comprobar que en el cultivo de maíz utilizado tanto las inoculaciones simples como las coinoculaciones, mostraban mejores resultados que en las plantas control sin inocular. A diferencia de los resultados obtenidos en condiciones controladas (cámara iluminada), la mayoría de los valores de los parámetros obtenidos en los tratamientos que conllevan coinoculaciones resultaron ser significativamente mayores que los correspondientes a las inoculaciones simples. En este ensayo de invernadero, además de los inóculos también existe una microbiota asociada al suelo escogido, lo que puede tener influencia, en concordancia con los resultados obtenidos. En este ensayo y en el ensayo de cámara iluminada, la cepa de *Streptomyces* por sí sola no parece ser muy efectiva; sin embargo, puede estar ejerciendo otro tipo de acción.

Existen numerosos estudios en los que se ha descrito el uso de cepas potencialmente beneficiosas para un cultivo y no han resultado efectivas cuando se han probado en condiciones de invernadero. Por ejemplo, Hungria et al. (2010) mostraron que el maíz respondió de manera positiva a la inoculación de una cepa comercial de *Azospirillum brasilense* AbV6. Sin embargo, en el ensayo de Arruda et al. (2013) realizado con la misma cepa comercial no se obtuvo el mismo efecto. Por tanto, estos resultados sugieren que los efectos positivos de las bacterias pueden variar entre las especies o entre cultivares del mismo tipo de cultivo (Chanway et al. 1988; Montañez et al. 2009). Salomone and Döbereiner (1996) evaluaron la eficacia que la inoculación de varias cepas tenía sobre las plantas de 15 genotipos de maíz, obteniéndose un efecto positivo en solo 6 de ellos. Por otro lado, los inóculos bacterianos de Moutia et al. (2010) mostraron respuestas positivas en dos cultivares distintos de maíz, Pioneer 30R50 y Fepagro 35, en condiciones de invernadero. Los resultados demostraron que las cepas bacterianas no eran específicas de cultivar y estimulaban el crecimiento de las plantas del maíz independientemente del cultivar utilizado.

En general, debido a los positivos efectos observados en la aplicación de las bacterias seleccionadas en plantas de maíz, en condiciones de invernadero, resultaban excelentes candidatas para comprobar su efecto en condiciones de campo y observar su efecto en la producción de mazorcas.

### 3. ENSAYO DE CAMPO.

Puesto que en los ensayos de invernadero contábamos con la limitación del tamaño de las macetas, no alcanzando producción, decidimos realizar un ensayo en campo con plantas de maíz. Las plantas se inocularon con las cepas de *Rhizobium* utilizadas en este estudio (CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R). En este caso no utilizamos la cepa de *Streptomyces*. Esta decisión se tomó teniendo en cuenta la legislación existente, y aunque los fertilizantes microbianos no están contemplados en la normativa europea sobre abonos, según la AEFA (Asociación

Española de Fabricantes de Agronutrientes) el futuro Reglamento de la Unión Europea relativo a la comercialización de fertilizantes autorizará en 2018 ciertos microorganismos para su uso como bioestimulantes microbianos. En principio, principalmente estarán incluidos los géneros *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Azospirillum* y hongos micorrícicos. Por estos motivos y puesto que el género *Rhizobium* se ha descrito en numerosas ocasiones como inoculante seguro ya que no presenta peligro para la salud humana, decidimos trabajar solamente con cepas de *Rhizobium*.

El experimento se llevó a cabo en un campo utilizado para el cultivo de maíz situado en el municipio salmantino de Pino de Tormes (Figura 62). Una zona fue tratada con las mismas condiciones que las utilizadas por el agricultor para este cultivo, es decir, fertilización antes de la siembra del maíz (Fertilización de base). En segunda zona, las condiciones empleadas fueron las mismas pero en este caso el suelo no se fertilizó. Para estar seguros de que no hubiese fertilizante residual, el agricultor nos habilitó una zona en la que nunca se habían añadido fertilizantes al suelo.



Fig. 62. Localización de las dos zonas utilizadas en este ensayo. El rectángulo rojo muestra la parcela fertilizada y el rectángulo azul la parcela sin fertilizar.

Cada tratamiento cuenta con tres réplicas, ya que se diseñaron tres subparcelas por cada cepa inoculada. Este ensayo comenzó en el mes de mayo y terminó en diciembre. A los 215 días después de la inoculación, se procedió a la recogida y el análisis de los distintos parámetros evaluados (Figura 63).

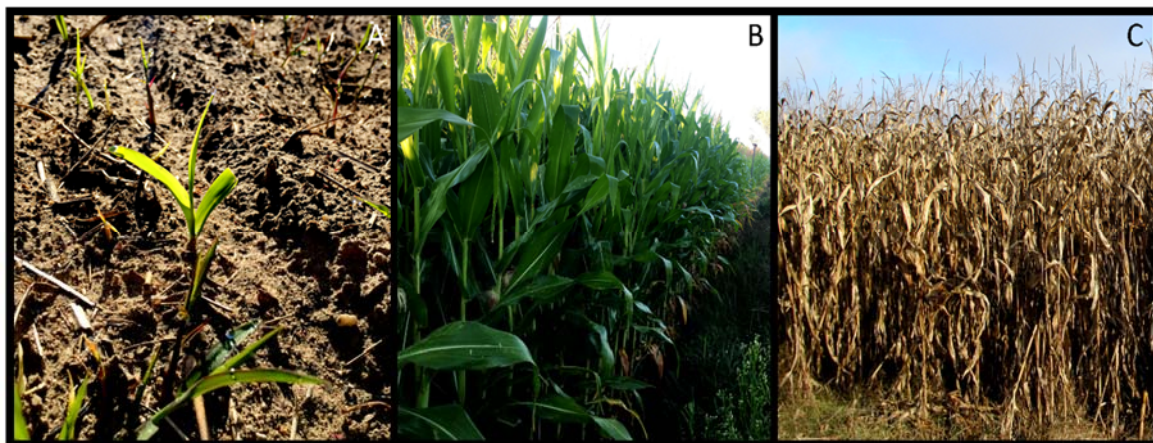


Fig. 63. Diferentes etapas del crecimiento del maíz en el ensayo de campo. A) Aspecto de las plantas de maíz el día de la inoculación, B) Aspecto de las plantas a los 81 dpi y C) Aspecto de las plantas el día de la recogida de las mazorcas, a los 215 dpi.

### 3.1 Análisis de los valores obtenidos en campo.

Los resultados obtenidos en el ensayo de campo se pueden observar en la tabla 64. Los valores de productividad representan el número de mazorcas obtenidas por planta, en el caso del tratamiento CRZM18R<sup>T</sup> fertilizado, se obtuvo un incremento significativo del 13,1%. En los tratamientos inoculados con la cepa CRZM52R se observa un aumento de un 2,2% de la productividad tanto en el campo fertilizado y sin fertilizar.

En cuanto al número de granos por mazorca, se observa un incremento en los tratamientos inoculados ambas cepas de *Rhizobium*, tanto en las parcelas fertilizadas como en aquellas que no habían sido fertilizadas, obteniéndose mayor incremento en las plantas sin fertilizar.

Además, el peso del grano de maíz aumenta con las inoculaciones, tanto en el campo fertilizado como sin fertilizar, obteniéndose el mayor aumento (20,75%) en el tratamiento inoculado con la cepa CRZM52R sin fertilizar.

Dichos incrementos dan lugar a un aumento en el rendimiento total del cultivo del maíz, obteniéndose importantes aumentos en las parcelas inoculadas con las cepas de *Rhizobium*. En el caso de los tratamientos fertilizados comparados con su control sin inocular correspondiente, se obtuvieron unos incrementos del 36,73% y del 29% cuando las parcelas se inocularon con las cepas CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R, respectivamente. En aquellos tratamientos que no habían sido fertilizados, se obtuvieron unos incrementos del 48,39% y del 37,53% en los respectivamente inoculados con las cepas CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R, comparados con el control sin inocular correspondiente. Además, los rendimientos obtenidos comparando los tratamientos control fertilizados con los tratamientos inoculados sin fertilizar aumentan en el caso de las inoculaciones sin previa fertilización, obteniéndose unos aumentos del 23,76% y del 14,69% con las cepas CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R, respectivamente. Estos resultados indican que los campos sin fertilizar e inoculados con *Rhizobium* producen mayores rendimientos que cuando son únicamente fertilizados los suelos al inicio del cultivo.

Tabla 64. Resultados en campo recogidos al inocular 251dpi con las cepas *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup> y *Rhizobium leucaenae* CRZM52R.

Tratamiento	Condiciones	Productividad (Mazorcas /planta) (±E.E)	Número de grano (±E.E)	Peso de grano (mg) (±E.E)	Rendimiento (Kg/Ha) (±E.E)
Sin inocular	Fertilizado	1,044±0,022	486,311±6,828	0,825±0,039	31,452
	Sin Fertilizar	1,044±0,022	453,561±19,802	0,723±0,096	26,234
CRZM18R <sup>T</sup>	Fertilizado	1,181±0,043*	500,433±1,802	0,863±0,022	43,004
	Sin Fertilizar	1,022±0,022	594,515±76,686	0,775±0,002	38,924
CRZM52R	Fertilizado	1,067±0,035	492,567±39,900	0,853±0,044	40,576
	Sin Fertilizar	1,067±0,067	513,292±5,958	0,873±0,063	36,074

\*Por cada uno de los tratamientos, se recolectaron las mazorcas de 15 plantas de maíz. Además, cada tratamiento se realizó por triplicado. Valores significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences). E.E. = Error Estándar

Diversos autores han estudiado el efecto de la inoculación de bacterias en plantas de maíz en ensayos de campo. Hungria et al. (2010) utilizaron una combinación de dos cepas de *Azospirillum brasilense* que aumentaron en condiciones de campo fertilizado el rendimiento del cultivo de maíz en un 27%, atribuyendo estos efectos al aumento de la captación de nutrientes por parte de las cepas inoculadas. En nuestro ensayo de campo bajo previa fertilización obtuvimos mayores incrementos en el rendimiento del maíz en comparación con el control.

Ferreira et al. (2013) utilizaron una cepa de *Azospirillum* para ver su efecto en combinación con fertilizantes nitrogenados, en invernadero y en campo. Al igual que en nuestro ensayo de invernadero, obtuvieron incremento en el peso de la parte aérea y de la raíz de las plantas inoculadas con *Azospirillum* en comparación con el control. En el ensayo de campo, la producción de grano se incrementó en un 29% en el tratamiento con *Azospirillum*, el cual es un porcentaje de incremento similar al que obtuvimos en nuestro ensayo con la cepa CRZM52R e inferior al que obtuvimos con la cepa CRZM18R<sup>T</sup>.

Viruel et al. (2014), realizaron un ensayo preliminar de invernadero con siete cepas solubilizadoras de fosfato, de las cuales finalmente seleccionaron una para realizar un ensayo de campo, ésta fue *Pseudomonas tolaasii* que se combinó con superfosfato triple (TSP) como fertilizante. La inoculación de esta cepa estimuló la aparición de plántulas (8%), la longitud del brote (19%), el rendimiento de grano (44%), el peso de 1000 granos (18%), la biomasa seca total (32%) y el contenido de fósforo (56%) en las plantas de maíz. Observaron que el efecto de dicha cepa era más eficiente como bioinoculante sin el fertilizante que con él. Lo mismo ocurre en nuestro ensayo de campo en el que se obtienen mejores rendimientos con las cepas en el campo sin fertilizar que fertilizado.

También Mehnaz et al. (2010) realizaron ensayos en plantas de maíz inoculando bacterias PGPR en condiciones de invernadero y de campo. En los ensayos de invernadero, las plantas inoculadas mostraron aumentos significativos tanto en el peso seco de las raíces como de la parte aérea. En el ensayo de campo utilizaron dos parcelas, una de ellas contenía el 100% de fertilizante nitrogenado que se usa normalmente en cultivos de maíz (110 Kg N ha<sup>-1</sup>) y en la otra parcela, adicionaron el 50% de ese fertilizante (55 Kg N ha<sup>-1</sup>). Al igual que en nuestro ensayo, sus resultados mostraron en ambas parcelas, mejores rendimientos en las plantas inoculadas en comparación con las plantas sin inocular. Las toneladas por hectáreas fueron mayores en las parcelas que contenían un 100 Kg N ha<sup>-1</sup>. Sin embargo, la pérdida económica para el agricultor es mayor en este caso, puesto que en la parcela con un contenido en



fertilizante de 55 Kg N ha<sup>-1</sup>, el rendimiento de la producción es menor pero también es menor el gasto en fertilizante. Por tanto, económicamente resulta ser más rentable el campo con la mitad del fertilizante y con las inoculaciones probadas.

Dichos resultados concuerdan con los datos obtenidos en nuestro ensayo, ya que se obtiene más rendimiento en los suelos fertilizados e inoculados que en los suelos sin fertilizar e inoculados, pero económica y ambientalmente hablando resulta más rentable inocular y no fertilizar. Cultivando en un suelo sin fertilización química y aplicando bacterias PGPB se obtienen incrementos en el rendimiento, gastando así menos recursos económicos y minimizando el deterioro de sus tierras por el uso de los fertilizantes químicos.

Los resultados obtenidos parecen ser muy eficaces en términos de producción, indicando que estas cepas podrían ser aplicadas en campo sin producir problemas adversos. En futuros ensayos se debería contemplar también la recogida de material vegetal en diferentes estadios del cultivo, con el fin de determinar el grado de efectividad e infectividad de dichas cepas mediante técnicas moleculares y/o microscopía.

### 3.2 Análisis del suelo.

Para comprobar las diferencias en cuanto a elementos nutricionales del suelo sin fertilizar y el fertilizado, se realizó un análisis iónico de ambos suelos. Una vez recogidas las muestras, se analizaron en el Servicio de inómica (CEBAS-CSIC). Los datos obtenidos aparecen reflejados como una media de tres muestras por cada uno de los suelos.

Podemos ver que tanto el contenido de los elementos principales del suelo y el contenido iónico de los minerales presentes en el suelo son valores similares aunque en la mayoría son valores superiores en el suelo sin fertilizar (Tablas 65 y 66). Los valores de B, Co, Mo y Sb ya que en todos ellos se obtuvieron valores inferiores a 0,01 mg/Kg.

Tabla 65. Concentraciones del contenido de los elementos principales del suelo. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar.

Suelo	Ntotal (g/100g)	Ctotal (g/100g)	C/N	Ca (g/100g)	K (g/100g)	P (g/100g)
Sin Fertilizar	0,08 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,07*	8,37 $\pm$ 7,77	0,10 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,01
Fertilizado	0,09 $\pm$ 0,001	0,42 $\pm$ 0,02	4,67 $\pm$ 18,30	0,09 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,001

Se realizaron tres réplicas de cada medida. Valores marcados con asterisco son significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

Tabla 66. Concentraciones del contenido iónico de los minerales presentes en el suelo. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar.

Suelo	Al (mg/kg)	As (mg/Kg)	Be (mg/Kg)	Bi (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
Sin Fert.	11.0000 $\pm$ 0,03*	1,35 $\pm$ 0,17*	0,76 $\pm$ 0,03*	2,65 $\pm$ 0,13*	0,08 $\pm$ 0,01*	17,47 $\pm$ 1,06*	6,50 $\pm$ 0,14*
Fert.	8.800 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,11	0,68 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,01	11,77 $\pm$ 0,13	4,44 $\pm$ 0,52

Suelo	Fe (mg/Kg)	Li (mg/Kg)	Mg (g/100g)	Mn (mg/Kg)	Na (mg/kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Rb (mg/Kg)
Sin Fert.	12290,15±605,70*	32,08±2,28*	0,21±0,01*	166,96±41,00	100±0,002	5,15±1,28	7,26±1,44	38,67±1,11*
Fert.	9156,36±212,38	23,80±0,49	0,14±0,02	133,47±18,65	100±0,003	3,96±0,49	6,08±0,66	28,64±1,35

Suelo	Se (mg/Kg)	S (mg/kg)	Sr (mg/Kg)	Ti (mg/Kg)	Tl (mg/Kg)	V (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)
Sin Fert.	0,62±0,32	2±0,0002	9,91±0,45	433,62±20,94	23,11±0,55	17,13±0,49*	29,58±0,94
Fert.	0,46±0,01	50±0,002	8,29±0,83	290,29±45,93	12,55±1,43	11,75±1,69	23,47±2,00

Se realizaron tres réplicas de cada medida. Valores marcados con asterisco son significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

En muchos países los suelos dedicados a la actividad agrícola se han empobrecido por el uso inadecuado, incremento demográfico mundial y producción agrícola en suelos marginales. Estos suelos no tienen un equilibrio de elementos nutritivos esenciales para las plantas, y pueden mejorarse a largo plazo (Bastidas 2000). En este sentido, el análisis de suelo sigue siendo el enfoque más utilizado a nivel mundial, para determinar la cantidad de nutrientes disponibles en el suelo (Centen and González 2016).

El fertilizante que se utilizó en este ensayo fue Entec®20+10+10 (20 N, 10 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 10 K<sub>2</sub>O) y como podemos observar, las concentraciones de NPK son los únicos valores de los elementos principales del suelo que son superiores en los suelos fertilizados que en los no fertilizados previamente. Además, en agricultura, se considera una liberación media de nitrógeno adecuada cuando el ratio de C/N, se encuentra entre 8 y 12 (Heinze et al. 2010). Por tanto, lo que podemos observar es que en nuestro ensayo en el suelo fertilizado se da una fuerte liberación de nitrógeno y consecuentemente habría que reducir este valor. Por otro lado, el suelo sin fertilizar tiene el ratio adecuado, según ese estudio.

Se pudo observar también que el suelo sin fertilizar contenía, en general, mayor cantidad de elementos nutricionales disponibles para la planta, siendo estos valores estadísticamente significativos en algunos elementos (C, Al, As, Be, Bi, Cd, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Rb y V). Esto se puede deber a que los nutrientes del suelo disminuyen por la sobreexplotación, eliminación de la cobertura vegetal y el exceso de laboreo entre otros (Centen and González 2016), como podría ser el caso del suelo fertilizado.

Las plantas de *Zea mays* utilizadas en nuestro estudio presentaron un desarrollo vegetativo normal y adecuado durante el tiempo que duró el ensayo de campo, sin denotar algún síntoma aparente o visible de enfermedad relacionada con la deficiencia de nutrientes. Por ello podemos concluir que el suelo utilizado en este ensayo es adecuado y saludable para realizar actividades agrícolas.

### 3.3 Análisis del contenido nutricional del grano de maíz.

Una vez finalizado el ensayo de campo y con el fin de comprobar el estado nutricional de los granos de maíz, se molió una parte representativa de los granos de maíz de cada tratamiento, incluyendo los controles y se enviaron tres réplicas por tratamiento al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 67 y 68, a excepción de los valores de As, Be, Bi, Cd, Mo, Se, Sb, Ti y V, que no se muestran, puesto que en todos los resultados obtenidos de los tratamientos eran inferiores a 0,01 mg/kg.

Tabla 67. Concentraciones del contenido de los elementos principales del grano de maíz. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar.

Tratamiento	Suelo	Ntotal (g/100g)	Ctotal (g/100g)	Ca (g/100g)	K (g/100g)	P (g/100g)
Control Sin Inocular	Sin Fertilizar	1,01 $\pm$ 0,03	40,38 $\pm$ 0,17	0,01 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,04
	Fertilizado	0,86 $\pm$ 0,10	40,30 $\pm$ 0,24	0,01 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,03
CRZM18R <sup>T</sup>	Sin Fertilizar	1,03 $\pm$ 0,02	40,25 $\pm$ 0,36	0,01 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,03
	Fertilizado	1,11 $\pm$ 0,04*	40,55 $\pm$ 0,32	0,01 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,01
CRZM52R	Sin Fertilizar	1,08 $\pm$ 0,08	40,37 $\pm$ 0,50	0,01 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,05
	Fertilizado	1,17 $\pm$ 1,13*	40,80 $\pm$ 0,31	0,01 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01

Se analizó por triplicado cada uno de los tratamientos. Valores marcados con asterisco son significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

Tabla 68. Concentraciones del contenido ionómico de los minerales presentes en el grano de maíz. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar.

Tratamiento	Suelo	Al (mg/kg)	B (mg/Kg)	Co (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)
Control Sin Inocular	Sin Fertilizar	0,09 $\pm$ 0	0,91 $\pm$ 0,04	<0,01	0,24 $\pm$ 0,25	0,57 $\pm$ 0,14	14,19 $\pm$ 0,24*
	Fertilizado	0,03 $\pm$ 1,36	1,70 $\pm$ 0,27*	0,05 $\pm$ 0,01*	0,18 $\pm$ 0,12	0,76 $\pm$ 0,17	11,62 $\pm$ 0,16
CRZM18R <sup>T</sup>	Sin Fertilizar	0,08 $\pm$ 0*	1,31 $\pm$ 0,43	<0,01	0,47 $\pm$ 0,50	0,70 $\pm$ 0,20	11,17 $\pm$ 1,54
	Fertilizado	0,06 $\pm$ 0	1,58 $\pm$ 0,071*	0,05 $\pm$ 0,01*	0,18 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,19	10,01 $\pm$ 1,17
CRZM52R	Sin Fertilizar	0,02 $\pm$ 0	0,42 $\pm$ 0,03	<0,01	<0,01	0,62 $\pm$ 0,04	11,00 $\pm$ 0,46
	Fertilizado	0,02 $\pm$ 0	0,57 $\pm$ 0,53	0,01 $\pm$ 0	<0,01	0,61 $\pm$ 0,18	11,87 $\pm$ 1,12

Tratamiento	Suelo	Li (mg/Kg)	Mg (mg/kg)	Mn (mg/Kg)	Na (mg/kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)
Control Sin Inocular	Sin Fertilizar	0,02 $\pm$ 0*	700 $\pm$ 0,01*	10,97 $\pm$ 1,68	40 $\pm$ 0,01*	0,28 $\pm$ 0,10	0,23 $\pm$ 0,06
	Fertilizado	0,01 $\pm$ 0	500 $\pm$ 0,01	9,59 $\pm$ 0,95	30 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,01
CRZM18R <sup>T</sup>	Sin Fertilizar	0,15 $\pm$ 0*	500 $\pm$ 0,01	9,33 $\pm$ 0,87	20 $\pm$ 0,01*	0,19 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,08
	Fertilizado	<0,01	500 $\pm$ 0,01	9,77 $\pm$ 1,30	10 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,05
CRZM52R	Sin Fertilizar	0,19 $\pm$ 0,02*	900 $\pm$ 0,02*	11,08 $\pm$ 2,27	100 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,10	0,16 $\pm$ 0,03
	Fertilizado	0,11 $\pm$ 0	800 $\pm$ 0,01	9,61 $\pm$ 1,56	100 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,04

Tratamiento	Suelo	Rb (mg/Kg)	S (mg/kg)	Sr (mg/Kg)	Ti (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)
Control Sin Inocular	Sin Fertilizar	1,40 $\pm$ 0,10	500 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,08	15,76 $\pm$ 7,58
	Fertilizado	1,45 $\pm$ 0,28	500 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,03	14,48 $\pm$ 1,08
CRZM18R <sup>T</sup>	Sin Fertilizar	1,21 $\pm$ 0,15	500 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,04	12,57 $\pm$ 0,33
	Fertilizado	1,51 $\pm$ 0,32	500 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,11	12,48 $\pm$ 0,62
CRZM52R	Sin Fertilizar	1,39 $\pm$ 0,30	500 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,21	15,05 $\pm$ 0,05
	Fertilizado	1,48 $\pm$ 0,25	500 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,01	12,68 $\pm$ 2,67

Se analizó por triplicado cada uno de los tratamientos. Valores marcados con asterisco son significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

El nitrógeno es un componente elemental para los nucleótidos y las proteínas (Xu et al. 2012). Además, es el principal limitante para el rendimiento de las plantas en la mayoría de los cultivos agrícolas (Robertson and Vitousek 2009). Se puede observar que los valores del contenido de nitrógeno en las semillas de maíz es mayor en las plantas inoculadas que en las plantas control. Este dato se corrobora con lo que argumenta Puente et al. (2004), que generalmente las plantas inoculadas con capacidades PGPR aumentan el contenido en nitrógeno frente a aquellas que no han sido inoculadas.

El fósforo es un elemento de gran importancia para las células, ya que es un componente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, adenosina trifosfato (ATP) y varias coenzimas. Su deficiencia provoca un crecimiento atrofiado de la planta (Soetan et al. 2010). Otros elementos como el K, Ca, Mg, Na y oligoelementos tales como Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Se, Cr, etc; son necesarios para procesos fisiológicos importantes y además, son importantes para los organismos en niveles tróficos superiores (Bukhsh et al. 2007). Los valores de otros elementos como el P, Ca, Fe, Cu, S y Mn mantienen valores similares en todos los tratamientos.

Los valores obtenidos en nuestro estudio de P, N y K fueron mayores a los obtenidos por Biari et al. (2008) en el análisis del contenido nutricional de las semillas de maíz tras haber sido coinoculados con las cepas PGPR de *Azospirillum* y *Azotobacter*; mientras que otros valores como el Fe, Mn, Zn y Cu fueron menores en nuestro ensayo.

El magnesio es otro de los macronutriente esencial para su crecimiento y reproducción porque es constitutivo de la molécula de clorofila (Bukhsh et al. 2007). Los mejores valores del magnesio se obtienen en los tratamientos inoculados con la cepa CRZM52R. Este elemento es otro de los macronutriente esencial para su crecimiento y reproducción porque es constitutivo de la molécula de clorofila (Bukhsh et al. 2007). Por lo que, una deficiencia de este elemento afecta al crecimiento de la planta y por lo tanto su rendimiento; además, las plantas son más susceptibles a patógenos y dañados por las bajas temperaturas y también produce clorosis afectando consecuentemente al proceso de fotosíntesis (Socha and Guerinot 2014).

En ningún caso, el contenido nutricional de las plantas se vio alterado por incrementos de elementos que pueden considerarse nocivos como el arsénico, el litio, el rubidio, el estroncio y el talio, ya que ciertos valores no pueden superar en ningún caso la concentración de los metales pesados recomendados para alimentación según la AAFCO (*Association of American Feed Control*) y el Real Decreto 465/2003, de 25 de Abril, que regula las sustancias indeseables en los productos destinados a la alimentación animal y los niveles máximos tolerados de sustancias indeseables en aquellos, a fin de proteger la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente.

Por tanto, nuestro estudio proporciona evidencias claras de que la inoculación en maíz de las bacterias PGPR seleccionadas, son susceptibles de ser utilizadas como biofertilizantes ya que promueven el crecimiento, la productividad y el rendimiento de las plantas de maíz. Además, el contenido nutricional de los granos de maíz, no se vio alterado negativamente pudiendo destinarse perfectamente para el consumo tanto humano como animal.

Estas bacterias son aceptadas internacionalmente como una fuente alternativa a los fertilizantes nitrogenados, ya que son respetuosos con el medio ambiente y pueden utilizarse para garantizar una producción sostenible de cereales.

***Estudios de la acción PGPR de  
Rhizobium en plantas hortícolas***

**Capítulo VII**



En la actualidad, científicos de todo el mundo desarrollan estudios en los que determinan el potencial de los microorganismos con capacidades promotoras del crecimiento en diversos cultivos agrícolas (García-Fraile et al. 2017). Este modelo de biofertilización, es más saludable que los fertilizantes químicos que tienen costes elevados y producen muchos problemas ambientales y de salud humana (García-Fraile et al. 2015). Por estos motivos, muchos países están aceptando e incluyendo políticas verdes en sus legislaciones. Una de estas iniciativas consiste en promover el consumo de hortalizas ricas en sustancias bioactivas (Jiménez-Gómez et al. 2017). En este sentido hemos visto que se ha incrementado considerablemente el consumo de los cultivos hortícolas como rúcula, albahaca, canónigos y berros, y actualmente, existen pocos estudios de interacción con biofertilizantes. Por este motivo, en este estudio hemos querido evaluar el posible potencial efecto promotor del crecimiento vegetal de uno de nuestros aislados en los cultivos hortícolas mencionados.

Puesto que se trata de una especie nueva, seleccionamos la cepa *Rhizobium zeae* CRZM18R<sup>T</sup> descrita en este estudio, para averiguar si al igual que ocurre en las plantas de maíz inoculadas con esta cepa, también incrementa la producción de los cultivos hortícolas seleccionados.

## **1. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA INTERACCIÓN DE LOS AISLADOS CON LAS RAÍCES DE RÚCULA, ALBAHACA, CANÓNIGOS Y BERROS.**

En primer lugar quisimos averiguar si la cepa CRZM18R<sup>T</sup> era capaz de interaccionar de manera eficaz con las raíces de los cultivos seleccionados, realizamos un ensayo inoculando la cepa marcada con GFP en las diferentes raíces y a continuación se visualizaron en diferentes días mediante microscopía de fluorescencia.

A los 11 dpi, se puede observar la superficie de la raíz de rúcula colonizada por la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, además se aprecia una mayor colonización en la base de los pelos radiculares, también se observa colonización en los espacios intercelulares y pequeñas formaciones de biofilms (Figura 64A). En las raíces de albahaca, a los 11 dpi, se puede apreciar una colonización discreta de la superficie radicular por parte de la cepa de *Rhizobium* (Figura 64B). A los 7 dpi, la cepa de *Rhizobium* colonizó también de manera discreta, la superficie de la raíz de canónigos, la base de los pelos radiculares y alguno de los pelos (Figura 64C). En las raíces de berros a los 11 dpi, se observó al igual que en las raíces de albahaca una discreta colonización de la superficie radicular (Figura 64D).

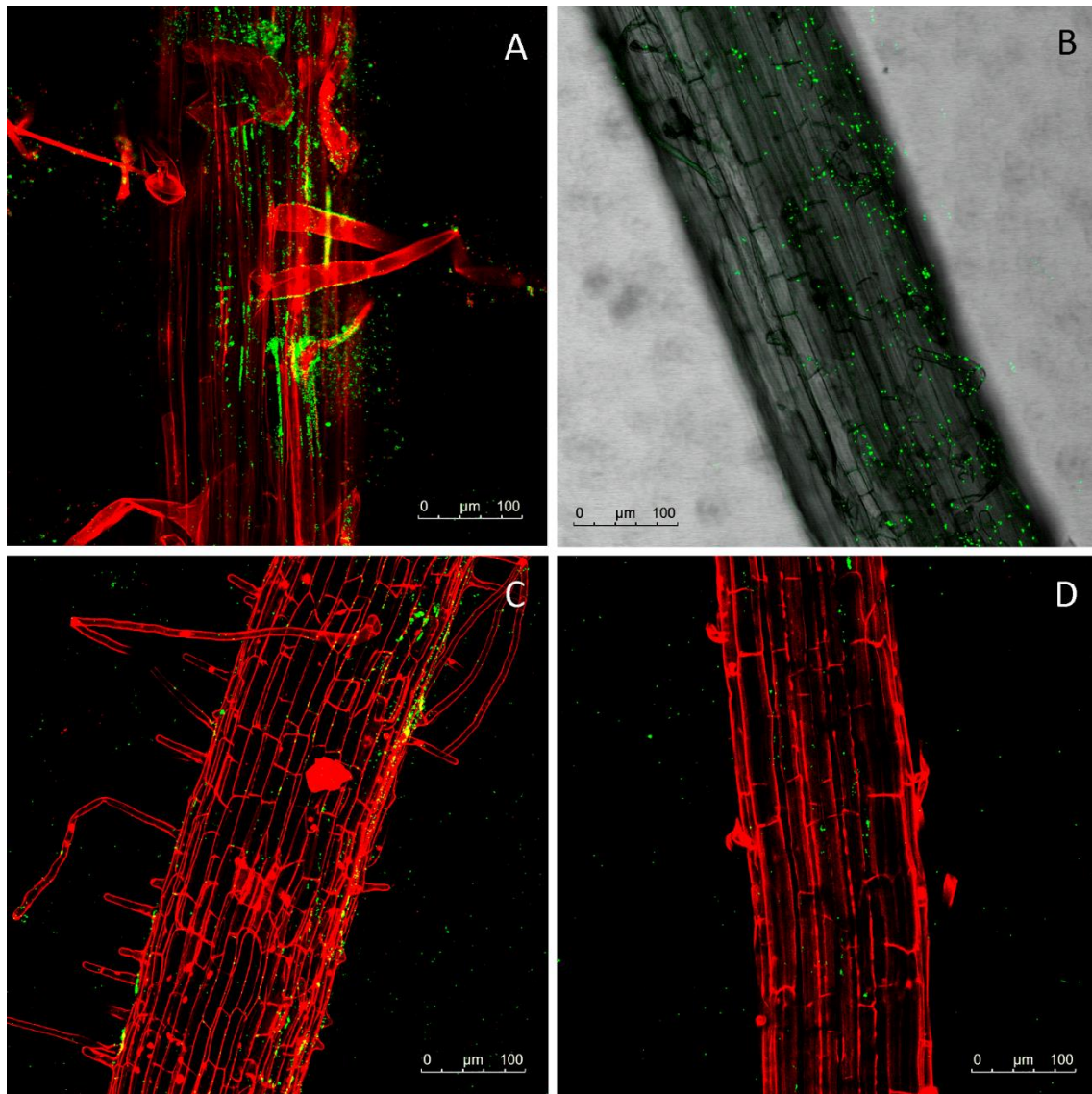


Fig. 64. Microscopía confocal de las raíces de los diferentes cultivos hortícolas utilizados en este estudio inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificada como *Rhizobium zeaе* marcada con *gfp* (verde). A) Superficie de la raíz de rúcula a los 11 dpi, teñida con yoduro de propidio (rojo) donde se puede ver una extensa colonización por parte de la cepa inoculada sobre la superficie; B) Superficie de la raíz de albahaca a los 11 dpi, en campo claro, en la que se puede observar la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup>; C) Superficie de la raíz de canónigo a los 7 dpi, teñida con yoduro de propidio (rojo) donde se aprecia una mayor colonización por parte de la cepa de *Rhizobium* en las zonas cercanas a los pelos radiculares; D) Superficie de la raíz de berro a los 11 dpi, teñida con yoduro de propidio (rojo) donde se observa una escasa colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup>.

Para analizar si la colonización se veía incrementada por parte de la cepa de *Rhizobium* en las raíces con el paso del tiempo, el ensayo se realizó a diferentes días. Por tanto, a los 14 dpi, se pudo observar en las raíces de rúcula, una gran colonización por parte de la bacteria así como la formación de biofilms a lo largo de la superficie (Figura 65A). Además, se observó una adhesión de células bacterianas sobre la superficie, la base y la punta de los pelos radiculares. En este caso los biofilms se han desarrollado de tal manera, que forman una barrera que posiblemente pueda impedir la entrada a otros microorganismos competidores de la rizosfera.

En el caso de las raíces de albahaca, se puede apreciar infección a través de los espacios intercelulares. Se observaron también microcolonias sobre la superficie de la raíz que son el primer paso de la formación de biofilms (Figura 65B).



Cuando se observaron las raíces de canónigos, se encontró la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> sobre la superficie radicular y en los espacios intercelulares. También se observa colonizando la superficie de los pelos radicales y la punta de los pelos. Se pueden apreciar formaciones de biofilms sobre la superficie de la raíz (Figura 65C).

Finalmente, cuando se observaron las raíces de berros, se pudo observar que la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> se concentraba a lo largo de la superficie radicular y sobre los pelos radicales. Se puede observar también la formación de biofilms en la superficie de la raíz (Figura 65D).

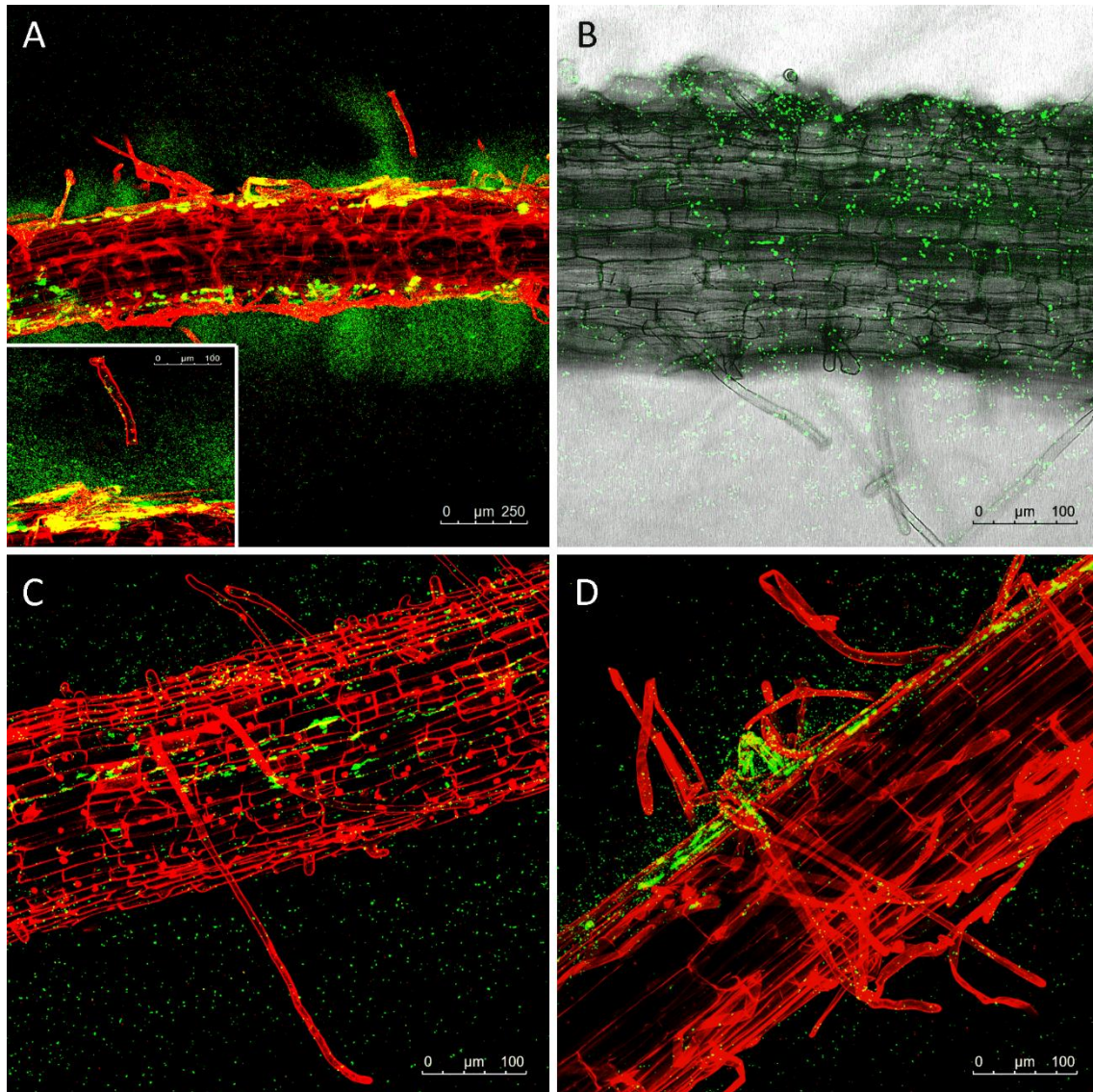


Fig. 65. Microscopía confocal de las raíces de los diferentes cultivos hortícolas utilizados en este estudio inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificada como *Rhizobium zae* transformada con *gfp* (verde). A) Superficie de la raíz de rúcula a los 14 dpi, teñida con yoduro de propidio (rojo) donde se puede ver la colonización por parte de la cepa inoculada; inferior izquierda, se puede ver la colonización detallada sobre un pelo radicular; B) Superficie de la raíz de albahaca a los 14 dpi, en campo claro, en la que se puede observar la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup>; C) Superficie de la raíz de canónigos a los 10 dpi, teñida con yoduro de propidio (rojo) donde se puede ver la colonización por parte de la cepa inoculada; D) Superficie de la raíz de berros a los 14 dpi, teñida con yoduro de propidio (rojo) donde se puede ver la colonización por parte de la cepa CRZM18R<sup>T</sup>.

Por tanto, la primera etapa de la colonización se cumple en todas las plantas estudiadas observando colonización tanto en la superficie radicular, como en la superficie y punta de los pelos radicales. Por otra parte, a los tiempos ensayados no se han visto células en el interior de las raíces, excepto en el caso de la albahaca y los canónigos que se ha observado una colonización de los espacios intercelulares.

Diversos estudios han analizado la capacidad para producir un crecimiento importante y una colonización efectiva a partir de cepas rizobianas. García-Fraile et al. (2012) observaron que dos especies de rizobios se encontraban firmemente unidas a las superficies de raíz de tomate y pimiento, colonizando los espacios intercelulares. Por otra parte, Flores-Félix et al. (2013) demostraron que una cepa de *Rhizobium leguminosarum* coloniza la epidermis de la raíz y los espacios intercelulares en plantas de *Lactuca sativa* y *Daucus carota*. Jiménez-Gómez et al. (2016) observaron como una cepa de *Rhizobium* sp. colonizaba gradualmente la superficie y ocupaban los espacios intercelulares de las raíces de espinaca. También observaron formaciones de biofilms.

Por tanto, nuestro estudio reveló que la inoculación con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> en diversas plantas de hortalizas presentaba un modo similar de colonización observado en otros estudios (Chabot et al. 1996; García-Fraile et al. 2012b; Flores-Félix et al. 2013; Jiménez-Gómez et al. 2016).

Sin embargo, en esos estudios no se ha reportado tanta cantidad de biofilm como la que observamos en la superficie radicular de las raíces de rúcula a los 14 pdi. Este hecho se puede deber a que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> ha demostrado tener capacidad *in vitro* para formar biofilms, característica descrita en otras cepas del género *Rhizobium* capaces de colonizar raíces de leguminosas y no leguminosas (García-Fraile et al. 2012b; Robledo et al. 2012; Flores-Félix et al. 2013; Abbamondi et al. 2016; Jiménez-Gómez et al. 2016); además como vimos en el capítulo III, de este trabajo, se han identificado los genes implicados en su formación, tanto en la biosíntesis de dichos exopolisacáridos (*exoR*, *exoD*, *exoQ* y *exoF*), como en su exportación (*kpsC*, *kpsT* y *kpsS*).

Sin embargo, el hecho de que solo se haya observado esta gran formación de biofilms en el caso de las raíces de rúcula, podría estar relacionado con una cierta especificidad de la planta, ya que las plantas secretan exudados, que son compuestos orgánicos que pueden proporcionar una fuente de nutrientes para las bacterias (Rudrappa et al. 2008). Según este hecho, podría ser que las raíces de rúcula secreten una mayor cantidad de exudados haciéndolas más atractivas para las bacterias.

Por otro lado, aunque la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, es endófito de maíz, su interacción no es específica de dicha planta, ya que la interacción y colonización es efectiva en todas las especies de plantas hortalizas probadas, aunque en el caso de las raíces de rúcula la colonización fue notablemente mayor.

## 2. ANÁLISIS DE LA PROMOCIÓN RADICULAR EN SEMILLAS DE RÚCULA, ALBAHACA, CANÓNIGOS Y BERROS.

Una vez que comprobamos que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> colonizaba de manera eficaz las raíces de los cultivos seleccionados para este ensayo, realizamos una inoculación de la cepa sobre las semillas germinadas de los diferentes cultivos, para observar si se producía algún efecto promotor en las raíces de los cultivos en los primeros estadios de desarrollo. Se analizaron, en diferentes días, los resultados obtenidos en cuanto a la longitud de la raíz principal y el número de raíces secundarias, comparados con raíces sin inocular (Tabla 69, Figura 66).

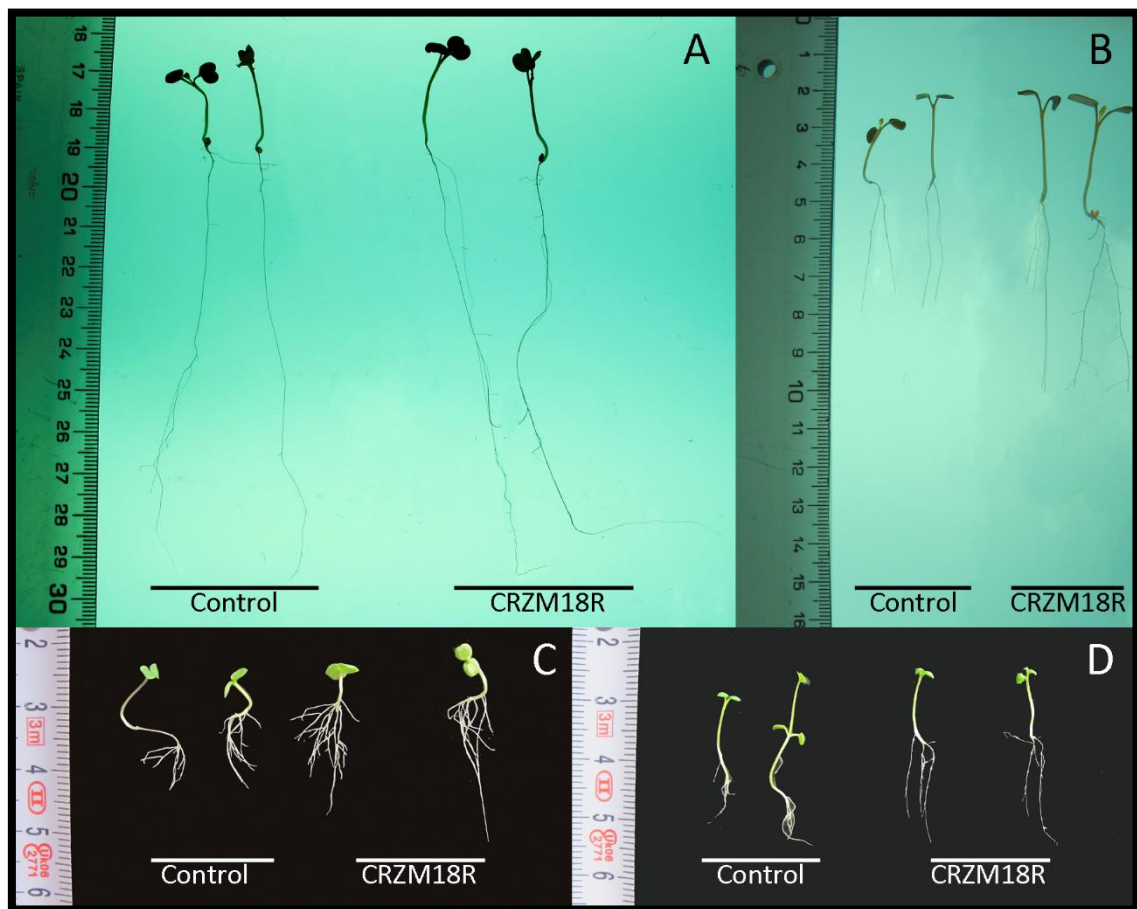


Fig. 66. Aspecto de las plántulas control comparadas con las inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup>. A) Plántulas de rúcula a 12 dpi; B) Plántulas de albahaca a 12 dpi; C) Plántulas de canónigos a 16 dpi; D) Plántulas de berros a 16 dpi.

Tabla 69. Resultados que muestran los datos obtenidos *in vitro* inoculando *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup> en semillas de rúcula, albahaca, canónigos y berros.

Plantas	Días post inoculación	Tratamientos	Longitud de la raíz principal (cm)	Número de raíces secundarias
<i>Eruca sativa</i>	8dpi	Control	8,52±0,94	2,30±0,08
		CRZM18R <sup>T</sup>	8,62±0,70	2,63±0,08*
	12 dpi	Control	11,20±0,37	2,50±0,09
		CRZM18R <sup>T</sup>	12,10±0,25*	2,82±0,06*
<i>Ocimum basilicum</i>	8dpi	Control	1,61±0,15	3,10±0,18
		CRZM18R <sup>T</sup>	2,05±0,21	3,25±0,16
	12 dpi	Control	2,05±0,30	3,44±0,18
		CRZM18R <sup>T</sup>	2,78±0,12*	3,75±0,25
<i>Valerianella locusta</i>	8 dpi	Control	1,42±0,10	6,00±0,45
		CRZM18R <sup>T</sup>	1,58±0,20	7,00±0
	16 dpi	Control	1,86±0,20	7,25±0,25
		CRZM18R <sup>T</sup>	2,85±0,29*	14,00±2,00*
<i>Nasturtium officinale</i>	8 dpi	Control	1,50±0,13	3,00±0,26
		CRZM18R <sup>T</sup>	1,85±0,29	3,75±0,25
	16 dpi	Control	1,90±0,23	3,67±0,33
		CRZM18R <sup>T</sup>	2,37±0,09	4,60±0,51

\*Los valores representan la media± el error estándar de 12 plantas por cada uno de los tratamientos. (n=12)

\*Valores marcados con asterisco son significativos a P≤0.05 de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

Los resultados muestran como la inoculación de la cepa de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup> promovió el desarrollo de la longitud de la raíz principal de las cuatro plantas hortícolas, observándose un aumento en todos los días evaluados, siendo estadísticamente significativos a los 12 dpi en rúcula y albahaca y en canónigos a los 16 dpi.

También en las raíces secundarias se pudo observar un aumento en los tratamientos inoculados con la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, siendo estadísticamente significativos los valores de todos los días evaluados en el caso de la rúcula. En el caso de los canónigos, los resultados fueron significativamente superiores a los 16 dpi.

Por tanto, este ensayo mostró el efecto positivo que produce la inoculación de la cepa *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup> en las diferentes plantas hortícolas probadas en este estudio, en los primeros estadios de crecimiento, cuando se evaluaron en condiciones *in vitro*.

Otros estudios también obtuvieron mejoras en el desarrollo radicular al inocular bacterias PGBP en semillas de rúcula y de canónigos. Por ejemplo, de manera similar a nuestro estudio, de Souza et al. (2016) aislaron 210 cepas rizobianas de *Phaseolus vulgaris*, entre los que seleccionaron *Rhizobium leguminosarum* E15 y *Rhizobium radiobacter* L5, por su capacidades PGPB, para realizar un ensayo *in vitro* en semillas de rúcula. Los resultados mostraron, la igual que en nuestro estudio, que las plántulas inoculadas incrementaron el porcentaje de germinación, la longitud y el peso seco en comparación con las plántulas sin inocular, relacionándose este incremento con la producción de fitohormonas del grupo indol por parte

de estas cepas. Por otra parte, Kunova et al. (2016) probaron el efecto biocontrolador de distintas cepas de *Streptomyces*, observando también un incremento en la tasa de germinación de las semillas de canónigos.

Los incrementos obtenidos en las raíces inoculadas de los diferentes cultivos de hortalizas podrían estar relacionadas con la capacidad de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> para producir AIA, ya que mostró capacidad para producir esta hormona en ensayos realizados *in vitro*, así como genes asociados con el complejo piruvato deshidrogenasa de la ruta del indol-3-piruvato (EC 1.2.4.1), que es una de las rutas utilizadas por las bacterias para sintetizar el ácido indol acético. Otros autores también han relacionado efectos similares en la estimulación del número de raíces debido con la producción de AIA por parte de las bacterias inoculadas (Dell'Amico et al. 2008; Duca et al. 2014).

Por tanto, nuestros resultados apoyarían la aplicación de *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup> como potencial bioinoculante en los cultivos de rúcula, albahaca, canónigos y berros. Estos incrementos en los sistemas radiculares podrían proporcionar una mejor absorción de los nutrientes del suelo a la planta y por lo tanto un mejor crecimiento y desarrollo. Por tanto, para cerciorarnos de dicha hipótesis, debemos realizar un ensayo en condiciones de invernadero y analizar si incrementa la producción de dichos cultivos.

### 3. ENSAYOS DE MICROCOSMOS EN INVERNADERO.

Los datos obtenidos de los cultivos tratados en este estudio en condiciones de invernadero, se pueden observar en la figura 67 y en la tabla 70.

En el caso de las plantas de rúcula inoculadas con la cepa de *R. zea* CRZM18R<sup>T</sup>, los resultados obtenidos a los 40 dpi, en todos los parámetros estudiados fueron estadísticamente significativos al control sin inocular, mostrando incrementos del 27,4% en la clorofila, 15% en la longitud de la parte aérea, 16,4% en la longitud de las raíces, 26,7% en el peso fresco de la parte aérea y del 30% en la radicular y por último, del 48,3% y 24,3% respectivamente en el peso seco de la parte aérea y radicular.

En el caso de las plantas de albahaca inoculadas con la cepa de *Rhizobium*, se obtuvieron a los 45 dpi, incrementos significativos en los valores de la clorofila, la longitud de la parte aérea y radicular, siendo estos aumentos del 7,7%, 13,4% y 10,4%, respectivamente.

En el caso de las plantas de canónigos, a los 30 dpi, se observaron valores estadísticamente significativos en las plantas inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> respecto al control, en la clorofila, la longitud de la parte aérea y de las raíces, y también en el peso seco de las raíces, siendo estos aumentos del 20,4%, 12,9%, 11,2% y 81,1%, respectivamente.

Finalmente, en el caso de los berros, a los 30 dpi, se obtuvieron valores estadísticamente significativos en las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup>, en los parámetros de clorofila, peso fresco y seco de la parte aérea y de las raíces, con unos aumentos respecto al control sin inocular del 13,7%, 58,5%, 83,3%, 9% y 8,8%, respectivamente.

Tabla 70. Resultados que muestran los datos obtenidos en condiciones de invernadero inoculando *Rhizobium zeae* CRZM18R<sup>T</sup> en plantas de rúcula, albahaca, canónigos y berros.

Plantas	dpi	Tratamiento	Clorofila (Unidades SPAD)	Longitud parte aérea (cm)	Longitud raíces (cm)	Peso fresco parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Peso fresco raíces (g planta <sup>-1</sup> )	Peso seco parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Peso seco raíces (g planta <sup>-1</sup> )
<i>Eruca sativa</i>	40dpi	Sin inocular	35,97±0,29	20,25±0,28	31,63±0,47	20,97±0,39	17,25±0,29	2,11±0,10	1,36±0,07
		CRZM18R <sup>T</sup>	45,83±0,37*	23,3±0,23*	36,81±0,35*	26,57±0,30*	22,42±0,41*	3,13±0,13*	1,69±0,08*
<i>Ocimum basilicum</i>	45dpi	Sin inocular	18,07±0,39	13,5±0,29	18,96±0,30	2,93±0,12	2,77±0,15	0,57±0,04	0,25±0,03
		CRZM18R <sup>T</sup>	19,46±0,16*	15,31±0,32*	20,94±0,20*	3,15±0,19	2,92±0,24	0,66±0,08	0,28±0,03
<i>Valerianella locusta</i>	30dpi	Sin inocular	33,65±0,26	6,40±0,16	15,49±0,27	1,09±0,06	1,38±0,08	0,07±0,01	0,04±0,02
		CRZM18R <sup>T</sup>	40,52±0,28*	7,23±0,16*	17,23±0,22*	1,16±0,06	1,47±0,07	0,08±0,01	0,07±0,02*
<i>Nasturtium officinale</i>	30dpi	Sin inocular	26,86±0,28	15,07±0,27	23,37±0,25	1,88±0,14	2,21±0,09	0,11±0,01	0,07±0,01
		CRZM18R <sup>T</sup>	30,53±0,29*	15,87±0,28	24,83±0,22*	2,98±0,18*	4,05±0,21*	0,23±0,02*	0,14±0,01*

\*Los valores representan la media ± el error estándar de 30 plantas por cada uno de los tratamientos. (n=30)

\*Valores marcados con asterisco son significativos a P≤0.05 de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

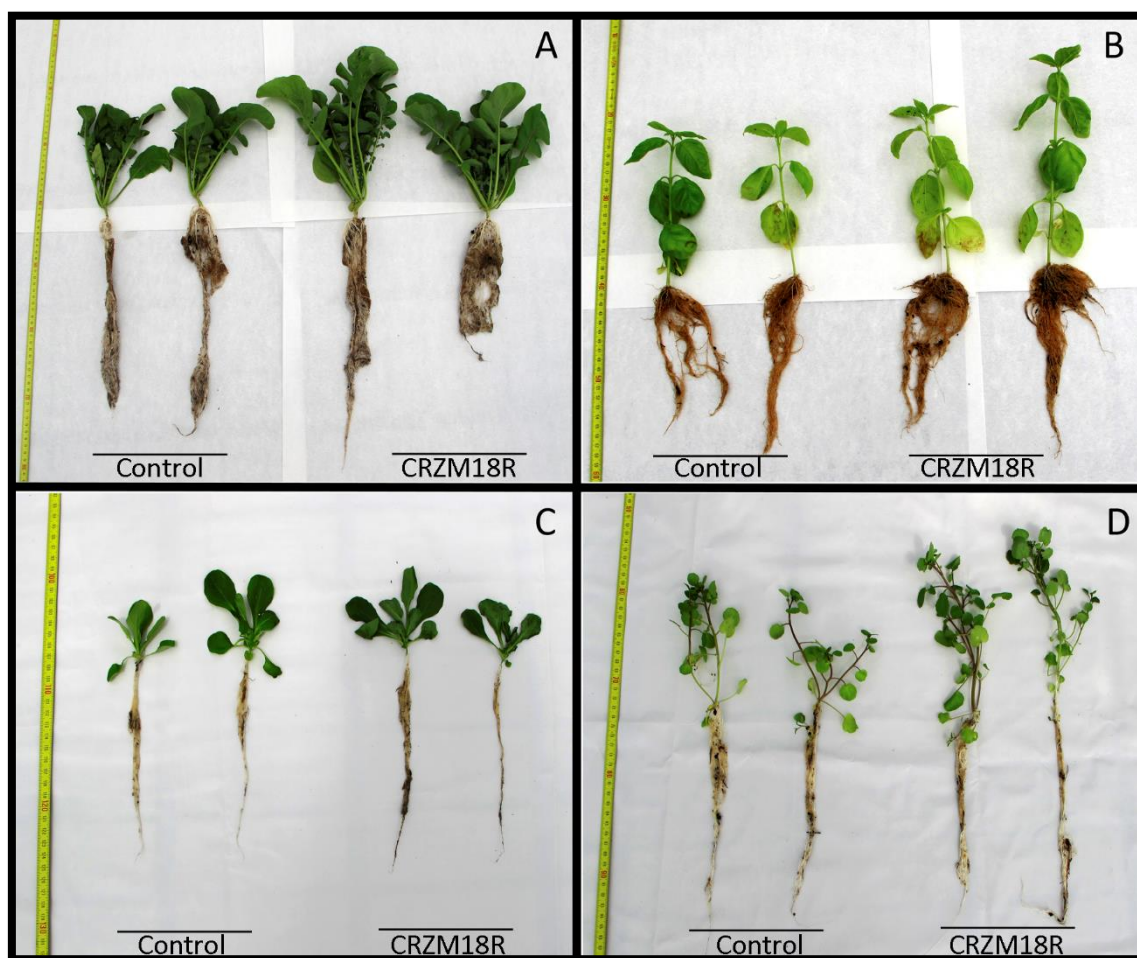


Fig. 67. Comparación de los fenotipos mostrados por dos plantas control sin inocular (izquierda) y dos plantas inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> (derecha) de los cultivos de A) rúcula a los 40 dpi; B) albahaca a los 45 dpi; C) canónigos a los 30 dpi; D) berros a los 30 dpi.

La inoculación con bacterias promotoras del crecimiento en estos cultivos también fueron estudiados por otros autores pero hasta la fecha y hasta donde nosotros sabemos en ninguno de ellos se utilizaron cepas de género *Rhizobium* para sus ensayos.

Uno de estos estudios fue el de Kamran et al. (2016) que evaluaron la capacidad en fitorremediadora de plantas de rúcula, en suelos con diferentes niveles de cadmio (Cd), inoculando una cepa de *Pseudomonas putida*, con capacidad de producir ácido indól acético y de solubilizar fosfato. Los resultados que obtuvieron fueron similares a los de nuestro estudio, mostrando que a niveles bajos de Cd, las plantas inoculadas aumentaron un 34% y 41% en la longitud de las raíces y brotes y el 38% y 24% en el peso seco fresco, respectivamente, en comparación con las plantas no inoculadas, favoreciendo el crecimiento saludable bajo estrés. También observaron aumentos en los contenidos de clorofila de las plantas inoculadas relacionándolo con la producción de diferentes hormonas.

El cultivo de albahaca también se ha probado ya con diversas PGPR. Por ejemplo, Ordookhani et al. (2011) estudiaron el efecto de coinocular las raíces de *Ocimum basilicum*, con diferentes combinaciones de bacterias PGPR: *Pseudomonas putida*, *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum*. Los resultados mostraron que algunas de las combinaciones

incrementaban significativamente el peso fresco y seco de la parte aérea, las raíces, la altura de los brotes y el contenido de N, P, K en las plantas de albahaca inoculadas. También, Singh et al. (2013) estudiaron el efecto de inocular *Pseudomonas monteilii*, *Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis* y *Bacillus spp.* para evaluar si se incrementaba el rendimiento del cultivo de albahaca. Los resultados mostraron una mayor producción debido a que las plantas inoculadas presentaban una mayor altura y una mayor concentración de nutrientes que las plantas sin inocular. Además, Kumar et al. (2017), evaluaron el efecto de *Azophos*, un producto compuesto por *Azospirillum* y *Phosphobacterium* (1:1) en plantas de albahaca, obteniendo un incremento en el crecimiento y el rendimiento del cultivo.

Al igual que en los estudios mencionados, en nuestro ensayo se incrementa también la producción del cultivo de albahaca cuando es inoculado con la cepa CRZM18R<sup>T</sup>. A su vez, se ven incrementados también algunos elementos principales como el Ca en un 5,2% y el P en un 16,7%, entre otros. El incremento del fósforo se puede deber a la capacidad de nuestra cepa para solubilizar fosfato, ya que esta habilidad fue comprobada *in vitro*. Pero además se detectaron en el genoma genes que codifican proteínas implicadas en dicho mecanismo, tanto el regulador Pho, encargado de activar las enzimas que obtienen el fosfato inorgánico a partir de fosfatos orgánicos, como también los transportadores de P inorgánico Pit, Pst y Phn.

En cuanto al cultivo de canónigos, hasta la fecha, no tenemos constancia de estudios de sobre inoculación de estos cultivos con bacterias PGPR en invernadero por lo que es interesante saber qué beneficios se obtiene al inocular dichas bacterias. Este estudio contribuye a este conocimiento.

En el caso del cultivo del berro, únicamente encontramos un estudio en el utilizasen bacterias PGPB. Pignata et al. (2016) quisieron comprobar como afectaba la inoculación de una cepa de *Bacillus subtilis*, sobre el rendimiento y la calidad en el cultivo de berro cultivado en un sistema flotante. A diferencia de nuestro ensayo, sus resultados no mostraron ningún aumento ni el desarrollo de la planta, ni en la producción de dicha hortícola.

Por otro lado, todas las plantas inoculadas de todos los cultivos probados, mostraron un aumento significativo en el contenido de clorofila en comparación con aquellas que no habían sido inoculadas. Este incremento en clorofila se traduce en un mayor color verde en las hojas, característica muy apreciada cuando se trata de las hojas comestibles de las hortalizas. Además, la ingesta de clorofila en nuestros cuerpos provoca un aumento de la cantidad de hemoglobina en nuestra sangre, lo que se traduce en una mejora de la energía, la circulación sanguínea y la oxigenación (García-Fraile et al. 2017). Por otro lado, este aumento está directamente relacionado con el incremento en el contenido de nitrógeno en la planta (Almaliotis et al. 1997; Rama Prabha et al. 2017). Pero, este efecto, en el caso de *Rhizobium*, no puede ser debido a una fijación de nitrógeno atmosférico ya que esta bacteria no es un fijador de nitrógeno de vida libre, posiblemente será debido a una mayor disponibilidad de nutrientes (Vessey 2003). Este efecto ya se ha observado también en tomate, lechuga y zanahorias inoculadas el efecto PGPR con otras cepas de *Rhizobium* (García-Fraile et al. 2012a; Flores-Félix et al. 2013). En conjunto, estos resultados sugieren que los rizobios, que aumentan el contenido de N de las leguminosas a través de la fijación simbiótica de nitrógeno, también pueden aumentar el contenido de N de las no leguminosas a través de la promoción del crecimiento de las plantas que favorece la absorción de nutrientes del suelo.



### 3.1 Análisis cuantitativo de los elementos esenciales de las hojas.

Una vez recogidas y secadas las partes aéreas de las hojas, se analizó en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC el contenido de los elementos esenciales de las partes comestibles de los cultivos utilizados en este estudio. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 71 y 72, a excepción de los valores de Be, Bi, Sb, Se y V, que no se muestran, puesto que en todos los resultados obtenidos de los tratamientos eran inferiores a 0,01 mg/kg.

Tabla 71. Concentraciones del contenido de los elementos principales del grano de maíz. Los valores representan la media ± el error estándar.

Planta	Tratamiento	Ntotal (g/100g)	Ctotal (g/100g)	Ca (g/100g)	K (g/100g)	P (g/100g)
Rúcula	Control	2,63±0,03	38,26±0,01*	1,59±0,18	2,61±0,31	0,30±0,04
	CRZM18R <sup>T</sup>	3,31±0,01*	38,21± 0,01	2,14±0,15*	2,90±0,18	0,37±0,03
Albahaca	Control	0,82±0,01*	40,26±0,05	1,35±0,06	1,34±0,06	0,18±0,01
	CRZM18R <sup>T</sup>	0,71±0,02	40,37±0,02*	1,42±0,03	1,30±0,04	0,21±0,01*
Canónigos	Control	4,33±0,02	42,03±0,17*	0,93±0,03	5,24±0,07	0,46±0,01
	CRZM18R <sup>T</sup>	4,57±0,01*	40,96±0,17	0,88±0,03	5,76±0,37*	0,50±0,01*
Berros	Control	2,53±0,02*	38,43±0,06	1,50±0,06	3,52±0,23	0,44±0,01
	CRZM18R <sup>T</sup>	2,07±0,01	38,93±0,03*	1,50±0,01	3,56±0,21	0,57±0,04*

Por cada uno de los tratamientos se analizaron tres réplicas. Valores seguidos de un asterisco son significativos a P≤0.05 de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

Tabla 72 Concentraciones del contenido iónico de los minerales presentes en el grano de maíz. Los valores representan la media ± el error estándar.

Planta	Tratamiento	Al (mg/kg)	As (mg/kg)	B (mg/Kg)	Cd (mg/kg)	Co (mg/Kg)
Rúcula	Control	61,68±8,53	<0,01	25,53±2,93	0,39±0,05	0,06±0,01*
	CRZM18R <sup>T</sup>	102,90±0,73*	0,11±0*	40,16±3,32*	0,38±0,03	0,04±0
Albahaca	Control	40,22±3,49*	0,03±0,02	16,56±0,04	<0,01	0,07±0,01
	CRZM18R <sup>T</sup>	33,08±5,50	0,19±0,03*	19,95±4,13	<0,01	0,03±0,02
Canónigos	Control	220,22±70,41*	0,06±0,03	37,80±0,78*	0,02±0*	0,19±0,01
	CRZM18R <sup>T</sup>	127,0±13,80	0,08±0,03	32,11±0,31	<0,01	0,21±0,02
Berros	Control	93,76± 7,56	0,28±0*	30,22±2,26	0,58±0,13	0,31±0,13
	CRZM18R <sup>T</sup>	116,38±32,88	0,04±0	35,21±0,23*	0,44±0,04	0,18±0,03

Planta	Tratamiento	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Li (mg/Kg)	Mg (g (mg/Kg)
Rúcula	Control	0,35±0,02*	3,0±0,39	86,26±11,38	135,37±16,71	8900±0,11
	CRZM18R <sup>T</sup>	0,27±0	4,0±0,19*	129,56±4,36*	175,83±11,42*	11400±0,09*
Albahaca	Control	0,38±0,02*	2,58±0,01*	76,28±1,15*	15,25±0,65	3900±0,04*
	CRZM18R <sup>T</sup>	0,21±0,06	1,53±0,11	63,65±4,47	15,32±1,15	3700±0,04
Canónigos	Control	0,41±0,03	8,33±0,08	225,82±40,98*	11,46±0,40	5300±0,03*
	CRZM18R <sup>T</sup>	0,38±0,01	8,76±0,15*	173,30±4,31	14,38±0,21*	5200±0,01
Berros	Control	0,46±0,01	5,35±0,06	99,89±2,22	20,0±1,33	3800±0,01
	CRZM18R <sup>T</sup>	0,39±0,16	6±0,37*	118,43±16,12*	19,43±3,16	4000±0,01*

Planta	Tratamiento	Mn (mg/Kg)	Mo (mg/kg)	Na (mg/kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)
Rúcula	Control	93,72±11,05	48,45±6,02*	1400±0,02	0,38±0,05	0,05±0
	CRZM18R <sup>T</sup>	127,58±7,72*	37,74±2,61	1500±0,01*	0,34±0,09	0,13±0*
Albahaca	Control	66,31 ±1,19*	0,85±0,01*	<0,01	0,24±0,02	0,12±0,04
	CRZM18R <sup>T</sup>	55,75±0,36	0,21±0,13	<0,01	0,30±0,08	0,15±0,08
Canónigos	Control	83,14±2,75	4,40±0,05	6000±0,01	0,86±0,10*	0,24±0,06
	CRZM18R <sup>T</sup>	81,12±1,41	4,64±0,29	7000±0,01*	0,66±0,01	0,37±0,17
Berros	Control	50,99±0,47	20,04±0,44*	2900±0,02*	0,57±0,14	0,17±0,15
	CRZM18R <sup>T</sup>	51,04±1,72	17,85±1,08	2800±0,02	0,41±0,01	0,11±0,03

Por cada uno de los tratamientos se analizaron tres réplicas. Valores seguidos de un asterisco son significativos a P≤0.05 de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

En primer lugar, el contenido de nitrógeno en las plantas de rúcula (*Eruca sativa*) inoculadas fue un 25,9% mayor que las plantas sin inocular, siendo este elemento elemental para el desarrollo de la planta. Otro macroelemento esencial para la planta es el fósforo; en este caso, las plantas inoculadas con esta cepa mostraron un aumento del 25,4% frente a las plantas control. En el caso de los microelementos esenciales para las plantas encontramos algunas de ellas en las que las plantas de rúcula inoculadas tenían concentraciones más altas que las no inoculadas, los porcentajes de aumento son, 78,3% en boro, 34,5% en calcio, 33,4% en cobre, 28,5% en magnesio, 36,1% en manganeso y 30,7% en zinc.

El análisis de las plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*), no presenta valores significativos diferentes en cuanto a macro y microelementos cuando se compararon las plantas inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> y las control sin inocular.

En el caso de los canónigos (*Valerianella locusta*), las plantas inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> mostraron valores significativos de nitrógeno un 5,7% mayores a las plantas control. No se encontraron diferencias significativas en el resto de los elementos medidos.

Finalmente, en las plantas de berro (*Nasturtium officinale*) inoculadas con la cepa CRZM18R<sup>T</sup> se obtuvo un incremento en la concentración de fósforo de un 28,9% mayor respecto a las plantas sin inocular. También se observó una mayor concentración del carbono en un 1,3% mayor en las plantas inoculadas que en las plantas sin inocular.

Por tanto, como hemos podido observar, el contenido nutricional puede variar ligeramente entre las plantas inoculadas y las plantas sin inocular, pero en ningún se incrementaron elementos nocivos como el litio, el rubidio, el estroncio y el talio por encima de los límites de toxicidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS: <http://www.who.int/es/>). Tampoco superaron en ningún caso, la concentración de metales pesados (As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb y Zn) establecidos para alimentación según la AAFCO (*Association of American Feed Control*) y el Real Decreto 465/2003, de 25 de Abril, que regula las sustancias indeseables en los productos destinados a la alimentación animal y los niveles máximos tolerados de sustancias indeseables en aquellos, a fin de proteger la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente.

Por tanto, la cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificada como *Rhizobium zea*, podría ser una excelente candidata para ser utilizada en la formulación de biofertilizantes de diferentes cultivos hortícolas como la rúcula, la albahaca, los canónigos y los berros, no sólo por su efectos promotores en dichas plantas, sino también por la seguridad que ofrecen las bacterias de dicho género y por contribuir a su vez a una agricultura tanto económica como medioambientalmente sostenible.

# **DISCUSIÓN GENERAL**



En la actualidad, la población mundial está en aumento (Soby 2013), por lo que surge la necesidad de incrementar también la producción de alimentos sin afectar por ello al medio ambiente (Sayer and Cassman 2013). Con el fin de aumentar la productividad agrícola, se comenzaron a utilizar los fertilizantes químicos, pero su uso indiscriminado ha provocado problemas en el medio ambiente y en la salud pública (Cowling et al. 2001; Erisman et al. 2011).

Por estos motivos, actualmente se buscan alternativas como los biofertilizantes basados en microorganismos beneficiosos, ya que a través de diferentes mecanismos, son capaces de promover el crecimiento vegetal, como las denominadas PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) (García-Fraile et al. 2015). Dentro de estas bacterias se encuentran aquellas que son capaces de habitar en el interior de los tejidos vegetales de sus hospedadores sin causar daños; éstas son las denominadas PGPBE (*Plant Growth Promoting Bacterial Endophytes*). Las combinaciones de una o varias de estas cepas bacterianas se formulan en productos y se aplican a los campos como biofertilizantes, aumentando el rendimiento de los cultivos por la disponibilidad y absorción de nutrientes minerales para las plantas, reduciendo o eliminando en algunos casos la dependencia total de los fertilizantes químicos (García-Fraile et al. 2017).

Estos biofertilizantes basados en bacterias beneficiosas se podrían aplicar a cultivos importantes que requieren grandes cantidades de fertilizantes químicos, como es el caso del cultivo del maíz. En este trabajo, con el fin de estudiar la posibilidad de incrementar la producción del maíz mediante el uso de bacterias endófitas, analizamos en primer lugar la abundancia y composición de las poblaciones de dichas bacterias endófitas de este cultivo de elevado valor agro-económico. Para ello, utilizamos un abordaje basado en el aislamiento de bacterias endófitas cultivables del interior de raíz y tallo de plantas de maíz y posteriormente las caracterizamos en base a diversas características fisiológicas y metabólicas. Se aislaron un total de 68 bacterias endófitas que mostraron tener una gran adaptabilidad genética y metabólica a diferentes factores ambientales probados. Esta gran adaptación de dichas cepas al medio podría conferirle una ventaja selectiva frente a otros competidores que se encuentren en la rizosfera, ya que la microbiota relativa a un hospedador para sobrevivir tiene que adaptarse a diversos factores ambientales como la temperatura, la radiación UV, la disponibilidad de agua y la biogeografía en la que se encuentre el hospedador (Müller et al. 2016). Además, los aislados mostraron una gran variabilidad en cuanto a las respuestas producidas cuando son expuestas a diferentes antibióticos y diferentes concentraciones de las mismas. Por tanto, podemos suponer que existe una alta diversidad infraespecífica que pueden adaptarse a diversos tipos de ambientes. Para verificar esta hipótesis, recurrimos a realizar los perfiles RAPD, que nos mostraron una alta diversidad de cepas aisladas en el interior del maíz, no pudiendo agrupar las cepas a niveles taxonómicos, con lo cual realizamos la secuenciación y análisis del gen ribosómico 16S de todos los aislados, revelándose que en la raíz existía una gran cantidad y diversidad de especies, mayor con respecto al tallo. Estos datos son consistentes con otros estudios realizados previamente en maíz (Pereira and Castro 2014; Rodríguez-Blanco et al. 2015), en caña de azúcar (Pariona-Llanos and Ferrara 2010), en *Solanum nigrum* (Luo et al. 2011) y en *Thlaspi goesingense* (Idris et al. 2004), entre otros.

Esta diferencia se puede deber a que la población de microorganismos es mayor en la rizosfera de la plantas hospedadora que en el interior de estas, ya que los microorganismos se sienten atraídos por los exudados radiculares que proporcionan un ambiente rico en carbono (Chen et al. 2003). Por otro lado, los endófitos son capaces de persistir más tiempo en las

raíces que en los órganos aéreos de las plantas (Junior et al. 2000) y además, la migración de los microorganismos ocurre lentamente de las raíces a los tallos y hojas (Liu et al. 2006). Además, pudimos observar que cuatro géneros fueron identificados en común en las raíces y en los tallos (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* y *Pantoea*), lo cual indica que existen microorganismos que poseen una distribución ubicua, pudiendo ser excelentes colonizadores de los tejidos de las plantas de maíz por distintas vías.

Las cepas aisladas en las raíces y en los tallos pertenecen a 22 géneros y 45 especies diferentes, incluidos todos ellos en tres phyla diferentes (Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes). Cabe destacar que encontramos varios representantes de géneros que no han sido descritos anteriormente como endófitos de maíz, hasta donde llega nuestro conocimiento. Además, algunas de las cepas secuenciadas mostraban valores de similitud bajos con respecto a las cepas tipo por lo que podrían ser especies nuevas, lo que nos indica que el maíz es todavía un interesante nicho por explorar. En este sentido, una de las cepas de *Rhizobium*, que presentaba baja similitud respecto a las de la base de datos, fue descrita como una nueva especie de nombre *Rhizobium zae* CRZM18R<sup>T</sup>, en base a sus características genotípicas, quimiotaxonómicas y fenotípicas, siendo la primera especie del género *Rhizobium* aislada a partir de tejidos radiculares de plantas de maíz (Celador-Lera et al. 2017).

Debida a la gran diversidad encontrada en este estudio, decidimos evaluar mediante pruebas realizadas *in vitro*, si poseían alguna característica para promover el crecimiento vegetal o proteger a las plantas frente a posibles fitopatógenos, ya que una adecuada caracterización de las PGPB de cada una de las cepas, facilitará la posterior elección de un bioinoculante óptimo para los cultivos deseados. Estos mecanismos pueden ser directos como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de minerales como el fosfato o la producción de reguladores del crecimiento, entre otros (García-Fraile et al. 2015), o indirectos tales como la síntesis de enzimas extracelulares (Martínez-Viveros et al. 2010), la estimulación del desarrollo de micorrizas, la exclusión competitiva de patógenos y/o la eliminación de sustancias fitotóxicas (Bashan and De-Bashan 2010).

Por tanto, se evaluaron en primer lugar, los mecanismos directos producidos entre nuestros aislados. Los resultados indicaron que todos los aislados poseían al menos uno de los mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal estudiados, siendo la biosíntesis de auxinas como lo es el ácido indolacético (AIA), el mecanismo más extendido entre los aislados de nuestro estudio. Sin embargo, la solubilización de fosfato y la fijación de nitrógeno resultaron ser los menos abundantes entre los aislados. Este resultado puede ser debido a varios factores, como por ejemplo la selección del medio en el que se realizaron los *screenings* para esos mecanismos PGPB no fue todo lo amplio que pudiera ser, o que en el suelo de provinieron las muestras había una concentración de N y P asimilable que hizo que no fuera necesario que las comunidades bacterianas expresaran esta característica, entre otras posibilidades que tendrán que ser determinadas en futuros estudios. En el caso de los sideróforos, el porcentaje de aislados que producían estos compuestos fue superior a la mitad, por lo que podemos decir que estas cepas captan mejor el hierro y mejorarán su competitividad frente a otros microorganismos (Ali and Vidhale 2016). Otro mecanismo indirecto evaluado fue la capacidad de producir enzimas hidrolíticas, en este caso celulasas, resultando en que la mitad de los aislados eran capaces de producirla, contribuyendo a la

hipótesis de que estas cepas pueden ser excelentes colonizadoras y competidoras para alcanzar nichos en el interior de las plantas (Menéndez et al. 2015).

Otro mecanismo indirecto llevado a cabo en este estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de la cepa CRZM149R identificada como *Streptomyces griseoaurantiacus*, ya que pertenece a un género descrito en numerosas ocasiones como un excelente productor de antibióticos (Valan Arasu et al. 2009; Duraipandiyar et al. 2010; Yekkour et al. 2012). Esta cepa es capaz de inhibir el crecimiento de una amplia gama de hongos fitopatógenos y producía un efecto inhibitorio frente a patógenos de maíz (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium graminearum*) en condiciones de invernadero, estimulando su desarrollo vegetativo. Además, se realizó un ensayo en el que se adicionaban dos cepas de *Rhizobium*, CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R, identificadas como *R. zea* y *R. leucaenae*, las cuales habían presentado buenos resultados en las pruebas de PGPB, observándose un efecto aditivo en las mejoras producidas por la cepa CRZM149R en cuestión de incremento en el desarrollo vegetativo y enriquecimiento del estado nutricional de dichas plantas de maíz en condiciones de invernadero en ambos casos. El efecto inhibitorio también puede ser debido a que estas cepas, las tres, no solo CRZM149R, eran productoras de sideróforos, cualidad importante ya que mediante la producción de sideróforos se priva a los hongos patógenos del acceso al hierro del suelo (Loper and Henkels 1999).

Por tanto, estos resultados podrían suponer una reducción de las pérdidas económicas causadas por las enfermedades que producen dichos hongos fitopatógenos que tanto afectan al sector agrícola.

Una vez evaluadas las características PGPB de los aislados, quisimos comprobar si disponen también de características fenotípicas asociadas a la colonización, como son la capacidad para sintetizar la celulosa y la capacidad para formar biofilms.

Puesto que las microfibrillas de celulosa son uno de los polisacáridos bacterianos (Davey and O'toole 2000) implicados en la adhesión de la bacteria a los pelos radicales manteniéndolas en la superficie radicular (Dazzo et al. 1984; Smit et al. 1987; Mateos et al. 1995), realizamos una prueba de detección de celulosa por parte de los aislados, donde pudimos observar que una gran mayoría eran capaces de producir este polisacárido, por lo que podrían tener una ventaja para iniciar la colonización de la planta frente a otros microorganismos que no dispongan de esta capacidad. La celulosa está descrita como un polisacárido importante en la formación y maduración de los biofilms producidos por representantes del género *Rhizobium* (Robledo et al., 2012)

Por otra parte, la producción de estos biofilms juegan un papel importante en la colonización, ya que pueden proteger a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, incrementando la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilitando el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y posibilitando la transferencia de material genético (Ramey et al. 2004). Esta prueba la realizamos con todas las cepas pertenecientes al género *Rhizobium* y la cepa de *Streptomyces* CRZM149R, utilizada en el capítulo anterior, obteniendo que todas las cepas disponían de la capacidad para producir biofilms *in vitro* presentando diferentes tendencias de crecimiento, que pueden corresponderse con el comportamiento que pueden tener estas cepas cuando se inoculan *in planta*.

Después determinamos la capacidad para promover el crecimiento radicular de las distintas cepas de *Rhizobium* (CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R, CRZM87R, CRZM91R y CRZM92R) y de

*Streptomyces* (CRZM149R), además de las respectivas coinoculaciones de las cepas de *Rhizobium* junto con la cepa de *Streptomyces*. Todos los tratamientos incrementaron tanto el número de raíces adventicias como la longitud de las raíces, siendo estos resultados de gran relevancia ya que este incremento está relacionado también con la mejora de la planta para soportar mejor las fluctuaciones ambientales, pues la raíz llega a capas más profundas del suelo y es menos sensible a las situaciones de estrés hídrico o nutricional (Egorshina and Khairullin 2012).

Estos incrementos pueden venir dados por una producción de AIA por parte de las bacterias inoculadas, ya que las auxinas promueven el crecimiento de las raíces; sin embargo, una alta concentración de dicha auxina podría producir un retardo en el crecimiento de las raíces (Facella et al. 2012; Taiz et al. 2015). En este trabajo, pudimos comprobar que todas las cepas utilizadas para la inoculación de las semillas de maíz producían en mayor o en menor medida ácido indol acético, pero los valores más altos se obtuvieron con las cepas de *Rhizobium*, CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R, tratamientos con los que se obtuvieron mejores resultados en el desarrollo radicular de las plántulas de maíz, por lo que esta producción no llega a ser perjudicial ni reduce el número de raíces secundarias, ni disminuye la longitud radicular. Además, debido al aumento de la superficie radicular aumentarán los compuestos químicos exudados por las plantas y en consecuencia, la colonización de la planta por parte de los microorganismos beneficiosos puede ser más activa. Mediante el marcaje de las cepas seleccionadas se comprobó que existía una efectiva interacción de las raíces de maíz, observando un incremento de la colonización superficial con el paso del tiempo tanto de las cepas de *Rhizobium* como en la de *Streptomyces*. Además, cabe la posibilidad de que las zonas de emergencia de las raíces secundarias sean una ruta de entrada a la planta. Este mecanismo de entrada ha sido observado en raíces de arroz al inocular *Azorhizobium caulinodans* (Senthilkumar et al. 2008) y *Azospirillum brasilense* (Jain and Gupta 2003), entre otros. Además, se pudo confirmar también la capacidad de los aislados para formar biofilms no solo *in vitro*, si no también *in planta*.

En líneas generales, las cepas de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R en inoculación simple fueron las cepas que mejor colonizaban e infectaban tanto la superficie radicular como el interior de la raíz, por lo que podemos suponer que una óptima colonización por parte de la bacteria podría suponer un mayor efecto de los mecanismos PGPB y mejores resultados en la promoción del crecimiento de las plantas de maíz. En nuestro caso, la cepa de *Streptomyces* puede tener otro tipo de acción, como por ejemplo, la descrita anteriormente como agente de biocontrol.

Cabe destacar que hasta la fecha y según nuestro conocimiento, es la primera vez que se estudia la colonización del tejido radicular en maíz por parte del género *Streptomyces* coinoculada con cepas de *Rhizobium*.

Debido a que tanto las cepas de *Rhizobium* (CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R) y la cepa de *Streptomyces* (CRZM149R) mostraron tener características PGPB en los ensayos evaluados *in vitro* y además interaccionar de manera positiva con las raíces de maíz, colonizándolas y promoviendo su desarrollo decidimos analizar el genomas de dichas cepas e identificar los genes implicados en los mecanismos promotores del crecimiento vegetal. En este sentido, diversos autores han analizado también el genoma de bacterias PGPB como *Pseudomonas* sp. (Liu et al. 2016), *Bacillus* sp. (Song et al. 2012; Wang et al. 2012), *Paenibacillus polymyxa* (Li et al. 2014) y *Klebsiella* sp. (Liu et al. 2016), entre otros.



La anotación de los genomas se realizó de manera automática mediante la herramienta RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*), la cual es efectiva pero no infalible, por lo que no podemos asumir que anote todos los genes que conforman los genomas analizados de manera correcta. Sin embargo, nos sirve para una búsqueda preliminar de genes implicados en los mecanismos de la promoción del crecimiento vegetal y en genes implicados en la colonización e infección endofíticas, ya que estos habían sido evaluados en capítulos anteriores mediante ensayos *in vitro*.

En relación a los genes que estarían implicados en procesos de promoción de crecimiento vegetal, los genomas revelan como las cepas de *Rhizobium* poseen genes que están envueltos en la producción de sideróforos mediante varias vías de incorporación de hierro, en tanto que la cepa de *Streptomyces* es posible que solo lo incorpore por una vía. En cuanto a solubilización de fosfato, las 3 cepas poseían una batería de genes para solubilizar dicho compuesto mediante vías similares. En los ensayos de solubilización de fosfato realizados *in vitro*, únicamente la cepa de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup> mostró capacidad para solubilizarlo, pero esto puede ser debido a que se utilizó como sustrato el fosfato tricálcico, una de las múltiples formas en las que se encuentra el fósforo inorgánico en el suelo.

Aunque únicamente la cepa de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup> mostró capacidad *in vitro*, para solubilizar fosfato. La existencia de varios grupos de genes implicados en la regulación y en la toma de este elemento esencial pone de manifiesto que en otras condiciones *in vitro*, las bacterias sean capaces de expresar estos genes y solubilizar otras formas de fosfato.

También encontramos en todas las cepas genes que codifican para la enzima triptófano sintasa y para la enzima Indol-3-glycerol fosfato sintasa (Schlee et al. 2013), ambas implicadas en la biosíntesis del triptófano. Además, todas ellas poseen genes codificantes para la enzima aldehído deshidrogenasa, que es la enzima que convierte el indol-3 acetaldehído en AIA, lo que nos indica que las cepas producen AIA por la vía del piruvato independientemente de que sean gram positivas o que sean gram negativas.

En cuanto a los genes implicados con la fijación de nitrógeno y la simbiosis, encontramos únicamente en las cepas de *Rhizobium*, genes *nifU* que codifican para una proteína necesaria en la fijación de nitrógeno (Zheng et al. 1993; Dean et al. 1993; Hwang et al. 1996) y los genes *ntr ntrB*, *ntrC*, *ntrX* y *ntrY*, que codifican para proteínas que están implicadas en la regulación del metabolismo del Nitrógeno (Pankievicz et al. 2016). Por otra parte, cabe la posibilidad de que algunos genes que no hemos encontrado, como los *fix* y los *nod*, estén en algún plásmido que no haya sido secuenciado o que el servidor utilizado no haya sido capaz de anotarlos automáticamente.

Además, y aunque no están testados *in vitro* en el presente trabajo, encontramos genes relacionados con la resistencia o tolerancia de las bacterias seleccionadas a estrés salino y con la solubilización de potasio, dos características que hacen aumentar la importancia de dichas bacterias PGPR y su potencial de ser aplicadas en diversos ambientes con estreses o falta de nutrientes.

Por tanto, mediante el análisis de los genomas, quedan demostradas las características PGPB que poseen las cepas CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R y CRZM149R, ya que se pudieron observar tanto *in vitro* (capítulo anterior) como *in silico*, ya que hemos podido identificar diversos genes potencialmente implicados en la promoción del crecimiento de las plantas.

## Discusión general

En cuanto a la búsqueda de genes implicados en la colonización e infección endofítica, todas las cepas mostraron genes que codifican enzimas que degradan la pared celular como las endoglucanasas, lo que se podría relacionar con lo observado en las pruebas *in vitro*, ya que todas habían sido positivas para el ensayo de producción de celulasas y además podrían utilizar esta capacidad para colonizar el interior de las plantas.

Del mismo modo, también es importante para la colonización la capacidad de las bacterias para biosintetizar la celulosa. Los genes implicados en dicha biosíntesis se encuentran localizados en el operón *celABC*. Diversos estudios en cepas de *Rhizobium leguminosarum* muestran que cepas defectivas en la producción de celulosa debido a mutaciones por inserción en los genes *celA* y *celB* son capaces de establecer simbiosis efectivas con su hospedador específico en condiciones de laboratorio por lo que en un principio, el defecto en la biosíntesis de celulosa no parece ser esencial para la infección y nodulación de las raíces de la planta hospedadora (Ausmees et al. 1999; Robledo et al. 2012). La desregulación del gen *celC* en *R. leguminosarum*, impide la formación de una correcta infección en *Trifolium repens* (Robledo et al., 2008; 2011b). Además, se ha demostrado en estudios recientes que la celulosa es esencial en la adhesión firme y en la formación de biofilms maduros (Robledo et al. 2012).

Solo encontramos dicho operón en la cepa CRZM52R, observando que los tres genes que conformaban el operón *celABC*, presentaban siempre una elevada similitud con los genes depositados correspondientes a cepas pertenecientes al género *Rhizobium* y *Agrobacterium*, siendo *celA* y *celC* los más conservados en las cepas de *Rhizobium* (Li and Alexander 1990; Robledo et al. 2011b). Las cepas de *Rhizobium* mostraron tener los genes implicados en la formación de los mismos, ya que disponían de genes relacionados con la biosíntesis de exopolisacáridos (*exo*) y también genes implicados en las exportaciones de los polisacáridos capsulares (*kps*). Sin embargo, el genoma de *Streptomyces* revela que la producción de exopolisacáridos y las propiedades de colonización e infección son diferentes a *Rhizobium*, existiendo genes codificantes para endoglucanasas y otros que codifican para proteínas envueltas en otros procesos de formación de biofilms, que pueden ser propios de gram positivas.

Finalmente, analizamos en la cepa de *Streptomyces* algunas de las posibles capacidades antimicrobianas que pudiese poseer en su genoma, puesto que en el capítulo II, pudimos observar que era capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. Destacamos que poseía genes que codifican para la oxitetraciclina, antibiótico de amplio espectro del grupo de las tetraciclinas; así como genes que codifican para enzimas como las  $\beta$ -lactamasas, causantes de las resistencias a los antibióticos betalactámicos, por lo que podrían ser susceptibles de investigación. Además, mediante la herramienta Antismash encontramos que la cepa CRZM149R, posee grupos de genes (*clusters*) que podrían sintetizar nuevas moléculas, descritas o no descritas, con capacidad para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Por último, la cepa CRZM149R presenta en su genoma genes que codifican para quitinasas, las cuales están implicadas en las repuestas degradativas de pared celular de hongos fitopatógenos (Faheem et al. 2015).

Por tanto, este análisis de los genomas nos ayuda a identificar y comprender mejor las actividades beneficiosas que estas bacterias PGPB realizan tanto en vida libre como en interacción con las plantas. En un futuro próximo, los genomas obtenidos en el presente trabajo, estarán disponibles en las bases de datos públicas y podrán servir como base de estudios de optimización de la producción enzimática o para la ingeniería genética implicando

los genes potencialmente valiosos, responsables de diferentes procesos biotecnológicos y otros ámbitos que no hemos contemplado en este trabajo, como el desarrollo de la tecnología de la fitorremediación mediante el uso de PGPR (Liu et al. 2016), el desarrollo de agentes de control biológico (Mukherjee 2011; Crovadore et al. 2016), o el desarrollo de biofertilizantes óptimos formulados con PGPR (Kwak et al. 2015; See-Too et al. 2016), entre otras aplicaciones.

Puesto que en el análisis *in silico* realizado con los genomas de las cepas seleccionadas, observamos la existencia en el genoma de la cepa de *Rhizobium leucaenae* CRZM52R del gen *celC*, localizado en el operón *celABC* que de acuerdo con la literatura está implicado en el proceso de infección primaria y secundaria de trébol blanco y en la biosíntesis de celulosa de *Rhizobium* (Robledo et al., 2008; Robledo et al. 2011b; Robledo et al., 2012), decidimos realizar un mutante heterólogo que sobreexpresara dicha celulasa en la cepa CRZM52R, denominándolo CRZM52RC2<sup>+</sup>, con el fin de observar su implicación en la colonización e infección de raíces de maíz.

En los ensayos *in vitro*, determinamos que la cepa que expresaba heterológamente la CelC2 de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 hidrolizaba celulosa no cristalina, producía celulosa y formaba biofilms de una forma comparable a las cepas de *Rhizobium* sobreexpresoras de CelC2 tanto homóloga como heterológamente referidas en trabajos anteriores del grupo de investigación (Robledo et al. 2011b; Robledo et al., 2012; T.D Rivera 2013; T.D Menéndez 2014).

Esta producción heteróloga de la celulasa CelC2 no alteraba de forma negativa el desarrollo radicular, ni el desarrollo de la parte aérea de las plantas de *Zea mays*. Las raíces inoculadas con la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup>, presentaban una colonización a lo largo de los pelos radiculares, una disminución de la colonización superficial y de la formación de biofilms comparadas con las cepas *wild type* y *empty vector*, que además en ambas cepas la colonización se acumulaba en la base de los pelos radiculares. Al igual que en nuestro ensayo, Robledo et al. (2012) observaron que la cepa ANU843C2<sup>+</sup> en raíces de *Trifolium repens* colonizaba los pelos radiculares a lo largo y/o en su base. Este fenotipo también fue observado en raíces de *Medicago truncatula* con la cepa 1021C2<sup>+</sup> de *Ensifer meliloti*, un género afín a *Rhizobium* (T.D Menéndez 2014). Pudimos comprobar que el comportamiento de la cepa CRZM52RC2<sup>+</sup> se ha visto influenciado por la sobreexpresión de dicha celulasa, además la capacidad para formar biofilms *in planta* ha disminuido, lo que concuerda con otros estudios (T.D. Robledo 2010; T.D. Rivera 2013; T.D Menéndez 2014).

Mediante microscopía confocal, determinamos como tanto la cepa CRZM52R como su derivado productor de CelC2 colonizaban el interior de los tejidos radiculares de forma inter e intracelular. Esto se corroboraba con las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica, donde se observaron invaginaciones desde el espacio periplásmico hasta el citoplasma envueltas en la membrana plasmática, en el las que se encontraban las bacterias en el interior. En el caso del tratamiento CRZM52RC2<sup>+</sup>, encontramos también unas roturas en las células vegetales, posiblemente ocasionadas por la acción de la celulasa, pero sin llegar a desorganizar las estructuras internas de la raíz, lo que no era suficiente para desencadenar ningún efecto negativo en el desarrollo vegetativo de este cultivo. Estas estructuras se asemejan a los simbiosomas que se forman en los nódulos de las leguminosas para fijar nitrógeno y a las estructuras que forman las bacterias del género *Frankia* en simbiosis con plantas leñosas, tras la infección llevada a cabo por el simbionte (Cocking 2005). Una formación similar a la encontrada en nuestro estudio, fue observada por Christiansen-Weniger (1998), en raíces de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* C3, en la que las bacterias se

establecían entre las células corticales de la raíz empaquetadas densamente en los espacios intercelulares. Sin embargo, en nuestro estudio, las bacterias se encuentran cubiertas por la membrana plasmática sin estar en contacto con el citoplasma. Por otra parte y a diferencia de nuestro estudio, Christiansen-Weniger (1998) no encontraron bacterias dentro del sistema vascular central. También, Ladha and Reddy (2000), observaron unas estructuras originadas en las raíces laterales similares a los nódulos, cuando inocularon rizobios sobre raíces de arroz, pero estos no eran comparables con los que se dan en las leguminosas, y a diferencia de nuestro ensayo no observaron colonización intracelular.

En este punto, con el conocimiento generado en los capítulos anteriores, decidimos aplicar las cepas CRZM18R<sup>T</sup>, CRZM52R y CRZM149R en diferentes cultivos y condiciones con el fin de determinar si son susceptibles de entrar a formar parte en formulaciones para biofertilización de cultivos de alto valor agro-económico.

Dichas cepas interaccionaban efectivamente en condiciones *in vitro* en plántulas de maíz. En condiciones controladas en cámara de cultivo, los mejores resultados fueron obtenidos con la inoculación simple de la cepa CRZM18R<sup>T</sup>, ya que sus resultados fueron mayores incluso a los resultados obtenidos en el control positivo con aporte de nitrógeno, y con la combinación CRZM18R<sup>T</sup>+CRZM149R, en la que los resultados obtenidos en los pesos de la parte aérea y la longitud de las raíces, fueron estadísticamente superiores al control sin inocular suplementado con nitrógeno. En los ensayos de microcosmos observamos que a diferencia del ensayo anterior los mejores resultados se obtuvieron con las coinoculaciones CRZM18R<sup>T</sup>+149R y CRZM52R+149R.

Diversos autores han estudiado también el efecto de bacterias PGPB en plantas de maíz en condiciones de invernadero, obteniendo incrementos tanto en las partes aéreas como en las raíces y el contenido en clorofila (Wu et al. 2005; Mehnaz and Lazarovits 2006; Arruda et al. 2013; Kuan et al. 2016), relacionando dichos incrementos con la producción de AIA por parte de las bacterias, ya que esta hormona está implicada en la promoción del desarrollo radicular pudiendo aumentar así la absorción de nutrientes (Khalid et al. 2004). En este sentido, a lo largo de este trabajo hemos podido comprobar que nuestras cepas de estudio disponían de la capacidad para producir ácido indol acético *in vitro* y también disponían de los genes implicados en la ruta del indol-3 piruvato, por lo que podríamos relacionarlos con los incrementos producidos en las plantas de maíz. Sin embargo, no se han podido comparar nuestros resultados en el caso de las inoculaciones de *Streptomyces* en maíz con los de otros estudios, ya que hasta la fecha y bajo nuestro conocimiento, no se han encontrado ensayos con dicho género.

Finalmente, realizamos un ensayo de campo sólo con las cepas de *Rhizobium* puesto que la legislación vigente no incluye de momento el género *Streptomyces* como un inoculante apto para la biofertilización. Dicho ensayo resultó en que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> inoculada sobre el suelo fertilizado aumentaba significativamente la productividad del cultivo. Globalmente, las inoculaciones con *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup> y CRZM52R dan lugar a un incremento total del cultivo de maíz del 36% y del 29% respectivamente en los suelos fertilizados, mientras que fue de un 48% y un 38%, respectivamente en los suelos sin fertilizar. Por tanto, dichos resultados indican que los mayores incrementos en el rendimiento del maíz, se produjeron con las inoculaciones de *Rhizobium* sobre suelo sin fertilizar. El hecho de que los tratamientos obtuviesen mejores resultados en los suelos sin fertilizar en comparación con el fertilizado, también lo observó Viuel et al. (2014) al inocular plantas de maíz con una cepa de *Pseudomonas*.

Sin embargo, aunque los incrementos en los tratamientos inoculados con las cepas de *Rhizobium* es mayor en los suelos sin fertilizar, el rendimiento (Kg/Ha) del maíz, es mayor en el caso del suelo fertilizado suplementado con las inoculaciones de *Rhizobium*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Mehnaz et al. (2010) en un ensayo de maíz en el que obtuvieron más toneladas por hectáreas en un suelo fertilizado al 100% e inoculado con bacterias PGPR, que en un suelo fertilizado al 50% de ese fertilizante y también inoculado.

Por tanto, económicamente para el agricultor sería más interesante no fertilizar o disminuir la fertilización e inocular con las cepas de *Rhizobium*, ya que en términos de producción la diferencia no es elevada. Además, la reducción de los fertilizantes nitrogenados sería más respetuoso con el medioambiente y el deterioro del suelo cultivable sería menor, además del hecho de que al reducir la adición de fertilizantes nitrogenados, reduce el gasto económico que supone su adquisición.

Al finalizar este ensayo de campo, se realizó un análisis del estado nutricional del suelo fertilizado y sin fertilizar. Pudimos observar que para un adecuado ratio de C/N en el suelo fertilizado, habría que disminuir la cantidad de nitrógeno liberada al suelo. Por otro lado, el suelo fertilizado contenía una menor cantidad de elementos nutricionales disponibles para la planta. Esto podría estar relacionado con la sobreexplotación, eliminación de la cobertura vegetal y el exceso de laboreo entre otros (Centen and González 2016). Aun así, durante el desarrollo del ensayo de campo, las plantas de maíz presentaron un buen desarrollo sin ningún síntoma aparente de enfermedad, por lo que se supone que el suelo utilizado es apto para la realización de las actividades agrícolas.

También se comprobó el estado nutricional de los granos de maíz y no se observó ninguna alteración relevante de los granos obtenidos de las plantas inoculados en comparación con los granos procedentes de las plantas sin inocular, no superando en ningún caso la concentración de los metales recomendados para la alimentación regulados por la AAFCO (*Association of American Feed Control*) y el Real Decreto 465/2003 de 25 de Abril, que regula las sustancias indeseables para el consumo humano y animal.

Por tanto, finalmente queda patente el beneficioso efecto producido por las cepas de *Rhizobium* en el cultivo de maíz, constituyendo una herramienta importante para la posible sustitución de fertilizantes nitrogenados por la inoculación de dichas bacterias, garantizando a su vez la producción sostenible de cereales.

Estos excelentes resultados en diversas condiciones en el cultivo de donde provenían los aislados, nos hicieron pensar en la posibilidad de que alguna de estas cepas podría ejercer efectos beneficiosos en cultivos de alto valor nutricional. Debido a que la preocupación actual sobre la calidad de los alimentos, no solo concierne a los cereales, la búsqueda de alternativas para sustituir los agroquímicos por productos biológicos se deben de estudiar en diversos tipos de cultivos. Por este motivo, quisimos evaluar el efecto promotor de la nueva especie de *Rhizobium*, *R. zea* CRZM18R<sup>T</sup>, en cultivos de hoja verde empleados comúnmente en ensaladas, como son la rúcula, la albahaca, los canónigos y los berros. Además, el uso del género *Rhizobium* no presenta peligro para la salud humana, siendo susceptibles de ser utilizadas como biofertilizantes en vegetales comestibles en crudo (García-Fraile et al. 2012b).

La cepa CRZM18R<sup>T</sup> interaccionaba positivamente con estos cultivos colonizando superficialmente las raíces de todas las plantas hortícolas seleccionadas, así como las superficies y las puntas de los pelos radicales. En las raíces de rúcula observamos una mayor

colonización sobre la superficie y un gran biofilm a lo largo de la superficie radicular. Este comportamiento había sido descrito en otros estudios en los que también inocularon cepas de *Rhizobium* (Chabot et al. 1996; Banchio et al. 2008; García-Fraile et al. 2012b; Flores-Félix et al. 2013; Silva et al. 2014; Jiménez-Gómez et al. 2016). Este hecho podría estar directamente relacionado con la capacidad de esta cepa para formar biofilms *in vitro* y con los genes encontrados en su genoma relacionados con la biosíntesis de exopolisacáridos y la exportación de los mismos.

La cepa en cuestión también promovía el desarrollo de plántula de estos cultivos, lo que podría estar relacionado con la capacidad de la cepa CRZM18R<sup>T</sup> para producir AIA. Estudios similares también relacionan el incremento del desarrollo radicular con la producción del AIA por parte de las cepas inoculadas (Dell'Amico et al. 2008; Duca et al. 2014; de Souza et al. 2016). Por tanto, el incremento radicular implicaría una mayor superficie radicular por lo que podrían proporcionar una mejora en la absorción de los nutrientes y como consecuencia se mejoraría el desarrollo de las plantas.

Para averiguar si estos incrementos se traducen posteriormente en un incremento de la producción de los cultivos hortícolas seleccionados realizamos un ensayo de invernadero en el que todos los parámetros evaluados eran mayores en las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium* que en las plantas control. En el caso de las plantas de rúcula y de berros, se obtuvieron incrementos significativos en la parte aérea medida en fresco con aumentos del 26,7% y del 9%, respectivamente. Estos datos son de gran importancia en dichos cultivos ya que es la parte de la planta que se consume. En el cultivo de rúcula todos los parámetros evaluados fueron estadísticamente significativos en el caso de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium* CRZM18R<sup>T</sup>. Por otro lado, todos los cultivos inoculados presentaban un incremento significativo en la concentración de clorofila en comparación con las plantas control, esto se traduce en un incremento en la coloración verdosa de las hojas de las plantas, característica apreciada de las hojas comestibles de las hortalizas. Además, este aumento de clorofila, puede ser el resultado de una mejora en la absorción de nutrientes (Jiménez-Gómez et al 2016).

Este efecto ha sido observado también en tomate, lechuga y zanahorias inoculadas el efecto PGPR con otras cepas de *Rhizobium* (García-Fraile et al. 2012a; Flores-Félix et al. 2013). Al igual que en los granos de maíz, en este ensayo pudimos comprobar también que no se incrementó la concentración de ningún elemento nocivo para la salud humana.

Todo ello indica que la cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificada como *Rhizobium zea*, es una excelente candidata para ser utilizada en la formulación de biofertilizantes tanto en cultivos como el maíz como en los cultivos hortícolas de rúcula, albahaca, canónigos y berros, puesto que además de haber comprobado su efectividad en el desarrollo de dichos cultivos es un género totalmente seguro para la salud humana y animal. Debido a que esta cepa era capaz de incrementar tanto la productividad del cultivo del maíz y como de diversos cultivos hortícolas, podría ser una buena candidata para ser utilizada como biofertilizante multifuncional y por tanto ser utilizada en una amplia variedad de cultivos.

En líneas generales, la alta diversidad en las comunidades de bacterias endófitas cultivables asociadas al tallo y raíz de plantas sanas de maíz conlleva también una alta probabilidad en encontrar aislados con propiedades que están implicadas en la mejora y promoción del crecimiento vegetal de diversos cultivos, al igual que en una interacción efectiva con las raíces de dichos cultivos. Entre esa diversidad, uno de los géneros más

versátiles y ampliamente estudiado es el género *Rhizobium*, que nos ofrece excelentes resultados en su interacción con plantas de maíz y cultivos hortícolas. Además, la cepa del género *Streptomyces*, perteneciente a las actinobacterias, complementa este estudio debido a su potencial como agente de biocontrol. Por otra parte, la secuenciación y anotación de los genomas aporta gran información sobre los genes implicados en los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal así como de aquellos genes implicados en la colonización. Por otro lado, abren camino a nuevos estudios genómicos de diversa índole, además de ayudar a la comprensión de su evolución y biología.





# CONCLUSIONES



A continuación, se exponen las principales conclusiones extraídas de estas Tesis Doctoral:

1. La diversidad de microorganismos endófitos aislados de *Zea mays* cultivado en un único suelo, es más alta de la esperada, tanto a nivel infraespecífico como a niveles taxonómicos más altos, ya que hay un total de 25 géneros aislados, no habiendo sido descritos hasta ahora 6 de ellos como endófitos en dicha planta y habiéndose aislado una nueva especie bacteriana no descrita hasta la fecha. Los géneros son, *Agrococcus*, *Herbiconiux*, *Kitasatospora*, *Leifsonia*, *Massilia* y *Pseudoclavibacter* y la especie es *Rhizobium zea* sp. nov. por lo que esta planta se proyecta como una fuente todavía por explorar de bacterias endófitas.
2. La elevada heterogeneidad bacteriana encontrada en la raíz y el tallo del maíz, nos hacen suponer que existe una predilección de las especies de bacterias por determinados tejidos, siendo la raíz la que mayor número de especies acoge, debido probablemente a la atracción que sufren las bacterias por los exudados radicales.
3. Los resultados obtenidos en el estudio de la interacción entre las cepas de *Rhizobium* y *Streptomyces* con plantas de maíz ponen de manifiesto la necesidad de estudiar las diferentes interacciones y coinoculaciones entre diferentes microorganismos con una única planta, y así poder formular biofertilizantes eficientes para cada tipo de cultivo.
4. La capacidad de producción de sideróforos y sustancias antifúngicas por parte de la cepa *Streptomyces griseoaurantiacus* CRZM 149R, adicionada a la capacidad que tiene esta cepa para colonizar la superficie radicular del maíz e interactuar positivamente con ella, la hace susceptible de ser usada como potencial agente de biocontrol en el cultivo del maíz.
5. La secuenciación, anotación y análisis de los genomas de bacterias con potencial PGPB complementan y mejoran los indicios obtenidos mediante la realización de pruebas de detección de mecanismos *in vitro*, constituyendo un buen método de discriminación para encontrar cepas con un óptimo potencial como biofertilizantes.
6. Mediante la construcción de un mutante que sobreexpresa la celulasa CelC2 en la cepa de *Rhizobium leucaenae* CRZM52RC2<sup>+</sup>, se demuestra que disminuye la colonización superficial en las raíces de maíz debido a la disminución de biosíntesis de celulosa y a la formación de biofilms. Sin embargo, la infección en el interior de la raíz se ve incrementada posiblemente debida a la mayor acción de la celulasa, mejorando así la entrada de dicha cepa, lo que confirma el papel relevante de esta celulasa en los procesos de colonización e infección.

## Conclusiones

7. La cepa CRZM52R identificada como *Rhizobium leucaenae*, produce un incremento en el rendimiento y producción del cultivo de maíz, manteniendo el contenido nutricional del grano, por lo que es susceptible de ser utilizada como biofertilizante, pudiendo ofrecer una alternativa sostenible a los fertilizantes nitrogenados.
  
8. La cepa CRZM18R<sup>T</sup> identificada como *Rhizobium zae*, es capaz de colonizar e incrementar la productividad, no solo del cultivo del maíz, sino también de cultivos hortícolas como la rúcula, la albahaca, los canónigos y los berros, por lo que esta cepa es susceptible emplearse en la formulación de un biofertilizante multifuncional dirigido a múltiples cultivos.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abbamondi GR, Tommonaro G, Weyens N, et al (2016) Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1.
- Acciaresi HA, Tambussi EA, Antonietta M, et al (2014) Carbon assimilation, leaf area dynamics, and grain yield in contemporary earlier- and later-senescing maize hybrids. *Eur J Agron* 59:29–38.
- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58:921–929.
- Agger J, Viksø-Nielsen A, Meyer A (2010) Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 58(10), 6141-6148.
- Ahirwar NK, Gupta G, Singh V, et al (2015) Influence on growth and fruit yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants by inoculation with *Pseudomonas fluorescence* (SS5): Possible role of plant growth promotion. *IntJCurrMicrobiolAppSci* 4:720–730.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan M (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Ahmad I, Akhtar MJ, Zahir ZA, et al (2014) Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. *Environ Sci Pollut Res* 21:11054–11065.
- Ahmad M, Zahir Z, Khalid M, Nazli F (2013) Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant physiology and biochemistry*, 63, 170-176.
- Ahmed A, Hasnain S (2014) Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Pol. J. Microbiol*, 63(3), 261-266.
- Akinsanya M, Goh J, Lim S, Ting A (2015) Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. *Genomics data*, 6, 159-163.
- Al-Askar AA, Rashad YM, Hafez EE, et al (2015) Characterization of alkaline protease produced by *Streptomyces griseorubens* E44G and its possibility for controlling *Rhizoctonia* root rot disease of corn. *Biotechnol Biotechnol Equip* 29:457–462.
- Alexander D, Zuberer D (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1), 39-45
- Ali B, Sabri A, Hasnain S (2010) Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1379-1384.
- Ali S, Vidhale N (2016) Bacterial Siderophore and their Application : A review. In *J Curr Microbiol App Sci* 2:303–312.
- Almaliotis D, Therios I, Karatassiou M (1997) Effects of nitrogen fertilization on growth, leaf nutrient concentration and photosynthesis in three peach cultivars. *Acta Hort* 529–534.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich C (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of botany*, 97(5), 883-893.

## Bibliografía

- Alqasoumi S, Al-Sohaibani M, Al-Howiriny T, et al (2009) Rocket "*Eruca sativa*": A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World J Gastroenterol* 15:1958–1965.
- Althabegoiti MJ, Lozano L, Torres-Tejerizo G, et al (2012) Genome Sequence of *Rhizobium grahamii* CCGE502, a Broad-Host-Range Symbiont with Low Nodulation Competitiveness in *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol* 194:6651–6652.
- Álvarez A, Benimeli CS, Saez JM, et al (2015) Lindane removal using *Streptomyces* strains and maize plants: a biological system for reducing pesticides in soils. *Plant Soil* 395:401–413.
- Alves A, Correia A, Igual J, Trujillo M (2014) *Microbacterium endophyticum* sp. nov. and *Microbacterium halimionae* sp. nov., endophytes isolated from the salt-marsh plant *Halimione portulacoides* and emended description of the genus *Microbacterium*. *Systematic and applied microbiology*, 37(7), 474-479.
- Alves-Santos F, Ramos B (2002) A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*, 92(3), 237-244.
- Anaya-López J, González-Chavira M (2011) Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(3), 373-383.
- Andreote F, Araújo W de (2009) Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3396-3406.
- Ang J, Banerjee R, Madsen J (2010) Innovation, technological change and the British agricultural revolution.
- Angle J (1986) Pectic and proteolytic enzymes produced by fast-and slow-growing soybean rhizobia. *Soil biology and biochemistry*, 18(1), 115-116.
- Anton A, Weltrowski A, Haney CJ, et al (2004) Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:7499–7507.
- Araújo JM de, Silva AC da, Azevedo JL (2000) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Arch Biol Technol* 43:0–0.
- Arruda L, Beneduzi A, Martins A, et al (2013) Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied soil ecology*, 63, 15-22.
- Aung ZH, Takeo Y (2015) Enhanced plant growth and/or nitrogen fixation by leguminous and non-leguminous crops after single or dual inoculation of *Streptomyces griseoflavus* P4 with *Bradyrhizobium* strains. *African J Microbiol Res* 9:2337–2344.
- Ausmees N, Jonsson H, Hoglund S, et al (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* 145:1253–1262.
- Aziz R, Bartels D, Best A (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 75.
- Baeshen AA (2016) Use of *Pseudomonas aeruginosa* as Fertilizer in *Eruca sativa*. 5:301–312.



- Bais H, Park S, Weir T, Callaway R (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science*, 9(1), 26-32.
- Baldani J, Baldani V, Seldin L (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(1), 86-93.
- Baldani VD, Baldani J, Döbereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5-6), 485-491.
- Banchio E, Bogino PC, Zygadlo J, Giordano W (2008) Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochem Syst Ecol* 36:766–771.
- Banerjee A, Duflo E, Glennerster R, Kinnan C (2010) The miracle of microfinance? Evidence from a randomized evaluation (No. w18950). National Bureau of Economic Research.
- Bangera M, Thomashow L (1996) Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 9(2), 83-90.
- Baratta M, Dorman H, Deans S (1998) Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 235-244.
- Bashan Y, De-Bashan L (2010) Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy*, 108, 77-136.
- Bashan Y, Holguin G (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian journal of microbiology*, 50(8), 521-577.
- Bashan Y, de-Bashan L, Prabhu S, Hernandez J (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
- Bashir A, Klammer A, Robins W, Chin C (2012) A hybrid approach for the automated finishing of bacterial genomes. *Nature biotechnology*, 30(7), 701-707.
- Bastidas A (2000) Diagnóstico de fertilidad de suelos en pendientes inferiores a 25%. Boconó, Estado Trujillo. 5:229–246.
- Becker A, Fraysse N (2005) Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(9), 899-905.
- Becker A, Kleickmann A, Keller M, et al (1993) Identification and analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. *MGG Mol Gen Genet* 241:367–379.
- Belkum A van, Chatellier S, Girard V (2015) Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert review of proteomics*, 12(6), 595-605.

## Bibliografía

- Benimeli CS, Fuentes MS, Abate CM, Amoroso MJ (2008) Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *Int Biodeterior Biodegrad* 61:233–239.
- Benson D, Silvester W (1993) Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological reviews*, 57(2), 293-319.
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 215-229.
- Berg R, Tyler M, Novick N, Vasil V (1980) Biology of *Azospirillum*-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 215-229.
- Bergersen F (1961) The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Australian Journal of Biological Sciences*, 14(3), 349-360.
- Bernabeu P, Pistorio M, Torres-Tejerizo G (2015) Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, 191, 113-120
- Bevivino A, Dalmastri C, Tabacchioni S, Chiarini L (2000) Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biol Fertil Soils* 31:225–231.
- Bhattacharjee RB, Jourand P, Chaintreuil C, et al (2012) Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. *Biol Fertil Soils* 48:173–182.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012a) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327–1350.
- Bianco C, Imperlini E, Calogero R, et al (2006) Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Microbiology* 152:2421–2431.
- Biari A, Gholami A, Rahmani HA (2008) Growth Promotion and Enhanced Nutrient Uptake of Maize (*Zea mays* L.) by Application of Growth Promoting Rhizobacteria in Arid Region of Iran. *J. Biol. Sci.* 8:1015–1020.
- Bierman M, Logan R, O'brien K, et al (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116(1), 43-49.
- Biswas J, Ladha J, Dazzo F (2000) Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice.
- Black M, Moolhuijzen P, Chapman B, et al (2012) The genetics of symbiotic nitrogen fixation: Comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. *Genes (Basel)* 3:138–166.
- Boer M de, Bom P, Kindt F, Keurentjes J (2003) Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology*, 93(5), 626-632
- Bogino PC, Oliva M de las M, Sorroche FG, Giordano W (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int J Mol Sci* 14:15838–15859.

- Bona E, Cantamessa S, Massa N, Manassero P (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza*, 27(1), 1-11.
- Bonaterra G, Hildebrandt W, Bodens A (2005) Increased cyclooxygenase-2 expression in peripheral blood mononuclear cells of smokers and hyperlipidemic subjects. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(2), 235-242.
- Bottini R, Cassón F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(5), 497-503.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al (2009) Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1–12.
- Bown D (1995) *The Royal Horticultural Society encyclopedia of herbs & their uses*. Dorling Kindersley Limited.
- Bozokalfa K, Eşiyok D, Yağmur B (2011) Use of multivariate analysis in mineral accumulation of rocket (*Eruca sativa*) accessions. *Genetika* 43:437–448.
- Braun-Kiewnick A, Jacobsen B, Sands D (2000) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*, 90(4), 368-375.
- Brewer M, Larkin R (2005) Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection*, 24(11), 939-950.
- Brewin N (1991) Development of the legume root nodule. *Annual review of cell biology*, 7(1), 191-226.
- Brígido C, Glick BR, Oliveira S (2017) Survey of Plant Growth-Promoting Mechanisms in native portuguese chickpea *Mesorhizobium* Isolates. *Microb Ecol* 73:900–915.
- Brown ME, Chang MCY (2014) Exploring bacterial lignin degradation. *Curr Opin Chem Biol* 19:1–7.
- Brown NL, Stoyanov J V, Kidd SP, Hobman JL (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27:145–63.
- Brown SD, Utturkar SM, Klingeman DM, et al (2012) Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. *J Bacteriol* 194:5991–5993.
- Bukhsh E, Malik S, Ahmad S (2007) Estimation of nutritional value and trace elements content of *Carthamus oxyacantha*, *Eruca sativa* and *Plantago ovata*. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4), 1181.
- Burdman S, Dulguerova G, Okon Y, Jurkevitch E (2001) Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:555–561.
- Burland V, Plunkett G, Daniels D, Blattner F (1993) DNA sequence and analysis of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: organizational symmetry around the origin of replication. *Genomics*, 16(3), 551-561.

## Bibliografía

- Çakmakçı R, Turan M, Kıtır N, Güneş A (2017) The role of soil beneficial bacteria in wheat production: A Review. In *Wheat Improvement, Management and Utilization*. InTech.
- Callaham D, Torrey J (1981) The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1647-1664.
- Calvo P, Watts DB, Kloepper JW, Torbert HA (2016) Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(1), 56-70.
- Carpanetto D, Bianchini P (2011) Atlas histórico del mundo.
- Carter RA, Worsley PS, Sawers G, et al (2002) The *vbs* genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: their expression in other genera requires ECF  $\sigma$  factor Rpol. *Mol Microbiol* 44:1153–1166.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, et al (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol* 45:28–35.
- Celador-Lera L, Jiménez-Gómez A, Menéndez E, Rivas R (2017) Biofertilizers based on bacterial endophytes isolated from cereals: potential solution to enhance these crops. 1146–1147.
- Celador-Lera L, Menéndez E, Peix A, et al (2017) *Rhizobium zeae* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2306-2311.
- Centen J, González Á (2016) Diagnóstico de suelos en cultivos de café (*Coffea arabica* L.), maíz (*Zea mays* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), comunidad de Santa Julia, El Crucero, Managua. *La Calera*, 15(24), 26-30.
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum biovar. phaseoli*. *Plant Soil* 184:311–321.
- Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J (2000) Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5437-5447.
- Chalifour F, Benhamou N (1989) Indirect evidence for cellulase production by *Rhizobium* in pea root nodules during bacteroid differentiation: cytochemical aspects of cellulose breakdown in rhizobial. *Canadian journal of microbiology*, 35(9), 821-829.
- Chandra R, Bura R, Mabee W, et al (2007) Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? In *Biofuels* (pp. 67-93). Springer Berlin Heidelberg.
- Chanway C, Shishido M, Nairn J, Jungwirth S (2000) Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology and Management*, 133(1-2), 81-88.
- Chanway CP, Nelson LM, Holl FB (1988) Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. *Can J Microbiol* 34:925–929.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, et al (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34:171–198.

- Chelius M, Triplett E (2000) Diazotrophic endophytes associated with maize. Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. 779-791.
- Chen G, Zhu H, Zhang Y (2003) Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in microbiology*, 154(6), 393-398.
- Chen W, Sheng X, He L (2015) *Rhizobium yantingense* sp. nov., a mineral-weathering bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(2), 412-417
- Cheng HP, Walker GC (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180:5183–5191.
- Chi F, Shen S, Chen S, Jing Y (2004) Migration of *Azospirillum brasilense* Yu62 from root to stem and leaves inside rice and tobacco plants. *Acta botanica sinica-english edition*, 46(9), 1065-1070.
- Chi F, Shen S, Cheng H, Jing Y (2005) Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7271-7278.
- Chiang L, Ng L, Cheng P (2005) Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(10), 811-816.
- Chiej R (1984) *The Macdonald encyclopedia of medicinal plants*. Macdonald & Co (Publishers) Ltd
- Chin C, Alexander D, Marks P, Klammer A (2013) Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature methods*, 10(6), 563-569.
- Christiansen-Weniger C (1998) Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1:55–76.
- Cocking E (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and soil*, 252(1), 169-175.
- Cocking EC (2005) OBPC Symposium: Maize 2004 & Beyond—Intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 41:369–373.
- Cole J, Gieler B, Heisler D (2013) *Kallotenue papyrolyticum* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic and filamentous thermophile that represents a novel lineage (Kallotenuales ord. nov., Kallotenuaceae fam. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(12), 4675-4682.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
- Conn K, Lazarovits G, Nowak J (1997) A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(9), 801-808.

## Bibliografia

- Conway G, Barbie E (1988) After the Green Revolution: sustainable and equitable agricultural development. *Futures*, 20(6), 651-670.
- Coombs JT, Franco CMM (2003) Visualization of an Endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 4260-4262.
- Copetta A, Lingua G, Berta G (2006) Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza*, 16(7), 485-494.
- Cornelis P, Matthijs S (2007) *Pseudomonas* siderophores and their biological significance. In *Microbial siderophores* (pp. 193-203). Springer Berlin Heidelberg.
- Costa Pinto LSR, Azevedo JL, Pereira JO, et al (2000) Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytol* 147:609–615.
- Coutinho T, Venter S (2009) *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 325-335.
- Cowling E, Galloway J, Furiness C, et al (2001) Optimizing nitrogen management in food and energy production and environmental protection: summary statement from the Second International Nitrogen Conference. *ScientificWorldJournal* 1 Suppl 2:1–9.
- Crawford D (1978) Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(6), 1041-1045.
- Crovadore J, Calmin G, Chablais R (2016) Whole-genome sequence of *Pseudomonas graminis* strain UASWS1507, a potential biological control agent and biofertilizer isolated in Switzerland. *Genome announcements*, 4(5), e01096-16.
- Cruz A, Cazacu A, Allen C (2007) *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1989-1992.
- D'Antuono L, Elementi S, Neri R (2008) Glucosinolates in *Diplotaxis* and *Eruca* leaves: Diversity, taxonomic relations and applied aspects. *Phytochemistry*, 69(1), 187-199.
- Dastager S, Deepa C, Pandey A (2010) Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 987-992.
- Dave B, Dube H (2000) Chemical characterization of fungal siderophores.
- Davey M, O'toole G (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847-867.
- Dazzo F, Truchet G, Sherwood J (1984) Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Applied and environmental microbiology*, 48(6), 1140-1150.
- De Jong W, Wösten HAB, Dijkhuizen L, Claessen D (2009) Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloida fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* 73:1128–1140.
- De Meyer G, Höfte M (1997) Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. *Phytopathology* 87:588–593.

- de Souza EM, Bassani VL, Sperotto RA, Granada CE (2016) Inoculation of new rhizobial isolates improve nutrient uptake and growth of bean (*Phaseolus vulgaris*) and arugula (*Eruca sativa*). *J Sci Food Agric* 3446–3453.
- de Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol* 38:401–419.
- Dean DR, Bolin JT, Zheng L (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *J Bacteriol* 175:6737–44.
- Delgado C (2003) Rising consumption of meat and milk in developing countries has created a new food revolution. *The Journal of nutrition*, 133(11), 3907S-3910S.
- Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V (2008) Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 74-84.
- Deng J, Gage D, Shor L (2014) Variations in moisture retention of contact-printed soil bacteria surface colonies using confocal microscopy. In *Bioengineering Conference (NEBEC), 2014 40th Annual Northeast* (pp. 1-2). IEEE.
- Dertz E, Xu J, Stintzi A, Raymond KN (2005) Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 22-23.
- Dhandayuthapani S, Via L, Thomas C (1995) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. *Molecular microbiology*, 17(5), 901-912.
- Diaz M, Esteban A, Fernández-Abalos JM, Santamaría RI (2005) The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 151:2583–2592.
- Díez-Méndez A, Menéndez E, Celador-Lera L, Rivas R (2016) Increase of saffron production using a bio-inoculant. *N Biotechnol* 33:422.
- Diez-Mendez A, Menéndez E, García-Fraile P, et al (2015) *Rhizobium cellulosilyticum* as a co-inoculant enhances *Phaseolus vulgaris* grain yield under greenhouse conditions. *Symbiosis* 67:135–141.
- Dobereiner J (1961) Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Plant and Soil*, 15(3), 211-216.
- Doebley J (1990) Molecular evidence and the evolution of maize. *Economic Botany*, 44, 6-27.
- Doi RH, Kosugi A (2004) Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat Rev Microbiol* 2:541–551.
- Doty SL, Doshier MR, Singleton GL, et al (2005) Identification of an endophytic *Rhizobium* in stems of *Populus*. *Symbiosis* 39:27–35.
- Duan CJ, Feng JX (2010) Mining metagenomes for novel cellulase genes. *Biotechnol Lett* 32:1765–1775.

## Bibliografía

- Duan, J, Jiang, W, Cheng, Z, et al (2013). The complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. PloS one, 8(3), e58640.
- Dubey S, Meena R, Sao S, Patel J (2014) Isolation and characterization of cellulose degrading bacteria from biogas slurry and their RAPD profiling. Current Research in Microbiology and Biotechnology, 2(4), 416-421.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, et al (2014) Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. Antonie Van Leeuwenhoek 106:85–125.
- Duke J (1992) Handbook of phytochemical constituent grass, herbs and other economic plants. CRC press
- Duraipandiyan V, Sasi AH, Islam VIH, et al (2010) Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. J Mycol Médicale 20:15–20.
- Dursun A, Ekinci M, Donmez M (2010) Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). Pak J Bot, 42(5), 3349-3356.
- Eastman AW, Heinrichs DE, Yuan Z-C (2014) Comparative and genetic analysis of the four sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. BMC Genomics 15:1–22.
- Egamberdiyeva D (2007) The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. Applied Soil Ecology, 36(2), 184-189.
- Egorshina A, Khairullin R (2012) Involvement of phytohormones in the development of interaction between wheat seedlings and endophytic *Bacillus subtilis* strain 11BM. Russian journal of plant physiology, 59(1), 134-140.
- Eid J, Fehr A, Gray J, et al (2009) Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science, 323(5910), 133-138.
- El-Azeem S, Mehana T, Shabayek A (2007) Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. In African Crop Science Conference Proceedings (Vol. 8, pp. 1517-1525).
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Applied and environmental microbiology, 67(11), 5285-5293.
- Elos MM, Pérez GR, Ortíz FC, et al (2016) Chlorophyll Concentration and Morphological Diversity in Corn Lines at Different Vegetative Stages. Am J Plant Sci 7:1067–1076.
- Erismann JW, van Grinsven H, Grizzetti B, et al (2011) The European nitrogen problem in a global perspective. The European nitrogen problem in a global perspective.
- Esitken A, Yildiz HE, Ercisli S, et al (2010) Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. Sci Hortic (Amsterdam) 124:62–66.



- Evangelista-Martínez Z (2014) Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 1639-1647.
- Evans W (2009) Trease and Evans' pharmacognosy. E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Ezra D (2004) Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* 150:785–793.
- Facella P, Daddiego L, Giuliano G, Perrotta G (2012) Gibberellin and auxin influence the diurnal transcription pattern of photoreceptor genes via CRY1a in tomato. *PloS one*, 7(1), e30121.
- Faheem M, Raza W, Zhong W, et al (2015) Evaluation of the biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol Control* 81:101–110.
- FAOSTAT 2004 FAOSTAT, 2004. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Accessed 20 Apr 2017
- Fauvart M, Sanchez-Rodriguez A, Beullens S, et al (2011) Genome Sequence of *Rhizobium etli* CNPAF512, a Nitrogen-Fixing Symbiont Isolated from Bean Root Nodules in Brazil. *J Bacteriol* 193:3158–3159.
- Fei S, Tong-bin Z, Ming-jiao T (2016) Effects of interaction between vermicompost and probiotics on soil property, yield and quality of tomato. *Yingyong Shengtai Xuebao*, 27(2).
- Feng Y, Shen D, Song W (2006) Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of applied microbiology*, 100(5), 938-945.
- Ferguson AD, Coulton JW, Diederichs K, et al (2006) The ferric hydroxamate uptake receptor fhua and related TonB-dependent transporters in the outer membrane of gram-negative bacteria. In: *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Fernández Riverón F, López Hernandez J, Ponce Martínez L, et al (2003) Resistencia Bacteriana. *Rev Cuba Med Mil* 32:44–48.
- Ferreira AS, Pires RR, Rabelo PG, et al (2013) Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. *Appl Soil Ecol* 72:103–108.
- Fiedler H, Krastel P, Müller J (2001) Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species. *FEMS microbiology letters*, 196(2), 147-151.
- Fierer N, Bradford M, Jackson R (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.
- Figurski D, Helinski D (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1648-1652.
- Finan T, Hirsch A, Leigh J, Johansen E (1985) Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell*, 40(4), 869-877.

## Bibliografía

- Finnie C, Zorreguieta A, Hartley N (1998) Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. *Journal of bacteriology*, 180(7), 1691-1699.
- Flanagan J, Brodie E, Weng L (2007) Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*, 45(6), 1954-1962.
- Fleischmann R, Adams M, White O, et al (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* (80- ) 269:496–512.
- Flemming H, Wingender J (2010) The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol* 19:139–150.
- Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP, et al (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J Plant Nutr Soil Sci* 176:876–882.
- Flores-Félix J, Marcos-García M, Silva L (2015a) *Rhizobium* as plant probiotic for strawberry production under microcosm conditions. *Symbiosis*, 67(1-3), 25-32.
- Flores-Félix JD, Silva LR, Rivera LP, et al (2015b) Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: The case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. *PLoS One*. *PLoS one*, 10(4), e0122281.
- Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, et al (2011) Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Sci* 20:1479–1483.
- Frayse N, Couderc F, Poinot V (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *The FEBS Journal*, 270(7), 1365-1380.
- Friesen ML, Porter SS, Stark SC, et al (2011) Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:23–46.
- Fujii K, Satomi M, Fukui Y (2013) *Streptomyces abietis* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from soil of a pine forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(12), 4754-4759.
- Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM (2006) A feeling for the microorganism structure on a small scale. *Biofilms on plant roots*. *Bot J Linn Soc* 150:79–88.
- Gaiero J, McCall C, Thompson K (2013) Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American journal of botany*, 100(9), 1738-1750.
- Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B (2012) The ethylene pathway contributes to root hair elongation induced by the beneficial bacteria *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. *Plant science*, 190, 74-81.
- García-Fraile P, Rivas R, Willems A, et al (2007) *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:844–848.
- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, et al (2012) *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One*, 7(5), e38122.

- García-Fraile P, Menéndez E, Rivas R (2015) Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering* 2(3): 183-205.
- García-Fraile P, Menéndez E, Celador-Lera L, et al (2017) Bacterial Probiotics: A truly green revolution. In *Probiotics and Plant Health* (pp. 131-162). Springer Singapore.
- Garg, A. K., Kim, J. K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Do Choi, Y., Kochian, L. V., & Wu, R. J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15898-15903.
- Gebhard S, Ekanayaka N, Cook GM (2009) The low-affinity phosphate transporter PitA is dispensable for in vitro growth of *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiol* 9:254.
- Gebhard S, Busby J, Fritz G, Moreland N (2014) Crystal structure of PhnF, a GntR-family transcriptional regulator of phosphate transport in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 196(19), 3472-3481.
- Geetha SJ, Joshi SJ (2013) Engineering rhizobial bioinoculants: A strategy to improve iron nutrition. *Sci World J*.
- Geisseler D, Horwath W, Joergensen R (2010) Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2058-2067.
- Gerhadson B (2002) Biological substitute for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20, 338-343.
- Ghorbel S, Smirnov A, Chouayekh H (2006) Regulation of ppk expression and *in vivo* function of Ppk in *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of bacteriology*, 188(17), 6269-6276.
- Giraud E, Moulin L, Vallenet D, et al (2007) Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. *Science*, 316(5829), 1307-1312.
- Glaser P, Kunst F, Arnaud M, et al (1993) *Bacillus subtilis* genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325 to 333deg; *Mol Microbiol* 10:371–384.
- González V, Bustos P, Ramírez-Romero MA, et al (2003) The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome biology*, 4(6), R36.
- González V, Santamaría RI, Bustos P, et al (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3834–9.
- Goodman M, Galinat W (1988) The history and evolution of maize. *Critical reviews in plant sciences*, 7(3), 197-220.
- Goormachtig S, Capoen W, James EK, Holsters M (2004) Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6303–6308.
- Gordon S, Weber R (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192-195.
- Govindarajan M, Balandreau J, Kwon S, Weon H (2008) Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology*, 55(1), 21-37.

## Bibliografía

- Govindarajan M, Balandreau J, Muthukumarasamy R (2006) Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil*, 280(1), 239-252.
- Govindarajan M, Kwon S, Weon H (2007) Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(7), 997-1006.
- Graham P, Vance C (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.
- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem* 39:1968–1977.
- Gray E, Smith D (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412
- Grayer R, Kite G, Goldstone F, et al (1996) Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 43(5), 1033-1039.
- Gregory P (2008) *Plant roots: growth, activity and interactions with the soil*. John Wiley & Sons.
- Grimont F, Grimont P (2006) The genus *Serratia*. In *The prokaryotes* (pp. 219-244). Springer New York.
- Grossmann K (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest management science*, 66(2), 113-120.
- Grzegorzewski F, Rohn S, Kroh LW, et al (2010) Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chem* 122:1145–1152.
- Guerinot ML, Meidl EJ, Plessner O (1990) Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 172:3298–303.
- Guillén F, Martínez M, Gutiérrez A (2005) Biodegradation of lignocellulose: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8, 195-204.
- Gül A, Kidoglu F, Tüzel Y (2008) Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum*, L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(3), 422-429.
- Gupta A, Gopal M, Thomas G V., et al (2014) Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. *PLoS One*. *PLoS one*, 9(8), e104259..
- Gutiérrez-Zamora ML, Martínez-Romero E (2001) Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol* 91:117–126.
- Guzmán E, Romeu A, Garcia-Vallve S (2008) Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: A review. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 26(2), 88-98.

- Gyaneshwar P, James E, Mathan N (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 183(8), 2634-2645.
- Gyaneshwar P, James E, Reddy P (2002a) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist*, 154(1), 131-145.
- Gyaneshwar P, Kumar G, Parekh L (2002b) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities* (pp. 133-143). Springer Netherlands.
- Habibi R, Tarighi S, Behravan J, et al (2017) Whole-Genome Sequence of *Pseudomonas fluorescens* EK007-RG4, a Promising Biocontrol Agent against a Broad Range of Bacteria, Including the Fire Blight Bacterium *Erwinia amylovora*. *Genome Announc.*
- Halliday KJ, Martínez-García JF, Josse E-M (2009) Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001586.
- Hamblin J, Stefanova K, Angessa TT (2014) Variation in Chlorophyll Content per Unit Leaf Area in Spring Wheat and Implications for Selection in Segregating Material. *PLoS One* 9:e92529.
- Hammerschmidt R, Kuć J (1995) *Induced Resistance to Disease in Plants*. Springer Netherlands
- Han H, Lee K (2005) Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of eggplant. *Res J Agric Biol Sci*, 1(2), 176-180.
- Han H, Lee K (2006) Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant soil and Environment*, 52(3), 130.
- Hardoim P, Overbeek L Van, Berg G (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.
- Haselwandter K, Häninger G, Ganzera M, Haas H (2013) Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal Basidiomycota *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*. *Biometals*, 26(6), 969-979.
- Hashem M, Moharam A, Zaied A, Saleh F (2010) Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop protection*, 29(10), 1111-1117
- Hatamoto M, Kaneshige M (2014) *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(5), 1770-1774
- Hayat R, Ali S, Amara U, et al (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579–598.
- Hecht S, Carmella S, Kenney P, Low S (2004) Effects of cruciferous vegetable consumption on urinary metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in Singapore Chinese. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(6), 997-1004.
- Heermann, R. & Jung, K. The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 304, 97–106 (2010).

## Bibliografía

- Heichlinger A, Ammelburg M (2011) The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *Journal of bacteriology*, 193(7), 1533-1542.
- Heidari M, Golpayegani A (2012) Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Saudi Soc Agric Sci* 11:57–61.
- Heinze S, Raupp J, Joergensen RG (2010) Effects of fertilizer and spatial heterogeneity in soil pH on microbial biomass indices in a long-term field trial of organic agriculture. *Plant Soil* 328:203–215.
- Hernández-Lucas I, Pardo MA, Segovia L, et al (1995) *Rhizobium tropici* chromosomal citrate synthase gene. *Appl Environ Microbiol* 61:3992–7.
- Hernandez-Lucas I, Ramirez-Trujillo JA, Gaitan MA, et al (2006) Isolation and characterization of functional insertion sequences of rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* 261:25–31.
- Herrera S, Grossi C, Zawoznik M, Groppa M (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological research*, 186, 37-43
- Hilali A, Prévost D, Broughton W (2001) Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Canadian journal of microbiology*, 47(6), 590-593.
- Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, et al (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315:804–7.
- Hopkins W, Huner N (2004) Cytokinins are synthesized primarily in the root. *Introduction to plant physiology*. Wiley, New York, 325-326.
- Horn S, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VG (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5:45.
- Hungria M, Campo RJ, Mendes IC (2003) Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol Fertil Soils* 39:88–93.
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413–425.
- Hurek T, Handley L (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(3), 233-242.
- Hurek T, Reinhold-Hurek B (2003) *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*, 106(2), 169-178.
- Hwang DM, Dempsey A, Tan KT, Liew CC (1996) A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution. *J Mol Evol* 43:536–540.
- Iannetta P, Mcmillan G, Sprent J (1997) Plant cell wall-degrading enzymes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: their role in avoiding the host-plant defence response. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 1019-1021.

- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. Applied and environmental microbiology, 70(5), 2667-2677.
- Igarashi Y, Trujillo M, Martínez-Molina E (2007) Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 17(13), 3702-3705.
- Ikeda A, Bassani L, Adamoski D, Stringari D (2013) Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. Microbial ecology, 65(1), 154-160
- Ilitis H (1983) From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. Science, 222(4626), 886-894.
- Iniguez A, Dong Y, Triplett E (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17(10), 1078-1085.
- Isfahani F, Besharati H (2012) Effect of biofertilizers on yield and yield components of cucumber. Journal of Biology and Earth Sciences, 2(2), 83-92.
- Jain V, Gupta K (2003) The flavonoid naringenin enhances intercellular colonization of rice roots by *Azorhizobium caulinodans*. Biology and fertility of soils, 38(2), 119-123.
- James E (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field crops research, 65(2), 197-209.
- James E, Gyaneshwar P, Mathan N (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Molecular Plant-Microbe Interactions, 15(9), 894-906.
- Janczarek M (2011) Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. International journal of molecular sciences, 12(11), 7898-7933.
- Janczarek M, Urbanik-Sypniewska T (2013) Expression of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *pssA* gene, involved in exopolysaccharide synthesis, is regulated by RosR, phosphate, and the carbon source. J Bacteriol 195:3412–23.
- Ji S, Gururani M, Chun S (2014) Expression analysis of rice pathogenesis-related proteins involved in stress response and endophytic colonization properties of *gfp*-tagged *Bacillus subtilis* CB-R05. Applied biochemistry and biotechnology, 174(1), 231-241.
- Jiménez-Gómez A, Menéndez E (2016) Effective colonization of spinach root surface by *Rhizobium*. In Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction (pp. 109-122). Springer, Cham.
- Jiménez-Gómez A, Celador-Iera L, Fradejas M, Rivas R (2017) Probiotic bacteria enhance fruit and horticultural quality of fruit and horticultural crops. AIMS Microbiol, 3, 483-501.
- Jiménez-Zurdo J, Mateos P, Dazzo F (1996) Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. Soil Biology and Biochemistry, 28(7), 917-921.

## Bibliografía

- Johnson EG, Sparks JP, Dzikovski B, et al (2008) Plant-Pathogenic *Streptomyces* Species Produce Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide in Response to Host Signals. *Chem Biol* 15:43–50.
- Johnston AWB, Todd JD, Curson AR, et al (2007) Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other  $\alpha$ -proteobacteria. *BioMetals* 20:501–511.
- Johnston-Monje D, Raizada MN (2011) Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One*, 6(6), e20396.
- Joshi F, Desai D, Archana G, Desai A (2009) Enhanced survival and nodule occupancy of pigeon pea nodulating *Rhizobium* sp. ST1 expressing fegA gene of *Bradyrhizobium japonicum* 61A152. *J Biol Sci*, 9, 40-51.
- Junior F dos R, Reis V, Urquiaga S, Döbereiner J (2000) Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and soil*, 219(1-2), 153-159.
- Kamran MA, Eqani SAMAS, Bibi S, et al (2016) Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 126:256–263.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al (2000) Complete Genome Structure of the Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7:331–338.
- Kannahi M, Senbagam N (2014) Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity. *J Chem Pharm Res*, 6(4), 1142-1145.
- Kantety R V., van Santen E, Woods FM, Wood CW (1996) Chlorophyll meter predicts nitrogen status of tall fescue. *J Plant Nutr* 19:881–889.
- Kao CM, Chen SC, Chen YS, et al (2003) Detection of *Burkholderia pseudomallei* in rice fields with PCR-based technique. *Folia Microbiol (Praha)* 48:521–524.
- Karunakaran R, Ramachandran VK, Seaman JC, et al (2009) Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *J Bacteriol* 191:4002–14.
- KeCpczynski J, KeCpczynska E (1997) Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiol Plant* 101:720–726.
- Keith F. Chater, Sandor Biró, Kye Joon Lee, Tracy Palmer, Hildgund Schrempf; The complex extracellular biology of *Streptomyces*, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 34, Issue 2, 1 March 2010, Pages 171–198.
- Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96:473–480.
- Khamna S, Yokota A, Lumyong S (2009) L-Asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *International Journal of Integrative Biology*, 6(1), 22-26.



- Khan AL, Waqas M, Kang S-M, et al (2014) Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *J Microbiol* 52:689–695.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. *Agron Sustain Dev* 27:29–43.
- Khush G (2001) Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*, 2(10), 815-822.
- Kifle MH, Laing MD (2015) Isolation and Screening of Bacteria for Their Diazotrophic Potential and Their Influence on Growth Promotion of Maize Seedlings in Greenhouses. *Front Plant Sci* 6:1225.
- Kifle MH, Laing MD (2016) Effects of Selected Diazotrophs on Maize Growth. *Front Plant science*, 7.
- Kirby R (2005) Actinomycetes and lignin degradation. *Advances in applied microbiology*, 58, 125-168.
- Kittipongpatana N, Davis D, Porter J (2002) Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 71(1), 65-75.
- Klee H, Hayford M, Kretzmer K, Barry G (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell*, 3(11), 1187-1193.
- Klimankova E, Holadová K, Hajšlová J, Čajka T (2008) Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food Chemistry*, 107(1), 464-472.
- Kloepper J, Leong J, Teintze M, Schroth M (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- Kloepper J, Lifshitz R, Zablotowicz R (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
- Kneip C, Lockhart P, Voß C (2007) Nitrogen fixation in eukaryotes—new models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 55.
- Kobayashi D, Palumbo J (2000) Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *Microbial endophytes*, 19, 199-233.
- Koeck DE, Pechtl A, Zverlov V V., Schwarz WH (2014) Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 29:171–183.
- Kortemaa H, Rita H, Haahtela K, Smolander A (1994) Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil* 163:77–83.
- Kovach M, Phillips R, Elzer P, 2nd RR (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques*, 16(5), 800-802.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, et al (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79:5112–5120.

## Bibliografía

- Krarrup C, Moreira I (1998) Hortalizas de estación fría. Biología y diversidad cultural. P. Universidad Católica de Chile, VRA, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Santiago, Chile.
- Krause A, Ramakumar A, Bartels D, et al (2006) Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat Biotechnol* 24:1385–1391.
- Kuan K, Othman R, Rahim K, Shamsuddin Z (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse. *PloS one*, 11(3), e0152478.
- Kudoyarova G, Melentiev A, Martynenko E (2014) Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant physiology and biochemistry*, 83, 285-291.
- Kumar V, Kumar M, Sharma S, Prasad R (2017) Probiotics and Plant Health.
- Kunova A, Bonaldi M, Saracchi M, et al (2016) Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiol* 16:272.
- Kuykendall LD, Young JM, Martínez-Romero E, et al (2015) *Rhizobium*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 1–36
- Kwak Y, Jung BK, Shin JH (2015) Complete genome sequence of *Pseudomonas rhizosphaerae* IH5T (=DSM 16299T), a phosphate-solubilizing rhizobacterium for bacterial biofertilizer. *J Biotechnol* 193:137–138.
- Ladha J, Kundu D, Coppenolle A (1996) Legume productivity and soil nitrogen dynamics in lowland rice-based cropping systems. *Soil Science Society of America Journal*, 60(1), 183-192.
- Ladha J, Bruijn F De, Malik K (1997) Introduction: assessing opportunities for nitrogen fixation in rice—a frontier project. In *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes* (pp. 1-10). Springer Netherlands.
- Ladha J, Reddy P (2000) The Quest for nitrogen fixation in rice, *Int. Rice Res. Inst.*
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG (2008) Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu Rev Biochem* 77:521–555.
- Lalande R, Bissonnette N, Coutlée D, Antoun H (1989) Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil*, 115(1), 7-11.
- Land M, Hauser L, Jun S, Nookaew I (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & integrative genomics*, 15(2), 141-161.
- Last R, Bissinger P, Mahoney D (1991) Tryptophan mutants in *Arabidopsis*: the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. *The Plant Cell*, 3(4), 345-358.
- Laus M, Logman T, Lamers G (2006) A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular microbiology*, 59(6), 1704-1713.

- Leong SA, Neilands JB (1982) Siderophore production by phytopathogenic microbial species. *Arch Biochem Biophys* 218:351–359.
- Li D-M, Alexander M (1990) Factors affecting co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to enhance rhizobial colonization and nodulation. *Plant Soil* 129:195–201.
- Li H, Wang X, Han M, et al (2012) Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential application in control of replant diseases. *African Journal of Biotechnology*, 11(1), 231-242.
- Li J, Bi Y, Dong C, et al (2011) Transcriptome Analysis of Adaptive Heat Shock Response of *Streptococcus thermophilus*. *PLoS One* 6:e25777.
- Li S, Yang D, Qiu M, et al (2014) Complete Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Antifungal Activity and Rhizosphere colonization ability. *Genome Announc* 2:e00281-14.
- Li XZ, Hauer B, Rosche B (2007) Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:1255–1262.
- Lin FC, Brown RM, Drake RR, Haley BE (1990) Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc. *J Biol Chem* 265:4782–4.
- Lin L, Li Z, Hu C, et al (2012) Plant Growth-Promoting Nitrogen-Fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China. *Microbes Env* 27:391–398.
- Lindsay W, Vlek P (1989) Phosphate minerals. *Minerals in soil environments, (mineralsinsoile)*, 1089-1130.
- Liu W, Wang Q, Hou J, et al (2016) Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. *Sci Rep* 6:e26710.
- Liu X, Zhao H, Chen S (2006) Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current microbiology*, 52(3), 186-190.
- Liu Y, Zuo S, Xu L, et al (2012) Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Archives of microbiology*, 194(12), 1001-1012.
- Liu Y, Zhao R, Wang R, et al (2016) *Paenibacillus chinensis* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) seeds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109:207–213.
- Livermore DM, Woodford N (2006) The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 14:413–420.
- Loaces I, Ferrando L, Scavino AF (2011) Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. *Microb Ecol* 61:606–618.
- Loman NJ, Pallen MJ (2015) Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nat Rev Microbiol* 13:787–794.
- Long H, Schmidt D, Baldwin I (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One*, 3(7), e2702.
- Longley A (1941) Chromosome morphology in maize and its relatives. *The Botanical Review*, 7(5), 263-289.

## Bibliografía

- Loper J, Henkels M (1999) Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5357-5363.
- López-Guerrero MG, Ormeño-Orrillo E, Velázquez E, et al (2012) *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Syst Appl Microbiol* 35:353–358.
- Lorite M, Flores-Félix J, Peix Á, Sanjuán J (2016) *Mesorhizobium olivaresii* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Systematic and applied microbiology*, 39(8), 557-561.
- Luo S, Wan Y, Xiao X, et al (2011) Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1637–1644.
- Lupwayi NZ, Clayton GW, Hanson KG, et al (2004) Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. *Can J Plant Sci* 84:37–45.
- Mäder P, Kaiser F, Adholeya A, et al (2011) Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat–rice and wheat–black gram rotations in India. *Soil Biol Biochem* 43:609–619.
- Madigan M, Martinko J, Bender K, et al (2015) Brock. *Biología de los microorganismos*.
- Mandel M, Marmur J (1968) Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods in enzymology*, 12, 195-206.
- Mangelsdorf P (1986) The origin of corn. *Scientific American*, 255(2), 80-86.
- Manulis S, Shafrir H, Epstein E, et al (1994) Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140:1045–1050.
- Mao W, Lewis JA, Hebbbar PK, Lumsden RD (1997) Seed Treatment with a Fungal or a Bacterial Antagonist for Reducing Corn Damping-off Caused by Species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis* 81:450–454.
- Martín L, Miera LS de (2014) AFLP and RAPD characterization of *Phaeoacremonium aleophilum* associated with *Vitis vinifera* decline in Spain. *Journal of Phytopathology*, 162(4), 245-257.
- Martínez-Hidalgo P, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, et al (2016) Reclassification of strains MAFF 303099T and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:4936–4941.
- Martinez-Molina E, Morales V (1979) Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. *Applied and environmental microbiology*, 38(6), 1186-1188.
- Martínez-Viveros O, Jorquera M., Crowley D., et al (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J soil Sci plant Nutr* 10:293–319.
- Mateos P, Jimenez-Zurdo J, Chen J (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. *Applied and environmental microbiology*, 58(6), 1816-1822.
- Mateos PF, Baker DL, Philip-Hollingsworth S, et al (1995) Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* attached to the root epidermis of white clover. *Can J Microbiol* 41:202–207.

- Mateos P, Baker D, Petersen M (2001) Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium* legume symbiosis. *Canadian journal of microbiology*, 47(6), 475-487.
- Matiru V, Dakora F (2004) Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-7.
- Maurhofer M, Hase C, Meuwly P, et al (1994) Systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine. *Phytopathology*, 84(2), 139-146.
- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, et al (1998) Salicylic Acid Biosynthetic Genes Expressed in *Pseudomonas fluorescens* Strain P3 Improve the Induction of Systemic Resistance in Tobacco Against Tobacco Necrosis Virus. *Phytopathology* 88:678–684.
- Mazur A, Marczak M, Król JE, Skorupska A (2005) Topological and transcriptional analysis of *pssL* gene product: a putative Wzx-like exopolysaccharide translocase in *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* TA1. *Arch Microbiol* 184:1–10.
- McInroy JA, Kloepper JW (1995) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337–342.
- McMurry LM, Levy SB (1998) Revised sequence of OtrB (tet347) tetracycline efflux protein from *Streptomyces rimosus*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3050.
- McSteen P (2010) Auxin and monocot development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a001479.
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, et al (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39:W339–W346.
- Medie FM, Davies GJ, Drancourt M, Henrissat B (2012) Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nat Rev Microbiol* 10:227–234.
- Mehboob I, Naveed M, Zahir Z (2009) Rhizobial association with non-legumes: mechanisms and applications. *Critical Reviews in Plant Science*, 28(6), 432-456.
- Mehnaz S, Lazarovits G (2006) Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 51:326–335.
- Mehnaz S, Kowalik T, Reynolds B, Lazarovits G (2010) Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biol Biochem* 42:1848–1856.
- Mendoza MR (1998) Estimation of nitrogen and chlorophyll status of tomato with a portable chlorophyll meter. *Terra* 135–141.
- Menéndez E, García-Fraile P, Rivas R (2015) Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioeng* 2:163–182.

## Bibliografía

- Menéndez E, Díez-Méndez A, Marcos-García M, et al (2016) *Rhizobium* Symbiotic Enzyme Cellulase CelC2: Properties and Applications. New Futur developments Microb Biotechnol Bioeng Microb Cell Syst Prop Appl 53:81–89.
- Menendez E, Garcia-Fraile P (2017) Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world. AIMS Microbiol 3:502–524.
- Mercado-Blanco J, Prieto P (2012) Bacterial endophytes and root hairs. Plant Soil 361:301–306.
- Metzker M (2010) Sequencing technologies—the next generation. Nature reviews genetics, 11(1), 31-46.
- Michaud P, Belaich A, Courtois B, Courtois J (2002) Cloning, sequencing and overexpression of a *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS carboxymethyl-cellulase gene. Applied microbiology and biotechnology, 58(6), 767-771.
- Mikael LG, Pawelek PD, Labrie J, et al (2002) Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiology 148:2869–2882.
- Mirza MS, Ahmad W, Latif F, et al (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. Plant and Soil, 237(1), 47-54.
- Mitra S (2014) Interaction of *Rhizobium* sp. strain IRBG74 with a legume (*Sesbania cannabina*) and a cereal (*Oryza sativa*). (Doctoral dissertation, The University of Wisconsin-Milwaukee).
- Mohammadi K (2012) Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and Their Role in Crop Production. Resour Environ 2:80–85.
- Mohite B (2013) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. J Soil Sci Plant Nutr 13:638–649.
- Monostori I, Árendás T, Hoffman B, et al (2016) Relationship between SPAD value and grain yield can be affected by cultivar, environment and soil nitrogen content in wheat. Euphytica 211:103–112.
- Montañez A, Abreu C, Gill PR, et al (2009) Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biol Fertil Soils 45:253–263.
- Montañez A, Blanco AR, Barlocco C, et al (2012) Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. Appl Soil Ecol 58:21–28.
- Morales M, Janick J (2002) Arugula: A promising specialty leaf vegetable. Reprinted from: Trends in new crops and new uses.
- Morales V, Martinez-Molina E, Hubbell D (1984) Cellulase production by *Rhizobium*. Plant and soil, 80(3), 407-415.
- Morales M, Simon J (1996) New basil selections with compact inflorescences for the ornamental market. Progress in new crops. ASHS, Alexandria, 543-546.

- Morales M, Janick J (2002) Arugula: A promising specialty leaf vegetable. Reprinted from: Trends in new crops and new uses.
- Morrissey R, Dugan E, Koths J (1976) Chitinase production by an *Arthrobacter* sp. lysing cells of *Fusarium roseum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 8(1), 23-28.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2010). A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1), nrm3031.
- Mousa WK, Shearer CR, Limay-Rios V, et al (2015) Bacterial endophytes from wild maize suppress *Fusarium graminearum* in modern maize and inhibit mycotoxin accumulation. *Front Plant Sci* 6:1–19.
- Moutia J-FY, Saumtally S, Spaepen S, Vanderleyden J (2010) Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant Soil* 337:233–242.
- Muday G, Rahman A, Binder B (2012) Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends in plant science*, 17(4), 181-195.
- Muis A, Quimio A (2016) Biological control of banded leaf and sheath blight disease (*Rhizoctonia solani* Kuhn) in corn with formulated *Bacillus subtilis* BR23. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 7(1), 1-7.
- Mukherjee P (2011) Genomics of biological control—whole genome sequencing of two mycoparasitic *Trichoderma* spp. *Curr Sci*, 101(3), 10.
- Mulcahy D, Cresti M, Sansavini S, Douglas G (1993) The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Scientia Horticulturae*, 54(2), 89-96.
- Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA (2016) The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu Rev Genet* 50:211–234.
- Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J (2003) Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microb Ecol* 46:454–464.
- Murray JD (2011) Invasion by invitation: Rhizobial infection in legumes. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:631–639.
- Muthukumarasamy R, Cleenwerck I, Revathi G, et al (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter* peroxydans with wetland rice. *Syst Appl Microbiol* 28:277–286.
- Naher UA, Othman R, Shamsuddin ZHJ, et al (2009) Growth enhancement and root colonization of rice seedlings by *Rhizobium* and *Corynebacterium* spp. *Int J Agric Biol* 11:586–590.
- Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R (2001) Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4), 603-612.
- Nicola S, Hoeberechts J, Baudino M (2001) Primi risultati di coltivazione fuori suolo per la produzione di valerianella (*Valerianella* spp.). National meeting La fertilizzazione in orticoltura. *Culture protette*, 5, 103-106

## Bibliografía

- Niklas K, Kutschera U (2012) Plant development, auxin, and the subsystem incompleteness theorem. *Frontiers in plant science*, 3.
- Nikolic B, Schwab H, Sessitsch A (2011) Metagenomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene (*acdS*) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum*. *Archives of microbiology*, 193(9), 665-676
- Nomura F (2015) Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1854(6), 528-537.
- Norrish K, Rosser H (1983) Mineral phosphate. *Soils: an Australian viewpoint*, 335-361.
- Nuss E, Tanumihardjo S (2010) Maize: a paramount staple crop in the context of global nutrition. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(4), 417-436
- O'Toole G (2003) To Build a Biofilm. *J Bacteriol* 185:2687–2689.
- O'Gara F, Shanmugam K (1976) Control of symbiotic nitrogen fixation in rhizobia regulation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 451(2), 342-352.
- O'Neill M, Carroll Y, Corridan B (2001) A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85(4), 499-507.
- Ochoa-Velasco C, Valadez-Blanco R (2016) Effect of nitrogen fertilization and *Bacillus licheniformis* biofertilizer addition on the antioxidants compounds and antioxidant activity of greenhouse cultivated tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L. var. Sheva). *Scientia Horticulturae*, 201, 338-345.
- Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka H, Horinouchi S (1999) The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: Identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol* 34:102–111.
- Olivares FL, James EK, Baldani JI, Döbereiner J (1997) Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol* 135:723–737.
- Oliveira A, Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani J (2002) The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242(2), 205-215.
- Oliveira LR, Marcelino FC, Barcellos FG, et al (2010) The *nodC*, *nodG*, and *glgX* genes of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. *Funct Integr Genomics* 10:425–431.
- Ordookhani K, Khavazi K, Moezzi A (2010) Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research*, 5(10), 1108-1116.
- Ordookhani K, Sharafzadeh S, Zare M (2011) Influence of PGPR on growth, essential oil and nutrients uptake of sweet basil. *Adv Environ Biol* 5:672–677.
- Ormeño-Orrillo E, Rosenblueth M, Luyten E, et al (2008) Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environ Microbiol* 10:1271–1284.



- Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LGP, et al (2012) Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). BMC Genomics 13:735.
- Ormeño-Orrillo E, Servín-Garcidueñas LE, Rogel MA, et al (2015) Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. Syst Appl Microbiol 38:287–291.
- Orole OO, Adejumo TO (2011) Bacterial and fungal endophytes associated with grains and roots of maize. J Ecol Nat Environ 3:298–303.
- Ortíz-Castro R, Valencia-Cantero E, López-Bucio J (2008) Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. Plant Signal Behav 3:263–265.
- Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, et al (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. Front Microbiol 6:1–9.
- Ouzari H, Khsairi A, Raddadi N, et al (2008) Diversity of auxin-producing bacteria associated to *Pseudomonas savastanoi* -induced olive knots. J Basic Microbiol 48:370–377.
- Overbeek R, Olson R, Pusch G, Olsen G (2013) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic acids research, 42(D1), D206-D214.
- Ozdener Y, Kutbay HG (2009) Toxicity of copper, cadmium, nickel, lead and zinc on seed germination and seedling growth in *Eruca sativa*. Fresen. Environ. Bull, 18(1), 26.
- Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A (2015) Classification of beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. PLoS One 10:1–23.
- Palada M, Crossman S (1999) Evaluation of tropical leaf vegetables in the Virgin Islands. Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 388-393.
- Pan D, Mionetto A, Tiscornia S, Bettucci L (2015) Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. Mycotoxin research, 31(3), 137-143.
- Pankiewicz VCS, Camilios-Neto D, Bonato P, et al (2016) RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. Plant Mol Biol 90:589–603.
- Pariona-Llanos R, Ferrara F de S (2010) Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. European Journal of Soil Biology, 46(6), 387-393.
- Park K, Lee O, Jung H, et al (2010) Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. Applied microbiology and biotechnology, 86(3), 947-955.
- Park N, Kim J, Park W, et al (2011) An efficient protocol for genetic transformation of watercress (*Nasturtium officinale*) using *Agrobacterium rhizogenes*. Molecular biology reports, 38(8), 4947-4953.
- Parry C, Blonquist JM, Bugbee B (2014) *In situ* measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. Plant Cell Environ 37:2508–2520.

## Bibliografía

- Parthasarathi R, Bellesia G (2011) Insights into hydrogen bonding and stacking interactions in cellulose. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(49), 14191-14202.
- Patil HJ, Srivastava AK, Kumar S, et al (2010) Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. *World J Microbiol Biotechnol* 26:2163–2170.
- Patten C, Glick B (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 207-220.
- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, 54(4), 559-568.
- Paungfoo-Lonhienne C, Rentsch D, Robatzek S (2010) Turning the table: plants consume microbes as a source of nutrients. *PLOS one*, 5(7), e11915.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, et al (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6548–53.
- Peix A, Ramírez-Bahena M, Velázquez E (2015) Bacterial associations with legumes. *Critical reviews in plant sciences*, 34(1-3), 17-42.
- Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, et al (2004) *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:847–850.
- Peng J, Richards D, Hartley N, Murphy G (1999) “Green revolution” genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 400(6741), 256-261.
- Peng L, Kawagoe Y, Hogan P, Delmer D (2002) Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* 295:147–50.
- Pereira SIA, Castro PML (2014) Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environ Sci Pollut Res* 21:14110–14123.
- Pereira S, Monteiro C, Vega A, Castro P (2016) Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering*, 87, 91-97.
- Pérez-Cordero A, Tuberquia-Sierra A, Amell-Jiménez D (2014) Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agron Mesoam* 25:213.
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 127-131.
- Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín R (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5), 325-336.
- Perrine-Walker FM, Prayitno J, Rolfe BG, et al (2007) Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J Exp Bot* 58:3343–3350.

- Petersen L, Tisa L (2012) Influence of temperature on the physiology and virulence of the insect pathogen *Serratia* sp. strain SCBI. *Applied and environmental microbiology*, 78(24), 8840-8844.
- Phillips K, Skirpan A, Liu X, Christensen A (2011) Vanishing tassel2 encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *The Plant Cell*, 23(2), 550-566.
- Picard C, Cello F Di, Ventura M, Fani R (2000) Frequency and biodiversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 948-955.
- Pignata G, Niñirola D, Casale M, et al (2016) Inherent Quality and Safety of Watercress Grown in a Floating System Using *Bacillus subtilis*. *Hortic J* 85:148–153.
- Pileggi M, Pileggi S, Olchanheski L, Silva P da (2012) Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere*, 86(11), 1127-1132.
- Pingali P (2012) Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12302-12308.
- Plasencia J (2004) Aflatoxins in maize: a Mexican perspective. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 23(2-3), 155-177.
- Plazinski J, Rolfe B (1985) Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. *Journal of plant physiology*, 120(2), 181-187.
- Podosokorskaya O (2013) *Ornatilinea* apprima gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class Anaerolineae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1), 86-92.
- Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K (2009) The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied soil ecology*, 42(2), 141-149.
- Prieto P, Schilirò E, Maldonado-González M (2011) Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial ecology*, 62(2), 435-445.
- Puente M, Bashan Y, Li C, Lebsky V (2004) Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6(05), 629-642.
- Puri A, Padda K, Chanway C (2015) Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth? *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 210-216.
- Rama Prabha M, Karthiyayini R, Viji M, Balakumbagan R (2017) Effect of biofertilizers on biomass yield and quality of *Ocimum basilicum* L. In: *Probiotics and Plant Health*. Springer Singapore, Singapore, pp 443–454
- Ramachandra M, Crawford D (1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 3057-3063.

## Bibliografía

- Ramakrishnan K, Selvakumar G (2012) Effect of biofertilizers on enhancement of growth and yield on Tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Int J Res Bot* 2:20–23.
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection*, 20(1), 1-11.
- Ramey B, Koutsoudis M, Bodman S von (2004) Biofilm formation in plant–microbe associations. *Current opinion in microbiology*, 7(6), 602-609.
- Ramírez-Bahena M (2008) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(11), 2484-2490.
- Ramsay JP, Sullivan JT, Jambari N, et al (2009) A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol Microbiol* 73:1141–1155.
- Ranjard L, Poly F, Nazaret S (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. *Res Microbiol* 151:167–177.
- Reed JW, Glazebrook J, Walker GC (1991) The *exoR* gene of *Rhizobium meliloti* affects RNA levels of other *exo* genes but lacks homology to known transcriptional regulators. *J Bacteriol* 173:3789–94.
- Reid M, Mor Y, Kofranek A (1981) Epinasty of poinsettias—the role of auxin and ethylene. *Plant physiology*, 67(5), 950-952.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (1997) *Azoarcus* spp. and their interactions with grass roots In *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes* (pp. 57-64). Springer Netherlands.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, Localization, and Perspectives to Study their Function. *CRC Crit Rev Plant Sci* 17:29–54.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants: Bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* 14:435–443.
- Ren, W., Wang, Z., & Xu, A. (2010). Advancement in the research of salt-alkali tolerance genes in alkaligrass. *Acta prataculturae sinica*, 19(5), 260-266.
- Rennie R (1981) A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), 8-14.
- Resendis-Antonio O, Reed JL, Encarnación S, et al (2007) Metabolic Reconstruction and Modeling of Nitrogen Fixation in *Rhizobium etli*. *PLoS Comput Biol* 3:e192.
- Reuveni R, Raviv M, Krasnovsky A, Freiman L (2002) Compost induces protection against *Fusarium oxysporum* in sweet basil. *Crop Protection*, 21(7), 583-587.
- Rigaud J, Puppo A (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *Microbiology*, 88(2), 223-228.

- Rijavec T, Lapanje A, Dermastia M (2007) Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian journal of microbiology*, 53(6), 802-808
- Rinaudi L V., Giordano W (2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* 304:1–11.
- Rivas R, Trujillo M, Mateos P (2004) *Cellulomonas xylanilytica* sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a decayed elm tree. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(2), 533-536.
- Robertson G, Vitousek P (2009) Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Annual Review of Environment and Resources*, 34, 97-125.
- Robledo M, Jimenez-Zurdo JI, Velazquez E, et al (2008) *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci* 105:7064–7069.
- Robledo M, Velazquez E, Ramirez-Bahena MH, et al (2011a) The *celC* gene, a new phylogenetic marker useful for taxonomic studies in *Rhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 34:393–399.
- Robledo M, Jiménez-Zurdo J, Soto M (2011b) Development of functional symbiotic white clover root hairs and nodules requires tightly regulated production of rhizobial cellulase CelC2. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(7), 798-807.
- Robledo M, Rivera L, Jimenez-Zurdo J, et al (2012) Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11(1), 125.
- Rodicio M, Mendoza M (2004) Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 22(4), 238-245.
- Rodríguez-Blanco A, Sicardi M, Frioni L (2015) Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). *Biol Fertil Soils* 51:391–402.
- Roesch LFW, De Quadros PD, Camargo FAO, Triplett EW (2007) Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1377–1383.
- Römling U (2002) Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* 153:205–212.
- Römling U, Galperin MY, Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:1–52.
- Rosas-Castor JM, Guzmán-Mar JL, Hernández-Ramírez A, et al (2014) Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review. *Sci Total Environ* 488–489:176–187.
- Rose P, Faulkner K, Williamson G, Mithen R (2000) 7-Methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis*, 21(11), 1983-1988.
- Rosegrant M, Ringler C, Sulser T (2009) Agriculture and food security under global change: Prospects for 2025/2050. Background note for supporting the development of CGIAR Strategy and Results Framework. International Food Policy Res. Institute: Washington, DC.

## Bibliografía

- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2004) *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. Arch Microbiol 181:337–344.
- Ross P, Mayer R, Benziman M (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol Rev 55:35–58.
- Rozier C, Rozier C, Erban A, et al (2016) Metabolomics: open access xylem sap metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. Metabolomics (Los Angel), 6(182), 2153-0769.
- Rubio-Canalejas A, Celador-Lera L, Cruz-González X, et al (2016) *Rhizobium* as Potential Biofertilizer of Eruca Sativa. In: Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction. Springer International Publishing, Cham, pp 213–220
- Rudrappa T, Biedrzycki ML, Bais HP (2008) Causes and consequences of plant-associated biofilms. FEMS Microbiol Ecol 64:153–166.
- Ryu RJ, Patten CL (2008) Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. J Bacteriol 190:7200–8.
- Sabry SR, Saleh SA, Batchelor CA, et al (1997) Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 264(1380), 341-346.
- Sadhu S, Maiti T (2013) Cellulase Production by Bacteria: A Review.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma B (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environmental Science and Pollution Research, 23(5), 3984-3999.
- Saharan B, Nehra V (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sci Med Res, 21(1), 30.
- Sahoo RK, Ansari MW, Dangar TK, et al (2014) Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. Protoplasma 251:511–523.
- Sakha Y, El- K (2016) Status of the Biofertilization Technology and Biosafety of Biofertilizers in Egypt.
- Salamone IG de, Döbereiner J (1996) Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the 15 N isotope dilution technique. Biology and Fertility of Soils, 23(3), 249-256.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J Ind Microbiol Biotechnol 34:635–648.
- Salipante S, Kawashima T, Rosenthal C (2014) Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. Applied and environmental microbiology, 80(24), 7583-7591.
- Salomone IG de, Döbereiner J (1996) Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. Biology and fertility of soils, 21(3), 193-196.

- Sangeeth K, Bhai R (2012) *Paenibacillus gluconolyticus*, a promising potassium solubilizing bacterium isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.) rhizosphere.
- Sangwan N, Farooqi A, Shabih F (2001) Regulation of essential oil production in plants.
- Santos-Beneit F (2015) The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol* 6:1–13.
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda M del C, Govindappa M (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci Technol* 22:855–872.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* 183:92–99.
- Saravia D, Farfán-Vignolo ER, Gutiérrez R, et al (2016) Yield and Physiological Response of Potatoes Indicate Different Strategies to Cope with Drought Stress and Nitrogen Fertilization. *Am J Potato Res* 93:288–295.
- Sarwar M, Arshad M, Martens D (1992) Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant and Soil*, 147(2), 207-215.
- Sasser M (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.
- Saxena S, Verma J, Modi D (2014) RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India: Identification and detection of genetic. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 27-35.
- Sayer J, Cassman K (2013) Agricultural innovation to protect the environment.
- Schlee S, Dietrich S, Kurcón T, et al (2013) Kinetic mechanism of indole-3-glycerol phosphate synthase. *biochemistry* 52:132–142.
- Schlosser, A., Hamann, A., Bossemeyer, D., Schneider, E., & Bakker, E. P. (1993). NAD<sup>+</sup> binding to the *Escherichia coli* K<sup>+</sup>-uptake protein TrkA and sequence similarity between TrkA and domains of a family of dehydrogenases suggest a role for NAD<sup>+</sup> in bacterial transport. *Molecular microbiology*, 9(3), 533-543.
- Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D, et al (2009) *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl Environ Microbiol* 75:4035–45.
- Schönian G, Meusel O, Tietz H, et al (1993) Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. *Mycoses*, 36(5-6), 171-179.
- Schütze E, Klose M, Merten D, et al (2014) Growth of streptomycetes in soil and their impact on bioremediation. *J Hazard Mater* 267:128–135.
- Schwyn B, Neilands J (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- See-Too WS, Convey P, Pearce DA, et al (2016) Complete genome of *Planococcus rifietoensis* M8T, a halotolerant and potentially plant growth promoting bacterium. *J Biotechnol* 221:114–115.

## Bibliografía

- Senthilkumar M, Madhaiyan M, Sundaram S (2008) Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans*. *Biotechnology letters*, 30(8), 1477-1487
- Serna-Saldivar S, Guerra C, Macias P (2008) Evaluation of the lime-cooking and tortilla making properties of quality protein maize hybrids grown in Mexico. *Plant foods for human nutrition*, 63(3), 119.
- Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U (2002) Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA. *FEMS microbiology ecology*, 39(1), 23-32.
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 28-36.
- Sevilla M, Burris R, Gunapala N (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif mutant strains. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(3), 358-366.
- Shaharoon B, Naveed M, Arshad M, Zahir ZA (2008) Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonas* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 79:147–155.
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 219-228.
- Shanware A, Kalkar S, Trivedi M (2014) Potassium solubilisers: occurrence, mechanism and their role as competent biofertilizers. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(9), 622-9.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2:587.
- Shen J, Yuan L, Zhang J, et al (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant physiology*, 156(3), 997-1005.
- Shen X, Hu H, Peng H, et al (2013) Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics* 14:271.
- Sheng XF, He LY (2006) Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can J Microbiol* 52:66–72.
- Shiferaw B, Prasanna BM, Hellin J, Bänziger M (2011) Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Secur* 3:307–327.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 21:1794–1805.
- Sikora R (1988) Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Rijksuniversiteit Faculteit Landbouwwetenschappen, Gent*.



- Silva LR, Azevedo J, Pereira MJ, et al (2014) Inoculation of the nonlegume *Capsicum annuum* L. with *Rhizobium* strains. 2. changes in sterols, triterpenes, fatty acids, and volatile compounds. *J Agric Food Chem* 62:565–573.
- Simon C, Daniel R (2009) Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(2), 265-276.
- Singh G, Biswas DR, Marwaha TS (2010) Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea Mays*) and Wheat (*Triticum Aestivum* L.): a hydroponics study under phytotron growth chamber. *J Plant Nutr* 8:1236–1251.
- Singh MK, Kushwaha C, Singh RK (2009) Studies on endophytic colonization ability of two upland rice endophytes, *Rhizobium* sp. and *Burkholderia* sp., using green fluorescent protein reporter. *Curr Microbiol* 59:240–243.
- Singh RK, Soni SK, Patel RP, Kalra A (2013a) Technology for improving essential oil yield of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions. *Ind Crops Prod* 45:335–342.
- Singh RK, Malik N, Singh S (2013b) Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Bioscience* 5:8–14.
- Skorov G (1973) The green revolution and social progress. *World Development*, 1(11), 13-21.
- Smit G, Kijne J, Lugtenberg B (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *Journal of Bacteriology*, 169(9), 4294-4301.
- Smith M, Neilands J (1984) Rhizobactin, a siderophore from *Rhizobium meliloti*. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5), 449-458.
- Smith R (2008) The role of auxin transport in plant patterning mechanisms. *PLoS biology*, 6(12), e323.
- Soby S (2013) The end of the green revolution. *Journal of agricultural and environmental ethics*, 26(3), 537-546.
- Socha A, Guerinot M (2014) Mn-euvering manganese: the role of transporter gene family members in manganese uptake and mobilization in plants. *Frontiers in plant science*, 5.
- Soetan K, Olaiya C, Oyewole OE (2010) The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants-A review. *African Journal of Food Science*, 4(5), 200-222.
- Sokolova M, Akimova G, Vaishlya O (2011) Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3), 274-278.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211.
- Song JY, Kim HA, Kim JS, et al (2012) Genome sequence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. Strain JS. *J Bacteriol* 194:3760–3761.

## Bibliografía

- Song O, Lee S, Lee Y, et al (2008) Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 151-156.
- Sorty A, Meena K, Choudhary K, Bitla U (2016) Effect of Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Halophytic Weed (*Psoralea corylifolia* L) on Germination and Seedling Growth of Wheat Under Saline. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180(5), 872-882.
- Spadaro D, Gullino M (2005) Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection*, 24(7), 601-613.
- Spaepen S, Vanderleyden J (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448.
- Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J (2008) Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312:15–23.
- Spaepen S (2015) Plant Hormones Produced by Microbes. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing, Cham, pp 247–256
- Steel R, Torrie J (1980) *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2nd (edn) McGraw-Hill Book Company.
- Stêpniak E, Zagalska M, Switonski M (2002) Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae. *Journal of applied genetics*, 43(4), 489-500
- Stets M, Pinto A, Huergo L, Souza E de (2013) Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *Journal of biotechnology*, 165(3), 167-174.
- Stone PJ, O’Callaghan KJ, Davey MR, Cocking EC (2001) *Azorhizobium caulinodans* ORS571 colonizes the xylem of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:93–97.
- Struelens M, Struelens M, Verbrugh H, et al (2001) Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. *Microbiology* 14:547–560.
- Sturz A, Nowak J (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied soil ecology*, 15(2), 183-190.
- Suman A, Gaur A, Shrivastava A, Yadav R (2005) Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Plant Growth Regulation*, 47(2-3), 155-162.
- Sun Yoon S, Hennigan RF, Hilliard GM, et al (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis of toxic NO, a byproduct of anaerobic respiration. Proteomic analyses identified an outer membrane protein. *Dev Cell* 3:593–603.
- Sun-Waterhouse D (2011) The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(5), 899-920.
- T.D Menéndez E (2014) Colonización, infección y nodulación en la interacción mutualista *Ensifer* – *Medicago*: Análisis molecular y funcional de la implicación del gen *ceiC*.

- T.D Rivera LP (2013) Análisis funcional de la celulasa CelC2 en la interacción mutualista de *Rhizobium* en cereales, leguminosas y solanáceas.
- Taechowisan T, Lu C, Shen Y, et al (2017) Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology*, 151(5), 1691-1695.
- Taiz L, Taiz E, Zeiger E, et al (2006) *Plant physiology*. (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Taiz L, Zeiger E, Møller I, Murphy A (2015) *Plant physiology and development*. Sinauer Associates, Incorporated.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729.
- Tanimoto E (2005) Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. *CRC Crit Rev Plant Sci* 24:249–265.
- Tejera N, Lluch C, Martínez-Toledo M (2005) Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, 270(1), 223-232.
- Temmerman R, Huys G, Swings J (2004) Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends Food Sci Technol* 15:348–359.
- Thayil SM, Morrison N, Schechter N, et al (2011) The Role of the Novel Exopolyphosphatase MT0516 in *Mycobacterium tuberculosis* Drug Tolerance and Persistence. *PloS one*, 6(11), e28076.
- Thomas L, Crawford D (1998) Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocellulose catabolism genes encoding peroxidase and endoglucanase and their extracellular expression *Pichia pastoris*. *Canadian journal of microbiology*, 44(4), 364-372.
- Tian X, Cao L, Tan H, et al (2007) Diversity of Cultivated and Uncultivated Actinobacterial Endophytes in the Stems and Roots of Rice. *Microb Ecol* 53:700–707.
- Todd JD, Wexler M, Sawers G, et al (2002) RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 148:4059–4071.
- Tokala R, Strap J, Jung C (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2161-2171.
- Torres-Cortés G, Millán V, Ramírez-Saad HC, et al (2011) Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. *Environ Microbiol* 13:1101–1114.
- Toth IK, Bell KS, Holeva MC, Birch PRJ (2003) Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathol* 4:17–30.
- Toumatia O, Compant S, Yekkour A, et al (2016) Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African J Bot* 105:234–239.

## Bibliografía

- Trienekens J, Zuurbier P (2008) Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. *Journal of Production Economics*, 113(1), 107-122
- Tsavkelova E, Klimova S, Cherdyntseva T (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126.
- Turan M, Ekinci M, Yildirim E, et al (2014) Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish J Agric For* 38:327–333.
- Turner F, Jund M (1991) Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requirement for semidwarf rice. *Agronomy Journal*, 83(5), 926-928.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Upadhyay S, Singh J, Saxena A, Singh D (2012) Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- Usha Rani M (2012) Screening of rhizobacteria containing plant growth promoting (PGPR) traits in rhizosphere soils and their role in enhancing growth of pigeon pea. *African J Biotechnol* 11:8085–8091.
- Valan Arasu M, Duraipandiyar V, Agastian P, Ignacimuthu S (2009) In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J Mycol Médicale / J Med Mycol* 19:22–28.
- Valverde A, Velázquez E (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1985-1989.
- Valverde A, Igual J, Peix A (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(11), 2631-2637.
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453–483.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, Vos P De (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.
- Vantomme R, Baetens M, Bruyne E (1987) Characterization of *Corynebacterium sepedonicum* by API ZYM and by SDS protein polyacrylamide gel electrophoresis. Rijksuniversiteit Faculteit Landbouwwetenschappen, Gent
- Vargas C, Padua VM de (2003) Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. *Symbiosis*, 35(1-3), 159-180.
- Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I (2006a) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(2), 137-144.
- Velázquez E, Igual J, Willems A (2001a) *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 1011-1021.

- Velázquez E, Martínez-Romero E (2001b) Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Applied and environmental microbiology*, 67(2), 1008-1010.
- Velázquez E, Menéndez E, Juanes F (2016) Identification of Human Pathogenic Bacteria in Plant Roots by Using MALDI-TOF MS Methodology. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* (pp. 3-12). Springer, Cham.
- Venieraki A, Dimou M, Pergalis P, Kefalogianni I (2011) The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial ecology*, 61(2), 277-285.
- Verma D, Zogbi V, Bal A (1978) A cooperative action of plant and *Rhizobium* to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. *Plant Science Letters*, 13(2), 137-142.
- Verma P, Yadav AN, Khannam KS, et al (2016) Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *J Basic Microbiol* 56:44–58.
- Verma S, Ladha J, Tripathi A (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91(2), 127-141.
- Verma S, Singh A, Chowdhury S, Tripathi A (2004) Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology letters*, 26(5), 425-429.
- Verma VC, Singh SK, Prakash S (2011) Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *J Basic Microbiol* 51:550–556.
- Vessey J (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Vial L, Chapalain A, Groleau M (2011) The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environmental microbiology*, 13(1), 1-12.
- Vidhyasekaran P, Muthamilan M (1999) Evaluation of a Powder Formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for Control of Rice Sheath Blight. *Biocontrol Sci Technol* 9:67–74.
- Vinale F, Sivasithamparam K (2014) *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Vincent J (1970) The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*, 1-13.
- Viruel E, Lucca M, Siñeriz F (2011) Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of microbiology*, 193(7), 489-496.
- Viruel E, Erazú LE, Calsina LM, et al (2014) Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *J Soil Sci Plant Nutr* 14:819–831.
- Vivekananthan R, Ravi M, Saravanakumar D, Kumar N (2004) Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection*, 23(11), 1061-1067.

## Bibliografía

- Waffenschmidt S, Jaenicke L (1987) Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2, 2'-bicinchoninate. *Analytical biochemistry*, 165(2), 337-340.
- Walterson AM, Stavriniades J (2015) *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Rev* 39:968–984.
- Wang H, Wen K, Zhao X, et al (2009) The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop protection*, 28(8), 634-639.
- Wang T-T, Ding P, Chen P, et al (2017) Complete genome sequence of endophyte *Bacillus flexus* KLBMP 4941 reveals its plant growth promotion mechanism and genetic basis for salt tolerance. *J Biotechnol* 260:38–41.
- Wang X, Luo C, Chen Z (2012) Genome sequence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. strain 916. *Journal of bacteriology*, 194(14), 3760-3761.
- Wani S, Chand S, Ali T (2013) Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production: an overview. *Current Agriculture Research Journal*, 1(1), 35-38.
- Wanner B, Chang B (1987) The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5569-5574.
- Webster G, Jain V, Davey M, Gough C (1998) The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant, Cell & Environment*, 21(4), 373-383.
- Wenda S, Illner S, Mell A, Kragl U (2011) Industrial biotechnology—the future of green chemistry? *Green Chem* 13:3007. doi: 10.1039/c1gc15579b
- Wexler M, Yeoman KH, Stevens JB, et al (2002) The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. *Mol Microbiol* 41:801–816.
- White JF, Torres MS, Sullivan RF, et al (2014) Occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids. *Microsc Res Tech* 77:874–885.
- Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, et al (2008) Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *J Bacteriol* 190:4706–15.
- Williams J, Kubelik A, Livak K (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Winkelmann G (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals*, 20(3-4), 379.
- Winn M, Casey E, Habimana O, et al (2014) Characteristics of *Streptomyces griseus* biofilms in continuous flow tubular reactors. *FEMS Microbiol Lett* 352:157–164.
- Woese C, Fox G (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.

- Wood C, Reeves D, Mimerick D (1994) Relationships between chlorophyll meter reading and crop chlorophyll concentration, N status and yield. *Rev. Proc. Agron. Soc. New Zealand*, 23, 1-9.
- Wu S, Cao Z, Li Z, et al (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1), 155-166.
- Xu G, Fan X, Miller AJ (2012) Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 63:153–182.
- Xu T, Li Y, Zeng X, et al (2017) Isolation and evaluation of endophytic *Streptomyces endus* OsiSh-2 with potential application for biocontrol of rice blast disease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1149-1157.
- Yang M, Mavrodi D, Mavrodi O (2011) Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields. *Phytopathology*, 101(12), 1481-1491
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35:155–189.
- Yanni YG, Rizk RY, Corich V, et al (1997) Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194:99–114.
- Yanni YG, Rizk RY, El-Fattah FKA, et al (2001) The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* with rice roots. *Funct Plant Biol* 28:845.
- Yanni Y, Dazzo F, Squartini A, et al (2016) Assessment of the natural endophytic association between *Rhizobium* and wheat and its ability to increase wheat production in the Nile delta. *Plant and soil*, 407(1-2), 367-383.
- Yekkour A, Sabaou N, Zitouni A, et al (2012) Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. *Lett Appl Microbiol* 55:427–435.
- Yildirim E, Turan M, Ekinçi M, Dursun A (2015) Growth and Mineral Content of Cabbage Seedlings in Response to Nitrogen Fixing Rhizobacteria Treatment. *Rom Biotechnol Lett*, 20(6), 10929-10935.
- Yin Y, Mao X, Yang J, et al (2012) dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic acids research*, 40(W1), W445-W451.
- Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, et al (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617.
- Young N, Debelle F, Olyourd G, et al (2011) The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480:520–524.
- Yu L, Yan X, Wang L, et al (2012) Molecular cloning and functional characterization of an ATP-binding cassette transporter OtrC from *Streptomyces rimosus*. *BMC Biotechnol* 12:52.
- Zaidi A, Khan M, Ahemad M, Oves M (2009) Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56:263–284.

## Bibliografía

- Zaluga J, Heylen K, Hoorde K Van, Hoste B (2011) GyrB sequence analysis and MALDI-TOF MS as identification tools for plant pathogenic *Clavibacter*. *Systematic and applied microbiology*, 34(6), 400-407.
- Zanden J (1991) The first green revolution: the growth of production and productivity in European agriculture, 1870-1914.
- Zaugg H, West R, Tateishi I, Randall D (2011) Mendeleev: Creating communities of scholarly inquiry through research collaboration. *TechTrends*, 55(1), 32.
- Zerbino D, Birney E (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.
- Zhang L, Shi X, Si M, et al (2014) *Rhizobium smilacinae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the leaf of *Smilacina japonica*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(4), 715-723.
- Zhang L, Zhong J, Liu H, et al (2017) Complete genome sequence of the drought resistance-promoting endophyte *Klebsiella* sp. LTGPAF-6F. *J Biotechnol* 246:36–39.
- Zhang X, Gao J, Cao Y (2015) *Rhizobium oryzicola* sp. nov., potential plant-growth-promoting endophytic bacteria isolated from rice roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 2931-2936.
- Zhao K, Penttinen P, Guan T, et al (2011) The Diversity and Anti-Microbial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau, China. *Curr Microbiol* 62:182–190.
- Zheng L, Whitet RH, Cash VL, et al (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Biochemistry* 90:2754–2758.
- Zhu B, Chen M, Lin L, et al (2012) Genome sequence of *Enterobacter* sp. strain SP1, an endophytic nitrogen-fixing bacterium isolated from sugarcane. *J Bacteriol* 194:6963–4.
- Ziegler D, Mariotti A, Pflüger V, et al (2012) In situ identification of plant-invasive bacteria with MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*, 7(5), e37189
- Zou X, Binkley D, Doxtader K (1992) A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and Soil*, 147(2), 243-250.
- Zurdo-Pineiro J, Rivas R (2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 784-788.