



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO de QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA AL CULTIVO DE
TOMATE: CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTE-
RIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL***

Tesista: Ing. Agrónomo Santiago A. Vio

Directora: Dra. María Flavia Luna

Año: 2023

El presente trabajo de tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el área de Química, fue realizado en el Laboratorio de *Microorganismos de Aplicación en Agricultura* (MAALab) perteneciente al *Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales* (CINDEFI, CONICET CCT La Plata - UNLP), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Flavia Luna, Investigadora independiente CIC-PBA.



Reconocimientos

A la **Universidad Nacional de La Plata**, por haberme becado para dedicarme a este trabajo de tesis, y haberme otorgado el subsidio Jóvenes Investigadores con el cual se financió parte de los trabajos descriptos en esta tesis. Un reconocimiento especial a la **Facultad de Ciencias Exactas** por mi formación de posgrado.

A la **Comisión de Investigaciones Científicas (CIC)** y a la **UNLP** por la financiación que permitió llevar a cabo gran parte de esta Tesis doctoral.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)** y a todos sus integrantes, por permitirme realizar los trabajos necesarios para llevar a cabo esta Tesis.

A la **Chacra Experimental Gorina** (Ministerio de Desarrollo Agrario de la Provincia de Buenos Aires), por haberme brindado la posibilidad de realizar los ensayos en cultivos hortícolas que se describen en este trabajo.

Al vivero hortícola **Babyplant** y al Ing. Agr. Julián Villagra por su predisposición para brindarnos su tiempo y recursos productivos para llevar adelante varios de los ensayos que se describen en este trabajo.

Al **Instituto Spegazzini**, por gentilmente ceder las cepas de hongos utilizadas en los ensayos que detallan en este trabajo.

A la **Estación Experimental del Zaidín** y el **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**, en especial al Dr. Manuel Fernández-López y su equipo de trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y poder realizar una pasantía de excelente calidad académica en la ciudad de Granada (España) donde me interioricé en el análisis ecológico de las comunidades bacterianas.

A la empresa **Compo Expert S.A.** por su predisposición en atender mis necesidades y su ayuda económica para solventar mi pasantía en España.

Al **Laboratorio de Ecología Microbiana Aplicada, de la Universidad de la Frontera** (Temuco, Chile), especialmente al Dr. Milko A. Jorquera y su equipo de trabajo, quienes me recibieron cálidamente y posibilitaron varios de los estudios moleculares que se describen en este trabajo.

A la **Red Latinoamericana de Ciencias Biológicas (RELAB)**, por su soporte económico que facilitó mi pasantía en Chile.

Agradecimientos

Llegado el final de esta etapa, solo tengo palabras de agradecimiento para quienes de alguna u otra manera colaboraron para que este trabajo pueda concretarse.

A Flavia, por su profesionalismo y vocación de enseñanza, su dedicación y compromiso fueron realmente determinantes en el desarrollo de este trabajo. Desde lo personal, por su confianza para incorporarme al grupo de trabajo y permitirme descubrir esta actividad; por sus palabras positivas y fuerza de voluntad contagiosa.

A todo el grupo del Lab4, que desde el primer momento me recibieron con los brazos abiertos, y siempre estuvieron y me apoyaron durante toda la realización de este trabajo. A Galle, Mari y Ceci, por su incommensurable ayuda en muchos de los ensayos, y por los lindos momentos compartidos entre mates; Pame y Sole, por acompañarme siempre, por sus enseñanzas, las charlas y las risas de siempre. Indudablemente este grupo representa una parte linda de mi vida.

A mi familia, por ser el apoyo y la base fundamental de todo.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1: introducción, hipótesis y objetivos	15
1.1 INTRODUCCIÓN	17
1.1.1. EL HOLOBIONTE VEGETAL COMO ENTIDAD FUNCIONAL Y EL ROL DE LA MICROBIOTA	17
1.1.2. MICROHÁBITATS DEL HOLOBIONTE VEGETAL Y FACTORES QUE MODULAN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS	19
1.1.2.1 El suelo y su microbiota	23
1.1.2.2 Microhábitat radical y su microbiota	24
1.1.2.3 Microhábitats de órganos vegetales aéreos y su microbiota	26
1.1.2.4 Microhábitats de la semilla y su microbiota	27
1.1.3. ROL BENÉFICO DE LA MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA A LAS PLANTAS	28
1.1.4. PGPB CON CARÁCTER ENDOFÍTICO Y SUS VENTAJAS	29
1.1.5. AGRICULTURA SUSTENTABLE Y BIODIVERSIDAD	31
1.1.6. MICROBIOTA Y BIODIVERSIDAD: CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS	32
1.1.7. METODOLOGÍAS Y ENFOQUES DE ESTUDIO DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN MUESTRAS AMBIENTALES	34
1.1.7.1 Técnicas dependientes de cultivo	36
1.1.7.2 Técnicas independientes de cultivo	36
1.1.8. INGENIERÍA DE MICROBIOMAS: EMPLEO Y MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA VEGETAL	38
1.1.9. BIOINSUMOS MICROBIANOS A BASE DE PGPB: ESQUEMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO	42
1.1.10. HORTICULTURA EN EL CINTURÓN HORTÍCOLA PLATENSE (CHP): MODO DE PRODUCCIÓN	45
1.1.11. LA PLANTA DE TOMATE: CULTIVO EN EL CHP Y CARACTERÍSTICAS	46
1.1.11.1 Cultivo en el chp	46
1.1.11.2 Características morfológicas de la planta de tomate	47
1.1.12. INVESTIGACIÓN DONDE SE ENMARCA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO	49
1.2 HIPÓTESIS	52
1.3 OBJETIVOS	53
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	53
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
1.4 SITIOS DE ESTUDIO DEL CHP Y DISEÑO GENERAL DEL EXPERIMENTO	54
Capítulo 2: microbiota bacteriana asociada a plantas de tomate var. <i>Elpida</i> cultivadas en el chp: caracterización por técnicas moleculares	57
2.1 INTRODUCCIÓN	59
2.1.1. COMUNIDADES BACTERIANAS DEL ENTORNO VEGETAL: ABUNDANCIA, COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA	59
2.1.2. MICROBIOTA ASOCIADA A PLANTAS DE TOMATE	62
2.1.3. FUNCIONALIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS	67
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	70
2.2.1. TOMA DE MUESTRAS A CAMPO Y PROCESAMIENTO EN LABORATORIO	70
2.2.1.1 Control del procedimiento de obtención de adn bacteriano de comunidades endófitas	72
2.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN METAGENÓMICO BACTERIANO A PARTIR DE MUESTRAS AMBIENTALES. CONTROL DE CALIDAD DEL ADN OBTENIDO.	73
2.2.3. CARACTERIZACIÓN A NIVEL TAXONÓMICO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE TOMATE	74
2.2.3.1 Cuantificación de las comunidades bacterianas totales mediante q-pcr	75
2.2.3.2 Caracterización de la composición y estructura de las comunidades bacterianas asociada al cultivo de tomate mediante metabarcoding.	76
2.2.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL LIGADA A ACTIVIDADES DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE TOMATE	79

2.2.4.1	Cuantificación de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno, mineralizadoras de fósforo orgánico y con actividad acc-deaminasa.	79
2.2.4.2	Diversidad de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo	81
2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
2.3.1.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS DE AMBOS SITIOS DE ESTUDIO	84
2.3.2.	CALIDAD DE LAS MUESTRAS VEGETALES Y DE ADN	85
2.3.3.	CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS TOTALES ASOCIADAS AL CULTIVO DE TOMATE	86
2.3.3.1	Cuantificación mediante q-pcr	86
2.3.3.2	Composición y estructura de las comunidades bacterianas asociada al cultivo de tomate. Análisis bioinformático de datos de secuenciación masiva.	88
2.3.4.	CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A CIERTAS FUNCIONES DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL	106
2.3.4.1	Cuantificación absoluta y relativa de genes nifh, phod y acds mediante q-pcr	106
2.3.4.2	Diversidad de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo asociadas al cultivo de tomate	109
2.4	DISCUSIÓN GENERAL	114

Capítulo 3: caracterización y selección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate 121

3.1	INTRODUCCIÓN	123
3.1.1.	TÉCNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE PGPB	123
3.1.2.	PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL: MECANISMOS Y EFECTOS	124
3.1.3.	MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE ASOCIADA A PLANTAS DE TOMATE	128
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	135
3.2.1.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS.	135
3.2.1.1	Procedimiento de obtención de aislamientos bacterianos endófitos	138
3.2.2.	RECuento POBLACIONAL, AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y MANTENIMIENTO DE LA COLECCIÓN	138
3.2.3.	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ENDÓFITOS	140
3.2.4.	CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A SU POTENCIAL DE COLONIZACIÓN VEGETAL.	141
3.2.4.1	Caracterización de enzimas líticas asociadas a la colonización vegetal y cálculo de icec	142
3.2.4.2	Determinación de formación de biofilm en placas multipocillo	143
3.2.4.3	Cálculo del índice de colonización vegetal - icv	144
3.2.5.	CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A SU POTENCIAL ANTAGONISMO CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS	145
3.2.5.1	Determinación de enzimas líticas de efecto antagonista. Cálculo de índice icea.	145
3.2.5.2	Ensayos in vitro de antagonismo contra hongos fitopatógenos. Cálculo de índices picr e ipa.	147
3.2.5.3	Cálculo de índice de potencial biocontrol – ipb.	150
3.2.5.4	Inhibición de la germinación de conidios de hongos fitopatógenos	151
3.2.5.5	Ensayos de biocontrol in vivo en germinación de semillas de lechuga	152
3.2.6.	CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL	153
3.2.6.1	Determinación cuali-cuantitativa de solubilización de formas insolubles de fósforo	154
3.2.6.2	Determinación de producción de sideróforos	156
3.2.6.3	Determinación de la capacidad de fijación biológica del nitrógeno atmosférico	157
3.2.6.4	Determinación de aislamientos productores de fitohormonas de tipo auxínicas	157
3.2.6.5	Cálculo del índices de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (impcv) y de potencial promoción del crecimiento vegetal (ippcv). Selección de aislamientos promisorios.	159

3.2.7.	EVALUACIÓN DEL EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS DE LECHUGA Y TOMATE	160
3.2.7.1	Ensayos en plantas de lechuga y tomate en etapa de plantin.	160
3.2.7.2	Ensayos en plantas de lechuga y tomate en etapa productiva	162
3.2.8.	APROXIMACIÓN AL NIVEL TAXONÓMICO ESPECIE DE AISLAMIENTOS CON MEJORES RESULTADOS EN ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	164
3.2.8.1	Aproximación a las especies del género bacillus y pseudomonas	164
3.3	RESULTADOS	166
3.3.1.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS, CONTROL DE DESINFECCIÓN Y RECuentOS BACTERIANOS.	166
3.3.2.	SELECCIÓN DE MORFOTIPOS, AISLAMIENTO Y GENERACIÓN DE LA COLECCIÓN	167
3.3.3.	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS DE LA COLECCIÓN	168
3.3.4.	POTENCIAL DE COLONIZACIÓN VEGETAL	172
3.3.4.1	Actividad de enzimas líticas extracelulares con implicancia en la colonización vegetal	172
3.3.4.2	Capacidad de crecimiento formando biofilm	174
3.3.4.3	Índice de colonización vegetal: icv	175
3.3.5.	POTENCIAL ANTAGONISMO CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS	176
3.3.5.1	Producción de enzimas líticas extracelulares con efecto antagonista	176
3.3.5.2	Ensayos de antagonismo en cultivos duales en placa contra hongos fitopatógenos	179
3.3.5.3	Inhibición de la germinación de conidios	188
3.3.5.4	Biocontrol en proceso de germinación de lechuga <i>in vitro</i>	192
3.3.6.	CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A PROPIEDADES PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL	194
3.3.6.1	Determinación cuali-cuantitativa de la solubilización de fósforo	194
3.3.6.2	Producción de sideróforos	196
3.3.6.3	Determinación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno	197
3.3.6.4	Producción de fitohormonas de tipo auxínicas	198
3.3.6.5	Índices sobre caracterización de promoción del crecimiento vegetal y selección de aislamientos promisorios	200
3.3.7.	EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL <i>IN VIVO</i> DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS SELECCIONADOS	203
3.3.7.1	Ensayos en etapa de plantin	204
3.3.7.2	Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en etapa productiva bajo cubierta	210
3.3.8.	APROXIMACIÓN A NIVEL TAXONÓMICO ESPECIE DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS SELECCIONADOS	216
3.4	DISCUSIÓN GENERAL	219
Capitulo 4: conclusiones finales y perspectivas		225
4.1	CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	227
Capitulo 5: anexo a. Resultados y análisis estadísticos aplicados en los estudios descriptos en el capítulo 2		231
5.1	RESULTADOS DE LAS EXTRACCIONES DE ADN	233
5.2	CUANTIFICACIÓN DE GENES MEDIANTE QPCR: FUNDAMENTOS, METODOLOGÍA Y APLICACIÓN.	234
5.2.1.	RESULTADOS DE QPCR DEL GEN ARNR 16S	235
5.2.1.1	Cuantificación en muestras de suelo y rizosfera	235
5.2.1.2	Cuantificación en muestras de endosfera de raíz, tallo y fruto	237
5.3	SECUENCIACIÓN MASIVA POR TECNOLOGÍA ILLUMINA. METABARCODING.	242
5.3.1.	RESULTADOS CRUDOS DE SECUENCIACIÓN, FILTRADO, AGRUPACIÓN EN OTUS Y COBERTURA DE SECUENCIACIÓN	245
5.3.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÍNDICES DE ALFA-DIVERSIDAD	247
5.3.2.1	ANAVA del índice chao-1 a nivel de phylum	247
5.3.2.2	ANAVA del índice chao-1 a nivel de orden	248
5.3.2.3	ANAVA del índice chao-1 a nivel de género	249
5.3.2.4	ANAVA del índice de shannon-wiener a nivel de phylum	250
5.3.2.5	ANAVA del índice de shannon-wiener a nivel de orden	251

5.3.2.6	ANAVA del índice de shannon-wiener a nivel de género	252
5.3.2.7	ANAVA del índice richness a nivel de otu	253
5.3.2.8	ANAVA del índice chao-1 a nivel de otu	254
5.3.2.9	ANAVA del índice shannon-wiener a nivel de otu	255
5.3.2.10	ANAVA del índice inversa de simpson a nivel de otu	256
5.3.2.11	ANAVA del índice evenness a nivel de otu	257
5.4	RESULTADOS DE QPCR DE GENES FUNCIONALES	258
5.4.1.	CUANTIFICACIÓN DEL GEN <i>NIFH</i>	258
5.4.1.1	Construcción de curva estándar	258
5.4.1.2	Resultados de cuantificación del gen <i>nifh</i>	259
5.4.2.	CUANTIFICACIÓN DEL GEN <i>PHOD</i> .	262
5.4.2.1	Construcción de las curva estándar.	262
5.4.2.2	Resultados de cuantificación del gen <i>phod</i>	264
5.4.3.	CUANTIFICACIÓN DEL GEN <i>ACDS</i> .	266
5.4.3.1	Construcción de la curva estándar.	266
5.4.3.2	Resultados de cuantificación del gen <i>acds</i> en muestras ambientales de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de tomate.	267
5.4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE GENES FUNCIONALES RELATIVIZADOS AL GEN ARNR 16S	269
5.4.4.1	Abundancia relativa del gen <i>nifh</i> respecto al gen ARNr 16s.	269
5.4.4.2	Abundancia del gen <i>phod</i> relativizada a la abundancia del gen <i>arnr 16s</i>	270
5.4.4.3	Abundancia del gen <i>acds</i> relativizada a la abundancia del gen <i>arnr 16s</i>	271
5.5	CARACTERIZACIÓN POR HUELLA GENÉTICA O <i>FINGERPRINT</i> . DGGE	273
5.5.1.	PUESTA A PUNTO DE LOS GRADIENTES DESNATURALIZANTES PARA LA DGGE DE LOS GENES <i>NIFH</i> Y <i>PHOD</i>	274
5.5.2.	DGGE DEL GEN <i>NIFH</i>	275
5.5.2.1	ANAVA del índice riqueza (s)	276
5.5.2.2	ANAVA del índice shannon-wiener (h)	277
5.5.2.3	ANAVA del índice inversa de simpson (1/d)	278
5.5.3.	DGGE DEL GEN <i>PHOD</i>	279
5.5.3.1	ANAVA del índice riqueza (s)	279
5.5.3.2	ANAVA del índice shannon-wiener (h)	280
5.5.3.3	ANAVA del índice inversa de simpson (1/d)	281

Capítulo 5: anexo B. resultados y análisis estadísticos aplicados en los estudios descriptos en el capítulo 3

283

6.1	AISLAMIENTOS BACTERIANOS: RECUENTO POBLACIONAL Y CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA	285
6.1.1	RECUENTO POBLACIONAL	285
6.1.1.1	Análisis estadístico de las poblaciones bacterianas (ufc g^{-1})	286
6.1.2	ASIGNACIÓN TAXONÓMICA DE AISLAMIENTOS ENDÓFITOS	287
6.2	CARACTERIZACIÓN RELACIONADA A LA COLONIZACIÓN VEGETAL Y LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA <i>IN VITRO</i>	291
6.2.1	RESUMEN DE ÍNDICES	291
6.2.2	ENSAYOS DE ANTAGONISMO	305
6.2.2.1	Ensayos de germinación de conidios	305
6.2.2.2	Antagonismo contra <i>botrytis cinerea</i> en germinación de semillas de lechuga	309
6.2.2.3	Análisis de componentes principales sobre índices de antagonismo	310
6.3	CARACTERIZACIÓN RELACIONADA A LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL <i>IN VITRO</i>	313
6.3.1	RESUMEN DE INDICES	313
6.3.1.1	Análisis de componentes principales sobre índices de promoción del crecimiento vegetal	327
6.3.2	ENSAYOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVO DE LECHUGA Y TOMATE <i>IN VIVO</i>	328
6.3.2.1	Cultivos bacterianos para ensayos de promoción del crecimiento vegetal <i>in vivo</i>	328
6.3.2.2	Análisis estadístico de los ensayos de promoción del crecimiento vegetal en etapa de plantin	329
6.3.2.3	Análisis de suelos de la estación experimental gorina (mda)	337

Capitulo 5: anexo c. medios de cultivo y preparaciones	339
7.1 ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	341
7.1.1 MÉTODO DE LA BICAPA PARA LA DETERMINACIÓN DE SIDERÓFOROS	343
Referencias bibliográficas	347

CAPÍTULO 1:
INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1. EL HOLOBIONTE VEGETAL COMO ENTIDAD FUNCIONAL Y EL ROL DE LA MICROBIOTA

Los microorganismos son las formas de vida más diversas (Lennon y Locey 2020) y las más abundantes después de las plantas (Bar-On et al., 2018); se estima que constituyen alrededor de un 20% de la biomasa de la Tierra representada en un 75 % por bacterias; habitan casi todos los entornos imaginables y comprenden la mayor parte de la diversidad orgánica y evolutiva del planeta. En la naturaleza, plantas y animales (incluido el hombre) están asociados con diversos microorganismos tales como arqueas, bacterias, hongos y protistas (Rosenberg y Rosenberg, 2022). Durante los últimos 500 millones de años, junto con la evolución y diversificación de animales y plantas, los microorganismos desarrollaron varios mecanismos para colonizar y proliferar sobre y dentro de estos hospederos gracias a su alta diversidad genética y metabólica, pudiendo establecer una amplia gama de interacciones beneficiosas, neutras o perjudiciales (Berg et al., 2020). Tal es así, que macro y microorganismos han co-evolucionado hasta tal punto que los fenotipos individuales de los macroorganismos se ven como resultado de estas interacciones complejas que resultan de la expresión combinada del hospedero y los genomas microbianos asociados. Esto ha llevado a la generalización de los conceptos de *holobionte* –entidad funcional conformada por el hospedero multicelular y los microorganismos asociados– y *hologenoma* –la suma de la información genética del holobionte– (Rosenberg y Rosenberg, 2022). En cuanto al componente microbiano del holobionte se lo ha denominado con el término *microbiota*, y es considerada el conjunto de microorganismos que habita un ambiente determinado. Las investigaciones en los temas relacionados a estos términos abarcan diferentes campos y han evolucionado muy rápidamente en las últimas décadas convirtiéndose en tópicos de gran interés público y científico. Este rápido crecimiento no fue acompañado de consenso en cuanto al uso de los términos microbiota y microbioma, ya que en muchos casos se usan como sinónimos y en otros, si bien se definen de manera diferente, existen discrepancias principalmente en la definición del término microbioma. En este trabajo, no utilizaremos los términos como sinónimos y consideraremos una definición de microbioma basada en la dada por Whipps y colaboradores en 1988 y mejorada por Lederberg (2001) considerando los últimos desarrollos tecnológicos, y que se menciona en la literatura como la más citada: un microbioma dentro de un contexto ecológico, se define como una “comunidad de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos dentro de un cuerpo, espacio u otro entorno”, es decir, en un hábitat razonablemente bien definido con determinadas propiedades (Berg et al., 2020). En el caso del holobionte vegetal, la microbiota asociada se denomina *fitomicrobiota*. Si bien las plantas han desarrollado sus propias estrategias para crecer, desarrollarse y sobrellevar los estreses bióticos y abióticos que deben superar en la naturaleza, han delegado a su *fitomicrobiota* ciertas funciones relacionadas con la nutrición y la salud vegetal, tales como la regulación de los niveles hormonales del vegetal para estimular el crecimiento, la movilización de nutrientes, la supresión de enfermedades –por ejemplo, por inducción de resistencia sistémica– la mayor tolerancia al estrés abiótico, entre otras (Lyu et al 2021). Durante casi un siglo, los científicos han informado sobre la importancia de la microbiota del suelo (Waksman, 1927); sin embargo, hasta hace poco tiempo se subestimaba la complejidad de la fitomicrobiota. El interés por la microbiota vegetal se convirtió en un *hot spot* de las investigaciones cuando la edición de agosto de 2012 de la revista *Nature* dedicó un comentario y su portada a dos artículos –Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012– describiendo la

microbiota bacteriana de la raíz de la planta *Arabidopsis thaliana*, estudios que definieron su importancia y los estándares metodológicos para futuras investigaciones (Chialva et al., 2022). Un aumento abrupto en relación al estudio de la fitomicrobiota ha sido plasmado en una multitud de artículos publicados (>99% de los artículos sobre este tema se publicaron después de 2012, Chialva et al., 2022), en relación tanto a ambientes naturales como ecosistemas agrícolas manejados intensivamente, mostrando el interés cada vez mayor en estos temas (palabras claves: *plant microbiota*, Buscador PubMed del National Center for Biotechnology Information, NCBI) (Figura 1.1.1a).

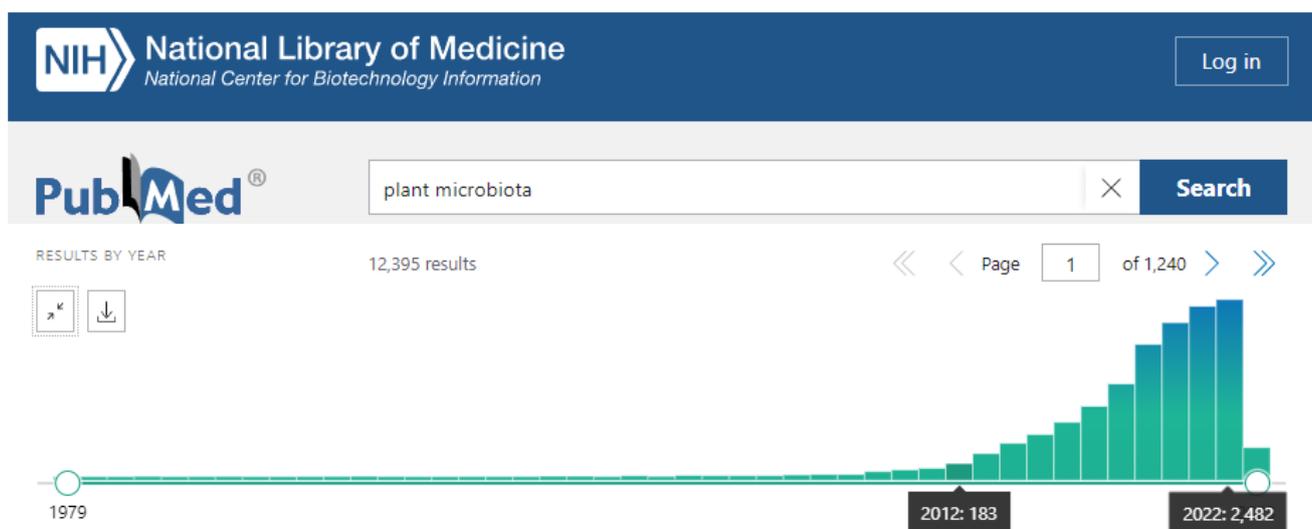


Figura 1.1.1a Resultados de la búsqueda *plant microbiota* en la biblioteca del NCBI que muestra el aumento de las publicaciones sobre el estudio de la microbiota de las plantas en los últimos 10 años.

Estas interacciones entre las plantas y su fitomicrobiota no son unidireccionales, las plantas también proporcionan un hábitat adecuado para el crecimiento de los microorganismos, proveyendo nutrientes y un ambiente favorable para su desarrollo, no sólo en su superficie sino también en su interior. Además, la salud y el desarrollo de las plantas están estrechamente ligados a la salud del suelo en el cual crecen, que también está ligada a su microbiota (Wall et al., 2015). En estos ambientes, la diversidad microbiana resulta esencial para garantizar los ciclos de nutrientes y los procesos de descomposición del material orgánico, mediante procesos de oxidación, reducción, degradación y mineralización, así como por interacciones inter e intraespecíficas reguladas por los microorganismos que los habitan. En el contexto de la agricultura, la productividad y el rendimiento de los cultivos dependen del éxito del holobionte vegetal, de manera que la actividad y diversidad de la microbiota asociada a las plantas y al suelo circundante constituyen algunos de los condicionantes de la estabilidad y funcionamiento de los agroecosistemas (Lyu et al., 2021).

Debido al gran potencial de las comunidades microbianas del holobionte vegetal para mejorar el crecimiento y la salud de las plantas, en las últimas décadas se ha puesto énfasis en las investigaciones acerca del rol de estas comunidades microbianas con idea de responder preguntas tales como:

¿Cuáles son los microorganismos que se asocian a las plantas?

¿Dónde están ubicados?

¿De dónde provienen los microorganismos que habitan cada microhábitat vegetal?

¿Cuál/es son los factores que afectan la composición de esta microbiota vegetal?

¿Cómo interactúan con la planta?

¿Qué funciones están llevando a cabo?

¿Puede modificarse la microbiota vegetal para mejorar el crecimiento de las plantas?

¿Existe un microbioma ideal para un holobionte vegetal?

Teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo, la revisión bibliográfica de aquí en adelante se enfocó específicamente en **la microbiota bacteriana** asociada a un determinado microhábitat, con énfasis en aquella que establece interacciones beneficiosas con las plantas para mejorar la sustentabilidad de los agroecosistemas.

1.1.2. MICROHÁBITATS DEL HOLOBIONTE VEGETAL Y FACTORES QUE MODULAN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS

El creciente interés en el estudio de la microbiota bacteriana asociada a las plantas, que en un principio fue descriptivo, actualmente también está dirigido hacia el conocimiento de los factores que las modulan ([Arif et al., 2020](#); [Chialva et al., 2022](#)). Tal como se mencionó previamente, las bacterias tienen la capacidad de colonizar las plantas en sus diferentes microhábitats, tanto en entornos naturales como agrícolas, los cuales pueden describirse como:

- Rizosfera, descrita inicialmente por [Hiltner en 1904](#), se circunscribe a una delgada capa de suelo que rodea el sistema radical de las plantas y está activamente influenciada por su actividad metabólica.
- Rizoplano: tejidos superficiales de las raíces de las plantas.
- Filoplano: tejidos superficiales de órganos aéreos (tallo, hojas, flores, frutos, estomas, tricomas).

- Endosfera: tejidos internos de los diferentes órganos vegetales (raíz, tallo, hoja, fruto, semilla), tanto en espacios intercelulares como intracelulares, habitados por microorganismos denominados endófitos¹ (Hardoim et al., 2015).

Los diferentes microhábitats del holobionte vegetal están determinados por características propias que dan origen a una gran diversidad de nichos ecológicos² únicos, y están colonizados por microorganismos que consiguen adaptarse a dichos entornos, dando lugar a complejas comunidades microbianas de estructura y funcionalidad específicas (Figueiredo Santos y Lopes Olivares, 2021; Fitzpatrick et al., 2020). Tal como se definirá más adelante en este capítulo, estas comunidades bacterianas se caracterizan en cuanto a su cantidad de integrantes (abundancia), a cuáles son sus integrantes (composición), a cuántos integrantes distintos hay (riqueza) y en qué proporción están (abundancia relativa). En la [Figura 1.1.2a](#) se muestran los diferentes microhábitats vegetales y se mencionan los factores bióticos y abióticos que influyen sobre sus características, y que pueden modular la microbiota bacteriana asociada, los cuales se describen a continuación:

- **Factor vegetal:**

- **La especie y el genotipo de la planta** (Lechuga, *Lactuca sativa*; Tomate, *Solanum lycopersicum* en sus distintas variedades genéticas: var. *cerasiforme*, var. *esculentum*, var. *grandiflorum*).
- **El tipo de órgano vegetal** (raíz, tallo, hoja, pecíolo, sépalo, pétalo, semilla).
- **La edad y el estado fenológico de las plantas** (plantas jóvenes o adultas; en estado vegetativo, floración, senescencia, etc.).
- **El estado hídrico, nutricional y sanitario de la planta** (si presenta estrés hídrico o por falta de nutrientes).

- **Factor geográfico:**

- **La ubicación geográfica** en sus distintas escalas –global, regional, local– determina variables como el relieve, la altitud, la cercanía a cursos de agua, etc., que modifican tanto la ocurrencia y magnitud de las variables ambientales, así como las características locales determinantes (tipo de suelo, flora y fauna predominante, etc.) y **la microbiota del entorno**.

¹ La etimología del término endófito deriva del griego *endon* (dentro) y *phyton* (planta), haciendo referencia al interior de los tejidos vegetales.

²En sentido amplio, no sólo refiere al espacio físico ocupado por un organismo (nicho espacial o de hábitat), sino también a su papel funcional en la comunidad (nicho trófico) y a su posición en los gradientes ambientales de temperatura, humedad, pH, suelos, etc. (nicho multidimensional o de hipervolumen) (Polechová y Storch, 2018)

- **Factor climático:**
 - **Las condiciones ambientales** (temperatura, humedad, viento, precipitaciones, heliofanía, radiaciones, etc.).
- **Factor edáfico:**
 - **Las características físico-químicas del suelo** (estructura y tipo de suelo, densidad, pH, conductividad eléctrica, salinidad, etc.) y **biológicas del suelo** (meso y macro fauna, comunidades microbianas, etc.). Las variables climáticas, la geomorfología y el tipo del suelo dependen en gran medida del contexto, estando determinados por la **ubicación geográfica**.
- **Factor antropogénico:**
 - **La actividad agropecuaria**, afectando no solo por la práctica en sí (intensidad y tipo de prácticas agrícolas, siembra directa/labranza tradicional; manejo regenerativo/orgánico/agroecológico/convencional; inoculación con bioinsumos microbianos; fertilización; abonado; rotación de cultivos), sino también por tener injerencia sobre los otros factores con consecuencias inmediatas o en el mediano-largo plazo.

Las plantas incorporan activamente microorganismos de diferentes reservorios microbianos incluso del aire/agua circundante, pero numerosos estudios indican que el suelo es la principal fuente ambiental de las comunidades bacterianas asociadas a plantas, siendo las raíces el órgano de la planta más colonizado (Chialva et al., 2022). De acuerdo a esto, la dinámica de las comunidades bacterianas de las raíces se daría principalmente por transferencia horizontal desde el medio ambiente del suelo. Sin embargo, se ha comprobado que las semillas son una fuente importante de microorganismos y que muchos integrantes de las comunidades bacterianas de los fitomicrobiomas surgen por transferencia vertical desde las semillas hacia otros nichos de la raíz o de la parte aérea de las plantas en desarrollo (Chialva et al., 2022; Kandel et al., 2017; Mitter et al., 2017).

Una mejor comprensión de la dinámica de las comunidades bacterianas del eje suelo-rizosfera-endosfera de la microbiota proporcionará valiosa información para el diseño de estrategias que permitan su manipulación para un mejor aprovechamiento de sus servicios ecosistémicos y así mejorar la producción de los cultivos agrícolas en línea con una agricultura sustentable.

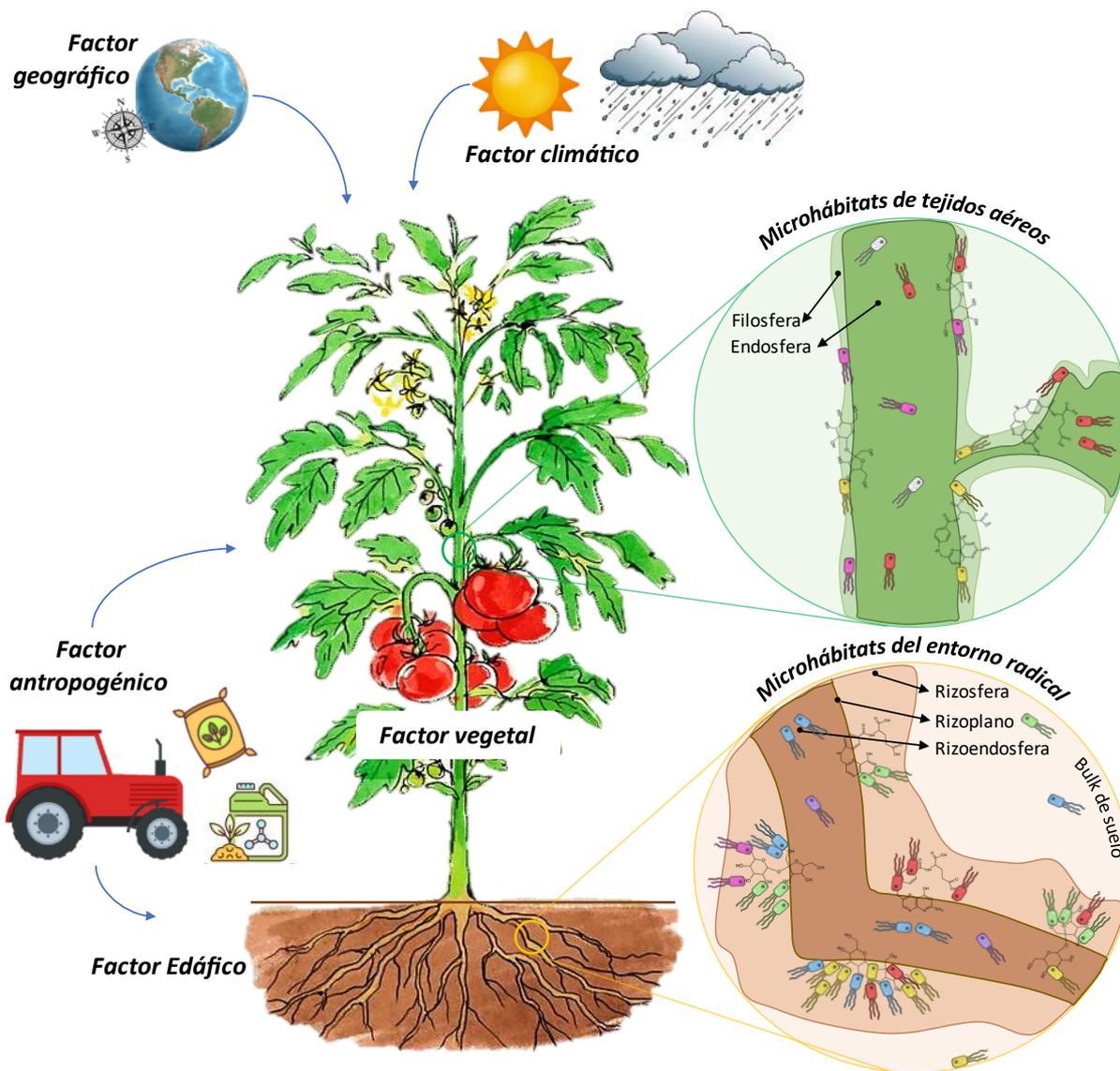


Figura 1.1.2a Holobionte vegetal y factores que afectan la abundancia, composición y estructura de la **microbiota bacteriana** que coloniza los distintos microhábitats vegetales subterráneos y aéreos.

Los factores mencionados tienen una implicancia directa sobre las comunidades bacterianas asociadas a las plantas por influir en el crecimiento y desarrollo vegetal, e indirecta por influir sobre el sistema suelo modificando tanto las variables bióticas como abióticas. A continuación, se mencionará que factores pueden tener un mayor impacto sobre las comunidades bacterianas de los diferentes microhábitats del entorno de las plantas, haciendo foco en aquellos factores que estén vinculados con el impacto del hombre o que el hombre pueda modificar (factor clima/geográfico afectarán a todos los microhábitats).

1.1.2.1 El suelo y su microbiota

El suelo ha sido descrito como el mayor reservorio de diversidad microbiana conocido (Bender et al., 2016). Las bacterias son una parte muy importante de los microorganismos que habitan el suelo (alrededor del 95% del total) (Glick et al., 2012). Es considerado un sistema vivo complejo donde tiene lugar la transformación de la materia y el ciclo de los elementos químicos, además de regular la calidad del agua y del aire (Wall et al., 2019). La biota del suelo es de importancia fundamental para el mantenimiento del equilibrio en los ecosistemas tanto naturales como en agroecosistemas (Bender et al., 2016). Los microorganismos del suelo proporcionan nutrientes al suelo al mineralizar materia orgánica, contribuyen a la estabilidad estructural de los agregados del suelo, suprimen patógenos de plantas transmitidos por el suelo y, como consecuencia, afectan la salud de las plantas y el rendimiento de los cultivos (Nielsen et al., 2011). En este sentido, los estudios de diversidad microbiana del suelo han recibido una atención creciente, y se afirma que existe una correlación positiva entre la biodiversidad de microorganismos y la estabilidad y funcionamiento del ecosistema, especialmente determinada por la funcionalidad de los taxones: a medida que aumenta la diversidad de microorganismos que aportan distintas funciones al ecosistema, la estabilidad y el funcionamiento mejora, aunque hasta cierto punto donde comienza a existir redundancia funcional y aumentos adicionales de biodiversidad no provocan una mejora directa (Nielsen et al., 2011; Pierre-Alain Maron et al., 2018)). Una mayor diversidad microbiana mejora la salud del sistema suelo y junto con ello la posibilidad de obtener más y mejores servicios ecosistémicos³.

La composición de las comunidades bacterianas del *bulk* del suelo se ve afectada en gran medida por *factores abióticos* del suelo que en orden decreciente de importancia relativa serían: el pH, la materia orgánica, el oxígeno del suelo y el estatus rédox, la disponibilidad de Nitrógeno y Fósforo, la textura y estructura, (Fierer, 2017), así como de factores bióticos del suelo (otros macro y microorganismos habitantes del suelo). Por lo tanto, cualquier acción del hombre que modifique los parámetros físico-químicos-biológicos del suelo afectará de manera indirecta su microbiota bacteriana.

En los últimos años, ha habido un gran interés sobre cómo las prácticas dominantes de manejo de los cultivos, como la labranza, la fertilización química y el uso de fitosanitarios, afectan la composición taxonómica y la diversidad microbiana del suelo (Barros-Rodríguez et al., 2021; Gupta et al., 2022). En general concluyen que se ha producido una disminución significativa de la calidad del suelo en todo el mundo debido a la salinización, contaminación por metales pesados y xenobióticos, la reducción del carbono orgánico del suelo y la pérdida de supresión natural del suelo hacia patógenos de plantas (Meena et al; 2020). Esta pérdida de calidad del suelo ha sido correlacionada con una disminución de la diversidad de macro y microorganismos (Bender et al., 2016; Fierer, 2017; Figuerola et al., 2015; Gupta et al., 2022).

³ servicios ecosistémicos: son el vínculo conceptual entre los ecosistemas, sus componentes y procesos, y los beneficios que las sociedades obtienen de los mismos (Boyd y Banzhaf, 2007).

1.1.2.2 Microhábitat radical y su microbiota

El entorno radical (rizosfera, rizoplano, rizoendosfera) de las plantas es el sitio primario de interacción planta-bacteria, ya que representa la zona de intercambio directo entre el vegetal y el suelo. Las raíces producen exudados radicales, contribuyen al intercambio de gases y de nutrientes inorgánicos, desprenden células de la cubierta de la raíz y mucílago de polisacáridos, e influyen considerablemente sobre la actividad biológica del suelo y su estructura generando un efecto atrayente sobre los microorganismos conocido como *efecto rizosférico* (Compant et al., 2019). Los exudados radicales comprenden grandes cantidades de carbono fijado fotosintéticamente que contienen una amplia gama de moléculas como carbohidratos, aminoácidos, iones de ácidos orgánicos y vitaminas. Por todo lo mencionado, las raíces en su conjunto comúnmente albergan la mayor cantidad de microorganismos cuando se compara con el resto de los ambientes:

- El número de bacterias en la rizosfera suele ser varios órdenes de magnitud más alto en comparación con el *bulk* del suelo: 10^6 - 10^{11} bacterias por gramo de rizosfera (Figura 1.1.2b) (Chialva et al., 2022; Figueiredo Santos y Olivares, 2021; Reinhold-Hurek et al., 2015), abundancia atribuida al efecto rizosférico.
- Las células bacterianas dentro de entornos endofíticos de raíces alcanzan valores de 10^4 - 10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de raíz, que es considerablemente menor en comparación con el *bulk* del suelo y la rizosfera (Bulgarelli et al., 2013). Esto sugiere que las raíces de las plantas actúan como barreras efectivas que restringen el ingreso de ciertos microorganismos a medida que los ambientes se desvían del suelo a las raíces, regulando así las comunidades microbianas que son progresivamente más acotadas (Liu et al., 2017) (Figura 1.1.2b).
- De esta cantidad de microorganismos solo un pequeño porcentaje han podido ser cultivados en los medios estándares, mientras que el resto se registra como no cultivable pero detectable por métodos moleculares (Bacterias Viables No Cultivables) (Lagos et al., 2015).

En cuanto a la composición y la estructura de la microbiota del entorno radical hay diversos factores que las pueden modular en diferente medida (Hacquard, 2016; Reinhold-Hurek et al., 2015):

- Comparando suelo con y sin la presencia de la planta se observó que coinciden en que la diversidad y la riqueza de especies en rizosfera es similar o apenas menor respecto al *bulk* de suelo, pero la composición taxonómica determina diferencias entre las comunidades de ambos microhábitats, denotando un enriquecimiento de la rizosfera en ciertos taxones específicos (Turner et al., 2013).
- Distintas especies de plantas cultivadas en un entorno de suelo similar permitieron el establecimiento de comunidades bacterianas significativamente diferentes tanto en la rizosfera como en el interior de las raíces, donde la morfología de las raíces y el tipo de rizodepósitos tuvieron un rol predominante en la

selección de la microbiota de las plantas (Chaparro et al., 2014; Hartmann et al., 2009; Reinhold-Hurek et al., 2015).

- Ensayos con más de 600 plantas de *Arabidopsis thaliana* evidenciaron que la microbiota de la rizosfera y de la endorizosfera de las plantas cultivadas en condiciones controladas en suelos naturales fue suficientemente dependiente del genotipo de la planta hospedera y permaneció sin modificaciones consistentes en diferentes tipos de suelo y etapas de desarrollo (Lundberg et al., 2012).

El análisis de numerosos estudios ha permitido proponer un proceso de enriquecimiento de tres pasos para describir la dinámica de las comunidades bacterianas del entorno radical, que inicia en el *bulk* del suelo y culmina en la endosfera radical (Figura 1.1.2b) (Bulgarelli et al., 2013; Liu et al., 2017; Reinhold-Hurek et al., 2015):

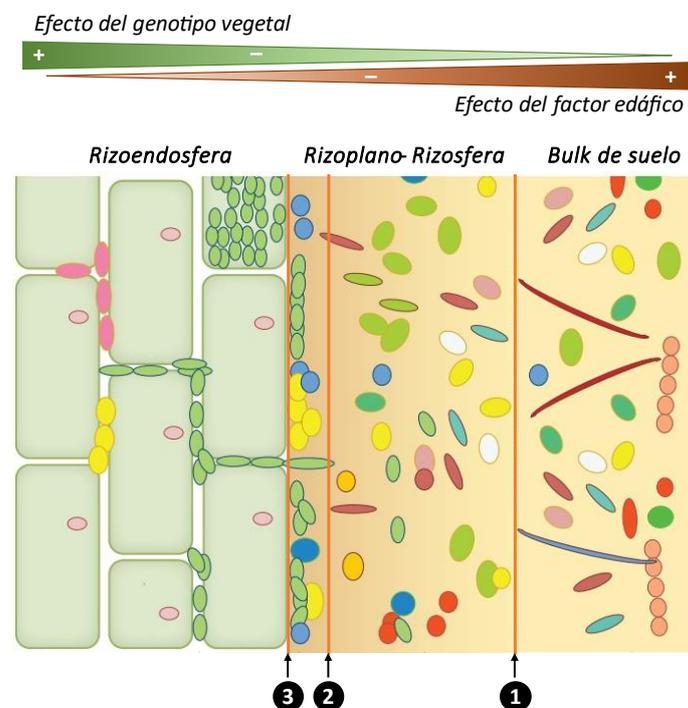


Figura 1.1.2b Modelo de enriquecimiento bacteriano de 3 pasos para los microhábitats radicales (1. Desde el bulk de suelo hacia la rizosfera; 2. Desde la rizosfera hacia el rizoplano; 3. Desde el rizoplano hacia la rizoendosfera). Adaptado de Reinhold-Hurek et al., 2015.

Desde el bulk de suelo hacia la rizosfera: las bacterias del suelo son reclutadas por las raíces de las plantas, por ello la microbiota del suelo –y por ende los factores que la modifican– será determinante en la composición y estructura de la microbiota de la rizosfera. En esta primera etapa predominan los gradientes de exudados radicales, moléculas señales, variaciones de pH, niveles de O₂. El genotipo y la especie vegetal empiezan a tener una pequeña influencia sobre las poblaciones microbianas que son atraídas hacia la rizosfera.

Desde la rizosfera hacia el rizoplano: ocurre una selección más pronunciada de la comunidad, y el genotipo vegetal tiene una influencia más significativa. La formación de biofilms⁴ o los mecanismos de adhesión específicos entran en juego en este paso del enriquecimiento.

Desde el rizoplano hacia la rizoendosfera: la especie y el genotipo vegetal influyen en mayor medida en la estructura de la comunidad endorizosférica en comparación con los otros compartimentos, y se requieren rasgos bacterianos específicos para el ingreso y establecimiento dentro del mismo. El microbioma en la endosfera de la raíz es significativamente menos diverso que los microbiomas en la rizosfera y el *bulk* del suelo (Liu et al., 2017) con comunidades bacterianas más específicas.

Lo expuesto anteriormente resalta la importancia del suelo y los microorganismos que lo habitan, sobre los cuales ejercerá la presión de selección el vegetal para definir su fitomicrobiota asociada. En este sentido y como se mencionó previamente, la inevitable modificación –en mayor o menor medida– de la microbiota del *bulk* del suelo a causa de la actividad antropogénica en los agroecosistemas puede afectar sobre las características de la fitomicrobiota.

1.1.2.3 Microhábitats de órganos vegetales aéreos y su microbiota

Los microhábitats de los órganos aéreos de las plantas han sido comparativamente menos estudiados respecto a los subterráneos. Se han encontrado grandes diferencias respecto a las características descritas con los microhábitats del entorno radical (Rilling et al., 2018).

La *filosfera* representa probablemente uno de los microhábitats más grandes de la Tierra, siendo la superficie de las hojas las que más contribuye a dicha característica (Bulgarelli et al., 2013). Las bacterias son las que mayormente predominan en la filosfera por sobre hongos y arqueas, alcanzando poblaciones de hasta 10^6 - 10^7 células cm^{-2} (Lindow y Brandl, 2003), aunque estas comunidades bacterianas resultan menos complejas en comparación con otros microhábitats vegetales (Delmotte et al., 2009). Esto último, tal vez atribuido a que los microorganismos colonizadores de la filosfera se encuentran en un ambiente más hostil que la rizosfera, ya que tienen una exposición más directa a los *fenómenos ambientales* y sus fluctuaciones (radiación, temperatura, humedad, viento) así como un menor acceso a nutrientes, lo que hace que sean factores fuertemente determinantes en la composición y estructura de estas comunidades bacterianas (Sivakumar et al., 2020). Estos factores mencionados estarán determinados por la *ubicación geográfica* y *estación del año*, que definirán la ocurrencia, magnitud y amplitud de las variables ambientales (Bao et al., 2020). Estudios en cultivos de cereales, así como en especies leñosas han mostrado que, la *especie* y *el genotipo vegetal* modulan las comunidades bacterianas de la filosfera (Laforest-Lapointe et al., 2016; Sapkota et al., 2015). Se ha reportado que los microorganismos que llegan a la filosfera provienen mayormente del aire, del agua y del suelo, usando la

⁴ biofilm: se define como una comunidad estructurada por células microbianas firmemente adheridas a una superficie y embebidas en una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (Karygianni et al., 2020).

lluvia y el viento como transporte (Bulgarelli et al., 2013). Los insectos, las plantas cercanas e incluso ciertas prácticas agrícolas (poda, cosecha, riego), pueden contribuir en el traslado y deposición de microorganismos en la filosfera (Kumar et al., 2017). La interacción planta-bacteria en la filosfera parece tener lugar únicamente en la superficie vegetal inmediata: si bien la cutícula y las moléculas de la pared celular de la planta en principio proporcionan abundante materia orgánica para el crecimiento bacteriano, los compuestos orgánicos solubles son escasos; esto determina que la liberación de exudados no sea un factor regulador clave de las comunidades bacterianas de la filosfera como sí lo es en la rizosfera (Bulgarelli et al., 2013). La colonización en la filosfera suele estar asociada a ciertas estructuras vegetales como tricomas y estomas, y también a la zona inmediata inferior de la cutícula donde forman pequeños agregados e incluso *biofilms* bacterianos (Whipps et al., 2008).

En cuanto a los microorganismos que habitan la *endosfera* de los órganos aéreos, pueden ingresar a través de estructuras como estomas, flores e incluso roturas naturales (Compant et al., 2011), pero no son la única vía de ingreso a dicho microhábitat, ya que también se ha descrito que gran parte de los endófitos se traslada desde la rizoendosfera a distintos compartimentos internos aéreos vía xilema (Compant et al., 2019). Al igual que para el entorno radical, los compartimentos endofíticos de órganos vegetales aéreos se encuentran fuertemente regulados por *el genotipo y la especie de la planta*, encontrándose diferencias entre las comunidades bacterianas de la filosfera respecto a las endófitas, incluso tratándose del mismo órgano vegetal (Campisano et al., 2014). Las investigaciones centradas en las bacterias endófitas y los diferentes compartimentos endofíticos vegetales han establecido claras diferencias entre las comunidades bacterianas presentes, resaltando el fuerte fenómeno de compartimentalización de los órganos vegetales (Dong et al., 2019).

1.1.2.4 Microhábitats de la semilla y su microbiota

En la última década se ha destacado la importancia de la semilla como órgano encargado de transmitir una microbiota específica de generación en generación, por transmisión vertical, asegurando de alguna forma la presencia de ciertos taxones bacterianos colonizando una determinada especie vegetal (Mitter et al., 2017; Omomowo y Babalola, 2019; Shade et al., 2017). Los microhábitats de la semilla poseen características particulares, como la baja actividad acuosa y acumulación de reservas, que determinan que la microbiota asociada tenga ciertos rasgos particulares como tolerancia a una alta presión osmótica o la formación de endosporas (Compant et al., 2011). La actividad amilasa, el uso de fitato, la movilidad, metabolismo de la ruta del etileno, entre otros, son actividades detectadas en la microbiota bacteriana de la semilla (Johnston-Monje y Raizada, 2011). Las bacterias que habitan tejidos internos de la semilla –el embrión o el endosperma– tienen más probabilidades de colonizar los nuevos plantines respecto a aquellos que habitan la cubierta exterior (pericarpio), debido a la mayor exposición a las condiciones ambientales que estas últimas enfrentan (Barret et al., 2016). Una vez que la semilla alcanza el suelo y absorbe agua para comenzar el proceso de germinación, se liberan en el entorno seminal –denominado espermosfera– una diversidad de metabolitos (ácidos orgánicos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos). Esto permite atraer a ciertos microorganismos del suelo para comenzar a establecer una asociación temprana en la semilla, y estos microorganismos que provienen del entorno del suelo

deberán competir con aquellos que ya están presentes en la semilla (Kumar et al., 2019). Algunos autores mostraron que las poblaciones bacterianas endófitas (del orden de 10^2 células g^{-1}) están determinadas principalmente por la especie y el genotipo vegetal en la selección de sus habitantes, siendo los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, y *Bacteroidetes* los predominantes (Wassermann et al., 2019). La asociación de semillas sanas con fuentes ambientales de microorganismos (suelo, rizosfera, filosfera y medio ambiente) asegura la germinación, el establecimiento temprano y el vigor de las plántulas en las etapas iniciales de desarrollo (Rodríguez et al. 2020). Las bacterias de la semilla pueden colonizar diferentes partes de la planta por transmisión vertical (Kavamura et al., 2019).

Todo esto denota que si bien se han identificado factores individuales que ejercen efectos sobre la microbiota asociada a los distintos microhábitats de las plantas, su acción y efecto no es individual sino que existen intrincadas interacciones que determinan el resultado de sus variaciones.

Las comunidades bacterianas en todos estos diferentes microhábitats mencionados se han especializado y son distintivas taxonómicamente (Reinhold-Hurek et al., 2015). Tal es así, que existen microorganismos que están estrechamente asociados con una determinada especie de planta o genotipo, independientemente del suelo y las condiciones ambientales, a los cuales se los identifica como '*microorganismos centrales*' o con el término '*core microbiome*' (Lemanceau et al., 2017; Toju et al., 2018). Por ejemplo, comunidades bacterianas endófitas de la raíz presentaron perfiles taxonómicos notablemente similares en plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en cuatro suelos diferentes en dos continentes (Lundberg et al., 2012). El *core microbiome* es un término ampliamente utilizado debido a su relevancia para la investigación ecológica y biológica para caracterizar la microbiota de diversidad de ambientes, pero es otro término con el cual no hay un consenso respecto a su definición. A los microorganismos que componen el *core* se los ha identificado como taxones que contienen genes de funciones claves para el desarrollo pleno del holobionte vegetal (Lemanceau et al., 2017). Por el contrario, los taxones microbianos asociados a las plantas que se encuentran presentes en baja abundancia y suelen variar según las características del sitio se denominan *taxones satélite*, cuya presencia se da en función del alcance geográfico, la abundancia local y la especificidad del hábitat (Compant et al., 2019).

1.1.3. ROL BENÉFICO DE LA MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA A LAS PLANTAS

Las bacterias rizosféricas benéficas han sido foco de estudio desde hace más de 100 años con el descubrimiento de la fijación biológica de nitrógeno por Beijerinck en 1901 (Soriano, 1978). Debido a su rol activo en el crecimiento vegetal desde 1978 se utilizan las siglas PGPR, del inglés *Plant-Growth Promoting Rhizobacteria*, para referirse a las bacterias beneficiosas asociadas con las raíces (Kloepper y Schroth, 1978). Más tarde, Bashan y Holguin (1998), las denominaron bacterias promotoras del crecimiento vegetal o *PGPB*, del inglés *Plant-Growth-Promoting Bacteria* como término más inclusivo ya que se extiende a todas las bacterias que puedan promover el crecimiento vegetal independientemente del microhábitat que colonicen, y comprende también bacterias endofíticas, bacterias de la filosfera y bacterias asociadas a microalgas (de-Bashan et al., 2020). Tal

como se ha comentado previamente, estas interacciones benéficas promueven el crecimiento vegetal mejorando la resistencia de la planta hospedera a una amplia variedad de estreses bióticos o abióticos –incluidas enfermedades, sequía, salinidad, metales pesados, toxinas– aumentando la disponibilidad de nutrientes, además pueden mejorar indirectamente la fertilidad y la calidad del suelo al sustituir al menos parcialmente el uso de insumos químicos (Orozco-Mosqueta et al., 2021), entre otros. Estos efectos son el resultado de diversos *mecanismos de promoción del crecimiento*, los cuales han sido clasificados como *directos* –liberación de sustancias sintetizadas por los microorganismos o ayuda en el ingreso de nutrientes a las plantas desde el ambiente– e *indirectos* –disminuyen o previenen la acción de patógenos por producción de sustancias o por incrementar la resistencia natural del vegetal a diferentes situaciones de estrés (Glick, 2012)– (Figura 1.1.3a).

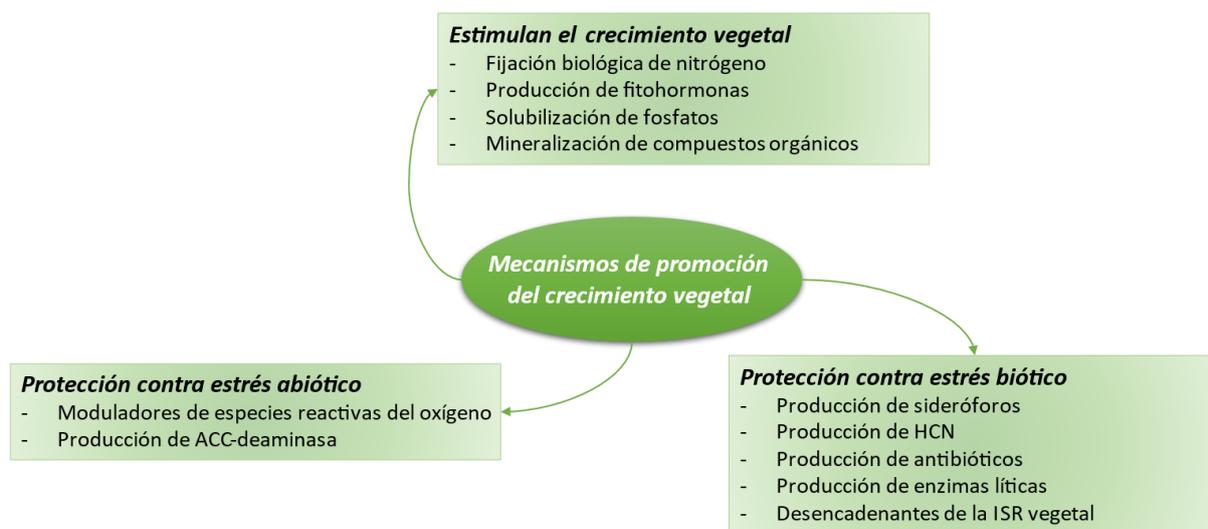


Figura 1.1.3a Mecanismos de acción de las PGPB. Adaptada de Goswami et al., 2016.

Algunas bacterias pueden presentar más de un mecanismo de promoción del crecimiento vegetal, pero lo que es fundamental para que dicha actividad se vea reflejada en una promoción del crecimiento vegetal efectiva es que deben ser colonizadores competentes del microhábitat vegetal en el que se desarrolle dicha función (Compant et al., 2010).

1.1.4. PGPB CON CARÁCTER ENDOFÍTICO Y SUS VENTAJAS

Las PGPB capaces de colonizar tejidos internos de los vegetales son las llamadas **PGPB endófitas** (Santoyo et al., 2016), y han sido foco de estudio debido a las ventajas ecológicas que tienen respecto a las bacterias rizosféricas, ya que:

- Establecen un intercambio más directo de metabolitos con la planta, ya que la endosfera representa un hábitat de interacción íntima con ésta (Hardoim et al., 2015).
- No compiten por nutrientes con la gran diversidad de microorganismos del suelo.
- Están protegidas de los cambios ambientales (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

Estas ventajas les dan la posibilidad de interactuar de una manera más eficiente con el hospedante. Por este motivo, sumado al potencial rol benéfico que tienen sobre el crecimiento y la salud vegetal, el número de estudios y publicaciones científicas ha crecido en las últimas décadas (Rilling et al., 2018). No obstante, el término endófito se utilizó ya desde principios del siglo XIX, siendo el científico alemán Heinrich Friedrich Link quien lo mencionó por primera vez (1809) pero no para hacer referencia de su acción benéfica sino para nombrar a un grupo de hongos parásitos de plantas. A partir de allí, el término se utilizó para referenciar a patógenos y organismos parásitos. Por ese entonces, se consideraba que las plantas sanas se encontraban libres de microorganismos –postulado por L. Pasteur–, aunque también había reportes que describían la existencia de microorganismos en el interior de tejidos vegetales e incluso afirmaban que éstos provenían del ambiente del suelo e ingresaban a la planta, teniendo un rol benéfico para el vegetal (Compant et al., 2012). Posteriormente, los puntos de vista eran contrastantes entre quienes afirmaban el rol benéfico de los endófitos y quienes no. Fue recién en 1991 que se define a los microorganismos endófitos como todos los organismos que habitan en los órganos de las plantas y que en algún momento de su ciclo de vida colonizan los tejidos internos de las mismas sin causar daño aparente a su huésped (Petrini et al., 1991). Si bien algunas definiciones pueden variar en algún punto, las condiciones de colonizar tejidos internos sin causar daño al vegetal se mantienen, en la búsqueda de diferenciar a los endófitos benéficos de los patógenos. Esta definición fue ampliamente adoptada por la comunidad científica, aunque en los últimos años fue causa de ciertas discusiones, ya que se observó que numerosos microorganismos endófitos podían comportarse como benéficos en ciertas plantas y como patógenos en otras especies; o incluso estar como endófito neutral en forma latente y convertirse en patógeno frente a alguna condición específica. Por estos motivos, Hardoim y colaboradores (2015) han propuesto que la definición haga referencia únicamente al hábitat y no a la funcionalidad: así el término endófito tiene un alcance más global e incluye a todos los microorganismos que durante toda o parte de su vida colonizan los tejidos internos de las plantas. Los microorganismos endófitos pueden distinguirse de otros microorganismos asociados a las plantas teniendo en cuenta que se pueden recuperar de material vegetal desinfectado superficialmente (Kandel et al., 2017).

Exceptuando a las bacterias endófitas ya establecidas provenientes de las semillas, el modo más común de entrada de bacterias endofíticas en los tejidos vegetales es a través de rupturas mecánicas que ocurren en las plantas, por grietas o aperturas naturales como estomas, por las zonas de surgimiento de las raíces laterales, o abriéndose paso por medio de enzimas hidrolíticas capaces de romper la pared celular vegetal tal como pectinasas, celulasas, entre otras. Dentro de los tejidos, se las ha encontrado principalmente en espacios intercelulares, con menor frecuencia en espacios intracelulares, y se pueden transportar a través de la planta por el xilema (Reinhold-Hurek et al., 2015) llegando incluso a colonizar órganos reproductores como tallo, flores, frutos y semillas (Compant et al., 2011). La colonización endofítica también requiere rasgos bacterianos específicos para establecerse dentro de los tejidos: flagelos, enzimas que degradan polímeros vegetales (celulosa, lignina), sistemas de secreción de proteínas tipo V y VI, adquisición y almacenamiento de hierro, *quorum sensing*, desactivación de especies reactivas de oxígeno y degradación de compuestos aromáticos, formación de biofilms (Reinhold-Hurek y Hurek, 2011; Sessitsch et al., 2011). En relación a la reacción de las plantas frente a estos colonizadores, se han encontrado diversos genes (cuyas funciones no se conocen en su

totalidad) que son diferencialmente expresados durante la asociación planta–endófito, e indican que los pasos iniciales de la colonización de los endófitos son activamente monitoreados y, seguramente, propiciados por la planta hospedera (Hardoim et al., 2015).

1.1.5. AGRICULTURA SUSTENTABLE Y BIODIVERSIDAD

La revolución verde trajo consigo un aumento significativo en la productividad agrícola a través de la mejora genética de variedades de cultivos, pesticidas químicos y fertilizantes, pero este “éxito” fue acompañado por una disminución de la salud del suelo⁵ (Arif et al., 2020; Barros-Rodríguez et al., 2021; Meena et al., 2020) y todo su entorno (concepto de una sola salud, Murillo y Paliouff, 2021). La necesidad de producir grandes cantidades de alimentos ha llevado a emplear cada vez mayores cantidades de agroquímicos sintéticos para satisfacer esta demanda (Afridi et al., 2022; Singh y Trivedi, 2017) (Figura 1.1.5a). Algunas características y consecuencias de estos sistemas agrícolas convencionales son:

- Uso poco racional de los suelos y del agua.
- Alteración del equilibrio dinámico de los ecosistemas terrestres y acuáticos con la consiguiente pérdida de biodiversidad.
- Acumulación y persistencia de residuos tóxicos en el ambiente y en los alimentos.
- Degradación de los ambientes, eutrofización.
- Salinidad del suelo y disminución de la materia orgánica.
- Aparición de patógenos resistentes y surgimiento de nuevas plagas.
- Eliminación de enemigos naturales y de microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica y del control biológico.

La demanda mundial de alimentos se prevé que aumentará un 70 % en 2050, mientras que la actividad agropecuaria deberá enfrentarse a condiciones climáticas adversas, agotamiento nutricional, suelos contaminados y escasez de agua (Singh y Trivedi, 2017). Por ello, resultan necesarias propuestas sustentables para la producción agrícola. Según la FAO (2015)⁶, la agricultura será sustentable si satisface las necesidades de las generaciones actuales y futuras y, al mismo tiempo, garantiza la rentabilidad, la salud ambiental, y la equidad

⁵ salud del suelo: la capacidad de un tipo específico de suelo para funcionar, dentro de los límites de un ecosistema natural o gestionado, para sustentar la productividad vegetal y animal, mantener o mejorar la calidad del agua y el aire, y apoyar la salud humana y la vida (Doran y Zeiss, 2000).

⁶ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.

social y económica. Las acciones que pueden conducir a la sustentabilidad en sistemas agrícolas (Pretty, 2008) se centran en el desarrollo de tecnologías y prácticas agrícolas que (Figura 1.1.5a):

- No tengan efectos adversos sobre el medio ambiente.
- Sean accesibles y eficaces para los agricultores.
- Mantengan o mejoren la productividad de alimentos inocuos reduciendo el uso de agroquímicos.
- Conserve o mejoren la biodiversidad (Barros-Rodríguez et al., 2021; de Graaff et al., 2019)

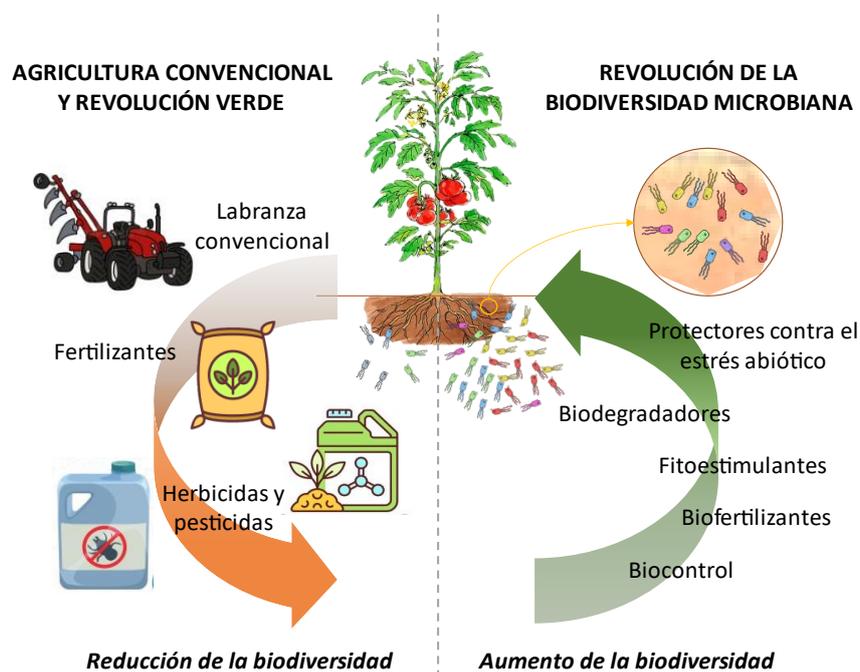


Figura 1.1.5a Diagrama conceptual que muestra las consecuencias de la revolución verde y la agricultura convencional, y de la revolución de la biodiversidad microbiana del suelo. Adaptado de Barros-Rodríguez et al., 2021.

En este escenario, el creciente interés en el rol benéfico de la microbiota bacteriana sobre el crecimiento y la salud de las plantas tiene fundamento en el gran potencial de estas interacciones planta-bacteria para proporcionar soluciones económicas y sustentables a los desafíos agrícolas actuales (Afridi et al., 2022; Ke et al., 2020).

1.1.6. MICROBIOTA Y BIODIVERSIDAD: CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Antes de identificar los miembros de una comunidad, sus características específicas y posibles funciones es necesario definir qué es una comunidad, otro término que también ha resultado complejo definir en términos

de ecología microbiana. Una comunidad es un conjunto integrado de poblaciones de múltiples especies que interaccionan entre ellas y coexisten en un espacio determinado, denominado hábitat (Konopka, 2009). Desde esta perspectiva, uno de los elementos importantes del análisis de comunidades microbianas son las propiedades emergentes, que son características que no se pueden identificar analizando a los microorganismos de forma aislada, sino que surgen cuando el sistema se considera en un alto nivel de organización. Un análisis de estas propiedades conduce a una comprensión global de cómo el sistema responde a las perturbaciones externas e internas y proporciona la capacidad de predecir la dinámica del sistema en respuesta a un cambio ambiental (Konopka, 2009). La propiedad central de la ecología de comunidades es la diversidad y se relaciona con la *variedad* de la unidad de estudio (desde genes hasta individuos).

Dentro de una muestra discreta, la diversidad de taxones tiene dos componentes importantes que definen a la alfa-diversidad: la riqueza que es el número total de taxones diferentes presentes en la muestra, y las medidas de uniformidad, dominancia o equitatividad, determinadas por las relaciones entre taxones en base a su abundancia relativa (proporción de cada taxón) en la comunidad. La ecología microbiana comúnmente expresa la medición de la diversidad bacteriana en Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) o Amplicon Sequencing Variants (ASVs), los cuales pueden definirse en diferentes niveles taxonómicos de resolución (phylum, clase, orden, familia, género y especie) (Escudero-Martínez y Bulgarelli, 2019; Kim et al., 2017). Numerosos índices han sido propuestos para caracterizar la alfa-diversidad:

- ***Riqueza observada*** (R), número total de taxones diferentes presentes en la muestra.
- ***Índice de Chao-1***, estima la riqueza teórica de especies ajustando la riqueza observada por la probabilidad de no observar especies
- ***Índice de Simpson*** (D), muestra la probabilidad de que dos individuos sacados al azar de una muestra correspondan a la misma especie. Es llamado índice de dominancia ya que tendrán una mayor contribución en este índice aquellas especies que se encuentren en mayor abundancia respecto al resto (especies dominantes). Cuanto más se acerca el valor de D a 1, menor es la diversidad del hábitat. En cambio, cuanto más cerca del valor 0 se encuentre, mayor es la diversidad del hábitat. También suele emplearse la inversa de Simpson ($1/D$), invirtiendo el análisis de los valores mencionados anteriormente.
- ***Índice de Shannon-Wiener*** (H'), toma en cuenta la cantidad de especies que existen en la muestra y la cantidad relativa de individuos que hay para cada una de las especies. Es decir, contempla la riqueza y la abundancia de las especies. El índice de Shannon está basado en un concepto muy relevante en ecología: la uniformidad.

En el estudio de comunidades microbianas, también resulta de interés la comparación para detectar similitudes y diferencias entre comunidades, análisis que se conoce como beta-diversidad y puede realizarse en

base a distintas medidas que involucran no solo presencia/ausencia y abundancia relativa de los individuos, sino también la filogenia (distancia genética).

1.1.7. METODOLOGÍAS Y ENFOQUES DE ESTUDIO DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN MUESTRAS AMBIENTALES

El desarrollo del microscopio, así como de otras herramientas y metodologías específicas (medios de cultivos, esterilización, asepsia) durante el S. XIX y principios del S. XX, dio origen a la microbiología como ciencia. Desde ese entonces, el cultivo *in vitro* y el aislamiento de microorganismos en cultivos puros con su consiguiente caracterización morfológica, bioquímica y taxonómica, han representado uno de los principales pilares en el desarrollo de la ciencia de la microbiología y, por consiguiente, del estudio de las comunidades microbianas (Porto de Souza Vandenberghe et al., 2017). El descubrimiento de la estructura del ADN (Watson y Crick, 1953) rápidamente condujo al advenimiento de novedosas metodologías basadas en las moléculas de ADN, que luego fueron apoyadas por el desarrollo tecnológico de la computación y la bioinformática (Sarhan et al., 2019). Por otro lado, solo un pequeño porcentaje de los microorganismos pueden cultivarse en el laboratorio, mientras que el resto permanece no cultivable pero detectable por métodos moleculares. Esta “no cultivabilidad” de muestras ambientales fue observada por primera vez en 1985, al detectar discrepancias entre el número de unidades formadoras de colonias en placas de petri con medios de cultivos y los recuentos al microscopio (Staley & Konopka, 1985). Esto puede deberse en parte a que los microorganismos en su hábitat, por lo general, forman *consorcios microbianos*⁷ en los que se relacionan íntimamente entre sí y con su microhábitat, y resultan interdependientes unos de otros, lo cual hace que sea difícil su aislamiento. De manera que el conocimiento de las comunidades microbianas en las plantas se puede realizar empleando diferentes técnicas (Figura 1.1.7a):

- Técnicas dependientes de cultivo, donde los microorganismos aislados del material vegetal, son cultivados, identificados y caracterizados por una combinación de métodos fenotípicos y moleculares.
- Técnicas independientes de cultivo, donde los microorganismos se detectan sin cultivo, en base a técnicas microscópicas o la extracción y análisis de distintas moléculas.

⁷ Asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás (López et al., 2007).

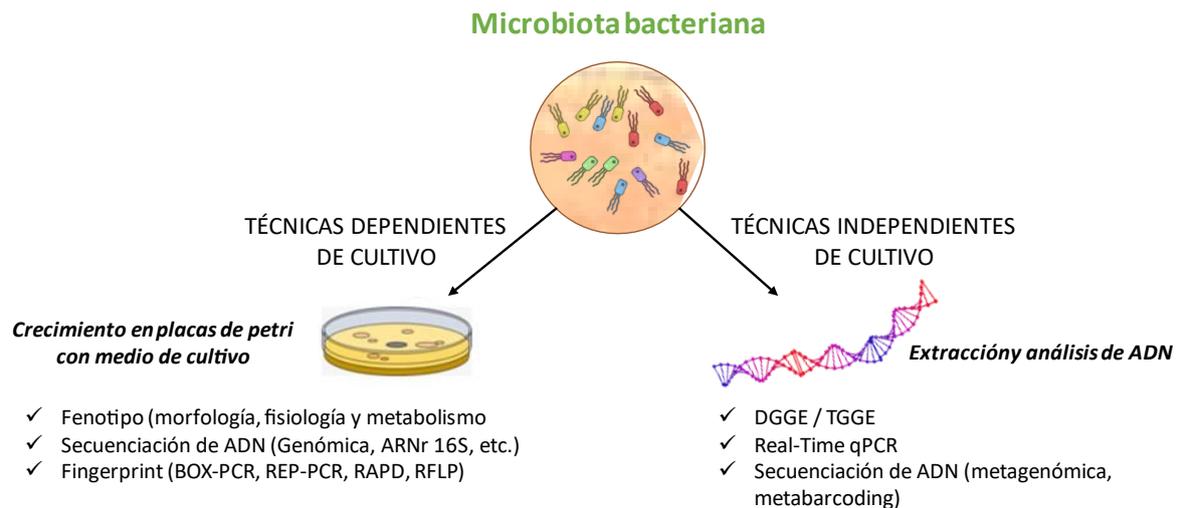


Figura 1.1.7a Esquema de técnicas empleadas para el análisis de comunidades bacterianas en plantas. Adaptado de [Porto de Souza Vandenberghe et al., 2017](#).

El caso ideal combina varias técnicas para un conocimiento profundo del ambiente microbiológico estudiado. Avances recientes en meta-ómica y herramientas computacionales han mejorado enormemente la comprensión de la diversidad del microbioma de las plantas. Los métodos actualmente disponibles para el estudio de los microbiomas, serían las denominadas multiómicas, incluyen el análisis de ADN, de ARN y otras moléculas, y van desde el aislamiento de alto rendimiento (culturomica) y la visualización (microscopía), hasta la determinación de la composición taxonómica (metabarcoding), abordando el potencial metabólico (metabarcoding de genes funcionales, metagenómica) y el análisis de las actividades microbianas (metatranscriptómica, metaproteómica, metabolómica) ([Berg et al., 2020](#)).

Todas estas técnicas permiten elegir diferentes enfoques de trabajo para realizar el estudio de la estructura y el funcionamiento de las comunidades bacterianas asociadas a las plantas y su mejora. Se puede plantear tanto el enfoque racional *bottom-up* (de abajo hacia arriba) como el evolutivo *top-down* (de arriba hacia abajo) ([Compant et al., 2019](#); [San León y Nogales, 2022](#)). En el enfoque *bottom-up* o de abajo hacia arriba, las partes individuales (microorganismos específicos) se analizan en detalle y luego se enlazan para formar componentes más grandes, que a su vez se enlazan hasta que se forma el sistema completo ([Amor y Dal Bello, 2019](#)). Su uso como enfoque para sintetizar comunidades microbianas se basa en el carácter funcional del aislamiento microbiano individual.

El enfoque *top-down* o de arriba hacia abajo, implica el conocimiento del sistema en su conjunto sin especificar detalles. Cada parte nueva es entonces redefinida, cada vez con mayor detalle, hasta que la especificación completa es lo suficientemente detallada para validar el modelo. Como enfoque para sintetizar comunidades microbianas se basa en las interacciones metabólicas entre los que componen la comunidad ([Amor y Dal Bello, 2019](#)).

1.1.7.1 Técnicas dependientes de cultivo

En la literatura existe una extensa lista de medios de cultivo diseñados para aumentar la posibilidad de aislar microorganismos en el laboratorio, que incluyen diferentes tipos de fuentes de carbono, vitaminas, fuentes de energía, al igual que consideraciones sobre los factores fisicoquímicos que afectan el crecimiento, tales como temperatura, pH, requerimientos de oxígeno, salinidad, entre otros. La aplicación de estas técnicas dependientes de cultivo es esencial para disponer de cultivos de microorganismos puros, que permitan su caracterización genotípica y fenotípica, el estudio de la interacción planta-microorganismo, no sólo con fines ecológicos sino también de *bioprospección*. Disponer de los microorganismos permite realizar cultivos que tienen el potencial de ser escalados para su producción y uso como bioinsumos microbianos. Otra de las ventajas asociadas a esta metodología reside en su bajo costo y en que el investigador cuenta con el “material microbiano” para su uso en futuros estudios. Una desventaja es que subestiman los valores de la diversidad microbiana.

1.1.7.2 Técnicas independientes de cultivo

Durante los últimos 50 años, las *técnicas independientes de cultivo* aplicadas al estudio de la fitomicrobiota han logrado un enorme avance en el entendimiento de las interacciones dentro del holobionte vegetal, gracias al desarrollo de nuevas y mejores tecnologías en el área de la fotografía, microscopía, electrónica, computación y bioinformática, entre otras disciplinas. Estas técnicas independientes de cultivo han podido sortear los inconvenientes de las técnicas de microbiología clásica (dependiente de cultivo) respecto al fenómeno de “no cultivabilidad” de ciertos microorganismos, permitiendo estudiar con mayor profundidad la enorme diversidad de microorganismos en la complejidad de cada ambiente, y pudiendo dar cuenta de la *composición, estructura y funcionalidad* de las comunidades bacterianas asociadas a muestras biológicas complejas. Una desventaja es que sobrestiman los valores de la diversidad microbiana. Por otro lado, también resultan una herramienta extremadamente útil para el estudio y la caracterización detallada de microorganismos aislados mediante técnicas dependientes de cultivo.

Dejando de lado las técnicas que involucran a la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM), el resto de las técnicas independientes de cultivo involucran la extracción y el estudio de moléculas particulares (principalmente ADN, aunque también otras moléculas como ARN, proteínas, etc.), por lo cual se las conoce también como técnicas de biología molecular ([Enespa y Chandra, 2022](#); [Gupta et al., 2021](#)) ([Figura 1.1.7b](#)).

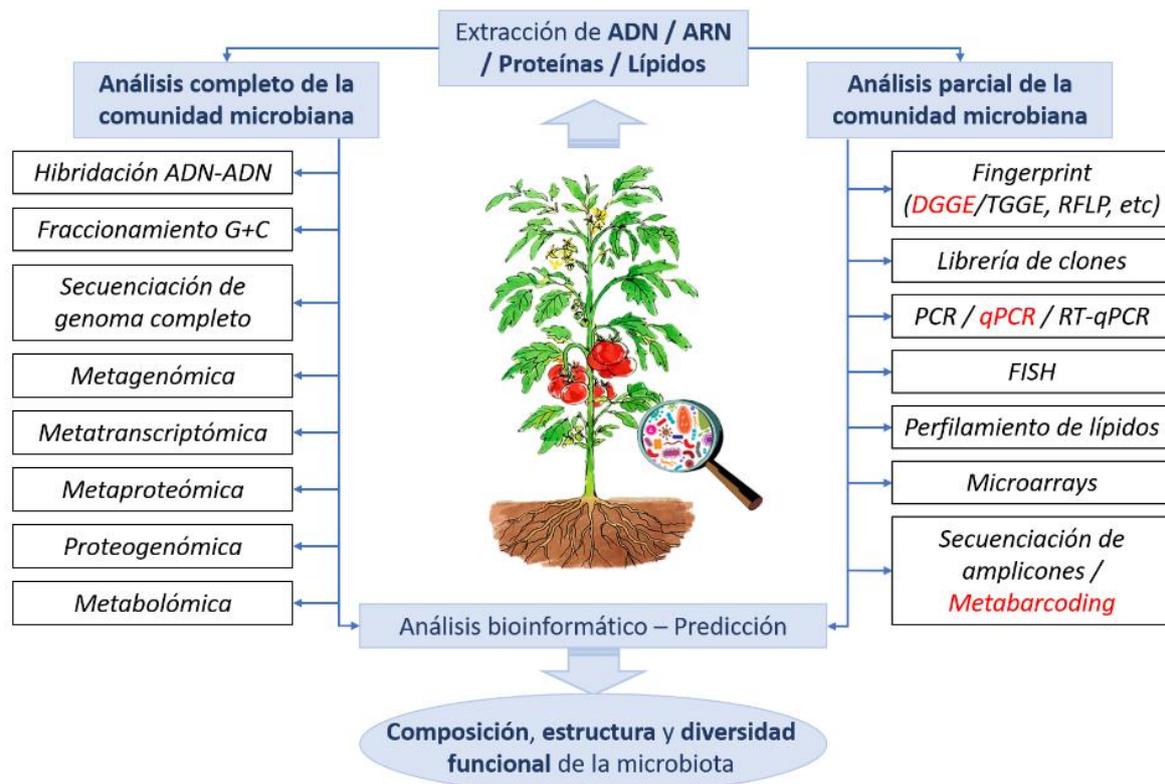


Figura 1.1.7b Técnicas moleculares aplicadas al estudio de la diversidad microbiana asociada a las plantas. Adaptado de Gupta et al., 2021. En color rojo se destacan las técnicas empleadas en este trabajo

Particularmente en lo que refiere a la biología molecular a nivel de ADN extraído de muestras ambientales complejas (la cual contiene genes/genomas de todas las bacterias presentes en dicha muestra, y se denomina *ADN metagenómico⁸ bacteriano*), ésta utiliza criterios estándares, reproducibles y auditables que identifican con precisión los microorganismos objetivo en diferentes entornos, ofreciendo un amplio rango de aplicación y la posibilidad de evaluar la biodiversidad en tiempo real, además de poder examinar la dinámica de especies, poblaciones y comunidades y/o mapear su distribución geográfica a gran escala y durante largos períodos (Beng y Corlett, 2020).

Las comunidades microbianas de una muestra ambiental compleja, pueden ser abordadas bajo distintos enfoques con alcances diferentes (Gupta et al., 2021; Rastogi y Sani, 2011):

- *Estudios sobre la totalidad de la comunidad bacteriana en su conjunto*, con un enfoque ómico, por ejemplo, estudios de metagenómica en el campo de la genética molecular y la ecología que estudia al genoma "colectivo" para determinar relaciones filogenéticas y funcionales de una muestra ambiental compleja (Romano et al., 2020).

⁸ La etimología denota al prefijo «meta-» el significado de «más allá de», y al sufijo «-oma» el significado de «conjunto de», por lo que La adición de este prefijo y sufijo a diferentes estudios biológicos refiere a aproximaciones masivas del conjunto (genómica/metagenómica, proteómica/Metaproteómica, metabolómica).

- Estudios centrados en un análisis parcial de la comunidad, ya sea en determinados genes/grupos de genes, por ejemplo, estudios de metabarcoding que busca definir el perfil taxonómico de microorganismos de una muestra a través de secuencias cortas de ADN que funcionan como marcadores para establecer diferencias entre distintos taxones microbianos, lo cual permite el reconocimiento y la asignación taxonómica (Wilson, 2018).

Los genes a ser empleados para *metabarcoding* deben cumplir con ciertas características como son:

- Contener regiones con variabilidad y divergencia genéticas significativas a nivel de especie.
- Poseer sitios conservados contiguos a las regiones variables, que se pueden usar para diseñar cebadores de PCR universales.

Si bien existen regiones del ADN que cumplen con estas características, el gen que codifica para la subunidad menor del ARN ribosomal 16S en bacterias (que tiene una longitud ~1500pb y cuenta con 9 regiones hipervariables, V1-V9) es el más ampliamente utilizado para estudios de filogenética y taxonomía bacteriana (Kress y Erickson, 2012).

Tanto para *metabarcoding* como para otros estudios en el campo de la ecología microbiana, la secuenciación de ADN⁹ mediante la tecnología Illumina es la técnica de biología molecular más ampliamente utilizada debido a su gran capacidad de secuenciación (que permite detectar microorganismos incluso a muy baja abundancia relativa), su baja tasa de error y la posibilidad de secuenciar paralelamente varias muestras (Cortés-López et al., 2020; Lahlali et al., 2021).

1.1.8. INGENIERÍA DE MICROBIOMAS: EMPLEO Y MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA VEGETAL

La comprensión de la composición y estructura de la fitomicrobiota y su funcionamiento, constituye el primer paso a la posibilidad de su manipulación para mejorar sus funciones, y así fortalecer la tolerancia al estrés, la resistencia a enfermedades y adquisición de nutrientes por las plantas (Afridi et al., 2022; Muller et al, 2015). La ingeniería de microbiomas justamente tiene que ver con el empleo de estrategias que permitan la manipulación de las comunidades microbianas del holobionte vegetal para mejorar el rendimiento de los cultivos y la resiliencia. La manipulación de la microbiota de la rizosfera es un *hot spot* de la biotecnología desde hace más de una década (Ryan et al., 2009), sin embargo, en la actualidad el interés se extendió al resto de los microhábitats de las plantas (Chialva et al., 2022). Se han propuesto varias formas prácticas mediante las cuales se puede modificar la microbiota para mejorar la producción de cultivos, muchas de las cuales se han utilizado

⁹ Técnica que permite conocer la composición y ordenamiento de las bases (A,T,G,C) que conforman un fragmento de ADN.

tradicionalmente para mejorar ciertas cualidades del suelo, e indirectamente modifican las características de las comunidades microbianas –como el uso de enmiendas o el manejo del cultivo– y otras, son estrategias biotecnológicas –inoculación con bioinsumos individuales o multiespecie– (Figura 1.1.8a) (Afridi et al., 2022; Arif et al., 2020; Noman et al., 2021).

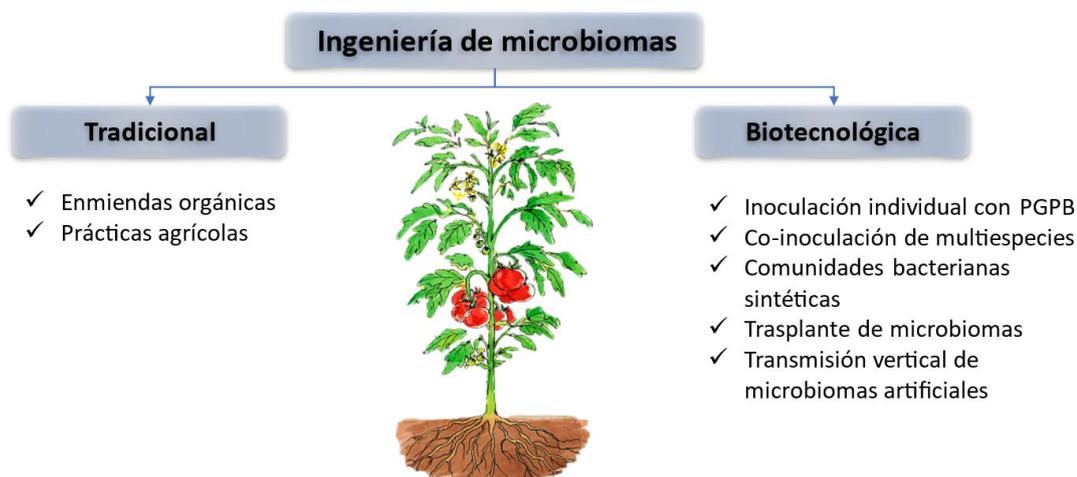


Figura 1.1.8a Estrategias de ingeniería de fitomicrobiomas. Adaptado de Afridi et al., 2022

Algunos ejemplos de estas estrategias y su implicancia en la microbiota se mencionan a continuación:

1. *Prácticas Tradicionales:*

1.a- El uso de enmiendas: consiste en agregar sustancias orgánicas al suelo que mejoran su calidad, y conducen en general a un aumento de la biomasa microbiana y diversidad, cuya composición depende del tipo de enmienda (Arif et al., 2020; Sankar et al., 2017).

- El estiércol se ha utilizado durante varios siglos porque es rico en N, P y materia orgánica, y además contribuye a la modificación de la microbiota del suelo y mejora sus propiedades físicas y químicas.

- El compost y los residuos agrícolas se emplean como enmiendas y hay diversos estudios que muestran su capacidad como fuentes ricas en agentes biocontroladores de enfermedades, y proponen su uso como herramienta para controlar los patógenos de plantas transmitidos por el suelo.

- Los componentes y extractos de algas marinas aumentan la inmunidad innata de las plantas.

- La biofumigación con crucíferas también es considerada una enmienda que modifica la microbiota del suelo debido a su acción fungistática.

1.b- Manejo del cultivo: consiste en el tipo de prácticas agrícolas que se aplican en el cultivo, pero en este caso se hace referencia básicamente a ejemplos de rotación de cultivos, y labranza. Prácticas de manejo agrícola que promueven la retención/acumulación de materia orgánica en el suelo mejoran la biodiversidad bacteriana.

- Las rotaciones de cultivos en general aumentan la riqueza y diversidad microbiana, por ejemplo, una disminución del rendimiento en el cultivo de caña de azúcar se puede revertir mediante la rotación de cultivos de leguminosas, vinculada a una restauración de la biomasa microbiana del suelo e incorporación de nitrógeno fijado (Arif et al., 2020).

- Buenas prácticas agrícolas, esencialmente definidas por la rotación de cultivos, mantuvieron la diversidad β bacteriana casi tan bien como los pastizales naturales y no causaron una pérdida significativa de especies endémicas (Figuerola et al., 2015).

- Los mapas de diversidad de los suelos con manejos históricos de siembra directa o de labranza convencional resultaron claramente diferentes entre sí; hubo una diferenciación en profundidad de la diversidad bacteriana en el caso de siembra directa donde el suelo no se perturba, que no se observó en el caso de labranza convencional (Frene et al., 2018).

2. Prácticas Biotecnológicas:

2.a- Inoculación con PGPB específicas en forma individual o multiespecie: los microorganismos benéficos se han utilizado durante mucho tiempo como inoculantes para cultivos. La aplicación a campo de microorganismos o inoculación o aplicación de bioinsumos a base de PGPB en forma individual es una estrategia prometedora. No obstante, en muchos cultivos el éxito de su aplicación ha sido variable, probablemente debido a las diferentes condiciones ambientales, ineficiente colonización y persistencia limitada en el ambiente. El uso de bioinsumos multiespecie que puedan proveer más de una función benéfica y la ingeniería genética/genómica de colonizadores robustos puede ayudar a superar estas limitaciones.

2.b- Inoculación con comunidades microbianas sintéticas como bioinsumos complejos: las comunidades microbianas naturales están compuestas por una mezcla de microorganismos con funciones a menudo desconocidas. Una forma prometedora de superar las dificultades asociadas con el estudio de las comunidades naturales es crear comunidades sintéticas artificiales que conserven las características claves de sus contrapartes naturales. Con una complejidad reducida, las comunidades microbianas sintéticas se comportarían como un sistema definido y podrían actuar como un sistema modelo para evaluar el papel de las características ecológicas, estructurales y funcionales clave de las comunidades de forma controlada (Großkopf y Soyer, 2014). La propuesta de un comunidad microbiana sintética basada en especies clave

más la diversidad de PGPB, amplía el efecto del inoculante único o multiespecie: las especies PGPB promoverán el crecimiento de las plantas y la protección contra patógenos directa o indirectamente, y las especies clave proporcionarán entonces un apoyo para las PGPB, ya sea directamente, con la ayuda de unas pocas especies "intermedias" (influencia intermedia) o indirectamente a través de una variedad diversa e interconectada (Figura 1.1.8b) (Sanchez-Cañizares et al., 2017).

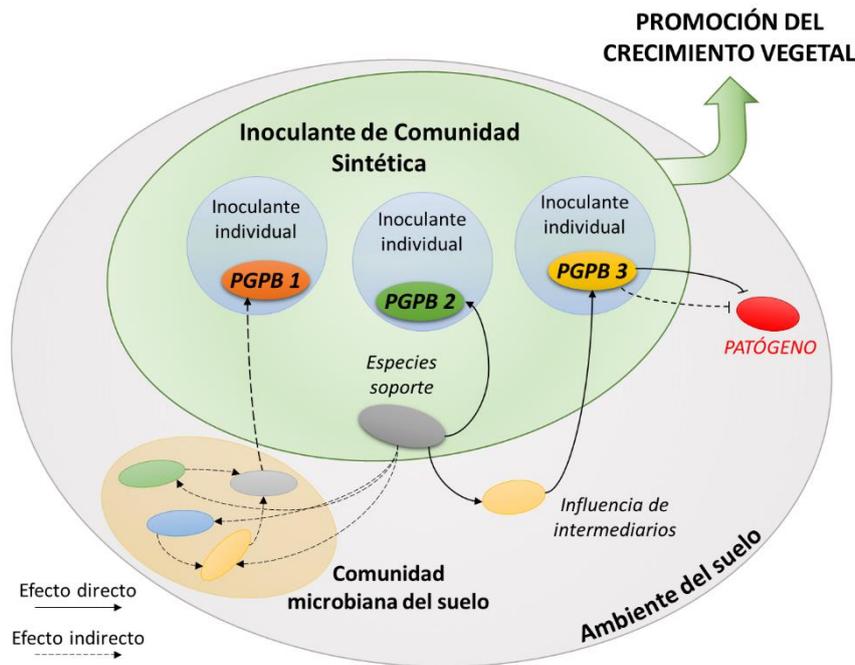


Figura 1.1.8b Esquema de inserción de una comunidad sintética en el ambiente edáfico y posibles interacciones directas e indirectas entre estos microorganismos y la comunidad microbiana del suelo.

2.c- Trasplante de microbiomas: el trasplante del microbioma de la rizosfera de una variedad de tomate resistente a una enfermedad que fue abundante en *Flavobacterium* suprimió los síntomas de la enfermedad en las plantas susceptibles (Arif et al., 2020).

2.d- Selección artificial de microbiomas en asociaciones hospedero-microbioma: al permitir que el huésped evalúe qué subconjuntos de microorganismos pueden interactuar con él y que se transmitirán verticalmente a su descendencia (Arif et al., 2020; Mitter et al., 2017; Muller et al., 2015). A diferencia de las comunidades sintéticas, se puede diseñar una comunidad compuesta por microorganismos cultivables y no cultivables.

1.1.9. BIOINSUMOS MICROBIANOS A BASE DE PGPB: ESQUEMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Los bioinsumos son una alternativa que tiene cada vez mayor participación en el esquema de manejo de los cultivos, ya que representan opciones económicamente atractivas y ecológicamente aceptables. Según el Comité Asesor en Bioinsumos de Uso Agropecuario (CABUA), creado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina (Resol. SAGyP 7/2013) se define a los Bioinsumos Agropecuarios como “todo producto de origen biológico que contenga o haya sido producido por microorganismos (hongos, bacterias, virus, etc.) o macro organismos, extractos de plantas o compuestos bioactivos derivados de ellos y que estén destinados a ser aplicados como insumos en la producción agropecuaria, agroalimentaria, agroindustrial e incluso agro energética”. Dentro de estos bioinsumos se encuentran los bioinsumos microbianos que se producen a base de PGPB y pueden utilizarse como biofertilizantes, fitoestimulantes y/o biocontroladores de fitopatógenos. Son productos tecnológicos que se caracterizan por recrean interacciones beneficiosas naturalmente existentes, son amigables con el medio ambiente y de bajo costo, cuyo uso se fomenta en el Plan Argentina Innovadora 2030, ya que son herramientas fundamentales para la transición a sistemas de producción más sustentables (https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/03/dt_17_-_bioinsumos.pdf). La inoculación con PGPB es una práctica considerada segura ya que se basa en el uso de microorganismos no patógenos que son aislados de los ambientes que colonizan en forma natural. Las PGPB más utilizadas como bioinsumos en la práctica agrícola pertenecen al grupo conocido como rizobios, entre las que se encuentran bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, entre otros, capaces de llevar a cabo la FBN en forma simbiótica en estructuras particulares o nódulos. No obstante, se producen y se utilizan, aunque en menor grado, diferentes especies de PGPB para diversos cultivos principalmente cultivos extensivos, entre las que se encuentran especies de los géneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Paraburkholderia*, *Bacillus*, entre otros (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Mamani de Marchese y Filippone, 2018).

La investigación y desarrollo de bioinsumos a base de PGPB, en general, ha sido el resultado de un proceso de selección para identificar candidatos prometedores siguiendo un estrategia del tipo *botton-up*, en la que se suceden diversas etapas que incluyen desde el aislamiento bacteriano, identificación taxonómica, evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento *in vitro*, caracterización de colonización rizosférica y endófito, ensayos de promoción de crecimiento *in vivo*, selección de cepas promisorias, cultivo en biorreactores hasta la determinación de la calidad y factibilidad económica en campo (Bashan et al., 2014) tal como se muestra de forma general en la Figura 1.1.9a. Cada una de estas acciones tiene su grado de complejidad, pero un problema que se encuentra a menudo es en los experimentos a campo es que se observa una inconsistencia de la respuesta de las plantas a la inoculación, siendo entonces poco probable garantizar el éxito de la misma. Esta falta de respuesta es atribuida generalmente a una ineficiente colonización y permanencia en el ambiente en el que se inoculan (Compant et al., 2019; Suman et al., 2022), características que comúnmente no son evaluadas cuando se trata de bioinsumos para cultivos de plantas no-leguminosas (Rilling et al., 2019). Las fuentes de carbono que se encuentran en los exudados de las raíces, los minerales disponibles en el suelo, la densidad celular lograda en la colonización de las raíces, la flora nativa con la cual tendrá que

competir/asociarse, así como condiciones ambientales (pH, temperatura, humedad) son algunos de los factores que influyen en la colonización de las PGPB (Lugtenberg y Kamilova, 2009), considerando siempre que el bioinsumo aplicado es de calidad (Bashan et al., 2014). Por lo tanto, hay ciertas consideraciones que se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar un bioinsumo a base de PGPB para que los efectos benéficos que estos microorganismos aportan puedan ser logrados (Compant et al., 2019).

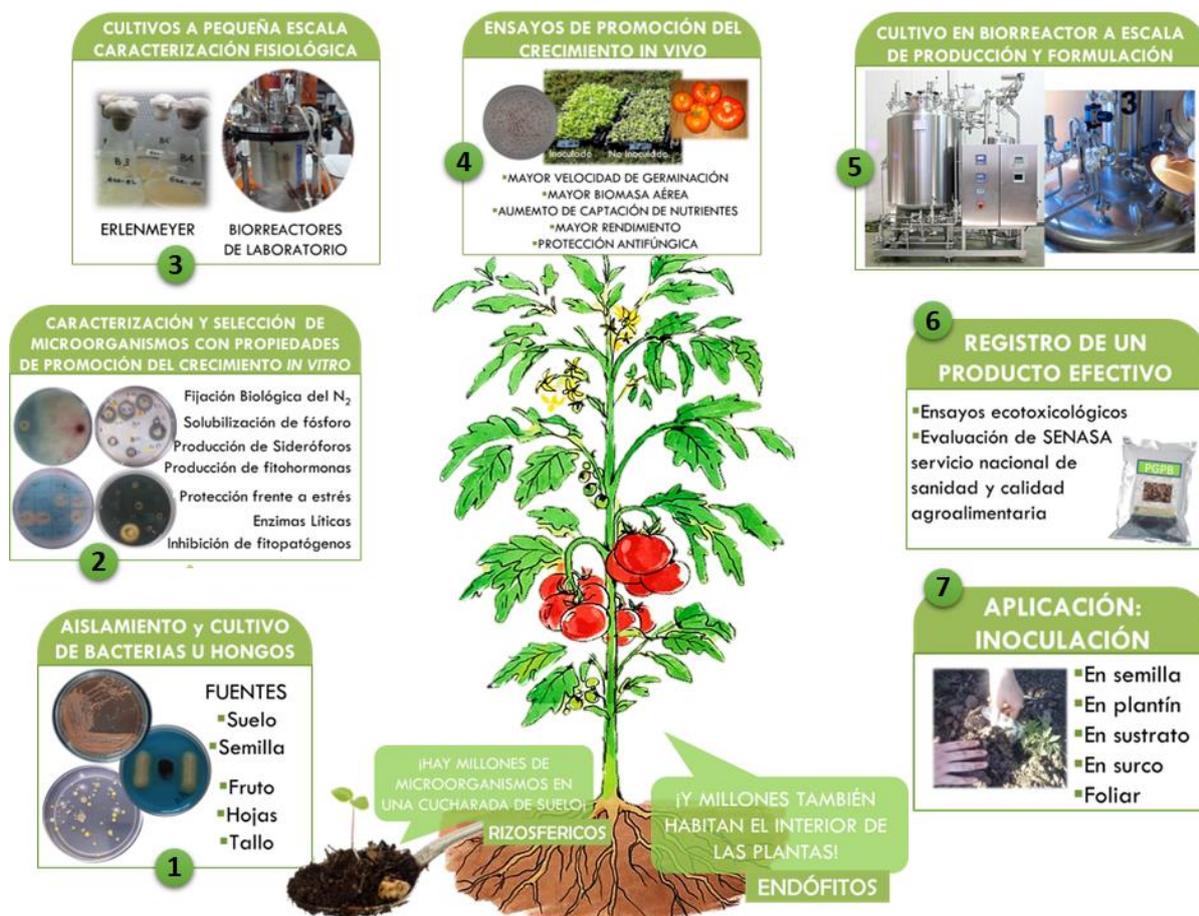


Figura 1.1.9a Esquema general de investigación y desarrollo para la producción de un bioinsumo a base de PGPB.

El empleo de bioinsumos microbianos, ha tenido un gran impulso y un creciente interés a nivel mundial en la actualidad debido, principalmente, a que el mercado internacional exige productos alimenticios más seguros para la salud y el medio ambiente (Bochetto et al., 2020). Los bioinsumos a base de PGPB se han incorporado en general entre las prácticas agrícolas en forma de inoculantes individuales (Bashan et al., 2014). Sin embargo, en los últimos años la co-inoculación o inoculación con múltiples cepas de PGPB de grupos taxonómicos iguales o diferentes —inoculantes multiespecies o inoculantes de segunda generación— ha adquirido un lugar importante no sólo en los temas de investigación científica sino también en la industria de bioinsumos (Vivanco-Calixto et al., 2016). Varios estudios de co-inoculación de PGPB con resultados prometedores han sido reportados en cultivos como soja, maíz, papa y trigo, entre otros (Iturralde et al., 2020; Tabacchioni et al.,

2021; [Satin Mortinho et al., 2022](#)); sin embargo, hay pocos informes sobre el uso de tales herramientas en estudios sobre cultivos hortícolas ([Obianuju Chiamaka y Olubukola Oluranti, 2020](#)). El diseño y formulación de bioinsumos multiespecies es ventajoso frente a los bioinsumos de primera generación (cepa única), porque:

- Los microorganismos pueden actuar de manera cooperativa proporcionando nutrientes, eliminando productos inhibidores y estimulando rasgos fisiológicos beneficiosos.
- Una amplia gama de microorganismos podría mejorar la adaptación a una amplia gama de condiciones ambientales.
- La provisión de más de un PGPB con modos de acción iguales o diferentes podría mejorar la capacidad de una comunidad bacteriana para promover el crecimiento de las plantas ([Thomludi et al., 2019](#)).

En cuanto al uso de comunidades sintéticas como bioinsumos, aún está en una etapa de investigación bastante reciente. Se puede hacer una aproximación a las comunidades microbianas sintéticas persiguiendo las 2 estrategias mencionadas previamente, así como por combinación de ambas en una estrategia híbrida *top-down / bottom-up (middle-out)* con un rendimiento y un alcance mejorados ([San León y Nogales, 2022](#)). Cuando se aplican individualmente, ambas estrategias de diseño tienen múltiples fortalezas, pero también importantes debilidades. En general, mientras que *bottom-up* ofrece altos niveles de control para el diseño racional, el espacio metabólico adecuado para propósitos de diseño es limitado y las soluciones a menudo se vuelven subóptimas. Por otro lado, la estrategia *top-down* muestra un espacio metabólico inicial más grande. Sin embargo, gran parte de él permanece sin explorar debido a la falta de conocimiento y, por lo tanto, no está disponible para fines de diseño. De esta manera, la aplicación sinérgica de ambos formalismos, también conocida como enfoque intermedio, probablemente aumentará las posibilidades de encontrar soluciones óptimas ([San León y Nogales, 2022](#)). Una ventaja de este enfoque es una preselección de candidatos bajo condiciones de campo expuestas a un estrés en un escenario realista mientras que el otro enfoque imita las condiciones de campo en un entorno simplificado. En este enfoque las características del microbioma a nivel molecular permiten seleccionar a los candidatos promisorios.

Siguiendo la estrategia tipo *bottom-up*, y teniendo una colección de PGPB, las posibles combinaciones para el diseño de comunidades sintéticas aumentan exponencialmente. Para manejar esta considerable cantidad de combinaciones, se utilizan redes que usan datos de entrada limitados (por ejemplo, presencia/ausencia de una combinación de bacterias, suministro de nutrientes en el medio de crecimiento) para predecir el fenotipo de la planta (contenido de fosfato de *Arabidopsis thaliana*). Usando este concepto es posible mejorar la selección de comunidades de PGPB sin entender el modo de acción y las interacciones de los miembros bacterianos, pero que combinen los mecanismos deseados ([Compant et al., 2019](#)). Esta y otras estrategias pueden aplicarse al diseño de comunidades sintéticas.

1.1.10. HORTICULTURA EN EL CINTURÓN HORTÍCOLA PLATENSE (CHP): MODO DE PRODUCCIÓN

El cinturón hortícola de La Plata (**CHP**) es una zona de producción de alimentos altamente perecederos la cual abastece a más de 14 millones de personas incluyendo el AMBA (área metropolitana de Buenos Aires) y otras regiones del país, destinando el total de su producción al mercado interno. Se caracteriza por unidades productivas muy intensivas en el uso de mano de obra, insumos y bienes de capital. Si bien numerosos estudios sitúan al CHP dentro del cinturón hortícola del gran Buenos Aires, la caracterización del nivel tecnológico, volumen y calidad de producción permiten diferenciar al CHP, comprendido por los partidos de La Plata, Florencio Varela y Berazategui (Figura 1.1.10a), como la principal región tecnológica-productiva de hortalizas frescas del país (Ortigoza Meza, 2014).



Figura 1.1.10a. Imagen satelital del partido de La Plata, Florencio Varela y Berazategui (Google Earth), destacando la extensión aproximada del Cinturón Hortícola Platense (CHP).

Si bien no se cuentan con datos censales actuales, diferentes estimaciones dan cuenta que la superficie cultivada del CHP no ha sufrido grandes variaciones en los últimos años; aunque sí se destaca el gran aumento del volumen producido por unidad de superficie: de 58.800 tn producidas en 4.753 has en 1988 ($12,37 \text{ tn ha}^{-1}$) a 138.407 tn producidas en 4902 has en 2010 ($28,23 \text{ tn ha}^{-1}$) (Lauría, 2011; Ferraris, 2014). Este notable incremento se debe principalmente a la masiva incorporación del paquete tecnológico que incluye el uso de invernáculo, el riego localizado, el uso de variedades mejoradas, así como una mayor utilización de fertilizantes químicos y fitosanitarios. Si bien no se cuenta con datos oficiales actualizados, el área de cultivo bajo cubierta ocupaba unas 1785 has en el último censo horti-florícola realizado por la provincia de Buenos Aires en 2005 (CHFBA, 2005), aunque en el año 2010 se estimó que el 75% del área cultivada se encontraba bajo cubierta (Stavisky, 2010; García, 2015). Tal como ha sido documentado en otras regiones hortícolas del mundo, como consecuencia de este tipo de actividad intensiva, los residuos de fitosanitarios se pueden encontrar tanto en el entorno que rodea las áreas de producción como en los productos alimenticios (Donkor et al., 2015). En el

CHP ha sido reportada la contaminación de cursos de agua con estos insumos (Mac Loughlin et al., 2017). Sumado a esto, el uso excesivo de fertilizantes químicos (que generalmente aportan N, P y K) también produce efectos nocivos en el ambiente además de afectar la disponibilidad de carbono, el pH y la osmolaridad del suelo, resultando, de acuerdo a varios reportes, en una reducción en la diversidad microbiana (Gupta et al., 2022). Otra de las prácticas de manejo ampliamente utilizadas anualmente durante la preparación del suelo para la campaña de primavera-verano, es el agregado de enmiendas orgánicas, principalmente provenientes del descarte de la actividad avícola y de caballerizas de la región.

Por lo mencionado anteriormente, el manejo agrícola convencional tiene consecuencias no sólo sobre la salud de la población (García et al., 2020) sino sobre la biodiversidad del ambiente en general, e incluso la del propio suelo (Meena et al., 2020) (Figura 1.1.5a). Si bien, mundialmente, ha habido un creciente aumento en el registro de los efectos que las prácticas de manejo intensivas, en general, provocan sobre la biodiversidad microbiana del ambiente agrícola suelo-planta, todavía es necesario seguir con las investigaciones en estos aspectos como para realizar alguna conclusión general o predicciones respecto de las alteraciones en la microbiota del suelo y de las plantas debido al uso prolongado del suelo bajo estas prácticas de manejo (Arif et al., 2020). En relación a este tipo de estudios en el CHP, de acuerdo a la búsqueda bibliográfica realizada, aún no existe información al respecto que haya sido documentada.

Algunas prácticas agrícolas que han comenzado a utilizar actualmente pequeños grupos de agricultores en el CHP con un enfoque agroecológico para mejorar el rendimiento y la calidad de sus cultivos tratando de cuidar el medio ambiente, incluyen la aplicación de fertilizantes y sanitizantes naturales (p. ej., productos de algas, biofumigación con crucíferas, biopreparados como purín de ajo o de ortiga), la rotación de cultivos y el uso de microorganismos benéficos, aunque en mucha menor medida.

1.1.11. LA PLANTA DE TOMATE: CULTIVO EN EL CHP Y CARACTERÍSTICAS

1.1.11.1 Cultivo en el CHP

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes mundialmente después de la papa, tanto en el plano productivo como económico (<http://faostat.fao.org>, noviembre de 2021). En Argentina actualmente el tomate es el segundo cultivo hortícola más producido alcanzando 1,2 millones de toneladas de tomate fresco y ocupando el puesto 12 entre los productores mundiales de la industria del tomate. Las principales zonas productoras de tomate fresco son los cinturones hortícolas de La Plata y Mar del Plata, aunque también hay producciones considerables en las provincias de Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Mendoza, Río Negro, Salta, San Juan y Santa Fe. En Argentina, además, el tomate ocupa el primer lugar entre las hortalizas cultivadas bajo cubierta en invernadero [MAGyP, 2020]. El CHP es una de las áreas de mayor producción bajo cubierta (García, 2011), siendo el tomate el cultivo hortícola superior en orden de importancia.

Además de ser el cultivo de mayor importancia en la región, también resulta el cultivo donde mayor diversidad de principios activos son empleados para mitigar las plagas y enfermedades. Según un informe conjunto de la [Defensoría del Pueblo de la Provincia de Buenos Aires y la UNLP \(2015\)](#) en este cultivo se han utilizado hasta 69 principios activos diferentes durante la campaña 2012/13. Dentro de los principios activos utilizados, predomina el uso de insecticidas frente a los fungicidas, representando los primeros más del 60% de los productos utilizados. Al analizar las clases toxicológicas¹⁰ de los principios activos utilizados en el cultivo de tomate observaron que el 60% de los principios activos insecticidas utilizados correspondieron a clases toxicológicas I y II (13% a la clase Ib y 47% a la clase II), representando una alta peligrosidad de manipuleo, riesgos de intoxicación como así también mayores daños ecológicos/ambientales. Resulta también alarmante el uso de 7 principios activos que, si bien están debidamente registrados en SENASA, no cuentan con el correspondiente registro de uso en el cultivo de tomate por lo que no informa oficialmente modo de uso, dosis o tiempo de carencia¹¹, lo que pone en riesgo la liberación al mercado de productos que superen el límite máximo de residuos¹². No obstante, las plagas sobre las que actúan estos principios activos, tanto los de mayor peligrosidad como los de menor peligrosidad, resultan ser las mismas para uno y otro grupo, lo cual permitiría volcarse al uso de productos de categoría IV, de mayor selectividad en cuanto a la plaga a controlar y de menor peligrosidad para el productor/consumidor y el medioambiente ([Fernández Acevedo et al., 2015](#)). Las oportunidades de crecimiento que tiene este cultivo son realmente importantes ya que solo el 68% de la demanda interna es abastecida por la producción interna, no obstante, el acelerado proceso de degradación del suelo debido a las prácticas agrícolas inadecuadas conduce a la urgente investigación y desarrollo de prácticas más sustentables.

1.1.11.2 Características morfológicas de la planta de tomate

En cuanto a las características morfológicas de la planta de tomate ([Figura 1.1.11a](#)), presenta un tallo erguido y cilíndrico en la planta joven; a medida que ésta crece, el tallo cae y se vuelve anguloso, presenta vellosidades en la mayor parte de sus órganos y glándulas que segregan una sustancia de color verde aromática, puede llegar a medir hasta 2,50 m, ramifica de forma abundante y tiene yemas axilares. Si al final del crecimiento todas las ramificaciones exhiben yemas reproductivas, estas se clasifican como de crecimiento determinado y si terminan con yemas vegetativas, son clasificadas como de crecimiento indeterminado. Las hojas son compuestas, se insertan sobre los diversos nudos en forma alterna. El limbo se encuentra fraccionado en siete, nueve y hasta once folíolos. El haz es de color verde y el envés de color grisáceo. La disposición de nervaduras en los folíolos es penninervia. La flor está formada por un pedúnculo corto, el cáliz tiene los sépalos soldados entre sí, al igual que la corola con los pétalos. Las flores son hermafroditas. El cáliz está compuesto de cinco sépalos y la corola de cinco pétalos amarillos (ocasionalmente seis). Los estambres, se reúnen

¹⁰ Criterios de clasificación de los ingredientes o principios activos constituyentes de los fitosanitarios desde clase I (extremadamente peligroso) a clase IV (normalmente no presentan peligro de uso) de acuerdo a la toxicidad aguda oral, dermal o inhalatoria establecido por la resolución 302/2012 de SENASA según los criterios de la Organización Mundial de la Salud a partir del Programa Internacional sobre Seguridad de Químicos ([Pina, 2012](#)).

¹¹ número de días que debe transcurrir entre la última aplicación del fitosanitario y el momento de cosecha o uso del cultivo tratado (frutos, granos, pastoreo) ([SENASA, 2012](#)).

¹² Máxima concentración de residuos de un plaguicida que se permite legalmente en productos y subproductos de la agricultura ([FAO, 2018](#)).

formando un tubo alrededor del gineceo. El estilo es más corto o tan largo como los estambres; posición que favorece considerablemente la autopolinización. El fruto es una baya de color rojo bajo en caseína, cuyo tamaño es variable, desde 3 cm de diámetro hasta 16 cm, con semillas dentro de un pericarpio carnoso desarrollado de un ovario. Su forma puede ser redondeada, achatada o en forma de pera y su superficie lisa o asurcada. La semilla es de diferentes tonalidades en su color, desde el grisáceo, hasta el color paja de forma oval aplastada; tamaño entre 3 y 5 mm de diámetro y 2,5 mm de longitud, y cubierta de vellosidades y están embebidas en una abundante masa mucilaginosa. La raíz, que es pivotante, alcanza hasta 1,5 m de profundidad (<https://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>; Cátedra de Horticultura, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP).

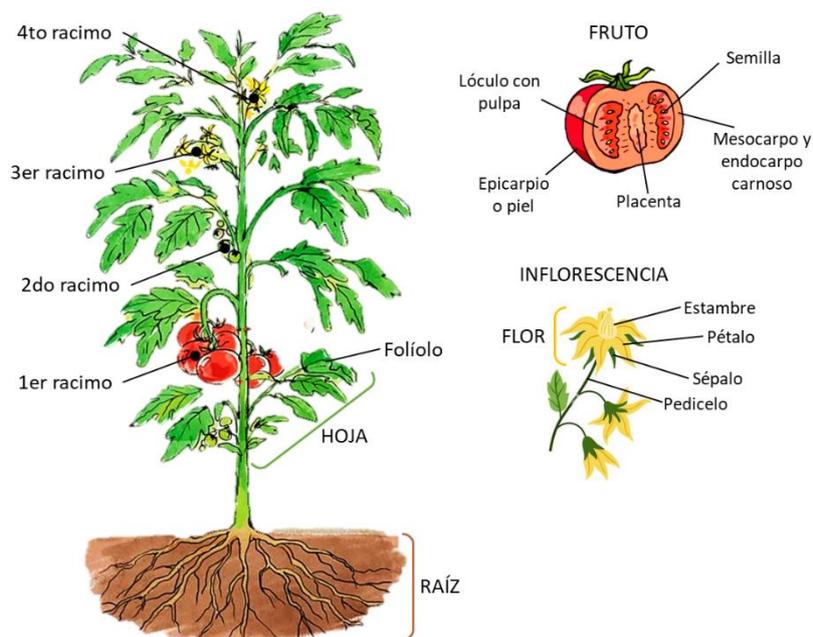


Figura 1.1.11a Morfología de la planta del tomate. Adaptado de [Cátedra de Horticultura, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP](#).

En relación a los requerimientos del cultivo, la temperatura óptima de desarrollo del cultivo de tomate oscila entre los 20 y 30 °C durante el día y entre 10 y 17 °C durante la noche. Las temperaturas superiores a los 35 °C impactan negativamente sobre el desarrollo de los óvulos fecundados y, por ende, afectan el crecimiento de los frutos. Por otro lado, las temperaturas inferiores a 12 °C afectan adversamente el crecimiento de la planta. Las temperaturas son especialmente críticas durante el período de floración, ya que por encima de los 25 °C o por debajo de los 12 °C la fecundación raramente se produce. Durante la fructificación las temperaturas inciden sobre el desarrollo de los frutos, acelerándose la maduración a medida que se incrementan las temperaturas. No obstante, por encima de los 30 °C (o por debajo de los 10 °C) los frutos adquieren tonalidades amarillentas. La humedad relativa óptima oscila entre 60 % y 80 %. Con humedades superiores al 80% incrementa la incidencia de enfermedades en la parte aérea de la planta y puede determinar, además, el agrietamiento de los frutos o dificultades en la polinización. En el otro extremo, una humedad relativa menor al 60 % dificulta la fijación de los granos de polen al estigma, lo que dificulta la polinización. El tomate necesita

de condiciones de muy buena luminosidad, de lo contrario los procesos de crecimiento, desarrollo, floración, polinización y maduración de los frutos pueden verse negativamente afectados. En cuanto al tipo de suelo, la planta de tomate no es muy exigente excepto en lo que se refiere al drenaje, el cual tiene que ser bueno ya que no soporta el anegamiento. No obstante, prefiere suelos sueltos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica. En cuanto al pH, los suelos pueden ser desde ligeramente ácidos hasta ligeramente alcalinos cuando están enarenados. Es la especie cultivada en invernadero que mejor tolera las condiciones de salinidad tanto del suelo como del agua de riego.

El tomate, al igual que otras hortalizas, se siembra en almacigo y luego se trasplanta a suelo (Figura 1.1.11b). Es una forma de adelantar tiempo, de asegurar mayores cuidados a las plantas y así tener mayor seguridad de que éstas crezcan con menos problemas. En general, esta etapa no se hace en el establecimiento de producción sino en establecimientos especializados o plantineras. Esta especie es una planta arbustiva que en su forma silvestre puede tener un ciclo de vida superior a un año; sin embargo, con la ayuda de la ingeniería genética y procesos de selección, se han desarrollado cultivares que, con una infraestructura adecuada para controlar las condiciones ambientales de cultivo, así como el uso de insumos, permiten obtener mejores rendimientos en poco tiempo. Se pueden distinguir varias etapas fenológicas en su ciclo de crecimiento (Figura 1.1.11b) (Cátedra de Horticultura, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP).

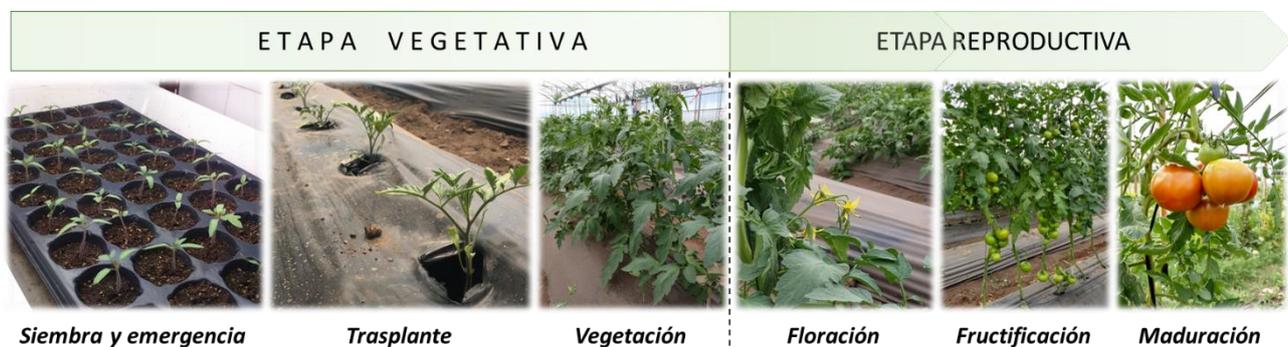


Figura 1.1.11b. Etapas fenológicas del cultivo de tomate.

1.1.12. INVESTIGACIÓN DONDE SE ENMARCA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO

En el grupo de Microorganismos de Aplicación en la Agricultura (MAALab) del CINDEFI (Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, CONICET-UNLP) en donde se realizó este trabajo, se han llevado a cabo actividades de investigación y desarrollo con bacterias promotoras del crecimiento vegetal desde hace más de 20 años, particularmente con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, su caracterización fisiológica en biorreactores y su interacción con plantas mayormente de cultivos extensivos. Desde hace unos años, debido a su inserción en la región del CHP y el conocimiento de su problemática, en el MAALab se vienen

realizando trabajos de investigación con cultivos hortícolas como tomate y lechuga, enfocados en la investigación, desarrollo y validación de bioinsumos a base de PGPB, individuales y multiespecies, tanto de bacterias de colección o recomendadas por el INTA con la idea de mejorar su producción con prácticas amigables para la salud de todos. Con este trabajo de tesis, se pretende ampliar la visión del grupo y comenzar la búsqueda de estrategias biotecnológicas que conduzcan a una producción sustentable de estos cultivos, no sólo a través de la bioprospección de bacterias obtenidas del ambiente de las plantas de tomate del CHP en el cual se pretenden aplicar, sino también a través de la incorporación de técnicas independientes de cultivo enfocadas en la comprensión sobre cuál es su composición y cómo se estructuran las comunidades microbianas y los factores intrínsecos y ambientales que pueden modularla. Profundizar en el conocimiento de estas comunidades microbianas asociadas a los distintos microhábitats, en particular la fitomicrobiota bacteriana, así como sus modificaciones provocadas por distintos factores, permite una mejor comprensión del funcionamiento del holobionte planta y no solo suma al conocimiento ecológico sobre las interacciones planta-bacteria, sino que también sienta las bases sobre las cuales se pueden tomar decisiones agronómicas respecto al mejor uso benéfico de la microbiota.

Dentro de las especies vegetales empleadas para los estudios de efectos de promoción de crecimiento por las PGPB, la planta de tomate como modelo de estudio representa una elección interesante ya que, como se mencionó previamente, es un cultivo con considerables exigencias nutricionales que normalmente son suplidas por fertilizantes químicos además de presentar numerosas plagas y enfermedades que se tratan comúnmente con fitosanitarios. En este trabajo se utilizó como modelo de estudio la especie de tomate híbrido cv. *elpida* redondo indeterminado, desarrollado por la empresa Enza Zaden. La elección del cultivar se debe a que dicho híbrido es (aún hoy) la más utilizada por los productores del CHP por sus características en cultivo y postcosecha:

- Precoz y ampliamente adaptado a muchos tipos de cultivo y climas
- Hábito de crecimiento constante y vigoroso
- De alto rendimiento, color verde oscuro a frutos rojos de calidad
- De bajo mantenimiento -Planta fuerte, con entrenudos cortos
- Uniformes, grandes, frutos redondos de color rojo vivo
- Frutos de alta calidad con buena vida útil.

Es escasa la información en relación a la microbiota asociada a los microhábitats subterráneos y aéreos de las plantas de tomate cultivadas en el CHP en condiciones de producción:

[Romero et al., \(2014\)](#), realizó estudios de la microbiota bacteriana endófitas de hoja y de rizosfera asociada a plantas de tomate var. *platense* por métodos independientes, pero no con plantas cultivadas en condiciones

de producción sino en macetas en invernadero con suelo proveniente de cultivo en producción orgánica en el CHP.

Romero et al., (2016), realizó estudios de la microbiota bacteriana endófitas de hoja de diferentes variedades de tomate provenientes de cultivos productivos del CHP por métodos dependientes de cultivo.

Collavino et al. (2020), realizaron estudios de las comunidades bacterianas endófitas (de raíz y tallo) portadoras del gen *nifH* asociadas a plantas de tomate var. *Elpida* cultivadas en el CHP.

López et al., (2020), realizaron estudios de la microbiota bacteriana endófitas (de raíz, tallo, hoja y fruto) de plantas sanas y enfermas de tomate var. *elpida* cultivadas en el CHP, por métodos dependientes e independientes de cultivo.

Por todo lo expuesto, queda claro que conocer cuál es la composición, la estructura y la funcionalidad de las comunidades bacterianas del holobionte vegetal resulta de gran interés, tanto con fines ecológicos para determinar su procedencia y su rol funcional dentro de la comunidad, como para poder descubrir cuáles pueden ser bacterias beneficiosas que contribuyan a la búsqueda de potenciales microorganismos promotores del crecimiento para utilizarlos como bioinsumos agrícolas ya sea como biocontroladores, biofertilizantes y/o fitoestimulantes, en particular en cultivos hortícolas como tomate cultivados en el CHP.

1.2 HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas en este trabajo, considerando plantas de tomate variedad *elpida* como modelo de estudio, suponen que:

- Los microhábitats asociados a plantas de tomate var. *elpida* –incluyendo el suelo– hospedan comunidades bacterianas diferentes con una mayor similitud entre las comunidades de la endosfera de los distintos órganos vegetales debido a la selección ejercida por el hospedero al ingreso de bacterias a dichos compartimentos endofíticos.
- Las prácticas agrícolas convencionales e intensivas implementadas durante años modifican las propiedades físico-químicas del suelo y, consecuentemente, su comunidad bacteriana alterando las características de las comunidades bacterianas de rizosfera y endosfera de plantas de tomate var. *elpida*.
- La endosfera y la rizosfera de plantas de tomate var. *elpida* son habitadas por diversas bacterias con capacidad de promoción del crecimiento vegetal y biocontrol, las cuales pueden ser aisladas y caracterizadas para su uso biotecnológico como bioinsumos con acción biofertilizante, bioestimulante y/o biocontroladora de hongos fitopatógenos.

1.3 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las hipótesis propuestas y las apreciaciones mencionadas en este capítulo, el objetivo general y los objetivos específicos de este trabajo se detallan a continuación.

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

→ Mejorar los sistemas de producción hortícola del CHP mediante propuestas de manejo productivo fundamentadas en el conocimiento de la estructura y funcionalidad de la microbiota bacteriana asociada a los agroecosistemas, y el uso eficiente de los servicios ecosistémicos que esta microbiota brinda, contribuyendo a un modelo de agricultura sustentable.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Explorar y describir la abundancia, composición y estructura taxonómica y funcional de las comunidades bacterianas asociadas al cultivo de tomate var. *elpida*.

→ Evidenciar el efecto de la acumulación de prácticas agronómicas intensivas ligadas a la actividad hortícola sobre la composición y estructura de la microbiota del suelo y la microbiota vegetal del cultivo de tomate var. *elpida*.

→ Obtener una colección bacteriana a partir de las comunidades asociadas a raíz, tallo y fruto de plantas de tomate var. *elpida* cultivadas en condiciones de producción. Caracterizar taxonómica de los aislamientos, y también en relación a los diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal mediante ensayos in vitro e in vivo, que permitan seleccionar aquellos aislamientos con mayor potencial de promover el crecimiento vegetal/biocontrol para su potencial uso como bioinsumos agrícolas.

A continuación, se detalla una breve descripción del diseño del experimento general que se llevó a cabo para la comprobación de las hipótesis y el cumplimiento de los objetivos específicos planteados en este trabajo.

1.4 SITIOS DE ESTUDIO DEL CHP Y DISEÑO GENERAL DEL EXPERIMENTO

Las hipótesis y los objetivos planteados en este trabajo de tesis serán abordados mediante un diseño de experimento bifactorial, el cual involucra el estudio de los efectos principales de dos factores y su posible interacción sobre distintas variables medidas en el objeto de estudio (la microbiota bacteriana asociada a plantas de tomate). Los dos factores del diseño son:

- ⊕ El **microhábitat**, con 5 niveles: suelo, rizosfera, raíz, tallo y fruto. Este factor permitirá evidenciar el efecto del microhábitat sobre las comunidades bacterianas asociadas a plantas de tomate.
- ⊕ El **sitio de estudio**, con 2 niveles: Establecimiento Viento Norte (**VN**) y Establecimiento del productor Mario (**M**). Este factor permitirá evaluar el efecto de las prácticas agrícolas convencionales e intensivas implementadas durante años sobre las comunidades bacterianas asociadas a plantas de tomate.

En ambos establecimientos se trasplantaron cultivos tardíos de tomate var. *elpida* la primera semana de enero de 2017. Los plantines que iniciaron el cultivo en ambos establecimientos fueron provistos por la misma plantinera (Plantar SRL, Av. 44 y calle 242, La Plata).

Los sitios de estudio son dos establecimientos hortícolas, ubicados en la localidad de Los Hornos del partido de La Plata, dentro de la región del CHP ([Figura 1.4a](#)). Al tratarse de establecimientos muy cercanos geográficamente, cuentan *a priori* con los mismos perfiles de suelos característicos de la región, incluso con las mismas descripciones según el proyecto de suelos de la Pcia. de Buenos Aires del [GeoINTA](#).

- ESTABLECIMIENTO VIENTO NORTE

Ubicado en las coordenadas (-57,9344|-35,0158). Este establecimiento se dedica principalmente a la producción de tomate y pimiento, aunque también produce pequeñas partidas de lechuga. Cuenta con una superficie total de 25 ha cubiertas con invernáculo.

Según la descripción de suelos del INTA ([GeoINTA](#), proyecto de suelos de la Pcia. de Buenos Aires 1:50000), se ubica sobre la unidad cartográfica **Etch1**. Dicha unidad cartográfica resulta de una consociación de las series de suelo Etcheverry (80%) y Poblet (20%), calificada en capacidad de uso IVws y un índice de productividad de 46,1_A.

Este establecimiento cuenta con una vasta experiencia en producción hortícola, principalmente en el cultivo de tomate, con más de 25 años realizando esta actividad. Particularmente, el invernáculo donde se tomaron las muestras para este trabajo tiene un historial de monocultivo de tomate de más de 10 años.

Estas características son las descritas en el diseño del experimento empleado en este trabajo como el sitio de estudio con un amplio historial de cultivos hortícolas, y prácticas agrícolas convencionales intensivas acumuladas durante años (Figura 1.4b).

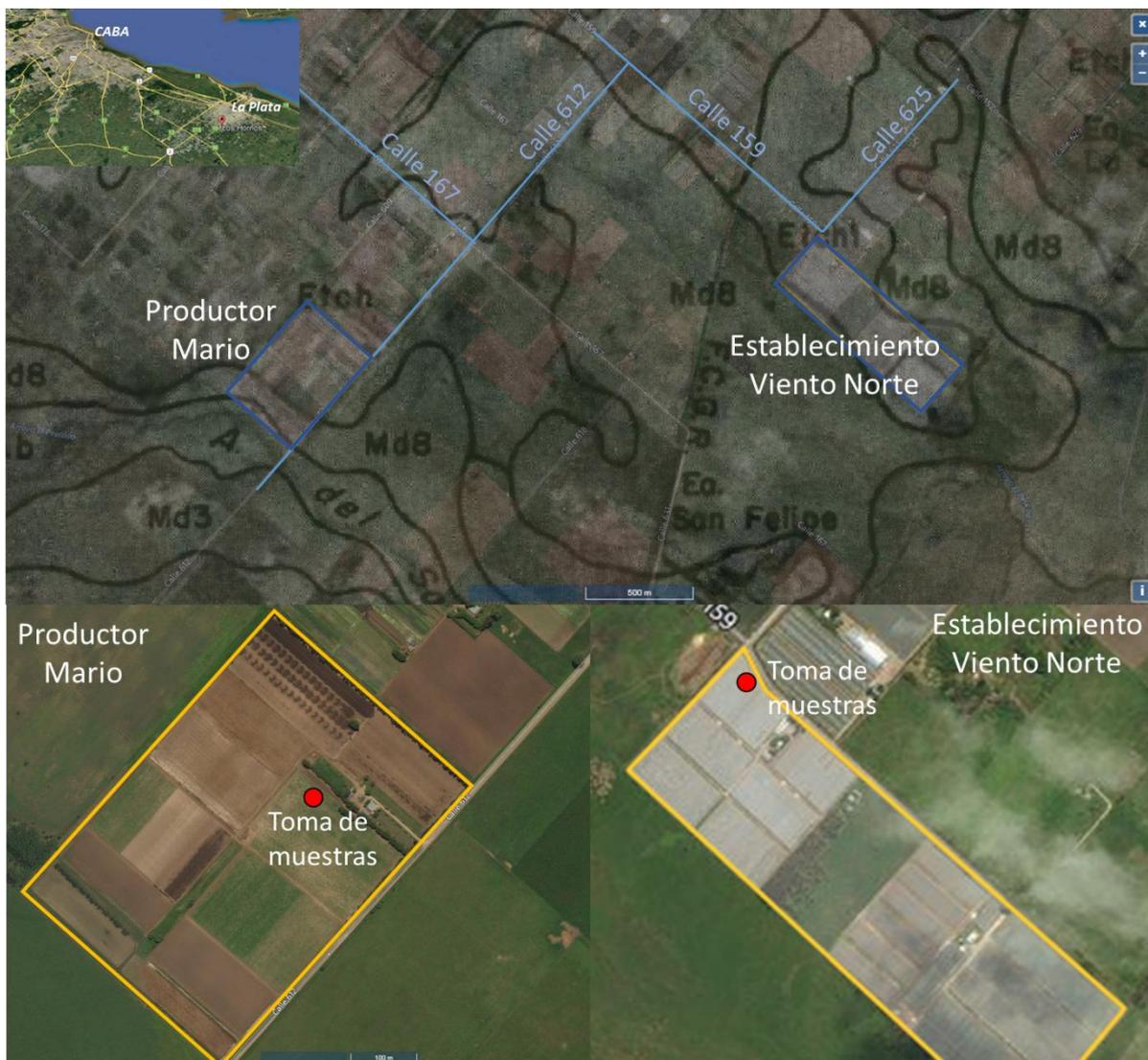


Figura 1.4a Imagen satelital de los establecimientos hortícolas Viento Norte (VN) y Productor Mario (M). Arriba: Mapa de suelos superpuesto con las respectivas unidades cartográficas (Fuente: [Visor GeoINTA](#)). Abajo: imagen satelital de cada establecimiento obtenida de Google Earth.

- *Establecimiento del Productor Mario*

Ubicado en las coordenadas (-57,9593 | -35,0207). Es un establecimiento hortícola donde se llevan a cabo diversas producciones como lechuga, cebolla de verdeo, brócoli, repollo, zapallito y principalmente tomate y pimiento. Dicho predio cuenta con una superficie de 20 ha, de las cuales 11,5 ha se encuentran en condiciones productivas: 5 ha bajo cubierta (la imagen satelital es antigua y no muestra los invernáculos recientemente instalados), y 6,5 ha sin cubierta.

Según la descripción de suelos del INTA ([GeoINTA](#), proyecto de suelos de la Pcia. de Buenos Aires 1:50000), en el establecimiento predomina la unidad cartográfica **Etch**, Consociación de las series Etcheverry (90%) e Ignacio Correa (10%), calificada con capacidad de uso IIw, e índice de productividad: 61,8_A.

Si bien el establecimiento lleva varios años en actividad, recientemente se amplió a zonas nunca antes cultivadas, donde se instalaron nuevos invernáculos y se realizó en el año 2017 el primer cultivo en dichos suelos, el cual fue un cultivo de tomate var. *elpida*.

Estas características son las descriptas en el diseño del experimento empleado en este trabajo como el sitio de estudio sin historial de prácticas agrícolas convencionales intensivas acumuladas, y con un primer cultivo de tomate (Figura 1.4b).

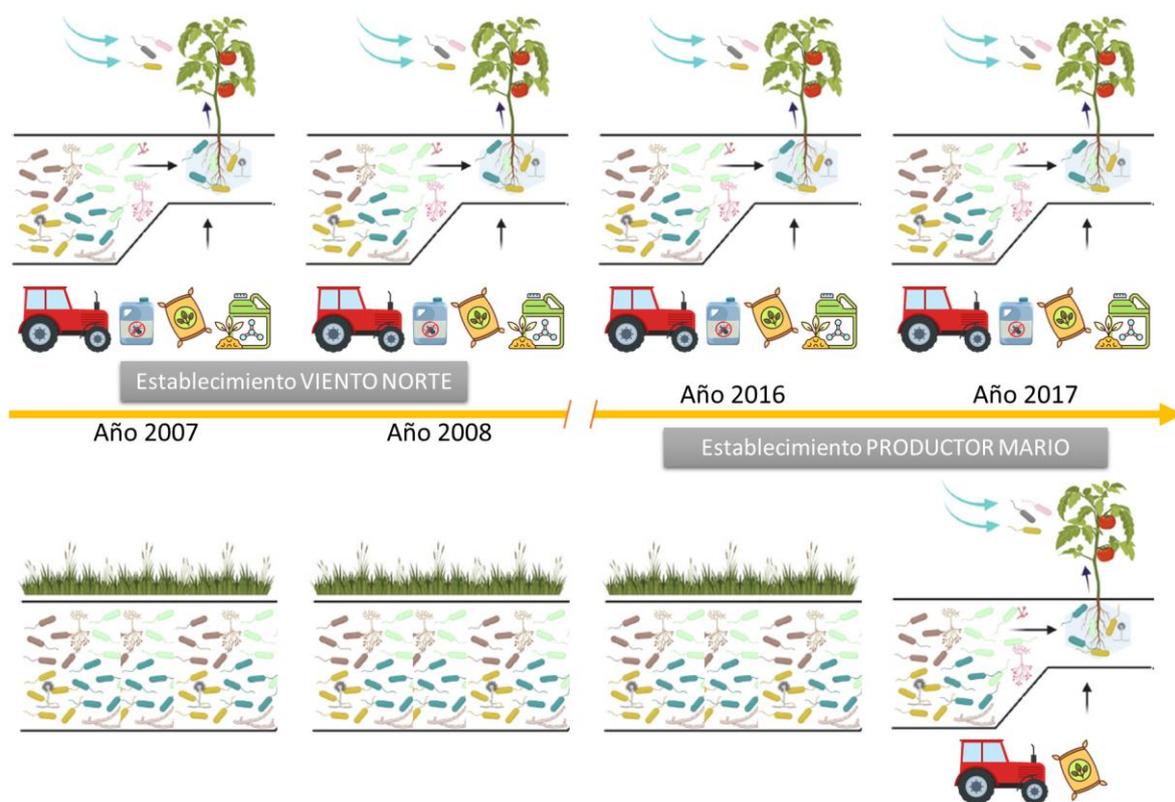


Figura 1.4b Esquema del historial productivo y la acumulación de prácticas agrícolas convencionales intensivas en ambos sitios de estudio: Establecimiento Viento Norte (VN) y Establecimiento del Productor Mario (M).

CAPÍTULO 2

MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA A PLANTAS DE TOMATE var. elpida CULTIVADAS EN EL CHP: CARACTERIZACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES

Enfoque ecológico sobre las comunidades

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1. COMUNIDADES BACTERIANAS DEL ENTORNO VEGETAL: ABUNDANCIA, COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA

Tal como se detalló en el Capítulo 1, debido al desarrollo y alcance de las técnicas independientes de cultivo y a la importancia descubierta en la fitomicrobiota en la última década, tanto estudios ecológicos como de bioprospección han tomado gran relevancia. Un resumen de las investigaciones realizadas específicamente de la microbiota bacteriana se describe en los siguientes párrafos.

✘ La mayor cantidad de estudios sobre la microbiota asociada a ambientes agrícolas se realizó en el *bulk* del suelo y en relación al entorno de las plantas se han realizado principalmente en la rizosfera.

✘ La estimación de las poblaciones bacterianas mediante qPCR del gen ARNr 16S en microhábitats de suelo y de diferentes especies vegetales mostró los siguientes resultados:

- Valores de $\sim 10^7$ y $\sim 10^{10}$ copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso seco y fresco de suelo, respectivamente (Azarbad et al., 2022; Olimi et al., 2022).
- Valores entre 10^9 – 10^{11} y $\sim 10^{12}$ copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso seco en rizosfera de *Cajanus cajan* y algodón, respectivamente (Sharma et al., 2020; Zhang et al., 2016).
- Valores entre 10^8 – 10^{11} copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso seco en rizosfera de plantas endémicas de distintos ambientes extremos de Chile (Acuña et al., 2016).
- Similares valores en el número de copias del gen ARNr 16S en suelo y rizosfera ($\sim 10^{10}$ copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso fresco), que difirieron de los hallados en la filosfera de hojas, flores y frutos de plantas de frutilla (10^7 - 10^8 copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso fresco) (Olimi et al., 2022).
- Niveles poblacionales bacterianos significativamente mayores en rizosfera (10^{12} – 10^{13} copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso seco) respecto a la endosfera de raíz (10^7 – 10^8 copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso seco) de plantas de trigo cultivadas sobre suelos andisoles en Chile (Rilling et al., 2018).
- Valores de $\sim 10^9$ y $\sim 10^6$ copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso fresco en endosfera de raíz y hoja de plantas de arroz, respectivamente (Chen et al. 2022).
- La abundancia de copias del gen ARNr 16S bacteriano por gramo fue 13,7 veces mayor en las muestras de rizosfera ($1,5 \times 10^{10}$) en comparación con muestras de suelo a granel ($1,1 \times 10^9$), y su la abundancia por gramo de muestras de raíces de plantas de *Medicago truncatula* fue $3,3 \times 10^9$ (Wang et al., 2020)

Diversos estudios muestran que el número de copias del gen ARNr 16S por cada célula procariota varía entre 1-15 (Sun et al., 2013), y debido a esto el resultado de la cuantificación no representa fielmente el número de células bacterianas, sino que es una sobreestimación de la densidad poblacional real. No obstante, esta técnica es válida para comparar la abundancia y estructura de las comunidades entre distintos microhábitats.

✘ En lo que respecta al impacto de las prácticas agrícolas sobre la abundancia de las poblaciones bacterianas, la mayoría de los resultados publicados son sobre la microbiota del suelo y muestran resultados contrastantes, como por ejemplo:

- [Rahman et al., \(2020\)](#) informaron que en suelos con amplio historial de fertilización química y uso de pesticidas en cultivo de arroz el N° de copias del gen ARNr 16S fue significativamente menor ($\sim 4 \times 10^{10}$ copias g^{-1}) comparado con un cultivo de arroz en un suelo vecino sin uso de agroquímicos ($\sim 6 \times 10^{11}$ copias g^{-1})
- [Macedo et al., \(2021\)](#) no encontraron diferencias en los valores del gen ARNr 16S (10^{10} – 10^{11} copias g^{-1} de peso seco) en 4 suelos distintos con y sin el agregado de una enmienda orgánica
- [Jorquera et al., \(2013\)](#) aseguraron un aumento de la densidad poblacional bacteriana en rizosfera de gramíneas con las mayores dosis de fertilizante nitrogenado.

Considerando al suelo como sistema vivo complejo, ha sido caracterizado por contener una amplia gama de microentornos, cuyas características bióticas y abióticas así como su respuesta a determinados disturbios pueden variar considerablemente en la escala de micrones a milímetros (Fierer, 2017). Esto hace que la bibliografía al respecto muestre resultados muy variables, incluso en suelos de características similares. Por otro lado, uno de los pocos estudios sobre el impacto del manejo agronómico en el N° copias del gen ARNr 16S de microhábitats vegetales fue el de [Wassermann et al. \(2019\)](#), quienes determinaron que no hubo diferencias significativas en las poblaciones bacterianas en diferentes partes del fruto de manzanos (pedúnculo, cascara, pulpa, semilla) según el tipo de manejo agronómico utilizando durante su cultivo (orgánico/convencional), aunque sí hubo variación debido a la parte del fruto evaluada (factor microhábitat).

✘ La composición y estructura de las comunidades del suelo puede verse afectada por las prácticas agrícolas, las cuales pueden también impactar en las comunidades rizosféricas, a diferencia de las lo que ocurre con las comunidades de la endosfera cuyo principal condicionante se ha reportado como el genotipo de la planta hospedera.

✘ En comparación con la microbiota de la rizosfera, la microbiota de la filosfera es menos diversa y abundante, sin embargo su papel ecológico es igualmente importante para la salud y el estado físico de las plantas.

✘ Se han descrito una gran cantidad de phylum bacterianos presentes en la naturaleza, no obstante, a pesar de ello y de los múltiples factores que puedan afectar a los componentes del fitomicrobioma, se encontró que las Proteobacterias, Actinobacterias y Bacteroidetes son los phylum dominantes, tanto en la parte subterránea como en la parte aérea (Bulgarelli et al., 2013; Hacquard, 2016).

✘ Las comunidades bacterianas de la rizosfera pueden ser semejantes a las del *bulk* del suelo en términos de diversidad, pero se enriquecen en determinados phylum en las distintas plantas en donde los rizodépósitos liberados por las raíces pueden desempeñar un papel importante en la amplificación de los taxones bacterianos dominantes. Entre éstos se han encontrado Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia y Proteobacteria (Dastogeer et al 2020; Chialva et al., 2022). Algunos de los géneros reportados incluyen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Cellulomonas* y *Micrococcus* (Mendes et al., 2011 y 2013), y su selección podría estar relacionada con ciertas características propias como la eficiencia en el uso de nutrientes y la velocidad de crecimiento (Chialva et al., 2022).

✘ En cuanto a la rizoendosfera, se observa en general una disminución de la diversidad y riqueza microbiana respecto de la rizosfera, con importantes cambios en la composición taxonómica: predominio del phylum Proteobacteria (~50% en abundancia relativa), específicamente las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria, Actinobacteria (~10%), Firmicutes (~10%) y Bacteroidetes (~10%) (Liu et al., 2017). En algunos de los estudios se encontró que Acidobacteria, Gemmatimonadetes y Arqueas disminuyen desde el *bulk* del suelo hacia la endosfera de la raíz mientras que las Proteobacterias (especialmente las Gammaproteobacteria) aumentan significativamente en abundancia (Edwards et al., 2015; Liu et al., 2017).

✘ Tal como se mencionó previamente en el [Capítulo 1](#), las comunidades bacterianas del suelo son las más estudiadas en cuanto al efecto de las prácticas agrícolas sobre su estructura y, mayoritariamente, se han estudiado en cultivos extensivos, con distintas intensidades labranza, bajo manejo orgánico o convencional, y muestran que los cultivos con mínima labranza y llevados a cabo en forma orgánica, en general, mejoran la diversidad de las comunidades del suelo.

✘ Al igual que lo reportado en relación a la abundancia de poblaciones bacterianas del suelo, se encontraron resultados dispares también en relación a cómo se ve afectada su composición y estructura de las en función del agregado de fertilizantes nitrogenados (N) y fosforados (P) (Barros Rodríguez et al., 2021; Berg et al., 2022):

- Un ensayo realizado en cultivo de arroz que combinó fertilización química (N y NP) y orgánica (estiércol) mostró que la aplicación continua de N y NP con o sin enmienda orgánica durante más de cuatro décadas en el suelo de arroz condujo a la modificación de las comunidades bacterianas: la mayor riqueza de OTUs bacterianos se registró en el tratamiento fertilizado con NP; los phylum dominantes en todos los tratamientos fueron Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria,

Chloroflexi y Firmicutes, que representaron alrededor del 80-85% del total de OTUs; algunos de estos phylum fueron suprimidos con la aplicación solo de N y otros presentaron una mayor abundancia relativa (Firmicutes, Actinobacteria y Nitrospira). El uso continuo de N en el suelo suprimió considerablemente algunos taxones diazotófos como Burkholderiales y Enterobacteriaceae (Kumar et al., 2018).

- Altos niveles de fertilizantes afectaron negativamente la riqueza y diversidad bacteriana de la rizosfera de plantas de trigo (Kavamura 2018).
- Un uso excesivo de fertilizantes nitrogenados provocó una disminución de la abundancia relativa de Bacteroidetes y un aumento de Actinobacterias y Proteobacterias (α y γ) en las comunidades de la rizosfera de trigo (Chen et al., 2019).
- Altas dosis de fertilizantes disminuyeron la diversidad de la comunidad microbiana del suelo, pero se seleccionaron microorganismos tolerantes a la aplicación alta de nitrógeno y fósforo (Zhang et al., 2021).
- Un meta-análisis de datos mostró que: el fertilizante N aumentó la diversidad microbiana cuando los estudios se realizaron durante un período superior a 5 años, incluso cuando se aplicó N a dosis elevadas. En ambos casos se condujo a la acumulación de materia orgánica del suelo (MOS) ya sea directamente a través de la aplicación de materiales orgánicos o a través de incrementos inducidos por fertilizantes en aportes de carbono derivados de plantas al suelo (de Graaff et al., 2019).
- La aplicación de N y/o P en una plantación de abetos subtropicales en el sur de China modificó las características de las comunidades bacterianas del suelo: la riqueza y diversidad bacteriana disminuyó más con la adición de N (N y NP) que solo con el agregado de P. Proteobacterias, Acidobacterias y Actinobacterias fueron los phylum principales en todos los tratamientos. La adición de N aumentó la abundancia relativa de Proteobacteria y Actinobacteria en 42,0 y 10,5%, respectivamente, mientras que redujo la de Acidobacteria en un 26,5% (Wang et al., 2018).

La enorme diversidad genética y metabólica de la microbiota bacteriana asociada a las plantas y su entorno, sumada a la variedad de ambientes, denota la complejidad de su estudio (Jakoby et al., 2017).

2.1.2. MICROBIOTA ASOCIADA A PLANTAS DE TOMATE

En lo que respecta a estudios de la microbiota asociada a plantas de tomate, considerando la importancia de este vegetal a nivel mundial, y en concordancia con el interés en los estudios de fitomicrobiota en la última década tal como se mencionó en el Capítulo 1, las investigaciones al respecto aumentaron de manera

exponencial: de acuerdo a una búsqueda con palabras claves “tomato plant microbiota” (Buscador [Pubmed](#) del [NCBI](#)) se encontraron 2 trabajos en 2012, en 2017 (inicio de este trabajo de tesis) 13 trabajos y en 2022 39 trabajos (y no todos tienen que ver con la caracterización de la microbiota de tomate) ([Figura 2.1a](#)), indicando el interés de diversos grupos de investigación en descubrir y describir la microbiota asociada a plantas de tomate, utilizando tanto métodos dependientes como independientes de cultivo.

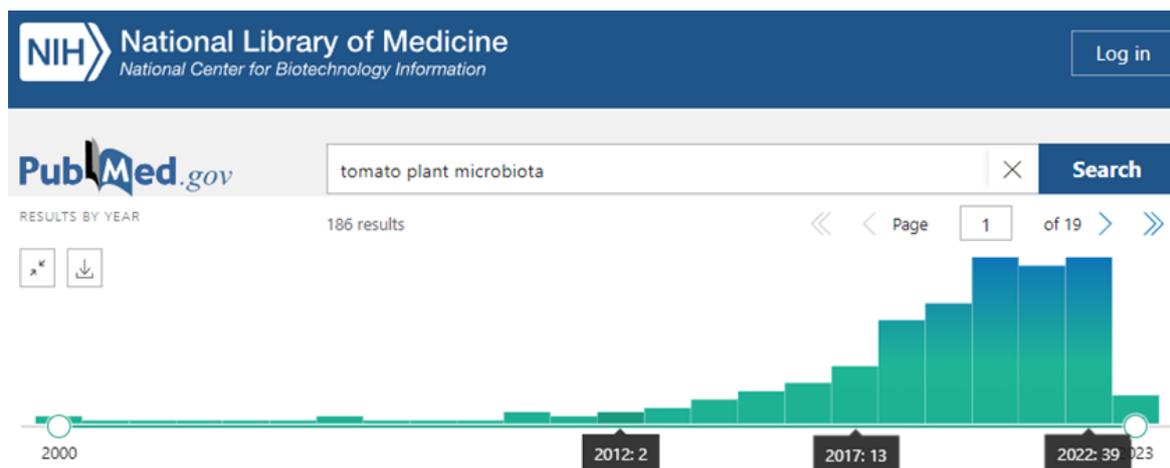


Figura 2.1.2a Número de publicaciones anuales sobre el estudio de la microbiota de las plantas de tomate en los últimos 10 años.

En la [Figura 2.1.2b](#), se muestran datos recopilados de 25 estudios de metabarcoding sobre comunidades bacterianas asociadas a plantas de tomate empleando en particular técnicas independientes de cultivo, específicamente tecnologías de secuenciación masiva como Pirosecuenciación e Illumina ([Allard et al., 2016](#); [Allard et al., 2018](#); [Babaola et al., 2022](#); [Bergna et al., 2018](#); [Cai et al., 2017](#); [Caradonia et al., 2019](#); [Dong et al., 2019](#); [Kwak et al., 2018](#); [Eltlbany et al., 2019](#); [Escobar Rodríguez et al., 2020](#); [Flemer et al. 2022](#); [French et al., 2020](#); [Larousse et al., 2017](#); [Lee et al., 2019](#); [Li et al., 2014](#); [López et al., 2018](#); [López et al., 2020](#); [Muñoz-Ucros et al., 2020](#); [Ottesen et al., 2013](#); [Poudel et al., 2018](#); [Romero et al., 2014](#); [Thomas y Shaik et al., 2021](#); [Tian et al., 2015](#); [Zheng et al., 2019](#)).

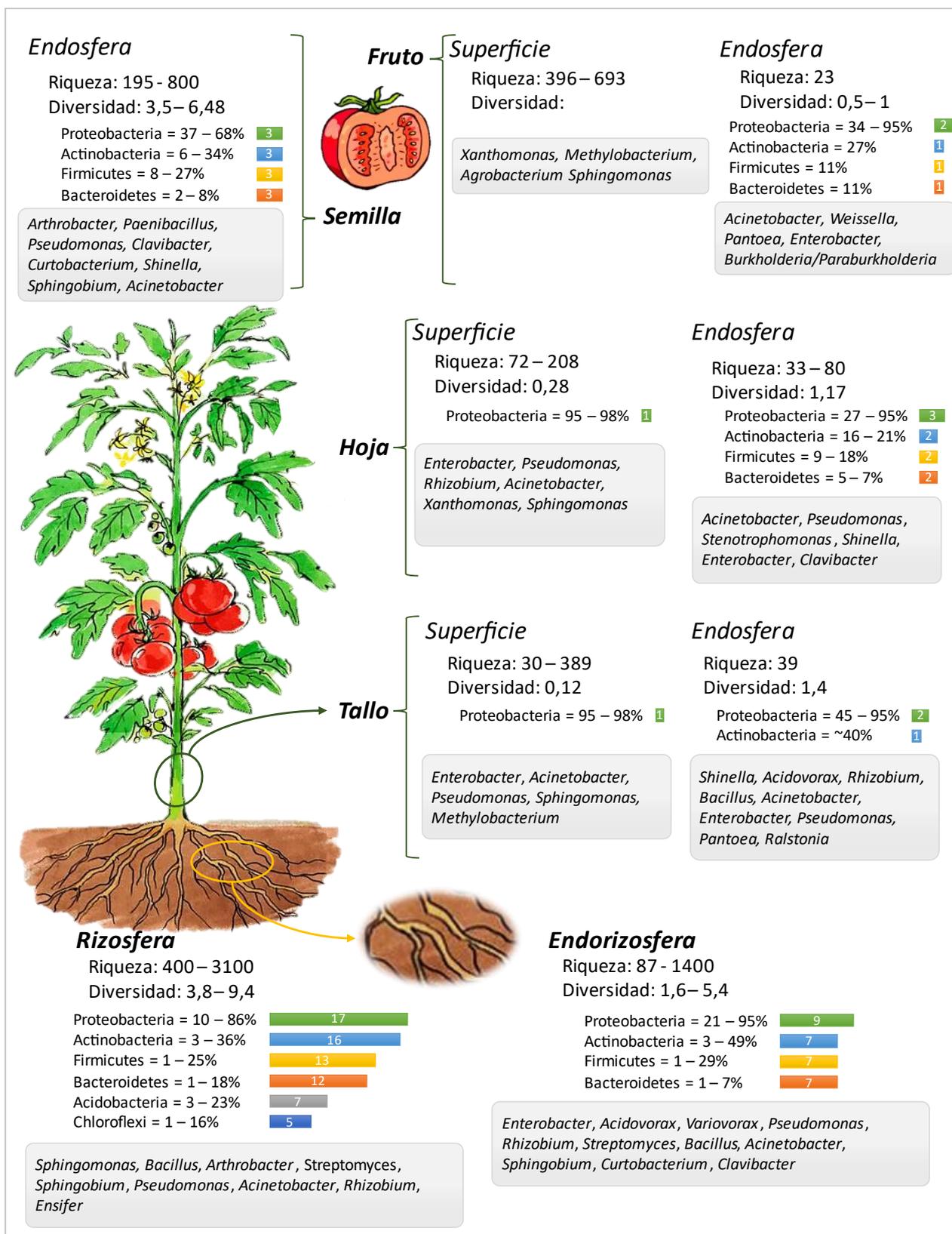


Figura 2.1.2b Antecedentes sobre estudios de comunidades bacterianas asociadas a distintos microhábitats superficiales y endofíticos de plantas de tomate empleando técnicas independientes de cultivo. Se resume la riqueza observada de OTUs/ASVs, la diversidad por el índice de Shannon-Wiener, y los taxones más abundantes a nivel de phylum (incluyendo rango de abundancia relativa y número de publicaciones en las barras de colores) y de género reportados en 25 publicaciones científicas.

De acuerdo a los antecedentes que se muestran en la [Figura 2.1.2b](#) (no se muestran datos de *bulk* de suelo aunque ha sido objeto de estudio en varias de las publicaciones mencionadas), al igual que para los estudios de fitomicrobiota en general, el microhábitat más estudiado es la rizosfera (17), y luego la endosfera de raíz (9, 1 de ellos en tomate variedad elpida en el CHP), endosfera de hoja (3), de tallo (2, 1 de ellos en tomate variedad elpida en el CHP) y de fruto (2, 1 de ellos en tomate variedad elpida en el CHP). Estos estudios se realizaron para evaluar comparativamente las características de las comunidades bacterianas, por ejemplo, de los diferentes microhábitats de las plantas, de plantas sanas y enfermas, de plantas cultivadas bajo diferentes prácticas de manejo. Algunas conclusiones reportadas en estos trabajos fueron:

[Ottesen et al. \(2013\):](#)

- Distintos grupos de comunidades microbianas se asociaron con diferentes órganos de la planta, pudiendo correlacionarse un gradiente de similitud de composición con la distancia entre el suelo y una parte dada de la planta.

[Romero et al. \(2014\):](#)

- Las comunidades bacterianas endofíticas de hoja presentaron una menor diversidad comparadas con las muestras de rizosfera.

[Allard et al. \(2016\):](#)

- La aplicación de tres enmiendas orgánicas (cama fresca de aves de corral, gránulos estériles de arena para aves de corral y vermicompost) aplicadas antes del trasplante no ejerció una influencia diferencial sobre las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera, y a la filosfera de flores o frutos de tomate comparada con la de los fertilizantes sintéticos.
- En el momento de la cosecha, las plantas de tomate presentaron comunidades bacterianas específicas de los órganos de las plantas, pero generalmente independientes de la enmienda aplicada.

[Lee et al. \(2019\):](#)

- La diversidad microbiana y la estructura de las comunidades vario según el rizocompartimento, con características más distintivas en la endosfera. Las comunidades bacterianas en el suelo y la rizosfera se correlacionaron con las propiedades fisicoquímicas del suelo, como el pH, la conductividad eléctrica y los niveles catión intercambiable, mientras que esta tendencia no fue evidente en las muestras de la endosfera. Un pequeño número de OTUs estuvieron presentes en todas las muestras de la rizosfera y la endosfera representado por más del 60% de la abundancia relativa total. Entre estos microorganismos centrales, en las muestras de la endosfera se encontraron como más abundantes los géneros *Acidovorax*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces* y *Variovorax*, cuyos miembros se sabe que tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas. Un análisis de red de coocurrencia indicó que la comunidad microbiana en la rizosfera tenía una red más grande y más compleja que las del *bulk* del suelo y de la endosfera.

[Dong et al. \(2019\)](#)

- Las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera mostraron la mayor riqueza y diversidad, la más baja diversidad bacteriana se dio en las muestras filosféricas, mientras que la riqueza más baja en la endosfera. Entre las muestras endofíticas, tanto la diversidad como la riqueza bacteriana en los diferentes tejidos fue variada, con los valores más altos en raíces. El phylum más abundante fue Proteobacteria, con la excepción de las semillas donde tanto Proteobacteria como Firmicutes fueron dominantes. A nivel de género, las secuencias de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* prevalecieron en la rizosfera, y en la filosfera, más del 97% de las secuencias se asignaron a *Acinetobacter*. Para los endófitos, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* fueron los géneros más abundantes en las raíces, tallos y hojas. En los frutos, los endófitos bacterianos variaron en diferentes compartimentos siendo *Enterobacter* enriquecido en el pericarpio y semillas.

[Caradonia et al. \(2019\)](#)

- Las características de la microbiota bacteriana de cultivos de campo son el producto de un proceso selectivo que diferencia progresivamente entre rizosfera y microhábitats de raíces. Este proceso se inicia temprano cuando las plantas están en una etapa de vivero y luego es más marcado en las últimas etapas de desarrollo, en particular en la cosecha. La selección actúa tanto sobre las abundancias relativas bacterianas como sobre asignaciones filogenéticas, con un sesgo para el enriquecimiento de miembros del phylum Actinobacteria en el compartimento de la raíz. La microbiota que prosperó en la interfaz raíz-suelo está modulada por y responde al tipo de fertilizante nitrogenado aplicado.

[López et al. \(2020\)](#)

- Los organismos encontrados en todas las muestras (plantas de tomate variedad *Elpida* sanas y enfermas) pertenecieron principalmente a 4 filos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. Las Proteobacterias fueron relativamente más abundantes dentro de las comunidades endofíticas de diferentes órganos vegetales de plantas enfermas. Los frutos mostraron contener una comunidad bacteriana compleja.

[Flemer et al. \(2022\)](#)

- Condiciones de estrés biótico y abiótico (iónico y osmótico) modificaron la microbiota de la endorizosfera con modificaciones en la abundancia relativa de Firmicutes y clases de Proteobacterias.

2.1.3. FUNCIONALIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS

Para satisfacer las necesidades nutricionales de los cultivos en los agroecosistemas, el nitrógeno (N) y el fósforo (P) se agregan rutinariamente como fertilizantes químicos, una práctica sobre utilizada en el CHP que causa serias preocupaciones ambientales tal como se mencionó en el [Capítulo 1](#) ([Mac Loughlin et al., 2017](#); [Solis et al., 2020](#)). Otra practica que apunta a mejorar la fertilidad de los suelos es el empleo de enmiendas orgánicas, principalmente descarte de la actividad avícola y de caballerizas de región del CHP. Con esta última práctica se realiza un gran aporte de da materia orgánica al suelo (MOS), la cual provee una gran cantidad de nutrientes que necesitan ser transformados a formas inorgánicas biodisponibles; además la MOS mejora las propiedades físicas del suelo como estructura, aireación, drenaje y capacidad de retención de agua y amortigua las fluctuaciones del pH, además de aumentar los recursos disponibles para los microorganismos del suelo.

La microbiota del entorno agrícola también puede contribuir al aporte de nutrientes, por ejemplo, proporcionando nitrógeno fijado de la atmósfera por el proceso de Fijación biológica de Nitrógeno (FBN), o mediante la mineralización de compuestos orgánicos fosforados, la solubilización de compuestos insolubles de fósforo, entre otras acciones. La FBN por las bacterias –en la que el N₂ atmosférico se reduce a amoniaco por el complejo enzimático bacteriano nitrogenasa, codificado por los genes *nif*– es considerada uno de los beneficios más relevantes desde el punto de vista ecológico y agronómico obtenido por las plantas a partir de su interacción con las bacterias ([Rilling et al., 2018](#); [Silveira et al., 2021](#)). El gen *nifH* –que codifica la subunidad hierro-proteína del complejo enzimático nitrogenasa en bacterias y arqueas– se ha considerado un marcador biológico útil para inferir el papel ecológico y el potencial de la comunidad microbiana en la fijación de N ([Pajares y Bohannan, 2016](#)). La actividad de las comunidades bacterianas solubilizadoras y mineralizadoras de P tienen el potencial de mejorar la absorción de P por las plantas al aumentar las formas biodisponibles de P en el suelo. El fosfato insoluble de aluminio, hierro o calcio se transforma en ortofosfato soluble y las moléculas de P orgánicas se hidrolizan enzimáticamente a ortofosfato soluble inorgánico mediante comunidades bacterianas que solubilizan y mineralizan P, respectivamente ([Compant et al., 2019](#)). Entre las enzimas que hidrolizan P (fitasas), las fosfomonoesterasas alcalinas (APasas), asociadas exclusivamente con el metabolismo de bacterias, hongos y lombrices de tierra, son relevantes para el reciclaje de fósforo orgánico en suelos alcalinos ([Turner, 2010](#)). De los tres genes homólogos que codifican APasa en procariontes (*phoD*, *phoA* y *phoX*), varios informes destacan la alta correlación inversa de la abundancia de *phoD* con la disponibilidad de P y la correlación positiva con la actividad de APasa ([Acuña et al., 2016](#); [Fraser et al., 2015](#)), lo que lo convierte en un gen factible para ser utilizado en estudios ecológicos de comunidades bacterianas mineralizadoras de fósforo. La microbiota del suelo y la rizosfera también están involucradas en el metabolismo del etileno, hormona asociada al crecimiento de los órganos de las plantas, diferenciación de tejidos, senescencia, respuesta a situaciones de estrés, entre otros ([Gamalero y Glick, 2015](#)). La producción bacteriana de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC-deaminasa), codificada estructuralmente por el gen *acdS* y regulada por el gen *acdR*, modula los niveles de etileno y favorece el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés (p. ej., sequía, salinidad, inundación), donde la concentración de etileno podría alcanzar niveles inhibidores para el crecimiento de las plantas ([Glick, 2014](#)).

Son escasos los estudios en agroecosistemas sobre la presencia, abundancia y diversidad de genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal, como la fijación de N₂ (gen *nifH*), la mineralización de P (gen *phoD*) y ACC (gen *acdS*), entre otras. Algunos antecedentes en relación al estudio de estas funcionalidades en diferentes agroecosistemas muestran que:

- ✘ [Rilling et al., \(2018\)](#) encontraron $\sim 10^6$ copias del gen *nifH* g⁻¹ en rizosfera de plantas de trigo cultivadas en condiciones de campo sobre suelos andisoles en Chile, las cuales decrecieron significativamente en endorizosfera a 2×10^5 copias g⁻¹.
- ✘ [Sneha et al. \(2021\)](#) encontraron entre 10^3 – 10^5 copias del gen *nifH* g⁻¹ tanto en suelo como en rizosfera de plantas de garbanzo.
- ✘ [Bouffaud et al., \(2016\)](#) encontraron $\sim 10^7$ copias del gen *nifH* g⁻¹ en suelo y $\sim 10^8$ copias del gen *nifH* g⁻¹ de rizosfera de plantas de tomate cultivadas en suelos de uso agrícola y en suelos de pradera natural sin diferencias.
- ✘ [Huhe et al. \(2014\)](#) encontraron $\sim 10^5$ copias del gen *nifH* g⁻¹ sin diferencias significativas entre suelos con diferentes años de descanso luego de 40 años de agricultura extensiva, con índices de diversidad de Shannon-Wiener entre 2,7–2,8.
- ✘ [Collavino et al. \(2020\)](#) amplificaron y secuenciaron el gen *nifH* presente en muestras de endosfera de raíz y tallo de tomate var. *Elpada* crecido en la EE Julio Hirschhorn en el CHP y encontraron que los géneros bacterianos más abundantes asociados al gen *nifH* en estos microhábitats ($\sim 85\%$) fueron Rhizobiales, Burkholderiales, Pseudomonadales, Enterobacterales y Bacillales, entre otros. A su vez, determinaron que la fertilización química afectó negativamente las comunidades diazotróficas de la endosfera, evidenciado por la alteración en los perfiles de los filotipos más abundantes.
- ✘ [Bouffaud et al., \(2018\)](#) encontraron 10^6 – 10^7 copias del gen *acdS* g⁻¹ en suelo y rizosfera de plantas de tomate cultivadas en suelos de uso agrícola y en suelos de pradera natural con mayores valores en este último suelo. Por medio de secuenciación masiva se identificaron los principales taxones que portan este gen en suelo y rizosfera de tomate: $\sim 70\%$ se corresponde al phylum Proteobacteria (géneros *Burkholderia*, *Methylibium*, *Variovorax*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, entre otros) y el restante $\sim 30\%$ al phylum Actinobacteria (géneros *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Norcardioides*, *Agromyces*, *Microbacterium*, entre otros).
- ✘ [Lang et al., 2022](#) determinaron que la fertilización con P afectó significativamente la estructura y composición de la comunidad bacteriana portadora de *phoD*, pero no su abundancia, la cual se mantuvo en el orden de $\sim 10^6$ copias g⁻¹ de suelo. Estos resultados también fueron observados por [Fraser et al., 2015](#) al evaluar el efecto de los aportes de fertilizantes de P inorgánicos (minerales) y orgánicos (estiércol). Las bacterias portadoras de *phoD* dominantes fueron *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

En relación a los [objetivos planteados en este trabajo](#), a continuación se describen los estudios que nos permitieron caracterizar las comunidades bacterianas asociadas a plantas de tomate variedad *elpida* cultivadas en dos sitios del CHP, mediante la obtención de ADN bacteriano de los diferentes órganos de las plantas, de la rizosfera y del *bulk* del suelo, y la evaluación del gen ARNr 16S, el gen *nifH*, el gen *phoD* y el gen *acdS*, haciendo uso de técnicas moleculares independientes de cultivo, y evaluar la modulación de dichas comunidades por el microhábitat de la planta y las prácticas de manejo del cultivo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. TOMA DE MUESTRAS A CAMPO Y PROCESAMIENTO EN LABORATORIO

De cada uno de los sitios descriptos previamente (ver [Descripción de los sitios: Establecimiento Viento Norte \(VN\) y Mario \(M\)](#)) se tomaron tres muestras compuestas (cada una por 3 submuestras) de suelo, rizosfera y plantas de tomate enteras (ver [Figura 2.2.1a](#)). Se tomó en lugares al azar el suelo entre plantas del lomo de los surcos entre las profundidades de 0-10 cm con un barreno y se colectó en bolsas estériles separadas cada muestra. Se seleccionaron al azar las 9 plantas colectadas de cada establecimiento hortícola: cada una de las plantas seleccionadas se descalzó cuidadosamente descartando el suelo menos adherido a las raíces, y se separaron las raíces de la parte aérea cortando a nivel de cuello de la raíz con tijeras desinfectadas. Las raíces con la rizosfera (suelo más cercano adherido) se guardaron en bolsas estériles separadas. Respecto a la parte aérea de las plantas colectadas, se cosecharon todos los frutos (verdes y maduros) y se guardaron en bolsas estériles separadas. El tallo con las hojas también se guardó en bolsas estériles separadas. Las distintas muestras se mantuvieron en conservadora con hielo hasta ser transportadas al Laboratorio de Microorganismos de Aplicación en Agricultura (MAALab) (CINDEFI – UNLP / CCT CONICET La Plata).

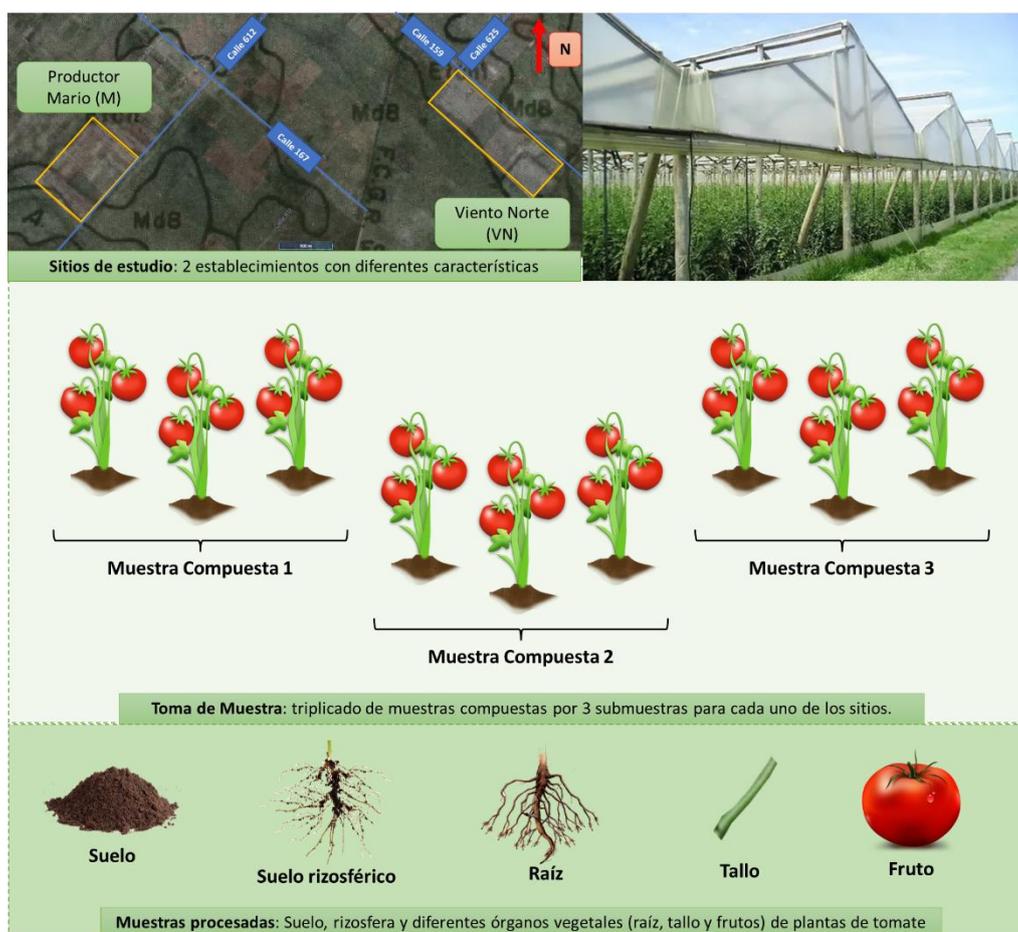


Figura 2.2.1a Esquema de toma de muestras en los establecimientos hortícolas VN y M del CHP

Una vez en el laboratorio, parte de las muestras fueron procesadas (en condiciones de esterilidad) como se describe a continuación para su uso en estudios de biología molecular:

- **SUELO.** Parte de las muestras de suelo se enviaron a la Cátedra de Edafología de la Fac. de Cs. Agrarias y Forestales (UNLP) para el análisis físico-químico de cada uno de los suelos. El resto de las muestras de suelo se homogeneizaron manualmente, se fraccionaron en tubos de polipropileno estériles y se conservaron a -80°C hasta su uso.
- **RIZOSFERA.** El suelo rizosférico se obtuvo desprendiendo el suelo íntimamente adherido a las raíces mediante movimientos manuales del sistema radical en el interior de bolsas estériles (Dong et al., 2019) se fraccionó en tubos de polipropileno estériles y se conservó a -80°C hasta su uso.
- **RAIZ.** Luego de separar la rizosfera, las raíces se lavaron enérgicamente con solución fisiológica con tween80 0,1% [v/v] y se desinfectaron superficialmente con NaClO (46 g l^{-1}) al 15% [v/v], en agitación a 150 rpm durante 30 minutos, para eliminar las poblaciones bacterianas superficiales y quedarnos únicamente con las poblaciones bacterianas endófitas (Dong et al., 2019). Luego de la desinfección superficial se lavan las raíces 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante y son tratadas superficialmente con *DNAsa* para eliminar posibles restos de ADN bacteriano que queden en la superficie de la raíz (Dong et al., 2019). Diferentes porciones representativas del sistema radical (raíz principal y laterales) se cortaron en pequeños trozos con un bisturí estéril, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en OMNI Mixer (Sorvall Duppont) (Figura 2.2.1b). El polvo de raíz congelado se fraccionó en tubos de polipropileno estériles y se conservó a -80°C hasta su uso.
- **TALLO.** Los trozos de tallos fueron seleccionados teniendo en cuenta tres porciones a lo largo de la planta: una porción basal, una medial y otra apical. De cada sección se cortaron dos trozos de 3 cm aproximadamente. Los tallos se sometieron a un lavado con solución fisiológica con tween80 0,1% [v/v] agitándose por 30 segundos en frascos estériles. Luego se realizó la desinfección superficial de los mismos con NaClO (46 g l^{-1}) al 15% [v/v] en agitación a 150 rpm por 8 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para remover los restos de desinfectante y se trataron superficialmente con *DNAsa* para eliminar posibles restos de ADN bacteriano que queden en la superficie del tallo. Luego, los tallos se cortaron en pequeñas porciones con un bisturí estéril, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en OMNI Mixer (Sorvall Duppont) (Figura 2.2.1b). El polvo de tallo congelado se fraccionó en tubos de polipropileno estériles y se conservó a -80°C hasta su uso.
- **FRUTO.** Dos frutos de cada planta fueron lavados con solución fisiológica con tween 80 0,1% [v/v] y luego desinfectados superficialmente mediante rociado de etanol 70% en tres oportunidades, esperando 3 minutos entre cada momento. Luego de la desinfección superficial se sometió a 3 lavados con agua destilada estéril y la acción de DNAsas en la superficie del fruto, se retiró la epidermis con un bisturí estéril y se cortaron porciones procurando incorporar desde la parte más externa hasta la más interna del fruto, descartando las semillas. Las porciones de fruto se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en OMNI Mixer (Sorvall Duppont) (Figura 2.2.1b). El polvo de fruto congelado se fraccionó en tubos de polipropileno estériles y se conservó a -80°C hasta su uso.



Figura 2.2.1b Fotografías del procesamiento de muestras de raíz, tallo y fruto para obtención de ADN bacteriano de las comunidades endófitas.

2.2.1.1 Control del procedimiento de obtención de ADN bacteriano de comunidades endófitas

Los procedimientos realizados para la obtención de muestras que contienen información sobre las comunidades endófitas asociadas a los distintos órganos vegetales de tomate fueron la acción superficial de una solución desinfectante con NaClO y con la acción de DNAsas, con el objetivo de eliminar todos los microorganismos y restos de ADN superficiales y quedarnos con aquellos presentes en los tejidos internos de los distintos órganos.

- **Control de desinfección superficial.** Se utilizó el agua del último lavado de los distintos órganos vegetales para verificar la ausencia de microorganismos en su superficie. Se plaquearon 100 μ l del agua del último lavado de los distintos tejidos en placas de petri con medio de cultivo para heterótrofos (R₂A; [Tabla 7.1a](#) del [ANEXO C: Medios de Cultivo](#)) y también se realizó el apoyo y rolado de los tejidos luego de la desinfección superficial sobre placas de petri con el mismo medio de cultivo. Las placas de petri se cultivaron en oscuridad a 30°C durante 72h para luego verificar la presencia/ausencia de colonias bacterianas.

▪ Control de la eliminación de ADN superficial. Se utilizó el agua del último lavado para realizar una PCR y controlar efectivamente la ausencia de producto de PCR, lo que evidencia la ausencia de microorganismos/ADN bacteriano en la superficie de los tejidos. La PCR se realizó con primers universales 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') que amplifican la región V3-V7 del gen ARNr 16S. La reacción de PCR contenía 1 µl de muestra, 1 U de GoTaq DNA Polimerasa (Promega), Buffer de reacción 1x, 0,2 mM de cada dNTP y 5 µM de cada primer en un volumen final de reacción de 25 µl. El programa del termociclador consistió en 1 ciclo [4 min a 94°C], 25 ciclos [30 seg a 94°C, 45 seg a 57°C y 1 min a 72°C] y la extensión final [10 min a 72°C]. Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con TAE como buffer de corrida, a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (10 mg ml⁻¹) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV.

2.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN METAGENÓMICO BACTERIANO A PARTIR DE MUESTRAS AMBIENTALES. CONTROL DE CALIDAD DEL ADN OBTENIDO.

Las muestras de suelo, rizosfera y órganos vegetales conservados a -80°C se utilizaron para extraer el ADN total metagenómico empleando el kit comercial FastDNA Spin Kit (MP biomedical) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver [Figura 2.2.2a](#)). La extracción de ADN se realizó para cada triplicado de muestra compuesta, repartiendo los 450 mg totales sobre los cuales se realiza una extracción de ADN en 150 mg de cada submuestra.

Cada una de las 30 extracciones de ADN obtenidas (2 sitios X 5 muestras –suelo, rizosfera, raíz, tallo y fruto– X 3 réplicas; N=30) se midieron por espectrofotometría en un equipo Nanodrop y se estimó la concentración de ADN (ng µl⁻¹) y la pureza del mismo al obtener la relación de absorbancia 260/280 (las bases aromáticas de la estructura del ADN -purinas y pirimidinas- presentan un pico de absorbancia a 260 nm, mientras que la absorbancia a 280 nm estima el contenido de contaminantes como proteínas y compuestos fenólicos). Las muestras con ADN relativamente puro presentan un valor de A260/280 entre 1,8 y 2,0. Se normalizó la concentración de ADN de todas las muestras a ~30 ng/µl realizando con agua miliQ (apta para biología molecular) las diluciones correspondientes para cada muestra.

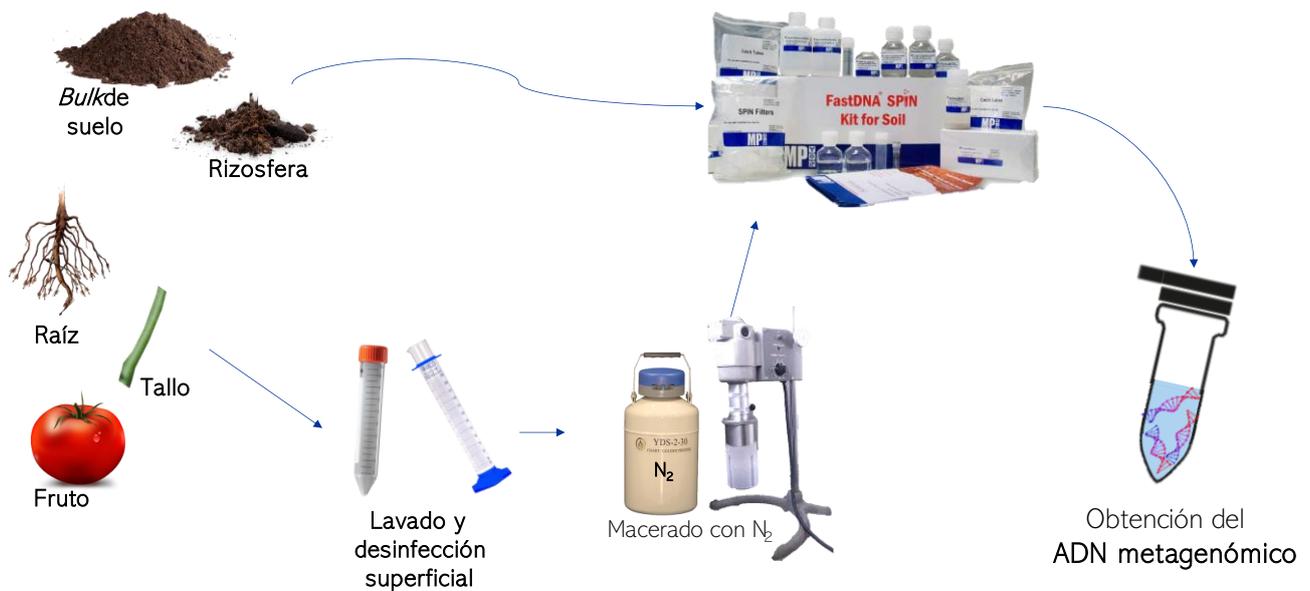


Figura 2.2.2a Procesamiento de muestras para obtención de ADN metagenómico bacteriano.

Para comprobar la correcta calidad de los fragmentos de ADN bacteriano se realizó la amplificación parcial del gen ARNr 16S mediante una PCR, utilizando los primers universales 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTC AATTCCTTTGAGTTT-3'). La reacción de PCR contenía 1 µl de muestra, 1 U de GoTaq DNA Polimerasa (Promega), Buffer de reacción 1x, 0,2 mM de cada dNTP y 5 µM de cada primer en un volumen final de reacción de 25 µl. Para validar la experiencia se realizó un control negativo de la reacción PCR (utilizando agua miliQ en vez de muestra con ADN) y un control positivo utilizando una muestra de 30 ng de ADN de la bacteria *Paraburkholderia tropica* Mto-293 (bacteria promotora del crecimiento vegetal utilizada como modelo en este trabajo). El programa del termociclador consistió en 1 ciclo [4 min a 94°C], 25 ciclos [30 seg a 94°C, 45 seg a 57°C y 1 min a 72°C] y la extensión final [10 min a 72°C]. Los productos de amplificación y un patrón de peso molecular (100-1000pb; Productos Bio-Lógico) se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con TAE como buffer de corrida, a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (10 mg ml⁻¹) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV.

2.2.3. CARACTERIZACIÓN A NIVEL TAXONÓMICO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE TOMATE

Se caracterizaron las comunidades bacterianas asociadas a las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate en base a su cuantificación, composición y estructura. La cuantificación se realizó mediante qPCR del gen ARNr 16S, mientras que la composición y estructura derivaron de la secuenciación masiva parcial de este mismo gen y el posterior análisis bioinformático.

2.2.3.1 Cuantificación de las comunidades bacterianas totales mediante q-PCR

A partir del ADN metagenómico bacteriano de las distintas muestras se cuantificó el número de copias del gen ARN ribosomal 16S (comunidad bacteriana total), por gramo de muestra (N° copias g^{-1}) mediante la técnica de q-PCR (ver fundamentos y metodología de qPCR, en el ANEXO A) (Rilling et al., 2018).

Los primers utilizados para la amplificación de cada gen se detallan en la Tabla 2.2.3a. Para la reacción de qPCR (Tabla 2.2.3b) se empleó la mezcla de reacción PowerUp™ SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) y el termociclador StepOne™ Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2.2.3a Primers utilizados para amplificar el gen ARNr 16s de las diferentes muestras.

Gen objetivo	Muestras	Primers	Referencia
16S rRNA	Suelo y rizosfera	799f (5'-AAC MGG ATT AGA TAC CCK G-3')	Shade et al., 2013
		1115r (5'-AGG GTT GCG CTC GTT G-3')	
	Endosfera de raíz, tallo y fruto	Bac1369F (5'-CGG TGA ATA CGT TCY CGG-3')	Suzuki et al., 2000
		Prok1492R (5'-GGW TAC CTT GTT ACG ACT-3')	

Tabla 2.2.3b Mix de reacción y termociclado de la qPCR para construcción de curvas estándar y cuantificación del gen ARNr 16s con primers 799F-1115r y Bac1369F-Prok1492R.

MIX DE REACCIÓN	VOLUMEN	TERMOCICLADO
PowerUp™ SYBR Green Master Mix	10 μ l	Desnaturalización a 94°C por 1 min
Primers forward y reverse [100 μ M]	2 μ l + 2 μ l	30 ciclos [94°C por 1 min, 53°C por 1 min y 72°C por 1 min]
Muestra \sim 30ng/ μ l	1 μ l	Extensión final a 72°C por 10 min
Volumen final de reacción = 15 μ l		

El N° copias de ARNr 16S g^{-1} de muestra se estimó mediante la construcción de una curva estándar obtenida a partir de la determinación de un patrón sintético del gen ARNr 16S (dsDNA ultramers; Integrated DNA Technologies, Inc) de *Azospirillum picis* (NCBI número de acceso AM922283) con número de copias conocido (la obtención de la curva estándar y su correspondiente análisis estadístico se detallan en el anexo qPCR ARNr 16S).

Para cada muestra (N=30) se realizaron 3 reacciones de qPCR (réplicas técnicas); Los 3 valores de Ct para cada combinación muestra*establecimiento se promediaron para ingresar al modelo matemático lineal y así obtener el número de copias del gen ARNr 16S con su respectivo intervalo de confianza del 95%. Se corroboró que el fragmento amplificado correspondiera al gen ARNr 16S comparando la curva de melting de los productos de PCR de cada una de las muestras respecto a la curva de melting del producto de PCR del gen sintético utilizado como patrón.

Los datos de cuantificación del gen para cada una de las muestras se analizaron estadísticamente a través de un ANAVA bifactorial (Factor *Muestra* con 5 niveles [suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto]; Factor *Establecimiento* con 2 niveles [VN y M]) con un 95% de confianza y se utilizó el test de Tukey ($\alpha=0,05$) cuando fue necesario.

2.2.3.2 Caracterización de la composición y estructura de las comunidades bacterianas asociada al cultivo de tomate mediante metabarcoding.

A partir del ADN metagenómico bacteriano de las distintas muestras se secuenció parcialmente el gen ARN ribosomal 16S mediante la tecnología de secuenciación de *Illumina* (ver [fundamentos y metodología de secuenciación de amplicones por *Illumina*](#)).

Las extracciones de ADN de las diferentes muestras (N=30) se enviaron a la empresa Mr. DNA (Texas, Estados Unidos) para secuenciar de ambos extremos (paired-end, 2x300pb) la región hipervariable V3-V4 del gen ARNr 16S, con un equipo *Illumina* MySeq. Los primers empleados fueron **new341F** (5'- CCTACGGGNBGCAS-CAG-3') y **new805R** (5'GACTACNVGGGTATCTAATCC-3') descritos por [Takahashi et al. \(2014\)](#). Para secuenciar las muestras de ADN metagenómico bacteriano obtenidas de órganos vegetales se emplearon bloqueadores (*PNA block plastid mitochondrial*) para evitar la amplificación de ADN mitocondrial y de cloroplastos ([Chen et al., 2022](#)).

- Análisis bioinformático de los datos de secuenciación

Los resultados de la secuenciación son dos archivos, R1 y R2, correspondientes a la secuenciación forward y reverse del amplicón, los cuales contienen cientos de miles de secuencias de las diferentes muestras.

Con el software bioinformático [Seed2 versión 1.2 \(Vetrovsky et al., 2018\)](#) se alinearon las secuencias *forward* y *reverse* con un solapamiento mínimo de 40 pb y un error admitido de hasta 15%. Este mismo programa se empleó para identificar las diferentes muestras secuenciadas a partir de los barcodes, eliminar secuencias de barcodes y primers, descartar secuencias cortas y muy largas para quedarnos con aquellas de ~450 pb (tamaño aproximado del fragmento objetivo a secuenciar), eliminar secuencias con baja calidad en la asignación de bases (*score* Q<30). Posteriormente se realizó la identificación y eliminación de secuencias quiméricas mediante el algoritmo *chimera.Uchime* ([Edgar, 2010](#)). Con las secuencias restantes (consideradas como las de mejor calidad y más confiables), se realizó el agrupamiento en unidades taxonómicas operativas (OTUs) con al menos un 97% de similitud empleando el algoritmo *Vsearch* ([Rognes et al., 2016](#)). Las secuencias más abundantes de cada OTU se clasificaron taxonómicamente con la base de datos [SILVA v138.1](#) (agosto 2020), utilizando el software bioinformático *Mothur* ([Schloss, 2020](#)). Se descartaron las secuencias asignadas a

cloroplastos y mitocondrias, los *singletons*¹³ y OTUs con menos del 0,005% del total de secuencias según recomendación de [Bokulich et al. \(2012\)](#).

Para cada una de las muestras se calculó la cobertura de secuenciación (considerada adecuada cuando es superior al 75%) aplicando la siguiente ecuación:

$$Cobertura (\%) = \left(1 - \left(\frac{\text{singletons}}{\text{total de lecturas}} \right) \right) \times 100$$

Luego de las diferentes etapas del filtrado de secuencias se construyeron las curvas de rarefacción de OTUs observados respecto al número de secuencias de cada muestra con el software Seed 2. En base a lo observado en las curvas de rarefacción se decidió el número de secuencias al cual ajustar las diferentes muestras para que todas sean representadas por un mismo número de secuencias y poder realizar un análisis comparativo válido ([Weiss et al., 2015](#)). La normalización del número de secuencias se realizó con el software Seed 2, seleccionando aleatoriamente el número correspondiente de secuencias de cada una de las muestras. Finalmente se obtuvo la *tabla de OTUs*¹⁴ para el análisis de los datos.

Posterior a la normalización se trabajó con la plataforma online [Microbiome Analyst \(Chong et al., 2020\)](#), en la cual se ingresó con la Tabla de OTUs con la correspondiente asignación taxonómica para realizar distintos análisis que se describen a continuación.

- Composición taxonómica y abundancia relativa de taxones

Para la descripción taxonómica de las comunidades bacterianas asociadas a las diferentes muestras, se agruparon los OTUs con la misma taxonomía a diferentes niveles taxonómicos como phylum, clase, orden, familia, género y OTU. Además, se determinaron diferencias significativas y biológicamente relevantes en las proporciones de los diferentes taxones entre los diferentes microhábitats (5 niveles: suelo, rizosfera, endosfera de raíz, tallo y fruto) y ambos establecimientos (Viento Norte S.A. y Productor Mario) utilizando el software STAMP v2.0.9 ([Parks et al., 2014](#)). El análisis estadístico utilizado para las comparaciones fue la prueba t no paramétrica de White ($\alpha=0,05$). La relevancia biológica se determinó eligiendo géneros con diferencia entre proporciones >0,5 y una relación de proporciones >2 ([Parks & Beiko, 2010](#)).

¹³ OTUs con una única secuencia.

¹⁴ Tabla de doble entrada, con OTUs en filas y muestras en columnas, indicando en el cuerpo de la tabla el número de secuencias de cada OTU presente en las diferentes muestras.

- Diversidad alfa

Se calcularon los índices de alfa-diversidad riqueza de especies observada (*Richness*) y teórica (*Chao-1*), índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') e índice Inversa de Simpson ($1/D$), a diferentes niveles taxonómicos (phylum, clase, orden, familia, género y OTU) (Marcon & Hérault, 2015; Lucas et al., 2017).

Los índices de alfa-diversidad se calcularon para cada una de las muestras (N=30) obteniéndose un valor medio con su respectiva desviación estándar. Los índices calculados para cada una de las muestras a los distintos niveles taxonómicos se analizaron estadísticamente a través de un ANAVA bifactorial (Factor *Muestra* con 5 niveles [suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto]; Factor *Establecimiento* con 2 niveles [Viento Norte S.A. y Productor Mario]) con un 95% de confianza y se utilizó el test de Tukey ($\alpha=0,05$) cuando fue necesario para realizar la comparación de medias.

- Diversidad beta

La comparación entre las comunidades bacterianas entre las diferentes muestras se realizó en la plataforma online [Microbiome Analyst](#) (Chong et al., 2020), empleando el índice de similitud/disimilitud composicional de Bray-Curtis para dos muestras, a partir del cual se obtuvo una matriz de comparación entre todas las muestras (N=30). Para la visualización gráfica de la matriz se utilizó el análisis de coordenadas principales (PCoA) como método de ordenamiento y reducción de la variabilidad total observada en dos coordenadas principales (PCo1 y PCo2). El análisis de significancia estadística sobre el agrupamiento de las diferentes muestras basados en la matriz de disimilitudes se realizó mediante un análisis de la varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA/adonis; $\alpha=0,05$) (paquete *vegan* del software externo R; Oksanen et al., 2013), utilizando dos factores experimentales: microhábitats (con 5 niveles: suelo, rizosfera, endosfera de raíz, tallo y fruto) y establecimiento (con dos niveles: Viento Norte S.A. y Productor Mario).

- Otros análisis comparativos

Usando la plataforma online [Microbiome Analyst](#) se construyeron mapas de calor para explorar visualmente diferencias entre las comunidades bacterianas de las distintas muestras. También se obtuvieron dendogramas contruidos a partir del índice de Bray-Curtis a distintos niveles taxonómicos para evidenciar el agrupamiento de las distintas muestras.

A partir de la tabla de OTUs se retuvieron únicamente aquellos OTUs con prevalencia ≥ 2 para cada microhábitat de cada establecimiento, a fines de hallar OTUs específicos y OTUs compartidos entre distintos grupos de muestras. Los resultados se plasmaron en diagramas de Venn. Los OTUs compartidos entre las diferentes muestras se analizaron estadísticamente mediante la comparación de medias no paramétrica de Kruskal-Wallis con $\alpha=0,10$ para determinar diferencias en su abundancia relativa entre las muestras. Los

resultados se plasmaron en una gráfica de dispersión MA (Log_2 de la relación en el número de secuencias vs promedio N° de secuencias).

2.2.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL LIGADA A ACTIVIDADES DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE TOMATE

Se caracterizaron las comunidades bacterianas ligadas a la fijación biológica del nitrógeno y a la mineralización del fósforo orgánico mediante el estudio de genes asociados a estas actividades metabólicas: *nifH* y *phoD*, respectivamente. Para cada uno de los genes mencionados previamente se realizó la cuantificación absoluta y relativa (respecto a la comunidad bacteriana total) del número de copias de cada gen en las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate, empleando la técnica de qPCR. También se caracterizó la diversidad de estos genes en estas mismas muestras mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE).

2.2.4.1 Cuantificación de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno, mineralizadoras de fósforo orgánico y con actividad ACC-deaminasa.

A partir del ADN metagenómico bacteriano de las distintas muestras se cuantificó el número de copias de los genes *nifH*, *phoD* y *acdS* (asociadas a actividades de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, mineralización de fósforo orgánico y regulación de los niveles de etileno, respectivamente), por gramo de muestra (N° copias g^{-1}) mediante la técnica de q-PCR (ver fundamentos y metodología de qPCR, en el ANEXO A) (Acuña et al., 2016; Jorquera et al., 2014; Rilling et al. 2018).

Los primers utilizados para la amplificación de cada gen se detallan en la Tabla 2.2.4a. Para la reacción de qPCR (Tabla 2.4.4b) se empleó la mezcla de reacción PowerUp™ SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) y el termociclador StepOne™ Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2.2.4a Primers utilizados para amplificar los genes *nifH*, *phoD* y *acdS* de las diferentes muestras.

Gen objetivo	Primers	Referencia
<i>nifH</i>	PoIF (5'-TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3')	Poly et al., 2001
	PoIR (5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3')	
<i>phoD</i>	ALPS-F730 (5'- CAG TGG GAC GAC CAC GAG GT-3')	Sakurai et al. 2008
	ALPS-R1101 (5'-GAG GCC GAT CGG CAT GTCG-3')	
<i>acdS</i>	F1936 (5'- GHG AMG ACT GCA AYW SYG GC-3')	Blaha et al. 2006
	F1939 (5'- GAR GCR TCG AYV CCR ATC AC-3')	

Tabla 2.2.4b Mix de reacción y termociclado de la qPCR para cuantificación del gen *nifH*, *phoD* y *acdS*.

MIX DE REACCIÓN	VOLUMEN
PowerUp™ SYBR Green Master Mix	10 µl
Primers forward y reverse (100 µM)	2 µl + 2 µl
Muestra ~30ng/µl	1 µl
Volumen final de reacción = 15 µl	
Desnaturalización a 95°C por 15 min	
Termociclado gen <i>nifH</i>	30 ciclos [94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min]
	Extensión final a 72°C por 10 min
Desnaturalización a 94°C por 3 min	
Termociclado gen <i>phoD</i>	35 ciclos [94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 2 min]
	Extensión final a 72°C por 7 min
Desnaturalización a 95°C por 5 min	
Termociclado gen <i>acdS</i>	35 ciclos [95°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 30 seg]
	Extensión final a 72°C por 7 min

De la misma forma que se cuantificó el gen ARNr 16S, el número de copias de los genes *nifH* y *phoD* se estimó mediante la construcción de curvas estándar para cada gen obtenidas a partir patrones sintéticos con número de copias conocido. El patrón sintético del gen *nifH* (dsDNA ultramers; Integrated DNA Technologies, Inc) se corresponde con *Azospirillum brasilense* sp7 (NCBI número de acceso [X51500](#)); el patrón sintético del gen *phoD* se corresponde con *Rhizobium melliloti* (NCBI número de acceso [U59229](#)); y el patrón sintético del gen *acdS* se corresponde con *Pseudomonas fluorescens* (NCBI número de acceso [MW357899](#)). La obtención de las curvas estándar para cada uno de los genes, con el correspondiente análisis estadístico, se detallan en el [ANEXO A: qPCR *nifH*, qPCR *phoD* y qPCR *acdS*](#).

Para los 3 genes en estudio se realizaron 3 reacciones de qPCR (réplicas técnicas) en cada una de las muestras (N = 30); Los 3 valores de Ct para cada combinación *muestra*establecimiento* se promediaron para ingresar al modelo matemático lineal correspondiente y así obtener el número de copias del gen (*nifH* o *phoD*) con su respectivo intervalo de confianza del 95%. Se corroboró que los fragmentos amplificados correspondieran a los genes objetivo comparando la curva de melting de los productos de PCR de cada una de las muestras respecto a la curva de melting del producto de PCR del respectivo gen sintético utilizado como patrón.

Separadamente para cada gen, Los datos se analizaron estadísticamente a través de un ANAVA bifactorial (Factor *Muestra* con 5 niveles [suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto]; Factor *Establecimiento* con 2 niveles [Viento Norte S.A. y Productor Mario]) con un 95% de confianza; se utilizó el test de Tukey ($\alpha=0,05$) cuando fue necesario.

- Abundancia relativa de genes *nifH*, *phoD* y *acdS* respecto a la comunidad bacteriana total (ARNr 16S).

El cálculo de la abundancia relativa de los genes *nifH*, *phoD* y *acdS* respecto a la comunidad bacteriana total se realizó aplicando la siguiente ecuación (donde A representa al gen en cuestión):

$$\text{Abundancia relativa del gen A (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de copias del gen A}}{\text{N}^\circ \text{ de copias ARNr 16S}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente (separadamente para cada gen) a través de un ANAVA bifactorial (Factor *Muestra* con 5 niveles [suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto]; Factor *Establecimiento* con 2 niveles [Viento Norte S.A. y Productor Mario]) con un 95% de confianza; se utilizó el test de Tukey ($\alpha=0,05$) cuando fue necesario.

2.2.4.2 Diversidad de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo

Se estudió la diversidad de las comunidades bacterianas encargadas de la fijación biológica del nitrógeno (Rilling et al. 2018) y de la mineralización de compuestos de fósforo orgánico (Acuña et al., 2016) mediante amplificación por PCR de los genes *nifH* y *phoD*, seguida de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), para luego digitalizar el gel y analizarlo con diferentes softwares bioinformáticos (ver [Fundamentos y Metodología de la técnica DGGE](#), en el ANEXO A).

- Los primers empleados para la DGGE del gen *nifH* fueron **PoIFI** (5'-TGC GAI CCS AAI GCI GAC TC-3') y **PoIR-GC** (5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3') con GC-clamp (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCC GAC GAT GTA GAT YTC CTG-3') en el extremo 5'-.
- 2.2.4.1 Los primers empleados para la DGGE del gen *phoD* fueron **ALPS-F730** (5'- CAG TGG GAC GAC CAC GAG GT-3') y **ALPS-R1101-GC** (5'-GAG GCC GAT CGG CAT GTCG-3') con GC-clamp (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3') en el extremo 5'-.

Las concentraciones de los reactivos y las características del termociclado para la PCR para los genes *nifH* y *phoD* se detallan en las [Tabla 2.2.4c](#) y [Tabla 2.2.4d](#), respectivamente, realizándose una PCR por cada muestra (N=30).

Tabla 2.2.4c Concentración y condiciones de termociclado de la reacción PCR para DGGE del gen *nifH* en extracciones de ADN metagenómico bacteriano a partir de muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivo de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	TERMOCICLADO
Buffer	1X	Desnaturalización a 95°C durante 15 min
dNTP's	0,25 mM	
Primer PolF1	0,5 µM	30 ciclos [94°C por 1min, 55°C por 1min y 72°C por 1min]
Primer PolR-GC	0,5 µM	
Mg ⁺²	3 mM	
Taq-ADN Polimerasa	2,6 U	Extensión final a 72°C por 10 min
Muestra de ADN	~30 ng	
Volumen final de reacción = 50 µl		Gradiente de electroforesis = 45-65% (suelo y rizosfera) y 30-55% (tejido vegetal)

Tabla 2.2.4d Concentración y condiciones de termociclado de la reacción PCR para DGGE del gen *phoD* en extracciones de ADN metagenómico bacteriano a partir de muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivo de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	TERMOCICLADO
Buffer	1X	Desnaturalización a 94°C durante 3 min
dNTP's	0,25 mM	
Primer ALPS-F730	0,5 µM	35 ciclos [94°C por 1min, 57°C por 1min y 72°C por 2 min]
Primer ALPS-R1101-GC	0,5 µM	
Mg ⁺²	3 mM	
Taq-ADN Polimerasa	2,6 U	Extensión final a 72°C por 7 min
Muestra de ADN	~30 ng	
Volumen final de reacción = 50 µl		Gradiente de electroforesis = 40-65% (suelo y rizosfera) y 50-70% (tejido vegetal)

Los productos de amplificación y un patrón de peso molecular (100-1000pb) se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con TAE como buffer de corrida, a 100 V durante 30 minutos y posterior tinción con SYBR™ Gold (Molecular Probes, Invitrogen Co.) para evidenciar a través de un transiluminador UV la presencia de una única banda que coincida con el peso molecular del amplicón a secuenciar de cada gen.

La DGGE se realizó utilizando un sistema DCode (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los productos de la PCR (20 µl) se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6 % (p/v) y se corrió la electroforesis durante 16h a 80 Volt. Los gradientes desnaturizantes para cada gen y grupo de muestras se detallan en las tablas [Tabla 2.2.4c](#) y [Tabla 2.2.4d](#). La [puesta a punto de la técnica](#) para determinar los gradientes y la agrupación de las muestras se detalla en el [ANEXO A](#)). El gel se tiñó con SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen Co.) durante 30 min y se fotografió en un transiluminador UV.

El análisis de imágenes y la agrupación de perfiles de bandas DGGE se realizaron con el software CLIQS 1D Pro (TotalLab Ltd), a partir del cual se obtuvo una matriz de datos identificando presencia/ausencia de bandas

de ADN (i , con recorrido $i=1$ hasta $i=n$, siendo n =número total de bandas) en el gel así como un valor que refleja la intensidad de las mismas (X_i) en base al contraste de la banda respecto al color del fondo del gel. Este valor X_i representa un análogo de la abundancia de ese producto de PCR en la muestra. Con base en la matriz obtenida del análisis en CLIQS 1D Pro se realizaron diferentes inferencias:

Se creó una matriz con las distancias entre las comunidades bacterianas que contienen los genes *nifH* y *phoD*. Se calcularon mediante un análisis de perfil de similitud (prueba SIMPROF) con el índice de similitud de Bray-Curtis con un nivel de significancia del 5% y valores de estrés $<0,15$ con el software Primer-E v6 (Primer-E Ltd.) (Clarke et al., 2008). A partir de estos resultados se generó una representación gráfica de estos resultados a través de NMDS (escalamiento multidimensional no métrico), desarrolladas con el mismo software. Las similitudes de las comunidades *nifH* y *phoD* de ambos establecimientos (Viento Norte y Productor Mario) se compararon entre el 20% y el 65%.

Se estimó la diversidad de las comunidades bacterianas portadoras de los genes *nifH* y *phoD* mediante el cálculo de diferentes índices empleando las siguientes ecuaciones (Haegeman et al. 2014):

$$Riqueza (S) = n$$

Siendo n el número de bandas presentes en cada muestra.

$$Shannon - Wiener (H) = - \sum_{i=1}^{i=n} X_i \times \ln (X_i)$$

Siendo X_i el valor de intensidad de la banda i , asignado por el software. n representa el número de bandas presentes en cada muestra.

$$Inversa de Simpson = 1 / \sum_{i=1}^{i=n} X_i^2$$

Siendo X_i el valor de intensidad de la banda i , asignado por el software bioinformático en base al contraste con el fondo del gel. Este valor representa un análogo de la abundancia de ese producto de PCR en la muestra. n representa el número de bandas presentes en cada muestra.

Los índices de diversidad calculados para cada gen se analizaron estadísticamente a través de un ANAVA bifactorial (Factor *Muestra* con 5 niveles [suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto]; Factor *Establecimiento* con 2 niveles [Viento Norte S.A. y Productor Mario]) con un 95% de confianza y se utilizó el test de Tukey ($\alpha=0,05$) cuando fue necesario.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS DE AMBOS SITIOS DE ESTUDIO

Los parámetros de granulometría entre los suelos de ambos establecimientos (Tabla 2.3.1a) resultaron similares, y son acordes a los descriptos en las cartas de suelos del INTA (descripción del sitio de estudio). Estos resultados, sumados a la proximidad geográfica entre ambos establecimientos permite establecer que, en términos del experimento llevado a cabo en este trabajo, la situación inicial en ambos establecimientos fue a partir de un “mismo suelo” de características físicas-químicas-biológicas similares. Esto resulta de importancia ya que permite definir que las diferencias observadas en la caracterización física-química-biológica de ambos suelos es consecuencia de la acumulación de las prácticas hortícolas convencionales e intensivas aplicadas durante más de 25 años en el Establecimiento Viento Norte (**VN**), respecto a una única campaña de cultivo llevada a cabo en el establecimiento del Productor Mario (**M**).

Tabla 2.3.1a Características físico-químicas de los suelos del establecimiento Viento Norte (**VN**) y del Productor Mario (**M**).

DETERMINACIÓN ^a	UNIDADES	VN	M
pH (1:2,5)		7,39 ± 0,12	7,86 ± 0,09
CE	dS m ⁻¹	7,15 ± 0,25	2,60 ± 0,32
CIC	cmolc kg ⁻¹	28,1 ± 2,3	20,4 ± 1,5
Ca ⁺⁺	cmolc kg ⁻¹	25,7	15,3
Mg ⁺⁺	cmolc kg ⁻¹	2,90	0,60
Na ⁺	cmolc kg ⁻¹	15,95	2,48
K ⁺	cmolc kg ⁻¹	2,94	1,94
P	Ppm	215 ± 37	131 ± 12
C	%	2,21 ± 0,09	1,45 ± 0,27
MO	%	3,80 ± 0,11	2,50 ± 0,24
Nt	%	0,298 ± 0,03	0,131 ± 0,08
C / N		7	11
PSI	%	21,2	12,2
Textura		Franco limoso	Franco limoso
Arena	%	28	30
Limo	%	64	58
Arcilla	%	8	12

^a CE: Conductividad eléctrica; CIC: Capacidad de intercambio catiónico; MO: Materia orgánica; Nt: Nitrógeno total; C/N: relación carbono nitrógeno; PSI: Porcentaje de sodio intercambiable.

❖ Los análisis físico-químicos del suelo de ambos establecimientos (Tabla 2.3.1a) evidencian el impacto negativo de las prácticas agronómicas acumuladas en el establecimiento VN respecto a M: leve acidificación del suelo, así como altos valores de conductividad eléctrica y PSI (salinización/sodificación) generalmente consecuencia de una fertilización excesiva, aunque también puede estar asociado a la calidad del agua de riego.

❖ En el establecimiento VN también se observan modificaciones deseables en ciertos parámetros, tal como el aumento de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el nitrógeno total, además de una mayor disponibilidad de fósforo y cationes. Estas mejoras pueden deberse al agregado de enmiendas orgánicas (principalmente cama de pollo y/o caballos, con alto contenido de nitrógeno y fósforo), una práctica comúnmente llevada a cabo en los establecimientos hortícolas de la región debido a la disponibilidad de este tipo de productos descartados de la actividad avícola y de caballerizas. También se ha mencionado que este tipo de enmiendas pueden aportar al suelo una alta concentración de sales que contribuyen al aumento la conductividad eléctrica de los mismos.

2.3.2. CALIDAD DE LAS MUESTRAS VEGETALES Y DE ADN

Los controles de desinfección superficial de los tejidos realizados en muestras de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate fueron satisfactorios:

- En las placas de petri donde se sembró el agua del último lavado o se apoyaron las muestras de plantas desinfectadas no se observó crecimiento bacteriano, evidenciando la ausencia de bacterias cultivables en los tejidos superficiales.
- Las PCR realizadas con el agua del último lavado arrojaron resultados negativos, confirmando la ausencia de ADN bacteriano en los tejidos superficiales.

Se colectaron muchas plantas de las cuales se descartaron aquellas que no cumplían con las 2 premisas anteriores, pudiendo afirmar que el ADN bacteriano metagenómico obtenido a partir de las muestras de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate proviene de las comunidades bacterianas que habitan el interior de dichos tejidos vegetales.

Fue posible obtener ADN bacteriano metagenómico de calidad a partir de las muestras de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate mediante la utilización del kit comercial FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals). Los rendimientos promedios de ADN en $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ se muestran en al [Tabla 2.3.2a](#) (los resultados detallados se encuentran en la [Tabla 5.1a](#), en el [ANEXO A](#))

Tabla 2.3.2a Rendimiento promedio y calidad de las extracciones de ADN bacteriano metagenómico a partir de triplicados de muestras ambientales. Valores de rendimiento expresados en $\text{ng } \mu\text{l}^{-1} \pm$ desviación estándar.

MUESTRA	VIENTO NORTE		PRODUCTOR MARIO	
	Concentración ADN	ABS 260/280	Concentración ADN	ABS 260/280
Suelo	41 ± 8	1,79 ± 0,06	44 ± 5	1,86 ± 0,03
Rizosfera	40 ± 5	1,83 ± 0,01	49 ± 2	1,84 ± 0,05
Raíz	36 ± 10	1,79 ± 0,03	25 ± 1	1,87 ± 0,04
Tallo	12 ± 8	1,86 ± 0,06	25 ± 4	1,78 ± 0,04
Fruto	29 ± 6	1,85 ± 0,07	27 ± 4	1,84 ± 0,03

En cuanto al control de calidad del ADN extraído a partir de cada una de las muestras, la PCR realizada para amplificar una región de ~850 pb resultaron en una banda amplificada nítida e intensa (Figura 2.3.2a), corroborando la buena calidad de las extracciones de ADN y posibilitando los posteriores estudios de caracterización por técnicas de biología molecular a partir de dichas muestras.

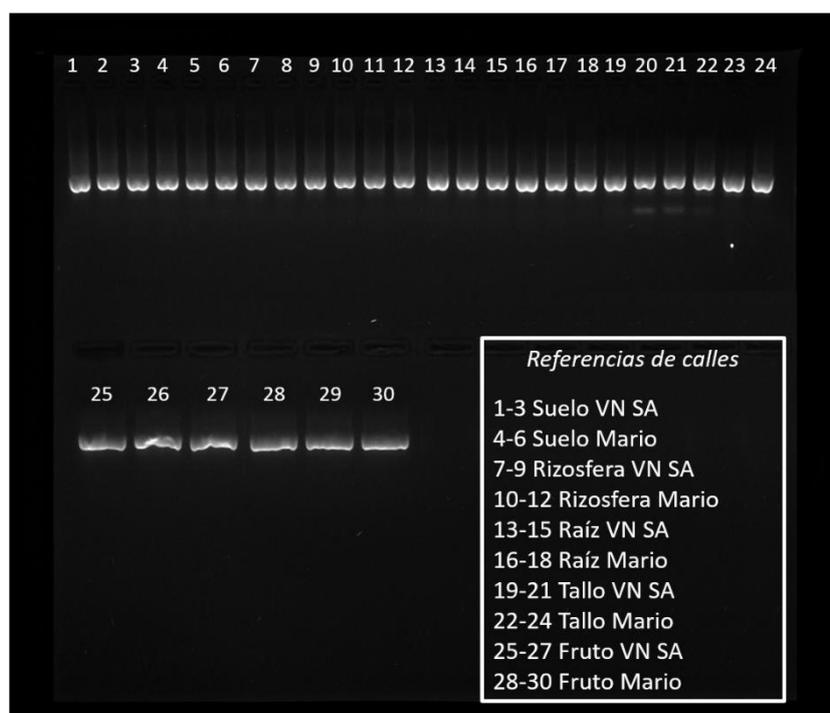


Figura 2.3.2a Fotografía del gel donde se corrieron los productos de PCR del gen ARNr 16S amplificados con los primers universales 341F-907R para cada una de las extracciones de ADN bacteriano metagenómico de las distintas muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de dos establecimientos (VN: Viento Norte; Mario: Productor Mario) del cinturón hortícola de La Plata.

2.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS TOTALES ASOCIADAS AL CULTIVO DE TOMATE

2.3.3.1 Cuantificación mediante q-PCR

Se logró amplificar y cuantificar satisfactoriamente el gen ARNr 16S con los primers detallados, tanto a partir del patrón sintético del gen, como de las extracciones de ADN bacteriano metagenómico de las distintas muestras. Para ello fue necesaria la utilización de dos pares de primers (forward y reverse) distintos para amplificar correctamente todas las muestras, ya que se evidenció que un par de primers arrojó buenos resultados confiables con ciertas muestras y problemas de amplificación inespecífica con otras muestras, y viceversa:

- con primers 799F–1115R se logró una buena amplificación específica en las muestras de suelo y rizosfera, pero la curva de melting sobre las muestras de endosfera demostró la presencia de productos de PCR inespecíficos (Figura 5.2.1e, gráfica B, en el ANEXO A). Por este motivo, solo se conservaron los datos para la cuantificación de suelo y rizosfera.
- con primers Bac1369F–Prok1492R se logró una buena amplificación específica en las muestras de endosfera, pero la curva de melting sobre las muestras de suelo y rizosfera demostró la presencia de productos de PCR inespecíficos (Figura 5.2.1e, gráfica C, en el ANEXO A). Por este motivo, solo se conservaron los datos para la cuantificación de endosfera de raíz, tallo y fruto.

Los resultados de la construcción de la curva estándar para cada par de primers (Curva estándar 799F-1115R y curva estándar Bac1369F-Prok1492R), así como el ajuste de cada uno de los modelos matemáticos y su evaluación estadística se detallan en el apartado de qPCR ARNr 16S, en el ANEXO A. Ambos modelos de regresión lineal ajustaron muy significativamente (p valor < 0,01) a los datos, con valores de coeficiente de determinación entre 0,983 y 0,999; cumpliendo con los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los residuos.

Los resultados promedios de la cuantificación del gen ARNr 16S se muestran en la Tabla 2.3.3a. El análisis estadístico y los resultados detallados se encuentran en el apartado de qPCR ARNr 16S, en el ANEXO A.

Tabla 2.3.3a Número de copias g^{-1} del gen ARNr 16S en las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de dos establecimientos del CHP.

MUESTRA	N° de copias g^{-1} de ARNr 16S ($\times 10^{11}$) *	
	Viento Norte	Productor Mario
Suelo	1142 \pm 280 ^a	489 \pm 207 ^b
Rizosfera	1105 \pm 220 ^a	813 \pm 293 ^{ab}
Raíz	0,11 \pm 0,09 ^c	0,11 \pm 0,07 ^c
Tallo	0,035 \pm 0,004 ^d	0,028 \pm 0,003 ^d
Fruto	0,0063 \pm 0,0008 ^e	0,008 \pm 0,001 ^e

* Los resultados se expresan elevados a 10^{11} . Letras distintas en los valores denotan diferencias estadísticas según test de Tukey ($\alpha=0,05$).

La comparación de las cuantificaciones absolutas del N° de copias del gen ARNr 16S por gramo de peso seco para cada una de las muestras nos permite realizar las siguientes observaciones:

- ❖ La rizosfera y el suelo fueron las muestras que demostraron contener mayor N° de copias g^{-1} del gen ARNr 16S, lo que se traduce en una mayor abundancia poblacional bacteriana, con diferencias significativas respecto a los resultados hallados en muestras de endosfera.
- ❖ Entre las muestras de endosfera, el N° de copias g^{-1} del gen ARNr 16S disminuyó significativamente conforme la muestra se alejó del entorno radical, situación que ocurrió en ambos sitios de estudio.

❖ La comparativa entre ambos establecimientos demuestra que el suelo del establecimiento VN posee un N° de copias g⁻¹ del gen ARNr 16S significativamente mayor a los encontrados en las muestras de suelo de M.

2.3.3.2 Composición y estructura de las comunidades bacterianas asociada al cultivo de tomate. Análisis bioinformático de datos de secuenciación masiva.

Para el total de las 30 muestras enviadas a secuenciar se obtuvieron 2.860.209 secuencias crudas (*raw data*), las cuales luego de las etapas de filtrado por calidad y eliminación de quimeras, OTUs con bajo número de secuencias (menos de 101 secuencias), cloroplastos y mitocondrias quedaron 1.822.145 de secuencias, un 63,7% de las secuencias crudas obtenidas del secuenciador (ver detalles sobre la estadística de las distintas etapas del filtrado de secuencias para cada una de las muestras en la [Tabla 5.3.1a](#), en el [ANEXO A](#)). A pesar de descartar un gran número de secuencias durante la etapa de filtrado, la cobertura lograda en la secuenciación de las distintas muestras fue muy satisfactoria, estando entre valores de 89,6-98,8%. El alto porcentaje de cobertura también puede visualizarse en las curvas de rarefacción de las distintas muestras ([Figura 2.3.3a](#)), ya que todas las muestras llegan a la región de la curva donde la aparición de nuevos OTUs requiere de un gran número de nuevas secuencias.

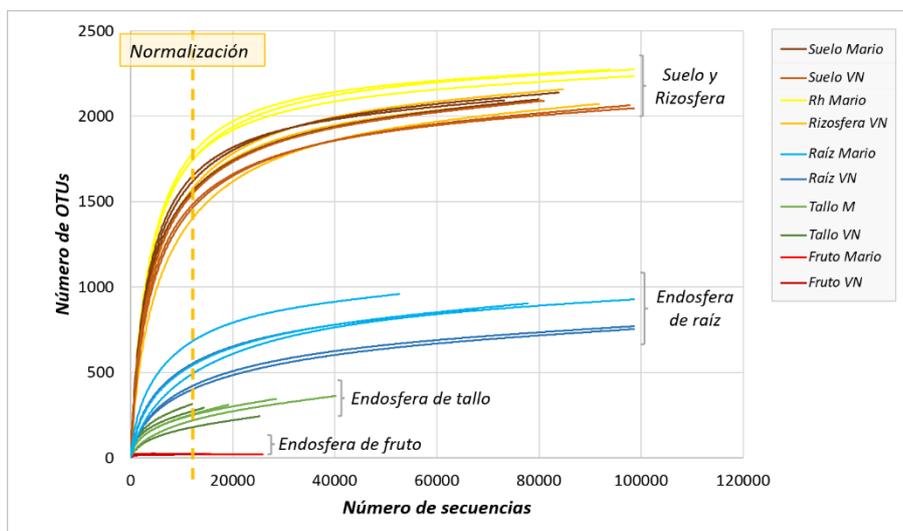


Figura 2.3.3a Curvas de rarefacción de las distintas muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de ambos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata (VN: Viento Norte; Mario: Productor Mario). La línea punteada amarilla indica el número aproximado al cual se normalizó el número de secuencias.

Como se observa en la [Figura 2.3.3a](#), se hallaron diferentes números de OTUs en los distintos microhábitats en estudio, con un mínimo de 28 OTUs en muestras de fruto y un máximo de 2369 OTUs en muestras de rizosfera. Los OTUs totales hallados entre todas las muestras fueron 2836 ([Tabla de OTUs vs MUESTRAS](#)).

Las curvas de rarefacción también nos permiten observar que el número de secuencias de buena calidad en cada una de las muestras fue muy variable (Figura 2.3.3b), razón por la cual fue necesario normalizar el número de secuencias en todas las muestras para poder realizar una comparación válida entre las distintas muestras.

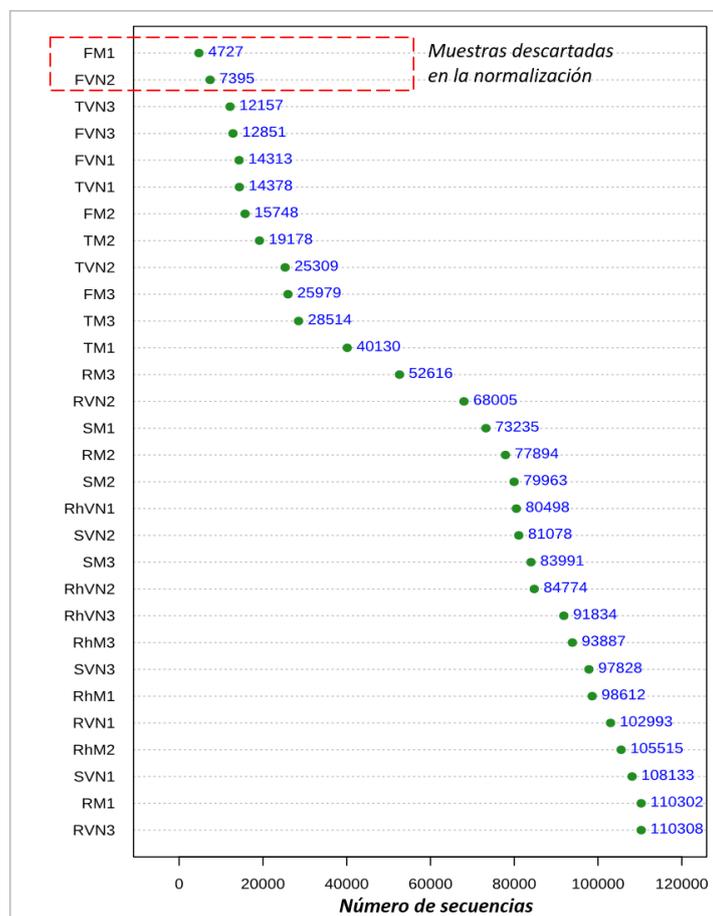


Figura 2.3.3b Número de secuencias por cada muestra luego del filtrado por calidad y eliminación quimeras, OTUs con pocas secuencias, mitocondrias y cloroplastos.

La normalización de las secuencias a 4727 secuencias (menor número de secuencias obtenido en una muestra, correspondiente a una de las réplicas de fruto del establecimiento del Productor Mario; **FM1**; Figura 2.3.3b) disminuyó drásticamente el valor de cobertura de las comunidades bacterianas de las muestras de suelo y rizosfera (arrojando valores ~60%. Ver detalles en Tabla 5.3.1b, en el ANEXO A). Por tal motivo, se decidió descartar las dos muestras que menor número de secuencias obtuvieron (**FM1** y **FVN2**; Figura 2.3.3b), y normalizar el resto de las muestras al número de 12.157 secuencias, encontrando un equilibrio entre una buena cobertura (>80% en todas las muestras) y poder incluir en el análisis la mayor cantidad de muestras y número de secuencias posible.

- Caracterización taxonómica de las comunidades bacterianas

La asignación taxonómica de los OTUs hallados empleando la última actualización de la base de datos Silva v138 resultó exitosa, ya que logró clasificar taxonómicamente el 99,7% de las secuencias a nivel de phylum. En la [Tabla 2.3.3b](#) se observan los 5 phylum más abundantes hallados para cada una de las muestras (N=28).

Tabla 2.3.3b Abundancia relativa expresada en porcentaje de los principales 5 taxones a nivel de phylum de las diferentes muestras de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de los establecimientos Viento Norte y Productor Mario.

Microhábitat	Establecimiento	Proteobacteria	Actinobacteriota	Bacteroidota	Firmicutes	Acidobacteriota	Total
Suelo	Viento Norte S.A.	35%	10%	12%	8%	10%	75%
	Productor Mario	28%	13%	14%	14%	9%	79%
Rizosfera	Viento Norte S.A.	37%	11%	17%	5%	7%	77%
	Productor Mario	36%	11%	18%	6%	8%	80%
Endosfera de raíz	Viento Norte S.A.	60%	14%	22%	1%	0%	97%
	Productor Mario	78%	5%	4%	11%	0%	98%
Endosfera de tallo	Viento Norte S.A.	85%	5%	3%	4%	0%	97%
	Productor Mario	50%	33%	0%	16%	0%	100%
Endosfera de fruto	Viento Norte S.A.	83%	12%	0%	5%	0%	100%
	Productor Mario	93%	5%	0%	2%	0%	100%

❖ Se evidencia que la gran mayoría de las secuencias pertenecen a los phylum Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Acidobacteria (75-80% en muestras de suelo-rizosfera y 97-100% en muestras de endosfera).

❖ Se observan valores similares en los microhábitats de suelo y rizosfera respecto a los diferentes phylum, con predominio de Proteobacteria, seguida por Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria y Firmicutes.

❖ Respecto a las comunidades bacterianas endófitas, se encontró que en su mayoría pertenecen al phylum Proteobacteria, seguidas por Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (éste último solo presente en endosfera de raíz y tallo). El phylum Acidobacteria (presente en orden del ~8% en rizosfera) no se encontró en muestras de endosfera.

Los OTUs clasificados taxonómicamente como Proteobacteria pertenecen en su mayoría a las clases γ -proteobacteria y α -proteobacteria ([Tabla 2.3.3c](#)), los cuales se encontraron en abundancias relativas diferentes entre los diferentes microhábitats en estudio:

Tabla 2.3.3c Porcentaje de abundancia relativa de las clases γ -proteobacteria y α -proteobacteria de las diferentes muestras de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de los establecimientos Viento Norte y Productor Mario.

Microhábitat	Establecimiento	γ -proteobacteria	α -proteobacteria
Suelo	Viento Norte S.A.	10%	25%
	Productor Mario	11%	17%
Rizosfera	Viento Norte S.A.	12%	26%
	Productor Mario	13%	23%
Endosfera de raíz	Viento Norte S.A.	27%	33%
	Productor Mario	61%	17%
Endosfera de tallo	Viento Norte S.A.	80%	5%
	Productor Mario	49%	2%
Endosfera de fruto	Viento Norte S.A.	81%	2%
	Productor Mario	92%	1%

❖ Las Alphaproteobacteria predominaron en los microhábitats subterráneos de rizosfera-rizoendosfera-suelo (17-33%), encontrándose en niveles muy superiores a los hallados en endosfera de tallo y fruto (1-5%).

❖ Por el contrario, las Gammaproteobacteria fueron abundantes en muestras de endosfera de fruto-tallo-raíz (27-92%) y en menor medida en suelo-rizosfera (10-13%).

Los órdenes bacterianos hallados en las diferentes muestras (Figura 2.3.3c) presentan notables diferencias dependiendo del microhábitat.

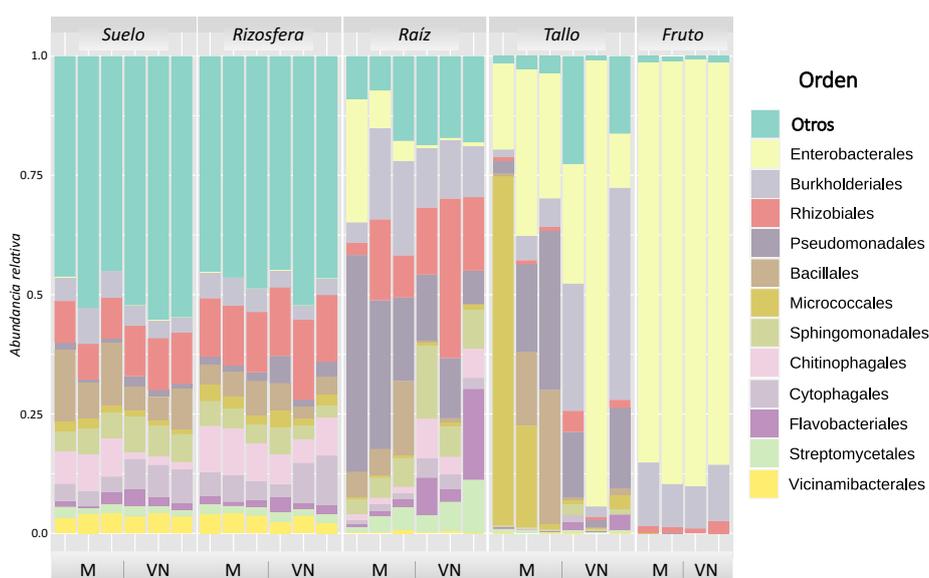


Figura 2.3.3c Abundancia relativa de los principales 12 órdenes bacterianos que componen las comunidades asociadas a muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de ambos establecimientos en estudio (M: Productor Mario; VN: Viento Norte) del CHP.

❖ Es apreciable la diferencia de los perfiles taxonómicos entre los distintos microhábitats, pudiendo agrupar a simple vista las muestras de suelo y rizosfera de ambos establecimientos, aparentemente, sin mucha relación respecto a las muestras de endosfera. Este último grupo de muestras evidencia una mayor variación, tanto en taxones como en abundancias relativas, no solo entre los distintos microhábitats de la endosfera, sino incluso entre ambos establecimientos para un mismo microhábitat (raíz y tallo).

❖ También se puede apreciar que los principales 12 órdenes detallados en la [Figura 2.3.3c](#) representan aproximadamente el ~50% de la abundancia total hallada en suelo y rizosfera, respecto al 80-90% que representan estos mismos órdenes en muestras de endosfera. Esto indica una cierta concentración de las comunidades bacterianas de endosfera en determinados taxones.

Estas diferencias pueden observarse más definidamente a nivel taxonómico de género. En la [Figura 2.3.3d](#) se observan la totalidad de los géneros hallados en todas las muestras y se denota claramente el diferente perfil de colores, destacando la mayor complejidad observada en muestras de suelo y rizosfera, y en orden decreciente hacia endosfera de raíz, tallo y fruto.

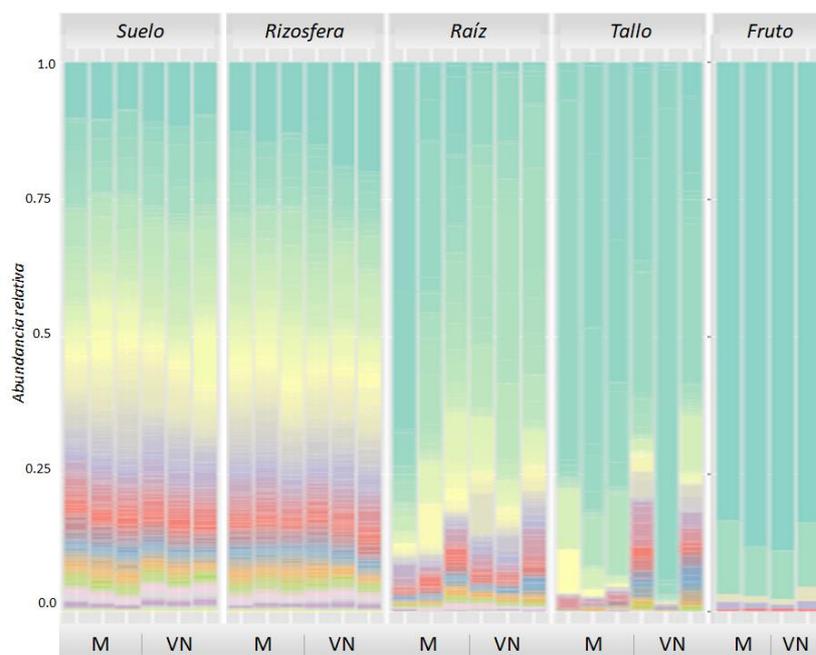


Figura 2.3.3d Abundancia relativa de todos los taxones clasificados a nivel de género de las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de ambos establecimientos en estudio (M: Productor Mario; VN: Viento Norte) del cinturón hortícola de La Plata.

Haciendo foco en los géneros más abundantes de cada microhábitat ([Tabla 2.3.3d](#)) se encontró que:

Tabla 2.3.3d Principales géneros (más abundantes) hallados en mayor abundancia relativa para cada una de las muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de ambos establecimientos en estudio (M: Productor Mario; VN: Viento Norte) del CHP.

Géneros	Suelo		Rizosfera		Endosfera de raíz		Endosfera de tallo	
	VN	M	VN	M	VN	M	VN	M
<i>Sphingomonas</i>	4,8%	4,0%	1,4%	3,1%	0,1%	0,5%	0,1%	0,0%
<i>Bacillus</i>	3,2%	4,6%	1,9%	2,4%	0,3%	3,8%	0,5%	6,6%
<i>Terrimonas</i>	0,2%	1,3%	3,3%	3,6%	0,2%	0,1%	0,0%	0,0%
<i>Streptomyces</i>	1,1%	1,8%	1,4%	1,7%	7,0%	3,1%	0,3%	0,6%
<i>Acidibacter</i>	0,6%	1,1%	2,1%	2,0%	0,0%	0,3%	0,2%	0,0%
<i>Bauldia</i>	0,6%	0,3%	2,7%	1,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>Chryseolinea</i>	2,7%	0,8%	0,6%	0,9%	0,3%	0,1%	0,0%	0,0%
<i>Devosia</i>	0,7%	0,6%	1,9%	1,4%	1,1%	0,3%	0,1%	0,0%
<i>Steroidobacter</i>	2,1%	1,1%	0,6%	0,7%	0,7%	1,2%	0,0%	0,0%
<i>Nitrospira</i>	0,8%	1,5%	0,8%	1,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
<i>Pseudarthrobacter</i>	0,1%	1,3%	0,2%	1,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>Pseudomonas</i>	0,6%	0,3%	1,2%	0,7%	9,5%	11,1%	1,8%	1,3%
<i>Rhizobium</i>	0,8%	0,3%	0,7%	0,3%	3,7%	3,8%	0,4%	0,2%
<i>Flavobacterium</i>	0,2%	0,4%	0,6%	0,8%	9,4%	1,0%	1,2%	0,2%
<i>Sphingobium</i>	0,4%	0,1%	0,9%	0,3%	7,5%	3,6%	0,6%	0,2%
<i>Acinetobacter</i>	0,0%	0,0%	1,3%	0,0%	0,5%	19,2%	8,7%	16,6%
<i>Shinella</i>	0,1%	0,3%	0,4%	0,2%	9,3%	1,5%	0,9%	0,3%
<i>Acidovorax</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%	5,3%	1,6%	0,4%	0,2%
<i>Klebsiella</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%	2,6%	0,3%
<i>Pantoea</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	11,9%	4,7%	20,9%
<i>Ralstonia</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,3%	17,4%	2,9%
<i>Terribacillus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	2,2%	0,1%	7,8%
<i>Paraburkholderia</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,3%	3,9%	0,5%
<i>Pectobacterium</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%	4,5%
<i>Curtobacterium</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	2,7%
TOTAL	19,1%	19,8%	22,0%	22,7%	56,0%	66,5%	44,3%	65,8%

❖ Los 25 géneros mencionados en la [Tabla 2.3.3d](#) representan solo un 19-22% de la abundancia total de las comunidades de suelo-rizosfera, mientras que ese porcentaje aumenta al 45-65% en muestras de endosfera. Esto denota como las comunidades de endosfera se encuentran más concentradas en menor cantidad de géneros bacterianos, en comparación con las de suelo-rizosfera.

❖ Los géneros más abundantes que se hallaron en suelo-rizosfera fueron *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Acidibacter*. Particularmente en suelo aparecen géneros como *Chryseolinea* y *Steroidobacter*, mientras que en rizosfera destacan los géneros *Terrimonas*, *Bauldia* y *Devosia*.

❖ Los géneros más abundantes hallados en endosfera de raíz y tallo fueron *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Particularmente en endosfera de raíz también se destaca la presencia de *Sphingobium*, *Rhizobium*, *Flavobacterium* y *Acidovorax*; mientras que en interior de tallo se encontró presencia de *Ralstonia*, *Peribacillus*, *Paraburkholderia* y *Pectobacterium*.

❖ Dentro de los géneros hallados en el interior del fruto de tomate, se encontró que más del 80% de las secuencias se asignaron al género *Klebsiella*; completando el restante 15% por los géneros *Castellaniella*, *Nocardia*, *Ralstonia* y *Acinetobacter*.

Algunos de los géneros con mayor abundancia relativa en suelo y rizosfera también se encontraron dentro de los más abundantes en la endosfera de plantas de tomate; es el caso de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Devosia*. El resto de los géneros mencionados en endosfera de tomate tienen muy baja o nula presencia en muestras de suelo y rizosfera.

- Índices de alfa-diversidad

Los resultados obtenidos de los cálculos de los índices de riqueza observada (*Richness*) y teórica (*Chao-1*) así como los índices de diversidad de *Shannon-Wiener* y la *inversa de Simpson* se detallan en la [Tabla 2.3.3e](#) y [Figura 2.3.3e](#).

Tabla 2.3.3e Índices de alfa-diversidad promedio (\pm desviación estándar) a nivel taxonómico de OTU para las muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de Tukey ($p < 0,05$).

Microhábitat	Establecimiento	Richness	Chao-1	Shannon-Wiener	Simpson (1/D)
Suelo	Viento Norte	1573 \pm 40 b	1905 \pm 34 b	6,5 \pm 0,2	265 \pm 139
	Productor Mario	1637 \pm 48 b	1924 \pm 58 b	6,55 \pm 0,05 ^a	257 \pm 71 ^a
Rizosfera	Viento Norte	1566 \pm 67 b	1908 \pm 39 b	6,4 \pm 0,1	253 \pm 39
	Productor Mario	1835 \pm 28 ^a	2150 \pm 24 ^a	6,75 \pm 0,07 ^a	372 \pm 64 ^a
Endosfera de raíz	Viento Norte	528 \pm 48 c	721 \pm 53 c	4,42 \pm 0,06	31 \pm 3
	Productor Mario	597 \pm 85 c	839 \pm 48 c	4,0 \pm 0,8	22 \pm 20 ^b
Endosfera de tallo	Viento Norte	273 \pm 74 d	427 \pm 121 d	2,8 \pm 1,6	11 \pm 9
	Productor Mario	251 \pm 18 d	406 \pm 65 d	2,9 \pm 0,4 ^c	7 \pm 4 ^b
Endosfera de fruto	Viento Norte	28 \pm 1,4 e	29,5 \pm 3,5 e	1,51 \pm 0,06	3,1 \pm 0,2
	Productor Mario	30 \pm 1,4 e	31 \pm 2,1 e	1,50 \pm 0,02 ^d	3,1 \pm 0,1 ^b

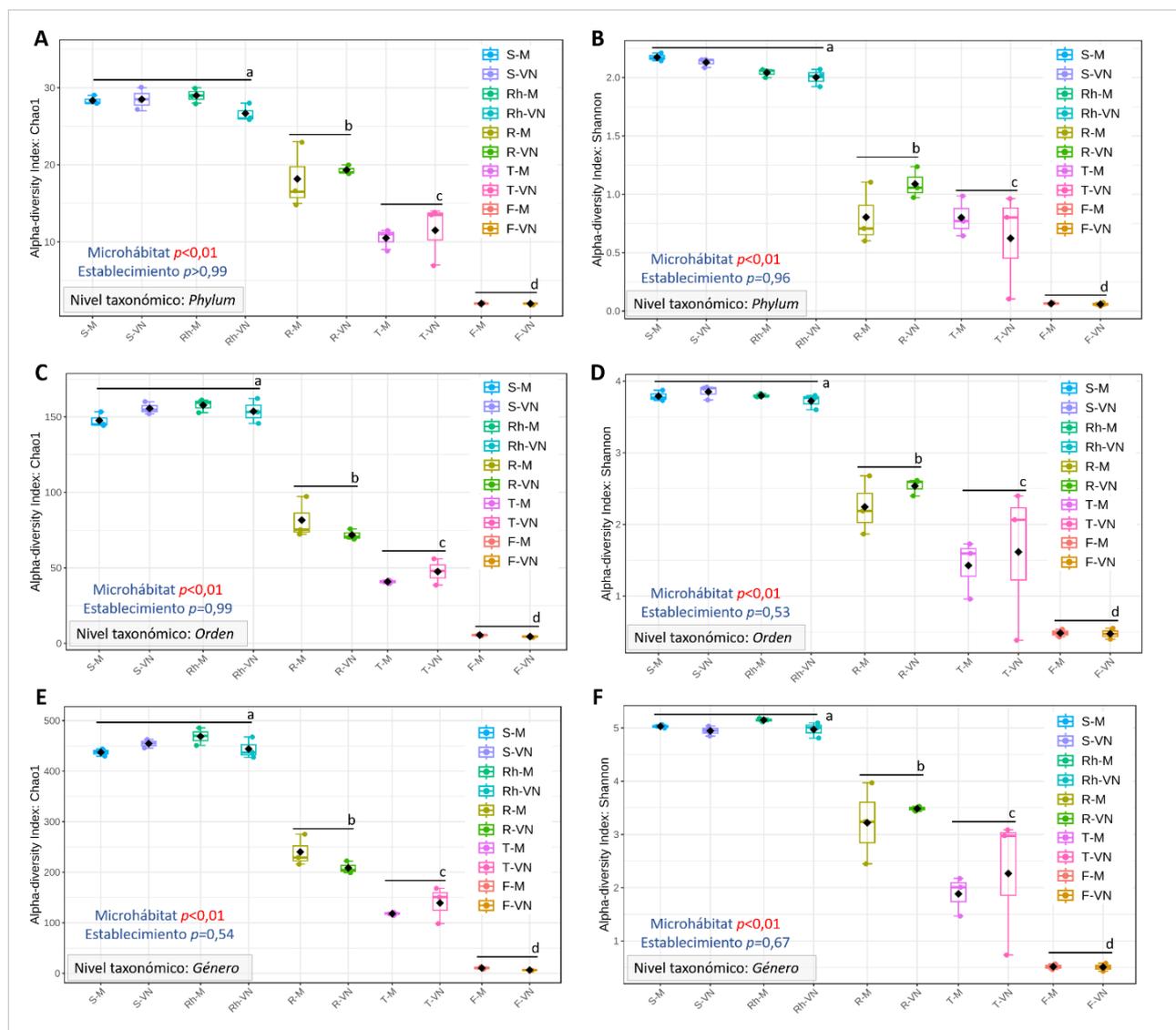


Figura 2.3.3e Índices de alfa-diversidad Chao-1 (A, C, E) y Shannon-Wiener (B, D, F) calculados para los distintos niveles taxonómicos de phylum (A y B), orden (C y D) y género (E y F) en muestras de suelo (S), rizosfera (Rh) y endosfera de raíz (R), tallo (T) y fruto (F) de plantas de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata (VN: Viento Norte S.A.; y M: Productor Mario). En cada gráfica se detalla el resultado del ANAVA para los factores *microhábitat* y *establecimiento*, considerándose con efecto significativo cuando $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de Tukey ($p < 0,05$).

Los índices de alfa-diversidad para las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de ambos establecimientos (Figura 2.3.3e y Tabla 2.3.3e) permiten realizar las siguientes observaciones:

- ❖ La riqueza observada (*Richness*) y teórica (*Chao-1*) de OTUs es significativamente mayor en muestras de suelo y rizosfera a todos los niveles taxonómicos evaluados (phylum, orden y género en Figura 2.3.3e; OTUs en Tabla 2.3.3e), seguidas en orden decreciente por las muestras de endosfera de raíz, tallo y fruto. Esto denota la existencia de un mayor número de taxones en las comunidades bacterianas de los microhábitats del entorno radical externo a las plantas de tomate (suelo/rizosfera), los cuales decrecen hacia la endosfera del vegetal y conforme se alejan del suelo.

❖ Respecto a los índices de Shannon-Wiener y la inversa de Simpson, nuevamente las muestras de suelo y rizosfera son las que presentan los mayores valores, seguidas en orden decreciente por la endosfera de raíz, tallo y fruto. Este índice al contemplar tanto la riqueza de los taxones como la abundancia relativa en la que se encuentran, probablemente sea arrastrado por la mayor riqueza observada en las muestras de suelo y rizosfera. No obstante, es válido mencionar que el mayor valor de estos índices se asocia con una mayor equitatividad en la abundancia relativa de los taxones presentes en cada comunidad bacteriana.

❖ Las diferencias observadas en los índices de alfa-diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a las distintas muestras son determinadas principalmente por el microhábitat (suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto), siendo los compartimentos vegetales internos los más restrictivos al ingreso del gran número de taxones observado en rizosfera.

❖ Las diferencias que caracterizan a cada uno de los establecimientos repercutieron sobre los índices de alfa-diversidad de suelo y rizosfera, en los cuales las muestras tomadas del establecimiento del Productor Mario mostraron mayor riqueza a nivel de OTUs, aunque únicamente fueron significativas en rizosfera ([Tabla 2.3.3e](#)). Los índices de alfa-diversidad de los microhábitats de endosfera no se vieron alterados por el establecimiento.

Los [resultados detallados de los análisis estadísticos](#) para los diferentes índices a distintos niveles taxonómicos se detallan en el [ANEXO A](#).

- Índices de beta-diversidad

Se compararon las comunidades bacterianas que caracterizan a cada uno de los microhábitats en estudio de ambos establecimientos hortícolas mediante el análisis de componentes principales (PCoA) aplicado a la matriz de distancias de Bray-Curtis. El análisis mencionado se aplicó a los niveles taxonómicos de phylum, orden, género y OTU para comparar todas las muestras juntas (N=28), como así también para la comparación particular de los grupos de muestra de suelo-rizosfera (N=12) y el grupo de muestras de endosfera (raíz, tallo y fruto; N=16). Los gráficos PCoA de las comparaciones realizadas pueden observarse en la [Figura 2.3.3f](#).

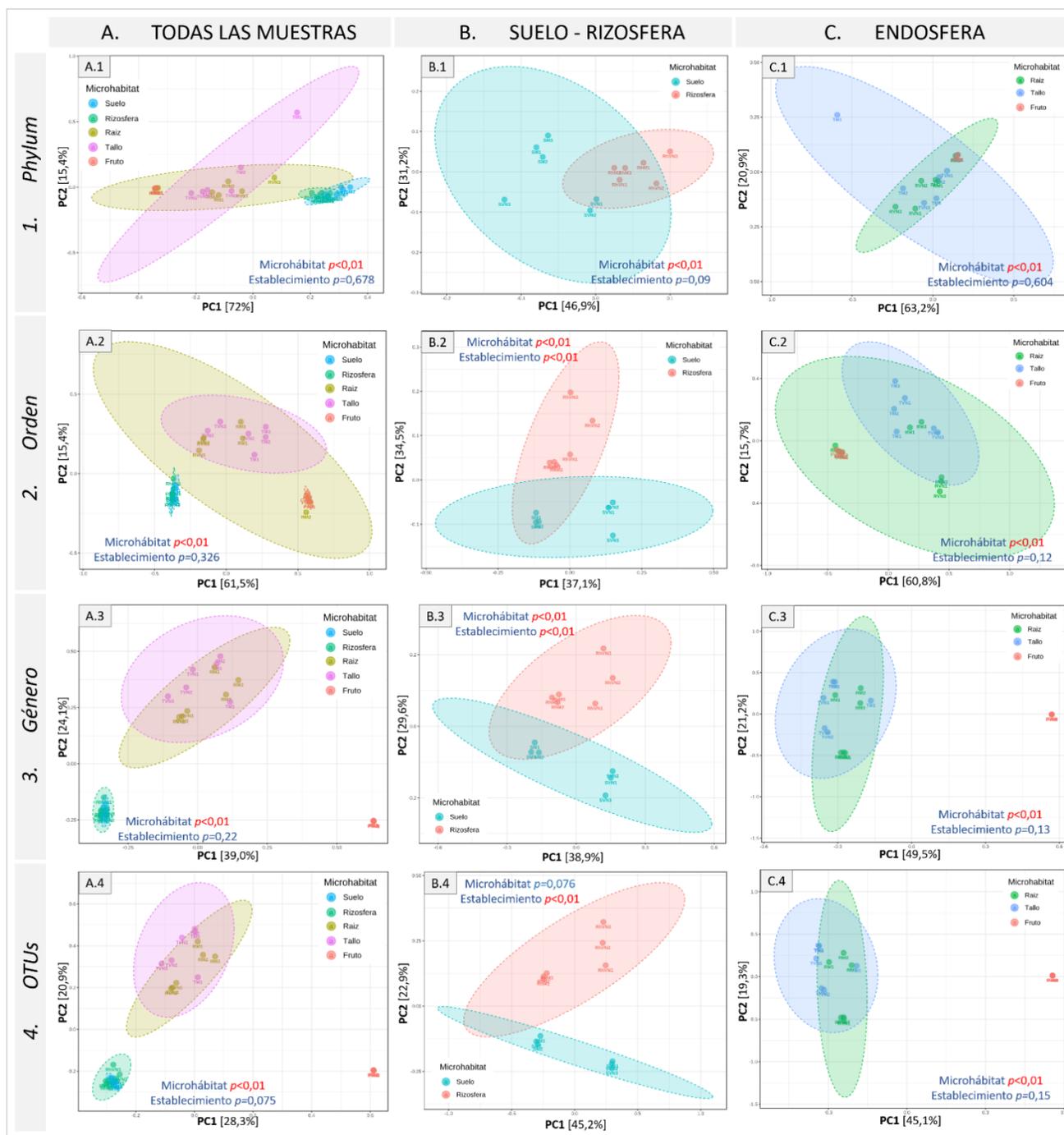


Figura 2.3.3f Análisis de componentes principales (PCoA) aplicados a la matriz de distancias calculadas según Bray-Curtis en la comparación de los distintos grupos de muestras (A. Todas las muestras; B. Suelo-rizosfera; C. Endosfera) a distintos niveles taxonómicos (1. Phylum; 2. Orden; 3. Género; 4. OTUs).

Del análisis comparativo conjunto de todas las muestras (Figura 2.3.3f, gráficas A.1, A.2, A.3 y A.4) se observa que:

- ❖ En todos los niveles taxonómicos analizados, el microhábitat ejerce un claro efecto en la diferenciación de las comunidades bacterianas ($p < 0,01$), mientras que no se evidencia efecto del establecimiento en las distintas comunidades bacterianas ($p > 0,10$), solo un efecto marginal a nivel taxonómico de OTU ($p = 0,075$).

❖ A nivel taxonómico de género y OTU se observan claramente 3 agrupamientos: (i) los microhábitats suelo-rizosfera, (ii) endosfera de raíz-tallo, y (iii) las muestras de fruto. Los agrupamientos de muestras denotan mayores similitudes en la composición y estructura de sus comunidades bacterianas; mientras que la separación entre estos grupos determina que las mayores diferencias sean entre suelo-rizosfera y fruto (en ambos extremos del CP1 [28-40%]), siendo las comunidades bacterianas de endosfera de raíz-tallo más cercanas en composición y estructura a las de suelo-rizosfera.

Del análisis parcial de las muestras suelo-rizosfera (Figura 2.3.3f, gráficas B.1, B.2, B.3 y B.4) y las muestras de endosfera (Figura 2.3.3f, gráficas C.1, C.2, C.3 y C.4), se puede evidenciar claramente que:

❖ El establecimiento como factor experimental tiene un fuerte impacto en la diferenciación de las comunidades bacterianas asociadas al suelo y la rizosfera ($p < 0,01$), cuyas muestras se separan en el eje del CP1 que explica la mayor variabilidad (37 a 45%). En menor grado, el microhábitat también ejerce efecto significativo ($p < 0,01$) o marginalmente significativo ($p < 0,1$) en estas comunidades, separando al suelo y la rizosfera en el eje del CP2 que explica una variabilidad menor (22 a 34%).

❖ Por otro lado, la variabilidad en las comunidades de endosfera se encontró determinada por el microhábitat ($p < 0,01$), principalmente por las grandes diferencias observadas en las comunidades de fruto respecto a raíz y tallo (separadas en el CP1 [~50%]).

- Análisis comparativo de las comunidades bacterianas: efecto del microhábitat y el sitio

Hasta aquí se han caracterizado las comunidades bacterianas asociadas a las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de tomate de ambos establecimientos hortícolas en estudio en base a su composición taxonómica, el cálculo de índices de alfa-diversidad y beta-diversidad. Estos análisis han permitido establecer diferencias y similitudes entre las comunidades bacterianas de las diferentes muestras debidas al factor experimental microhábitat y al factor experimental establecimiento.

En otros análisis globales de los datos de secuenciación masiva, que incluyen la totalidad de las muestras (N=28), se puede observar cómo estos dos factores (microhábitat y establecimiento) afectan en la modulación de las comunidades bacterianas. Por ejemplo, en el mapa de calor elaborado con todas las muestras (Figura 2.3.3g).

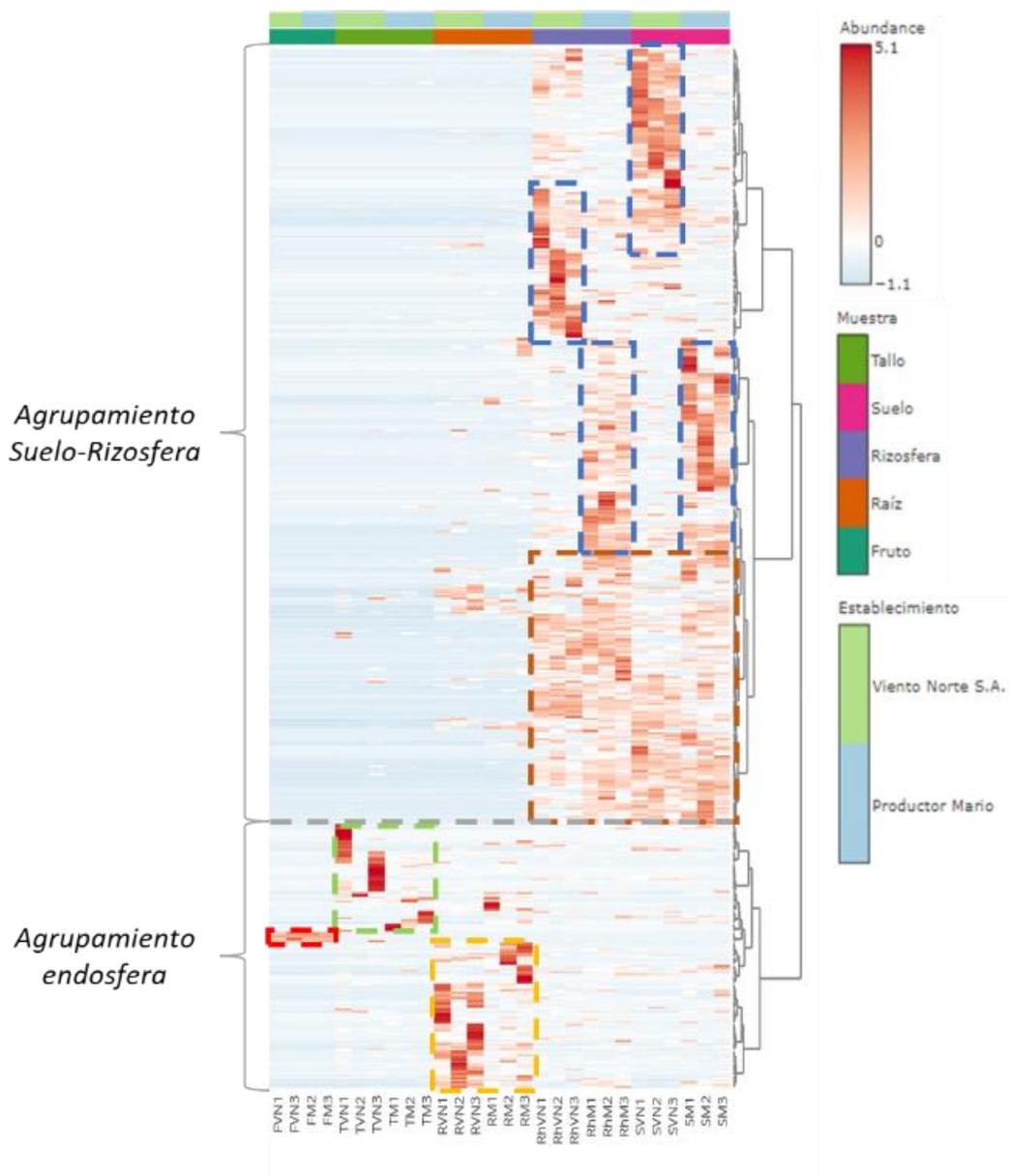


Figura 2.3.3g. Mapa de calor que compara la abundancia relativa a nivel taxonómico de orden entre las diferentes muestras de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de ambos establecimientos.

Basados en la gama de colores rojos-rosas (que indican mayor abundancia relativa) y celestes-blancos (que indican menor abundancia relativa), a simple vista general de este mapa de calor (Figura 2.3.3g), se puede identificar dos grupos de muestras: suelo-rizosfera por un lado y las muestras de endosfera por otro.

- ❖ Dentro del agrupamiento de las muestras de suelo y rizosfera, se observa el recuadro marrón que destaca una gran cantidad de taxones compartidos entre las muestras en similares abundancias relativas altas. Esos mismos taxones, alguno que otro parece encontrarse abundante en endosfera de raíz, pero la gran mayoría no se encuentra en muestras de endosfera.

- ❖ Dentro del agrupamiento de suelo-rizosfera, también se destaca una zona donde pueden observarse las diferencias entre los establecimientos: en recuadro azul se destacan aquellos taxones que se

encuentran en mayor abundancia relativa en los suelos y rizosfera de cada establecimiento, evidenciando el efecto de este factor experimental.

❖ Por otro lado, las muestras de endosfera prácticamente sin similitudes respecto a suelo-rizosfera y muy pocas similitudes entre ellas: se observan taxones muy específicos en las distintas muestras, que no comparten la misma abundancia relativa con las otras muestras de endosfera (las muestras de raíz, tallo y fruto se pueden identificar según los taxones más abundantes por los recuadros punteados color amarillo, verde y rojo, respectivamente). La cantidad de taxones que caracterizan los distintos microhábitats de endosfera decrecen de raíz hacia tallo y fruto.

Los dendogramas construidos a diferentes niveles taxonómicos para las diferentes muestras de ambos establecimientos (Figura 2.3.3h) también permiten visualizar el efecto del factor experimental microhábitat y el establecimiento en la modulación de las comunidades bacterianas.

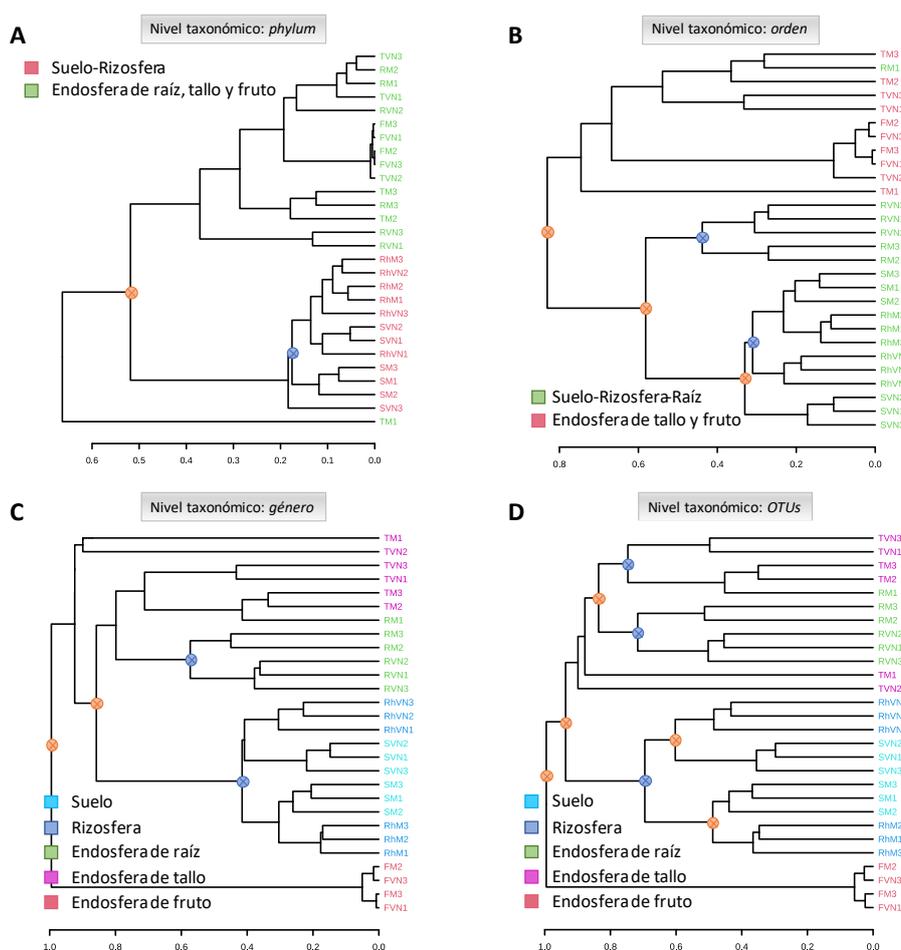


Figura 2.3.3h Dendogramas de las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de ambos establecimientos hortícolas en estudio (VN: Viento Norte; M: Productor Mario). En los dendogramas, los círculos naranjas indican separación por microhábitat y los círculos azules indican separación por establecimiento.

❖ En las distintas escalas de los diferentes dendogramas se puede ver que siempre la primera separación (la que denota mayores diferencias entre las llaves que se abren), e incluso algunas separaciones posteriores, responden a los diferentes microhábitats (en escala de 0,5–1).

❖ Además, el factor experimental establecimiento muestra tener impacto en las comunidades bacterianas (en escala de 0,2–0,6), principalmente en aquellas asociadas a los microhábitats subterráneos (suelo-rizosfera en primer lugar, y rizoendosfera en menor grado), y es casi imperceptible en microhábitats aéreos.

Teniendo en cuenta esto, se compararon a nivel de OTUs estos grupos de muestras (suelo-rizosfera y endosfera). Para los análisis comparativos y construcción de diagramas de Venn se consideró como OTU presente en un microhábitat aquel que se encontró en al menos 2 de las 3 réplicas (por ello es que el número de OTUs observados en cada muestra puede variar respecto al índice *Richness*).

La comparación de las comunidades de suelo-rizosfera se muestra en la [Figura 2.3.3i](#) y las de endosfera en la [Figura 2.3.3j](#). En los diagramas de Venn se indica el número de OTUs y el porcentaje de secuencias que estos representan respecto al total. En los diagramas de dispersión se detallan los OTUs compartidos, discriminando entre aquellos que se encuentran en abundancias relativas similares entre los establecimientos y aquellos con mayor abundancia en uno u otro establecimiento (Test de Student, $p < 0,10$).

A partir de los resultados de la comparación entre las comunidades bacterianas de suelo-rizosfera de ambos establecimientos ([Figura 2.3.3i](#)) podemos realizar las siguientes observaciones:

❖ Si bien los OTUs compartidos entre los suelos de ambos establecimientos ([Figura 2.3.3i, A](#)) representan una mayor cantidad respecto a los OTUs específicos de este microhábitat en cada uno de los sitios, el porcentaje de secuencias que representan tanto los OTUs compartidos como los específicos se reparte casi equitativamente. Esto indica que los OTUs específicos presentes en los suelos de cada establecimiento se encuentran en una alta abundancia relativa al igual que los OTUs compartidos. Incluso, dentro de los OTUs compartidos, ~30% presentan diferencias significativas entre los establecimientos ($p < 0,10$) respecto a su abundancia relativa ([Figura 2.3.3i, B](#)). Lo mencionado previamente ahonda en las diferencias observadas entre los suelos de ambos establecimientos en el análisis de beta-diversidad.

❖ Contrariamente a lo observado en suelo, en rizosfera ocurre que los OTUs compartidos entre ambos establecimientos están representados por un porcentaje mucho mayor de las secuencias totales ([Figura 2.3.3i, C](#)), lo cual significa que, si bien existe una cantidad importante de OTUs específicos en cada uno de los establecimientos, estos se encuentran en baja abundancia. Dentro de los OTUs compartidos cabe destacar que solo ~20% presentan diferencias en la abundancia relativa entre los establecimientos ($p < 0,10$) ([Figura 2.3.3i, D](#)).

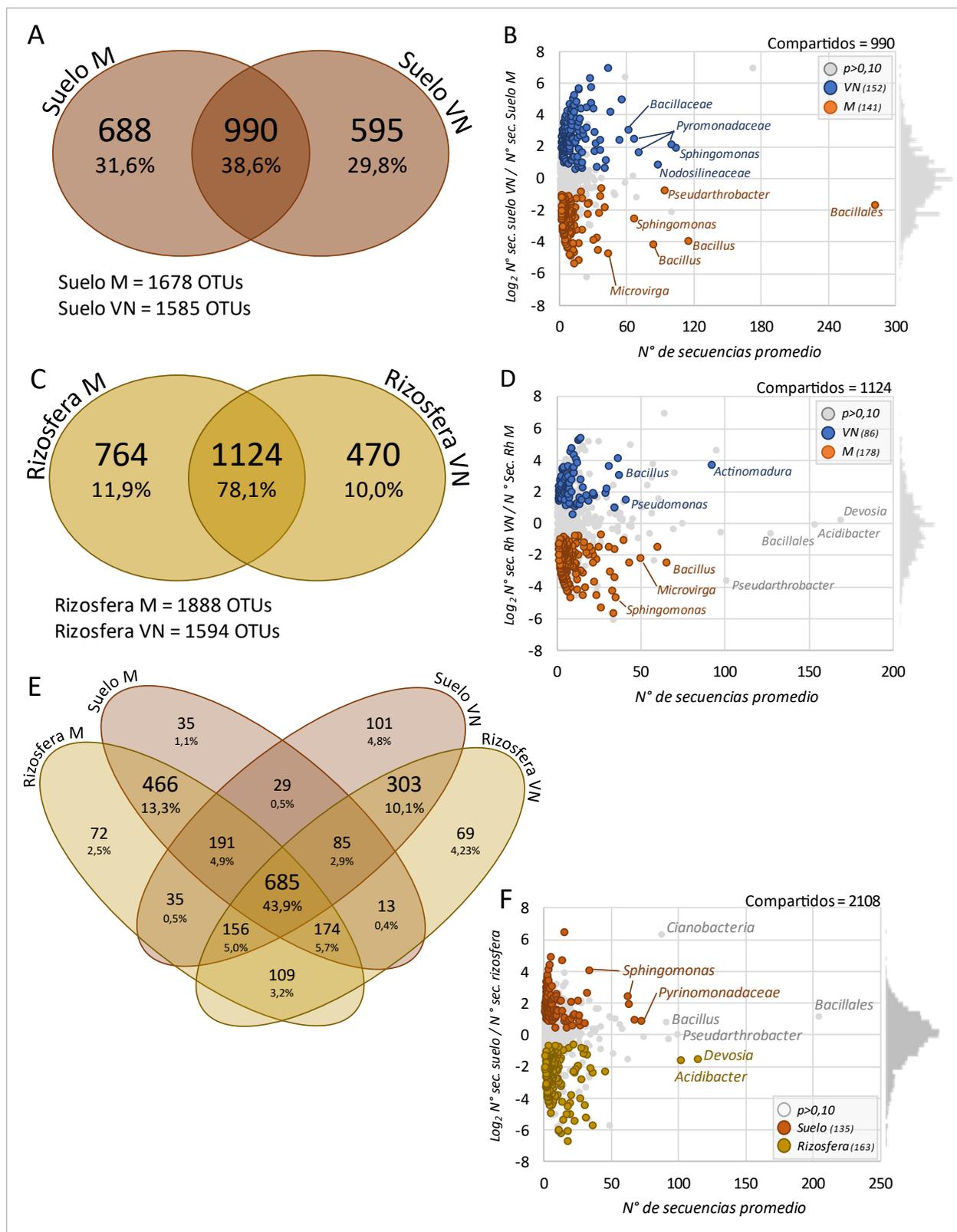


Figura 2.3.3i Comparación a nivel de OTUs entre muestras de suelo (A y B) y rizosfera (C y D) de ambos establecimientos en estudio (VN; M) por separado y en conjunto (E y F). En los diagramas de Venn se indica el número de OTUs y el porcentaje de secuencias que estos representan respecto al total. En los diagramas de dispersión se detallan diferencias en la abundancia relativa de los OTUs compartidos (Test de Student, $p < 0,10$).

❖ Lo expuesto en los dos puntos anteriores permite estimar que las diferencias entre las rizosferas de los establecimientos (visualizadas en el análisis de beta-diversidad) no se presentan en la misma magnitud que las reportadas para los suelos. Posiblemente el factor experimental establecimiento causó un mayor impacto en el microhábitat suelo en comparación al de rizosfera; o bien podría ser el efecto rizosférico del vegetal (las plantas de tomate) el que modere las diferencias entre las comunidades bacterianas de rizosfera de los establecimientos.

❖ La comparación de las 4 muestras en conjunto (Figura 2.3.3i, E) muestra que los OTUs compartidos entre el suelo y la rizosfera de ambos establecimientos representan un bajo porcentaje del total de OTUs (~27%); aun así, esos OTUs muestran ser importantes en cuanto a la abundancia relativa ya que ocupan >40% del total de secuencias.

❖ Los OTUs específicos de muestras de rizosfera representan una fracción pequeña respecto al total, siendo la gran mayoría coincidentes con los OTUs observados en suelo. En suelo, se observa el mismo comportamiento con los OTUs específicos de suelo respecto al total. Esto indica la semejanza en la composición taxonómica de estos dos microhábitats observada previamente.

❖ Por otro lado, los OTUs específicos de cada establecimiento representan una fracción más importante (573 OTUs específicos del Productor Mario y 473 OTUs específicos del establecimiento Viento Norte). Esto sostiene las diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera de ambos establecimientos visualizadas en los análisis de beta-diversidad y el mapa de calor (efecto establecimiento).

❖ Respecto a los OTUs compartidos (Figura 2.3.3i, F), la gran mayoría (>85%) se encuentran en similares abundancias relativas tanto en el suelo como en la rizosfera ($p > 0,10$). De estos OTUs, los de mayor abundancia relativa pertenecen a géneros bacterianos previamente descritos en esta sección como los principales géneros de estos microhábitats en la Tabla 2.3.3d: *Bacillus* (con mayor presencia en el establecimiento del Productor Mario), *Sphingomonas*, *Devosia*, *Acidibacter*, y *Pseudarthrobacter*.

Respecto a la comparación de las muestras de endosfera (en este análisis se dejaron de lado las muestras de fruto ya que contenían pocos OTUs y en su mayoría asignados al género *Klebsiella* y *Castellaniella*), en la Figura 2.3.3j se muestran los diagramas de Venn y las gráficas MA.

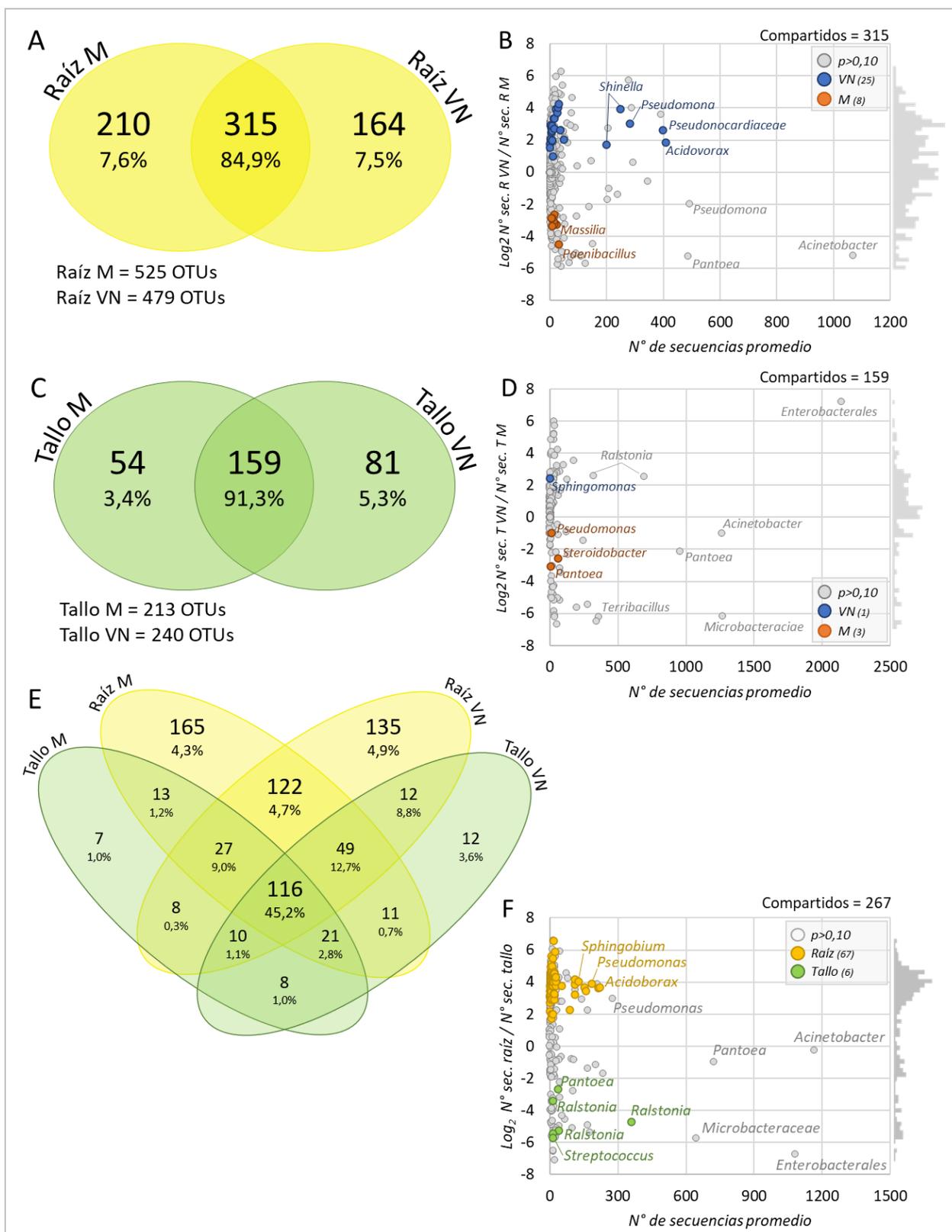


Figura 2.3.3j Comparación a nivel de OTUs entre muestras de endosfera de raíz (A y B) y endosfera de tallo (C y D) de ambos establecimientos en estudio (VN; M) por separado y en conjunto (E y F). En los diagramas de Venn se indica el número de OTUs y el porcentaje de secuencias que estos representan respecto al total. En los diagramas de dispersión se detallan diferencias en la abundancia relativa de los OTUs compartidos (Test de Student, $p < 0,10$).

Estos resultados nos permiten realizar las siguientes apreciaciones:

- ❖ Contrariamente a lo observado en los suelos de ambos establecimientos, los OTUs específicos presentes en endosfera de raíz y tallo de cada establecimiento se encuentran en una muy baja abundancia relativa, siendo los OTUs compartidos los que ocupan >85% de las secuencias en ambos microhábitats (Figura 2.3.3j, A y C). Incluso, en ambos compartimentos los OTUs compartidos se encuentran mayormente sin diferencias en sus abundancias relativas en cada uno de los establecimientos ($p < 0,10$) (Figura 2.3.3j, B y D). Esto respalda los resultados obtenidos en el análisis de beta-diversidad que indicaron una alta similitud entre las comunidades bacterianas de endosfera de raíz y tallo de ambos establecimientos.
- ❖ Los OTUs específicos en endosfera de tallo representan una fracción mínima del total; mientras que los OTUs específicos de raíz son una fracción mucho mayor respecto al total (Figura 2.3.3j, E). Si bien esto se debe principalmente a una mayor cantidad de OTUs en muestras de raíz respecto a las de tallo, se destaca que la gran mayoría de los OTUs que se encuentran en endosfera de tallo (>90%) también se encuentran en raíces de tomate.
- ❖ Respecto a los OTUs compartidos entre las 4 muestras (Figura 2.3.3j, F), el 25% se encontró con mayor abundancia relativa en endosfera de raíz, siendo los más abundantes clasificados dentro de los géneros *Acidovorax*, *Sphingobium* y *Pseudomonas*. Solo 6 OTUs compartidos se encontraron en mayor abundancia relativa en endosfera de tallo, en su mayoría pertenecientes al género *Ralstonia* (el cual alberga especies patógenas de plantas de tomate) y *Pantoea*. El resto de los OTUs compartidos se encuentran en similares abundancias relativas ($p > 0,10$) en ambos microhábitats endosféricos.
- ❖ Estos OTUs con mayor abundancia relativa en el interior de raíces y tallos de tomate pertenecen a géneros bacterianos previamente descritos en esta sección como los principales géneros de estos microhábitats en la Tabla 2.3.3d: *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Sphingobium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, y del orden *Enterobacterales*.

Haciendo foco en los taxones específicos de cada establecimiento en cada uno de los microhábitats (Tabla 2.3.3f) puede apreciarse que en general se encuentran en muy bajas abundancias relativas, siendo muy pocos los que superan el 1% de las secuencias totales de cada muestra. El número de taxones específicos en cada establecimiento es mayor en muestras de suelo-rizosfera, donde el efecto del establecimiento sobre las comunidades bacterianas fue más notorio, ocurriendo lo contrario en los microhábitats de endosfera. No obstante, como se mencionó previamente, las diferencias entre los establecimientos son determinadas no solo en base a los taxones que se encuentran específicamente en cada sitio sino también por los diferenciales en la abundancia relativa de los taxones compartidos (Figura 2.3.3i y Figura 2.3.3j).

Tabla 2.4.2f Número, porcentaje de secuencias respecto al total y asignación taxonómica de los taxones específicos de cada establecimiento en cada uno de los microhábitats

Microhábitat (riqueza de géneros)	Viento Norte			Productor Mario		
	N°	% de sec.	Taxones más abundantes	N°	% de sec.	Taxones más abundantes
Suelo (474)	106	7,32%	<i>Nodosilinea</i> - 1,3% <i>Amphiplicatus</i> - 0,5%	90	5,88%	<i>Sphingobacterales</i> - 1,25% <i>Chryseobacterium</i> - 0,50%
Rizosfera (458)	71	5,10%	<i>Acinetobacter</i> - 1,3% <i>Amphiplicatus</i> - 0,3% <i>Domibacillus</i> - 0,3%	80	3,38%	<i>Skermanella</i> - 0,2% <i>Ferruginibacter</i> - 0,1%
Endosfera de raíz (229)	38	1,57%	<i>Saccharimonadales</i> - 0,3% <i>Flaviumibacter</i> - 0,1% <i>Paenarthrobacter</i> - 0,1%	53	2,18%	<i>Virgibacillus</i> - 0,2% <i>Fic-tibacillus</i> - 0,1% <i>Am-moniphilus</i> - 0,1%
Endosfera de tallo (121)	27	3,51%	<i>Neisseria</i> - 0,6% <i>Burkholderiales</i> - 0,4% <i>Gemella</i> - 0,4%	18	0,32%	<i>Oligoflexia</i> - 0,07% <i>Sphingobacterium</i> - 0,04% <i>Pseudonocardia</i> - 0,02%
Endosfera de fruto (7)	0	-	-	1	0,01%	<i>Bosea</i>

2.3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A CIERTAS FUNCIONES DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

2.3.4.1 Cuantificación absoluta y relativa de genes *nifH*, *phoD* y *acdS* mediante q-PCR

Se logró amplificar satisfactoriamente los genes *nifH*, *phoD* y *acdS* con los primers detallados, tanto a partir del patrón sintético como de las extracciones de ADN bacteriano metagenómico de las distintas muestras ambientales en estudio. La cuantificación de todas las muestras fue posible únicamente para el gen *phoD*, ya que tanto con el gen *nifH* como con el *acdS* hubo problemas de inespecificidad en la qPCR con los primers utilizados (ver las curvas de melting para cada qPCR en las Figura 5.4.1c y Figura 5.4.3c del ANEXO A, respectivamente), por lo que solo fue posible cuantificar el N° copias g⁻¹ de peso seco en muestras de suelo y rizosfera para estos dos genes.

Los resultados de la construcción de la curva estándar para los genes *nifH*, *phoD* y *acdS*, así como el ajuste de cada uno de los modelos matemáticos y su evaluación estadística se detallan en el apartado qPCR de genes funcionales, en el ANEXO A. Los 3 modelos de regresión lineal ajustaron muy significativamente ($p < 0,01$) a los datos, con un coeficiente de determinación de entre 0,993 y 0,998; cumpliendo con los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los residuos.

Los resultados de la cuantificación se muestran en la Figura 2.3.4a. Los resultados y el análisis estadístico detallado para cada uno de los genes de encuentran en el apartado qPCR de genes funcionales, en el ANEXO A.

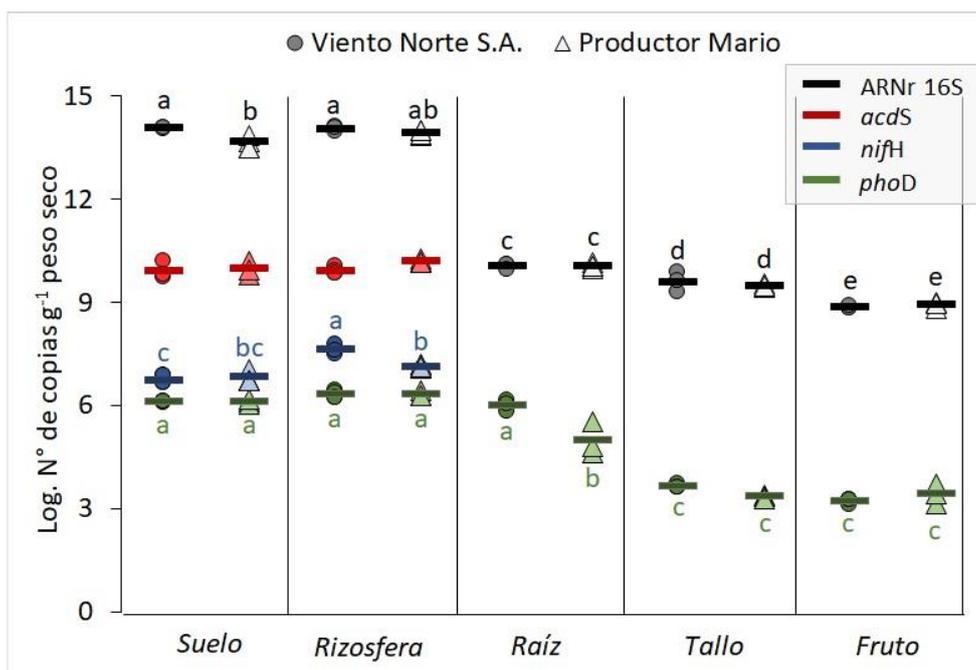


Figura 2.3.4a Cantidades absolutas (círculos y triángulos) y promedio (línea horizontal) del N° copias g⁻¹ de peso seco de los genes ARNr16S, *nifH*, *phoD* y *acdS* para las diferentes muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de dos establecimientos (Viento Norte y Productor Mario) del CHP. Para un mismo gen, letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores medios (test de Tukey, α=0,05).

La comparación de las cuantificaciones absolutas del N° de copias g⁻¹ de peso seco de los diferentes genes para cada una de las muestras nos permite realizar el siguiente análisis:

- ❖ Los genes funcionales relacionados con la mineralización del fósforo orgánico (*phoD*) siguen similar patrón de abundancia que el gen ARNr 16S en las distintas muestras: mayor número de copias halladas en muestras del entorno radical (suelo, rizosfera y endosfera de raíz) y una disminución gradual pero significativa hacia la endosfera de tejidos aéreos.

- ❖ Esto no pudo comprobarse con los genes relacionados con la fijación biológica del nitrógeno (*nifH*) y la actividad ACC-deaminasa (*acdS*), ya que la amplificación de la qPCR para las muestras de ADN bacteriano obtenidas a partir de tejido vegetal no fue específica y los resultados hallados no fueron confiables. Sin embargo, los valores absolutos del gen *nifH* y *acdS* en suelo y rizosfera fueron similares para ambos establecimientos, con un mayor recuento del gen *acdS*.

Si relativizamos el número de copias de los genes funcionales al número de copias del gen ARNr 16S (Tabla 2.3.4a), para de alguna forma establecer una relación de abundancia entre las comunidades bacterianas que llevan a cabo estas funciones respecto a las comunidades bacterianas totales halladas en cada una de las

muestras podemos destacar los siguientes puntos (los correspondientes análisis estadísticos se detallan en el apartado [qPCR de genes funcionales](#), en el [ANEXO A](#)):

Tabla 2.3.4a Abundancia relativa de los genes *nifH*, *phoD* y *acdS* respecto al número de copias del gen ARNr 16S en muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto tomadas de cultivos de tomate de dos establecimientos hortícolas del cinturón hortícola de La Plata. los resultados de la tabla están expresados en N° de copias por cada millón de copias del gen ARNr 16S. Para un mismo gen, letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Gen	Establecimiento	Muestra (x -10 ⁶)				
		Suelo	Rizosfera	Raíz	Tallo	Fruto
Gen <i>nifH</i>	Viento Norte	0,05 ± 0,01 ^b	0,4 ± 0,1 ^a			
	Productor Mario	0,16 ± 0,08 ^a	0,17 ± 0,03 ^a			
Gen <i>acdS</i>	Viento Norte	72,7 ± 4,0 ^b	75,5 ± 3,2 ^b			
	Productor Mario	211 ± 10,1 ^a	190 ± 14,0 ^a			
Gen <i>phoD</i>	Viento Norte	~0,008 ^e	~0,01 ^e	74,4 ± 1,7 ^a	1,3 ± 0,8 ^{cd}	2,3 ± 0,4 ^{bcd}
	Productor Mario	~0,02 ^e	~0,02 ^e	11,1 ± 1,2 ^b	0,74 ± 0,2 ^d	3,5 ± 1,6 ^{bc}

❖ Las abundancias relativas halladas fueron dispares entre las distintas muestras y los distintos genes, variando entre 0,010 y 210 copias de genes funcionales por cada millón de copias del gen ARNr 16S (Tabla 2.3.4a).

❖ De los 3 genes funcionales estudiados, el gen *acdS* fue el que se encontró en mayor abundancia relativa (solo comparable en suelo y rizosfera) en ambos establecimientos evaluados.

❖ En suelo y rizosfera, el gen *nifH* fue el segundo con mayor abundancia relativa, con valores similares para suelo y rizosfera de ambos establecimientos, con la menor abundancia relativa en el suelo de Viento Norte S.A.

❖ Si bien el gen *phoD* presentó los menores valores de abundancia relativa en suelo y rizosfera, se detecta un significativo enriquecimiento de este gen en muestras de endosfera de raíz, tallo y fruto de tomate, comportamiento observado en los dos establecimientos evaluados.

❖ La comparativa entre ambos establecimientos permite evidenciar (i) una abundancia relativa de *acdS* hasta 3 veces mayor y significativa en las muestras de suelo y rizosfera del Productor Mario respecto a las de Viento Norte S.A.; y (ii) una mayor abundancia relativa del gen *nifH* en el suelo del Productor Mario respecto a Viento Norte S.A.

2.3.4.2 Diversidad de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo asociadas al cultivo de tomate

A partir de las extracciones de ADN bacteriano metagenómico de las distintas muestras ambientales, se logró amplificar satisfactoriamente los genes *nifH* y *phoD* con los primers detallados para el estudio por DGGE. En el ANEXO A pueden observarse las fotografías de los geles de DGGE de *nifH* (Figura 5.5.2a) y *phoD* (Figura 5.5.3a). En la puesta a punto de la metodología se determinó que los perfiles de grupos genéticos de los genes funcionales determinados en las muestras agrupadas de suelo-rizosfera resultaron muy diferentes a los observados en las muestras de endosfera (raíz, tallo y fruto). Por esta razón, si bien no se evalúa detalladamente las diferencias entre estos dos grupos de muestra, se puede afirmar que ambos grupos resultaron muy distintos en cuanto a las comunidades portadoras de ambos genes (Figura 5.5.1a, en el ANEXO A)

- Comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno

Tanto para las muestras de suelo-rizosfera (N=12), como las de endosfera (N=18), se logró obtener dos geles con una correcta apertura de los patrones de bandas, así como una buena cantidad y definición de diferentes bandas que evidencian la presencia de distintos productos de PCR amplificados a partir de los primers PolF1 y PolR-GC (Figura 5.1.3c).

Mediante la digitalización de ambos geles y el posterior análisis bioinformático, se pudieron calcular para las distintas muestras los índices de alfa-diversidad de Riqueza, Shannon-Wiener e Inversa de Simpson (Tabla 2.3.4b), los cuales se analizaron estadísticamente para detectar posibles diferencias debido al tipo de muestra y el establecimiento del cual provienen (apartado DGGE del gen *nifH*, en el ANEXO A).

Tabla 2.3.4b Índice de diversidad del gen *nifH* calculados a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE para las distintas muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del CHP. Los valores se corresponden al promedio \pm SD de tres réplicas.

INDICE DE DIVERSIDAD	ESTABLECIMIENTO	MUESTRAS				
		SUELO	RIZOSFERA	RAIZ	TALLO	FRUTO
Riqueza (S)	Viento Norte	10,3 \pm 1,1	11,7 \pm 0,6	7,7 \pm 0,6	11,0 \pm 1,0	11,0 \pm 2,0
	Productor Mario	8,3 \pm 0,6	10,7 \pm 1,5	11,7 \pm 2,9	11,7 \pm 1,5	10,3 \pm 0,6
Shannon-Wiener (H)	Viento Norte	1,6 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3	0,94 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,4
	Productor Mario	1,8 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1	1,6 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1
Simpson (1/D)	Viento Norte	4,0 \pm 1,2	4,5 \pm 1,0	2,1 \pm 0,4	3,0 \pm 0,3	3,1 \pm 1,7
	Productor Mario	5,1 \pm 1,1	6,4 \pm 0,8	4,5 \pm 1,7	3,1 \pm 0,7	3,8 \pm 0,8

❖ Los índices de alfa-diversidad evidencian una riqueza de grupos genéticos del gen *nifH* similar entre las diferentes muestras (entre 7 y 11 grupos genéticos), cuya presencia se da de forma más equitativa en las muestras de suelo y rizosfera respecto a las de endosfera (representada por los mayores valores del índice de Shannon-Wiener e inversa de Simpson), indicando la concentración de ciertos grupos genéticos

del gen *nifH* en los compartimentos internos (los análisis estadísticos se detallan en el apartado **DGGE del gen *nifH***, en el **ANEXO A**).

Mediante el análisis de la matriz de distancias por Bray-Curtis obtenida a partir de la digitalización del gel de DGGE se pudo obtener la representación gráfica a través de un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) (**Figura 2.3.4b**).

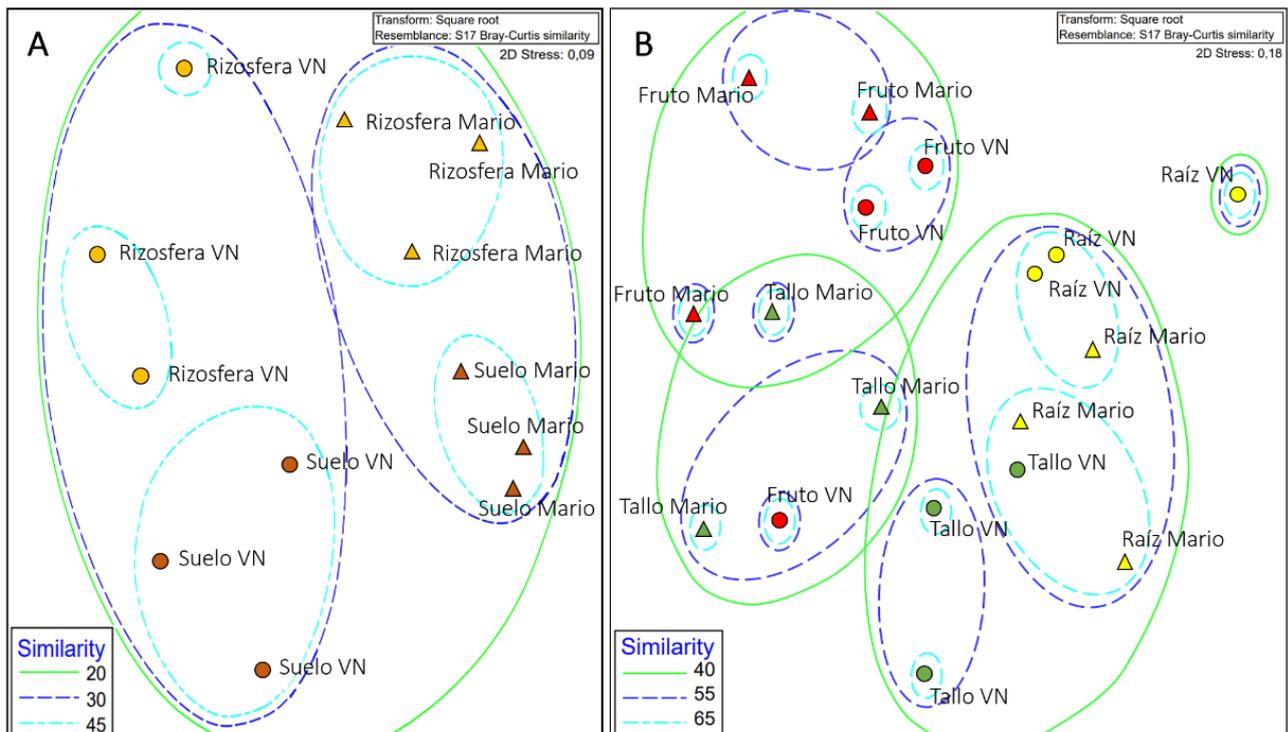


Figura 2.3.4b Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) del análisis por DGGE del gen *nifH* para las muestras de (A) suelo y rizosfera, y (B) endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de dos establecimientos (VN: Viento Norte y Mario: Productor Mario) del cinturón hortícola de La Plata. Se utilizó la matriz de índices de similitud de Bray-Curtis, $\alpha=0,05$ y estrés $<0,1$.

El análisis del NMDS (**Figura 2.3.4b**) permite realizar ciertas apreciaciones:

- ❖ Si bien las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera portadoras del gen *nifH* (**Figura 2.3.4b**, Gráfica A) tienen un cierto porcentaje de similitud (20%) que permite agrupar a las 12 muestras juntas, se visualizan dos grupos definidos con un mayor porcentaje de similitud (30%) que se encuentran diferenciados según el establecimiento del cual proviene la muestra, indicando el efecto del sitio en dichas comunidades. También puede identificarse en un tercer nivel de similitud (45%) el agrupamiento por muestras, diferenciándose las comunidades de suelo respecto a las de rizosfera, situación que ocurre en ambos establecimientos.

❖ Por el contrario, el sitio parece no ejercer un efecto claro en las comunidades bacterianas endófitas portadoras del gen *nifH* (Figura 2.3.4b, Gráfica B), ya que se observan altos porcentajes de similitud (40-65%) en las diferentes muestras de ambos sitios.

❖ Una particularidad observada en las muestras de endosfera es la agrupación de las muestras raíz-tallo y tallo-fruto, que posiblemente evidencian mediante la similitud en sus comunidades la conexión cercana entre cada par de órganos (no así raíz-fruto).

- Comunidades bacterianas mineralizadoras de fósforo orgánico

Al igual que lo mencionado para el gen *nifH*, tanto para las muestras de suelo-rizosfera (N=12), como las de endosfera (N=18), se logró obtener dos geles con una correcta apertura de los patrones de bandas, así como una buena cantidad y definición de diferentes bandas que evidencian la presencia de distintos productos de PCR amplificados a partir de los primers ALPS-F730 y ALPS-R1101-GC (Figura 5.5.3a).

Mediante la digitalización de ambos geles y el posterior análisis bioinformático, se pudieron calcular para las distintas muestras los índices de alfa-diversidad de Riqueza, Shannon-Wiener e Inversa de Simpson (Tabla 2.3.4c), los cuales se analizaron estadísticamente para detectar posibles diferencias debido al tipo de muestra y el establecimiento del cual provienen (apartado DGGE del gen *phoD*, en el ANEXO A).

Tabla 2.3.4c Índice de diversidad del gen *phoD* calculados a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE para las distintas muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del CHP. Los valores se corresponden al promedio \pm SD de tres réplicas.

INDICE DE DIVERSIDAD	ESTABLECIMIENTO	MUESTRAS				
		SUELO	RIZOSFERA	RAIZ	TALLO	FRUTO
Riqueza (S)	Viento Norte	10,0 \pm 1,7	15,3 \pm 2,1	19,7 \pm 3,2	13,0 \pm 2,6	13,7 \pm 2,1
	Productor Mario	5,0 \pm 1,0	11,0 \pm 1,0	16,0 \pm 1,7	16,3 \pm 4,0	11,0 \pm 1,0
Shannon-Wiener (H)	Viento Norte	1,9 \pm 0,07	2,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,3	0,8 \pm 0,07
	Productor Mario	1,3 \pm 0,3	1,7 \pm 0,2	2,5 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1
Simpson (1/D)	Viento Norte	5,8 \pm 0,2	5,8 \pm 1,4	6,1 \pm 0,8	2,8 \pm 0,4	2,2 \pm 0,2
	Productor Mario	3,0 \pm 0,7	3,9 \pm 0,4	6,6 \pm 0,7	2,6 \pm 0,2	2,2 \pm 0,5

❖ Los índices de alfa-diversidad evidencian una mayor riqueza de grupos genéticos del gen *phoD* en endosfera de ambos establecimientos (similar entre las diferentes muestras, entre 11 y 19 grupos genéticos), difiriendo de la riqueza observada en las muestras de suelo que fue sensiblemente menor en ambos establecimientos.

❖ En las muestras del entorno radical (suelo-rizosfera-rizoendosfera) se observó una mayor equitatividad en la abundancia de los grupos genéticos observados, en comparación con las muestras de endosfera, donde la equitatividad de los grupos fue menor (representada por los menores valores del índice de Shannon-Wiener e inversa de Simpson), indicando la concentración de ciertos grupos genéticos en los compartimentos internos (resultados similares a los observados con el gen *nifH*).

El análisis de la matriz de distancias (Bray-Curtis) obtenida a partir del gel de DGGE que deriva en la representación gráfica a través de un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) (Figura 2.3.4c) permite realizar las siguientes observaciones:

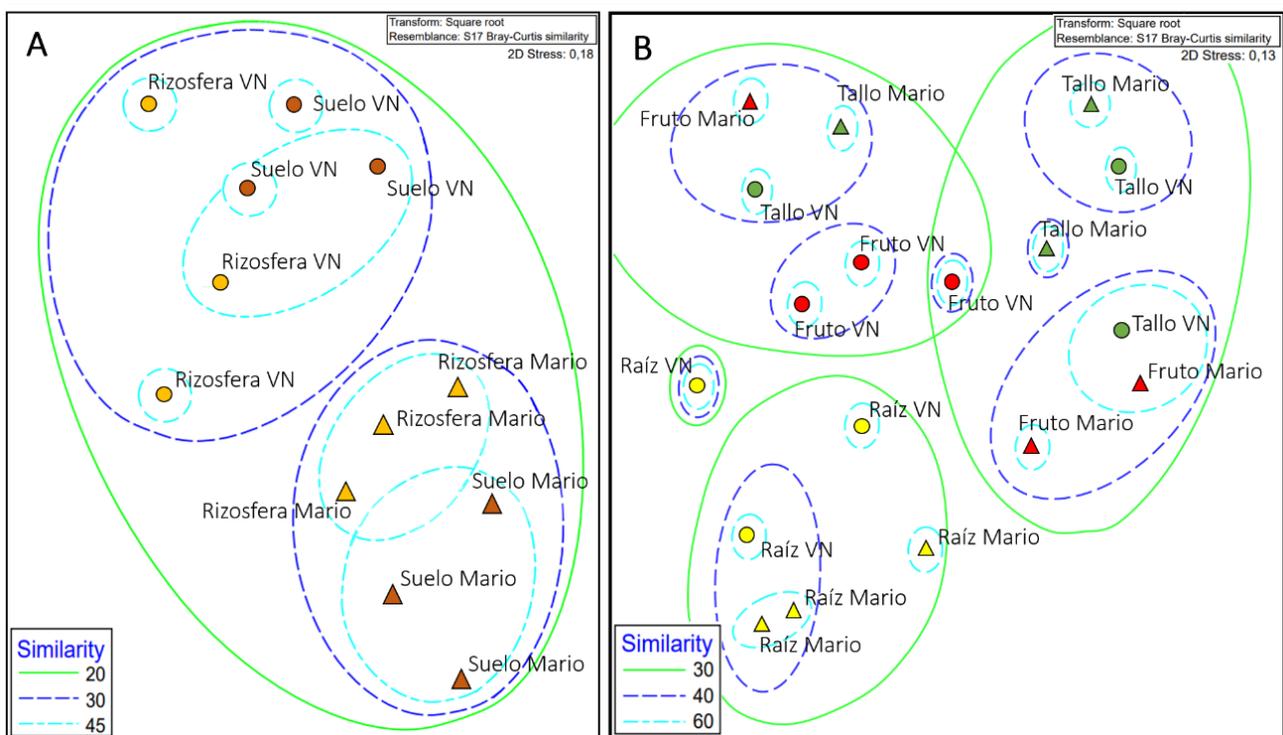


Figura 2.3.4c Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) del análisis por DGGE del gen *phoD* para las muestras de (A) suelo y rizosfera, y (B) endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de dos establecimientos (VN: Viento Norte y Mario: Productor Mario) del CHP. Se utilizó la matriz de índices de similitud de Bray-Curtis, $\alpha=0,05$ y estrés $<0,1$.

❖ En lo que respecta a las muestras de suelo y rizosfera se observa un comportamiento similar a lo reportado previamente para el gen *nifH*: la totalidad de las muestras se agrupan con un 20% de similitud en sus comunidades bacterianas portadoras del gen *phoD*. No obstante, se visualizan dos grupos definidos con un mayor porcentaje de similitud (30%) que se encuentran diferenciados según el establecimiento del cual proviene la muestra, indicando el efecto del sitio en dichas comunidades. Al igual que lo descrito para las comunidades portadoras del gen *nifH*, también puede identificarse en un tercer nivel de similitud (45%) el agrupamiento por muestras, diferenciándose las comunidades de suelo respecto a las de rizosfera, situación que ocurre en ambos establecimientos (Figura 2.3.4c, Gráfica A).

❖ En las comunidades bacterianas endófitas portadoras del gen *phoD* (Figura 2.3.4c, Gráfica B) se detecta un mayor grado de similitud. El principal factor que explica las diferencias entre las comunidades mineralizadoras de fósforo orgánico es el tipo de muestra, ya que se observa por un lado las muestras de raíz que se agrupan de forma independiente respecto a la de tallo y fruto, las cuales presentan un mayor grado de similitud (40-60%). No hay evidencia de que el sitio tenga un efecto moderador sobre las comunidades bacterianas portadoras del gen *phoD* que habitan en la endosfera.

2.4 DISCUSIÓN GENERAL

Las plantas han co-evolucionado con una gran diversidad de microorganismos –principalmente bacterias–, los cuales conforman complejas comunidades asociadas a distintos microhábitats subterráneos y aéreos, cuya estructura y composición pueden modificarse por diversos factores bióticos y abióticos. Esta microbiota asociada lleva a cabo funciones claves que impactan en el crecimiento, el desarrollo y la salud vegetal, servicios ecosistémicos que pueden ser aprovechados para mejorar el rendimiento de especies vegetales cultivadas en agroecosistemas. Profundizar en el conocimiento de estas comunidades microbianas, no solo sumará al conocimiento ecológico sobre las interacciones planta-bacteria, sino que también sentará las bases sobre las cuales se podrán tomar decisiones agronómicas respecto al mejor uso de la microbiota. En este sentido, en el presente capítulo se describieron los ensayos que permitieron caracterizar la microbiota bacteriana asociada a suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate *Elpida* provenientes de cultivos comerciales de dos establecimientos del CHP, con la hipótesis de que sus características diferenciales (establecimiento **VN**, un suelo con una larga trayectoria de manejo hortícola intensivo, mayormente monocultivo de tomate; comparado con el establecimiento **M**, el “mismo suelo” en su primer ciclo productivo con un cultivo de tomate) podrían ejercer un efecto sobre las características de estas comunidades bacterianas.

El análisis de los resultados de este trabajo mostró al microhábitat como el principal factor experimental que determina las diferencias en abundancia, estructura, composición y funcionalidad de las comunidades bacterianas, restringiendo el efecto del establecimiento a cambios en los perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas de microhábitats subterráneos, con magnitud decreciente desde el suelo hacia la rizoendosfera.

⊕ El suelo y la rizosfera se caracterizaron por una mayor abundancia poblacional bacteriana (10^{13} – 10^{14} copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso seco), en comparación con las muestras de endosfera (10^8 – 10^{10} copias del gen ARNr 16S g^{-1} de peso seco) de plantas de tomate, independientemente del establecimiento en el cual se cultivaron las plantas (Tabla 2.3.3a). Si bien no se encontraron reportes que utilicen esta técnica para cuantificar las comunidades bacterianas asociadas a plantas de tomate, existe información de otras especies vegetales (trigo, arroz, frutilla, garbanzo, pasturas de gramíneas, entre otros) que evidencia el mismo comportamiento descrito anteriormente: suelos y rizosferas con mayores densidades poblacionales –que varían entre 10^{10} y $\sim 10^{13}$ copias del gen ARNr 16S g^{-1} –, y endosferas y filosferas de diferentes órganos vegetales (raíces, hojas, flores, frutos) con menores densidades poblacionales, entre 10^6 – 10^8 copias del gen ARNr 16S g^{-1} (Acuña et al., 2016; Azarbad et al., 2022; Chen et al. 2022; Olimi et al., 2022; Rilling et al., 2018; Sharma et al., 2020; Zhang et al., 2016).

⊕ Las comunidades bacterianas del suelo y la rizosfera mostraron ser más ricas y diversas (*Richness* = 1566–1835 OTUs; Shannon-Wiener = 6,4–6,7) que las de endosfera de plantas de tomate (*Richness* = 28–597; Shannon-Wiener = 1,5–4,4), independientemente del establecimiento; las únicas diferencias observadas entre los establecimientos fueron en rizosfera (Tabla

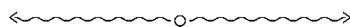
2.3.3e). Estas particularidades descriptas entre suelo-rizosfera y endosfera, han sido reportadas por numerosos trabajos en gran variedad de especies vegetales, incluso también en plantas de tomate de diferentes variedades y cultivadas en diversos entornos (Figura 2.1.2b). Por ejemplo, Lee et al. (2019) observaron como disminuyó la riqueza y diversidad de taxones desde el suelo-rizosfera (Chao-1 ~1640; Shannon-Wiener ~6,04) hacia la endosfera de raíces en plantas de tomate (Chao-1 ~222; Shannon-Wiener ~3,38) en 23 sitios de estudio. En esta misma línea, Dong et al., (2019) establecieron que la riqueza de taxones y la diversidad estimada por el índice de Shannon-Wiener, siguieron el patrón decreciente suelo>rizosfera>endosfera (Richness = 1231; 601; 23– 87; y Shannon-Wiener = 6,1; 3,2; 0,5–1,7 para suelo, rizosfera y endosfera, respectivamente) luego de investigar las comunidades bacterianas de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo, hoja y fruto de plantas de tomate cultivadas bajo cubierta. De esta manera, los resultados de este trabajo se suman a los reportes existentes que generalizan que las poblaciones bacterianas de suelo y rizosfera son más abundantes y tienen mayor riqueza y diversidad en comparación con las poblaciones de microhábitats vegetales de endosfera, pudiendo estas últimas seguir una tendencia decreciente conforme el microhábitat se aleja del suelo.

⊕ Respecto a los resultados sobre las comunidades funcionales, la abundancia de genes *nifH*, *phoD* y *acdS* en suelo y rizosfera de ambos establecimientos (10^6 - 10^7 copias *nifH* g⁻¹, ~ 10^6 copias *phoD* g⁻¹ y ~ 10^{10} copias *acdS* g⁻¹; Figura 2.3.4a) fue similar a lo reportado por otros investigadores (Bouffaud et al., 2016; Bouffaud et al., 2018; Huhe et al. 2014; Rilling et al., 2018; Sneha et al. 2021; Lang et al., 2022; Chen et al., 2019). El gen *phoD* fue el único gen que pudo ser cuantificado en todas las muestras, mostrando –al igual que el gen ARNr 16S– una tendencia decreciente desde el suelo-rizosfera hacia endosfera de raíz, tallo y fruto, sin mostrar diferencias entre los establecimientos. Si bien no se encontraron reportes acerca de la cuantificación del gen *phoD* en muestras de endosfera, resultados semejantes en otros genes funcionales fueron detallados por Rilling et al., (2018) quienes describieron como disminuyó significativamente el número de copias del gen *nifH* desde la rizosfera hacia la endosfera de plantas de trigo.

⊕ Los análisis sobre riqueza y diversidad de grupos genéticos portadores de los genes *nifH* (Tabla 2.3.4b) y *phoD* (Tabla 2.3.4c) permitieron determinar que, la riqueza de estos grupos genéticos no mostraron mayores variaciones entre los diferentes microhábitats de ambos establecimientos, pero se destaca la mayor equitatividad en los microhábitats del entorno radical respecto al enriquecimiento de ciertos grupos genéticos en los microhábitats endosféricos, determinados por un menor índice de diversidad de Shannon-Wiener.

El hecho de que las propiedades emergentes de las comunidades bacterianas del suelo no se hayan visto modificadas por tantos años acumulados de prácticas agrícolas convencionales e intensivas (caso del

Establecimiento VN), puede resultar *a priori*– desconcertante, dado los numerosos reportes que asocian a este tipo de prácticas con la pérdida de calidad de los suelos y la disminución de la diversidad de microorganismos (Bender et al., 2016; Fierer, 2017; Gupta et al, 2022). Consecuentemente, la caracterización físico-química de los suelos (Tabla 2.5.1a) evidencia resultados negativos en el establecimiento **VN** debido a la actividad hortícola (principalmente salinización/sodificación); no obstante, también se observaron modificaciones deseables en algunos parámetros: aumento de la materia orgánica, el nitrógeno total, los niveles de fósforo y cationes en general, los cuales se asociaron al empleo de enmiendas orgánicas como práctica arraigada en la región del CHP. Esto último es un dato no menor, ya que numerosos investigadores han correlacionado el uso de enmiendas orgánicas con aumentos de la biomasa, riqueza y diversidad bacteriana (Arif et al, 2020; Sankar et al., 2017; Treonis et al., 2010). La respuesta de las comunidades bacterianas a esta práctica se asocia a aumentos en la materia orgánica de los suelos, la cual no solo mejora las propiedades físicas y químicas del suelo (estructura, aireación, drenaje, retención de agua, CIC, fluctuaciones de pH) sino que también proporciona recursos nutricionales que estimulan la actividad metabólica de los microorganismos (de Graaff et al., 2019). En este sentido, las técnicas de manejo que mejoren la entrada y el aumento de la materia orgánica del suelo pueden funcionar para retener o promover la biodiversidad bacteriana del suelo, amortiguando la pérdida de diversidad ocasionada por el impacto negativo de ciertas prácticas agrícolas convencionales intensivas. Este efecto combinado de ambos tipos de prácticas agrícolas llevadas a cabo en el establecimiento **VN** durante tantos años puede ser el responsable de mantener similares niveles de biomasa, riqueza y diversidad bacteriana en suelo-rizosfera respecto al establecimiento **M**.



⊕ El efecto del microhábitat también se evidenció en la composición taxonómica de las comunidades bacterianas asociadas a las diferentes muestras. Si bien Proteobacteria fue el phylum más abundante en todos los microhábitats, en suelo-rizosfera representó 28-37% de las secuencias, mientras que en endosfera representó entre 50-93% de las secuencias totales. En orden decreciente, los phylum Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria y Firmicutes completan los 5 phylum más abundantes en suelo-rizosfera (75-80% del total de secuencias); mientras que Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes completan casi la totalidad de las secuencias en endosfera (Tabla 2.3.3b). Generalmente, todos estos phylum son los que se encuentran asociados a los entornos vegetales, aunque pueden diferir en los valores de abundancia relativa (Bulgarelli et al., 2013). En lo que respecta a plantas de tomate, los resultados de este trabajo son coincidentes con los numerosos reportes de experimentos realizados en diferentes variedades y partes del mundo (Figura 2.1.2b), permitiendo identificar a Proteobacteria como el principal phylum asociado a la rizosfera y la endosfera de plantas de tomate en mayor abundancia relativa, seguido en orden decreciente por Actinobacteria/Firmicutes que se alternan el 2do. y 3er. puesto de mayor abundancia relativa, y Bacteroidetes en cuarto lugar, no encontrándose normalmente otros phylum relevantes (>1% secuencias).

⊕ La abundancia relativa de las Gammaproteobacteria aumenta hacia la endosfera y la de las Alphaproteobacteria aumenta en sentido inverso, en concordancia con lo reportado no solo para tomate (Dong et al., 2019; López et al., 2020) sino también para otros cultivos tal como trigo (Liu et al., 2017).

⊕ Respecto a los géneros bacterianos más abundantes en rizosfera y endosfera de distintos órganos de plantas de tomate, existe una gran variabilidad entre los resultados reportados (Tabla 2.3.3d). Sin embargo, los resultados de este trabajo concuerdan con lo expuesto por diversos investigadores:

→ Dentro de los géneros más abundantes en rizosfera de tomate se encuentran los géneros *Sphingomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Allard et al., 2016; Bergna et al., 2018; Dong et al., 2019; Kwak et al., 2018; Eitlbany et al., 2019; Larousse et al., 2017; Ottesen et al., 2013; Poudel et al., 2018; Tian et al., 2015).

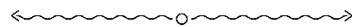
→ Dentro de los géneros más abundantes en endosfera de raíz se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Acinetobacter* y *Sphingobium* (Bergna et al., 2018; Dong et al., 2019; French et al., 2020; López et al., 2020; Tian et al., 2015).

→ Dentro de los géneros más abundantes en endosfera de tallo se encuentran los géneros *Pantoea*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Dong et al., 2019; López et al., 2020)

⊕ Respecto a los resultados encontrados en fruto (~85% de secuencias asignadas a *Klebsiella* y ~12% a *Castellaniella*, con prevalencia en las 6 muestras y en el caso de *Klebsiella* presente en todos los microhábitats relevados en ambos establecimientos ~0,5% de abundancia relativa en suelo, rizosfera y rizoendosfera, y ~2% en tallo), no se encontró bibliografía que comparta estos hallazgos. Incluso, López y colaboradores (2020) caracterizaron la endosfera de tomate *Elpida* crecido en condiciones comerciales bajo cubierta en el CHP (condiciones experimentales comparables a las de este trabajo) y sus resultados describen a *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, y *Pectobacterium* como los géneros más abundantes, sin mencionar a los géneros *Klebsiella* o *Castellaniella* en ninguno de los microhábitats caracterizados (endosfera de raíz, tallo, hoja y fruto), y sólo en 2 del resto de las publicaciones, colonizando rizosfera y endorizosfera.

Mientras algunos organismos pueden ser oportunistas ocasionales como resultado de eventos estocásticos, hay evidencia creciente de la existencia de una comunidad bacteriana central o *core* consistentemente estable en plantas sanas a través del espacio, el tiempo y, en parte, a través de los órganos, no solo a nivel de phylum sino también a otros niveles taxonómicos (Vorholt et al. 2017), tal como los géneros coincidentes en los resultados anteriormente mostrados. Lo expuesto anteriormente suma a la evidencia reportada por otros

investigadores sobre taxones bacterianos que se encuentran comúnmente habitando dichos microhábitats, lo que podría significar que sean parte de los microorganismos que conforman el *core* de dichos entornos.



⊕ A pesar de las variaciones en los perfiles taxonómicos entre los diferentes microhábitats, el análisis de beta-diversidad agrupó a las diferentes comunidades bacterianas en 3 clústeres en base a su similitud de composición y abundancia relativa, diferenciados por el microhábitat ($p < 0,05$) y conformados por (i) suelo-rizosfera, (ii) endosfera de raíz-tallo, y (iii) fruto. Este mismo análisis evidenció también un efecto significativo del factor experimental establecimiento, aunque únicamente sobre las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera ($p < 0,05$), permaneciendo la endosfera de raíz, tallo y fruto sin alteraciones debidas a este factor ($p = 0,12$) (Figura 2.3.3f).

⊕ De igual manera, la comparación de los grupos genéticos del gen *nifH* (Figura 2.3.4b) y *phoD* (Figura 2.3.4c) de las distintas muestras evidencia que el principal factor que determina las mayores diferencias se da a nivel de microhábitats (suelo-rizosfera respecto a endosfera); el factor experimental establecimiento muestra impactar únicamente en la diferenciación de las comunidades bacterianas portadoras del gen *nifH* y *phoD* que habitan el suelo y la rizosfera, mientras que dicho efecto no es observado en las muestras de endosfera.

En este trabajo no se caracterizaron taxonómicamente las comunidades funcionales estudiadas, pero hay reportes interesantes que describen los géneros portadores de los genes *nifH* y *acdS* en distintos microhábitats de la planta de tomate:

→ Particularmente sobre las comunidades portadoras del gen *nifH*, es interesante destacar que Collavino et al. (2020) amplificaron y secuenciaron dicho gen a partir de muestras de endosfera de raíz y tallo de tomate var. *Elpada* crecido en el CHP –condiciones comparables con las utilizadas en este trabajo–. Este reporte indica que los órdenes bacterianos más abundantes asociados al gen *nifH* en estos microhábitats (~85%) fueron Rhizobiales, Burkholderiales, Pseudomonadales, Enterobacterales y Bacillales. Coincidentemente, los resultados de este trabajo muestran a estos órdenes como los 5 más abundantes en las comunidades bacterianas de endosfera de raíz y tallo (Figura 2.3.3c) y podrían ser los taxones que se asocian a los diferentes grupos genéticos encontrados.

→ Respecto a las comunidades portadoras del gen *acdS*, Bouffaud et al. (2018) identificaron a los principales taxones que portan este gen en suelo y rizosfera de tomate: ~70% se corresponde al phylum Proteobacteria (géneros *Burkholderia/Paraburkholderia*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, entre otros) y el restante ~30% al phylum Actinobacteria (géneros *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, entre otros). Coincidentemente, todos estos géneros bacterianos también se encontraron en las muestras de suelo y rizosfera de tomate caracterizadas en este trabajo, incluso algunos de ellos también en endosfera de raíz y

tallo, pudieron formar parte de los taxones que llevan adelante esta función en cada uno de los sitios relevados.

Como se mencionó previamente no se observaron diferencias en cuanto a la abundancia, riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo entre ambos establecimientos. Aun así, los últimos resultados exponen diferencias en los perfiles taxonómicos que habitan cada uno de los suelos, determinados principalmente por taxones específicos en cada uno de los sitios y diferencias en las abundancias relativas de los taxones que comparten ambos suelos (Figura 2.3.3i). Siendo el suelo y su microbiota asociada el principal determinante (aunque no el único) de las comunidades de la rizosfera en las plantas (Reinhold-Hurek et al., 2015), es comprensible que también las comunidades de rizosfera evidencien diferencias entre ambos establecimientos (Figura 2.3.3f). Aun así, estas diferencias en suelo-rizosfera entre los establecimientos no ocurrieron en la misma magnitud en suelo (con mayores diferencias entre sí, Figura 2.3.3i) que en rizosfera (diferencias menos marcadas, Figura 2.3.3i), lo cual puede entenderse como el efecto rizosférico del vegetal efectuado mediante la liberación de exudados radicales y la contribución al intercambio de gases y de nutrientes (Compant et al., 2019): a pesar de que las plantas crecen en suelos habitados por comunidades bacterianas diferentes, la mayoría de los habitantes más abundantes de la rizosfera fueron comunes en ambos sitios. No obstante, el efecto rizosférico no es absolutamente específico en cuanto a las comunidades bacterianas que atrae al entorno radical, ya que una misma planta puede variar en las señales químicas que envía a través de sus raíces dependiendo de su estado fisiológico. Esto puede determinar que, aunque las plantas de tomate compartan el mismo genotipo (y por ello gran parte el efecto rizosférico atrajo similares taxones en ambos establecimientos), las características diferenciales entre los sitios determinaron que las raíces secreten perfiles de exudados particulares posibilitando la interacción con taxones específicos de cada sitio. Como ha sido mencionado por diferentes autores, este efecto regulador del genotipo y la especie vegetal, que comienza débilmente con señales a nivel de rizosfera, aumenta progresivamente hasta su máxima expresión en los compartimentos internos vegetales (Reinhold-Hurek et al., 2015). Una vez dentro de la planta, se ha mencionado que los microorganismos pueden trasladarse vía conductos xilemáticos entre los distintos órganos de la planta (Compant et al., 2019), un aspecto interesante que podría fundamentar las similitudes entre las comunidades bacterianas de endosfera de raíz y tallo. Más aún, dependiendo el nivel taxonómico de análisis, se han detectado ciertas similitudes entre la endosfera de raíz respecto a suelo-rizosfera, permitiendo asignar a la endorizosfera el rol de conexión entre los microhábitats subterráneos y aéreos. La alta similitud tanto en las propiedades emergentes (detalladas más arriba) como así también en la composición y abundancia relativa de taxones en las comunidades de endosfera de raíz y tallo de plantas de tomate –a pesar de haber crecido en dos sitios distintos– ponen de manifiesto esta selección que ejerce el vegetal.

CAPÍTULO 3.

CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADAS DE SUELO, RIZOSFERA Y ENDOSFERA DE RAÍZ, TALLO Y FRUTO DE PLANTAS DE TOMATE

BIOPROSPECCIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS DE TOMATE PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN COMO BIONSUMOS HORTÍCOLAS

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1. TÉCNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE PGPB

De acuerdo a lo mencionado en capítulos previos, se puede apreciar la complejidad del estudio de la microbiota asociada a las plantas y su entorno. También se destacó la utilidad y el avance de los estudios del microbioma basados en métodos independientes de cultivo, los cuales contribuyen, por ejemplo, a la comprensión de cómo es la estructura de la microbiota, cómo pueden modularla ciertos factores o cómo puede influir el genotipo de la planta sobre su composición en los diferentes compartimentos de las plantas. Sin embargo, el enfoque independiente de cultivo también tiene limitaciones, entre otras, que algunas de las bacterias cultivables no puedan ser detectadas debido a desajustes de *primers*, o bien que se sobreestima la diversidad de ciertos taxones (Youseif et al., 2021). Por otro lado, las técnicas dependientes de cultivo han sido y siguen siendo necesarias para comprender no solo el papel ecológico de los microorganismos y su interacción con las plantas sino también para la búsqueda de microorganismos con potencial aplicación biotecnológica como bioinsumos a base de PGPB, es decir, para poder realizar estudios de bioprospección. Tal como se describió en [Capítulo 1](#), los estudios de bioprospección bacteriana utilizan un enfoque del tipo *bottom-up*, el cual se inicia con el aislamiento a partir de muestras vegetales, la identificación y caracterización como PGPB para su potencial uso en forma individual o combinada, como bioinsumos multiespecie o comunidades sintéticas (Armanhi et al., 2018). Entre las propiedades que comúnmente se evalúan en los aislamientos bacterianos que se pretenden utilizar como bioinsumos agrícolas, se encuentran: actividades de promoción del crecimiento vegetal y biocontrol *in vitro* e *in vivo*, resistencia al estrés por desecación o temperatura o componentes tóxicos, resistencia a antibióticos, eficiencia de colonización y rizocompetencia, etc. (Molina Romero et al., 2017). Estas pruebas se pueden utilizar como criterio de selección de las PGPB promisorias, y para ello pueden calcularse ciertos índices (Agarás et al., 2015). Además, es necesario evaluar la cinética de crecimiento de los microorganismos en medios líquidos, así como la compatibilidad entre cepas si es que se pretende formular un bioinsumo bacteriano multiespecie, entre otras evaluaciones ([Figura 3.1.1a](#)) (Vishwakarma et al., 2020). Esto significa que más allá de las características como PGPB que pueda tener el microorganismo, la eficiencia de su respuesta y la posibilidad de su uso como bioinsumo depende de diversos factores, es decir, no hay una correlación entre sus capacidades y la respuesta a campo.

Un bioinsumo agrícola, puede presentar más de un efecto en la planta, por ejemplo, puede promover el desarrollo de la planta y, a su vez, protegerla del ataque de patógenos. Estos efectos, tal como se mencionó en el [Capítulo 1](#), son el resultado de diferentes mecanismos ejercidos por las PGPB, y algunos de ellos se describen a continuación.

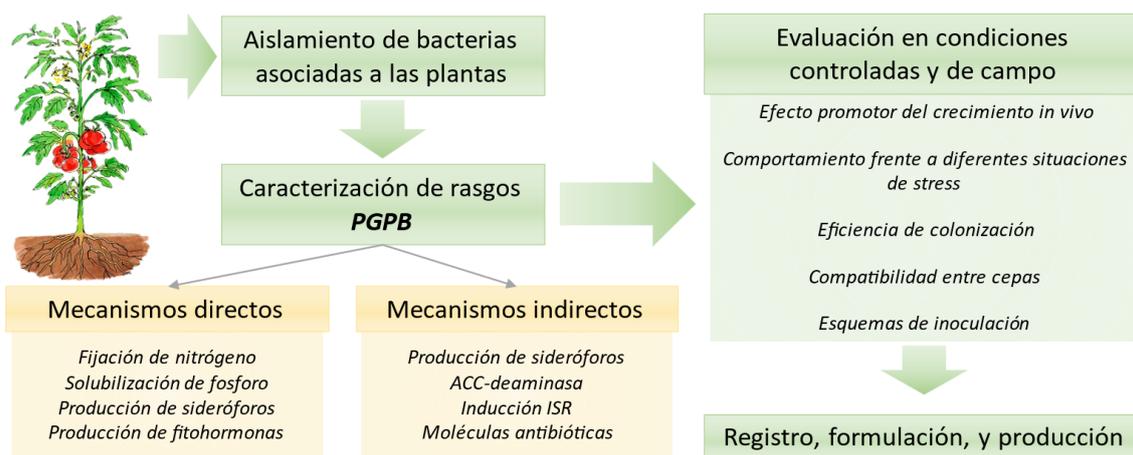


Figura 3.1.1a Esquema de investigación y desarrollo de un bioinsumo bacteriano a partir de colecciones bacterianas en estudios de bioprospección. Adaptado de Vishwakarma et al., 2020.

3.1.2. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL: MECANISMOS Y EFECTOS

Las PGPB son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos (Glick, 2012):

- **Mecanismos directos**, involucrados en el crecimiento vegetal. Ponen a disposición de las raíces varios de los nutrientes presentes en el suelo que, en muchos casos, no se encuentran en formas biodisponibles para las plantas. Los más destacados son la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la solubilización de fósforo, y la producción de hormonas vegetales responsables de la estimulación de crecimiento
- **Mecanismos Indirectos**, involucrados en reducir el impacto negativo de situaciones de estreses bióticos y abióticos. Disminuyen/previenen la acción de fitopatógenos mediante la producción de metabolitos de acción antagonista, la competencia por espacio, o por desencadenar la respuesta del sistema inmune vegetal. También engloba a aquellos mecanismos que incrementan la resistencia natural del vegetal a diferentes situaciones de estrés. Los más destacados son la síntesis de metabolitos tales como sideróforos, y/o antibióticos, la producción de enzimas líticas (quitinasas, glucanasas y proteasas son las principales enzimas hidrolíticas de la pared fúngica), metabolitos que inducen la resistencia sistémica (ISR), la regulación de los niveles de etileno en la planta (ACC-deaminasa), entre otros.

Algunos de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal más relevantes que las PGPB poseen son:

- **Aumento de la biodisponibilidad del fósforo** (P) del suelo para las plantas. Dependiendo del tipo de suelo, se puede decir que entre 50-60% del P corresponde a la **fracción orgánica**, mientras que el resto se encuentra en **formas inorgánicas**, ya sea formando parte de sales insolubles o bien disuelto en la solución del suelo. Las plantas deben absorber el P de la solución del suelo, donde se encuentra en muy baja

concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 ppm. Los principales procesos en el ciclo biogeoquímico del P en el suelo involucran la absorción por las plantas y su retorno a través de los residuos vegetales y animales, reacciones de fijación a las superficies de arcillas y óxidos y el recambio biológico dado por procesos de **mineralización-inmovilización** y **solubilización** dependientes de la actividad microbiana. La liberación de fosfatasas –que tienen acción en la mineralización del fósforo orgánico–, y ácidos orgánicos que actúan en la solubilización de compuestos de fósforo insolubles son los mecanismos por medio de los cuales las PGPB pueden aumentar la biodisponibilidad de P en el suelo para el uso vegetal. Se han reportado bacterias con la capacidad de aumentar la biodisponibilidad de fósforo en los suelos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* y *Rhizobium*, entre otros (Goswami et al., 2016), principalmente por la producción de ácidos orgánicos que por intercambio iónico solubilizan los compuestos insolubles de P.

- **Incremento de la disponibilidad del nitrógeno** (N) a través del proceso de fijación biológica del N (FBN), en la cual el N₂ atmosférico se transforma en amonio, una especie que puede ser utilizada por las plantas. El nitrógeno, uno de los nutrientes más abundantes de la materia viva cuyo rol es fundamental para el desarrollo de todos los seres vivos –síntesis proteica, ácidos nucleicos, clorofila y en otras moléculas de importancia para la célula–, se encuentra en la atmósfera en un 79% aproximadamente, bajo la forma de gas diatómico N₂, pero el mayor reservorio de N es la litósfera. La dinámica del N en la biósfera comprende principalmente la FBN, la mineralización, la nitrificación y la desnitrificación procesos mediados principalmente por microorganismos presentes en el suelo. El N₂ en la atmósfera es muy estable y solo un pequeño grupo de microorganismos de vida libre, asociados no simbióticos y simbióticos –denominados *diazótrofos*– pueden reducir el N₂ a amonio (NH₄⁺). Esta reacción de alta demanda energética (16 ATP por cada N₂), es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa a temperatura y presión normales. Los diazótrofos de vida libre viven en el suelo o agua y fijan el N₂ sin formar estructuras particulares; la mayoría son bacterias heterótrofas pertenecientes a los géneros: *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerincka*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* y *Stenotrophomonas*, entre otros (Baldani et al., 2014).

- **Producción de fitohormonas** como auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, entre otras, las cuales actúan en los procesos metabólicos vegetales regulando el crecimiento y desarrollo vegetal. Las distintas hormonas vegetales tienen incidencia en la división y elongación celular (otorgando plasticidad de la pared celular para que esta se alargue) tanto del sistema radical como de la parte aérea, pueden retrasar la senescencia del sistema radical y la abscisión de órganos como hojas, flores y frutos, estimulan la movilización de nutrientes, regulan al proceso de germinación, entre otros (Glick, 2014).

→ **AUXINAS** –particularmente ácido 3-indol acético (IAA)–. Afecta a procesos biológicos vegetales como la elongación y división celular, diferenciación de tejidos y ayuda a la dominancia apical. Alrededor del 80% de la flora bacteriana en la rizosfera produce IAA (Goswami et al., 2016). Las plantas bajo el tratamiento a largo plazo de IAA tienen raíces muy desarrolladas, lo que a su vez permite que la planta logre mayor exploración del suelo y pueda absorber mayor cantidad de agua y

nutrientes, ayudando al crecimiento general de la planta. Se ha reportado que ciertas bacterias que habitan en la rizosfera, el rizoplasma y los nichos endófitos pueden producir IAA y mejorar el crecimiento de las plantas. Se ha reportado producción de IAA en bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, entre otros (Goswami et al., 2016).

→ **GIBERELINAS** –(GAs) numeroso grupo de más de 130 estructuras moleculares diferentes–. Las GAs influyen en muchos procesos de desarrollo en las plantas superiores, incluida la germinación de semillas, el alargamiento del tallo, la floración y el cuajado de frutos. Estas fitohormonas se trasladan desde las raíces a las partes aéreas de la planta, teniendo un efecto más notorio cuando se combina con las auxinas que estimulan el sistema radicular potenciando el aporte de nutrientes para facilitar el crecimiento en la parte aérea. Se ha reportado producción de GAs por bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum* y *Bacillus* (Goswami et al., 2016)

→ **CITOQUININAS**. Similar a las auxinas, estimulan la división celular, desarrollo de raíces, formación de pelos radicales, inhibición del alargamiento de raíces, iniciación de brotes y otras respuestas fisiológicas como la expansión de las hojas, la producción de clorofila y el retraso de la senescencia. Se han encontrado más de 30 compuestos diferentes de citoquininas promotoras del crecimiento en plantas y en microorganismos asociados a plantas, probándose en condiciones *in vitro* que la mayoría de los microorganismos son capaces de liberar citoquininas en diferentes proporciones (Amara et al., 2015). Se ha encontrado producción de citoquininas en bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Xanthomonas* (Maheshwari et al., 2015).

▪ **Producción de sideróforos**, moléculas de bajo peso molecular capaces de quelar reversiblemente al hierro. Las bacterias productoras de sideróforos intervienen en la salud y el crecimiento de las plantas en varios niveles: mejoran la nutrición de hierro –ya que las plantas absorben el complejo hierro-sideróforo–, e inhiben el crecimiento de otros microorganismos dada la actividad antibiótica de dicha molécula y la dificultad de ciertos patógenos que no pueden absorber el complejo hierro-sideróforo (Shen et al., 2013).

▪ **Antagonismo contra patógenos**, tanto a través de la producción de enzimas líticas como de la producción de moléculas antibióticas. La producción de enzimas líticas (quitinasas, glucanasas, proteasas, amilasas, lipasas, etc) actúa en la degradación de las paredes celulares de hongos fitopatógenos y ha sido reportada para diversos géneros bacterianos, como *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* (Goswami et al., 2016). Por otro lado, numerosos metabolitos extracelulares con efecto antibiótico son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos incluso a baja concentración. *Bacillus* y *Pseudomonas* son los géneros de PGPB más estudiados respecto a la producción de moléculas de efecto antibiótico, con numerosas formas moleculares producidas a través de diferentes rutas metabólicas (Chang et al., 2007; Leclere et al., 2005).

▪ **Fortalecimiento frente al estrés biótico y abiótico** en las plantas, mediante la modulación en los niveles de las especies reactivas de oxígeno en la planta (Chun-Juan et al., 2012), la inducción de la resistencia sistémica vegetal, regulando el ajuste osmótico en las células vegetales e interviniendo en los niveles del etileno –fitohormona asociada al estrés vegetal– (Glick, 2014). Los niveles de etileno incrementan rápidamente en planta frente a los estreses abióticos, provocando efectos no deseados como la abscisión y senescencia de órganos vegetales, clorosis, aborto de flores, etc. En la ruta metabólica por la cual las plantas producen etileno, el ácido 1-Aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) es un precursor importante. Las PGPB tienen incidencia en esta ruta metabólica mediante la producción de la enzima ACC-deaminasa, la cual anula la producción de esta fitohormona y junto con ello retrasando los efectos negativos sobre el vegetal (Ali et al., 2012).

Los bioinsumos microbianos entonces pueden funcionar como biofertilizantes, fitoestimulantes y/o biopesticidas, y pueden producir sobre las plantas que los hospedan los siguientes efectos benéficos:

- Aumento en la velocidad de germinación, de aparición de primeras hojas
- Aumento del crecimiento/volumen de las raíces
- Aumento del tamaño de grano, área foliar, número de frutos
- Aumento de los contenidos de clorofila, magnesio, nitrógeno y proteínas
- Tolerancia a la sequía y baja temperatura
- Senescencia retardada de la hoja
- Resistencia a enfermedades

Para que las PGPB puedan ejercer efectos benéficos sobre las plantas, tienen que ser colonizadores eficientes para poder ocupar un determinado nicho ecológico. En estas interacciones PGPB-planta está involucrado el reconocimiento inicial de señales moleculares (quimiotaxis a sustancias presentes en los exudados radiculares), seguido del movimiento de la bacteria en dirección de la planta hospedera, su adhesión a la superficie de la raíz, la colonización de la superficie y posteriormente el ingreso en el interior de la misma cuando se trata de PGPB endófitas (Santoyo et al., 2016). La primera instancia comprende la aproximación de la bacteria hacia la planta, los mecanismos de aproximación espacial pueden ser pasivos, si la bacteria se encuentra en la semilla o en la yema de propagación vegetativa, o activos a través del movimiento por atracción quimiotáctica o electrostática desde la rizosfera hacia la superficie de la raíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). La adhesión bacteriana se puede dar en cualquier parte de la superficie de la raíz, en donde las bacterias puedan crecer a partir de los exudados radiculares, y formar microcolonias, *biofilm*, agregados, etc. (Angus y Hirsch, 2013). Por ello la capacidad de formación de *biofilm* es también una de las características que se evalúa durante la caracterización de un potencial bioinsumo a base de PGPB, aunque ésta no sea una característica de promoción del crecimiento sino de eficiencia de colonización. Una vez establecida la interacción planta-bacteria y colonizado el rizoplasma, para lograr posteriormente la entrada a los tejidos internos vegetales muchos

microorganismos secretan enzimas celulasas y pectinasas útiles para la degradación de la pared celular de la planta (Berendsen et al., 2012).

3.1.3. MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE ASOCIADA A PLANTAS DE TOMATE

Hay una considerable información sobre estudios dependientes de cultivo en diferentes plantas creciendo tanto en sistemas naturales como agrícolas, principalmente en lo referido a géneros más comúnmente encontrados. Algunos resultados de estos estudios informan que:

Anguita-Maeso et al., 2020

- Las bacterias cultivables obtenidas de xilema de plantas de olivo pertenecían a cuatro phylum y los géneros más abundantes incluyen *Frigoribacterium* (18,8%), *Methylobacterium* (16,4%), y *Sphingomonas* (14,6%).

Youseif et al., 2021

- 166 aislados cultivables de la rizosfera de trigo, los cuales fueron muy diversos a nivel de género, con una alta proporción con potencial para actividades de promoción del crecimiento vegetal para la adquisición de nutrientes, como producción de sideróforos y solubilización de P (aprox. el 21 % de los aislados exhibían múltiples características como PGPB). La gran mayoría de estos aislamientos se clasificaron dentro de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Sphingomonas*, reconocidos por sus efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la salud del trigo bajo condiciones controladas y de campo

Riva et al., 2022

- Una gran cantidad de trabajos en los que emplearon muy variados medios para la recuperación y aislamiento de bacterias endófitas cultivables a partir de diferentes plantas, fueron analizados. Se encontró que independientemente de los múltiples factores que podrían influir en la diversidad de las bacterias, *Bacillus* fue el género más representado en todas las categorías consideradas (diferentes compartimentos, diferentes medios) con la excepción de suelo contaminado donde *Pseudomonas* fue dominante. Especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido reconocidas como importantes promotores del crecimiento vegetal y también como agentes de biocontrol por producir metabolitos con efecto antagónico y también inducir resistencia sistemática en las plantas. En resumen, los géneros bacterianos más representados en el conjunto de datos analizados pertenecieron a Gammaproteobacteria (*Pseudomonas*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, y *Enterobacter*), bacilos (*Bacillus*, *Staphylococcus* y *Paenibacillus*) y Actinobacteria (*Microbacterium* y *Curtobacterium*).

En lo que respecta a estudios de la **microbiota asociada a plantas de tomate**, en la [Tabla 3.1.3a](#) se muestra un resumen de algunos de los reportes encontrados de la última década:

Tabla 3.1.3a Resumen de estudios sobre aislamientos bacterianos a partir de plantas de tomate, indicando microhábitat de aislamiento, medio de cultivo empleado, tamaño de la colección, caracterización taxonómica y determinaciones en relación a actividades de promoción del crecimiento vegetal (PGPB) *in vivo* e *in vitro*, y/o antagonismo.

<i>Especie y cultivar</i>	<i>Microhábitat Vegetal</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Número de aislamientos</i>	<i>Taxones más abundantes</i>	<i>Actividad PGPB in vitro (% de +)</i>	<i>Antagonismo (% de +)</i>	<i>Taxones PGPB (in vivo)</i>	<i>Ref</i>
<i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Capsicum annuum</i>	-	Agar nutritivo	87	Taxones con mayor antagonismo (8): <i>Bacillus</i> (6) <i>Serratia</i> (2)	Sideróforos (8), AIA (8), solubilización de P (4)	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Colletotrichum capsici</i> .	<i>Bacillus</i> y <i>Serratia</i>	Amare-san et al. 2012
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Pink lady; cv. Red cherry; cv. Yellow angel; cv. Green pearl	Endosfera de semilla	Agar nutritivo	84	Se aislaron específicamente <i>Bacillus</i> . Principales géneros hallados: <i>B. subtilis</i> (64%), <i>B. amyloliquefaciens</i> (23%), <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. altitudinis</i> y <i>B. safensis</i>	Sideróforos (24%), AIA (37%), solubilización de P (37%), fijación de nitrógeno (90%), enzima ACC-deaminasa (6%)	-	<i>B. subtilis</i>	Xu et al. 2014
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Hildares	Rizosfera	Leván peptona glucosa agar	200	Selección de 25 taxones con mayor antagonismo: <i>Bacillus</i> (20), <i>Enterobacter</i> (3), <i>Chryseobacterium</i> y <i>Klebsiella</i>	Sideróforos (20), AIA (20), solubilización de P (18)	<i>Rizoctonia solani</i> (28,5%) y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (34,5%)	<i>Bacillus</i>	Abdeljalil et al. 2016
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Rio Grande	Endosfera de hoja	Tripti-casa soya agar	10	<i>Pseudomonas</i> (4), <i>Exiguobacterium</i> (3), <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Pantoea</i>	Sideróforos (40%), AIA (40%), solubilización de P (50%)	<i>Botrytis cinerea</i> (50%); <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> (30%)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pantoea</i>	Romero et al. 2016
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. San Marzano; cv. Plus Licopene	Rizosfera	Luria-Bertani agar	11	<i>Bacillus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Ensifer</i>	Sideróforos (87%), AIA (89%), enzima ACC-deaminasa (83%), producción de ácidos orgánicos (73%)	-	<i>Agrobacterium</i> , <i>Bacillus</i>	Abba- mondi et al. 2016
	Endosfera de raíz		12	<i>Agrobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>				

Capítulo 3
INTRODUCCIÓN

Caracterización y selección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate

Tabla 3.1.3a (continuación) Resumen de estudios sobre aislamientos bacterianos a partir de plantas de tomate, indicando microhábitat de aislamiento, medio de cultivo empleado, tamaño de la colección, caracterización taxonómica y determinaciones en relación a actividades de promoción del crecimiento vegetal (PGPB) *in vivo* e *in vitro*, y/o antagonismo.

Especie y cultivar	Microhábitat Vegetal	Medio de cultivo	Número de aislamientos	Taxones más abundantes	Actividad PGPB in vitro (% de +)	Antagonismo (% de +)	Taxones PGPB (in vivo)	Ref
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Jiabao	Endosfera de raíz	Luria-Bertani agar, agar nutritivo, Tripticasa soya agar, medios selectivos sin fuente de N	49	<i>Bacillus</i> (22), <i>Pseudomonas</i> (12), <i>Enterobacter</i> (7), <i>Rhizobium</i> (6) <i>Burkholderia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> .	AIA (8,1%), fijación de N (34,7%)	<i>Escherichia coli</i> (32,6%), <i>Bacillus subtilis</i> (8,1%), <i>Staphylococcus aureus</i> (28,6%) y <i>Aspergillus niger</i> (20,4%)	<i>Bacillus</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i>	Tian et al. 2017
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Elpida F1; cv. Silverio	Endosfera de semilla	Tripticasa soya agar, agar nutritivo y King B	41	<i>Bacillus</i> (11), <i>Paenibacillus</i> (3), <i>Acinetobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> .	Sideróforos (2), AIA (10), solubilización de P (1)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Corynespora cassiicola</i> , <i>Stemphylium lycopersici</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i>	López et al. 2018
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Arka Vikas; cv. Arka Abha	Endosfera de semilla	Agar nutritivo y Tripticasa soya agar	17	<i>Ralstonia</i> (4), <i>Sphingomonas</i> (4), <i>Kosakonia</i> (2), <i>Sphingobium</i> (2), <i>Micrococcus</i> (2), <i>Bacillus</i>	Fijación de N (0%), producción de amonio (77%), solubilización de P (31%), AIA (0%)	-	<i>Sphingomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i>	Shaik & Thomas 2019
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Santa Cruz Kada Gigante	Rizosfera	Medios selectivos sin fuente de N: JMV, JNFb, NFb, LGI, LGI-P	42	<i>Rhizobium</i> (32), <i>Burkholderia</i> (3), <i>Variovorax</i> (3), <i>Pseudomonas</i> (2), <i>Caulobacter</i> ,	Sideróforos (45%), AIA (52%), solubilización de P (86%)	-	<i>Rhizobium</i> y <i>Pseudomonas</i>	Zuluaga et al. 2020

Tabla 3.1.3a (continuación) Resumen de estudios sobre aislamientos bacterianos a partir de plantas de tomate, indicando microhábitat de aislamiento, medio de cultivo empleado, tamaño de la colección, caracterización taxonómica y determinaciones en relación a actividades de promoción del crecimiento vegetal (PGPB) *in vivo* e *in vitro*, y/o antagonismo.

Especie y cultivar	Microhábitat Vegetal	Medio de cultivo	Número de aislamientos	Taxones más abundantes	Actividad PGPB <i>in vitro</i> (% de +)	Antagonismo (% de +)	Taxones PGPB (<i>in vivo</i>)	Ref
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. <i>el-pida</i> F1	Endosfera de raíz	Trypticasa soya agar, agar nutritivo y King B	8	<i>Pseudomonas</i> (3), <i>Serratia</i> (3), <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Microbacterium</i>	-	-	-	López et al. 2020
	Endosfera de tallo		7	<i>Stenotrophomonas</i> (2), <i>Pseudomonas</i> (2), <i>Curtobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Pantoea</i>				
	Endosfera de hojas		4	<i>Pseudomonas</i> (4)				
	Endosfera de frutos		5	<i>Staphylococcus</i> (2), <i>Terribacillus</i> , <i>Phylobacterium</i> , <i>Acinetobacter</i>				
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. <i>Arka Vikas</i> ; cv. <i>Arka Abha</i>	Endófitos de semilla	Agar nutritivo	16	<i>Sphingomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Bacillus</i>	-	-	-	Thomas & Shaik 2021
<i>Solanum lycopersicum</i>	Endófitos de semilla	Medio selectivo para <i>Clavibacter michiganensis</i>	50	16 OTUs: <i>Firmicutes</i> (13), <i>Actinobacteria</i> (3)	-	-	-	Someya et al. 2021
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. <i>Hildares</i>	Endosfera de raíz	Trypticasa soya agar	74	<i>Bacillus</i> - 28,9%, <i>Microbacterium</i> - 11,8%, <i>Agrobacterium</i> 14,5%, <i>Pae-nibacillus</i> - 7,9%, <i>Rhizobium</i> - 5,3%	Sideróforos (70%), AIA (35%), enzimas quitinasa (6%) y ACC-deaminasa (78%), solubilización de P (41%)	<i>Fusarium oxysporum</i> (3,9%)	<i>Bacillus</i> (2), <i>Pantoea</i> (1), <i>Microbacterium</i> (2)	Flemer et al. 2022

Capítulo 3
INTRODUCCIÓN

Caracterización y selección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate

De acuerdo a estos antecedentes se observa que la mayor cantidad de estudios sobre bacterias cultivables son de semilla de tomate, y esto puede ser debido a la importancia que la transferencia vertical desde la semilla podría contribuir al uso de las mismas, y luego de rizosfera y rizoendosfera. Un resumen de los resultados que pueden aportar a este trabajo se muestra a continuación:

[Abdeljalil et al. \(2016\)](#)

- 200 rizobacterias aisladas asociadas al tomate exhibieron una gran diversidad morfológica y bioquímica. 25 aislados exhibieron la mejor respuesta como agentes de biocontrol y por secuenciación de los genes 16SrRNA y rpoB se agruparon en 7 especies: *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. cloacae*, *C. jejuense* y *K. pneumoniae*; 20 aislamientos fueron capaces de producir sideróforos, 18 solubilizaron fosfato y 19 fueron capaces de sintetizar indol-3- ácido acético (IAA).

[Abbamondi et al. \(2016\)](#)

- 15 aislamientos que se caracterizaron genotípicamente, cinco pertenecen al género *Agrobacterium*, y otros a los géneros *Microbacterium* (2), *Bacillus* (2), *Rhizobium* (2), *Ensifer* (1), *Chryseobacterium* (1), *Pseudomonas* (1), y *Rhodococcus* (1). Un alto porcentaje de las cepas aisladas dieron positivo para las siguientes características de PGP: el 73 % pudo producir OA, 89 % IAA, 83 % ACC-deaminasa y 87 % sideróforos.

[Tian et al. \(2017\)](#)

- Los aislamientos fueron agrupados en grupos de los órdenes Pseudomonadales, Enterobacterales, Rhizobiales, Burkholderiales y Xanthomonadales, que representan la mayoría de los grupos de proteobacterias de la raíz del tomate. La mayoría de los aislados endófitos que presentaron actividades antimicrobianas fueron de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Los 18 endófitos fijadores de nitrógeno fueron principalmente especies de *Bacillus* y *Rhizobium*.

[Zuluaga et al. \(2020\)](#)

- 42 cepas bacterianas fueron obtenidas de rizosfera, después de lo cual fueron categorizados filogenéticamente y caracterizados por sus mecanismos básicos de PGPB. Todas las cepas pertenecían al phylum Proteobacteria en las clases Alphaproteobacteria (61% de los aislados), Betaproteobacteria (19% de los aislados) y Gammaproteobacteria (20% de los aislados), con una distribución que abarcó nueve géneros, con predominio del género *Rhizobium* (58,4% de los aislados).

[López et al. \(2020\)](#)

- En hojas, brotes y raíces de plantas de tomate *el pida* se identificaron Gammaproteobacteria (71%), Actinobacteria (12,5%), Firmicutes (12,5%) y Alphaproteobacteria (4%), sólo se aislaron Firmicutes de frutos donde representaban el 60% de la comunidad.

[Anzalone et al. \(2021\)](#)

- 77 bacterias endófitas cultivables compartieron múltiples actividades benéficas, entre ellas había un predominio de bacterias en Bacillales, Enterobacterales, y Pseudomonadales. Su actividad antagónica *in vitro*

mostró que las especies de *Bacillus* fueron significativamente más activas que otros aislamientos. En cuanto a la actividad *in vivo* contra bacterias fitopatógenas sobresalieron un subconjunto de *Bacillus* y *Pseudomonas*. Se encontró que: (i) el tamaño de la población bacteriana cultivable en la raíz es mayor en la rizosfera y en el rizoplano que en el compartimiento de la endosfera; (ii) el sitio del aislamiento (es decir, granja y condiciones agrícolas) en el compartimiento de la raíz impulsa las características fenotípicas de las poblaciones bacterianas; (iii) las bacterias cultivables eficientes de la endorizosfera de tomate pertenecieron a Bacillales, Pseudomonadales y Orden Enterobacterales; (iv) las especies de *Bacillus* fueron significativamente más eficaces en la inhibición de patógenos de plantas de tomate *in vitro*; (v) los resultados preliminares *in vivo* mostraron que algunas *Pseudomonas* y los aislados de *Bacillus* de la endorizosfera pudieron proteger a las plantas de tomate contra ciertas bacterias fitopatógenas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, resultó de interés realizar estudios de bioprospección de las bacterias asociadas a plantas de tomate variedad *elpida* cultivadas en el CHP, mediante la obtención de aislamientos bacterianos, su caracterización de acuerdo a sus propiedades de promoción del crecimiento vegetal y biocontrol, seguida por la selección de aquellos aislamientos que muestren ser buenos candidatos para su potencial aplicación como bioinsumos hortícolas. A continuación, se detallan las tareas realizadas, los resultados obtenidos y su análisis.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS.

Las muestras utilizadas (N=30) para obtener los aislamientos bacterianos fueron las mismas que las que se recolectaron de ambos establecimientos en estudio ([Descripción de los sitios de estudio](#)) para la caracterización de las comunidades bacterianas mediante técnicas independientes de cultivo: suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate por triplicado de ambos sitios en estudio ([Toma de muestras](#)). Inmediatamente luego de la recolección, las muestras se transportaron hacia el Laboratorio de Microorganismos de Aplicación en Agricultura (CINDEFI – UNLP/CCT-Conicet La Plata) conservadas a 4°C y se mantuvieron refrigeradas a esa temperatura hasta su procesamiento. Las diferentes muestras se procesaron como se detalla en el esquema de la [Figura 3.2.1a](#).

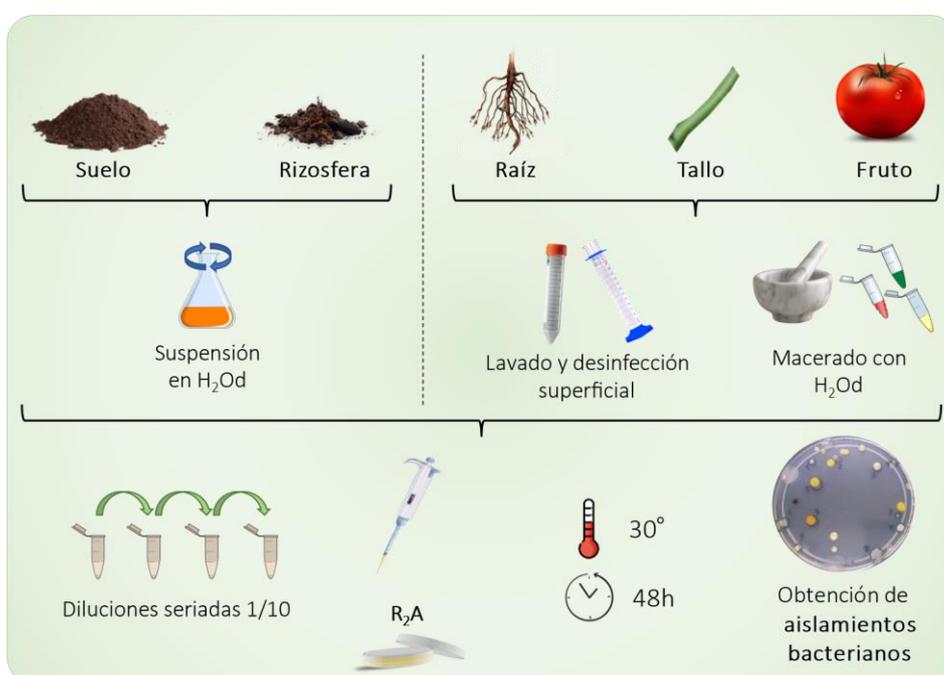


Figura 3.2.1a Procesamiento de las muestras para obtención de aislamientos bacterianos.

- **SUELO.** De cada una de las muestras compuesta, se tomaron 10 g y se agitó a 150 rpm por 40 minutos en erlenmeyer junto con 100 ml de solución fisiológica con Tween80 0,1% v/v previamente esterilizada. Luego se realizaron diluciones seriadas (la primera a razón de 1 ml del extracto en 9 ml de solución fisiológica y las siguientes utilizando 100 µl de la dilución anterior en 900 µl de solución fisiológica). Se plaqueó por duplicado 100 µl de las varias diluciones en placa de petri con medio de cultivo específico para aislamiento de heterótrofos.

- **RIZOSFERA.** El suelo rizosférico, obtenido mediante agitación de las raíces en el interior de bolsas estériles, se procesó como se describió previamente para el suelo, con la diferencia de que se utilizaron 3 g

de suelo rizosférico. Se plaqueó por duplicado 100 µl de varias diluciones seriadas en placas de petri con medio de cultivo específico para aislamiento de heterótrofos.

- **RAIZ**. Luego de extraer la rizosfera, las raíces se lavaron enérgicamente con solución fisiológica con tween80 0,1% v/v y se desinfectaron superficialmente con NaClO (46g/L) al 15% v/v, en agitación a 150 rpm durante 30 minutos, para eliminar las poblaciones bacterianas superficiales y quedarnos únicamente con las poblaciones bacterianas endófitas. Luego de la desinfección superficial se lavaron las raíces 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Las raíces desinfectadas superficialmente se cortaron en pequeños trozos con un bisturí desinfectado para luego macerar en mortero desinfectado diferentes porciones representativas de raíces, añadiendo 2 ml de agua destilada para resuspender el macerado (Figura 3.2.1b). Con el macerado obtenido se realizan diluciones seriadas y se plaqueó por duplicado 100 µl del extracto sin diluir y de varias diluciones en placas de petri con medio de cultivo específico para aislamiento de heterótrofos.

- **TALLO**. Los trozos de tallos fueron seleccionados teniendo en cuenta tres porciones a lo largo de la planta: una porción basal, una medial y otra apical. De cada sección se cortaron dos trozos de 3 cm. Los tallos se sometieron a un lavado con solución fisiológica con tween80 0,1% v/v, agitándose manualmente por 30 segundos en frascos estériles. Luego se realizó la desinfección superficial de los mismos con NaClO (46 g/L) al 15% v/v en agitación a 150 rpm por 8 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para remover los restos de desinfectante. Luego de la desinfección superficial, los tallos se rasparon superficialmente con bisturí desinfectado y se cortaron en pequeñas porciones para facilitar el macerado de los mismos en mortero desinfectado (Figura 3.2.1b). Para la re suspensión del macerado se utilizaron 2 ml de agua destilada estéril. Se plaquearon por duplicado 100 µl del extracto sin diluir y varias diluciones en placas de petri con medio de cultivo específico para aislamiento de heterótrofos.

- **FRUTO**. Dos frutos de cada planta fueron lavados con solución fisiológica con tween80 0,1% v/v estéril y luego desinfectados superficialmente mediante el rociado de etanol 70% en tres oportunidades, esperando 3 minutos entre cada momento. Luego de un posterior lavado a la desinfección, se le quito la epidermis del fruto con un bisturí desinfectado y se realizó el macerado de una porción de cada fruto procurando incluir desde la parte más externa hacia el centro, agregando 1 ml de agua destilada estéril (Figura 3.2.1c). Se plaqueó por duplicado el macerado sin diluir y diluciones seriadas en placa de petri con medio de cultivo para heterótrofos.

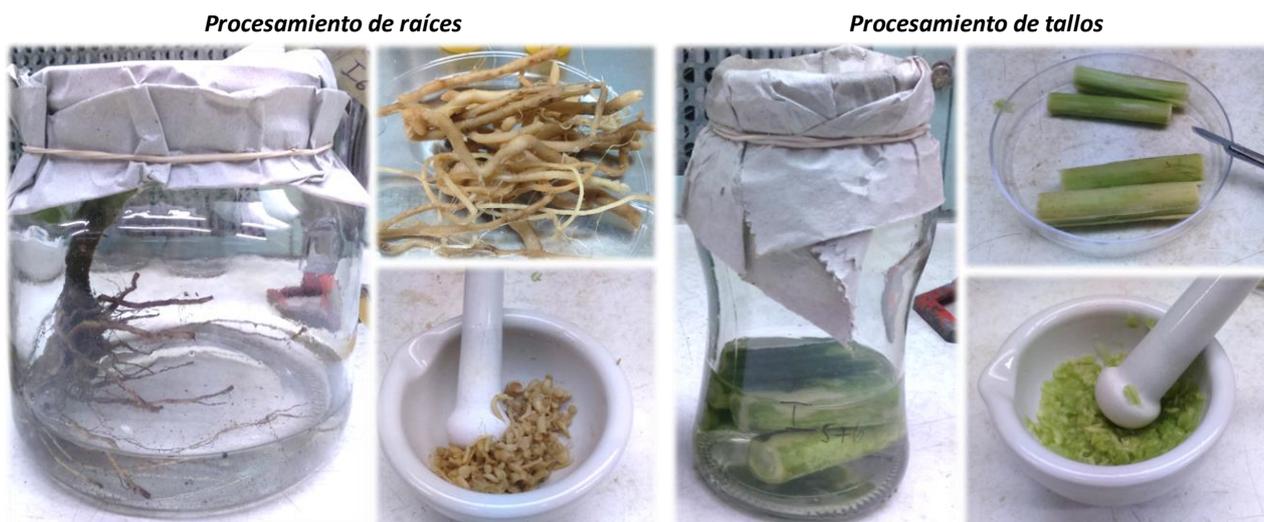


Figura 3.2.1b Fotografías del proceso de desinfección superficial y macerado de raíces y tallo para aislamiento de bacterias endófitas.

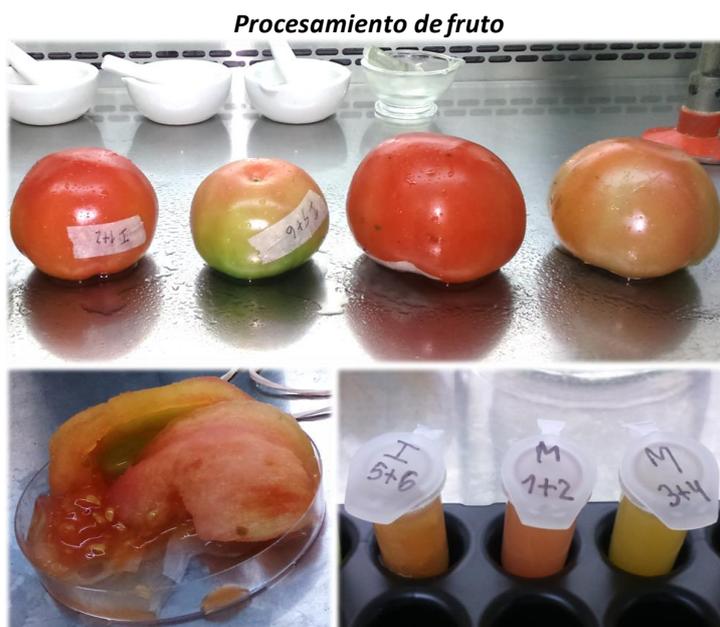


Figura 3.2.1c Fotografías del proceso de desinfección superficial y macerado de fruto para aislamiento de bacterias endófitas.

En la bibliografía consultada respecto al aislamiento bacteriano a partir de variadas especies vegetales se determinó que los medios de cultivo que mayormente se emplean para tal fin son el agar nutritivo (AN), el Luria Bertani (LB) y el Tripticasa agar soya (TSA) (Tabla 3.1.3a). En base a distintas pruebas previas, simulando el aislamiento de bacterias a partir de diferentes muestras de plantas de tomate, se decidió emplear el medio de cultivo R₂A (Reasoner y Geldreich, 1985) (detallado en Tabla 7.1a, en el ANEXO C: Medios de cultivo) para realizar los aislamientos bacterianos definitivos, ya que fue donde se observó mayor número y diversidad de

colonias bacterianas. Este medio de cultivo complejo, muy utilizado para aislamientos de heterótrofos dada su amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno en su composición, así como la presencia de diferentes vitaminas y aminoácidos, fue empleado para el aislamiento, crecimiento y mantenimiento de los aislamientos bacterianos de la colección.

Estas pruebas previas también permitieron conocer aproximadamente el recuento poblacional de los distintos microhábitats para saber hasta donde realizar las diluciones seriadas y cuales aproximadamente hay que sembrar en las placas para obtener un recuento adecuado. Para cada muestra (N=30) se sembraron 3 diluciones, utilizando dos placas para cada uno de los extremos y 3 placas a la dilución central, totalizando 7 placas por muestra.

Todas las placas de petri sembradas se llevaron a estufa a 30°C donde se incubaron en oscuridad por 48 horas para luego realizar el conteo de colonias y el cálculo de las unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC g⁻¹) y el posterior aislamiento de las mismas.

3.2.1.1 Procedimiento de obtención de aislamientos bacterianos endófitos

Para la obtención de aislamientos bacterianos endófitos a partir de los distintos órganos vegetales de tomate, las muestras de vegetal se desinfectaron superficialmente con NaClO, con el objetivo de eliminar todos los microorganismos que habitan la superficie y quedarnos con aquellos presentes en los tejidos internos de los distintos órganos.

- Control de desinfección superficial

Se utilizó el agua del último lavado de los distintos órganos vegetales para verificar la ausencia de microorganismos en su superficie. Se plaquearon 100 µl del agua del último lavado de los distintos tejidos en placas de petri con medio de cultivo R₂A y también se realizó el apoyo y rolado de los tejidos luego de la desinfección superficial sobre placas de petri con el mismo medio de cultivo. Las placas de petri se cultivaron en oscuridad a 30°C durante 72h para luego verificar la presencia/ausencia de colonias bacterianas.

3.2.2. RECUENTO POBLACIONAL, AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y MANTENIMIENTO DE LA COLECCIÓN

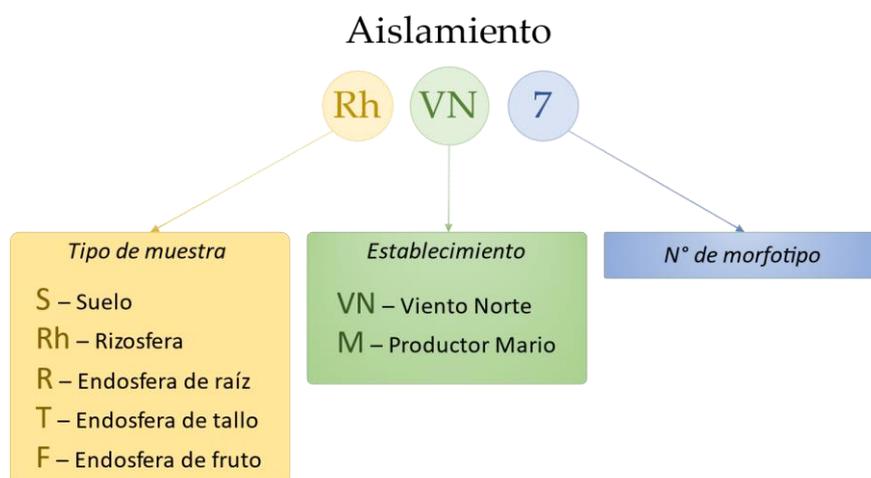
A partir de las placas de petri donde se sembraron las diluciones de las distintas muestras obtenidas de cada uno de los establecimientos en estudio se realizó el cálculo de unidades formadoras de colonia (**UFC**) por gramo de muestra, utilizando la siguiente fórmula:

$$UFC\ g^{-1} = \frac{n^{\circ}\ colonias \times 10^{n^{\circ}\ diluciones} \times Volumen\ inicial}{peso\ muestra}$$

Los datos de recuento poblacional (N=30) se analizaron estadísticamente a través de un ANAVA bifactorial (Factor *Microhábitat* con 5 niveles [suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto]; Factor *Establecimiento* con 2 niveles [Viento Norte S.A. y Productor Mario]) con un 95% de confianza y se utilizó el test de Tukey ($\alpha=0,05$) cuando fue necesario para realizar la comparación de medias. El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

Empleando las mismas placas de petri, se identificaron macroscópicamente diferentes morfotipos de colonias bacterianas en base a la apariencia, color, borde, brillo, forma, etc., con el objetivo de aislar la mayor diversidad bacteriana posible presente en cada microhábitat (suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto). Para esto, se agruparon las placas de petri por microhábitat y en base a caracterización visual de los morfotipos se fueron seleccionando todas las colonias bacterianas que presentaban características distintivas respecto al resto, descartando el aislamiento de morfotipos en apariencia similares que puedan haber crecido en una placa distinta correspondiente a dicho microhábitat.

Cada morfotipo, se identificó con letras y números indicando *tipo de muestra*, *sitio de aislamiento* y *número de morfotipo*, empleando el siguiente criterio:



Los distintos morfotipos se re-aislaron mediante la técnica de agotamiento en estría separándose en colonias aisladas del mismo morfotipo, a partir de las cuales se guardaron por duplicado en medio de cultivo R2A con glicerol 20% v/v a -80°C (Figura 3.2.2a). Los repiques para su posterior caracterización y su uso en distintos ensayos se realizaron en placas de petri con medio de cultivo R₂A.

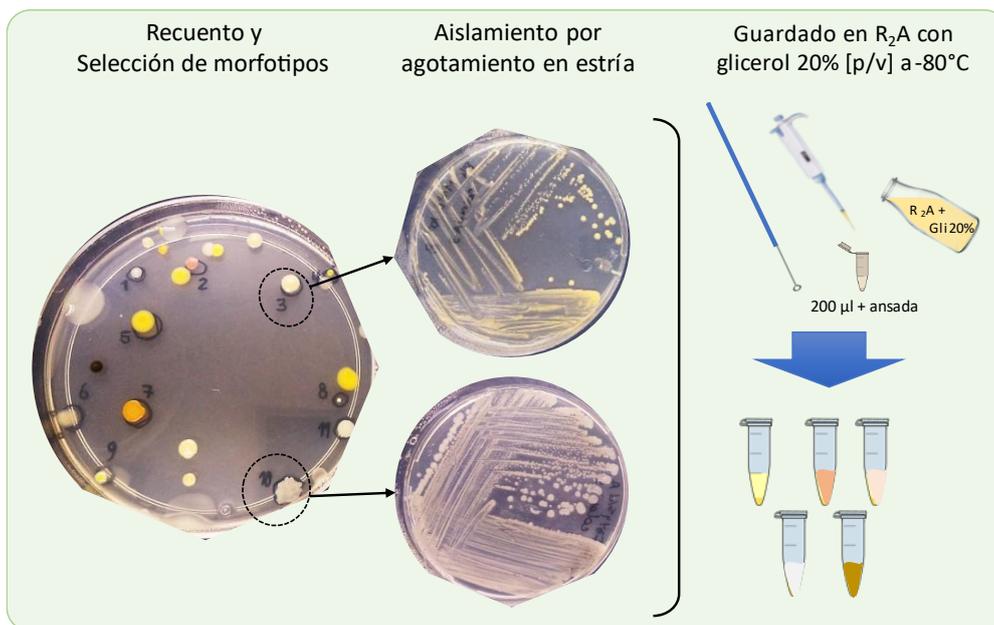


Figura 3.2.2a Método de selección y aislamiento de morfotipos bacterianos, y mantenimiento de la colección de aislamientos seleccionados.

3.2.3. ASIGNACIÓN TAXONÓMICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ENDÓFITOS

Debido al gran número de aislamientos bacterianos de la colección y el particular interés en aquellos obtenidos del interior del vegetal, se identificaron taxonómicamente solo los aislamientos bacterianos endófitos. La identificación taxonómica se realizó mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S y comparación de los resultados con la base de datos del [NCBI](#).

Para esto, se realizaron extracciones de ADN bacteriano a partir de una colonia aislada para cada uno de los aislamientos obtenidos de endosfera de raíz, tallo y fruto, mediante el siguiente protocolo:

1. Tomar con ansa una colonia aislada crecida durante 48h en placa de petri y depositarla en un tubo limpio y estéril.
2. Agregar 500 µl de NaCl 1M, agitar en vórtex durante 30 seg, centrifugar por 2 min y descartar el sobrenadante. Repetir esta secuencia de pasos 3 veces.
3. Agregar 1 ml de agua bidestilada estéril, agitar en vórtex durante 30 seg y centrifugar durante 2 min. Descartar el sobrenadante.

4. Agregar 200 µl de agua bidestilada estéril y agitar en vórtex durante 30 seg. Poner en baño de agua a 100°C durante 6-7 min. Centrifugar durante 2 min y pasar el sobrenadante (con el ADN bacteriano) a un nuevo tubo limpio y estéril. Guardar a -20°C hasta su uso.

Se controló la calidad del ADN obtenido como se describió previamente para las extracciones de ADN metagenómico (ver [Control de calidad en extracciones de ADN](#)). Las extracciones de ADN se enviaron a secuenciar a [MacroGen Inc.](#) (Seúl, Corea del Sur), utilizando los primers 27F – 907R para amplificar en sentido forward la región V3-V7 del gen ARNr 16S. Los datos de secuenciación se procesaron con el programa bioinformático ApE v3.1.3 ([Davis & Jorgensen, 2022](#)) para evaluar la calidad de la secuenciación. Las secuencias obtenidas se contrastaron con la base de datos del NCBI mediante la herramienta [BLAST N](#) para determinar a qué grupo taxonómico bacteriano se asemeja con un mayor porcentaje de identidad.

Para el análisis filogenético de los aislamientos endófitos, se descargaron de la base de datos del GenBank del NCBI las secuencias del gen 16S ARNr de las especies tipo que presentaron mayor porcentaje de similitud con los aislamientos. Se construyó un árbol filogenético por el método de máxima similitud agrupando todos los aislamientos bacterianos endófitos de la colección, siguiendo los pasos mencionados a continuación:

1. Se realizó el alineamiento y el análisis de secuencias utilizando el Software Geneious v2023.0.4 (Biomatters Ltd.; <http://www.geneious.com>, [Kearse et al. 2012](#)). Las secuencias se alinearon usando los parámetros por defecto del algoritmo ClustalW.
2. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el método Neighbor-Joining con 1000 bootstrap para evaluar la solidez estadística de los nodos.

3.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A SU POTENCIAL DE COLONIZACIÓN VEGETAL.

Los aislamientos bacterianos de la colección se caracterización mediante ensayos *in vitro* específicos para determinar la capacidad potencial de colonizar órganos vegetales a través de la producción de enzimas líticas involucradas en la colonización vegetal y la capacidad de formar *biofilm*. Posteriormente, a fin de comparar la capacidad potencial de los distintos aislamientos para colonizar órganos vegetales, se asignaron valores numéricos a la caracterización enzimática (cálculo del **índice de caracterización enzimática de colonización - ICEC**) y a la formación de biofilm (**Bf**), para calcular el **Índice de Colonización Vegetal (ICV)** que involucra ambas caracterizaciones.

3.2.4.1 Caracterización de enzimas líticas asociadas a la colonización vegetal y cálculo de ICEC

Se realizaron ensayos *in vitro* en placas de petri con medios de cultivo específicos para determinar en los diferentes aislamientos la producción cualitativa de dos enzimas líticas extracelulares involucradas en mecanismos de colonización vegetal. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, obteniéndose un resultado positivo/negativo para cada determinación, los cuales se utilizaron para el cálculo del **Índice de Caracterización Enzimática de Colonización (ICEC)**.

- Determinación de celulasas

Estas enzimas hidrolizan las moléculas de celulosa a unidades de glucosa. [Teather & Wood \(1982\)](#) describieron una técnica para determinar la presencia de estas enzimas empleando carboximetilcelulosa (**CMC**) como sustrato, la cual tiene la cualidad de absorber el colorante Rojo Congo entre sus largas cadenas de polisacáridos. Para la determinación se utilizó un medio de cultivo (detallado en el [ANEXO C: Medios de cultivo, Tabla 7.1b](#)) conteniendo CMC como fuente de carbono, el cual se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se vertió en placas de petri estériles. Se inocularon los distintos aislamientos bacterianos en las placas, por duplicado, y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Finalmente, para obtener los resultados de la determinación se reveló la placa mediante el agregado de Rojo Congo 0,1% *p/v*, una vez absorbido completamente se lavó con NaCl 1M, y por último se disminuyó el pH mediante el agregado de ácido acético 0,5% *v/v*. Se consideró como bacteria productora de celulasas (resultado positivo) a aquellas que mostraron un halo decolorado alrededor de su colonia; el resultado negativo por el contrario se observó en aquellas bacterias donde la CMC no fue degradada y absorbió el colorante Rojo Congo y el medio de cultivo se tornó de color rojizo.

- Determinación de pectinasas

Son enzimas responsables de la hidrólisis de la pectina, principal componente responsable de cementar las células vegetales y posibilitar la estructuración. Para la determinación se utilizó un medio de cultivo (detallado en el [ANEXO C: Medios de cultivo, Tabla 7.1c](#)) con pectina como fuente de carbono, el cual se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dispuso en placas de petri. Las placas se inocularon con los diferentes aislamientos bacterianos y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Luego de este período, las placas se revelan mediante el agregado de solución de iodo/ioduro ($I_2/I^- = 1 \text{ g de } I_2 + 6 \text{ g de } IK + 330 \text{ ml de agua}$). El iodo reacciona con la pectina del medio de cultivo formando un complejo de color café. El resultado positivo se evidencia mediante una zona decolorada alrededor de la colonia de aquellos aislamientos bacterianos que producen y liberan extracelularmente estas enzimas.

- Cálculo del índice de caracterización enzimática de colonización - ICEC

Con los resultados de los ensayos cualitativos de caracterización enzimática con implicancias en la colonización vegetal se calculó el **Índice de Caracterización Enzimática de Colonización (ICEC)** para cada aislamiento bacteriano, utilizando la siguiente ecuación:

$$ICEC_j = \frac{\sum a_{jk}}{n}$$

Donde:

a representa el resultado (negativo = 0; positivo = 1) del aislamiento j para la caracterización enzimática k (celulasa/pectinasa).

n representa el número de actividades enzimáticas determinadas (Si el aislamiento no creció en el medio de cultivo de la determinación en placa, se considera como no evaluado y no contribuye al valor de n).

3.2.4.2 *Determinación de formación de biofilm en placas multipocillo*

Para evaluar la capacidad de formación de *biofilm* de los diferentes aislamientos se realizaron ensayos en placas estériles de poliestireno de 96 pocillos, utilizando medio de cultivo R₂A, donde se hicieron crecer y luego se cuantificó el *biofilm* formado por la técnica de Cristal Violeta (CV) (O'Toole, 2011). El protocolo de la determinación se describe a continuación:

1. Preparación del inóculo: cada aislamiento se creció en medio de cultivo líquido R₂A en oscuridad a 30°C y en agitación a 150rpm por 48 h. Se midió la densidad óptica (DO) del cultivo a 590 nm y se realizaron las diluciones correspondientes para obtener un inóculo ajustado a una DO_{590nm} = 1.

2. En placas multipocillo, se emplearon 3 pocillos por cada aislamiento. En cada pocillo se utilizó un volumen de 160 µl de medio de cultivo R₂A y 40 µl de inóculo, de forma que la densidad óptica inicial de dicho pocillo fuera de 0,2 con un volumen final de 200 µl. Paralelamente se sembraron por triplicado 200 µl de medio de cultivo sin inóculo para ser utilizados como blanco en las mediciones y como control de esterilidad del ensayo.

3. Las placas se incubaron estáticas por 48 horas en oscuridad a 30°C en cámara húmeda. Luego de 48 horas se midió la densidad óptica final del cultivo mediante un espectrofotómetro a longitud de onda de 590 nm y se procedió a realizar el lavado de la placa y el revelado del biofilm mediante tinción con cristal violeta.

4. El cultivo se descarta cuidadosamente y se realizan tres lavados con agua destilada estéril para deshacerse de las células planctónicas que no estén formando parte del *biofilm*.

5. Se agregan 200 μ l de una solución de cristal violeta 0,1% y se deja actuar por 15 minutos. Posteriormente se descarta el contenido y se lava 3 veces cada pocillo con agua destilada estéril. Se deja secar a temperatura ambiente por 10 min.

6. Se eluye el cristal violeta de las células bacterianas que conforman el biofilm agregando a cada pocillo 200 μ l de etanol 95% v/v y dejando reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.

7. Se mide la absorbancia del colorante eluído a una longitud de onda de 590 nm.

Las medidas de absorbancia obtenidas se analizaron según los criterios propuestos por [Stepanović y colaboradores \(2007\)](#), calculando los rangos entre los cuales podemos caracterizar a los diferentes aislamientos en base a su capacidad de formación de *biofilm*. Para esto se calculó el valor de DO de referencia (DO_c) a partir del promedio de absorbancia de los pocillos control sumado tres veces el desvío estándar de dichos datos control. Con la DO_c se estableció el siguiente orden y se asignó el valor numérico que toma dicha caracterización (Bf):

NO FORMADOR (-): Absorbancia promedio menor a DO_c . Valor $Bf = 0$.

POBRE FORMADOR (+): Absorbancia promedio entre DO_c y $2*DO_c$. Valor $Bf = 0,25$.

MODERADO FORMADOR (++): Absorbancia promedio entre $2*DO_c$ y $4*DO_c$. Valor $Bf = 0,5$.

MUY BUEN FORMADOR (+++): Absorbancia promedio entre $4*DO_c$ y $6*DO_c$. Valor $Bf = 0,75$.

FUERTE FORMADOR (++++): Absorbancia promedio mayor a $6*DO_c$. Valor $Bf = 1$.

3.2.4.3 Cálculo del Índice de colonización vegetal - ICV

Con la caracterización de enzimas relacionadas con la colonización vegetal celulasa y pectinasa (*ICEC*) y la capacidad de formar biofilm (Bf) se calculó un *índice de colonización vegetal (ICV)* para los distintos aislamientos, el cual refiere a la capacidad potencial de cada cepa para colonizar distintos órganos vegetales.

$$ICV_j = \frac{ICEC_j + Bf_j}{2}$$

Donde:

ICEC representa el índice de [caracterización enzimática relacionado a la colonización](#)

Bf representa el valor numérico obtenido en la caracterización respecto a la [formación de biofilm](#).

El *ICV* toma valores entre 0 y 1: valores cercanos al cero indican ausencia de enzimas líticas involucradas en la colonización vegetal y pobre o nula capacidad de formar biofilm. Por el contrario, valores cercanos a 1 denotan presencia de celulasas/pectinasas y alta capacidad de formar biofilm.

3.2.5. CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A SU POTENCIAL ANTAGONISMO CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS

Los aislamientos bacterianos de la colección se caracterización mediante ensayos *in vitro* específicos para determinar cualitativamente la capacidad de liberar al medio enzimas líticas que puedan intervenir en interacciones antagonistas bacteria-fitopatógeno. También se realizaron diferentes ensayos en placa con cultivo duales para determinar cuali-cuantitativamente su efecto antagonista contra 3 hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata* #25031 de la colección del [Instituto de Investigación Microbiología y Zoología Agrícola \(IMyZA\)](#), y *Botrytis cinerea* LPSC-8, *Fusarium oxysporum* LPSC-1017, y *Sclerotinia sclerotiorum* LPS-28138, gentilmente cedidos por el [Instituto de Botánica Carlos Spegazzini](#) (La Plata, Argentina). En base a estas caracterizaciones se calcularon distintos índices de potencial antagonismo que permitieran seleccionar aquellos aislamientos con mejores aptitudes antagonistas para ser utilizados en posteriores ensayos *in vivo* en plantas de lechuga.

3.2.5.1 Determinación de enzimas líticas de efecto antagonista. Cálculo de índice ICEA.

Se realizaron ensayos *in vitro* en placas de petri con medios de cultivo específicos para determinar cualitativamente en los aislamientos bacterianos la producción de diferentes enzimas líticas extracelulares involucradas en interacciones antagonistas ([Tariq et al., 2017](#)). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, obteniéndose un resultado positivo/negativo para cada determinación, los cuales se utilizaron para el cálculo del **Índice de Caracterización Enzimática Antagonista (ICEA)**.

- Determinación de proteasas

También llamadas peptidasas, son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos presentes en las proteínas. En esta determinación se utilizó un medio de cultivo descrito por [Dunne et al. \(1997\)](#) compuesto por 50 g l⁻¹ de leche descremada en polvo y 10 g l⁻¹ de agar con pH final de 7,0, el cual se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Las bacterias se inocularon en placas de petri con este medio de cultivo y los resultados se obtuvieron luego de incubar las placas en oscuridad a 30°C durante 48 horas. Se consideraron como bacterias con actividad proteasa positiva aquellas que evidenciaron un halo transparente alrededor de su colonia, indicando la liberación extracelular de estas enzimas que degradaron la caseína (principal proteína presente en la leche). Por el contrario, un resultado negativo se atribuyó a la no formación del halo transparente circundante a la colonia bacteriana.

- Determinación de quitinasas

Estas enzimas son las encargadas de hidrolizar la quitina, un polímero de cadena larga con enlaces β-1,4 de N-acetilglucosamina. Para la determinación de aislamientos bacterianos capaces de producir quitinasa extracelular se utilizó quitina coloidal como fuente de carbono en el medio de cultivo (detallado en [Anexo C: Medios de cultivo, Tabla 7.1d](#)), el cual se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dispuso en placas de petri. Las placas se inocularon con los aislamientos bacterianos y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. La presencia de púrpura de bromocresol a pH 4,7 en el medio de cultivo provoca que éste tome un color amarillo. El metabolismo asociado a la hidrólisis de la quitina provoca un aumento en el pH del medio de cultivo haciendo que el color del medio de cultivo vire a púrpura, evidenciando colorimétricamente los aislamientos bacterianos capaces de hidrolizar la quitina ([Shimahara y Takiguchi, 1988](#)).

- Determinación de lipasas

Las lipasas catalizan la hidrólisis de acilglicerol de cadena larga. Para su determinación se utilizó el medio de cultivo descrito por [Samad et al. \(1989\)](#) (detallado en [ANEXO C: Medios de cultivo, Tabla 7.1e](#)), el cual se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min y se dispuso en placas de petri. Las placas se inocularon con los diferentes aislamientos bacterianos y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Los microorganismos considerados como positivos serán capaces de hidrolizar el Tween 80 y se evidenciará alrededor de su colonia un precipitado oscuro notorio a simple vista (monooleato de calcio), debido a la combinación del Ca⁺² presente en el medio de cultivo y los ácidos grasos producto de la actividad de la enzima lipasa.

- Determinación de amilasas

Son enzimas responsables de hidrolizar los hidratos de carbono. Para la determinación se utilizó el protocolo descrito por [Deb et al. \(2013\)](#). El medio de cultivo (detallado en [ANEXO C: Medios de cultivo, Tabla 7.1f](#)) se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min y se dispuso en placas de petri. Los aislamientos bacterianos se inocularon en las placas con dicho medio de cultivo y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 72 horas. Luego de este período, las placas se revelan mediante el agregado de solución de I₂/I⁻ (la misma que se empleó para la determinación de celulasas). El iodo reacciona con el almidón del medio de cultivo, intercalándose en su estructura helicoidal formando un complejo de color azul intenso. El resultado positivo se evidencia mediante una zona incolora alrededor de la colonia de crecimiento de aquellos aislamientos bacterianos que producen y liberan extracelularmente estas enzimas.

- Cálculo del índice de caracterización enzimática de antagonismo – ICEA.

Con los resultados de los ensayos cualitativos sobre la caracterización de proteasas, quitinasas, lipasas y amilasas se calculó el **Índice de Caracterización Enzimática Antagonista (ICEA)** para cada aislamiento bacteriano, utilizando la siguiente expresión matemática:

$$ICEA_j = \frac{\sum a_{jk}}{n}$$

Donde:

a representa el resultado (negativo = 0; positivo = 1) del aislamiento j para la caracterización enzimática k .

n representa el número de actividades enzimáticas determinadas (Si el aislamiento no creció en el medio de cultivo de la determinación en placa, se considera como no evaluado y no contribuye al valor de n).

3.2.5.2 *Ensayos in vitro de antagonismo contra hongos fitopatógenos. Cálculo de índices PICR e IPA.*

Para evaluar la capacidad antagónica de los aislamientos bacterianos frente a hongos fitopatógenos se realizaron ensayos duales *in vitro* según la metodología descrita por [Mokhtar & Dehimat \(2015\)](#), con algunas modificaciones. Los hongos fitopatógenos utilizados fueron *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, y *Sclerotinia sclerotiorum*, de aquí en más denominados por las siglas **Aa**, **Bc**, **Fo** y **Ss**, respectivamente.

- Screening inicial: ENSAYOS DUALES 4 vs 1

En primer lugar, se realizaron ensayos en placa enfrentando 4 aislamientos bacterianos a cada hongo fitopatógeno a modo de screening, para identificar potenciales aislamientos con efecto antagonista (Figura 3.2.5a). Se utilizaron placas de petri con medio de cultivo Agar Papa Glucosado Britania®, donde se inocularon los distintos aislamientos bacterianos de 24h de crecimiento utilizando un ansa en anilla y el patógeno a partir de un disco micelial de 8 mm de diámetro con micelio desarrollado de 7 días. Placas inoculadas solo con el patógeno se utilizaron como controles. Se realizaron placas por duplicado y se incubaron en oscuridad a 30°C las placas con *Aa* y *Fo*; y a 24°C las placas de *Bc* y *Ss*. Los resultados se observaron cuando el patógeno en la placa control completó el crecimiento en toda la placa, lo que demoró 7 días en *Aa*, *Bc*, y *Fo*; y 10 días en *Ss*. Los aislamientos bacterianos se consideraron antagonistas positivos cuando se evidenció la detención del crecimiento del hongo en la zona de interacción hongo-bacteria. Se consideró como resultado negativo el crecimiento del hongo similar al control o bien en caso de tomar contacto con la bacteria, observándose crecimiento o no por encima de la misma (Figura 3.2.5a).

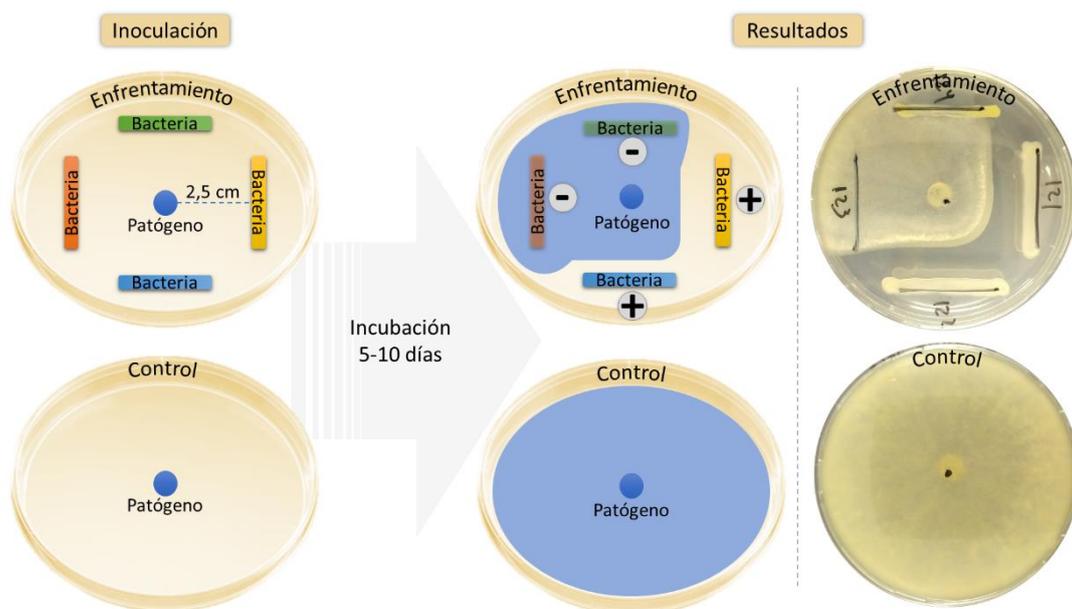


Figura 3.2.5a Esquema de inoculación de placas y lectura de resultados positivos y negativos en ensayos 4 vs 1 para evaluación de antagonismo de los aislamientos bacterianos contra hongos fitopatógenos.

- ENSAYOS DUALES 1 vs 1 y cálculo de PICR

Los aislamientos con resultado positivo en los ensayos 4 vs 1 fueron utilizados para realizar ensayos en placa en cultivos duales 1 vs 1 contra cada hongo que se evidenció antagonismo positivo. El protocolo del ensayo fue el mismo que el descrito previamente para los ensayos 4 vs 1, pero con el arreglo espacial en la placa distanciando al hongo de la bacteria por 5cm entre sí (Figura 3.2.5b). Las placas inoculadas solo con el

patógeno se utilizaron como controles. Se realizaron placas por duplicados y se incubaron en las condiciones y tiempos descrito previamente para cada hongo. Los resultados se observaron cuando el patógeno en la placa control alcanzó los 5 cm que lo separan de la bacteria.

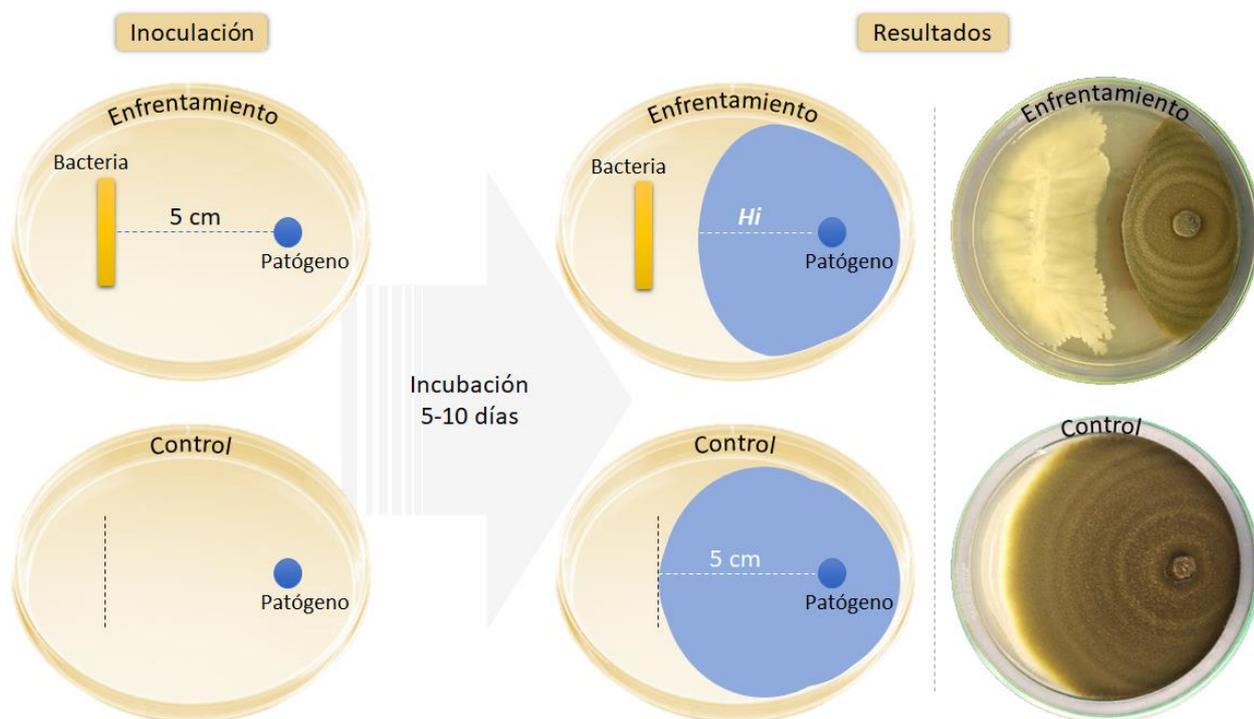


Figura 3.2.5b Esquema de inoculación de placas y lectura de resultados en ensayos 1 vs 1 para evaluación de antagonismo de los aislamientos bacterianos contra hongos fitopatógenos.

Al final del ensayo se midió el halo de crecimiento radial del patógeno (H_i) (Figura 3.2.5b) en todas las placas de cultivo dual y controles ($H_i \text{ control} = 50 \text{ mm}$), desde el centro del disco micelial utilizado como inóculo hasta el borde de la colonia del hongo en dirección perpendicular a la inoculación de la bacteria. Se calculó el **porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)** de cada aislamiento bacteriano para cada hongo fitopatógeno ensayado empleando la siguiente ecuación:

$$PICR_{ij} = \frac{H_{i \text{ control}} - H_{ij}}{H_{i \text{ control}}}$$

H_{ij} : Crecimiento radial del hongo fitopatógeno i desde el centro del disco de inóculo hasta el borde de crecimiento en dirección hacia la bacteria j . $H_{i \text{ control}} = 50 \text{ mm}$.

Se calculó un PICR para cada aislamiento bacteriano *j* respecto a cada hongo *i*, considerando la existencia de actividad antagonista cuando se inhibió el crecimiento radial del fitopatógeno en al menos un 20% (PICR=0,2) respecto al control. Para el cálculo se utilizaron las medidas de halos promedio (*Hi*) de los ensayos *in vitro* 1 vs 1. El índice PICR varía entre 0 (antagonismo negativo o nulo) y 1 (máximo nivel de inhibición del crecimiento del patógeno).

- Cálculo de índice de potencial antagonismo - IPA

Como índice resumen de la caracterización enzimática relacionada a antagonismo y los ensayos duales *in vitro* de los aislamientos bacterianos de la colección contra los 4 hongos fitopatógenos ensayados se calculó el **Índice de Potencial Antagonista (IPA)**. Este índice es particular para cada aislamiento y combina los resultados de las dos caracterizaciones realizadas *in vitro* sobre antagonismo contra hongos fitopatógenos, ponderando el ensayo de antagonismo en placa por brindar resultados de interacción específica. El índice varía entre 0 (sin actividad enzimática de antagonismo y sin inhibición del crecimiento radial contra los hongos testeados) y 1 (máxima actividad enzimática de antagonismo y máxima inhibición del crecimiento radial contra todos los hongos testeados).

$$IPA_j = \frac{ICEA + (2 \times PICR_{prom})}{2}$$

ICEA_j: Índice de caracterización enzimática de antagonismo del aislamiento *j*.

PICR_{prom}: Porcentaje de Inhibición Radial promedio del aislamiento *j*.

3.2.5.3 Cálculo de índice de potencial biocontrol – IPB.

Combinando los resultados del índice de colonización vegetal (**ICV**) y los resultados del potencial antagonismo (**IPA**), se calculó el **Índice de Potencial Biocontrol (IPB)** para cada aislamiento bacteriano de la colección empleando la siguiente ecuación:

$$IPB_j = \frac{ICV_j + IPA_j}{2}$$

Este índice se utilizó para realizar la comparación del potencial biocontrolador de cada aislamiento bacteriano de la colección y a partir de ello, realizar la selección de los más promisorios para continuar con los ensayos de enfrentamientos bacteria-fitopatógeno sobre plantas.

- Análisis multivariado de índices de actividad antagonista

La estadística multivariada es usada para comparar, agrupar y/o clasificar ciertas observaciones en función de varias variables (Balzarini et al., 2008). Tomando los valores de índices *ICV*, *ICEA*, *PICR* para cada fitopatógeno, e *IPB* de todos los aislamientos bacterianos de la colección, se realizó un análisis multivariado mediante el análisis de componentes principales (PCA). Los resultados del PCA se graficaron en un biplot, el cual permite visualizar tanto las observaciones (individuales o agrupadas en base a algún criterio de clasificación), así como el comportamiento de las variables originales en base a los componentes principales (CP) calculados. El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

- Criterio de Selección de aislamientos bacterianos con potencial biocontrol

Para seleccionar los aislamientos bacterianos con potencial para biocontrol se utilizaron los siguientes criterios:

- Selección de **5 antagonistas específicos** para cada uno de los hongos fitopatógenos ensayados a partir del índice *PICR*, tomándose los de mayor valor de *PICR*. Estos antagonistas específicos serán utilizados únicamente en los ensayos contra dicho hongo fitopatógeno.
- Selección de **5 biocontroladores generales** a partir del *IPB*, tomándose los de mayor valor de *IPB*. Estos biocontroladores generales serán utilizados en los ensayos contra todos los hongos fitopatógenos.

3.2.5.4 Inhibición de la germinación de conidios de hongos fitopatógenos

Los aislamientos seleccionados como antagonistas específicos y biocontroladores generales se caracterizaron en ensayos *in vitro* en relación a su capacidad para inhibir la germinación de conidios de los 4 hongos fitopatógenos empleados en ensayos anteriores: *Alternaria alternata* #25031, *Botrytis cinerea* LPSC-8, *Fusarium oxysporum* LPSC-1017, y *Sclerotinia sclerotiorum* LPS-28138. El procedimiento para llevar a cabo los distintos ensayos fue el siguiente:

1. Obtención de suspensión de conidios: A partir del crecimiento de cada hongo en placas de petri con medio de cultivo PDA durante 7-10 días (dependiendo de cada hongo, lo que tardó en completar la placa), se resuspenden los conidios generados en el cultivo sólido agregando 25ml de solución fisiológica con Tween80 0,1% v/v previamente esterilizada y agitando con buzo magnético. Se cuentan los conidios por ml de cada suspensión en cámara de Neubauer.

2. Preparación de inóculos bacterianos con potencial efecto antagonista: Se prepararon cultivos líquidos de cada aislamiento seleccionado, haciendo crecer cada uno en erlenmeyer con medio de cultivo R₂A durante 48h a 30°C con agitación constante a 150rpm. Se caracterizó cada cultivo midiendo el pH resultante y realizando un recuento para determinar el número de UFC ml⁻¹ (diluciones seriadas del cultivo y plaqueo en medio de cultivo R₂A).

En los 4 experimentos (uno por cada hongo) se siguió el mismo protocolo: por triplicado para cada tratamiento, se utilizaron frascos de 15 ml (previamente esterilizados y con tapón de algodón para permitir la oxigenación) donde se mezclaron partes iguales (2,5 ml) de agua destilada, suspensión de conidios y cultivo bacteriano. En el tratamiento CONTROL (únicamente los conidios del hongo) se utilizó agua destilada estéril en vez de cultivo bacteriano. Los frascos se mantuvieron en oscuridad a 24°C y se realizó el recuento de conidios germinados a las 24h, 48h, 72h y 168h, empleando un microscopio con aumento 40X. Se considera un conidio germinado cuando se observa un tubo germinativo de igual o mayor tamaño que el conidio sin germinar.

Los datos de cada experimento se analizaron estadísticamente mediante un ANAVA bifactorial (factor aislamiento con tantos niveles como aislamientos seleccionados para cada fitopatógeno; Factor tiempo con 4 niveles [24h, 48h, 72h y 168h]), aplicando el Test de Tukey en caso necesario para realizar la comparación de medias ($\alpha=0,05$). El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

3.2.5.5 Ensayos de biocontrol in vivo en germinación de semillas de lechuga

Se determinó el efecto negativo de cada hongo fitopatógeno (utilizados en ensayos previos) en el proceso de germinación de semillas de lechuga var. *sagess* (seleccionada por ser una especie vegetal más susceptible a las enfermedades fúngicas, de germinación más rápida y de menor costo que las semillas de tomate), con el objetivo de posteriormente comprobar el efecto biocontrolador de los aislamientos bacterianos seleccionados.

Para llevar a cabo los distintos ensayos se obtuvieron las suspensiones de conidios de cada hongo fitopatógeno y se prepararon los inóculos bacterianos de los aislamientos seleccionados como biocontroladores, tal como se describió anteriormente para los ensayos de [inhibición de la germinación de conidios](#). Luego del ensayo de germinación de conidios, se seleccionaron los que mayor inhibición mostraron a la germinación de los conidios de los fitopatógenos.

En los 4 experimentos (uno por cada hongo fitopatógeno) se llevó a cabo el mismo protocolo:

1. Se desinfectaron superficialmente semillas de lechuga var. *sagess*: se lavaron 3 veces con agua destilada con tween80 0,1% v/v previamente esterilizado por 2 minutos en agitación manual, luego desinfectadas superficialmente con NaClO (46 g l⁻¹) 20% v/v durante 10 minutos con agitación manual cada 2 minutos y 3 lavados posteriores con agua destilada estéril por 2 minutos en agitación manual.

2. Luego del lavado y la desinfección superficial, las semillas se inocularon con el hongo fitopatógeno por inmersión en la suspensión de conidios durante 20 min con agitación manual cada 5 min. Se descartó la suspensión de conidios y sin dejar desecar la superficie de las semillas se procedió con la inoculación de las bacterias seleccionadas como biocontroladoras.

3. Se inoculó cada tratamiento con las distintas bacterias antagonistas seleccionadas, mediante inmersión en los cultivos bacterianos durante 20 min con agitación manual cada 5 min. Luego de este tiempo, se descartó el cultivo bacteriano, y sin dejar desecar la superficie de las semillas se procedió con el último paso.

4. Por duplicado para cada tratamiento, las semillas se acomodaron en placas de petri con papel de filtro y se mantuvieron húmedas durante 5 días en cámara de crecimiento con condiciones controladas (24°C y fotoperíodo 14h luz/8h oscuridad).

La evaluación del ensayo consistió en la determinación del porcentaje de germinación, y la cuantificación de la incidencia (% de plántulas afectadas) y severidad de la enfermedad (evaluando 4 categorías: 1-plántulas sanas; 2-plántulas cloróticas: con algún signo de clorosis; 3-plántulas necróticas: con algún signo de necrosis; 4-plántulas muertas: más del 50% de necrosis en cotiledones/raíz).

Los datos generados se analizaron estadísticamente mediante un ANAVA monofactorial (factor: aislamientos, con tantos niveles como aislamientos seleccionados para cada fitopatógeno), aplicando el Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para comparar las medias de los tratamientos. El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

3.2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Los distintos aislamientos bacterianos de la colección se caracterización mediante ensayos *in vitro* específicos para determinar la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles, producir sideróforos, producir auxinas (fitohormonas) y/o fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico. Con estos resultados se calcularon índices para comparar y seleccionar entre los distintos aislamientos a los más promisorios que puedan actuar como promotores del crecimiento vegetal para continuar posteriormente con ensayos *in vivo*.

3.2.6.1 Determinación cuali-cuantitativa de solubilización de formas insolubles de fósforo

La determinación cualitativa *in vitro* para identificar aquellos aislamientos bacterianos capaces de solubilizar compuestos insolubles de fósforo se hizo en placas de petri por duplicado para cada aislamiento, utilizando el medio de cultivo denominado NBRIP, con fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Nautiyal, 1999). Este medio de cultivo (detallado en ANEXO C: Medios de cultivo, Tabla 7.13g) se visualiza blanquecino debido al fosfato tricálcico precipitado. Los diferentes aislamientos se inocularon en cada placa con un ansa en punta a partir de un crecimiento en medio de cultivo R₂A sólido y se mantuvieron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Se consideró como resultado positivo a aquellos aislamientos que evidencien la formación de un halo transparente alrededor de su colonia, lo cual significa la solubilización del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ blanquecino. Por el contrario, se consideró un resultado negativo aquellos sin presencia de halo transparente. Los resultados positivos se diferenciaron visualmente en 3 categorías (Figura 3.4.6a):

“+”: halo de solubilización coincidente con el halo de crecimiento de la colonia.

“++”: halo de solubilización poco mayor al halo de crecimiento de la colonia.

“+++”: halo de solubilización mucho mayor al halo de crecimiento de la colonia.

Aquellos aislamientos con resultado “++” y “+++” se seleccionaron para realizar los ensayos cuantitativos *in vitro* en placa, utilizando el mismo medio de cultivo. Para estos ensayos, se procedió de la siguiente forma (Figura 3.2.6a):

1. Obtención de cultivos líquidos. Se cultivaron los aislamientos seleccionados en medio de cultivo R₂A líquido en erlenmeyers durante 48 horas a 30°C y agitación a 150 rpm.

2. Ajuste de la densidad óptica (DO). Se normalizaron todos los cultivos a una DO de 0,2. Para esto se midió en espectrofotómetro a longitud de onda de 560 nm la DO del cultivo de 48. Posteriormente se centrifugó y se resuspendió en el volumen calculado de solución fisiológica según la ecuación

$$Vol_{inicial} \times DO_{inicial} = Vol_{final} \times DO_{final}$$

3. Inoculación de las placas de petri. Se inoculó una gota de 20 µl de cada aislamiento en el centro de una placa de petri (por duplicado).

4. Incubación y lectura de resultados. Las placas se incubaron en oscuridad a 30°C por 120 h. Luego, se confirmó la presencia de un halo de solubilización alrededor de la colonia y se midió en cada placa el diámetro de la colonia (D_c) y el diámetro del halo de solubilización (D_h).

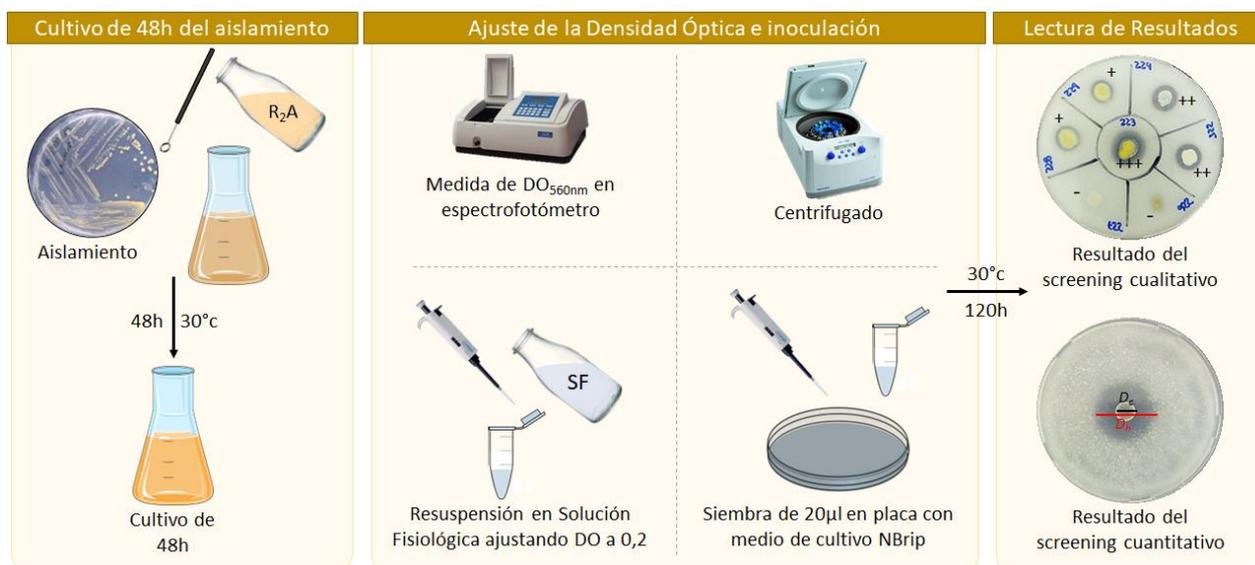


Figura 3.2.6a Determinación cuali-cuantitativa de la capacidad de solubilizar fuente de fósforo insoluble.

Con el objetivo de comparar la capacidad solubilizadora de los diferentes aislamientos se calculó la **Eficiencia de Solubilización de Fósforo Insoluble (ESFI)** (modificado de Cisneros et al., 2017) en medio sólido, de acuerdo con la expresión:

$$ESFI_j = \frac{D_h - D_c}{D_c}$$

Donde

D_c : diámetro de la colonia (mm). Promedio de los duplicados.

D_h : diámetro del halo de solubilización (mm). Promedio de los duplicados.

A Los aislamientos bacterianos con determinación cualitativa “+” se les asignó un valor de ESFI = 0,10.

El índice **ESFI** determina cuán grande es el halo solubilizador en referencia al crecimiento de su colonia, pudiendo obtener valores mayores que 1 en bacterias con gran capacidad de solubilizar fósforo. Para normalizar este índice a un rango entre 0-1, se calculó el **índice de solubilización de fósforo (ISoIP)**:

$$ISolP = \frac{ESFI_j}{ESFI_{m\acute{a}xima}}$$

3.2.6.2 Determinación de producción de sideróforos

Se realizó la determinación cualitativa *in vitro* de la producción de sideróforos para cada uno de los aislamientos de la colección por medio de la técnica de la bicapa en placas de petri (Pérez-Miranda et al., 2007). Esta técnica consistió en hacer crecer los diferentes aislamientos en medio de cultivo R₂A durante 48h en oscuridad a 30°C. Luego de este tiempo, se vertió un segundo preparado (la bicapa, preparación descrita en ANEXO C: Medios de Cultivo) sobre las placas con los aislamientos ya crecidos y se dejó reposar durante 30 min.

Finalizado este tiempo, se obtuvieron los resultados del ensayo: la bicapa, originalmente de color azulado, cambiará a color amarillento alrededor de aquellos aislamientos que han liberado sideróforos en la zona cercana a su colonia (Figura 3.2.6b), los cuales se identificarán como positivos para esta actividad y se diferenciarán por el tamaño del halo en '+', '++' y '+++', tomando los valores 0,33, 0,66 y 1 para cada categoría respectivamente. Por el contrario, si no se observa este cambio de color el resultado se toma como negativo '-' y numéricamente el valor es 0.

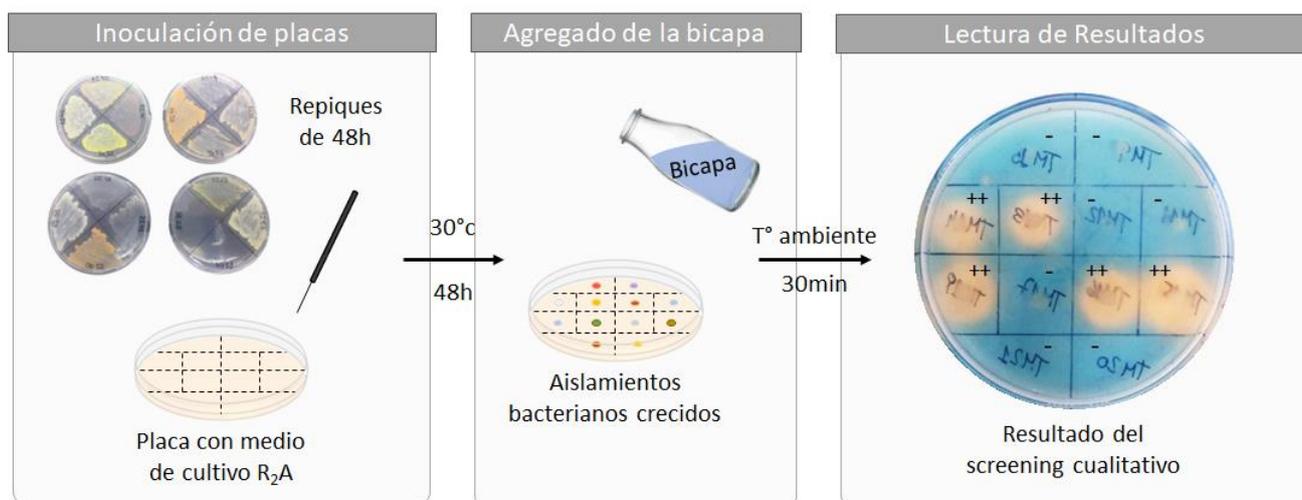


Figura 3.2.6b determinación cualitativa de la capacidad de producir sideróforos.

3.2.6.3 Determinación de la capacidad de Fijación Biológica del nitrógeno atmosférico

Se realizó la determinación *in vitro* de la capacidad de FBN indirectamente a través de la detección de crecimiento microbiano (halo de crecimiento) en medios de cultivo semisólidos sin contenido de fuente nitrogenada: LGI y NFb (Baldani et al., 2014) (la composición de los medios de cultivo se detallan en [Tabla 7.1h](#) y [Tabla 7.1i](#) del ANEXO C: Medios de Cultivo). Esta determinación se realizó únicamente en bacterias endófitas (aquellas aisladas de endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de ambos establecimientos en estudio).

Los medios de cultivo LGI y NFb semisólidos, se depositaron en frascos de 20 ml con tapones de algodón que permitan la oxigenación. Cada uno de los aislamientos por duplicado, se inocularon con un ansa en punta en cada frasco conteniendo los distintos medios de cultivo semisólido y se incubó en oscuridad a 30°C durante 10 días ([Figura 3.2.6c](#)). Luego de este tiempo registraron los resultados: se consideró resultado positivo a aquellos aislamientos capaces de formar una película de crecimiento en los viales en al menos uno de los medios de cultivo utilizados, asignando el valor 1 al índice FBN. Por el contrario, aquellos aislamientos que no mostraron una película de crecimiento en ninguno de los medios de cultivos utilizados se consideraron negativos '-' sin actividad de fijación biológica del nitrógeno, siendo FBN = 0.



Figura 3.2.6c Determinación cualitativa de la capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico.

3.2.6.4 Determinación de aislamientos productores de fitohormonas de tipo auxínicas

La determinación de auxinas *in vitro* se realizó utilizando una técnica colorimétrica en la cual se utiliza el reactivo de Salkowski¹⁵, el cual en contacto con indoles se torna en un color rosa cuya intensidad depende de la concentración de indoles en la muestra ([Figura 3.2.6d](#)) (Asgar et al., 2002).

¹⁵ 2 ml de FeCl₃.6H₂O 0,5M + 98 ml de HClO₄ 35%.

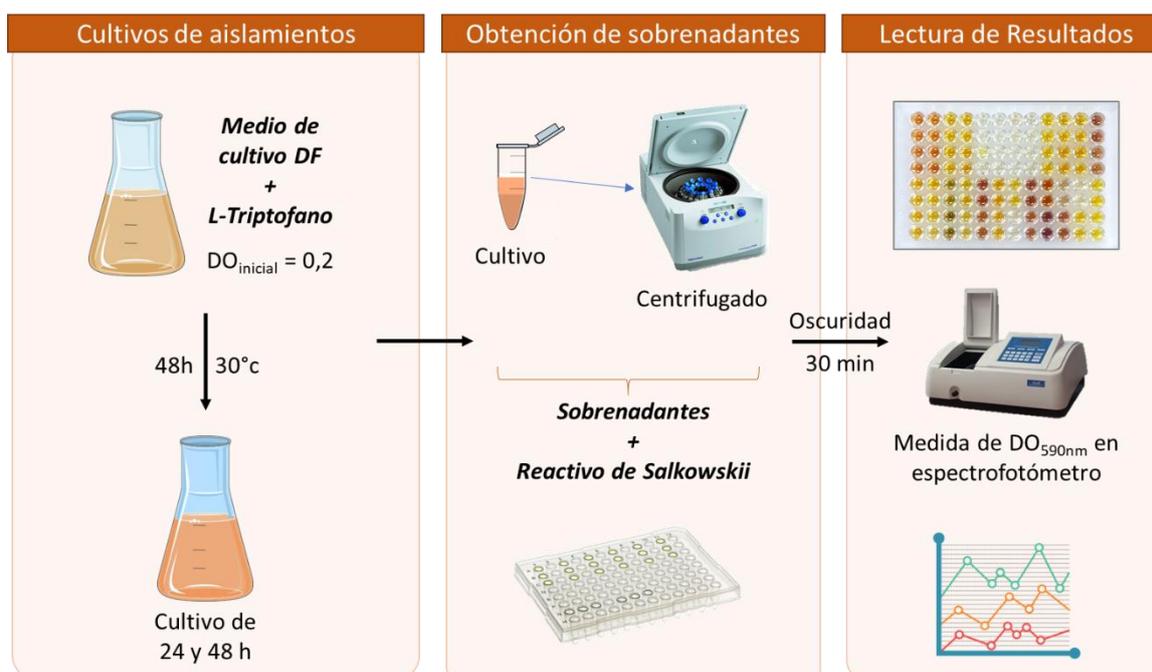


Figura 3.2.6d Determinación cualitativa de la capacidad de producir fitohormonas de tipo auxínicas.

Los aislamientos bacterianos se crecieron en medio de cultivo DF con el agregado de L-triptofano (precursor químico en la ruta metabólica de producción de indoles), ajustando una DO inicial de 0,2 (la composición del medio de cultivo se detalla en [Tabla 7.1j del ANEXO C: Medios de Cultivo](#)). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 30°C y en agitación a 150 rpm durante 48h. Se tomaron muestras de 1 ml de cultivo a las 24 h y a las 48 h y se centrifugaron a 8000 rpm durante 3min. El sobrenadante se utilizó para mezclar por triplicado y en partes iguales con el reactivo de Salkowsky en placas multipocillo, dejando reaccionar durante 30 min en oscuridad. Luego de este tiempo, se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm para determinar el contenido de auxinas en la muestra ([Figura 3.2.6d](#)). En cada placa multipocillo se incluyeron blancos (medio de cultivo DF + reactivo de Salkowsky) para determinar una lectura control ($DO_{control}$).

Aplicando similar criterio para la medida del *biofilm* con cristal violeta, los resultados de producción de auxinas se clasificaron en 4 categorías:

NEGATIVO (-): Absorbancia promedio menor a $DO_{control}$. Valor **AUX** = 0.

POBRE PRODUCTOR (+): Absorbancia promedio entre DO_c y $1,5*DO_c$. Valor **AUX** = 0,33.

MODERADO PRODUCTOR (++): Absorbancia promedio entre $1,5*DO_c$ y $3*DO_c$. Valor **AUX** = 0,67.

MUY PRODUCTOR (+++): Absorbancia promedio mayor a $3*DO_c$. Valor **AUX** = 1,0.

3.2.6.5 Cálculo del Índices de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (IMPCV) y de potencial promoción del crecimiento vegetal (IPPCV). Selección de aislamientos promisorios.

Se calculó un **índice de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (IMPCV)** que permitió comparar los diferentes aislamientos (*j*) entre sí en base a las características de promoción de crecimiento vegetal evaluadas *in vitro*.

El cálculo del **IMPCV** se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$IMPCV_j = \frac{ISolP_j + SID_j + FBN_j + AUX_j}{4}$$

Donde:

ISolP_j representa el valor del índice de solubilización de fósforo del aislamiento *j*.

SID_j representa el resultado de la caracterización de producción de sideróforos del aislamiento *j*.

FBN_j representa el resultado de la caracterización sobre la fijación biológica del nitrógeno del aislamiento *j*.

AUX_j representa el resultado de la caracterización respecto a la producción de auxinas del aislamiento *j*.

Además, se calculó un **índice de potencial promoción del crecimiento vegetal (IPPCV)** que permitió comparar los diferentes aislamientos (*j*) entre sí en base a sus características para colonizar y promover el crecimiento vegetal con el fin de seleccionar aquellos aislamientos más promisorios para continuar con la caracterización. La construcción de este índice otorga un mayor peso a las actividades de promoción del crecimiento vegetal en su cálculo.

El cálculo del **IPPCV** se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$IPPCV_j = \frac{ICV_j + (2 * IMPCV_j)}{2}$$

Donde:

ICV_j representa el índice de colonización vegetal del aislamiento *j*.

IMPCV_j representa el índice de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal del aislamiento *j*.

- Análisis multivariado de índices de actividad antagonista

Tomando los valores de **ICV**, **ISoIP**, **SID**, **FBN**, **AUX** e **IPPCV** de todos los aislamientos bacterianos de la colección, se realizó un análisis multivariado mediante el análisis de componentes principales (PCA). Los resultados del PCA se graficaron en un biplot, el cual permite visualizar tanto las observaciones (individuales o agrupadas en base a algún criterio de clasificación), así como el comportamiento de las variables originales en base a los componentes principales (CP) calculados. El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

- Selección de aislamientos bacterianos con potenciales características promotoras del crecimiento vegetal

Para continuar con los ensayos de promoción del crecimiento *in vivo*, se seleccionaron los 10 aislamientos bacterianos con mayor valor **IMPCV** y de **IPPCV**, los cuales representan a los más promisorios según las características evaluadas para ser utilizados como bioinsumos en cultivos hortícolas.

3.2.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS DE LECHUGA Y TOMATE

Los 10 aislamientos bacterianos seleccionados se utilizaron como inoculante experimental para evaluar su potencial efecto promotor del crecimiento vegetal *in vivo* sobre plantas de lechuga y tomate, en diferentes etapas del cultivo y diferentes condiciones productivas.

3.2.7.1 Ensayos en plantas de lechuga y tomate en etapa de plantín.

La etapa de plantín transcurre desde la siembra hasta el momento previo al trasplante al lugar definitivo donde crecerá el cultivo (ya sea a campo o en invernáculo). En el cultivo de lechuga, el plantín se encuentra listo para ser trasplantado cuando cuenta con 4 hojas (20-30 días desde la siembra dependiendo de las condiciones ambientales, variedades, etc); en el cultivo de tomate, esto sucede cuando el tallo adquiere el grosor de 6-8mm (30-40 días desde la siembra dependiendo de las condiciones ambientales, variedades, etc).

Los ensayos de promoción del crecimiento en etapa de plantín (Figura 3.2.7a) se llevaron a cabo en condiciones de crecimiento controladas (cámara de cultivo con temperatura y fotoperíodo controlados: 24°C y 8h

luz/16h oscuridad) en cultivo de lechuga y tomate; y en condiciones de crecimiento productivo a nivel comercial en cultivo de lechuga. En ambos casos, se siguieron los pasos que se describen a continuación:

1. Obtención de los cultivos bacterianos e inoculantes experimentales. Los 10 aislamientos bacterianos seleccionados se crecieron en medio de cultivo R₂A líquido en oscuridad a 30°C y agitación a 150rpm durante 48h. Se realizó el recuento de UFC ml⁻¹ mediante la técnica de recuento en placa y se midió el pH del cultivo bacteriano resultante. Los inoculantes experimentales se obtuvieron realizando una dilución 1:2 de los cultivos bacterianos.

2. Siembra e inoculación. Se utilizaron semillas de lechuga var. *sagess* y lechuga var. *emilia*, y semillas de tomate var. *elpida*, sin desinfección superficial. La siembra se realizó en bandejas multicelda (4 bandejas con 40 celdas por cada uno de los 11 tratamientos –Control + 10 aislamientos bacterianos–, N = 44) rellenas con sustrato comercial (Growmix multipro de Terrafertil® en los ensayos en cámara de cultivo y Klasmann T3 en vivero hortícola comercial), inoculándose a razón de 0,1 ml de inoculante experimental cada 1 ml de sustrato (bandejas para lechuga 15 ml celda⁻¹ de sustrato; bandejas para tomate: 25 ml celda⁻¹). En el tratamiento control (sin inoculante experimental) se añadió el mismo volumen de medio de cultivo R₂A previamente esterilizado.

3. Crecimiento de los plantines. Se mantuvieron regados manteniendo el sustrato a capacidad de campo durante todo el ensayo. Los ensayos en condiciones controladas, a los 15 días se regaron con solución nutritiva Hoagland para crecimiento de plantas (Composición detallada en [Tabla 7.1k del ANEXO C: Medio de Cultivos](#)) a razón de 1 y 2 ml celda⁻¹ para los plantines de lechuga y tomate, respectivamente. Los ensayos en condiciones productivas comerciales se llevaron adelante empleando el esquema productivo que comúnmente lleva la plantinera.

4. Evaluación del experimento. Cuando los plantines alcanzaron el desarrollo para ser trasplantados se evaluó la acumulación de biomasa en los plantines de los distintos tratamientos, discriminando entre el sistema radical y la parte aérea. Para esto, se sacaron 10 plantines al azar de cada una de las bandejas de crecimiento (4 bandejas por cada tratamiento, N = 44) y se lavaron las raíces para descartar la totalidad del sustrato dejando las raíces limpias. Posteriormente se separó el sistema radical de la parte aérea al nivel de cuello de la planta y se depositaron separadamente en sobres de papel (conteniendo cada sobre las 10 raíces y las 10 partes aéreas para generar un mayor peso y que tenga un menor error la determinación) que fueron llevados a estufa de desecación (60°C, hasta peso constante. También se midió el área foliar de las dos primeras hojas en plantines de lechuga y tomate mediante el registro fotográfico y cuantificación con el software Image J v1.53e ([Rueden et al., 2017](#)).

5. Análisis estadístico. Se aplicó a los datos de biomasa seca y área foliar (N=44) un ANAVA monofactorial (factor inoculación con 11 niveles: control sin inocular + 10 inoculantes experimentales) y el Test de Dunnett

($\alpha=0,05$) para comparación de las medias de los tratamientos inoculados respecto al control sin inocular. El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

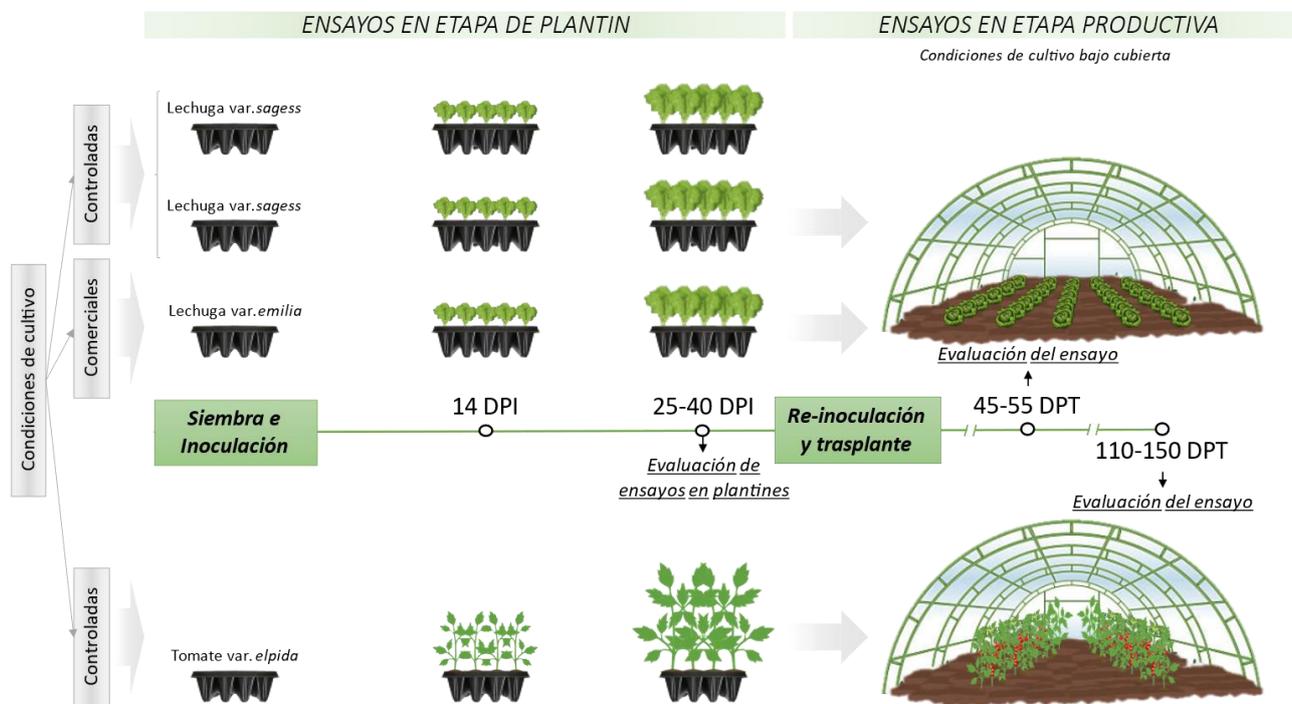


Figura 3.2.7a Esquema general de los ensayos de promoción del crecimiento vegetal en etapa de plantín en cultivo de lechuga y tomate y su continuación a ensayos en etapa productiva.

3.2.7.2 Ensayos en plantas de lechuga y tomate en etapa productiva

Los ensayos en etapa productiva se llevaron a cabo en invernáculos de la [Chacra Experimental Gorina](#) (Ministerio de Desarrollo Agrario, Provincia de Buenos Aires), ubicada en el CHP (-34.914597, -58.038621).

Previo al trasplante de los cultivos se tomaron muestras representativas del suelo de ambos invernáculos para realizar un análisis de las propiedades químicas de dichos suelos.

Los plantines de lechuga var. *sagess*, lechuga var. *emilia*, y tomate var. *elpida* que se trasplantaron a los invernáculos se inocularon a la siembra con los mismos inoculantes experimentales descritos previamente, los cuales se obtuvieron tal como se describió en los [ensayos de promoción del crecimiento en etapa de plantín](#). Cuando los plantines alcanzaron un desarrollo apto para ser llevados al terreno definitivo se reinocularon previo al trasplante a razón de 2 y 4 ml por plantin para lechuga y tomate, respectivamente, (bandejas para lechuga 15 ml celda⁻¹ de sustrato; bandejas para tomate: 25 ml celda⁻¹) poniendo el volumen total en un recipiente y dejando la bandeja con plantines dentro durante toda la noche de forma tal que el sustrato de los

plantines absorbiera por capilaridad todo el inoculante experimental. Posteriormente, se procedió con el trasplante a terreno definitivo en invernáculo, cuyo diseño del experimento, arreglo espacial y evaluación del ensayo se detallan a continuación para cada uno de los cultivos:

- Ensayo en cultivo de lechuga

Se realizaron dos ensayos en cultivo de lechuga empleando dos variedades diferentes: lechuga var. *sagess*, cuyos plantines se cultivaron en condiciones controladas de laboratorio; y lechuga var. *emilia*, cuyos plantines se cultivaron en condiciones productivas comerciales de plantinera. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe a continuación:

1. Diseño experimental. Los plantines de lechuga se dispusieron según un diseño experimental de bloques completos aleatorizados: se utilizaron 5 surcos (factor de bloqueo) de 32 m con separación de 1,0 m entre sí, repartiendo aleatoriamente en cada uno de los surcos los 11 tratamientos (CONTROL + 10 aislamientos bacterianos * 5 surcos = N = 55 parcelas). Cada tratamiento se ubicó en una parcela de 2,5 m dejando bordes de plantas de lechuga sin inocular en los extremos de cada surco, con marco de plantación en tresbolillo a 25 cm (8 plantas m⁻¹, 20 plantas por parcela).

2. Mantenimiento del cultivo y labores culturales. Las plantas se mantuvieron con riego por goteo, sin fertilización durante todo el ciclo de cultivo y sin aplicación de insecticidas/fungicidas. Solo se realizaron labores de carpido para mantener libre de malezas el cultivo y un seguimiento de las poblaciones plaga y del estado sanitario del cultivo.

3. Evaluación del experimento. Se registró el peso comercial por planta promedio de cada una de las parcelas (N=55), cosechando y pesando inmediatamente 5 plantas parcela⁻¹ seleccionadas aleatoriamente (evitando cosechar las plantas de los bordes).

4. Análisis estadístico. Se aplicó a los datos (N=55) un ANAVA ($\alpha=0,05$) monofactorial (factor inoculación con 11 niveles) con bloque (5 surcos), utilizando el Test de Dunnett ($\alpha=0,05$) para comparación de las medias de los tratamientos inoculados respecto al control sin inocular en caso de ser necesario. El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

- Ensayos en cultivo de tomate

Se realizó un único ensayo en cultivo de tomate var. *elpida*, empleando plantines que se cultivaron en condiciones controladas de laboratorio y se trasplantaron a invernáculo siguiendo los pasos que se describen a continuación:

1. Diseño experimental. Los plantines de tomate se dispusieron según un diseño experimental de bloques completos aleatorizados: se utilizaron 5 surcos (factor de bloqueo) de 50 m con separación de 1,10 m entre sí, repartiendo aleatoriamente en cada uno de los surcos los 11 tratamientos (CONTROL + 10 aislamientos bacterianos * 5 surcos = N = 55 parcelas). Cada tratamiento se ubicó en una parcela de 4 m dejando bordes con plantas de tomate sin inocular en los extremos de cada surco, utilizando un marco de plantación en línea a 45 cm (2,2 plantas m⁻¹, 9 plantas parcela⁻¹).

2. Mantenimiento del cultivo y labores culturales. Las plantas se mantuvieron con riego por goteo, sin fertilización durante todo el ciclo de cultivo y sin aplicación de insecticidas/fungicidas. Se realizaron labores de carpido para mantener libre de malezas el cultivo, tutorado de las plantas con sistema de colgado con hilo plano, desbrote durante todo el ciclo de cultivo y deshoje en las etapas finales del cultivo. También se realizó el seguimiento de las poblaciones plaga y del estado sanitario del cultivo.

3. Evaluación del experimento. Para la evaluación, de cada parcela se seleccionaron 3 plantas (evitando las dos plantas de los extremos de las parcelas, y seleccionando las 3 plantas centrales alternadas) que se marcaron y se evaluaron individualmente, para luego al final del ensayo obtener un promedio de las 3 plantas por parcela. Los datos que se recolectaron fueron N° de frutos planta⁻¹, peso de los frutos (g), y rendimiento total por planta (kg planta⁻¹). Para esto, se realizaron cosechas semanales durante 8 semanas consecutivas, llegando a cosechar desde la primera hasta la 6ta corona.

4. Análisis estadístico. Para cada variable determinada, se aplicó a los datos (N=55) un ANAVA ($\alpha=0,05$) monofactorial (factor inoculación con 11 niveles) con bloque (5 surcos), utilizando el Test de Dunnett ($\alpha=0,05$) para comparación de las medias de los tratamientos inoculados respecto al control sin inocular en caso de ser necesario. El software utilizado para estos análisis fue el Infostat v.2020 (di Rienzo et al., 2020).

3.2.8. APROXIMACIÓN AL NIVEL TAXONÓMICO ESPECIE DE AISLAMIENTOS CON MEJORES RESULTADOS EN ENSAYOS *IN VIVO*

Se construyeron arboles filogenéticos con el objetivo de aproximar la asignación taxonómica de especie en los aislamientos bacterianos del género *Bacillus* y *Pseudomonas* seleccionados por sus resultados en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

3.2.8.1 Aproximación a las especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas*

Se realizó una búsqueda por el buscador [Nucleotide](#) de la base de datos del NCBI de secuencias del gen ARNr 16S de todas las especies de *Bacillus*, y se creó un archivo con las secuencias de especies distintas encontradas (144 especies del género *Bacillus*). De igual modo se procedió con el género *Pseudomonas*, obteniéndose un archivo con 281 secuencias del gen ARNr 16S.

Con esta base de datos de secuencias de *Bacillus* y *Pseudomonas*, se realizó el alineamiento separadamente para cada género (ClustalW) incluyendo las secuencias de los aislamientos seleccionados y posteriormente se construyeron dos árboles filogenéticos por el método Neighbor-Joining con 1000 bootstrap utilizando el Software Geneious v2023.0.4 (Biomatters Ltd.; <http://www.geneious.com>, Kears e et al. 2012).

3.3 RESULTADOS

3.3.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS, CONTROL DE DESINFECCIÓN Y RECuentOS BACTERIANOS.

A partir de las muestras de suelo, rizosfera, raíz, tallo y fruto de plantas de tomate fue posible obtener satisfactoriamente un gran número y diversidad de colonias bacterianas en las distintas placas con medio de cultivo para heterótrofos. La desinfección superficial de órganos vegetales fue satisfactoria ya que en ninguno de los casos se observó crecimiento bacteriano, lo que evidencia que los crecimientos bacterianos observados como resultado del macerado y plaqueo de estas muestras vegetales provienen del interior de dichos órganos, considerando que son bacterias endófitas.

El recuento poblacional bacteriano (en UFC g⁻¹) promedio para las 3 réplicas de cada una de las muestras para ambos sitios evaluados se muestra en la [Figura 3.3.1a](#). Los resultados de [recuento poblacional](#) detallados para cada una de las muestras procesadas para la obtención de aislamientos, así como el [análisis estadístico de poblaciones](#) bacterianas, se encuentran en el [ANEXO B](#).

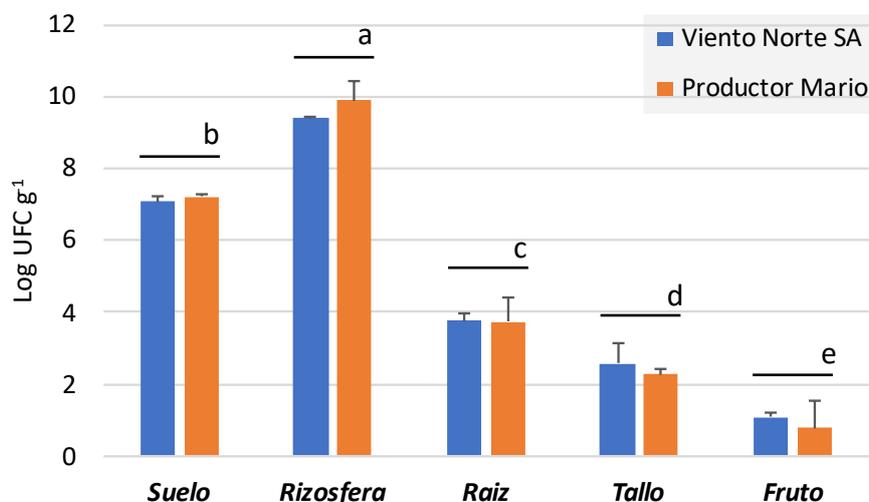


Figura 3.3.1a Recuento bacteriano en UFC g⁻¹ promedio (\pm SD) de tres réplicas obtenido en cada una de los microhábitats para ambos sitios en estudio. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

- ❖ El mayor recuento poblacional bacteriano se observa en muestras de rizosfera, continuando en orden decreciente en muestras de suelo, y endosfera de raíz, tallo y fruto. Las principales diferencias en los recuentos poblacionales ocurren según el microhábitat ($p < 0,01$)
- ❖ Particularmente en la comparación entre ambos sitios, no se observan diferencias significativas en el recuento bacteriano para las distintas muestras evaluadas ($p = 0,93$).

3.3.2. SELECCIÓN DE MORFOTIPOS, AISLAMIENTO Y GENERACIÓN DE LA COLECCIÓN

Para el aislamiento y generación de la colección de bacterias, se utilizaron las mismas placas de petri de los recuentos bacterianos, a partir de las cuales se observaron las características morfológicas macroscópicas de las distintas colonias (Figura 3.3.2a) y se seleccionaron los diferentes morfotipos.

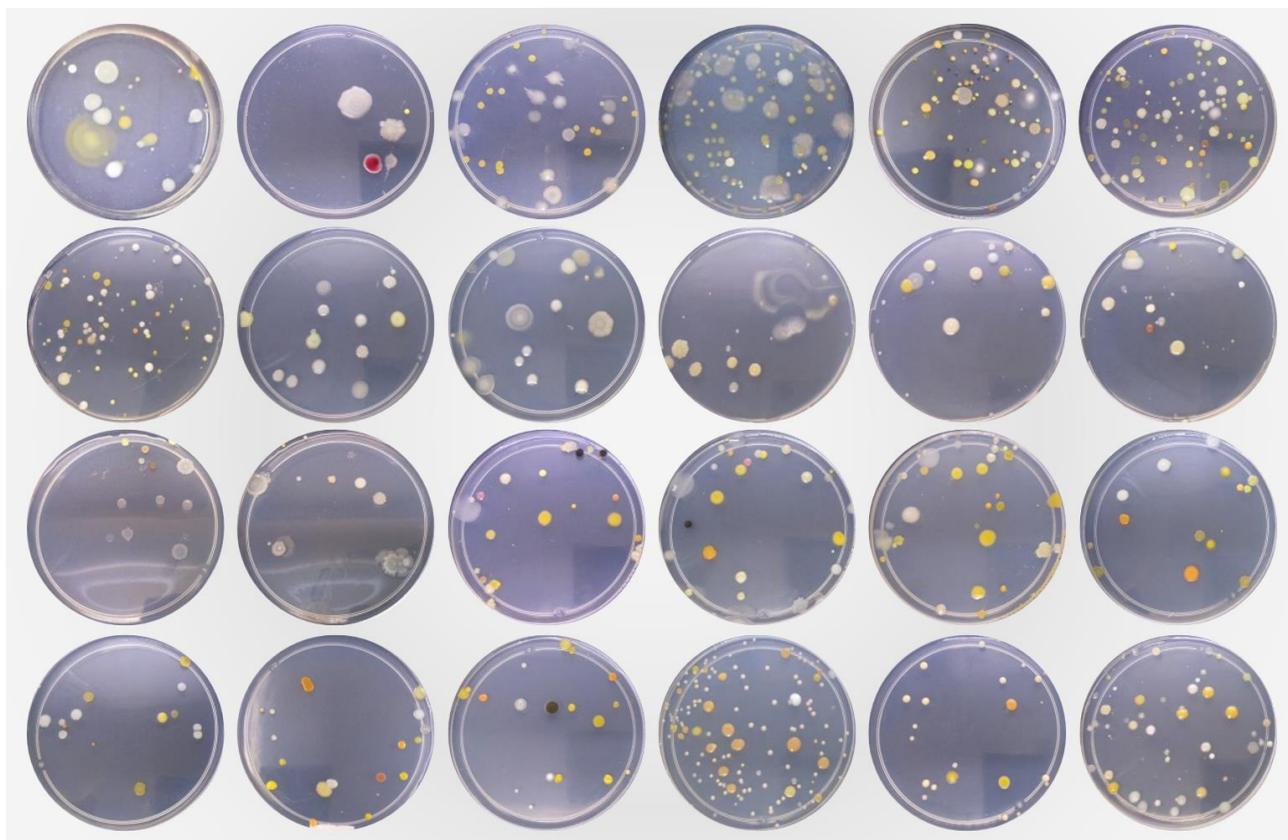


Figura 3.3.2a. Fotografía de algunas de las placas de petri correspondientes a las muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de ambos establecimientos hortícolas del CHP. Total de placas = 120.

En total se seleccionaron 283 morfotipos de todas las muestras de ambos sitios, los cuales se aislaron y se conservaron como cultivos puros para conformar la colección de bacterias. En la Figura 3.3.2b se muestra en detalle el número de aislamientos bacterianos por cada muestra de cada establecimiento.

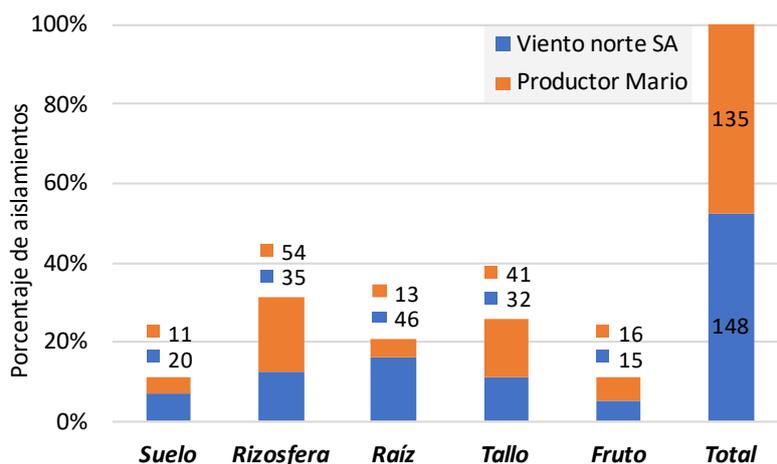


Figura 3.3.2b. Aislamientos bacterianos obtenidos en cada una de los microhábitats para ambos sitios en estudio. Los datos se expresan en porcentaje en el eje (Y), y los valores numéricos asociados a las barras dentro del gráfico denotan el número de aislamientos de cada sitio.

La selección y el aislamiento de los distintos morfotipos se realizó con el objetivo de aislar la mayor diversidad (no la totalidad) de bacterias cultivables posible de cada microhábitat en estudio. Con este criterio consideramos válidos los análisis de resultados que se realizan *a posteriori* respecto a la comparación entre las características de las bacterias cultivables de los distintos microhábitats (ya que se aisló toda la diversidad posible de cada uno de ellos), no así la comparación entre establecimientos (ya que puede ocurrir que un morfotipo aislado de una muestra tomada en un establecimiento se haya visualizado en la misma muestra del otro establecimiento y, por presentar características similares, no se haya aislado de este último).

Si bien la selección en base a características macroscópicas de colonias bacterianas resultó subjetiva a la hora de seleccionarlas para su aislamiento, se pueden ver algunas diferencias claras en el número de morfotipos encontrados en cada uno de los microhábitats, lo que sugiere una idea de la diversidad de bacterias cultivables muy distinta que se encontró en cada muestra por la técnica de aislamiento empleando el medio de cultivo R₂A. En base a esto, en orden decreciente se encontraron mayores números de morfotipos distintos en rizosfera, endosfera de tallo y endosfera de raíz, con un menor número en suelo y endosfera de fruto.

De los 283 aislamientos obtenidos inicialmente, 24 de ellos no se pudieron recuperar luego de guardarlos en freezer a -80°C. Finalmente, se pudo contar con 259 aislamientos para la caracterización de potencial biocontrolador y potencial promotor del crecimiento vegetal.

3.3.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS DE LA COLECCIÓN

Se lograron identificar los 150 aislamientos bacterianos endófitos de la colección, sumados a algunos (10) aislamientos de rizosfera que resultaron promisorios en las caracterizaciones como antagonistas y/o promotores del crecimiento vegetal. Los resultados detallados se encuentran en la [Tabla 6.1.2a](#) del [ANEXO B](#).

En la [Tabla 3.3.3a](#), la [Figura 3.3.3a](#) y la [Figura 3.3.3b](#) se resume la asignación taxonómica de los 160 aislamientos bacterianos:

Tabla 3.3.3a Resultado de la asignación taxonómica de los aislamientos bacterianos endófitos (150) y algunos de rizosfera (10) de la colección bacteriana, indicando los niveles taxonómicos de phylum, clase, orden y género y el número de aislamientos correspondiente a cada género. Se resaltan de la tabla los géneros con mayor número de aislamientos.

Phylum	Clase	Orden	Género	N° de aislamientos	
Actinobacteria (48)	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Brevibacterium</i>	2	
			<i>Brachybacterium</i>	4	
			<i>Janibacter</i>	2	
			<i>Curtobacterium</i>	17	
			<i>Microbacterium</i>	14	
			<i>Arthrobacter</i>	4	
			<i>Paenarthrobacter</i>	1	
			<i>Pseudoarthrobacter</i>	2	
			<i>Cellulosimicrobium</i>	1	
			<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardioide</i>	1
Bacteroidete (9)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Chryseobacterium</i>	8	
			<i>Flavobacterium</i>	1	
Firmicutes (43)	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus</i>	34	
			<i>Fictibacillus</i>	1	
			<i>Paenibacillus</i>	1	
			<i>Peribacillus</i>	3	
			<i>Priestia</i>	4	
Proteobacteria (60)	<i>Alfaproteobacteria</i>	<i>hyphomicrobiales</i>	<i>Agrobacterium</i>	1	
			<i>Phyllobacterium</i>	1	
			<i>Ensifer</i>	1	
			<i>Rhizobium</i>	1	
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonas</i>	1
			<i>Enterobacter</i>	5	
			<i>Kluyvera</i>	1	
			<i>Leclercia</i>	1	
			<i>Pantoea</i>	8	
			<i>Pectobacterium</i>	1	
<i>Serratia</i>	1				
<i>Lysobacterales</i>	<i>Luteibacter</i>	5			
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i>	28			
<i>Xanthomonadales</i>	<i>Lysobacter</i>	1			
	<i>Stenotrophomonas</i>	3			
<i>Xanthomonas</i>	1				

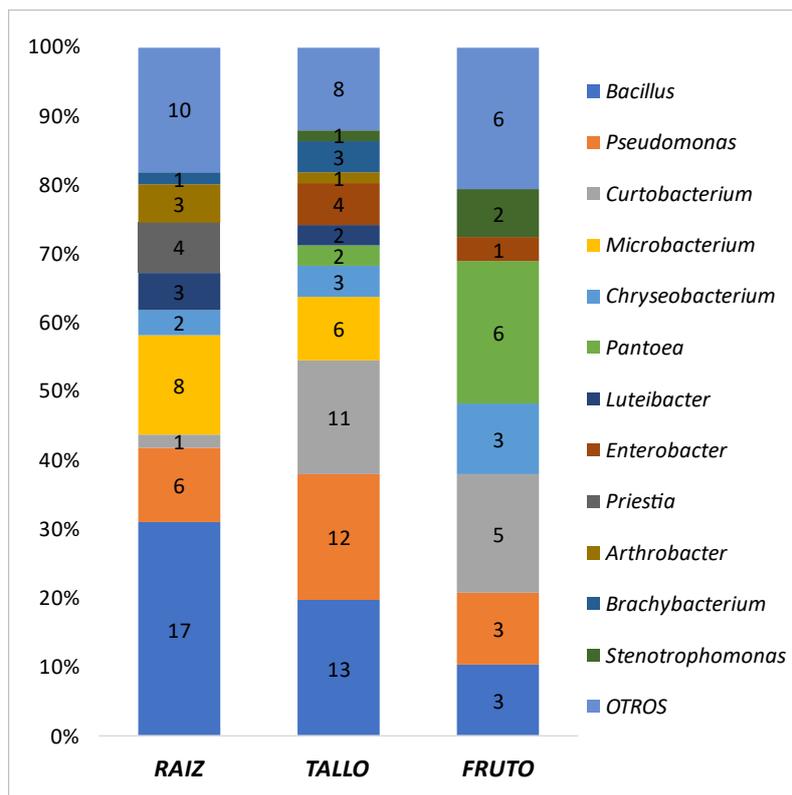


Figura 3.3.3a Géneros con mayor número de representantes asignados a los aislamientos endófitos de la colección bacteriana, detallados en base al órgano vegetal del cual fueron aislados.

❖ A niveles taxonómicos generales, los aislamientos de bacterias endófitas asociadas a raíz, tallo y fruto de tomate se asignaron a los phylum *Proteobacteria* (37,5%) *Actinobacteria*, *Firmicutes*, y *Bacteroidetes*, en orden decreciente.

❖ En total, se encontraron 33 géneros bacterianos: los géneros con más cantidad de representantes entre los aislamientos endófitos fueron (en orden decreciente): *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Chryseobacterium* y *Pantoea*.

❖ En endosfera de raíz, tallo y fruto se encontraron aislamientos bacterianos pertenecientes a 18, 20 y 14 géneros, respectivamente.

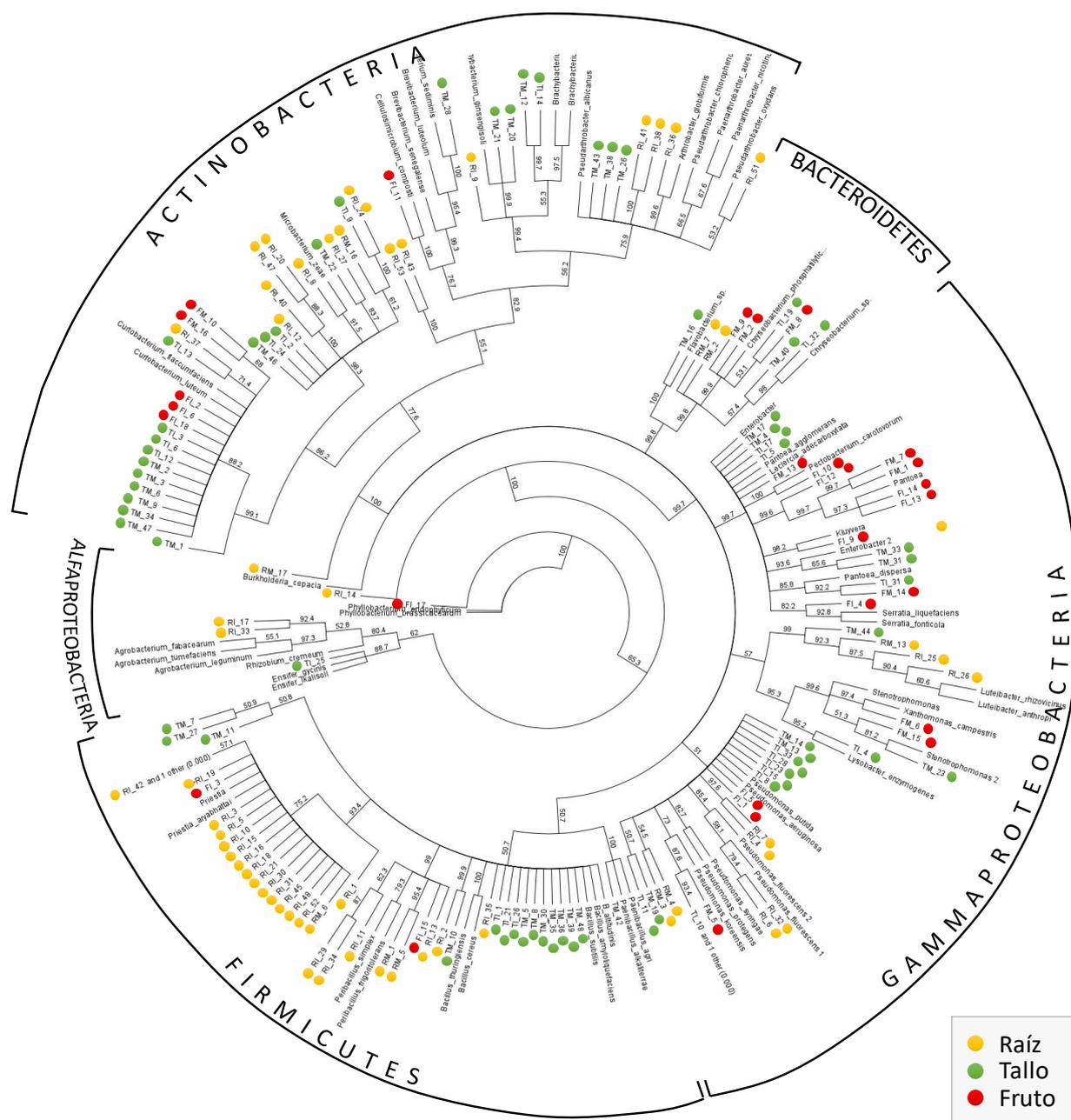


Figura 3.3.3b Árbol filogenético de aislamientos bacterianos endófitos realizado en base a secuencias parciales del gen ARNr 16S utilizando el método Neighbor-Joining. Los números en los nodos del árbol indican el porcentaje estadístico de 1000 bootstrap. Los puntos de colores indican los órganos vegetales de los cuales se obtuvieron los aislamientos.

❖ Los resultados del agrupamiento evidenciado por el análisis filogenético (**Figura 3.3.3b**) fueron consistentes con los alineamientos de mayor *score* de las secuencias de cada aislamiento con la base de datos del Gen Bank (**Tabla 6.1.2a** del **ANEXO B**).

❖ Los 4 phylum estuvieron representados en todos los órganos vegetales. Particularmente los aislamientos bacterianos pertenecientes al phylum Firmicutes fueron mayormente aislados del interior de raíz y de tallo, con pocos representantes en endosfera de fruto.

❖ Se observaron diferentes *clústeres*, algunos conformados por aislamientos bacterianos provenientes de distintos establecimientos y órganos vegetales, que evidencian su cercanía filogenética. Esto podría significar que correspondan al mismo género, aunque no asegura coincidencias a nivel de especie, dado el nivel resolutivo del árbol filogenético construido.

3.3.4. POTENCIAL DE COLONIZACIÓN VEGETAL

3.3.4.1 Actividad de enzimas líticas extracelulares con implicancia en la colonización vegetal

Se logró caracterizar *in vitro* la mayoría de los aislamientos bacterianos de la colección en relación a la producción de enzimas pectinasas y celulasas extracelulares, las cuales están relacionadas con la colonización bacteriana de órganos vegetales. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.2.1a](#) del ANEXO B.

En la [Figura 3.3.4a](#) se detalla el porcentaje de aislamientos bacterianos con actividad celulasa y pectinasa positiva (+), y con resultado no determinado por ausencia de crecimiento en el medio de cultivo de la determinación.

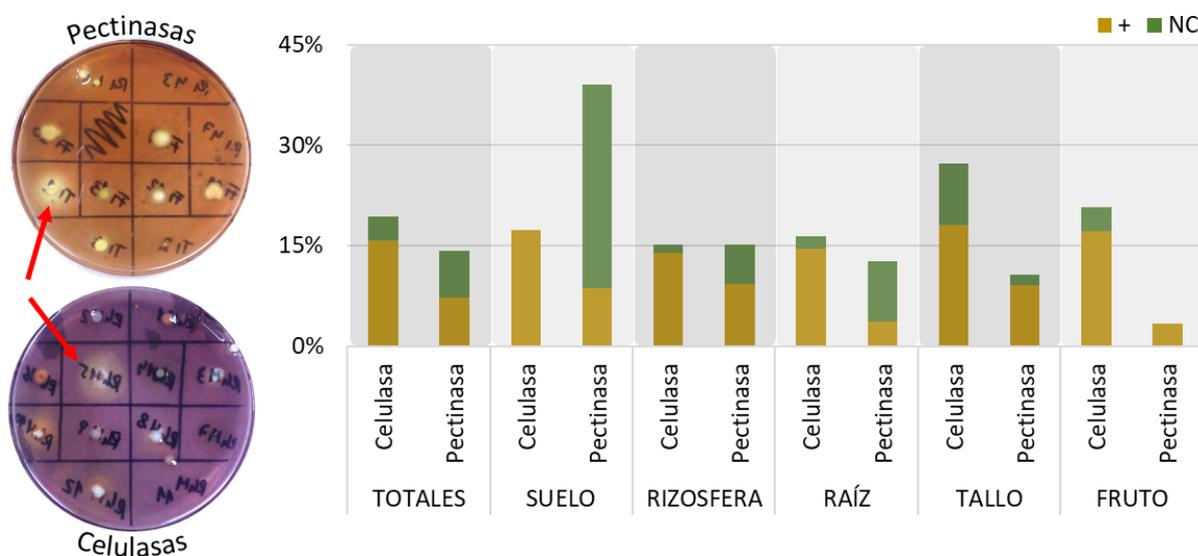


Figura 3.3.4a Porcentaje de aislamientos bacterianos con resultado *positivo* (+) y *no determinado* (NC) en la caracterización de enzimas líticas involucradas en la colonización vegetal (celulasa y pectinasa), detallando los resultados para el total de la colección y discriminado según el microhábitat de aislamiento. El porcentaje restante para completar el 100% se corresponde a los aislamientos con resultado negativo en las determinaciones.

❖ De los 259 aislamientos bacterianos de la colección se encontró mayor número de aislamientos con actividad celulasa respecto al número de aislamientos con actividad pectinasa (15,8% y 7,3%, respectivamente).

❖ Ambas actividades enzimáticas se encontraron en aislamientos de todos los microhábitats, tanto de suelo como de órganos vegetales, en similares proporciones y observándose el mismo patrón mencionado en el punto anterior.

Del total de la colección, se encontró que 52 de ellos (20,1%) mostraron al menos una actividad enzimática, y solo 8 aislamientos mostraron producir ambas enzimas líticas. Dentro de los 8 aislamientos bacterianos que mostraron actividad positiva para las dos enzimas, la mayoría (6) fueron aislados de rizosfera, habiéndose obtenido los otros dos de suelo y el interior de tallo.

En la [Figura 3.3.4b](#) se resume los géneros bacterianos y la muestra de donde provienen los aislamientos con actividad enzimática celulasa y pectinasa positiva:

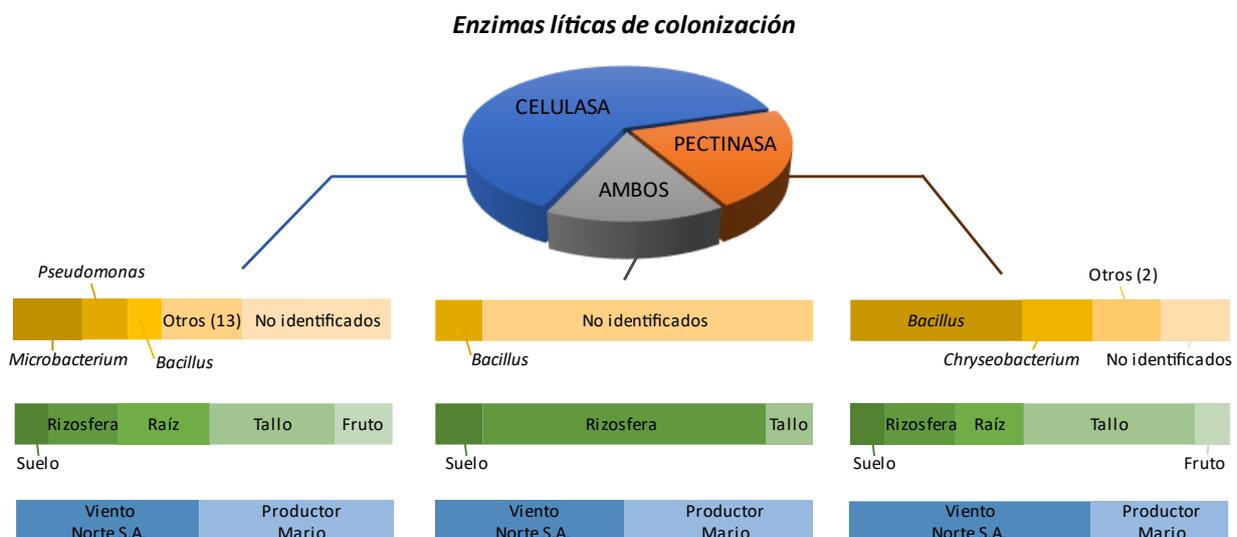


Figura 3.3.4b Proporción de las actividades enzimáticas celulasa y pectinasa evidenciadas en los ensayos *in vitro*, géneros bacterianos que las llevan a cabo y tipo de muestra de donde se aislaron.

❖ Respecto a los géneros bacterianos que llevan a cabo estas actividades se destaca la presencia de los géneros *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Pantoea* para la actividad celulasa y los géneros *Bacillus* y *Chryseobacterium* para la actividad pectinasa.

❖ En relación a la muestra de donde provienen se observa que prácticamente no hay diferencias entre la proporción de aislamientos positivos entre los establecimientos Viento Norte y Productor Mario, aunque

sí se puede destacar que la mayoría de los aislamientos positivos a celulasa y pectinasa provienen de rizosfera y endosfera de raíz y tallo.

3.3.4.2 Capacidad de crecimiento formando biofilm

Se logró caracterizar *in vitro* (en placas multipocillo) la totalidad de los aislamientos bacterianos de la colección respecto a la capacidad de crecer formando biofilm, las cual se relaciona con la colonización bacteriana de órganos vegetales. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.2.1a](#) del ANEXO B. En la [Figura 3.3.4c](#) se muestra una fotografía de cómo se observaban los biofilms bacterianos en la placa multipocillo luego de la tinción con cristal violeta. Los resultados respecto a esta determinación se resumen en la [Figura 3.3.4d](#).

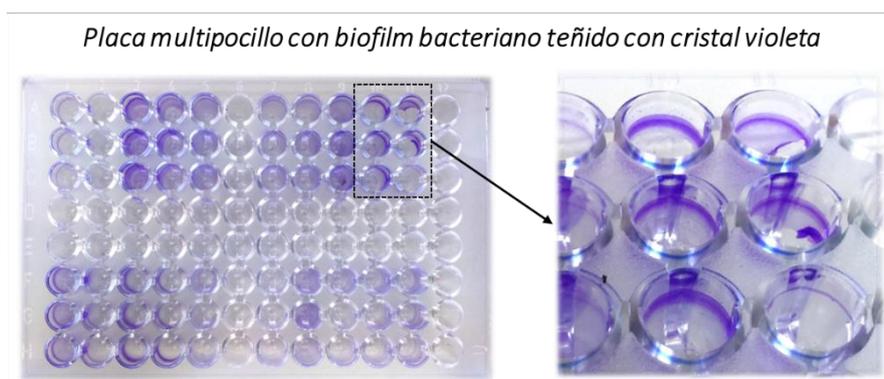


Figura 3.3.4c Fotografía de la placa multipocillo luego de la tinción con cristal violeta para evidenciar la presencia de biofilm bacteriano

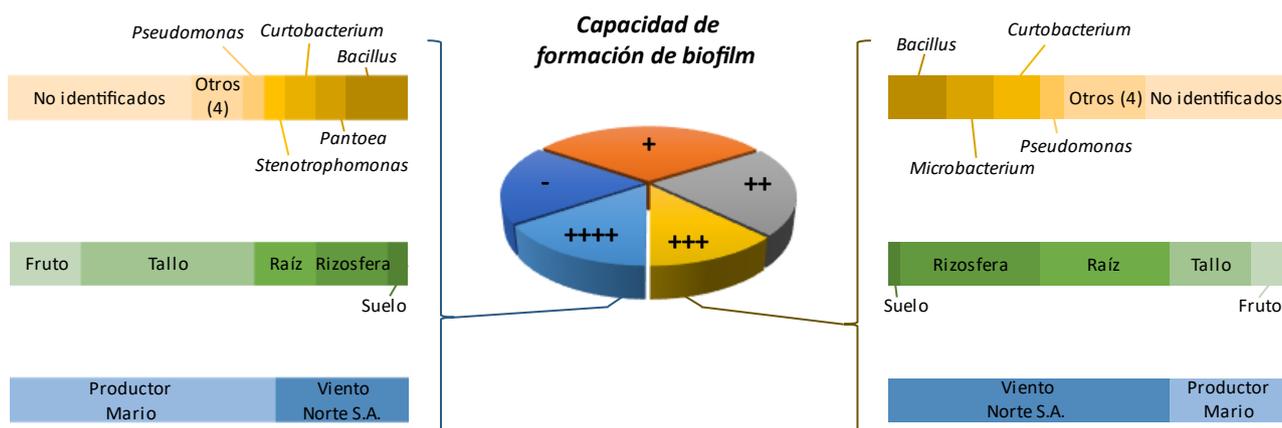


Figura 3.3.4d Proporción de aislamientos bacterianos con nula (-), pobre (+), moderada (++) y muy buena (+++) y fuerte (++++), capacidad de crecer formando biofilm, géneros bacterianos y tipo de muestra de donde se aislaron los mayores formadores de biofilm.

❖ El 50,6% de los aislamientos bacterianos mostró nula o pobre capacidad para formar biofilm en las condiciones ensayadas, mientras que 34,2% de los aislamientos resultaron en moderados/muy buenos formadores de biofilm y el 15,2% restante mostró una fuerte formación de biofilm.

❖ Los aislamientos bacterianos caracterizados como muy buenos formadores de biofilm (+++) y fuertes formadores de biofilm (++++) fueron aislados en su mayoría (>50%) de endosfera de las plantas de tomate.

❖ Los géneros más relevantes con esta característica son *Bacillus*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, y *Pseudomonas*.

3.3.4.3 Índice de Colonización Vegetal: ICV

El Índice de Colonización Vegetal calculado a partir de los ensayos *in vitro* sobre la producción de enzimas líticas de colonización y la capacidad de formación de biofilm permite comparar entre los aislamientos bacterianos de la colección y encontrar fácilmente aquellos con mayores capacidades potenciales de colonizar eficientemente los tejidos vegetales. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.2.1a](#) del [ANEXO B](#).

Los aislamientos con mayores valores del **ICV** ($ICV \geq 0,75$) se detallan en la [Tabla 3.3.4a](#):

Tabla 3.3.4a Aislamientos bacterianos con mejores resultados del índice de Colonización Vegetal (ICV), detallando la taxonomía y el resultado obtenido en las caracterizaciones enzimáticas y de producción de biofilm.

Género	Aislamiento	Celulasa	Pectinasa	ICEC	Biofilm	Bf	ICV
<i>Pseudomonas</i>	RhM 20	NC	+	1,0	++++	1	1,00
<i>Bacillus</i>	TM 30	+	+	1,0	++++	1	1,00
No identificado	RhM 38	+	+	1,0	++++	1	1,00
No identificado	RhI 22	+	+	1,0	+++	0,75	0,88
<i>Bacillus</i>	TI 26	-	+	0,5	++++	1	0,75
<i>Pseudomonas</i>	TM 14	+	-	0,5	++++	1	0,75
<i>Flavobacterium</i>	TM 16	+	-	0,5	++++	1	0,75
<i>Bacillus</i>	TM 27	+	-	0,5	++++	1	0,75
<i>Bacillus</i>	RM 1	+	-	0,5	++++	1	0,75
<i>Enterobacter</i>	TM 17	+	-	0,5	++++	1	0,75
No identificado	RhM 33	+	-	0,5	++++	1	0,75
No identificado	RhM 12	+	+	1,0	++	0,5	0,75

❖ Solo 12 aislamientos obtuvieron un $ICV \geq 0,75$. Se destaca que todos estos aislamientos fueron obtenidos de muestras de microhábitats relacionados a las plantas, justamente donde se espera que abunden bacterias con estas características.

❖ Entre los géneros más destacados encontramos *Bacillus* (4), *Pseudomonas* (2) y *Flavobacterium* y *Enterobacter*, los cuales se destacan por ser en su mayoría fuertes formadores de biofilm y presentar al menos una de las actividades enzimáticas involucradas en la colonización.

3.3.5. POTENCIAL ANTAGONISMO CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS

3.3.5.1 Producción de enzimas líticas extracelulares con efecto antagonista

Se logró caracterizar *in vitro* la mayoría de los aislamientos bacterianos de la colección en relación a la producción extracelular de enzimas líticas con efecto antagonista (proteasas, lipasas, amilasas y quitinasas). Los medios de cultivo para determinación de quitinasas y lipasas fueron los que más cantidad de aislamientos sin determinar obtuvieron (7,3% y 9,7%, respectivamente) ya que no se evidenció crecimiento bacteriano (indicado en tablas y figuras como **NC**). En la [Figura 3.3.5a](#) se muestran fotografías de las placas de petri de cada determinación enzimática para ilustrar la lectura de resultados positivos para los distintos aislamientos bacterianos de la colección. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.2.1a](#) del [ANEXO B](#).

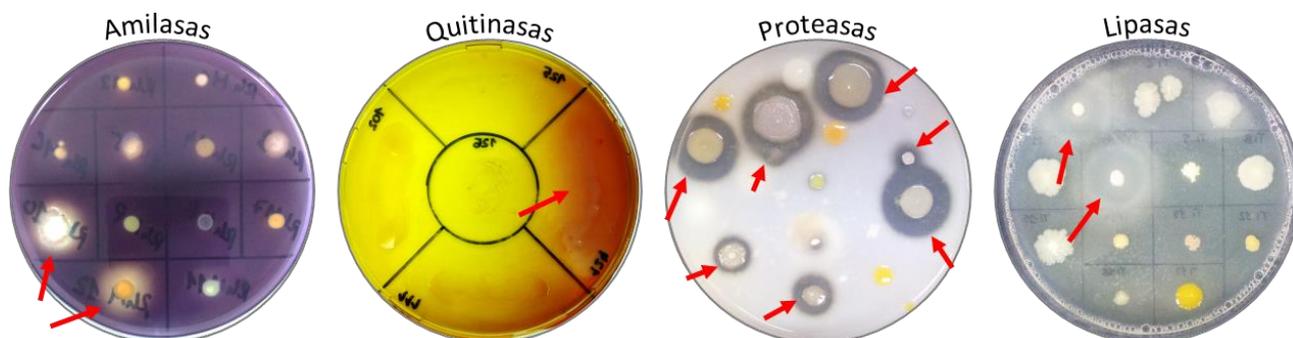


Figura 3.3.5a Fotografía de las placas de petri al momento de la lectura de resultados de las determinaciones enzimáticas de los distintos aislamientos bacterianos de la colección relacionadas a la interacción antagonista entre bacterias y hongos. Las flechas color rojo indican resultados positivos a la actividad enzimática.

De los 259 aislamientos bacterianos caracterizados se encontró que 106 de ellos (40,9%) mostraron al menos una actividad enzimática proteasa, lipasa, amilasa y/o quitinasa positiva:

- 72 aislamientos mostraron una única actividad enzimática positiva (27,8%).
- 30 aislamientos mostraron dos actividades enzimáticas positivas (11,6%).

→ 4 aislamientos mostraron tres actividades enzimáticas positivas (1,5%).

→ Ninguno demostró tener las 4 actividades enzimáticas positivas.

En la [Figura 3.3.5b](#) se detalla el porcentaje de aislamientos bacterianos con actividad enzimática de antagonismo positiva (+), y con resultado no determinado por ausencia de crecimiento en el medio de cultivo de la determinación.

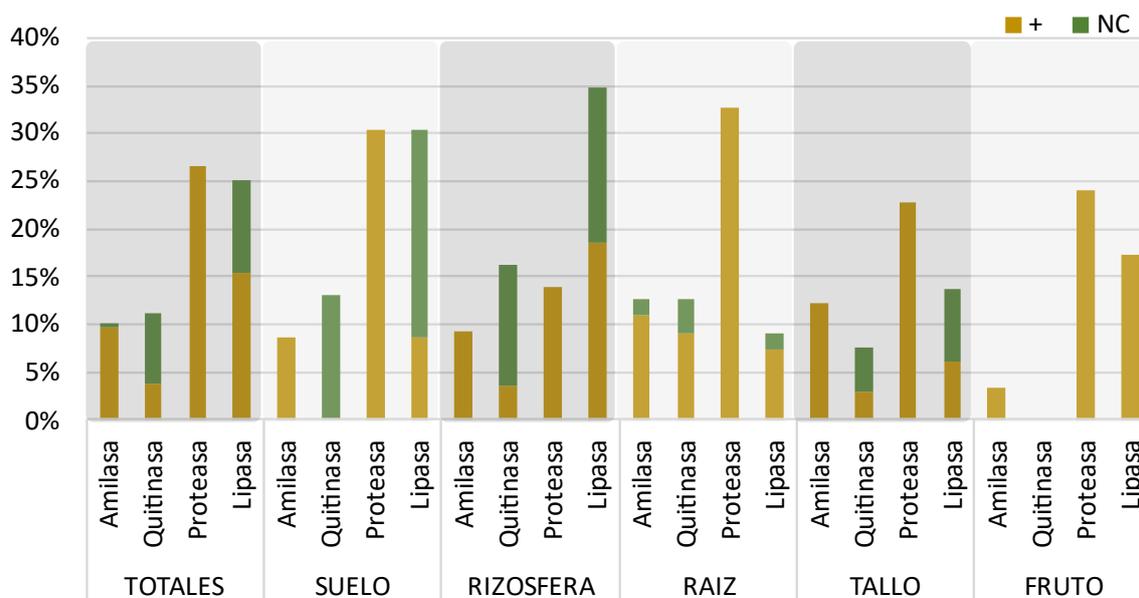


Figura 3.3.5b Porcentaje de aislamientos bacterianos con resultado *positivo (+)* y *no determinado (NC)* en la caracterización de enzimas líticas involucradas en la interacción antagonista contra hongos fitopatógenos, detallando los resultados para el total de la colección y discriminado según el microhábitat de aislamiento. El porcentaje restante para completar el 100% se corresponde a los aislamientos con resultado negativo en las determinaciones.

❖ La proteólisis fue la actividad enzimática con mayor presencia entre los aislamientos bacterianos (26,6%), seguida por lipasas (15,4%), amilasas (9,7%), y quitinasas (3,9%) ([Figura 3.3.5a](#)).

❖ Los aislamientos bacterianos de tejidos internos de raíces de tomate fueron los que mostraron mayor actividad enzimática en general, con un promedio para las 4 enzimas evaluadas de 16,5% de positividad, siendo la actividad proteasa la más importante presente en el 37,5% de los aislamientos endófitos de raíz (18 aislamientos bacterianos).

❖ En este mismo sentido, los aislamientos asociados a los ecosistemas subterráneos (suelo, rizosfera y endófitos de raíz) mostraron levemente una mayor actividad de enzimas líticas con efecto antagonista respecto a los aislamientos asociados a muestras de ecosistemas aéreos (endófitos de tallo y fruto) (13,8% vs 11,8%, respectivamente).

En lo que respecta a las determinaciones enzimáticas de antagonismo, se identificaron 17 géneros que realizan al menos una de las 4 actividades líticas determinadas, teniendo en cuenta que 56 aislamientos bacterianos no fueron identificados. La información para cada actividad enzimática se detalla en la Figura 3.3.5c.

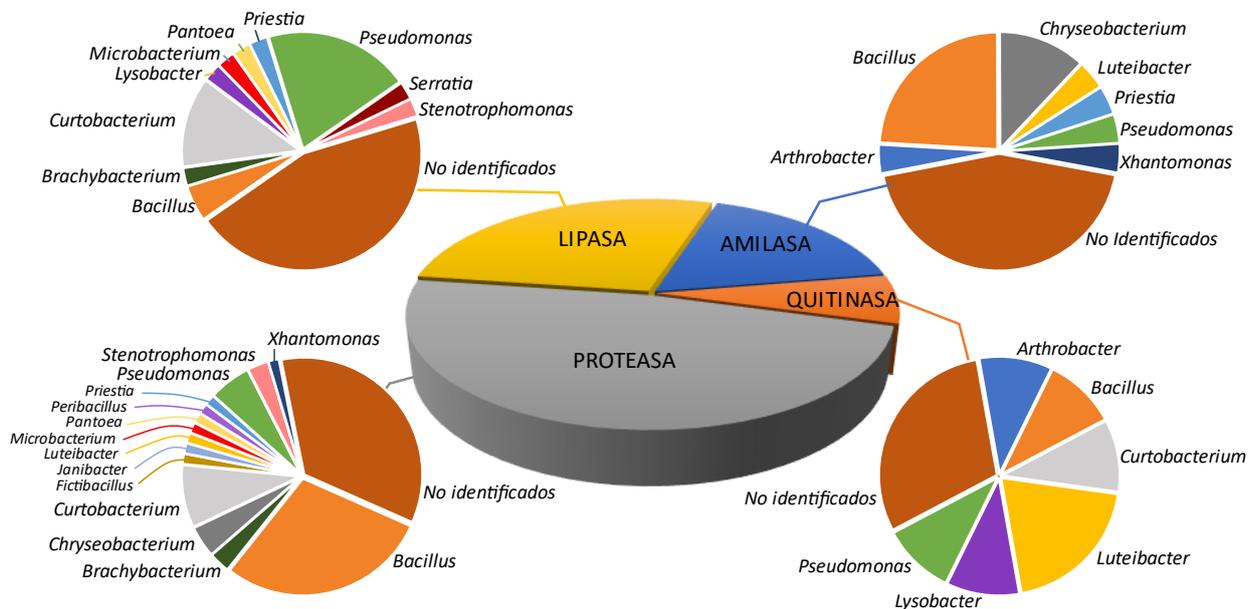


Figura 3.5.5c proporción de las distintas actividades enzimáticas evidenciadas en los ensayos *in vitro* y géneros que las llevan a cabo.

❖ Los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Curtobacterium* fueron los aislamientos que mayor positividad mostraron en promedio para las 4 actividades enzimáticas determinadas (20,1%, 9,7% y 8,3%, respectivamente), destacándose la actividad amilasa y proteasa en el género *Bacillus*; la actividad lipasa en el género *Pseudomonas* y la actividad proteasa y lipasa al género *Curtobacterium* (Figura 3.3.5b).

❖ La actividad proteasa, y en menor medida lipasa, son llevadas a cabo por una mayor diversidad de géneros (14 y 10 géneros, respectivamente) en comparación con la actividad quitinasa, cuyos aislamientos bacterianos positivos se reparten entre 5 géneros bacterianos.

❖ De la totalidad de aislamientos bacterianos con actividades enzimáticas de efecto antagonista positivas un 65,3% provienen del establecimiento Viento Norte y el 34,7% restante del establecimiento del productor Mario.

- Índice de caracterización enzimática de antagonismo: icea

Respecto al Índice de Caracterización Enzimática Antagonista (**ICEA**), se obtuvieron valores entre 0,25 (aislamientos con una sola actividad enzimática) y 1, un único aislamiento bacteriano con 3 actividades positivas

(amilasa, proteasa y lipasa) y quitinasa sin determinar porque no creció en dicho medio de cultivo. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.2.1a](#) del [ANEXO B](#).

Los 10 aislamientos con mayor ICEA ([Tabla 3.3.5a](#)) provienen de diferentes muestras de suelo, rizosfera, raíz, tallo y fruto, y 8 de ellos particularmente del establecimiento del productor Mario.

Tabla 3.3.5a aislamientos bacterianos con mayor índice de caracterización enzimática antagonista (*ICEA*)

<i>Muestra</i>	<i>Género</i>	<i>Amilasa</i>	<i>Quitinasa</i>	<i>Proteasa</i>	<i>Lipasa</i>	<i>ICEA</i>
RhM 10	No identificado	+	NC	+	+	1,00
RhM 24	No identificado	-	+	+	+	0,75
RhM 38	No identificado	+	-	+	+	0,75
SM 2	No identificado	+	-	+	+	0,75
RM 1	<i>Bacillus</i>	-	NC	+	+	0,67
SM 9	No identificado	-	NC	+	+	0,67
TM 30	<i>Bacillus</i>	+	NC	+	-	0,67
TM 36	<i>Bacillus</i>	+	NC	+	-	0,67
FI 11	<i>Cellulosimicrobium</i>	-	-	+	+	0,50
FI 12	<i>Pantoea</i>	-	-	+	+	0,50

3.3.5.2 Ensayos de antagonismo en cultivos duales en placa contra hongos fitopatógenos

Se logró caracterizar *in vitro* a todos los aislamientos bacterianos de la colección en relación al antagonismo en enfrentamientos en placa contra los 4 hongos fitopatógenos elegidos para esta determinación: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum* ([Figura 3.3.5d](#)).

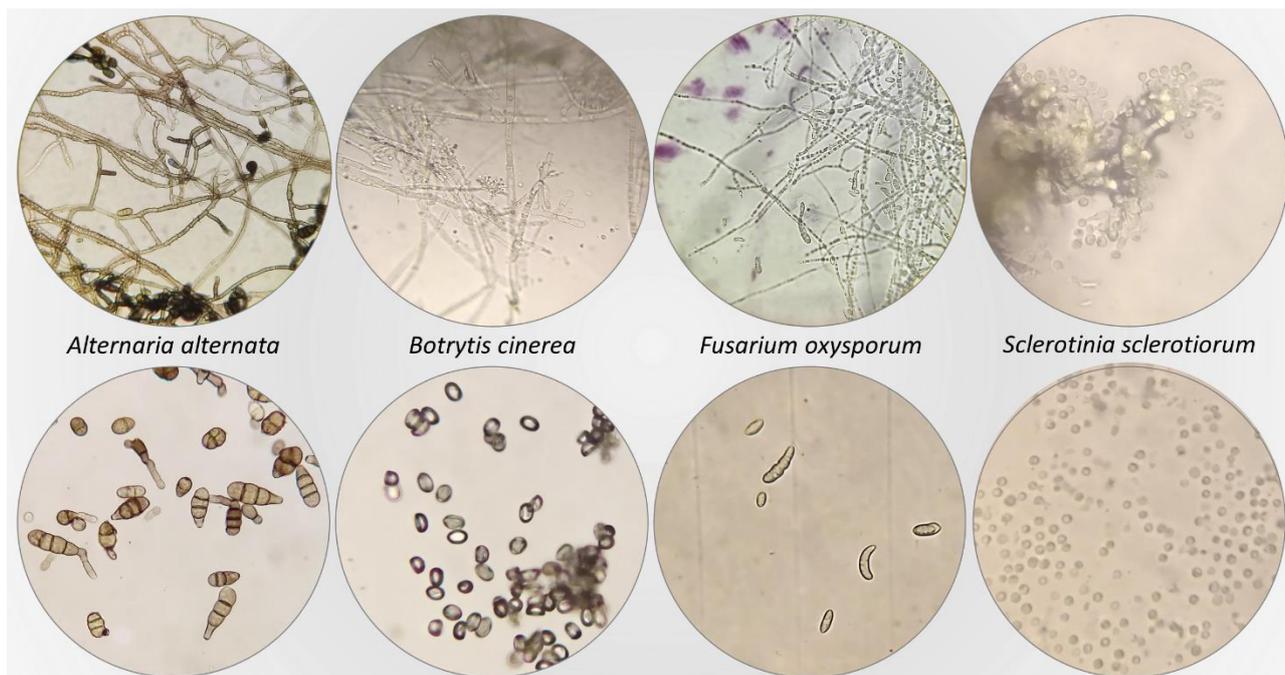


Figura 3.3.5d Imágenes de microscopía de los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, y *Sclerotinia sclerotiorum*, mostrando hifas y estructuras reproductivas

De todos los aislamientos con actividad antagonista positiva en los ensayos *in vitro* se encontró que:

- 66 aislamientos fueron capaces de inhibir al menos el 20% del crecimiento radial de *Alternaria alternata*.
- 27 aislamientos fueron capaces de inhibir al menos el 20% del crecimiento radial de *Botrytis cinerea*.
- 56 aislamientos fueron capaces de inhibir al menos el 20% del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum*.
- 24 aislamientos fueron capaces de inhibir al menos el 20% del crecimiento radial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

En total se encontraron 91 aislamientos (~35% de la colección bacteriana) capaces de inhibir el crecimiento de al menos uno de los hongos fitopatógenos evaluados, de los cuales la gran mayoría inhibió solamente uno de los fitopatógenos utilizados en las determinaciones; solo 14 mostraron antagonismo en placa frente a los 4 hongos fitopatógenos (Figura 3.3.5e).

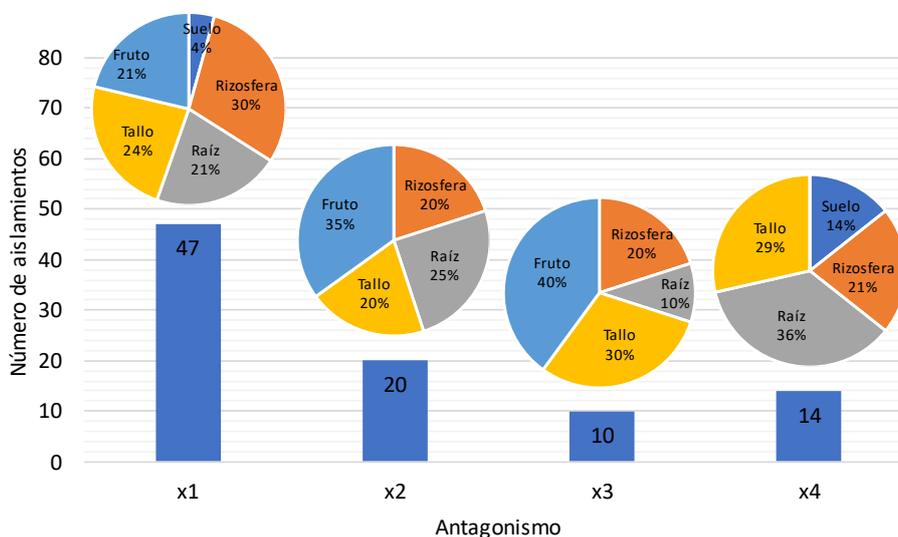


Figura 3.3.5e Número de aislamientos con antagonismo positivo contra uno (x1), dos (x2), tres (x3), o cuatro (x4) hongos fitopatógenos ensayados, discriminando según la muestra de origen de los aislamientos. El gráfico de barras indica la cantidad de aislamientos bacterianos y el gráfico de torta por encima de la barra indica de donde provienen esos aislamientos.

❖ Los aislamientos capaces de inhibir el crecimiento radial de los fitopatógenos provienen de distintas muestras: la gran mayoría (>60%) provienen de microhábitats endófitos del vegetal, aunque los aislamientos con antagonismo contra los 4 hongos fitopatógenos, un ~35% provienen también del suelo y la rizosfera.

En la [Figura 3.3.5f](#) observamos representado el número de aislamientos con antagonismo positivo a cada hongo fitopatógeno, discriminado por microhábitat de donde provienen los aislamientos.

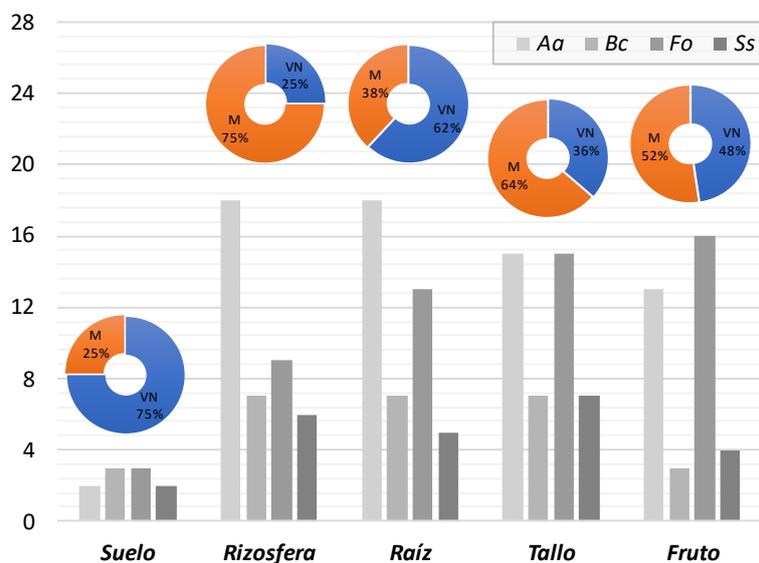


Figura 3.3.5f Número de aislamientos con antagonismo positivo para cada uno de los hongos fitopatógenos ensayados (**Aa**: *Alternaria alternata*; **Bc**: *Botrytis cinerea*; **Fo**: *Fusarium oxysporum*; **Ss**: *Sclerotinia sclerotiorum*), discriminados según el microhábitat (EJE X) y el establecimiento (gráficos de torta) de donde fueron obtenidos.

❖ Al igual que lo mencionado previamente, se observa una mayor actividad antagonista contra los fitopatógenos **Aa** y **Fo**, en comparación a **Bc** y **Ss**.

❖ Los aislamientos con antagonismo positivo mayormente fueron obtenidos del interior de raíz, tallo, fruto y rizosfera de plantas de tomate, siendo el suelo el microhábitat del cual se aislaron bacterias con menor actividad antagonista.

❖ En promedio, los aislamientos bacterianos provienen de ambos establecimientos en proporciones similares: Viento Norte (41%) y Productor Mario (59%).

Los taxones bacterianos que demostraron actividad antagonista en los ensayos de enfrentamiento en placa se resumen en la [Figura 3.3.5g](#).

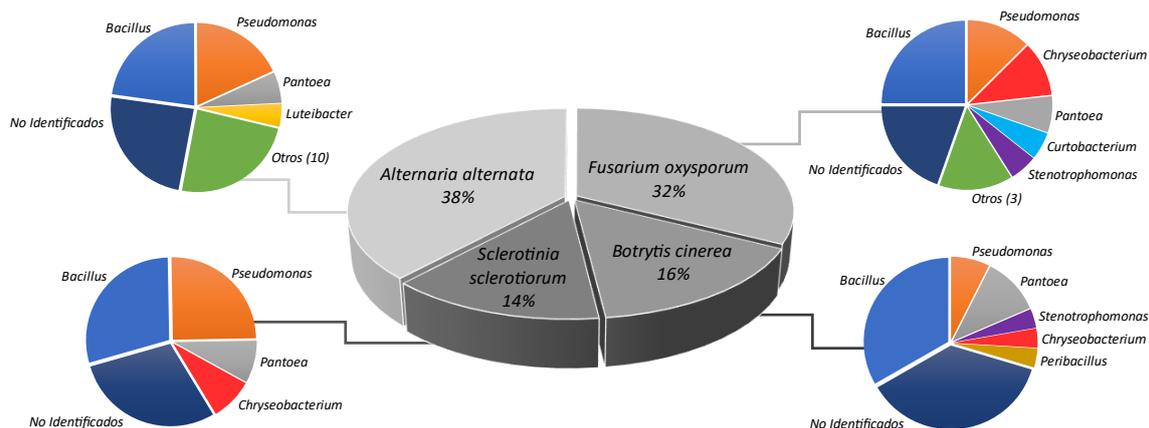


Figura 3.3.5g Proporción de actividad antagonista bacteriana contra cada uno de los hongos fitopatógenos ensayados en enfrentamientos duales *in vitro*, y principales géneros asociados.

❖ Los principales géneros asociados a las determinaciones de antagonismo fueron *Bacillus* (17,6%), *Pseudomonas* (13,2%), *Chryseobacterium* (7,7%), *Pantoea* (7,7%) y *Curtobacterium* (4,4%). De estos géneros, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Pantoea* han demostrado actividad antagonista contra los 4 hongos fitopatógenos.

- índices picr, ipa e ipb: SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Respecto al cálculo del **porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)** de los distintos aislamientos bacterianos para cada uno de los hongos fitopatógenos, se encontraron valores de PICR de hasta el 90% respecto al control (Figura 3.3.5h). Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la Tabla 6.2.1a del ANEXO B.

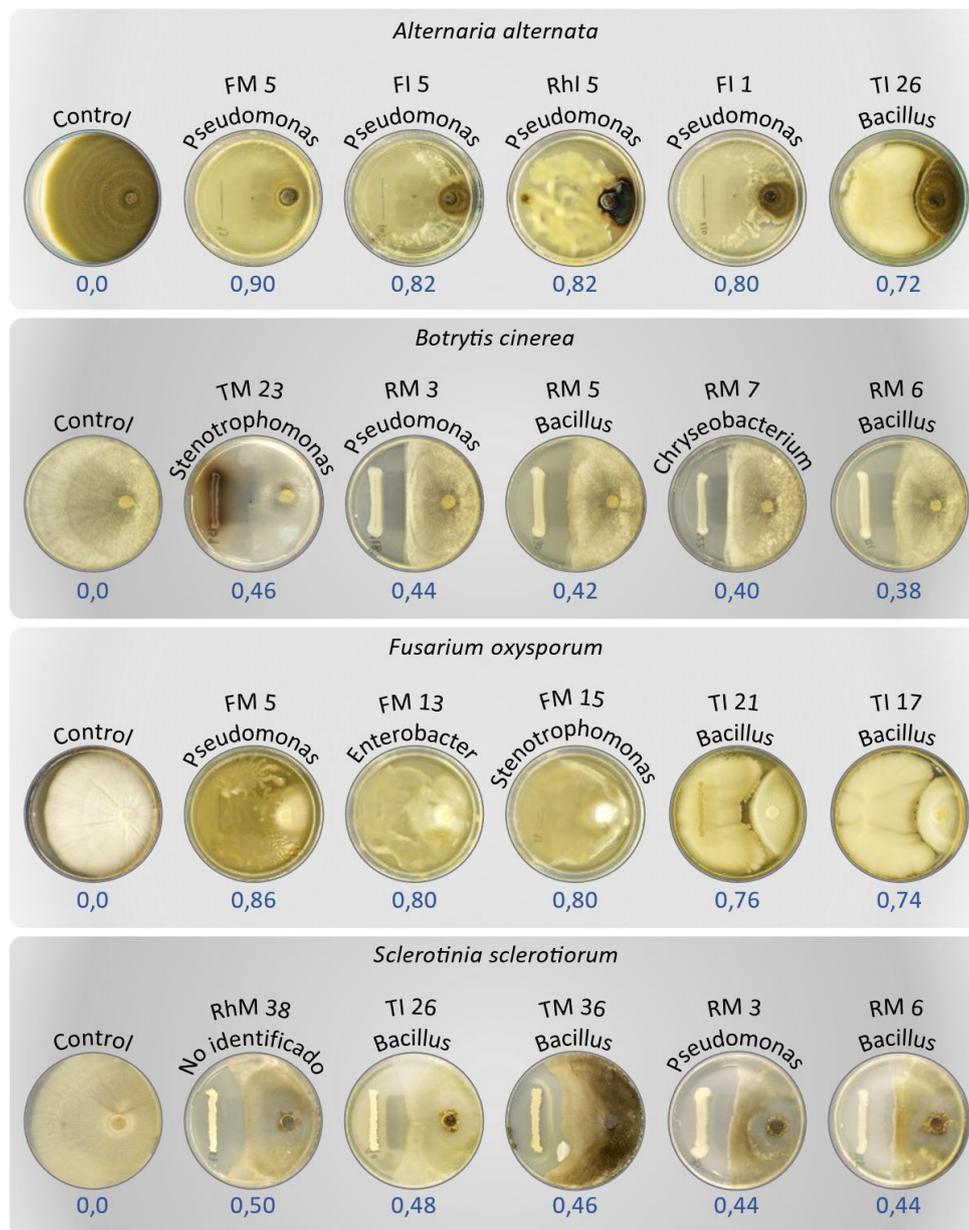


Figura 3.3.5h Fotografía de los enfrentamientos en placa de aislamientos bacterianos contra hongos fitopatógenos

Los 5 aislamientos con mayores **PICR** para cada uno de los hongos fitopatógenos ensayados se muestran en la [Figura 3.3.5h](#) y son los seleccionados como biocontroladores específicos de cada uno de los fitopatógenos para continuar con los estudios de biocontrol.

- ❖ Como se observó previamente, la gran mayoría de los aislamientos pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, y en algunos casos los aislamientos seleccionados como antagonistas específicos en los diferentes fitopatógenos coinciden, lo que determina que dicho aislamiento fue capaz de inhibir en gran porcentaje más de un hongo fitopatógeno.

- ❖ La mayoría de los aislamientos bacterianos que mostraron mayores efectos antagonistas fueron aislados de los tejidos internos de las plantas de tomate.

❖ Cabe destacar que los valores de *PICR* máximos para **Aa** y **Fo** resultaron significativamente mayores que los obtenidos para **Bc** y **Ss**. Sumado a los resultados mencionados anteriormente, podemos determinar que en la colección se encontró un mayor número de aislamientos y con una mayor capacidad de inhibición *in vitro* en los fitopatógenos **Aa** y **Fo** respecto a los hallados contra **Bc** y **Ss**.

La combinación de los resultados de antagonismo en placa con los resultados de la caracterización enzimática de antagonismo se realizó mediante el cálculo del índice de potencial antagonismo (**IPA**), cuyos aislamientos con los mejores valores de este índice se muestran en la [Tabla 3.3.5b](#). Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.2.1a](#) del [ANEXO B](#).

Tabla 3.3.5b Aislamientos bacterianos de la colección con mayores valores de índice de potencial antagonismo (**IPA**).

AISLAMIENTO	GÉNERO	IPA
FM 5	<i>Pseudomonas</i>	0,93
TM 36	<i>Bacillus</i>	0,85
FM 15	<i>Stenotrophomonas</i>	0,84
RhM10*	No identificado	0,84
RM 1*	<i>Bacillus</i>	0,83
TM 30*	<i>Bacillus</i>	0,81
RhI 5	<i>Pseudomonas</i>	0,79
RhM38	No identificado	0,79
FI 5	<i>Pseudomonas</i>	0,74
TI 21	<i>Bacillus</i>	0,73

*aislamientos bacterianos no seleccionados como antagonistas específicos.

❖ Dentro de los 10 aislamientos bacterianos con mayor **IPA**, la mayoría pertenecieron a los géneros *Bacillus* (4) y *Pseudomonas* (3).

❖ Como el valor del índice depende en gran medida del *PICR*, es esperable que coincidan los aislamientos con mayores valores de **IPA** con los aislamientos seleccionados como antagonistas específicos (aquellos con mayor valor de *PICR* para cada hongo fitopatógeno). Aun así, hay 3 aislamientos en la [Tabla 3.3.5c](#) que no fueron seleccionados como específicos, y su alto valor se debió a que poseen valores intermedios de *PICR* y valores altos de la caracterización enzimática de antagonismos. Cabe destacar que RhM 10 y TM 30 mostraron actividad antagonista contra los 4 patógenos, mientras que el restante RM 1 mostró actividad antagonista contra 3 patógenos (**Aa**, **Bc** y **Fo**).

Finalmente, se combinó el resultado de la caracterización de biocontrol (*IPA*) y el resultado de la caracterización de colonización vegetal (*ICV*) en el cálculo del índice de potencial biocontrolador (*IPB*).

El análisis global de los aislamientos bacterianos de la colección, en el cual los índices calculados a partir de las determinaciones en relación a su capacidad de colonización y la actividad antagonista contra hongos fitopatógenos (*ICV*, *ICEA*, *PICR*, *IPA* e *IPB*) se resumen en dos componentes principales (PC1 y PC2), permitió realizar las siguientes observaciones (Figura 3.3.5i y Figura 3.3.5j):

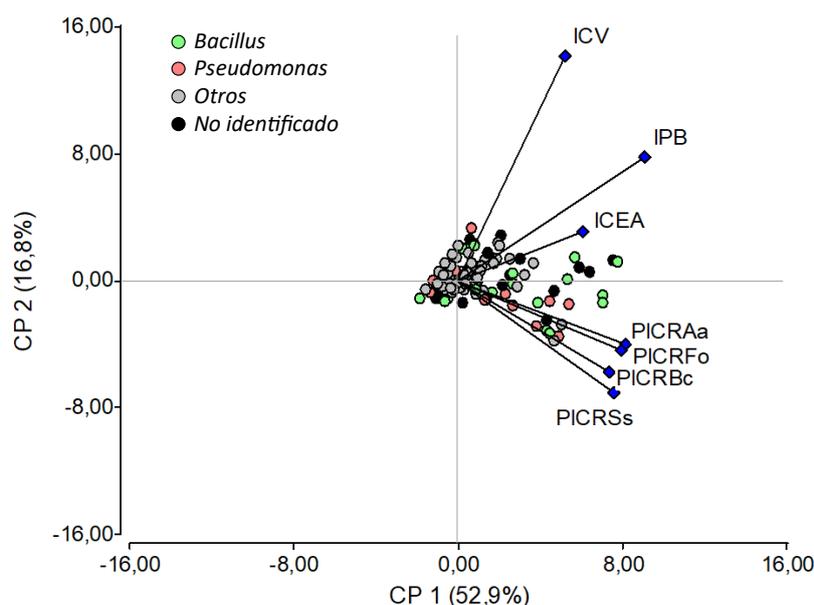


Figura 3.3.5i Biplot resultante del análisis de componentes principales sobre los índices relacionados a la colonización vegetal (*ICV*), la actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos (*ICEA*, *PICR*) y su combinación (*IPB*) de los diferentes aislamientos bacterianos, discriminados según asignación taxonómica.

❖ El análisis de componentes principales de los distintos aislamientos bacterianos respecto a los índices calculados sobre las determinaciones *in vitro* sobre colonización vegetal y actividad antagonista contra hongos fitopatógenos determinó que los dos CP explicaron un 69,7% de la variabilidad total. Un tercer CP no mejoró significativamente el análisis, aportando <10% de explicación de la variabilidad, por lo que no fue incluido.

❖ Se destacan 19 aislamientos bacterianos (mayormente de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*) que se salen de la nube de puntos central, en dirección positiva sobre el CP1, hacia mayores índices de colonización vegetal, antagonismo y biocontrol. Los índices *PICR* e *IPB* tienen una mayor proyección sobre el CP1 (de mayor variabilidad explicada, 52,9%), en comparación a los otros dos índices incluidos en el análisis (*ICEA* e *ICV*), lo que determina que tengan un mayor peso al explicar el comportamiento de estos 19 aislamientos bacterianos: la diferenciación de estos aislamientos respecto al resto de la colección se da principalmente por sus actividades antagonistas.

❖ El CP2 explica una menor variabilidad (16,8%) y la variación entre los distintos aislamientos en este eje no es tan amplia como la observada en el CP1. Principalmente contribuye a diferenciar entre aislamientos con actividad antagonista y buenos resultados en la caracterización de colonización vegetal (cuadrante de-recho superior) y aquellos antagonistas que no mostraron altos valores de **ICV**.

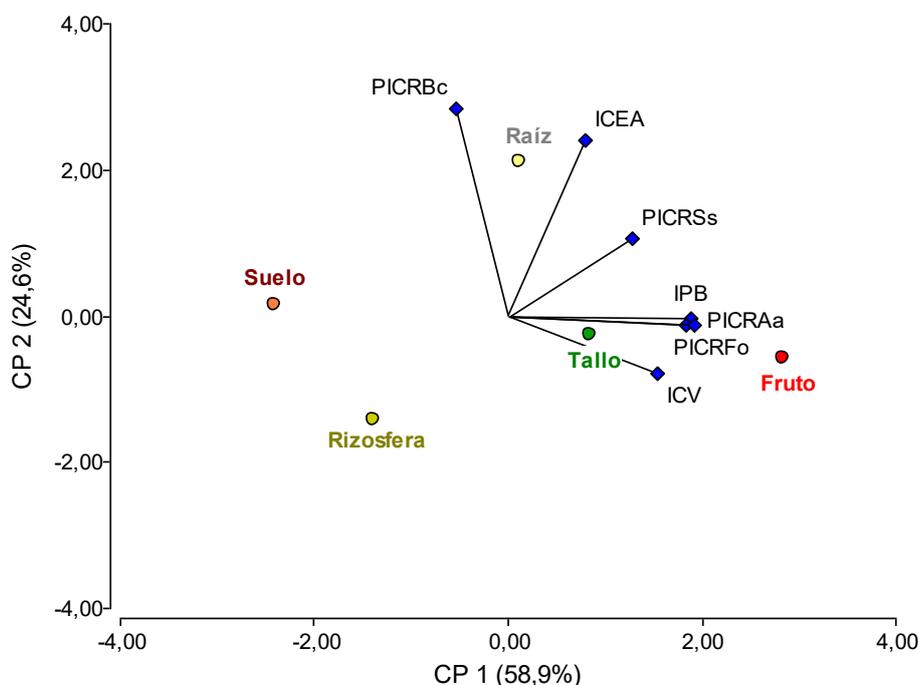


Figura 3.3.5j Biplot resultante del análisis de componentes principales sobre los índices relacionados a la colonización vegetal (**ICV**), la actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos (**ICEA**, **PICR**) y su combinación (**IPB**) en base a los aislamientos bacterianos pertenecientes a cada microhábitat.

❖ El análisis de componentes principales respecto a los índices calculados sobre las determinaciones *in vitro* sobre colonización vegetal y actividad antagonista contra hongos fitopatógenos que caracterizan a cada microhábitat a través de los aislamientos bacterianos determinó que los dos CP explicaron un 83,5% de la variabilidad total. Un tercer CP no mejoró significativamente la variabilidad total explicada.

❖ El CP1 (58,9%) separa a lo largo de su eje a los 5 microhábitats de donde se obtuvieron los diferentes aislamientos vegetales, siendo las variables de mayor peso los índices **PICR** de Aa y Fo, el **IPB**, el **ICV** y el **PICR_{Ss}**. Esto determina diferencias entre los microhábitats respecto a su contribución de aislamientos bacterianos con antagonismo en la colección generada.

❖ Los aislamientos bacterianos con mayores valores de los índices mencionados fueron aislados de los microhábitats de fruto, tallo y menor medida de raíz.

❖ Los aislamientos obtenidos de endosfera de raíz se diferenciaron particularmente de los obtenidos del resto de los microhábitats por su mayor actividad antagonista frente a *Botrytis cinerea* (**PICR_{Bc}**) y mayor presencia de enzimas de actividad antagonística (**ICEA**), evidenciado por el CP2 (24,6%).

En la [Tabla 3.3.5c](#) se detallan los 10 aislamientos bacterianos con mayor **IPB**, de los cuales, los 5 mayores fueron seleccionados para continuar los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.2.1a](#) del ANEXO B.

Tabla 3.3.5c Aislamientos bacterianos de la colección con mayores valores de índice de potencial biocontrol (**IPB**).

AISLAMIENTO	GÉNERO	ICV	ICEA	IPA	IPB
TM 30	<i>Bacillus</i>	1,00	0,67	0,81	0,91
RhM38*	No identificado	1,00	0,75	0,79	0,90
RM 1	<i>Bacillus</i>	0,75	0,67	0,83	0,79
Rhi 22*	No identificado	0,88	0,50	0,64	0,76
TI 26	<i>Bacillus</i>	0,63	1,00	0,84	0,73
RhM10	No identificado	0,75	0,25	0,68	0,71
TI 21	<i>Bacillus</i>	0,63	0,25	0,73	0,68
TM 17	<i>Enterobacter</i>	0,75	0,00	0,60	0,68
TM 36	<i>Bacillus</i>	0,50	0,67	0,85	0,67
FM 15	<i>Stenotrophomonas</i>	0,50	0,50	0,84	0,67

*aislamientos bacterianos no seleccionados como antagonistas específicos, pero seleccionados como antagonistas generales por su alto valor de **IPB**.

❖ Los mayores valores del **IPB** se asignaron en gran medida a aislamientos bacterianos del género *Bacillus* obtenidos de distintos microhábitats.

De los 5 aislamientos bacterianos con mayor **IPB**, 3 de ellos ya fueron seleccionados como antagonistas específicos por su alto valor de PICR contra alguno de los hongos fitopatógenos. En la [Tabla 3.3.5d](#) se resumen los aislamientos seleccionados, detallando si fue seleccionado como antagonista específico o como biocontrolador general.

Los aislamientos bacterianos seleccionados como biocontroladores específicos se utilizaron para continuar los ensayos *in vitro* e *in vivo* con el hongo fitopatógeno específico por el que fue seleccionado; y los aislamientos

seleccionados como antagonistas generales se utilizaron para ensayos *in vitro* e *in vivo* contra los tres hongos fitopatógenos evaluados.

Tabla 3.3.5d Aislamientos bacterianos seleccionados como antagonistas específicos y/o generales por sus mayores valores de *PICR* e *IPB*, respectivamente.

AISLAMIENTO	GÉNERO	ANTAGONISTA ESPECÍFICO				ANTAGONISTA GENERAL
		<i>Alternaria Alternata</i>	<i>Botrytis Cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
TM 30	<i>Bacillus</i>					*
RhM38	No identificado				*	*
RM 1	<i>Bacillus</i>					*
RhI 22	No identificado					*
TI 26	<i>Bacillus</i>	*			*	*
FM 5	<i>Pseudomonas</i>	*		*		
RhI 5	<i>Pseudomonas</i>	*				
FI 5	<i>Pseudomonas</i>	*				
FI 1	<i>Pseudomonas</i>	*				
TM 23	<i>Stenotrophomonas</i>		*			
RM 3	<i>Pseudomonas</i>		*		*	
RM 5	<i>Bacillus</i>		*			
RM 7	<i>Chryseobacterium</i>		*			
RM 6	<i>Bacillus</i>		*		*	
FM 13	<i>Enterobacter</i>			*		
FM 15	<i>Stenotrophomonas</i>			*		
TI 21	<i>Bacillus</i>			*		
TI 17	<i>Bacillus</i>			*		
TM 36	<i>Bacillus</i>				*	

3.3.5.3 Inhibición de la germinación de conidios

Se logró ensayar la inhibición *in vitro* de la germinación de conidios de 3 hongos fitopatógenos utilizados en ensayos previos (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*), empleando los distintos aislamientos seleccionados como biocontroladores. Empleando el protocolo descrito en materiales y métodos, no se logró obtener una suspensión de conidios estables y reproducible del fitopatógeno *Sclerotinia*

sclerotiorum, observándose en todas las pruebas realizadas muy pocos conidios en suspensión, la mayoría de las veces formando conglomerados con hifas. Por este motivo, no fue posible ensayar la inhibición de la germinación de conidios de este fitopatógeno. Los cultivos bacterianos alcanzaron aproximadamente 10^8 UFC ml⁻¹, con pH entre 7,5 y 8,2 (Tabla 6.2.2a en el ANEXO B).

- Inhibición de conidios de *Alternaria alternata*

Para el ensayo de germinación de conidios, se obtuvo una suspensión de conidios con $4,3 \times 10^6$ conidios ml⁻¹. Se logró cuantificar exitosamente los conidios germinados y no germinados, pudiendo calcular el porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos (Control + 9 aislamientos bacterianos seleccionados; ver Tabla 3.3.5d). Los promedios de 3 réplicas por cada tratamiento a cada tiempo se muestran en la Figura 3.3.5k a continuación:

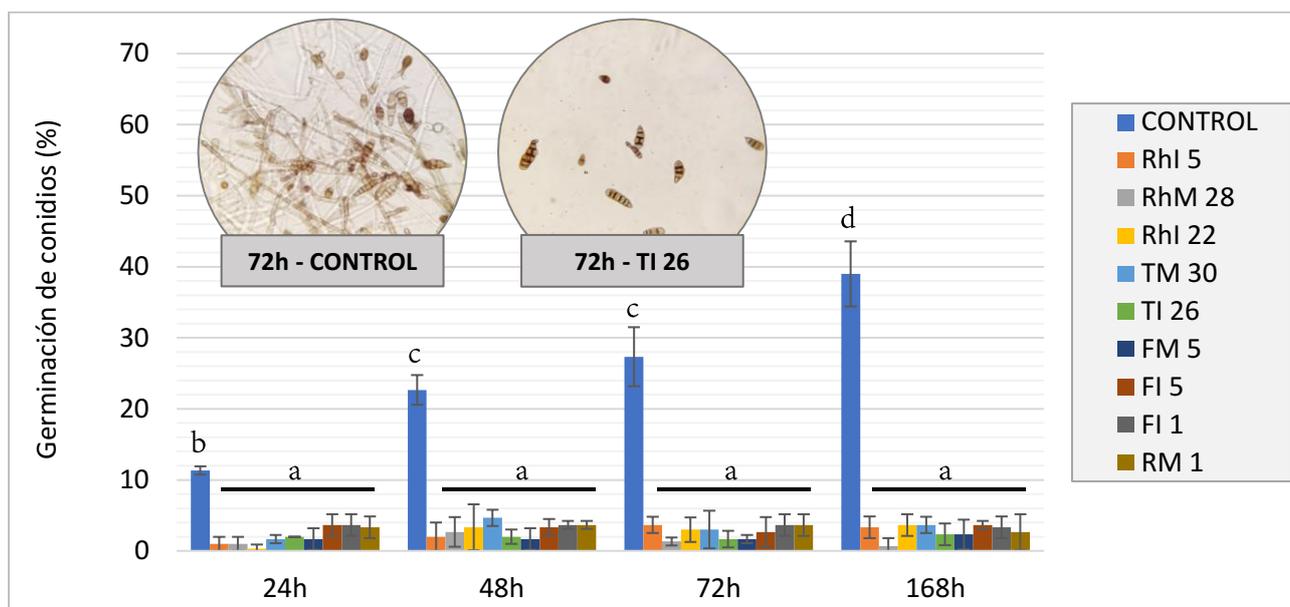


Figura 3.3.5k Porcentaje promedio (\pm desviación estándar) de germinación de conidios de *Alternaria alternata* en solución acuosa, en distintas combinaciones del fitopatógeno y aislamientos bacterianos con actividad antagonista. La fotografía muestra los conidios germinados en el tratamiento control y los conidios sin germinar en el tratamiento con el aislamiento TI 26 a las 72h. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey ($p < 0,05$).

❖ Tanto los aislamientos bacterianos seleccionados como antagonistas específicos (TI 26, FM 5, RhI 5, FI 5, y FI 1) así como los antagonistas generales (TI 26, TM 30, RhM 28, RM 1, y RhI 22) habían mostrado inhibición significativa del crecimiento radial del fitopatógeno en los ensayos de enfrentamiento dual en placa, y mantuvieron el porcentaje de germinación entre 1-5%, mientras que en el tratamiento control la germinación de conidios fue muy superior.

❖ Todos los aislamientos bacterianos mostraron un porcentaje de germinación de los conidios significativamente menor respecto al tratamiento control, evidenciando la capacidad de todos los aislamientos

bacterianos ensayados para efectivamente inhibir la germinación de los conidios de *Alternaria alternata* (el análisis estadístico se detalla en el ANEXO B)

❖ Si bien el tratamiento CONTROL promedia el 39% de conidios germinados hacia el final del ensayo, a las 72h ya se consideró con una germinación cercana al 100% ya que se observaba al microscopio agrupamientos de conidios germinados, causando dificultad para cuantificarlos (como se ve en la Figura 3.3.5k), por lo cual se buscó cuantificar las zonas donde no estuvieran tan agrupados, justamente donde predominaban conidios sin germinar (los conidios germinados tienden a entrelazar sus hifas y agruparse).

- Inhibición de conidios de *Botrytis cinerea*

Para el ensayo de germinación de conidios, se obtuvo una suspensión de conidios con $8,2 \times 10^5$ conidios ml^{-1} . Se logró cuantificar exitosamente los conidios germinados y no germinados, pudiendo calcular el porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos (Control + 10 aislamientos bacterianos seleccionados; ver Tabla 3.3.5d). Los promedios de 3 replicados por cada tratamiento a cada tiempo se muestran en la Figura 3.5.5l a continuación:

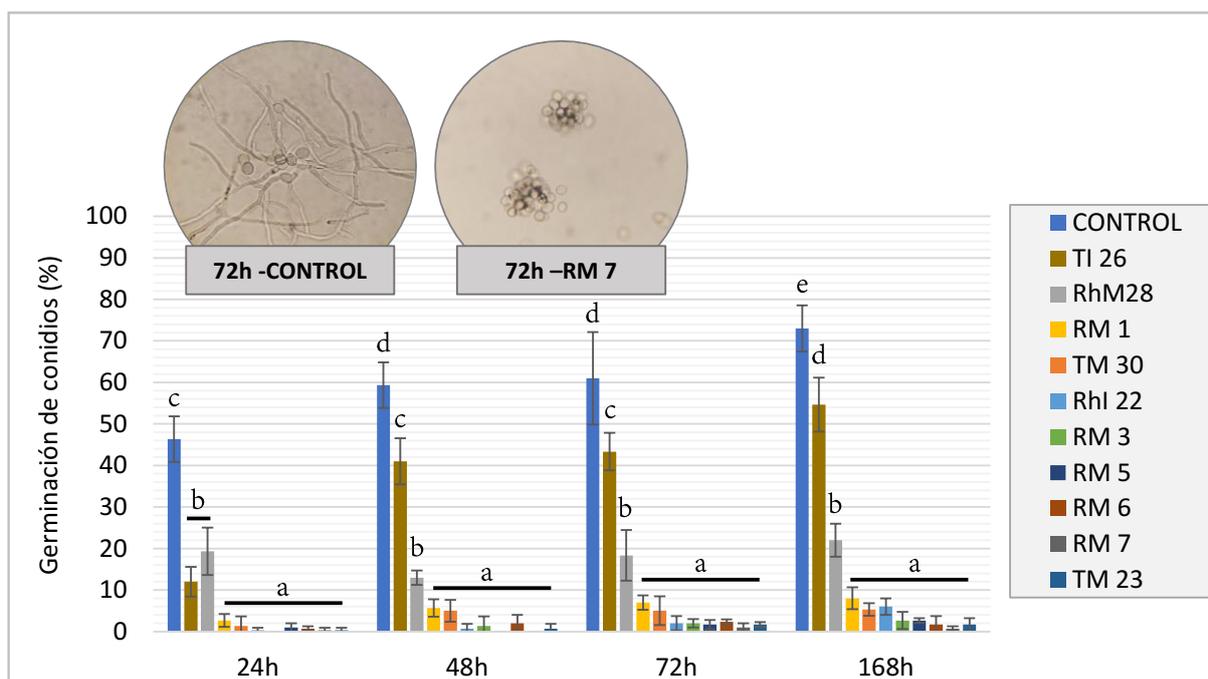


Figura 3.3.5l Porcentaje promedio (\pm desviación estándar) de germinación de conidios de *Botrytis cinerea* en solución acuosa, en distintas combinaciones del fitopatógeno y aislamientos bacterianos con actividad antagonista. La fotografía muestra los conidios germinados en el tratamiento control y los conidios sin germinar en el tratamiento con el aislamiento RM 7 a las 72h. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey ($p < 0,05$).

❖ Se observó un alto porcentaje de germinación de los conidios en el tratamiento control ya a las 24 h posteriores de iniciado el ensayo, el cual aumentó gradualmente a medida que transcurrió el tiempo hasta un promedio de 73% de germinación hacia el final del ensayo. Nuevamente, se observaron agrupamientos

de conidios germinados lo que dificultó el conteo y posiblemente el porcentaje real de conidios germinados fuera mayor.

❖ Respecto a las combinaciones del fitopatógeno con los aislamientos seleccionados como antagonistas se determinó que en 8 de los tratamientos con bacterias disminuyó significativamente el porcentaje de germinación de los conidios germinados: hacia el final del ensayo se encontró entre 1-6% (el [análisis estadístico](#) se detalla en el [ANEXO B](#)).

❖ Solo dos tratamientos con bacterias antagonistas (TI 26 y RhM 28, seleccionadas como antagonistas generales por su alto valor de *IPB*) obtuvieron altos valores de germinación de conidios diferentes al resto de los tratamientos mencionados previamente, aunque siempre mostraron menores valores que el control al mismo tiempo transcurrido.

- Inhibición de conidios de *Fusarium oxysporum*

Para el ensayo de germinación de conidios de *Fusarium oxysporum*, se obtuvo una suspensión de conidios con $5,8 \times 10^7$ conidios ml^{-1} . Se logró cuantificar exitosamente los conidios germinados y no germinados, pudiendo calcular el porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos (Control + 10 aislamientos bacterianos seleccionados; ver [Tabla 3.3.5d](#)). Los promedios de 3 replicados por cada tratamiento a cada tiempo se muestran en la [Figura 3.5.5m](#) a continuación:

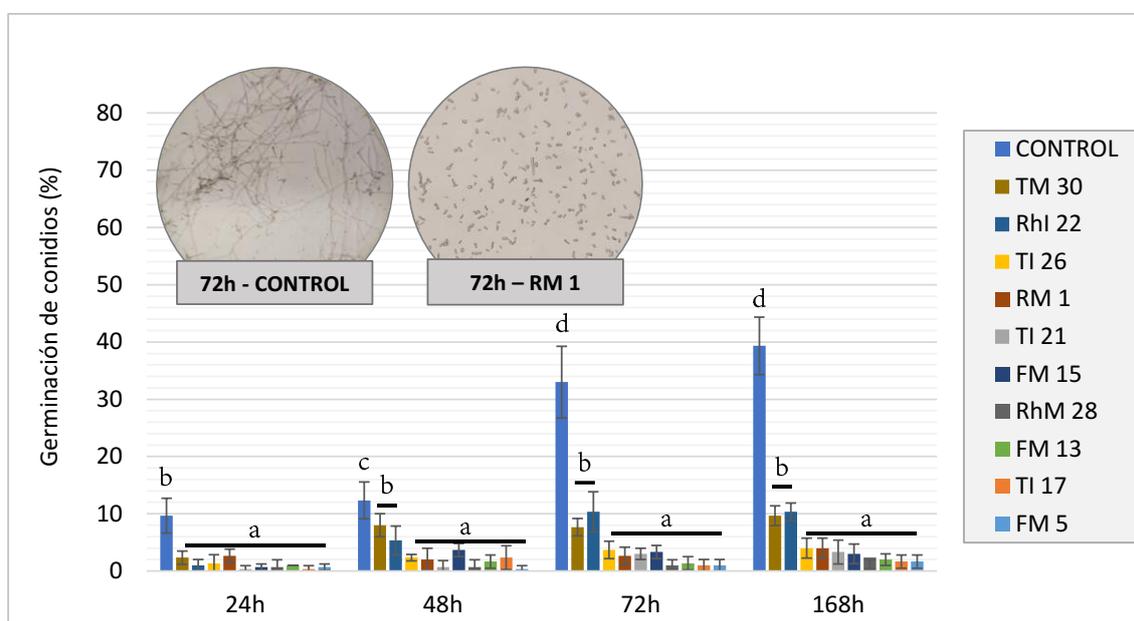


Figura 3.3.5m Porcentaje promedio (\pm desviación estándar) de germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* en solución acuosa, en distintas combinaciones del fitopatógeno y aislamientos bacterianos con actividad antagonista. La fotografía muestra los conidios germinados en el tratamiento control y los conidios sin germinar en el tratamiento con el aislamiento RM 1 a las 72h. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey ($p < 0,05$).

❖ El tratamiento CONTROL alcanzó un porcentaje promedio de germinación de conidios de 39% hacia el final del ensayo, mientras que los tratamientos del fitopatógeno con las bacterias antagonistas disminuyeron significativamente el porcentaje de germinación: 8 tratamientos mantuvieron el porcentaje de germinación más bajo entre 1,7 y 4%; los otros 2 tratamientos (TM 30 y RhI 22, seleccionados como antagonistas generales) obtuvieron un porcentaje de germinación de conidios ~10% (el [análisis estadístico](#) se detalla en el [ANEXO B](#)).

3.3.5.4 Biocontrol en proceso de germinación de lechuga in vitro

Únicamente se pudo determinar el efecto antagonista de los aislamientos seleccionados en el ensayo de antagonismo que se utilizó el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

Con el resto de los fitopatógenos, no se logró visualizar los signos de la enfermedad en plántulas de lechuga. En estos ensayos, si bien se observó al microscopio la presencia de los diferentes patógenos en las radículas de lechuga, no se pudo identificar claramente a las plántulas enfermas, por lo cual no fue posible cuantificar ni comparar la incidencia y severidad de la enfermedad entre los distintos tratamientos.

- Antagonismo contra *Botrytis cinerea*

Las plántulas cuyas semillas se inocularon únicamente con el fitopatógeno mostraron signos propios de la enfermedad que produce *Botrytis cinerea*: podredumbre blanda de tallos y hojas que comienza con amarillamiento (clorosis) y avanza a un color anaranjado/pardo (necrosis) y termina con la muerte de las plántulas. En base a esto, se establecieron 4 categorías para evaluar la severidad de la enfermedad: plántulas sanas, plántulas cloróticas, plántulas con necrosis y plántulas muertas ([Figura 3.3.5n](#)).



Figura 3.3.5n Categorías del estado de las plántulas de lechuga para la evaluación de la severidad en el ensayo de antagonismo contra hongos fitopatógenos.

Los resultados del ensayo con el fitopatógeno *B. cinerea*, ya sea solo o en combinación con las bacterias antagonistas, no mostraron variaciones en el porcentaje de germinación, rondando en todos los casos el 100%.

Respecto a la incidencia y severidad de la enfermedad provocada por *B. cinerea*, los resultados se pueden visualizar en la [Figura 3.3.5o](#) a continuación (el [análisis estadístico](#) se detalla en el [ANEXO B](#)):

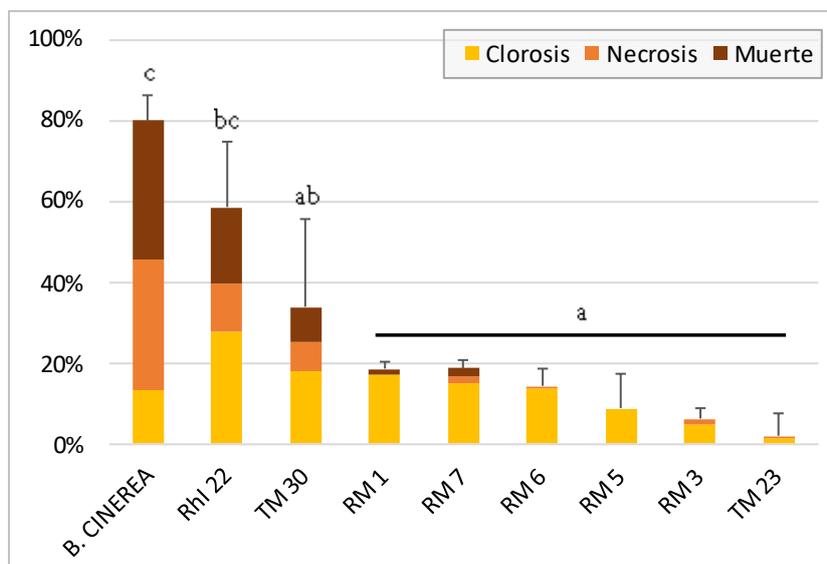


Figura 3.3.5o Porcentaje de plántulas de lechuga con clorosis, necrosis y plántulas muertas a causa del fitopatógeno *Botrytis cinerea* en distintos tratamientos con bacterias antagonistas. La incidencia en cada tratamiento es la suma total de plántulas afectadas. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey ($p < 0,05$).

❖ La inoculación de semillas de lechuga únicamente con el fitopatógeno *Botrytis cinerea* provocó un 80% de incidencia, cuya severidad fue mayormente plántulas con necrosis y plántulas muertas, con un bajo porcentaje de plántulas con clorosis ([Figura 3.3.5o](#) y [Figura 3.5.5p](#)).

❖ La inoculación con los aislamientos biocontroladores seleccionados redujo significativamente en casi todos los casos el porcentaje de incidencia de la enfermedad en las plántulas de lechuga, con excepción del aislamiento Rhl 22, el cual mostró resultados estadísticamente iguales a los descriptos para el tratamiento con el fitopatógeno. El resto de los tratamientos, mantuvo los niveles de incidencia entre el 2% y el 34%, cuyos signos evidenciados fueron mayormente clorosis en los cotiledones (el nivel más bajo de severidad).

❖ Los mejores resultados fueron obtenidos con la inoculación de los aislamientos **TM 23** (*Stenotrophomonas* sp.), **RM 3** (*Pseudomonas* sp.), y **RM 5** (*Bacillus* sp.).

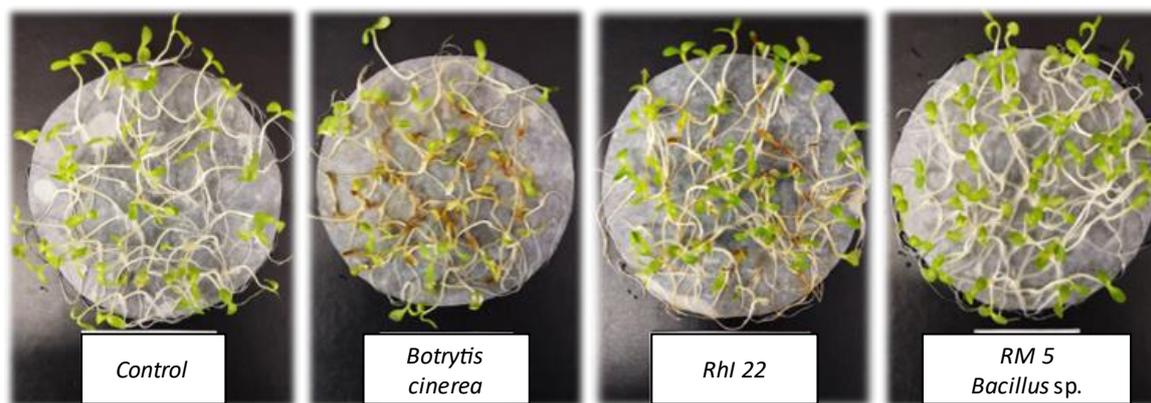


Figura 3.3.5p Fotografías de las plántulas de lechuga a los 5 días de iniciado el proceso de germinación. Tratamientos control (sin inoculación), inoculado el fitopatógeno *Botrytis cinerea* y la combinación del fitopatógeno con bacterias antagonistas seleccionadas (Rhl 22 y RM 5).

3.3.6. CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS RESPECTO A PROPIEDADES PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

3.3.6.1 Determinación cuali-cuantitativa de la solubilización de fósforo

Se logró caracterizar a todos los aislamientos bacterianos respecto a su capacidad *in vitro* de solubilizar fosfato tricálcico insoluble. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.3.1a](#) del [ANEXO B](#).

Se encontraron 111 aislamientos (42,9% de la colección) capaces de solubilizar fuentes de fósforo insolubles. Del *screening* inicial se pudieron clasificar en las siguientes categorías según el halo de solubilización evidenciado:

- 58 aislamientos con + (halo de solubilización de igual tamaño que el halo de crecimiento de la colonia).
- 20 aislamientos con ++ (halo de solubilización poco mayor al halo de crecimiento de la colonia).
- 33 aislamientos con +++ (halo de solubilización mucho mayor al halo de crecimiento de la colonia).

Gran parte de los aislamientos con capacidad de solubilizar el fosfato tricálcico utilizado en los ensayos *in vitro* fueron aislados de muestras de rizosfera, raíz y tallo, siendo *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Bacillus* los géneros predominantes ([Figura 3.3.6a](#))

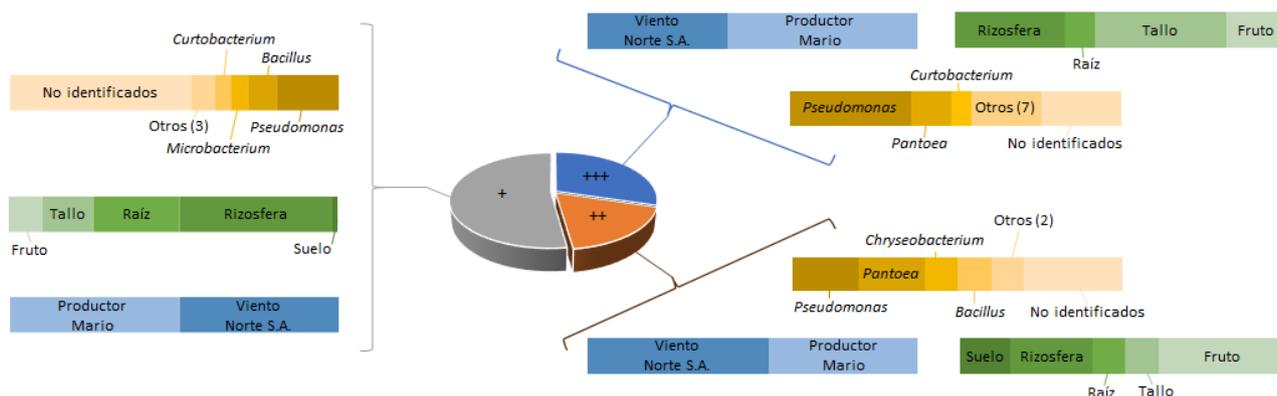


Figura 3.3.6a Proporción de aislamientos bacterianos con diferente capacidad de solubilizar fósforo insoluble, detallando para cada grupo los géneros predominantes y de donde fueron aislados (microhábitat y establecimiento).

Los aislamientos con caracterización “++” y “+++” fueron utilizados para la determinación cuantitativa de eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico en placa de petri, comparando el halo de la colonia y el halo de solubilización. Respecto a estos resultados, se encontraron:

- 28 aislamientos con una eficiencia de solubilización mayor al 50% (halo de solubilización 1,5 veces más grande que el halo de crecimiento).
- 11 aislamientos con una eficiencia mayor al 100% (halo de solubilización 2 veces más grande que el halo de crecimiento) (Figura 3.3.6b). El aislamiento con mayor capacidad de solubilizar fosfatos insolubles fue RI 1, Identificado como perteneciente al género *Priestia* y aislado de tejidos internos de raíz, con una **ESFI** = 1,85.

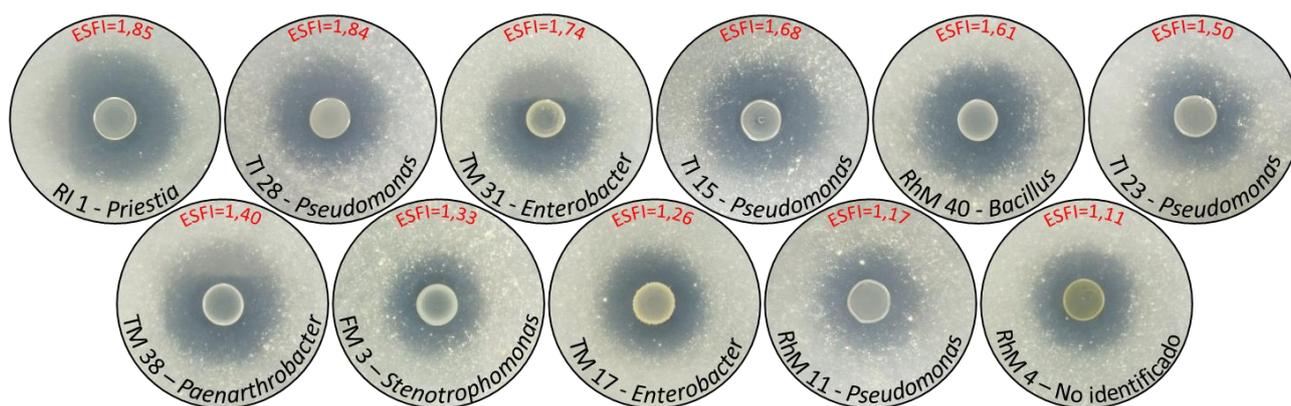


Figura 3.3.6b Fotografías de los aislamientos bacterianos con mayor eficiencia de solubilización de fósforo en las determinaciones cuantitativas en placas de petri, indicando nombre del aislamiento y la eficiencia de solubilización de fósforo insoluble (ESFI) calculada.

3.3.6.2 Producción de sideróforos

Se logró caracterizar a todos los aislamientos bacterianos respecto a su capacidad *in vitro* de producir sideróforos. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.3.1a](#) del ANEXO B.

Se detectaron 101 aislamientos bacterianos capaces de producir sideróforo ([Figura 3.3.6c](#)), clasificados según el halo formado en el *screening in vitro*:

- 58 aislamientos con + (halo amarillo del tamaño de la colonia de crecimiento).
- 40 aislamientos con ++ (halo amarillo poco mayor al de la colonia de crecimiento).
- 3 aislamientos con +++ (halo amarillo mucho mayor al de la colonia de crecimiento).

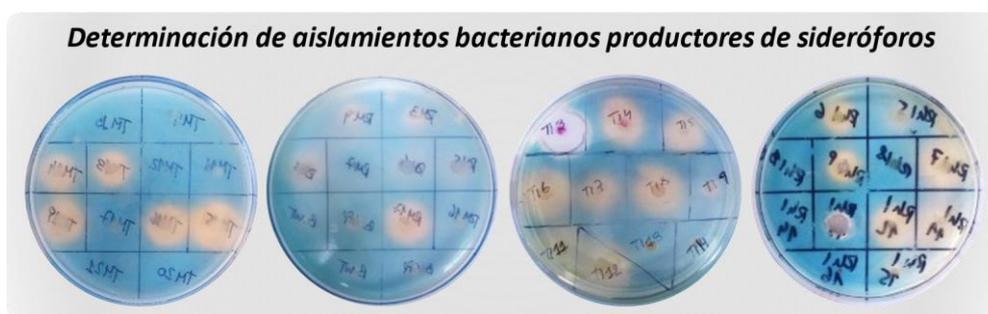


Figura 3.3.6c Fotografías de placas de petri en la determinación de producción de sideróforos por aislamientos bacterianos, luego de verter la bicapa con cromo azul s (cas).

En la [Figura 3.3.6d](#) se resumen los principales géneros asociados a los aislamientos productores de sideróforos, indicando el microhábitat y establecimiento de donde fueron aislados.

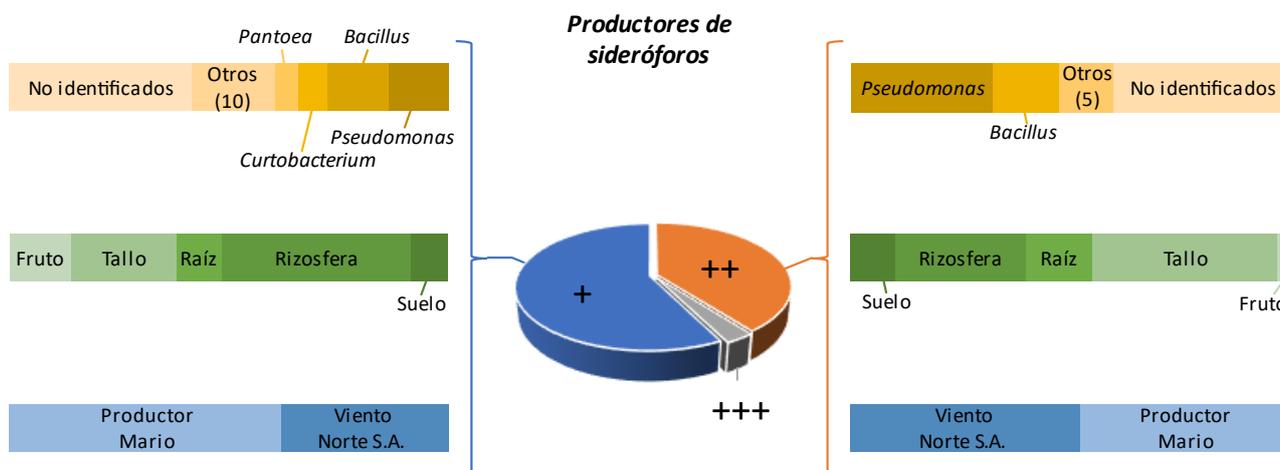


Figura 3.3.6d Proporción de aislamientos bacterianos con diferente capacidad de producir sideróforos, detallando para cada grupo el establecimiento y microhábitat de donde fueron aislados y los géneros predominantes.

❖ Al igual que lo mencionado previamente para la actividad de solubilización de fósforo, se observa que los aislamientos capaces de producir sideróforos fueron aislados mayormente de muestras de rizosfera y endosfera de raíz y tallo, siendo los principales géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Los 3 aislamientos bacterianos destacados por su gran capacidad de producir sideróforos se detallan en la [Tabla 3.3.6a](#) a continuación:

Tabla 3.3.6a Aislamientos bacterianos con mayor capacidad de producción de sideróforos

AISLAMIENTO	GÉNERO	PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS
RhM 9	No identificado	+++
RhI 24	No identificado	+++
RM 17	<i>Bacillus</i>	+++

3.3.6.3 Determinación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno

Se logró caracterizar a todos los aislamientos bacterianos endófitos respecto a su capacidad *in vitro* de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.3.1a](#) del ANEXO B.

De los 160 aislamientos bacterianos determinados, se encontró que 39 de ellos (24,4%) evidenciaron una película de crecimiento subsuperficial en los frascos con medios de cultivo semisólido sin fuente nitrogenada ([Figura 3.3.6e](#)). Solo 2 aislamientos (FM 2 y FM 8, ambos asignados como *Chryseobacterium* sp.) mostraron resultados positivos en ambos medios de cultivo evaluados (LGI y NFb); del resto de los aislamientos, 9 mostraron resultados positivos en LGI y 18 lo hicieron en NFb.



Figura 3.3.6e Fotografías de viales con medio de cultivo semisólido sin fuente nitrogenada evidenciando película de crecimiento subsuperficial lo cual denota el resultado positivo de la determinación de fijación biológica del nitrógeno.

Entre los géneros bacterianos que se asocian a esta determinación positiva está *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, y *Pantoea*; los cuales se aislaron mayormente de endosfera de raíz y tallo, y de ambos establecimientos en similar número (Figura 3.3.6f).

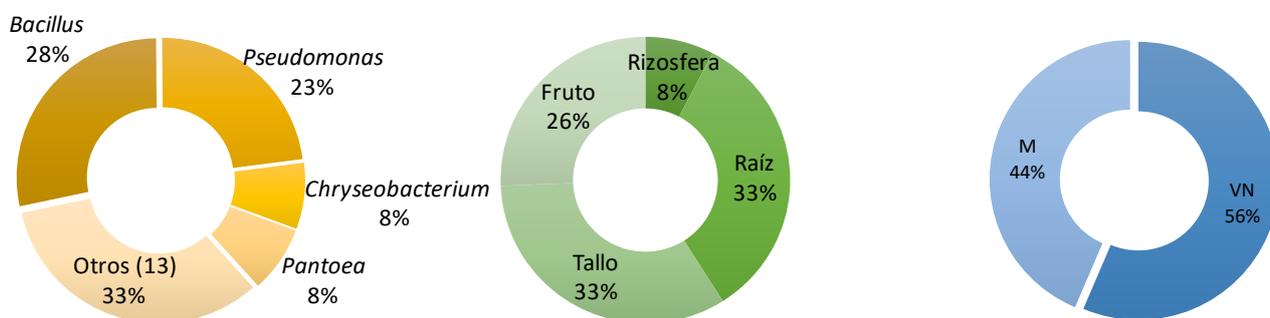


Figura 3.3.6f Proporción de géneros bacterianos con resultado positivo en la caracterización *in vitro* de la capacidad de fijación biológica del nitrógeno, microhábitats y establecimiento (VN: Viento Norte; M: Productor Mario) de donde fueron aislados.

3.3.6.4 Producción de fitohormonas de tipo auxínicas

Se logró caracterizar a todos los aislamientos bacterianos de la colección respecto a su capacidad *in vitro* de producir fitohormonas de tipo auxínico. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la Tabla 6.3.1a del ANEXO B.

En total se encontraron 74 aislamientos bacterianos que mostraron resultado positivo a la determinación de auxinas en sobrenadantes de cultivo por método colorimétrico empleando el reactivo de Salkowsky (Figura 3.3.6g):

- 36 aislamientos se caracterizaron con +
- 23 aislamientos se caracterizaron con ++
- 15 aislamientos se caracterizaron con +++

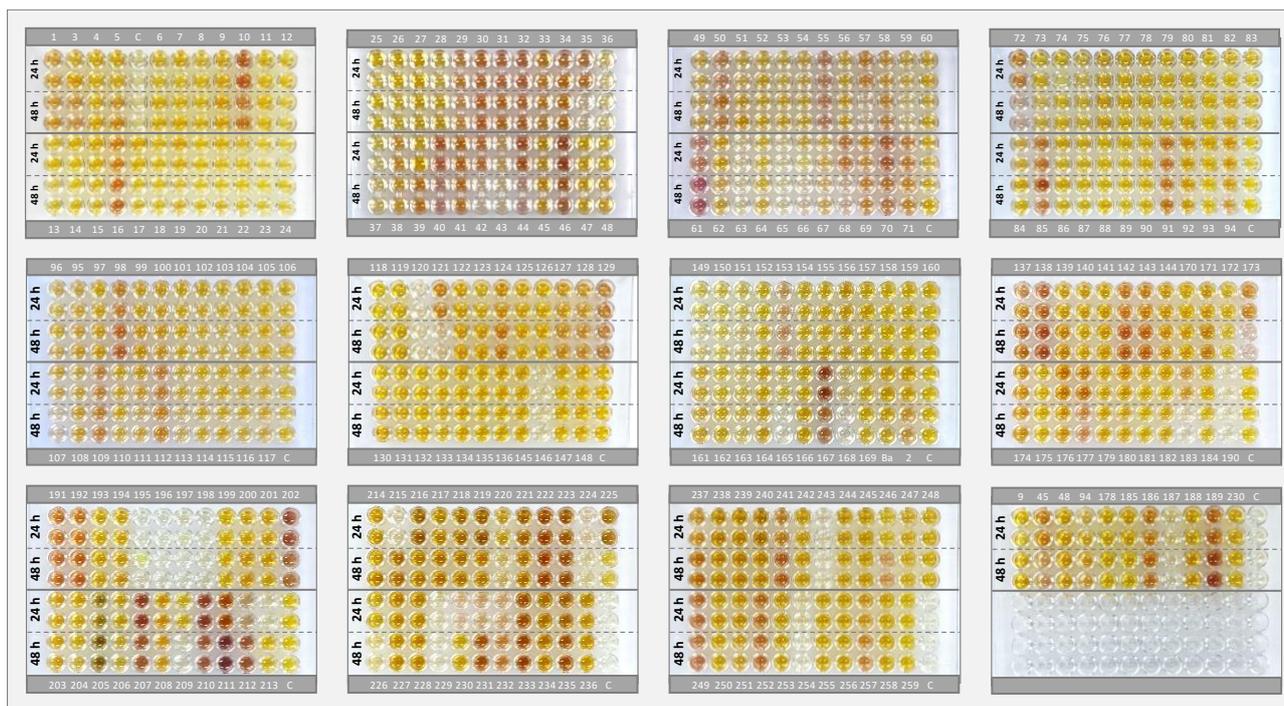


Figura 3.3.6g Fotografía de las placas multipocillo donde se llevó a cabo la reacción entre el sobrenadante del cultivo bacteriano y el reactivo de Salkowsky.

En la Figura 3.3.6h se resumen los principales géneros asociados a los aislamientos productores de auxinas, indicando el microhábitat y establecimiento de donde fueron aislados.

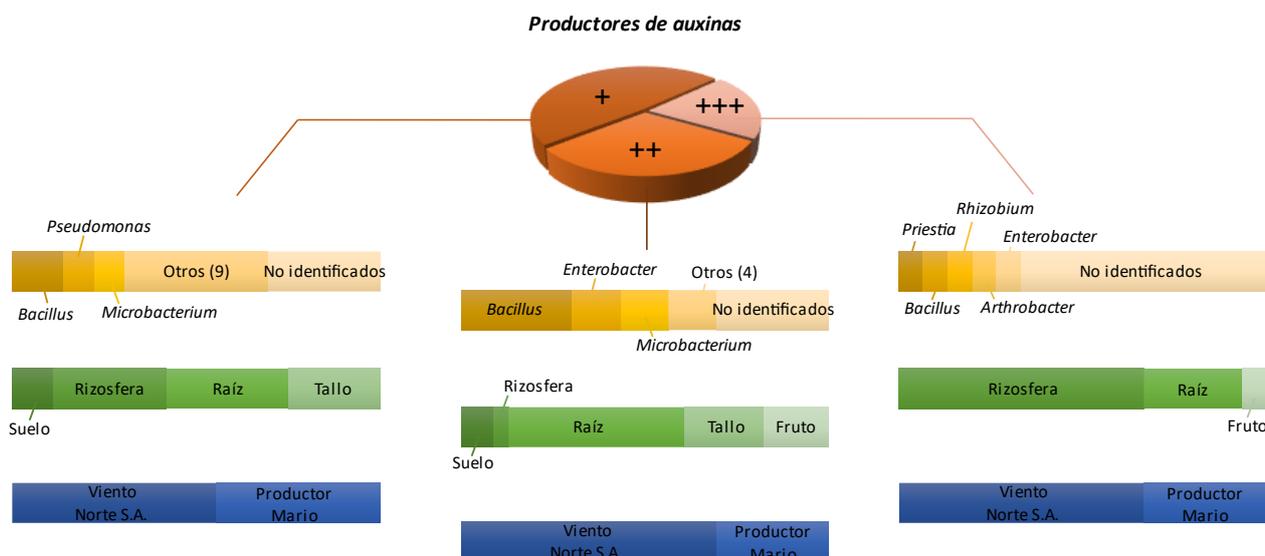


Figura 3.3.6h Proporción de aislamientos bacterianos con diferente capacidad de producir auxinas, detallando para cada grupo el establecimiento y microhábitat de donde fueron aislados y los géneros predominantes.

❖ Los aislamientos capaces de producir auxinas fueron aislados mayormente de muestras de rizosfera y endosfera de raíz y tallo de ambos establecimientos, siendo los principales géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*.

3.3.6.5 Índices sobre caracterización de promoción del crecimiento vegetal y selección de aislamientos promisorios

Con los resultados de la caracterización *in vitro* sobre solubilización de fósforo insoluble, producción de sideróforos, fijación biológica del nitrógeno y producción de fitohormonas de tipo auxínicas se calculó el **Índice de Mecanismos de Promoción del Crecimiento Vegetal (IMPCV)**. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla 6.3.1a](#) del [ANEXO B.](#)

Se encontraron 67 aislamientos con **IMPCV** = 0, lo cual indica que no mostraron actividad positiva en ninguno de los 4 mecanismos de promoción del crecimiento vegetal evaluados. Solo 4 aislamientos bacterianos obtuvieron valores de **IMPCV** > 0,5, siendo el valor máximo de **IMPCV** = 0,73 (aislamiento **TI 15**, género *Pseudomonas*).

Los 15 aislamientos con mayores valores de **IMPCV** ([Tabla 3.3.6b](#)) fueron obtenidos tanto en su mayoría de endosfera de raíz y tallo, solo habiendo 2 de rizosfera y dos de endosfera de fruto de plantas de tomate de ambos establecimientos en estudio, destacándose mayoritariamente los géneros *Bacillus* (4) y *Pseudomonas* (3).

Tabla 3.3.6b Detalle de los aislamientos bacterianos con mayor valor del índice de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (**IMPCV**), especificando resultados de las características ensayadas y los aislamientos seleccionados (*) para continuar con los estudios *in vivo*.

Aislamiento	Género	ISoIP	Sideróforos	FBN	AUX	IMPCV	ICV	IPPCV
TI 15 *	<i>Pseudomonas</i>	0,91	+	+	++	0,73	0,25	0,85
TI 28 *	<i>Pseudomonas</i>	1,00	+	+	-	0,58	0,38	0,77
RhM 40 *	<i>Bacillus</i>	0,87	+	+	-	0,55	0,25	0,68
TI 6 *	<i>Curtobacterium</i>	0,37	++	+	-	0,51	0,25	0,63
TM 16 *	<i>Flavobacterium</i>	0,05	++	+	-	0,43	0,75	0,80
RI 17 *	<i>Agrobacterium</i>	0,05	+	+	+	0,43	0,50	0,68
RI 48	<i>Bacillus</i>	0,00	-	+	++	0,42	0,13	0,48
TM 30 *	<i>Bacillus</i>	0,00	++	+	-	0,42	1,00	0,92
RI 13 *	<i>Peribacillus</i>	0,00	++	+	-	0,42	0,50	0,67
RI 16	<i>Bacillus</i>	0,00	+	+	+	0,42	0,25	0,54
RhI 7	No identificado	0,00	++	-	+++	0,42	0,00	0,42
TM 31 *	<i>Enterobacter</i>	0,94	-	-	++	0,40	0,50	0,65
FM 13 *	<i>Enterobacter</i>	0,21	+	-	+++	0,38	0,50	0,63
FM 7	<i>Pantoea</i>	0,19	+	+	-	0,38	0,00	0,38
TI 23	<i>Pseudomonas</i>	0,81	++	-	-	0,37	0,25	0,49

Al combinar estos resultados con la caracterización del potencial de colonización de los órganos vegetales mediante el cálculo del **Índice de Potencial de Promoción del Crecimiento Vegetal (IPPCV)** para elegir definitivamente los aislamientos bacterianos de la colección con características de bioprospección más promisorias se observa que, si bien puede cambiar el orden según el valor del **IPPCV**, los aislamientos con buenas características de promoción del crecimiento vegetal también poseen buenos valores del índice de colonización vegetal. Los aislamientos bacterianos seleccionados para continuar con los ensayos de promoción del crecimiento in vivo se detallan en la [Tabla 3.3.6b](#) con un asterisco color rojo (*).

El análisis global de los aislamientos bacterianos de la colección a través de un análisis de componentes principales de sus índices (**ICV, ISoIP, SID, AUX, IPPCV**), permitió realizar las siguientes observaciones (no se emplearon datos de la **FBN** ya que no se contó con este dato para toda la colección bacteriana, aunque su resultado si está incluido en **IPPCV**) ([Figura 3.3.6i](#) y [Figura 3.3.6j](#)):

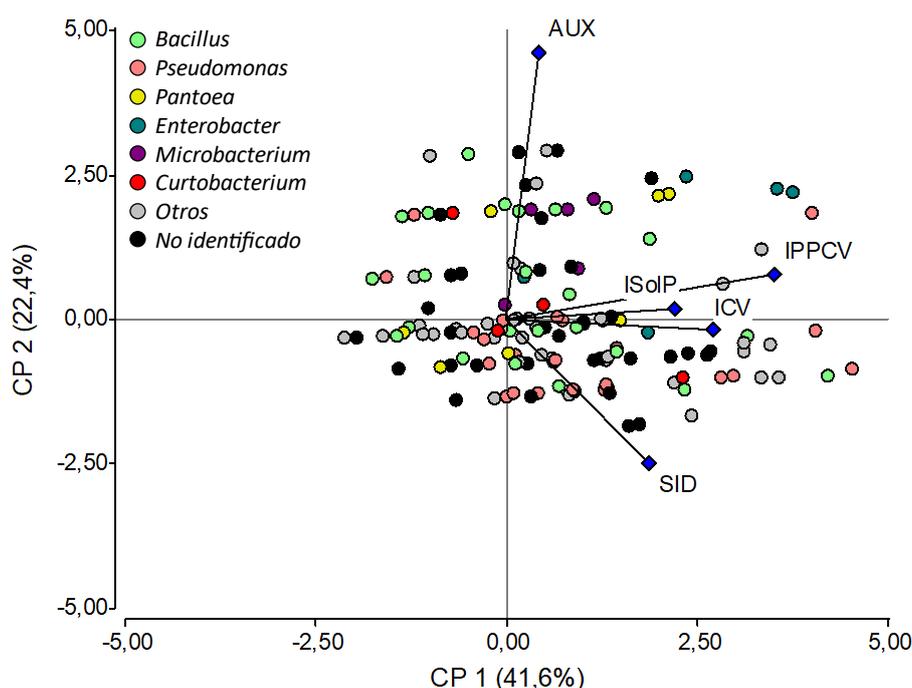


Figura 3.3.6i Biplot resultante del análisis de componentes principales sobre los índices relacionados a la colonización vegetal (**ICV**), los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (**ISoIP, SID, AUX**) y su combinación (**IPPCV**) de los diferentes aislamientos bacterianos, discriminados según asignación taxonómica.

❖ El análisis de componentes principales de los distintos aislamientos bacterianos respecto a los índices calculados sobre las determinaciones *in vitro* sobre colonización vegetal y los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal determinó que los dos CP expliquen un 64% de la variabilidad total. Un tercer y

cuarto CP aportaron 18% y 16%, respectivamente. Para simplificar el análisis solo se analizan los CP1 y CP2, aunque pueden verse los resultados detallados en el PCA del ANEXO B..

❖ Se observa una nube de puntos con cierta concentración en el centro del gráfico, de la cual se distinguen numerosos aislamientos bacterianos que se salen de la nube de puntos central, en dirección tanto positiva sobre el CP1, como positivo para el CP2.

❖ En base a la proyección de las variables sobre cada uno de los CP, se puede determinar que las proyecciones positivas sobre el CP1 (41,6%) están caracterizadas por altos valores de *ICV*, así como por la mayor actividad de solubilización de fósforo y producción de sideróforos. Todo esto en conjunto se traduce en un mayor valor del *IPPCV*, variable de mayor peso en el CP1. La mayor densidad de puntos desplazada hacia el lado positivo del CP1 muestra que gran parte de la colección bacteriana generada mostró resultados positivos a las determinaciones sobre capacidad de colonización vegetal y mecanismos de promoción del crecimiento. Se destacan algunos aislamientos con mayor proyección pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea* y *Curtobacterium*, entre otros, así como algunos no identificados taxonómicamente (coincidente con los aislamientos bacterianos seleccionados por su mayor *IPPCV*, mostrados en la [Tabla 3.3.6b](#))

❖ El CP2 (22,4%) principalmente aporta una diferenciación entre los aislamientos con mayor capacidad de producir auxinas (ubicados sobre cuadrante positivo del CP2) y la mayor capacidad de producción de sideróforos (ubicados en el cuadrante negativo del CP2).

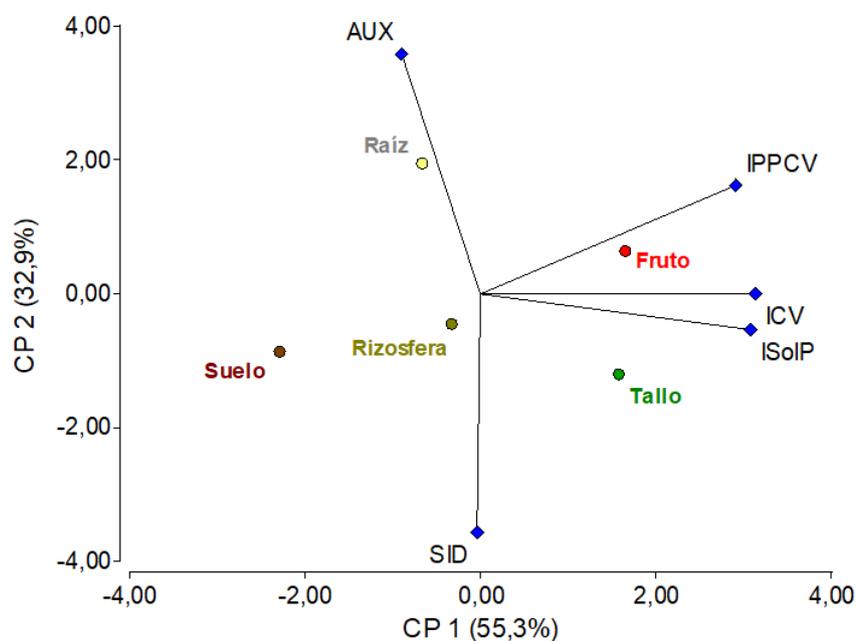


Figura 3.3.6j Biplot resultante del análisis de componentes principales sobre los índices relacionados a la colonización vegetal (*ICV*), los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (*ISolP*, *SID*, *AUX*) y su combinación (*IPPCV*) en base a los aislamientos bacterianos pertenecientes a cada microhábitat.

❖ El análisis de componentes principales respecto a los índices calculados sobre las determinaciones *in vitro* sobre colonización vegetal y mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que caracterizan a cada microhábitat a través de los aislamientos bacterianos determinó que los dos CP expliquen un 88,2% de la variabilidad total. Un tercer CP no mejoró significativamente la variabilidad total explicada (los detalles en el ANEXO: Capítulo 3).

❖ El CP1 (55,3%) separa a lo largo de su eje a los microhábitats, conformando 3 grupos con similar proyección sobre este eje: (i) suelo, (ii) rizosfera-raíz, y (iii) tallo-fruto. Esto determina diferencias entre los microhábitats respecto a su contribución (de menor a mayor, respectivamente) de aislamientos bacterianos con mayores valores en las determinaciones de colonización vegetal (**ICV**), actividad de solubilización de fósforo y el **IPPCV** general (que incluye la FBN), en la colección generada.

❖ En este mismo sentido, las muestras de endosfera vegetal y rizosfera se caracterizaron por una mayor proporción de aislamientos bacterianos que mostraron resultados positivos en las determinaciones sobre mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

❖ El CP2 (32,9%) describe a cada uno de los microhábitats en base a las actividades de producción de auxinas (cuadrante positivo del CP2) y la producción de sideróforos (cuadrante negativo del CP2) determinada en los aislamientos bacterianos obtenidos de cada uno de ellos. Este eje permite diferenciar los agrupamientos de microhábitats mencionados en el punto 2, distinguiendo a los aislamientos obtenidos de raíz por sus mayores actividades de producción de fitohormonas auxínicas y los de tallo, suelo y rizosfera por mayor actividad de producción de sideróforos.

3.3.7. EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL *IN VIVO* DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS SELECCIONADOS

Las características relacionadas a la colonización y a la promoción del crecimiento vegetal evaluadas *in vitro* para cada uno de los aislamientos bacterianos de la colección permitieron seleccionar a 10 de ellos para evaluar su efecto promotor del crecimiento vegetal *in vivo* en cultivo de lechuga y tomate tanto en etapa de plantín como en etapa productiva, cuyos resultados se detallan a continuación. Las características de los cultivos bacterianos utilizados para inocular en cada uno de los ensayos se detallan en la [Tabla 6.3.2a](#) del [ANEXO B](#).

3.3.7.1 Ensayos en etapa de plantin

Los plantines sin inocular e inoculados al momento de la siembra con los aislamientos bacterianos seleccionados en las especies hortícolas lechuga y tomate, se crecieron en cámara de cultivo con condiciones de temperatura y fotoperíodo controladas. Los resultados detallados de cada uno de los ensayos se encuentran [aquí](#).

En lo que respecta al cultivo de lechuga var. *sagess*, la producción de plantines en las condiciones controladas fue exitosa, ya que se logró obtener en todos los tratamientos plantines de calidad comparables a los obtenidos por los viveros comerciales para la producción hortícola. En cuanto a los efectos de los diferentes aislamientos bacterianos sobre la acumulación de biomasa en los plantines y el área foliar, se comprobó que algunos de estos aislamientos bacterianos seleccionados por sus características de promoción del crecimiento vegetal efectivamente aumentaron los parámetros del crecimiento medidos, en comparación con los plantines sin inocular (Figura 3.3.7a y Figura 3.3.7b). El [análisis estadístico](#) se detalla en el [ANEXO B](#).

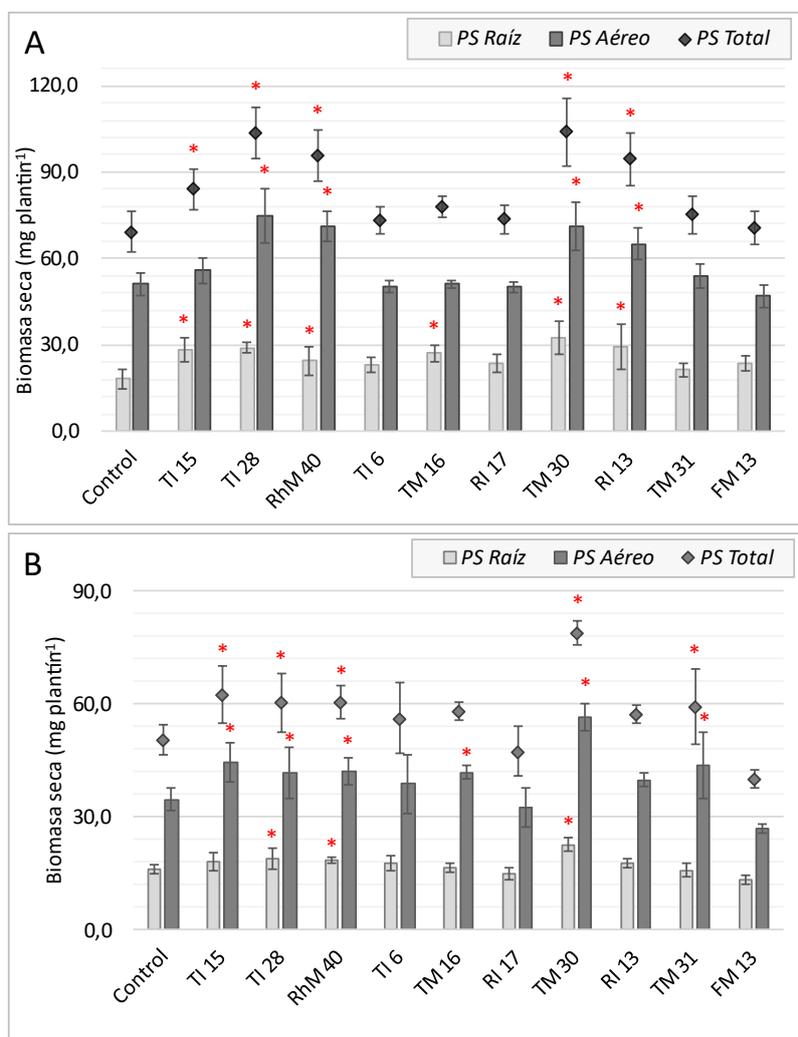


Figura 3.3.7a Acumulación de materia seca (mg plantin^{-1}) a los 30 días desde la siembra en raíz (barras gris claro), parte aérea (barras gris oscuro) y total (Rombos gris oscuro) en plantines de lechuga var. *sagess* no inoculados (control) e inoculados con distintos aislamientos bacterianos en dos ensayos independientes (A y B). Los asteriscos rojos indican las medias con diferencias significativas respecto al tratamiento control según Test unilateral de Dunnett ($p < 0,05$).

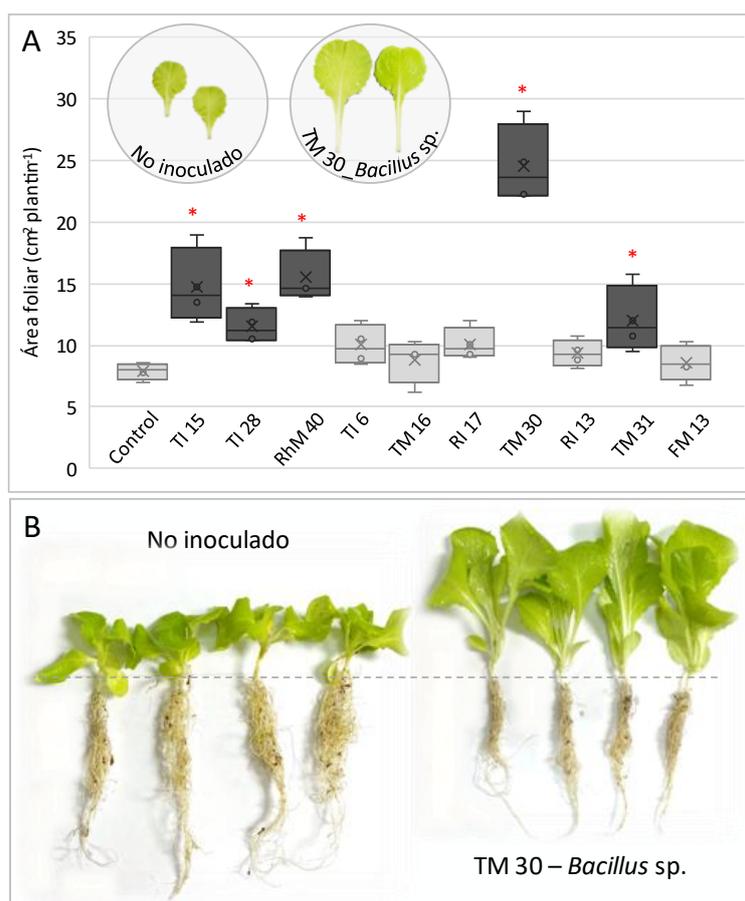


Figura 3.3.7b En (A) se detalla el área foliar de plantines no inoculados e inoculados con distintos aislamientos bacterianos a los 30 días desde la siembra. Las cajas en gris claro representan a los tratamientos cuyos valores no difieren significativamente del tratamiento control; y las cajas en gris oscuro con asterisco rojo representan los tratamientos inoculados con mayor área foliar significativa respecto al tratamiento, según Test unilateral de Dunnett ($p < 0,05$). En (B), fotografía de plantines del tratamiento No inoculado (control) y el inoculado con el aislamiento TM 30, del género *Bacillus*.

❖ La acumulación de biomasa fue significativamente mayor en plantines inoculados con 4 de los aislamientos seleccionados –en comparación con los no inoculados–, cuyos resultados fueron consistentes en ambos ensayos independientes: (TI 15_ *Pseudomonas* sp.; TI 28_ *Pseudomonas* sp.; RhM 40_ *Bacillus* sp.; TM 30_ *Bacillus* sp.) (Figura 3.3.7a). Este incremento de biomasa total se observó reflejado tanto en el sistema radical como en la parte aérea de los plantines, siendo que ambos parámetros en los plantines inoculados superaron lo observado en los plantines no inoculados ($p < 0,05$).

❖ Estos mismos aislamientos bacterianos inoculados a la siembra, promovieron un aumento del área foliar de las primeras dos hojas en los plantines de lechuga (Figura 3.3.7b), con diferencias significativas respecto al control sin inocular ($p < 0,05$).

❖ El aislamiento TM 30, perteneciente al género *Bacillus*, fue el que obtuvo numéricamente los mayores valores de área foliar y acumulación de biomasa, aumentando un 210% y entre un 50-64% dichos parámetros, respectivamente, en comparación a los plantines de lechuga sin inocular.

❖ Si bien no se obtuvo el mismo resultado consistente en ambos ensayos como el descrito anteriormente, los aislamientos RI 13_*Peribacillus* sp. y TM 31_*Enterobacter* sp. aumentaron significativamente el peso seco de los plantines en al menos uno de los ensayos realizados; y TM 31_*Enterobacter* sp. también aumentó el área foliar de los plantines de lechuga.

La repetición de estos ensayos en condiciones de producción (vivero hortícola Babyplant), en la variedad de lechuga *Emilia* y bajo el manejo productivo comúnmente empleado en dicha plantinera mostró resultados consistentes en los parámetros del crecimiento medidos en plantines inoculados con algunos de los aislamientos bacterianos seleccionados (Figura 3.3.7c) (El análisis estadístico se detalla en el ANEXO B.):

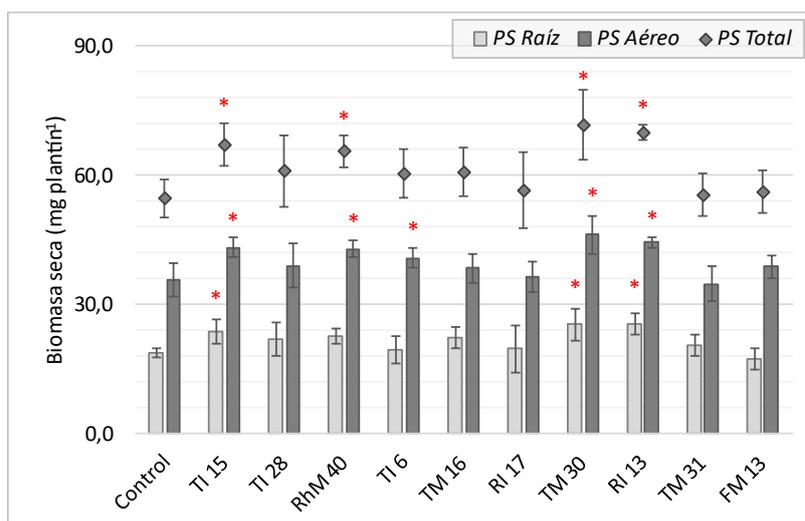


Figura 3.3.7c Acumulación de materia seca (mg plantin^{-1}) a los 30 días desde la siembra en raíz (barras gris claro), parte aérea (barras gris oscuro) y total (Rombos gris oscuro) en plantines de lechuga var. *emilia* no inoculados (control) e inoculados con distintos aislamientos bacterianos. Los asteriscos rojos indican las medias con diferencias significativas respecto al tratamiento control según Test unilateral de Dunnett ($p < 0,05$).

❖ La acumulación de biomasa total fue significativamente mayor en plantines inoculados con 4 de los aislamientos seleccionados ($p < 0,05$), en comparación con los no inoculados. Tres de estos aislamientos bacterianos también promovieron significativamente la acumulación de biomasa total en ambos ensayos en condiciones controladas de laboratorio: TI 15_*Pseudomonas* sp.; RhM 40_*Bacillus* sp.; TM 30_*Bacillus* sp.; el aislamiento restante (RI 13_*Peribacillus* sp.) mostró resultados significativos de aumento de la biomasa total en un solo ensayo previo.

❖ Este incremento de biomasa total se observó reflejado tanto en el sistema radical (salvo en el tratamiento con RhM 40 que no se diferenció de la biomasa radical del control), como en la parte aérea de los plantines, siendo que ambos parámetros en los plantines inoculados superaron lo observado en los plantines no inoculados ($p < 0,05$).

Las diferencias mencionadas en aumentos de la biomasa aérea de los plantines al trasplante resultaron muy notorias en la apariencia de los plantines, como se muestra en las fotografías de la [Figura 3.3.7d](#) a continuación:

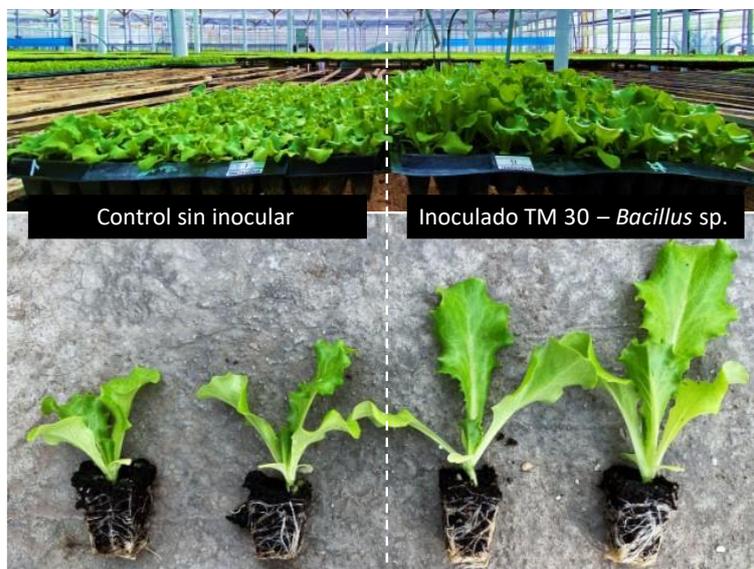


Figura 3.3.7d Fotografía de plantines de lechuga var. *Emilia* no inoculados, e inoculados con el aislamiento TM 30 del género *Bacillus*, a los ~30 días desde la siembra, crecidos en vivero hortícola Babyplant SRL.

Los mismos aislamientos bacterianos se ensayaron en la producción de plantines de tomate var. *elpida*, los cuales se crecieron en cámara de cultivo y luego de 40 días desde la siembra e inoculación se encontraron los siguientes valores de biomasa seca radical, aérea y total expresados en mg plantin^{-1} ([Figura 3.3.7e](#)) (el [análisis estadístico](#) se detalla en el [ANEXO B.](#)):

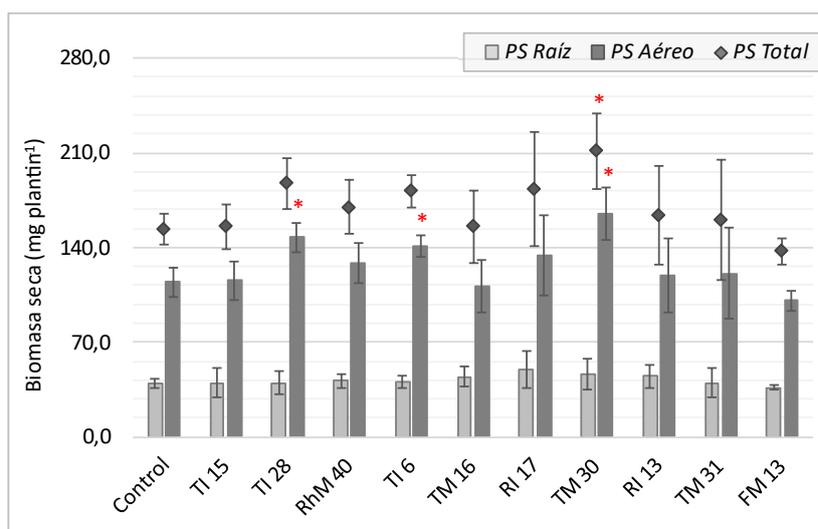


Figura 3.3.7e Acumulación de materia seca (mg plantin^{-1}) a los 40 días desde la siembra en raíz (barras gris claro), parte aérea (barras gris oscuro) y total (rombos gris oscuro) en plantines de tomate var. *elpida* no inoculados (control) e inoculados con distintos aislamientos bacterianos. Los asteriscos rojos indican las medias con diferencias significativas respecto al tratamiento control según Test unilateral de Dunnett ($p < 0,05$).

❖ La acumulación de biomasa total fue significativamente mayor (38%) en plantines inoculados con el aislamiento bacteriano TM 30, en comparación con los no inoculados ($p < 0,05$). Este incremento de biomasa total se observó reflejado en la parte aérea de los plantines, ya que dicho parámetro resultó significativamente mayor que lo observado en los plantines no inoculados ($p < 0,05$), sin diferencia en la biomasa radical entre ambos tratamientos.

❖ Otros dos aislamientos bacterianos inoculados en plantines de tomate mostraron una mejoría de los parámetros de biomasa acumulada respecto al control sin inocular: TI 28_ *Pseudomonas* sp. y TI 6_ *Curtobacterium* sp. promovieron el crecimiento de la parte aérea de los plantines, aumentando en un 29 y un 24% la acumulación de biomasa en comparación al control sin inocular, respectivamente.

❖ Ninguno de los aislamientos bacterianos inoculados en plantines de tomate mostró una mejoría en el crecimiento del sistema radical respecto al tratamiento sin inocular.

Los aumentos de la biomasa en los plantines inoculados con TM 30_ *Bacillus* sp. y TI 28_ *Pseudomonas* sp. se tradujeron en plantines con mayor desarrollo aéreo, como se muestra en las fotografías de la [Figura 3.3.7f](#) a continuación:



Figura 3.3.7f Fotografía de plantines de tomate var. *elpida* no inoculados, e inoculados con el aislamiento TI 28 y TM 30, pertenecientes a los géneros *Curtobacterium* y *Bacillus*, respectivamente, a los 40 días desde la siembra, crecidos en condiciones controladas de laboratorio.

De los 3 aislamientos bacterianos que mostraron promover la acumulación de biomasa de la parte aérea de plantines de tomate, solo uno de ellos mostró incrementos significativos en el área foliar respecto al control sin inocular ($p < 0,05$), y fue el aislamiento TM 30_ *Bacillus* sp. Los resultados de área foliar expresados en cm^2 por plantin para todos los tratamientos inoculados y no inoculado se muestran en la [Figura 3.3.7g](#) a continuación:

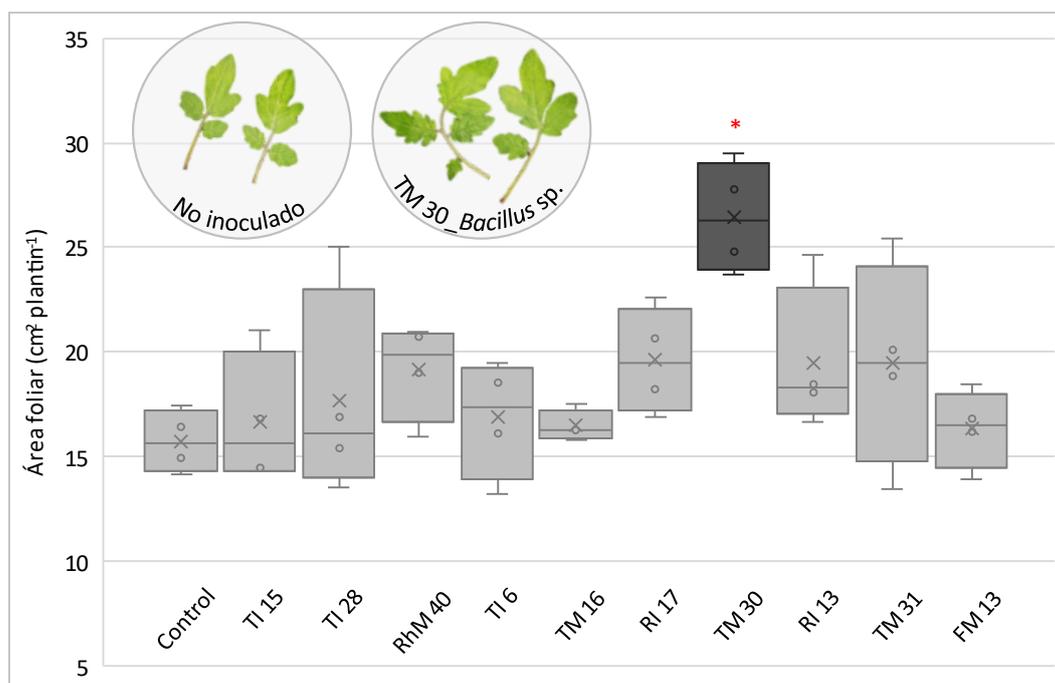


Figura 3.3.7g Área foliar de plantines no inoculados e inoculados con distintos aislamientos bacterianos a los 40 días desde la siembra. Las cajas en gris claro representan a los tratamientos cuyos valores no difieren significativamente del tratamiento control; y las cajas en gris oscuro con asterisco rojo representan los tratamientos inoculados con mayor área foliar significativa respecto al tratamiento, según Test unilateral de Dunnett ($p < 0,05$). Las fotografías a escala son las dos primeras hojas de plantines de tomate *elpida* del tratamiento No inoculado (control) y el inoculado con el aislamiento TM 30, del género *Bacillus*.

Los ensayos de promoción del crecimiento vegetal realizados en etapa de plantin en los cultivos de lechuga y tomate, inoculando a la siembra los aislamientos bacterianos seleccionados, mostraron resultados interesantes (Tabla 3.3.7a):

Los aislamientos bacterianos inoculados mostraron mayores efectos promotores del crecimiento en el cultivo de lechuga, mejorando tanto la acumulación de biomasa total como el área foliar de los plantines en ambos cultivares de lechuga ensayados (*sagess* y *emilia*) y crecidos tanto en condiciones controladas de laboratorio como en condiciones comerciales de producción.

Los resultados más consistentes en cultivo de lechuga se obtuvieron con los aislamientos bacterianos TI 15_ *Pseudomonas* sp., RhM 40_ *Bacillus* sp. y TM 30_ *Bacillus* sp., evidenciando su efecto promotor en los 3 ensayos realizados.

En plantines de tomate var. *elpida* se observó que únicamente un aislamiento bacteriano (TM 30_ *Bacillus* sp.) mejoró tanto la acumulación de biomasa como el área foliar, mientras que otros dos aislamientos solo mostraron una mayor biomasa aérea que no se tradujo en aumentos del área foliar (TI 28_ *Pseudomonas* sp. y TI 6_ *Curtobacterium* sp.).

Tabla 3.3.7a Resumen de los resultados que mostraron un aumento significativo en parámetros del crecimiento (biomasa seca acumulada en sistema radical, parte aérea y total –PS Raíz, PS Aéreo y PS Total, respectivamente–, y área foliar) de ensayos de promoción del crecimiento vegetal de aislamientos bacterianos seleccionados en etapa de plantin de cultivos de lechuga y tomate crecidos en condiciones controladas (Lab) y comerciales de producción.

Cultivo	Ensayo	Parámetro	AISLAMIENTOS BACTERIANOS									
			TI 15 <i>Pseudomonas</i> sp.	TI 28 <i>Pseudomonas</i> sp.	RhM 40 <i>Bacillus</i> sp.	TI 6 <i>Curtobacterium</i> sp.	TM 16 <i>Flavobacterium</i> sp.	RI 17 <i>Agrobacterium</i> sp.	TM 30 <i>Bacillus</i> sp.	RI 13 <i>Peribacillus</i> sp.	TM 31 <i>Enterobacter</i> sp.	FM 13 <i>Enterobacter</i> sp.
Lechuga	Lab (1)	PS Raíz	*	*	*		*		*	*		
		PS Aéreo		*	*				*	*		
		PS Total	*	*	*				*	*		
	Lab (2)	PS Raíz		*	*				*			
		PS Aéreo	*	*	*		*		*			
		PS Total	*	*	*				*		*	
		Área foliar	*	*	*				*		*	
	Comercial	PS Raíz	*						*	*		
		PS Aéreo	*		*	*		*	*	*		
PS Total		*		*				*	*			
Tomate	Lab (1)	PS Raíz										
		PS Aéreo		*		*			*			
		PS Total							*			
		Área foliar							*			

3.3.7.2 Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en etapa productiva bajo cubierta

Los ensayos en etapa productiva se llevaron a cabo en invernaderos dentro de la Chacra Experimental Gorina (Ministerio de Desarrollo Agrario – MDA). Los resultados detallados de cada uno de los ensayos se encuentran [aquí](#).

El resultado del análisis de suelo muestreado en los invernáculos de la chacra experimental Gorina revela las características de un suelo levemente alcalino, con buenas aptitudes para la actividad agrícola (buenos

contenidos de materia orgánica, nitrógeno total, fósforo y cationes, y sin problemas de salinidad y/o sodicidad). Los resultados detallados se resumen en la [Tabla 6.3.2t](#) del ANEXO B.

- ENSAYOS EN LECHUGA

Los ensayos en cultivo de lechuga var. *sagess* y var. *emilia* –no inoculados, e inoculados a la siembra y al trasplante con distintos aislamientos bacterianos– transcurrieron sin aplicación de fitosanitarios y sin inconvenientes respecto a plagas y/o enfermedades ([Figura 3.3.7h](#)).



Figura 3.3.7h Ensayo de promoción del crecimiento vegetal en lechuga (var. *sagess* y var. *emilia*) en invernáculo de la chacra experimental Gorina (MDA).

Se evaluó en ambos ensayos el peso comercial de las plantas a cosecha (g planta^{-1}), cuyos resultados se detallan en la [Figura 3.3.7i](#).

En ambos ensayos se observó al momento de la cosecha que los tratamientos presentaban plantas en diferentes estadios de desarrollo vegetativo: mientras que las plantas de algunos tratamientos inoculados (TM 30_ *Bacillus* sp., TI 28_ *Pseudomonas* sp., y RhM 40_ *Bacillus* sp.) ya se encontraban en calidad comercial para ser cosechadas, otras plantas de tratamientos inoculados y el tratamiento control sin inocular aún no habían alcanzado esta característica.

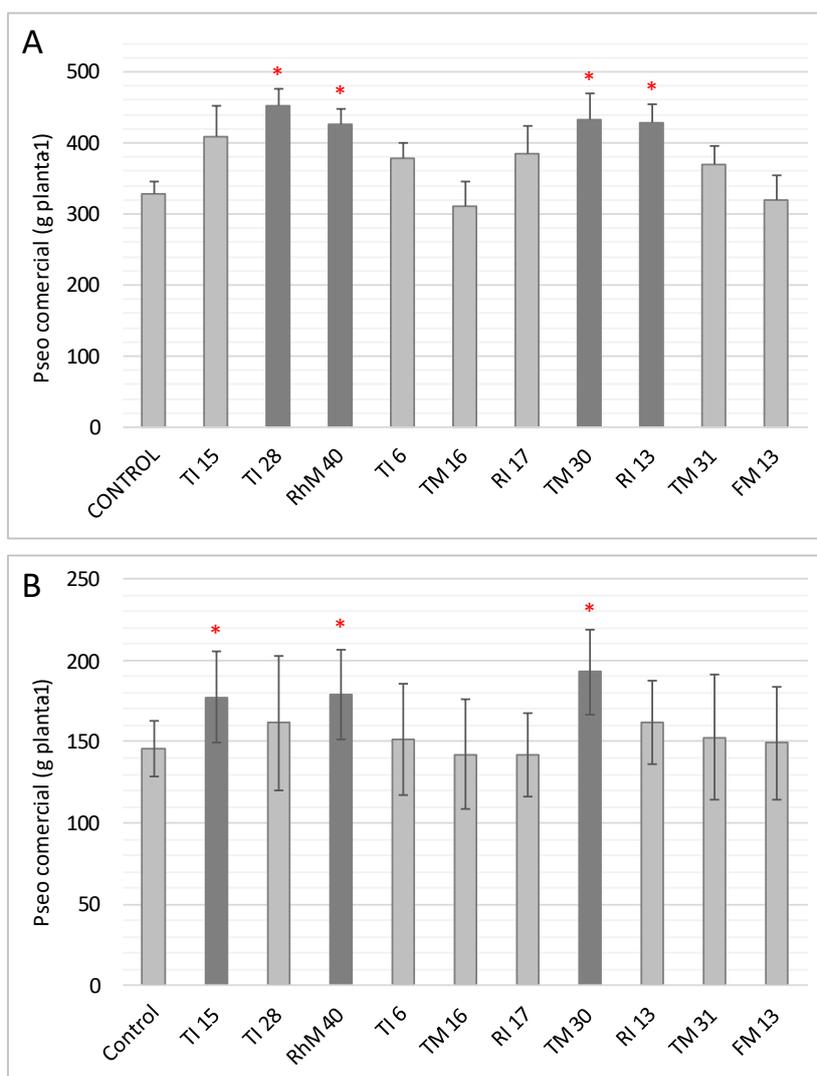


Figura 3.3.7i Resultados de los pesos comerciales a cosecha de plantas de lechuga var. *sagess* (A) y var. *emilia* (B) de los distintos tratamientos (Control sin inocular e inoculados con distintos aislamientos bacterianos) del ensayo de promoción del crecimiento vegetal en la chacra experimental Gorina (MDA).

❖ Las diferencias en los pesos de las plantas de lechuga entre ambos ensayos se deben principalmente a las características de cada variedad de lechuga y a su momento de cosecha comercial: la lechuga var. *sagess* es una lechuga mantecosa que forma un centro arrepollado medianamente compacto y más pesado; por otro lado, la lechuga var. *emilia* es de tipo crespa, más laxa, voluminosa y liviana.

❖ En ambos ensayos se observaron aislamientos bacterianos que incrementaron significativamente el peso a cosecha comercial de las plantas de lechuga respecto al tratamiento control sin inocular:

→ En el ensayo de lechuga var. *sagess* hubo 4 aislamientos bacterianos que incrementaron entre 30-37% el peso comercial de las plantas de lechuga: TI 28_*Pseudomonas* sp., TM 30_*Bacillus* sp., RI 13_*Peribacillus* sp., y RhM 40_*Bacillus* sp.

→ En el ensayo de lechuga var. *emilia* hubo 3 aislamientos bacterianos que incrementaron entre 21-32% el peso comercial de las plantas de lechuga: TM 30_ *Bacillus* sp., RhM 40_ *Bacillus* sp., y TI 15_ *Pseudomonas* sp.

❖ Dos aislamientos mostraron mayores valores respecto al control en ambos ensayos, ambos pertenecientes al género *Bacillus*, uno aislado de tejidos internos de tallo y otro de rizosfera de plantas de tomate. Cabe destacar que estos dos aislamientos bacterianos mostraron importantes aumentos en la acumulación de biomasa y área foliar en el cultivo de lechuga en etapa de plantín, tanto creciendo en condiciones controladas de laboratorio, como en condiciones comerciales en plantinera.

❖ Los otros 3 aislamientos bacterianos que mostraron una mejoría en el peso de las plantas a cosecha comercial, también mostraron efectos promotores del crecimiento en etapa de plantin en lechuga, aunque más variables que los mencionados anteriormente (Tabla 3.3.7a).

- ENSAYOS EN TOMATE

El ensayo en cultivo de tomate var. *elpida* se realizó en fecha de cultivo temprano para la zona del CHP, con plantas no inoculadas (control), e inoculados a la siembra y al trasplante con distintos aislamientos bacterianos. Durante el transcurso del cultivo no se identificaron problemas de plagas y/o enfermedades (Figura 3.3.7j).



Figura 3.3.7j Ensayo de promoción del crecimiento vegetal en cultivo de tomate var. *elpida*, en invernáculo de la chacra experimental Gorina (MDA).

Si bien no se evaluaron parámetros de crecimiento intermedios durante la etapa vegetativa del cultivo, no se apreciaron diferencias visuales entre las plantas de los distintos tratamientos inoculados y no inoculado, creciendo todas las plantas de forma uniforme y robusta (Figura 3.3.7k).



Figura 3.3.7k Ensayo de promoción del crecimiento vegetal en cultivo de tomate var. *elpida* en invernáculo de la chacra experimental Gorina (MDA).

La cosecha del cultivo comenzó a principios del mes de noviembre/2021 y se extendió hasta fin de diciembre/2021 realizando 6 cosechas en total. Los resultados del ensayo se muestran en las Figura 3.3.7l y Figura 3.3.7m a continuación:

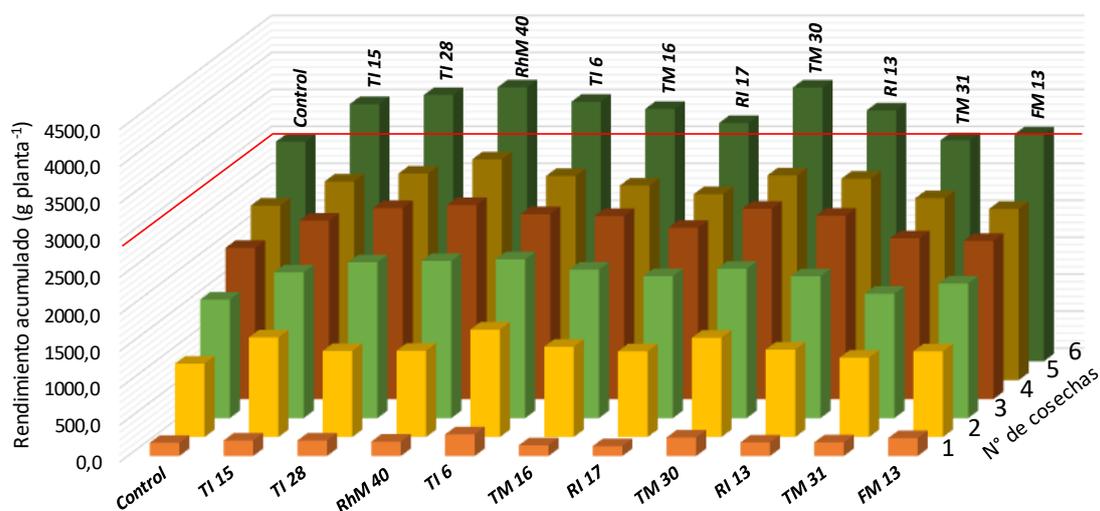


Figura 3.5.7l Rendimiento acumulado del cultivo de tomate var. *elpida*. Promedio de los tratamientos inoculados y no inoculado. Los resultados se expresan en g de fruto planta⁻¹.

❖ El rendimiento promedio de 165 plantas evaluadas (11 tratamientos * 5 bloques * 3 submuestras = 165 plantas) a lo largo de todo el ensayo fue de 3370 g planta⁻¹ de frutos. El tratamiento control no inoculado tuvo una producción de frutos de tomates promedio de 2971 ± 170 g planta⁻¹, mientras que los tratamientos inoculados con los diferentes aislamientos bacterianos rindieron entre 2991-3704 g planta⁻¹, sin efecto significativo de la inoculación sobre el rendimiento del cultivo ($p = 0,112$).

❖ Los tratamientos que numéricamente mostraron un mayor rendimiento del cultivo fueron los inoculados con los aislamientos bacterianos TM 30_ *Bacillus* sp. y RhM 40_ *Bacillus* sp (~3700 ± 450 g planta⁻¹), y el aislamiento TI 28_ *Pseudomonas* sp. (~3600 ± 693 g planta⁻¹).

❖ Si bien los resultados del análisis estadístico no permiten afirmar un efecto promotor del crecimiento sobre el rendimiento del cultivo de las diferentes bacterias inoculadas, se observaron resultados similares a los obtenidos en ensayos previos (etapa de plantin en lechuga y tomate, y etapa productiva en cultivo de lechuga) en los cuales estos tres aislamientos bacterianos muestran los mejores parámetros del crecimiento en las plantas evaluadas.

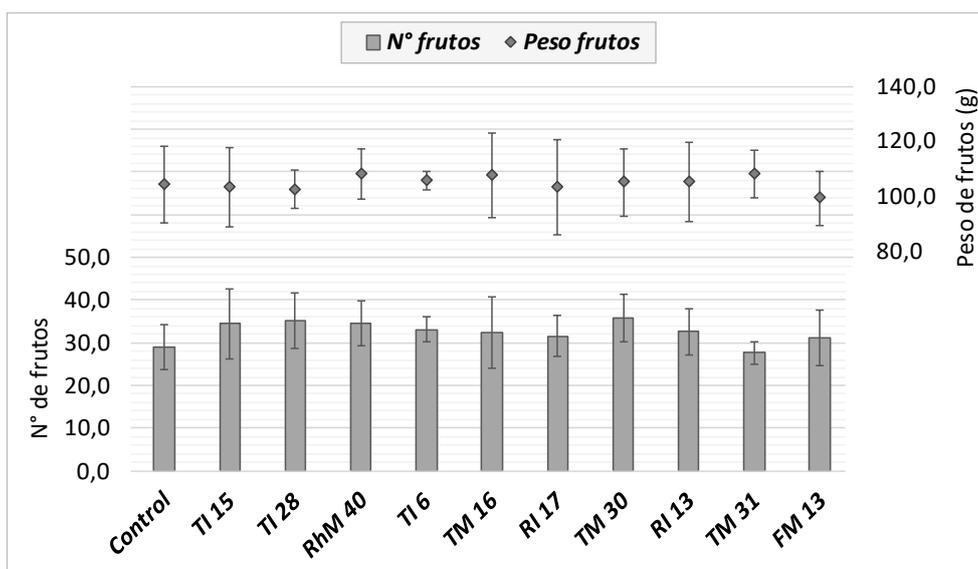


Figura 3.3.7m Número y peso de frutos en plantas de tomate no inoculadas (Control) e inoculadas a la siembra y al trasplante con distintos aislamientos bacterianos, cultivadas bajo cubierta la chacra experimental Gorina (MDA).

❖ La cosecha promedio del ensayo fue de 32 ± 3 frutos planta⁻¹, con un peso de 104 ± 3 g.

❖ Las plantas del tratamiento control sin inocular rindieron 29 ± 5 frutos planta⁻¹, con un peso de 104 ± 14 g fruto⁻¹; mientras que la cosecha de las plantas inoculadas con los diferentes aislamientos bacterianos mostró valores entre 27,7 – 35,1 frutos planta⁻¹, con un peso entre 99 – 108 g fruto⁻¹.

❖ Las variables número de frutos y peso de los frutos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos no inoculado e inoculados a la siembra y al trasplante con los distintos aislamientos ($p=0,928$ y $p=0,901$).

3.3.8. APROXIMACIÓN A NIVEL TAXONÓMICO ESPECIE DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS SELECCIONADOS

En base a lo visto en resultados de [antagonismo contra hongos fitopatógenos](#) y sobre [promoción del crecimiento vegetal](#), se construyeron árboles filogenéticos con el objetivo de aproximar la asignación taxonómica de especie para los aislamientos bacterianos del género *Bacillus* y *Pseudomonas* seleccionados.

- Aislamientos del género *Bacillus*

El alineamiento y la construcción del árbol filogenético por el método Neighbor-Joining con 1000 bootstrap mostró los siguientes resultados ([Figura 3.3.8a](#)):

❖ Algunos de los aislamientos bacterianos asociados inicialmente al género *Bacillus* por representar el mejor alineamiento con la base de datos del NCBI (con un porcentaje de identidad cercano al 100%), parecen no formar parte de este género al estar ubicados en la parte más externa del árbol filogenético. Es el caso de los aislamientos RM 1, RM 5 y RI 13. En los 3 casos, el alineamiento con la base de datos también mostró la cercanía de estos 3 aislamientos bacterianos al género *Peribacillus* con un porcentaje de identidad de 96,77%, 97,82% y 100%, respectivamente.

❖ El resto de los aislamientos bacterianos seleccionados conforman dos grupos distanciados, con una filogenia intragrupo muy cercana entre sí:

- Uno de estos grupos está conformado por los aislamientos RhM 40, RI 16, RI 48, y RM 6. Estos aislamientos mostraron mayor cercanía filogenética a *B. pseudoflexus* y *B. zanthoxyli*.
- El otro de los grupos comprendió a los aislamientos bacterianos TM 36, TI 26, TI 21 y TM 30, cercanos filogenéticamente a *B. velezensis*, *B. siamensis*, y *B. amyloliquefaciens*.

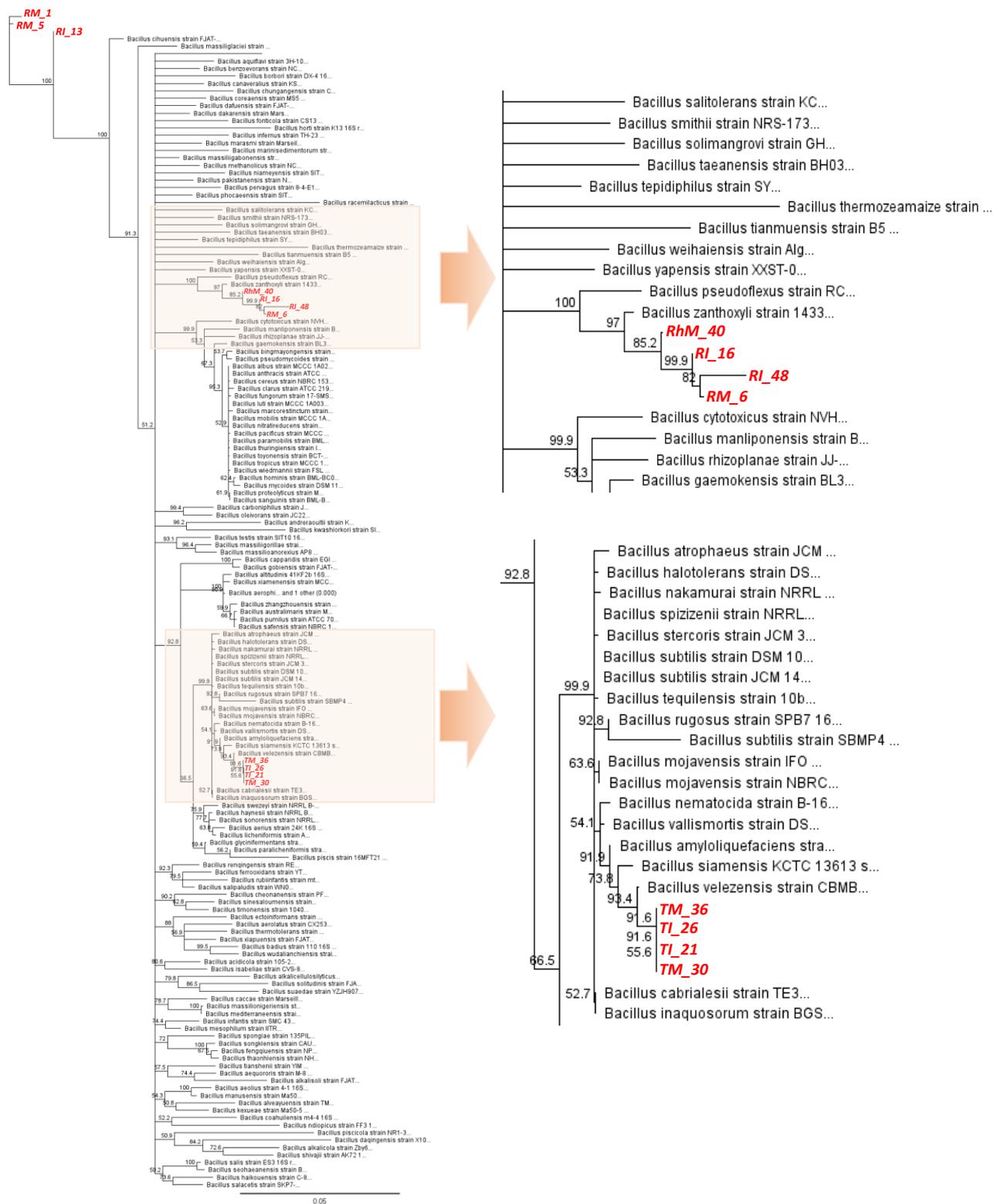


Figura 3.3.8a Árbol filogenético de 144 especies del género *Bacillus*, incluyendo los aislamientos bacterianos seleccionados (nombres en color rojo) por sus características de antagonismo y de promoción del crecimiento vegetal, asignados al género *Bacillus* por mejor alineamiento de la secuencia del gen ARNr 16S con la base de datos del NCBI. El árbol se realizó por el método Neighbor-Joining con 1000 bootstrap.

- *Aislamientos del género Pseudomonas*

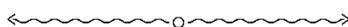
El alineamiento y la construcción del árbol filogenético por el método Neighbor-Joining con 1000 bootstrap mostró que los aislamientos asignados previamente al género *Pseudomonas*, todos se ubicaron dentro de las ramas centrales del árbol, indicando la cercanía filogenética con este género. Sin embargo, las secuencias de ARNr 16S generaron un árbol filogenético que resuelve en una rama principal a partir de la cual se desprenden la mayoría de las especies empleadas para la construcción del árbol, determinando que el árbol construido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S resulta muy poco resolutivo para inferir el nivel especie de los aislamientos bacterianos de la colección.

3.4 DISCUSIÓN GENERAL

La bioprospección microbiana, definida como la exploración de la biodiversidad en la búsqueda sistemática de microorganismos completos y/o componentes naturales con posibles usos para beneficio del ser humano en diferentes sectores (industrial, alimentario, cosmético, farmacéutico, agropecuario) (Castree, 2003), comprende las tareas de aislar, identificar, clasificar, y caracterizar a nivel bioquímico y genético a microorganismos con potencial uso biotecnológico. En este sentido, en el presente capítulo se describieron los ensayos de bioprospección bacteriana, tomando como objeto de estudio a la diversidad de bacterias cultivables asociadas a distintos microhábitats subterráneos y aéreos de plantas de tomate var. *elpida* que crecieron en dos sitios distintos, en la búsqueda de bacterias que potencialmente puedan emplearse en el desarrollo de bioinsumos para el sector agrícola/hortícola.

- ⊕ El análisis de los resultados evidenció que los diferentes microhábitats asociados a las plantas de tomate var. *elpida* son habitados por diversas bacterias cultivables, muchas de las cuales pudieron ser aisladas y conservadas en un medio de cultivo para heterótrofos, generando así una colección bacteriana compuesta por un gran número de aislamientos edáficos, rizosféricos y endófitos de raíz, tallo y fruto.

Como se mencionó previamente, los sesgos de las técnicas de aislamiento –causados en gran medida por el medio de cultivo seleccionado, las condiciones en las cuales se hacen crecer los microorganismos, e incluso el objetivo/criterio con el cual se realiza la selección– determina que las comparaciones de resultados en distintos estudios carezcan de afirmaciones rigurosas, ya que probablemente gran parte de las diferencias sean explicadas por dichos sesgos. No obstante, y teniendo esto último en cuenta, se encontraron numerosos trabajos publicados en la última década que obtuvieron una gran diversidad de bacterias cultivables aisladas de suelo, rizosfera y endosfera de diferentes plantas (Riva et al., 2022), incluso algunas de estas publicaciones detallan la obtención de aislamientos bacterianos a partir de plantas de tomate (generando una colección de hasta 200 aislamientos bacterianos (Abdeljalil et al., 2016; Tabla 3.1.3a) siendo los microhábitats más estudiados los de rizosfera y endorizosfera.



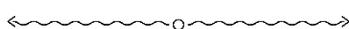
- ⊕ El análisis taxonómico realizado únicamente sobre los aislamientos bacterianos endófitos de raíz, tallo y fruto (150) de la colección generada en este trabajo, mostró a los phylum Proteobacteria (37,5% = 3,1% de Alfabroteobacteria + 34,4% de Gammaproteobacteria), Actinobacteria (30%), Firmicutes (26,9%), y Bacteroidetes (5,6%). Se clasificaron en 33 géneros en total, siendo los más abundantes *Bacillus* (34), *Pseudomonas* (28), *Curtobacterium* (17), *Microbacterium* (14), *Chryseobacterium* (8) y *Pantoea* (8).

La descripción taxonómica de la colección bacteriana endófito generada en este trabajo coincide con los taxones bacterianos frecuentemente aislados de los entornos de las plantas, no solo de microhábitats endofíticos, sino también de rizosfera y filosfera (Bulgarelli et al., 2013). Tal es así que se describe a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* como ubicuos en comunidades microbianas tanto de suelo, así como de rizosfera, filosfera y endosfera de diversas plantas (Bulgarelli et al., 2013; Mongkolthananuk, 2012), así como al género *Pantoea* más vinculado a la colonización de órganos aéreos (Romero et al. 2016). En lo que respecta particularmente a colecciones bacterianas generadas a partir de distintos microhábitats externos e internos de plantas de tomate de diferentes variedades y cultivadas en diferentes condiciones edafoclimáticas, los géneros más reportados (Tabla 3.1.3a, 13 publicaciones) son *Bacillus* (10), *Pseudomonas* (7), *Microbacterium* (5), *Rhizobium* (4), *Acinetobacter* (3), *Enterobacter* (3), y *Pantoea* (3); todos estos géneros fueron hallados en los aislamientos bacterianos de este trabajo, con excepción de *Acinetobacter*.

Puntualmente, se encontraron dos trabajos publicados por López y colaboradores (López et al., 2018; López et al., 2020) sobre aislamientos bacterianos obtenidos de diferentes compartimentos endofíticos de plantas de tomate var. *elpida* cultivadas en el CHP (estudio comparable con el realizado en este trabajo, aunque empleando diferentes medios de cultivo), cuyos resultados se asemejan a los de este trabajo de tesis:

- En una colección de aislamientos más acotada (36 aislamientos en total, obtenidos de endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas sanas y plantas con síntomas de mancha foliar gris; López et al., 2020), encontraron predominancia de los mismos phylum, aunque con diferencias en la abundancia relativa: Proteobacterias (75% = 4% de Alphaproteobacteria + 71% de Gammaproteobacteria), Actinobacteria (12,5%) y Firmicutes (12,5%), sin hallar aislamientos bacterianos del phylum Bacteroidetes.
- En este mismo reporte, el género con mayor número de aislamientos fue *Pseudomonas*, seguido por *Curtobacterium*, *Microbacterium* y *Pantoea*; similar a lo hallado en este trabajo de tesis. No se informan aislamientos bacterianos del género *Bacillus* en ninguno de los microhábitats endofíticos relevados (raíz, tallo, fruto), resultado contrapuesto a lo descrito en este trabajo, donde este género fue el más abundante de la colección.
- La caracterización taxonómica de aislamientos endofitos encontrados en las semillas de tomate var. *elpida* (López et al., 2018), determinó la presencia de los géneros *Bacillus* (22), *Pseudomonas* (12), *Enterobacter* (7), *Rhizobium* (6) *Burkholderia*, y *Stenotrophomonas*.

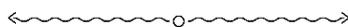
Todos estos resultados en conjunto muestran que varios de los géneros asignados a la flora bacteriana cultivable podrían ser habitantes frecuentes del entorno vegetal de las plantas de tomate, independientemente de la localización y las diferentes características de los suelos en donde las plantas de tomate sean cultivadas.



- ⊕ La **caracterización en base a antagonismo contra hongos fitopatógenos** demostró que, dentro de la colección de bacteriana generada en este trabajo se encontraron bacterias capaces de:
 - Producir enzimas líticas de efecto antagonista (proteasa, lipasa, amilasa, quitinasa): el 40,9% de los aislamientos mostraron al menos una actividad enzimática.
 - Disminuir el crecimiento radial de 4 hongos fitopatógenos (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*) en enfrentamientos duales en placa: el 35% de los aislamientos inhibieron el crecimiento radial de al menos uno de los cuatro hongos fitopatógenos evaluados.
 - Inhibir la germinación de conidios de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* en medio acuoso.
 - Reducir –en mayor o menor medida– la incidencia y severidad de la afección causada por el fitopatógeno *Botrytis cinerea* en plántulas de lechuga durante su germinación.
- ⊕ Los índices calculados con los resultados de diferentes ensayos *in vitro* permitieron la selección de 19 aislamientos bacterianos por su mejor desempeño como antagonistas: estos aislamientos bacterianos fueron asignados a los géneros *Bacillus/Peribacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, y *Enterobacter*; 16 de ellos provienen de endosfera de raíz, tallo y fruto.
- ⊕ Los 8 aislamientos que pudieron ser evaluados en cuanto a su antagonismo *in vivo* contra *Botrytis cinerea* fueron asignados a los géneros *Bacillus/Peribacillus* (4), *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*; 1 de ellos no fue identificado.

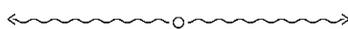
La caracterización de aislamientos bacterianos de la colección generada en este trabajo, coincide con la bibliografía que describe a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, y *Xanthomonas* como agentes bacterianos de biocontrol (BCA, del inglés *Biocontrol Agents*), por evidenciar algún mecanismo que prevenga o disminuya el impacto de las enfermedades fúngicas y/o bacterianas (Bonaterra et al., 2022; Kim et al., 2012), ya sea indirectamente por desencadenar la resistencia sistémica inducida en el vegetal, o bien directamente a través de su interacción negativa hacia el fitopatógeno. En colecciones bacterianas generadas a partir de plantas de tomate (Tabla 3.1.3a), también se han encontrado aislamientos bacterianos –mayormente del género *Bacillus*– con actividad antagonista en ensayos *in vitro* y/o *in vivo* frente a distintos fitopatógenos fúngicos y bacterianos (Amaresan et al. 2012; Abdeljalil et al., 2016; Tian et al. 2017; López et al., 2018; Flemer et al. 2022). El género *Bacillus* es posiblemente uno de los más estudiados, caracterizados e incluso utilizados como BCA contra diversos fitopatógenos fúngicos y bacterianos, siendo uno de sus rasgos

más destacados la capacidad de producir metabolitos con actividad antimicrobiana, tensioactivos y moléculas implicadas en la inducción de respuestas de defensa de las plantas (Bonaterra et al., 2022). Estos antecedentes denotan algunos de los mecanismos de la interacción antagónica bacteria-fitopatógeno que podrían haberse manifestado en los diferentes ensayos de caracterización realizados.



- ⊕ La **caracterización en base a mecanismos de promoción del crecimiento vegetal** demostró que, dentro de la colección de bacteriana generada en este trabajo se encontraron bacterias capaces de:
 - Solubilizar una fuente insoluble de fósforo, evidenciado por el 42,9% de los aislamientos, incluso 11 de ellos mostraron un área de solubilización 2 veces mayor a su área de crecimiento.
 - Producir sideróforos, actividad mostrada por el 39% de los aislamientos.
 - Fijar nitrógeno atmosférico: 36 aislamientos endófitos demostraron la capacidad de crecer formando una película subsuperficial en medios de cultivo semisólido sin fuente nitrogenada.
 - Producir fitohormonas de tipo auxínico: actividad demostrada por el 28,5% de los aislamientos.
 - Promover el crecimiento vegetal en el cultivo de lechuga y tomate –tanto en etapa de plantín como en etapa productiva y creciendo en diferentes condiciones de cultivo–, a través de la mejora en ciertos parámetros del crecimiento medidos, tal como la biomasa seca acumulada (radical, aérea y total), el rendimiento del cultivo, y el número y peso de los frutos.
- ⊕ Los índices calculados con los resultados de diferentes ensayos permitieron la selección de 10 aislamientos bacterianos por su mejor desempeño en la caracterización *in vitro* como potenciales promotores del crecimiento vegetal: estos aislamientos bacterianos fueron asignados a los géneros *Bacillus/Peribacillus* (3), *Pseudomonas* (2), *Enterobacter* (2), *Curto-bacterium*, *Flavobacterium* y *Agrobacterium*; 9 de ellos provenientes de endosfera de raíz, tallo y fruto, y el restante de rizosfera.
- ⊕ Los aislamientos bacterianos que mostraron resultados de promoción del crecimiento vegetal *in vivo* consistentes en los diferentes ensayos fueron asignados a los géneros *Bacillus/Peribacillus* y *Pseudomonas*.

Al igual que lo mencionado previamente, la caracterización de aislamientos bacterianos de la colección generada en este trabajo coincide con la bibliografía que describe a los géneros *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, entre otros, como los más reportados por sus probadas propiedades promotoras del crecimiento vegetal (Arif et al, 2020; Gupta et al., 2021; Herrera-Quiterio et al., 2020; Santoyo et al., 2016). Incluso, en otras colecciones de aislamientos bacterianos obtenidos de plantas de tomate (Tabla 3.1.3a), también se ha encontrado que varios de estos géneros tienen la capacidad de mostrar las actividades *in vitro* evaluadas en este trabajo, así como de promover el crecimiento vegetal en ensayos *in vivo*: de las 13 publicaciones sintetizadas en la Tabla 3.1.3a, en 10 de ellas se destacan a los aislamientos asignados al género *Bacillus* como los mejores promotores del crecimiento vegetal en ensayos *in vivo*; otras incluyen dentro de esta afirmación a los géneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Microbacterium*, entre otros (Amaresan et al. 2012; Abbamondi et al. 2016; Abdeljalil et al., 2016; Shaik & Thomas 2019; Tian et al. 2017; López et al., 2018; Flemer et al. 2022 Xu et al., 2014).



Como se describe al principio de este capítulo, tanto la actividad antagonista, como los mecanismos relacionados a la promoción del crecimiento vegetal que se ponen en juego durante la interacción benéfica planta-bacteria pueden ser variados, e incluso manifestarse de forma combinada y simultánea, siempre influenciados por diversos factores bióticos y abióticos. Aunque muchos microorganismos muestran un buen desempeño en ensayos específicos *in vitro*, su aplicación en el campo a menudo no se traduce en una acción PGPB efectiva debido a la heterogeneidad de factores del entorno que obstaculizan el establecimiento de microorganismos inoculados. Si bien los diferentes ensayos realizados en este trabajo tienen alcances limitados en cuanto a la dilucidación específica de la interacción planta-bacteria mencionada anteriormente, así como los factores que pueden modificar la expresión de dichas interacciones, los resultados obtenidos se suman a la evidencia que respalda el efecto significativo y beneficioso de ciertos microorganismos sobre el crecimiento y la salud vegetal.

La obtención de aislamientos bacterianos cuyos efectos benéficos sobre los cultivos hortícolas en condiciones productivas fueron evidentes, resulta de interés no solo por el potencial de estas bacterias para su aplicación biotecnológica como bioinsumos bacterianos con fines biofertilizantes, fitoestimulantes y/o biocontroladores en cultivos de interés agrícola, sino también porque puede ayudar a dilucidar las bases genéticas de múltiples rasgos beneficiosos asociadas a la interacción planta-bacteria que se encuentre presente en sus genomas (Romero et al. 2016).

CAPITULO 4.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Al comienzo de este trabajo de tesis se detalló que en Argentina el cultivo de tomate es el segundo cultivo hortícola más producido y que ocupa el primer lugar entre las hortalizas cultivadas bajo cubierta en invernadero, concentrando su producción principalmente en el Cinturón Hortícola de La Plata, lugar donde fue desarrollado este trabajo de tesis. Este es un cultivo con considerables exigencias nutricionales que normalmente son suplidas por fertilizantes químicos, sumado al tratamiento común con fitosanitarios ya que presentan numerosas plagas y enfermedades. En los últimos años, el acelerado proceso de degradación del suelo debido a la implementación de prácticas agrícolas intensivas ha llevado a una necesidad de investigación y desarrollo de prácticas más sustentables. Teniendo en cuenta que las plantas están naturalmente colonizadas por comunidades bacterianas ubicadas en la rizosfera, la filosfera y endosfera, y que muchas de estas bacterias juegan papeles cruciales en la salud y el crecimiento de las plantas, enfocamos nuestro interés en el conocimiento de la microbiota bacteriana asociada al cultivo de tomate con el objetivo general de poder aprovechar sus servicios ecosistémicos para proporcionar soluciones sustentables a los desafíos agrícolas actuales. Aún es escasa la información en relación a la microbiota de órganos tanto aéreos y subterráneos así como de rizosfera y de suelo asociados a las plantas de tomate cultivadas en el CHP en condiciones de producción, en particular de la var. *elpida* (variedad utilizada por los productores de la región), que resultó de interés como planta modelo para el estudio ecológico y de bioprospección de las comunidades bacterianas asociadas, haciendo uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo (moleculares).

❖ En base a la caracterización mediante técnicas de biología molecular (ADN) de la microbiota bacteriana asociada a diferentes microhábitats de plantas de tomate *elpida* cultivadas en dos establecimientos comerciales del CHP, cuyos suelos difirieron en la acumulación de prácticas agrícolas convencionales e intensivas, se concluye que:

- Se proporcionó una caracterización completa y detallada de las comunidades bacterianas asociadas a rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate variedad *elpida*.
- La abundancia, estructura, composición y funcionalidad de las comunidades bacterianas asociadas tuvieron como principal determinante al microhábitat.
- Las prácticas agrícolas continuas comúnmente empleadas en la actividad hortícola del CHP (labranza refinada, fertilización química/fertirriego, uso de agroquímicos, enmiendas orgánicas, monocultivo) tuvieron impactos tanto negativos como positivos sobre las características físico-químicas del suelo, cuyo resultado combinado no se tradujo en la modificación de las propiedades emergentes, sino en el cambio en los perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera.
- Los cambios en las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera por efecto del sitio, no evidenciaron modificaciones en las comunidades de endosfera de plantas cultivadas en cada uno de ellos, sugiriendo que las plantas de tomate son un hospedero robusto de sus comunidades bacterianas de endosfera.

- El microhábitat de la rizosfera actuó como interfase entre el efecto del suelo –que determinó sus características físico-químicas y contribuyó con ciertos taxones específicos– y el efecto del genotipo vegetal –que a través de exudados radicales atrajo taxones específicos, independientemente del sitio–.
 - Las comunidades funcionales mostraron respuestas similares a las mencionadas anteriormente para las comunidades bacterianas en su conjunto.
- ❖ La bioprospección bacteriana aplicada a la diversidad de bacterias cultivables asociadas a distintos microhábitats subterráneos y aéreos de plantas de tomate var. *elpida*, mostró que:
- Las plantas de tomate son un reservorio natural de diversas bacterias cultivables, muchas de las cuales pudieron ser aisladas proporcionando así una colección bacteriana compuesta por un gran número de aislamientos edáficos, rizosféricos y endófitos de raíz, tallo y fruto.
 - Las características taxonómicas de los aislamientos bacterianos endófitos cultivables de la colección se asemeja a las descritas para las plantas en general y es en gran parte coincidente con los reportes de otras colecciones bacterianas reportadas para las plantas de tomate.
 - Numerosos aislamientos exhibieron múltiples rasgos PGPB, posibilitando el cálculo de índices que demostraron ser efectivos para la selección de aquellos aislamientos bacterianos que mostraron mejores resultados en las caracterizaciones *in vitro*.
 - Los aislamientos bacterianos seleccionados en base al índice de potencial biocontrolador (**IPB**) demostraron su efecto antagonista al reducir la incidencia y severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en plántulas de lechuga durante su germinación.
 - Algunos aislamientos bacterianos seleccionados en base al índice de potencial promotor del crecimiento vegetal (**IPPCV**) y aplicados tanto a la siembra como a la siembra y al trasplante, efectivamente mejoraron el crecimiento en el cultivo de lechuga, no solo en etapa de plantín, sino también en la etapa productiva.
 - Algunos aislamientos bacterianos seleccionados en base al **IPPCV** mejoraron el crecimiento de plántulas de tomate cuando fueron inoculados a la siembra. La inoculación a la siembra y al trasplante en cultivo de tomate con algunos de los aislamientos seleccionados mostró numéricamente un mayor rendimiento del cultivo, aunque sin diferencias significativas.
 - El aislamiento TM 30_ *Bacillus* sp. mostró los mejores y más consistentes efectos de promoción del crecimiento vegetal, tanto en cultivo de lechuga como en cultivo de tomate, resultando un potencial candidato para el desarrollo de bioinsumos ya sea individuales o multiespecie acompañado de otros aislamientos que también resultaron promisorios.

- El carácter endofítico de los aislamientos promisorios (8 promoción de crecimiento y 16 biocontroladores) les otorga un plus en comparación con otras PGPB aislados de suelo o de zonas superficiales de las plantas.

Tal como se señaló previamente, el manejo de microbiomas tiene un papel central en la promoción del crecimiento, el desarrollo, la productividad y el valor nutritivo de las plantas. Los bioinsumos actuales se basan casi en su totalidad en cultivos bacterianos individuales con características específicas como la fijación de Nitrógeno, la solubilización de fósforo o la estimulación a través de fitohormonas. El conocimiento de una diversidad detallada y los análisis funcionales de los microorganismos asociados a las plantas, proveen una mejor comprensión de la complejidad de la microbiota bacteriana, y ofrecen un inmenso potencial para generar comunidades sintéticas hasta ahora muy poco explotado para el mejoramiento de la adquisición de nutrientes y la resiliencia a los estreses abióticos y bióticos y, en última instancia, los rendimientos de los cultivos. El desarrollo de cualquier comunidad microbiana requiere una colección de aislamientos prometedores funcionalmente anotados y compatibles. Por lo tanto, será apropiado utilizar holísticamente el conocimiento del microbioma no cultivable generado a través de herramientas de genómica estructural y funcional, y la colección generada de bacterias cultivables para desarrollar nuevos bioinsumos multiespecie y comunidades bacterianas sintéticas que puedan funcionar como los biofertilizantes, biocontroladores de enfermedades y/o bioestimulantes en pos de una agricultura sustentable. En este sentido, un esquema de las posibles acciones a llevar a cabo con todos los datos que generados en este trabajo se muestra en la Figura 4.1a:

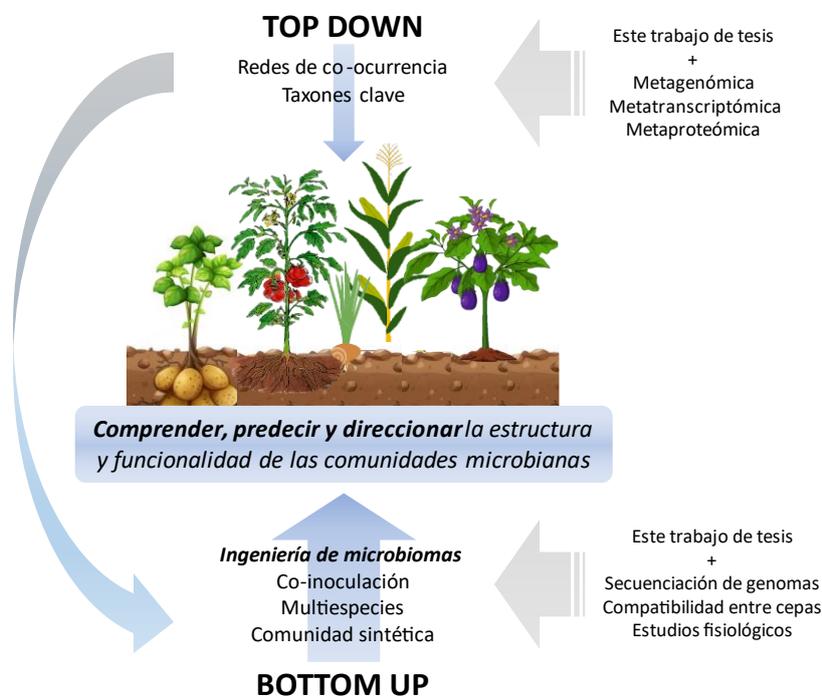


Figura 4.1a Acciones futuras posibles a partir de los datos generados en este trabajo.

Además de los experimentos correspondientes a este trabajo de tesis, se realizaron también ensayos con diversas bacterias PGPB comerciales y de colección aplicadas a diferentes cultivos hortícolas, que contribuyeron al aprendizaje de las técnicas de laboratorio utilizadas a lo largo de este trabajo, así como al análisis y manejo estadístico de datos en relación a los diferentes proyectos en los que participé en el MAALab. Los resultados obtenidos y su respectivo análisis y discusión, se sumaron a la presentación de trabajos y participación en congresos y jornadas relacionados a la temática de este trabajo de tesis, y me permitieron realizar las siguientes publicaciones:

2018 *Assessment of bacterial inoculant formulated with Paraburkholderia tropica to enhance wheat productivity*. Pamela Romina Bernabeu, Sabrina Soledad García, Ana Clara López, **Santiago A. Vio**, Natalia Carrasco, José Luis Boiardi, María Flavia Luna. World Journal of Microbiology and Biotechnology 34: 81. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2461-4>

2018 *Bioinsumos para una agricultura sustentable: Una breve mirada al mundo de los microorganismos*. Juan Manuel Crespo, **Vio Santiago A.** y María Flavia Luna. Presentación de [E-book](#) (32 pág.) en Feria del Libro 2018. Editorial Cibeles, España. Auspiciado por Sintesis Química SA.

2019 *Paraburkholderia tropica as a plant growth-promoting bacterium in barley: characterization of tissues colonization by culture-dependent and -independent techniques for use as an agronomic bioinput*. García, Sabrina; Bernabeu, Pamela; **Vio, Santiago**; Cattelan, Natalia; García, Julia; Puente, Mariana; Galar, Maria Lina; Prieto, Claudia; Luna, Maria Flavia. Plant and Soil. Berlin: Springer. vol. n°. p - . ISSN 0032-079X. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00015-0>

2020 *Chapter 15 - Paraburkholderia*. **Vio, Santiago A.**, García, S.S., Casajus, V., Arango, J.S., Galar, M.L., Bernabeu, P.R., Luna, M.F... In: Amaresan, N., Senthil Kumar, M., Annapurna, K., Kumar, K., Sankaranarayanan, A. (Eds.), Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00015-0>. Elsevier, Academic Press, pp. 271–311. ISBN: 9780128234143

2020 *Microbiota bacteriana asociada al cultivo de tomate: caracterización y selección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal*. **Vio, Santiago Adolfo**. Investigación Joven Vol 7 (2) EBEC UNLP 2020.

2022 *Tracking and plant-growth-promoting effect of Paraburkholderia tropica MTo-293 applied to Solanum lycopersicum*. **Vio Santiago A.**, Bernabeu, García, Galar and Luna. Journal of Basic Microbiology 2022: 1-12. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100628>

2023 *Multispecies Bacterial Bio-Input: Tracking and Plant-Growth-Promoting Effect on Lettuce var. sagess*. **Vio, Santiago A.**; Galar, M.L.; Gortari, M.C.; Balatti, P.; Garbi, M.; Lodeiro, A.R.; Luna, M.F. Plants 2023, 12, 736. <https://doi.org/10.3390/plants12040736>

CAPITULO 5: ANEXO A

Resultados y análisis estadísticos aplicados en los estudios descritos en el Capítulo 2

5.1 RESULTADOS DE LAS EXTRACCIONES DE ADN

Tabla 5.1a Rendimiento obtenido en las extracciones de ADN bacteriano metagenómico de muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del CHP.

<i>MUESTRA</i>	<i>ESTABLECIMIENTO</i>	<i>PESO SECO (%)</i>	<i>CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/μl)</i>
Suelo	Viento Norte	72,3%	32,9
		73,9%	48,9
		73,7%	42,3
	Productor Mario	76,0%	47,5
		75,9%	38
		76,7%	45,3
Rizosfera	Viento Norte	68,6%	36,6
		67,3%	39,9
		64,4%	45,3
	Productor Mario	69,5%	51,3
		67,9%	48,7
		69,0%	47,1
Raíz	Viento Norte	9,9%	43,8
		10,0%	40,7
		10,0%	24,4
	Productor Mario	8,0%	24,2
		9,1%	25,8
		10,0%	26,1
Tallo	Viento Norte	9,9%	4,33
		9,2%	12,3
		9,2%	19,5
	Productor Mario	12,6%	27,4
		8,9%	21
		10,9%	27,7
Fruto	Viento Norte	10,8%	23,5
		9,5%	32,9
		8,1%	33,3
	Productor Mario	9,5%	29,6
		6,8%	28,7
		5,4%	22,8

5.2 CUANTIFICACIÓN DE GENES MEDIANTE qPCR: FUNDAMENTOS, METODOLOGÍA Y APLICACIÓN.

Esta técnica permite medir la abundancia y expresión de marcadores genéticos taxonómicos y funcionales en muestras de diversa naturaleza basada en la amplificación específica de ADN (o ADN complementario si se parte de una muestra de ARN, en cuyo caso la técnica se nomina RT-qPCR) mediante reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) (Lahlali et al., 2021). El fundamento de la técnica se basa en incluir un fluorocromo en la mezcla de la PCR, el cual se intercala entre las hebras de ADN de doble cadena y emite fluorescencia que es captada por un sensor. A medida que transcurren los ciclos de reacción de la PCR, el número de copias del gen amplificado por la reacción va en aumento, como así también la fluorescencia emitida, permitiendo determinar en qué número de ciclo de la reacción (**Ct**) se sobrepasa el límite de fluorescencia establecido (threshold). El resultado obtenido es un gráfico donde se puede observar el comportamiento de la fluorescencia emitida a medida que transcurren los ciclos de PCR, a partir del cual se puede obtener el valor de Ct (Figura 5.2a).

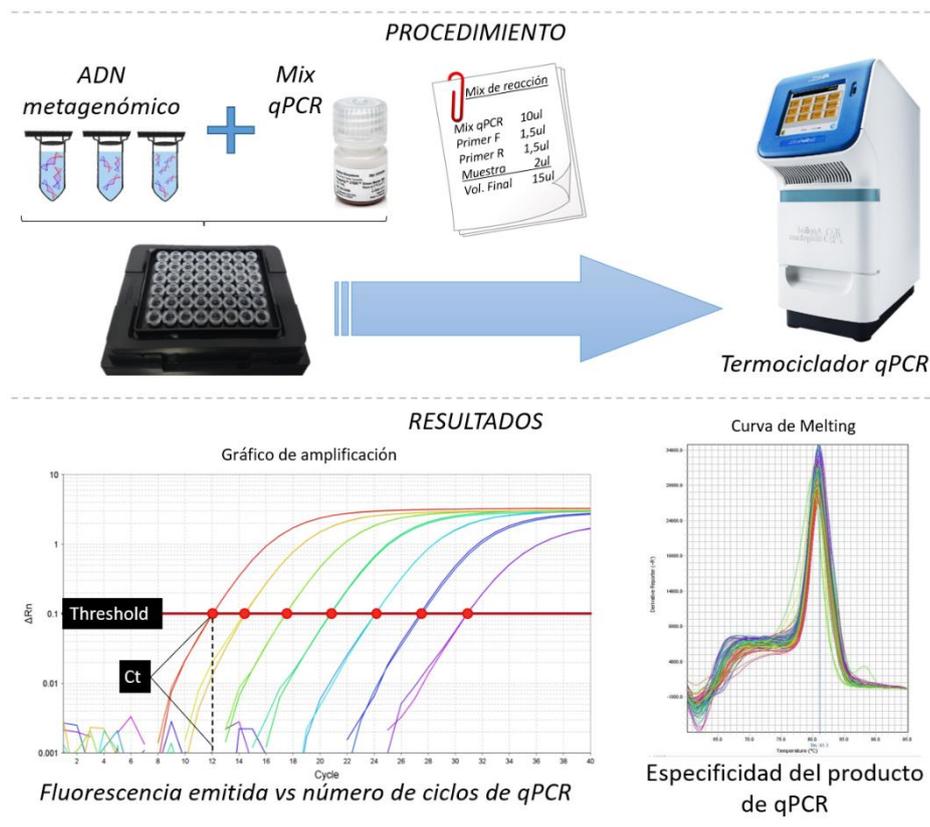


Figura 5.2a Resumen de la técnica qPCR para cuantificación de genes.

Los estudios de qPCR/RT-qPCR pueden hacerse de forma comparativa entre distintas muestras y evaluar en base al valor de Ct cuál es la muestra que contiene mayor/menor número de copias de un determinado gen; o bien se puede obtener una cuantificación absoluta del gen. Para esto último es necesaria la construcción de una curva de calibración empleando un patrón de concentración conocida del gen a cuantificar, obteniéndose

un modelo matemático lineal ($Y_i = a + b X_i$) a partir del cual se puede estimar el número de copias del gen en cada muestra.

Dado que el fluorocromo empleado se intercala de forma inespecífica entre las hebras de ADN de doble cadena, resulta imprescindible asegurar la especificidad del producto de PCR amplificado así como evitar la formación de dímeros de primers (lo que provocaría una sobreestimación del número de copias) (Lahlali et al., 2021). La especificidad del producto de qPCR es verificada al final de la reacción, momento en que el termociclador realiza la determinación de la fluorescencia emitida a medida que se aumenta la temperatura. Por las características de la molécula de ADN, a determinada temperatura (específica según la extensión y el %GC del amplicón) se separarán las hebras, disminuyendo la emisión de fluorescencia. Este resultado se visualiza en un gráfico denominado curva de Melting (Figura 5.2a), en el cual debe observarse un único pico lo que se traduce en un único producto de PCR (en caso de contar con un gen patrón, el pico observado en las muestras debe coincidir con el observado para el patrón)

5.2.1. RESULTADOS DE qPCR DEL GEN ARNr 16S

Debido a la presencia de productos inespecíficos al realizar la amplificación parcial del gen ARNr 16S en las muestras se optó por utilizar dos pares de primers para cubrir la totalidad de las muestras (N=30). Por ello, se utilizó un par de primers para cuantificar las muestras de suelo y rizosfera (799F-115R; ya que denotaban productos de PCR inespecíficos en las muestras de endosfera; Figura 5.2.1f, en gráfica B) y otro par de primers para cuantificar las muestras de endosfera de raíz, tallo y fruto (Bac1369F-Prok1492R; que amplificaban inespecíficamente en muestras de suelo y rizosfera; Figura 5.2.1f, en gráfica C).

5.2.1.1 Cuantificación en muestras de suelo y rizosfera

Determinación realizada con primers 799F (5'-AAC MGG ATT AGA TAC CCK G-3') y **1115R** (5'-AGG GTT GCG CTC GTT G-3') descritos por Shade et al., 2013 en muestras de SUELO y RIZOSFERA.

- Construcción de la curva estándar

La curva estándar se generó empleando 6 diluciones a partir del patrón sintético con número de copias conocido, determinándose el Ct por triplicado en las diluciones de los extremos y por duplicado en las diluciones intermedias (N=14) (Tabla 5.2.1a). Se utilizó la transformación logarítmica decimal para el número de copias del gen con el objetivo de estabilizar las varianzas y linealizar la regresión. Los valores de Ct se ajustaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos al siguiente modelo (Figura 5.2.1a):

$$Y_i = 59,833 - 3,4948 X_i$$

Se evaluó la regresión entre las variables y la falta de ajuste de los datos al modelo obtenido mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% (Tabla 5.2.1b). Se calculó la eficiencia de amplificación de la qPCR utilizando la pendiente ($B = -3,4948$) del modelo en la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia (\%)} = (10^{(-1/-3,4948)} - 1) * 100$$

Una pendiente próxima a $-3,3$ indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. El valor obtenido (93,26) se encuentra dentro del rango considerado aceptable para una curva estándar (85% a 115% de eficiencia).

Tabla 5.2.1a Determinación del Ct para diluciones del stock patrón del gen sintético ARNr 16S con primers 799F-1115R.

DILUCIÓN	N° COPIAS / μL	LOG N° COPIAS / μL	VALOR DE CT		
Stock s/d = 1	12224660000	10,09	No determinado		
1 (1:5)	2444932000	9,39	27,35	25,71	28,01
2 (1:25)	488986400	8,69	28,91		29,34
3 (1:125)	97797280	7,99	31,98		32,36
4 (1:625)	19559456	7,29	34,77		35,04
5 (1:3125)	3911891,2	6,59	36,63		36,19
6 (1:15625)	782378,24	5,89	39,03	38,79	39,82

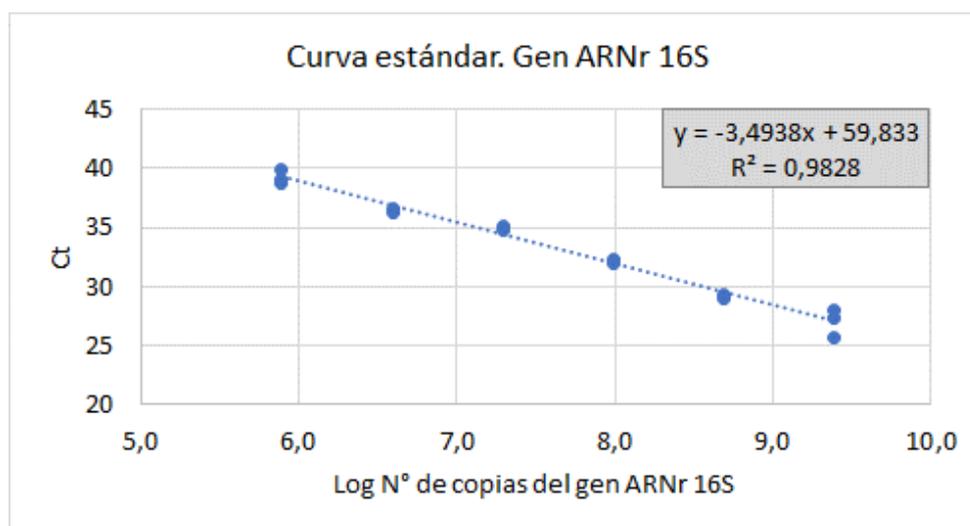


Figura 5.2.1a Resultados de Ct de la qPCR con primers 799F-1115R para las diluciones a partir del stock sintético del gen ARNr 16s. Sobre la gráfica se detalla el modelo lineal ajustado y su coeficiente de determinación.

Tabla 5.2.1b Análisis de varianza del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de Ct de las diferentes diluciones del stock patrón del gen ARNr 16s con primers 799F-1115R. Variable: N° de copias g^{-1} del gen ARNr 16s por gramo; transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; $N=30$; $R^2=0,9828$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Log N° copias/ μL	283,36	1	283,36	539	<0,01
Falta de ajuste	1,28	4	0,32	0,61	0,461
Error Puro	3,68	7	0,526		
Total	288,32	12			

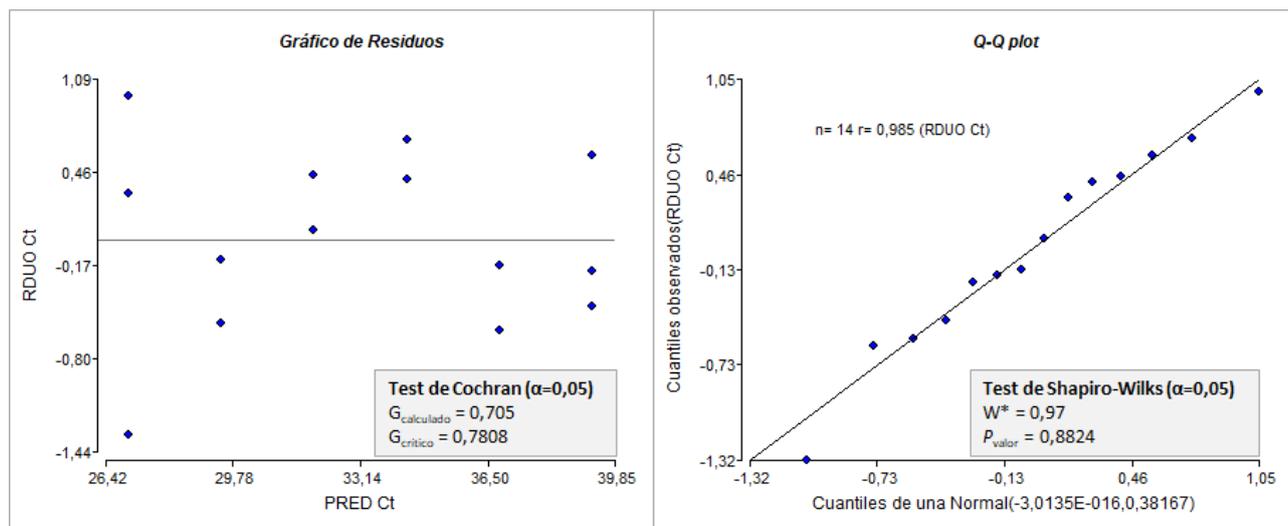


Figura 5.2.1b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico Q-Q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

5.2.1.2 Cuantificación en muestras de endosfera de raíz, tallo y fruto

Curva realizada con primers Bac1369F (5'-CGG TGA ATA CGT TCY CGG-3') y Prok1492R (5'-GGW TAC CTT GTT ACG ACT-3') descritos por [Suzuki et al., 2000](#).

- Construcción de la curva estándar.

La curva estándar se generó empleando 6 diluciones a partir del patrón sintético con número de copias conocido, determinándose el Ct por triplicado en las diluciones de los extremos y por duplicado en las diluciones intermedias (N=14) ([Tabla 5.2.1c](#)). Se utilizó la transformación logarítmica decimal para el número de copias del gen con el objetivo de estabilizar las varianzas y linealizar la regresión. Los valores de Ct se ajustaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos al siguiente modelo ([Figura 5.2.1c](#)):

$$Y_i = 45,317 - 3,5522 X_i$$

Se evaluó la regresión entre las variables y la falta de ajuste de los datos al modelo obtenido mediante el análisis de la varianza (ANAVA) con un nivel de confianza de 95% ([Tabla 5.2.1d](#)). Se calculó la eficiencia de amplificación de la qPCR utilizando la pendiente (B = -3,5522) del modelo en la siguiente ecuación:

$$Eficiencia (\%) = (10^{(-1/-3,4948)} - 1) * 100$$

Una pendiente próxima a $-3,3$ indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. El valor obtenido (91,21) se encuentra dentro del rango considerado aceptable para una curva estándar (85% a 115% de eficiencia).

Tabla 5.2.1c Determinación del Ct para distintas diluciones del stock patrón del gen sintético ARNr 16s con primers Bac1369F-Prok1492R.

DILUCIÓN	N° COPIAS / μL	LOG N° COPIAS / μL	VALOR DE CT		
Stock s/d = 1	12224660000	10,09	No determinado		
4 (1:625)	19559456	7,29	19,68	19,68	19,41
5 (1:3125)	3911891	6,59	21,96		22,17
6 (1:15625)	782378	5,89	24,02		24,15
8 (1:390625)	31295	4,49	29,29		29,42
9 (1:1953125)	6259	3,79	31,71		32,12
10 (1:9765625)	1252	3,09	34,43	34,19	34,28

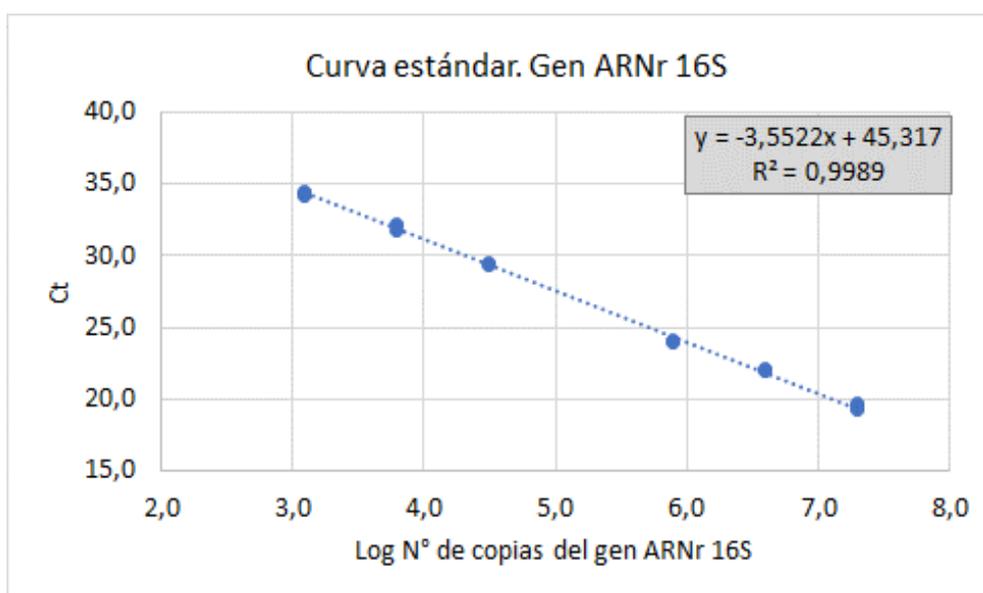


Figura 5.2.1c Resultados de Ct de la qPCR con primers Bac1369F-Prok1492 para las diluciones a partir del stock sintético del gen ARNr 16s. Sobre la gráfica se detalla el modelo lineal ajustado y su coeficiente de determinación.

Tabla 5.2.1d Análisis de varianza del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de Ct de las diferentes diluciones del stock patrón del gen ARNr 16s con primers Bac1369F-Prok1492R. Variable: N° de copias g^{-1} del gen ARNr 16s g^{-1} ; transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; $N=30$; $R^2=0,9989$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Log N° copias/ μl	456,46	1	456,46	12780,9	<0,01
Falta de ajuste	0,27	4	0,071	1,96	0,204
Error Puro	0,25	7	0,036		
Total	456,98	12			

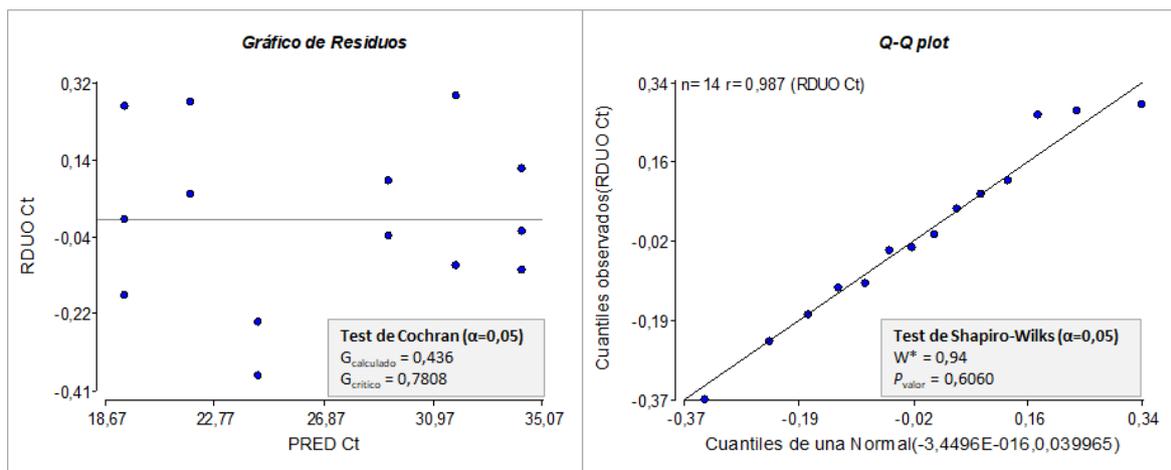


Figura 5.2.1d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico Q-Q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

- Resultados de cuantificación del gen ARNr 16S en muestras ambientales de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de tomate.

A continuación, se muestran los resultados de la cuantificación del número de copias del gen ARNr 16S para cada una de las muestras de ambos establecimientos hortícolas (Tabla 5.2.1e), la corroboración de la especificidad de la qPCR (Figura 5.2.1e) y el análisis estadístico de los datos (Tabla 5.2.1f)

Tabla 5.2.1e Resultados de la cuantificación del gen ARNr 16S en muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata.

MUESTRA	VIENTO NORTE			PRODUCTOR MARIO		
	Ct prom.	Nº copias g ⁻¹ (x10 ¹⁰)	Prom. + IC ^a (x10 ¹⁰)	Ct prom.	Nº copias g ⁻¹ (x10 ¹⁰)	Prom. + IC ^a (x10 ¹⁰)
Suelo	27,51	12155		28,14	4641	
	26,96	10824	11423 ± 676	28,53	3128	4889 ± 1896
	27,08	11282		27,56	6897	
Rizosfera	27,99	9179		27,85	7363	
	27,83	12559	11049 ± 1718	27,86	9525	8136 ± 1205
	27,80	11411		27,96	7520	
Raíz	24,90	1,147		25,14	1,352	
	25,12	1,197	1,07 ± 0,2	24,85	1,104	1,13 ± 0,2
	25,77	0,859		25,42	0,924	
Tallo	27,25	0,177		27,21	0,248	
	27,44	0,660	0,41 ± 0,2	27,63	0,277	0,28 ± 0,04
	27,74	0,382		27,19	0,323	
Fruto	29,41	0,059		28,93	0,059	
	29,08	0,058	0,063 ± 0,008	28,66	0,085	0,08 ± 0,02
	28,62	0,072		29,38	0,089	

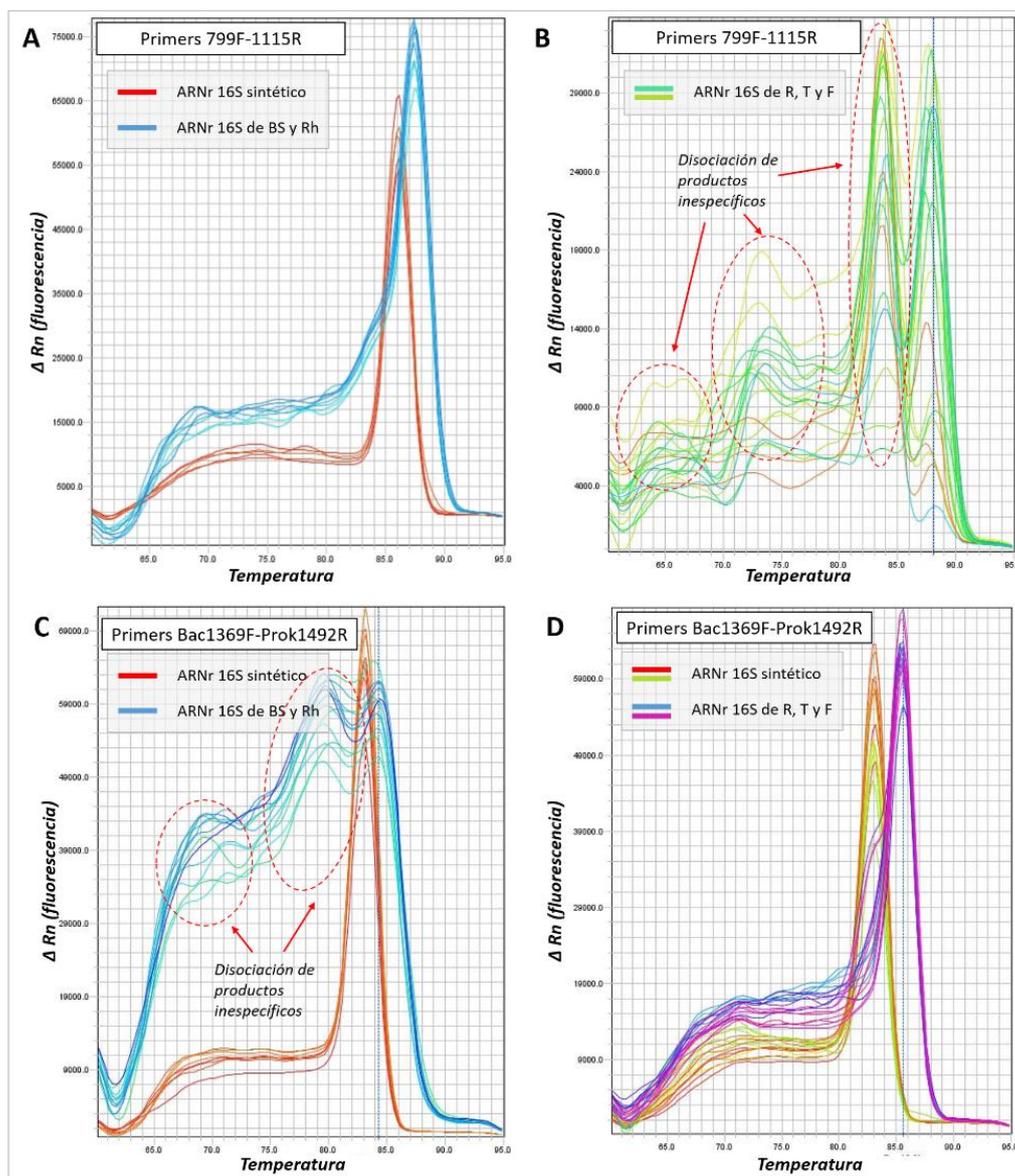


Figura 5.2.1e Curva de melting del gen ARNr16S del patrón sintético y de las diferentes muestras de suelo (BS) y rizosfera (Rh) (en gráficas A y C), y endosfera de raíz (R), tallo (T) y fruto (F) (en gráficas B y D) para cada uno de los pares de primers empleados.

Tabla 5.2.1f Análisis de varianza de resultados de cuantificación del gen ARNr 16s de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen ARNr 16s por gramo; transformación: logarítmica decimal; α=0,05; N=30; CV=1,09.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Muestra	147,5	4	36,88	2335,7	<0,01
Establecimiento	0,08	1	0,08	5,1	0,03
Muestra*Establecimiento	0,2	4	0,05	3,2	0,02
Error	0,3	19	0,02		
Total	148,09	28			

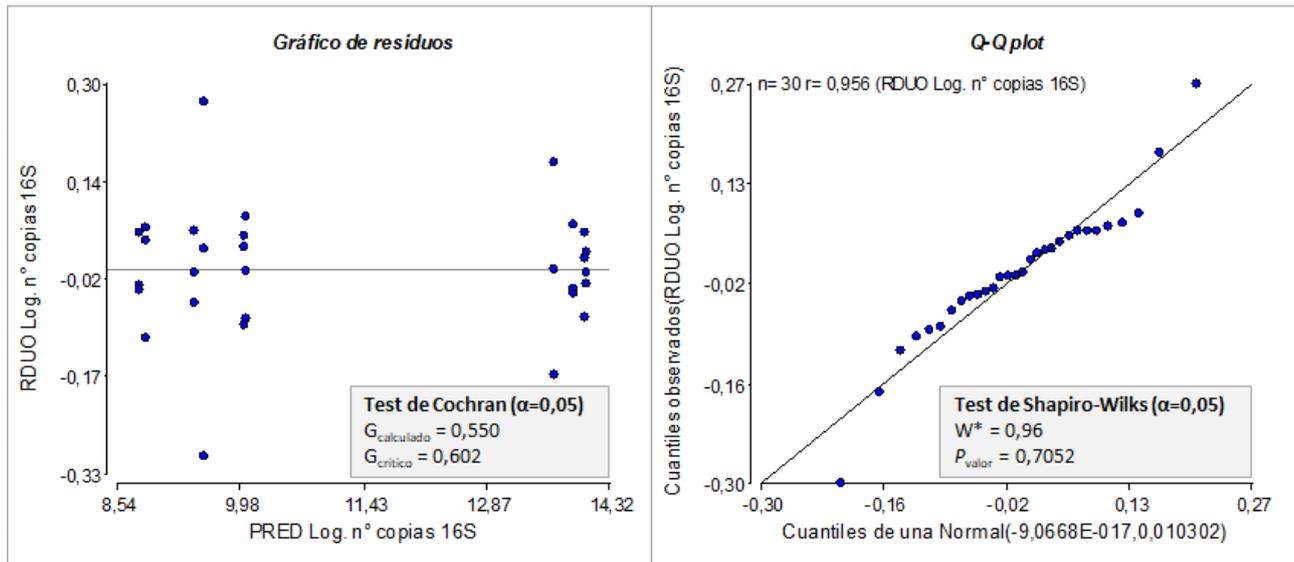


Figura 5.2.1f Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico Q-Q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.2.1g Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen ARNr 16s por gramo; $\alpha=0,05$; Diferencia mínima significativa=0,35. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	MEDIA DEL LOG. N° COPIAS ARNr 16S
Suelo	Viento Norte	14,06 a
Rizosfera	Viento Norte	14,04 a
Rizosfera	Productor Mario	13,91 ab
Suelo	Productor Mario	13,67 b
Raíz	Productor Mario	10,05 c
Raíz	Viento Norte	10,02 c
Tallo	Viento Norte	9,55 d
Tallo	Productor Mario	9,45 d
Fruto	Productor Mario	8,88 e
Fruto	Viento Norte	8,8 e

5.3 SECUENCIACIÓN MASIVA POR TECNOLOGÍA ILLUMINA. METABARCODING.

La secuenciación genética es una herramienta que permite conocer la composición y ordenamiento de las bases que conforman un fragmento de ADN, lo cual representa el análisis más detallado que puede obtenerse a nivel molecular y posibilita identificar variantes en el material genético. El primer método de secuenciación de amplicones, registrado en 1975 por [Sanger & Coulson](#) (método de secuenciación Sanger, en sus inicios realizado manualmente por electroforesis en gel y hoy en día en forma automatizada por electroforesis capilar), fue el punto de partida para el desarrollo de esta herramienta de biología molecular que logró en 1995 la secuenciación completa del primer genoma bacteriano y hoy en día supera los 120000 genomas bacterianos completamente secuenciados y depositados en diferentes bases de datos ([Hernández et al., 2020](#)). En la actualidad existen distintos métodos de secuenciación que han revolucionado completamente los estudios biológicos, principalmente el campo de la microbiología, con secuenciadores capaces de obtener la secuencia de millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación y de forma masiva (*High-Throughput Sequencing, HTS*), elevando significativamente el rendimiento a un menor costo. Mayormente, la secuenciación genética es un servicio ofrecido por laboratorios especializados que cuentan con los diferentes equipos y tecnologías de secuenciación, entre los cuales se puede optar según el tipo de investigación que se esté llevando a cabo (secuenciación *shotgun*¹⁶ (genómica/metagenómica), o secuenciación de amplicones específicos (*metabarcoding, técnica empleada en esta tesis doctoral*), entre otros), basados en el largo del fragmento a secuenciar, la cantidad de lecturas que se desean obtener, el número de muestras y la tasa de error dispuesta a asumir.

- ADN barcoding / Metabarcoding

El código de barras en relación al ADN refiere a la particularidad de secuencias cortas de ADN como marcador para establecer diferencias entre distintos taxones microbianos, lo cual permite el reconocimiento y la asignación taxonómica ([Wilson, 2018](#)). Debido a esto, los genes a ser empleados para *metabarcoding* deben cumplir con ciertas características como son:

(i)- Contener regiones con variabilidad y divergencia genéticas significativas a nivel de especie.

(ii)- Poseer sitios conservados contiguos a las regiones variables, que se pueden usar para diseñar cebadores de PCR universales.

Si bien existen regiones del ADN que cumplen con estas características, el gen que codifica para la subunidad menor del ARN ribosomal 16S en bacterias (que tiene una longitud ~1500pb y cuenta con 9 regiones hipervariables, V1-V9) es el más ampliamente utilizado para estudios de filogenética y taxonomía bacteriana. Por este motivo, se ha referido con el nombre de *metabarcoding* a la técnica de secuenciar total o

¹⁶ Fracción aleatoria de las moléculas de ADN en miles de pequeños fragmentos, los cuales son secuenciados masivamente y luego a través de softwares de bioinformática son alineados para reconstruir la secuencia de la molécula entera. Esto aplica tanto para la secuenciación del genoma de un organismo como para la secuenciación del metagenoma de una muestra biológica ambiental.

parcialmente la secuencia de ADN del gen ARNr 16S en bacterias (así como su análogo ITS en hongos, o 18S en eucariotas), extraído de muestras ambientales con el objetivo de caracterizar la diversidad taxonómica de dichas comunidades (Wilson, 2018).

Tanto para *metabarcoding* como para otros estudios en el campo de la ecología microbiana, la tecnología de secuenciación *Illumina* es la más ampliamente utilizada debido a su gran capacidad de secuenciación (que permite detectar microorganismos incluso a muy baja abundancia relativa), su baja tasa de error y la posibilidad de secuenciar paralelamente varias muestras (Cortés-López et al., 2020; Lahlali et al., 2021). La obtención de secuencias de ADN por medio de *Illumina* se basa en lecturas de fluorescencia emitidas por millones de celdas que agrupan a los fragmentos de ADN inmovilizados en la placa sólida multicelda, conforme transcurre la síntesis de dichos fragmentos utilizando nucleótidos marcados con fluoróforos.

La rutina de secuenciación de amplicones (*metabarcoding*) por *Illumina* consta de 3 etapas básicas (Figura 5.3a):

- Amplificación por PCR del gen a secuenciar y adición de adaptadores¹⁷ e identificadores¹⁸.

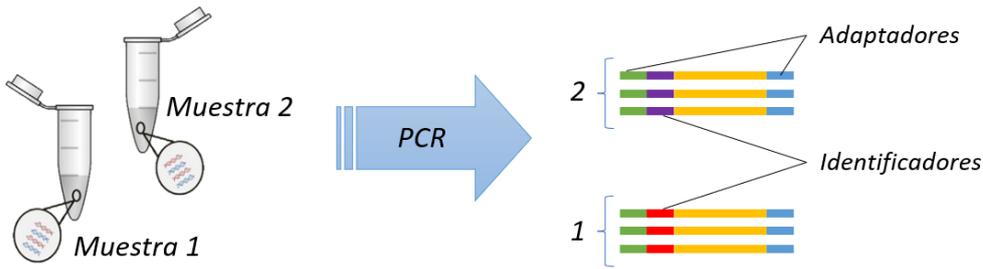
- Adhesión sobre la placa solida multicelda y amplificación de los fragmentos de ADN por PCR en puente. con el objetivo de generar un núcleo con gran densidad de hebras del mismo fragmento para amplificar la señal. Se elimina la hebra reversa para unificar el sentido de secuencia de todos los fragmentos.

- Detección de bases (A, T, C y G) a través de repetidos ciclos de adición de nucleótidos y lavado, en los cuales una ADN polimerasa añade únicamente un nucleótido marcado con un fluoróforo específico por ciclo, emitiendo fluorescencia de longitud de onda específica la cual es captada por un sensor y traducida al lenguaje computacional. Esta secuencia ocurre paralelamente en las todas las celdas de la placa sólida multicelda.

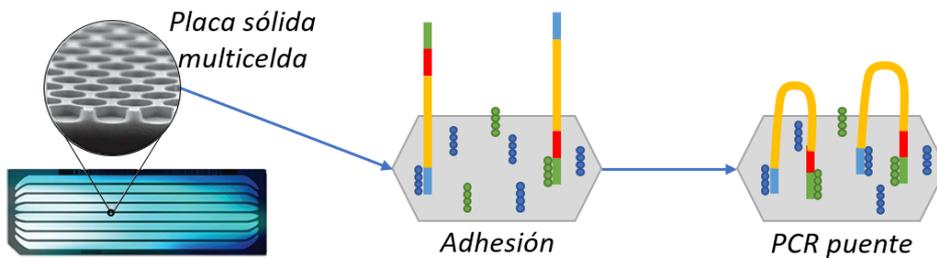
¹⁷ Secuencias de nucleótidos que permitirán que el gen de interés se adhiera a la placa sólida multicelda del secuenciador.

¹⁸ Secuencias de nucleótidos específicos que permiten identificar durante el análisis bioinformático las distintas muestras secuenciadas paralelamente en una misma corrida.

(i) Amplificación del gen a secuenciar y agregado de adaptadores e identificadores



(ii) Adhesión a la placa y amplificación por PCR en puente



(iii) Detección de bases

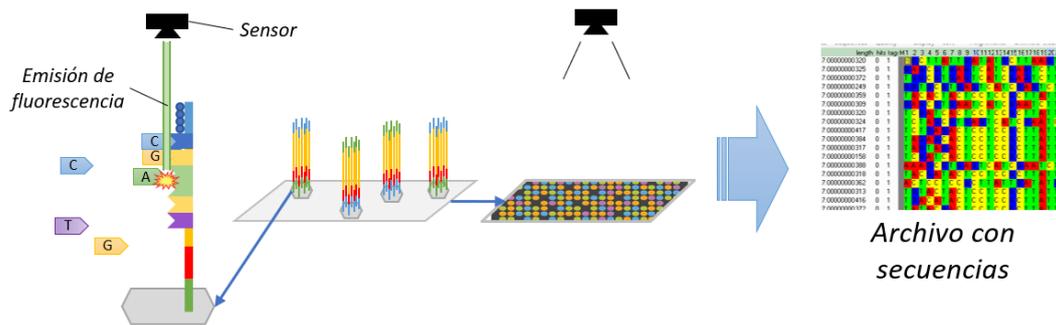


Figura 5.3a Principales etapas en la secuenciación por tecnología *Illumina*.

El resultado arrojado por el equipo secuenciador son dos archivos de texto (R1 correspondiente al sentido forward; y R2 correspondiente al sentido reverse de la secuenciación), el cual contiene los millones de lecturas (*reads*) obtenidas, detallando para cada lectura la secuencia específica de nucleótidos (comprendida por los adaptadores, barcodes, primers y el amplicón de interés) y un *score*¹⁹ asignado para cada una de las bases que indica la confianza en la detección y asignación de cada base en cada posición. La información detallada en los archivos de salida del secuenciador, denominados como datos crudos de secuenciación, debe ser procesada posteriormente mediante diversas herramientas bioinformáticas para filtrar esos datos crudos y a partir de los datos más confiables realizar diferentes análisis.

¹⁹ Determina la probabilidad de que una base sea asignada incorrectamente. El *score* (Q) va de 0 a 40, siendo Q₁₀ = 90% precisión, Q₂₀ = 99% precisión, Q₃₀ = 99,99% precisión.

5.3.1. RESULTADOS CRUDOS DE SECUENCIACIÓN, FILTRADO, AGRUPACIÓN EN OTUS Y COBERTURA DE SECUENCIACIÓN

Tabla 5.3.1a Número de secuencias crudas obtenidas del secuenciador, secuencias retenidas luego de las distintas etapas del filtrado [1-4] y cobertura de secuenciación para cada una de las muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto (S, Rh, R, T y F, respectivamente) de plantas de tomate de dos establecimientos (VN: Viento Norte; M: Productor Mario) del CHP.

ETAPA	[1]	[2]	[3]		[4]			
Muestras	Secuencias iniciales (raw data)	Secuencias Alineadas (forward y reverse)	Secuencias luego del filtrado por calidad, longitud y descarte de quimeras	Número de OTUs	Secuencias luego de eliminar: singletons, mitocondrias, cloroplastos, OTUs con pocas secuencias	Número de OTUs	% secuencias después de filtrado	Cobertura
S VN 1	2.860.209 secuencias totales	132837	124531	5780	108133	2217	81,4%	98,3%
S VN 2		98241	93020	5338	81078s	2194	82,5%	97,9%
S VN 3		114097	110999	5555	97828	2184	85,7%	98,1%
S M 1		93565	85054	5357	73235	2165	78,3%	97,8%
S M 2		107123	96331	5501	79963	2187	74,6%	97,9%
S M 3		105621	97586	5783	83991	2230	79,5%	97,8%
Rh VN 1		99957	90665	5092	80498	2196	80,5%	98,0%
Rh VN 2		101476	96422	5475	84774	2268	83,5%	97,9%
Rh VN 3		106962	102529	5293	91834	2209	85,9%	98,0%
Rh M 1		119363	114385	6445	98612	2385	82,6%	98,0%
Rh M 2		129623	122058	6451	105515	2368	81,4%	98,1%
Rh M 3		117231	109255	6515	93887	2369	80,1%	97,9%
R VN 1		123573	116887	2926	102993	871	83,3%	98,5%
R VN 2		87629	80296	2573	68005	940	77,6%	98,3%
R VN 3		129500	123017	2956	110308	896	85,2%	98,6%
R M 1		130564	121764	3272	110302	1022	84,5%	98,6%
R M 2		95443	86461	2865	77894	963	81,6%	98,2%
R M 3		66733	61873	2664	52616	1021	78,8%	98,0%
T VN 1		63203	60436	723	14378	316	22,7%	97,2%
T VN 2		33544	32048	521	25309	250	75,5%	98,8%
T VN 3		68125	64511	824	12157	332	17,8%	95,9%
T M 1		73902	69995	1110	40130	388	54,3%	98,3%
T M 2		42129	40169	828	19178	328	45,5%	97,5%
T M 3		69063	65821	1080	28514	364	41,3%	97,8%
F VN 1		35044	28722	535	14313	29	40,8%	97,1%
F VN 2		35277	30578	372	7395	28	21,0%	96,1%
F VN 3		33144	27764	558	12851	28	38,8%	96,6%
F M 1		49043	43913	567	4727	29	9,6%	89,6%
F M 2	30877	25181	482	15748	30	51,0%	97,8%	
F M 3	44017	35047	780	25979	31	59,0%	97,7%	

Tabla 5.3.1b Número de OTUs y cobertura de secuenciación de las distintas muestras a distintos valores de normalización del número de secuencias.

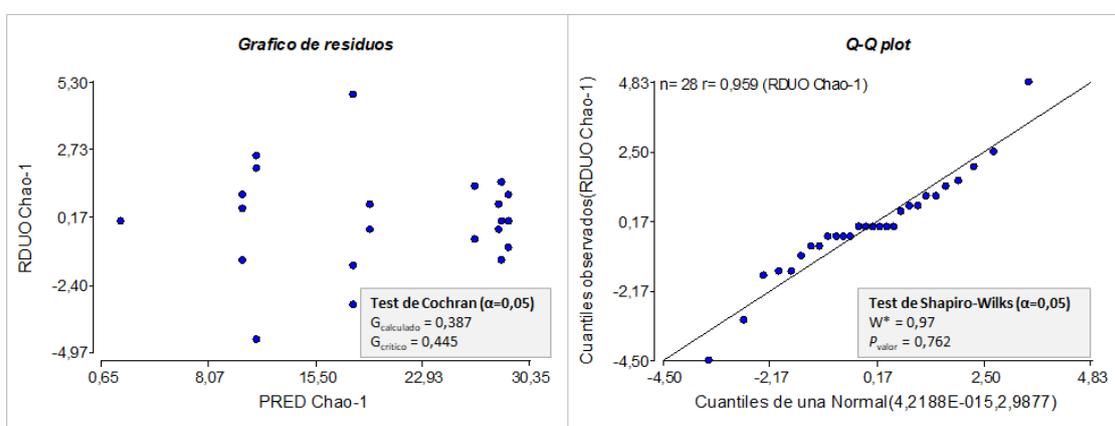
<i>Normalización</i>	<i>12157 secuencias</i>		<i>4727 secuencias</i>	
<i>Muestras</i>	<i>Número de OTUs</i>	<i>Cobertura de secuenciación</i>	<i>Número de OTUs</i>	<i>Cobertura de secuenciación</i>
S VN 1	1588	85,1%	1180	61,8%
S VN 2	1604	85,7%	1194	63,2%
S VN 3	1528	84,9%	1107	61,1%
S M 1	1683	86,8%	1206	66,0%
S M 2	1588	86,3%	1190	64,8%
S M 3	1641	84,9%	1210	61,2%
Rh VN 1	1583	86,7%	1176	65,8%
Rh VN 2	1623	85,1%	1182	61,6%
Rh VN 3	1493	84,8%	1047	60,8%
Rh M 1	1830	83,7%	1347	58,0%
Rh M 2	1866	83,5%	1422	57,6%
Rh M 3	1810	83,6%	1355	57,8%
R VN 1	499	87,6%	344	68,1%
R VN 2	584	90,3%	387	75,1%
R VN 3	502	87,2%	506	67,2%
R M 1	533	87,3%	344	67,4%
R M 2	564	88,2%	402	69,6%
R M 3	694	91,2%	370	77,3%
T VN 1	299	96,7%	209	91,5%
T VN 2	190	97,4%	113	93,4%
T VN 3	332	95,9%	215	89,4%
T M 1	235	94,5%	154	86,0%
T M 2	271	96,0%	198	89,7%
T M 3	248	94,8%	171	86,5%
F VN 1	29	96,6%	27	91,4%
F VN 2	-	-	26	93,9%
F VN 3	27	96,5%	27	90,9%
F M 1	-	-	29	89,6%
F M 2	29	97,2%	28	92,7%
F M 3	31	95,1%	29	87,5%

5.3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÍNDICES DE ALFA-DIVERSIDAD

5.3.2.1 ANAVA del índice Chao-1 a nivel de phylum

Tabla 5.3.2a Análisis de varianza del índice Chao-1 a nivel de phylum calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Chao-1 a nivel de phylum; N=28; CV=11,3.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	2248,58	4	562,15	125,44	<0,01
Establecimiento	~0,00	1	0,00	0,00	>0,99
Muestra*Establecimiento	11,75	4	2,94	0,66	0,63
Error	80,67	18	4,48		
Total	2630,71	27			

**Figura 5.3.2a** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2b** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Chao-1 a nivel de phylum; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=3,87. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	CHAO-1 (PHYLUM)
Suelo	28,4 a
Rizosfera	27,8 a
Raíz	18,7 b
Tallo	11,0 c
Fruto	2,0 d

5.3.2.2 ANAVA del índice Chao-1 a nivel de orden

Tabla 5.3.2c Análisis de varianza del índice Chao-1 a nivel de orden calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Chao-1 a nivel de orden; N=28; CV=7,2.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	82801,09	4	20700,27	464,39	<0,01
Establecimiento	0,001	1	0,001	0,00003	0,99
Muestra*Establecimiento	333,91	4	83,48	1,87	0,1591
Error	802,36	18	44,58		
Total	92041,76	27			

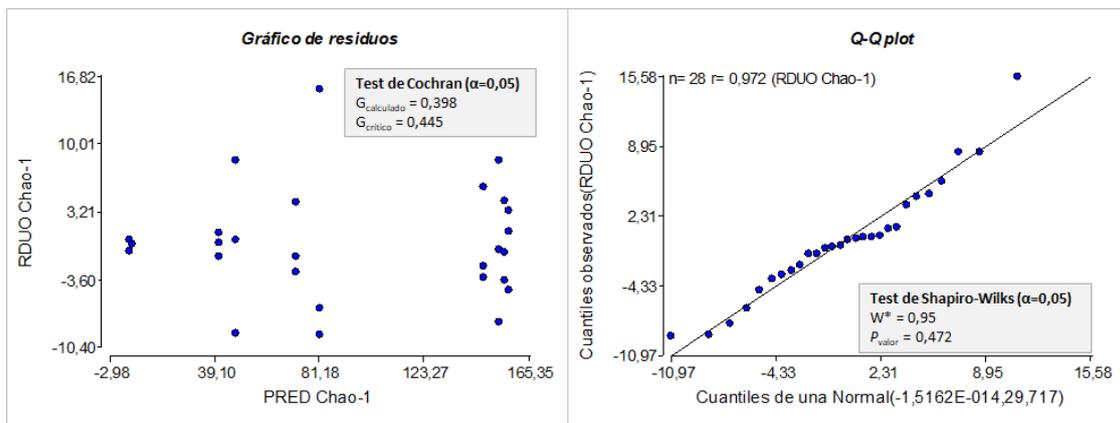


Figura 5.3.2b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

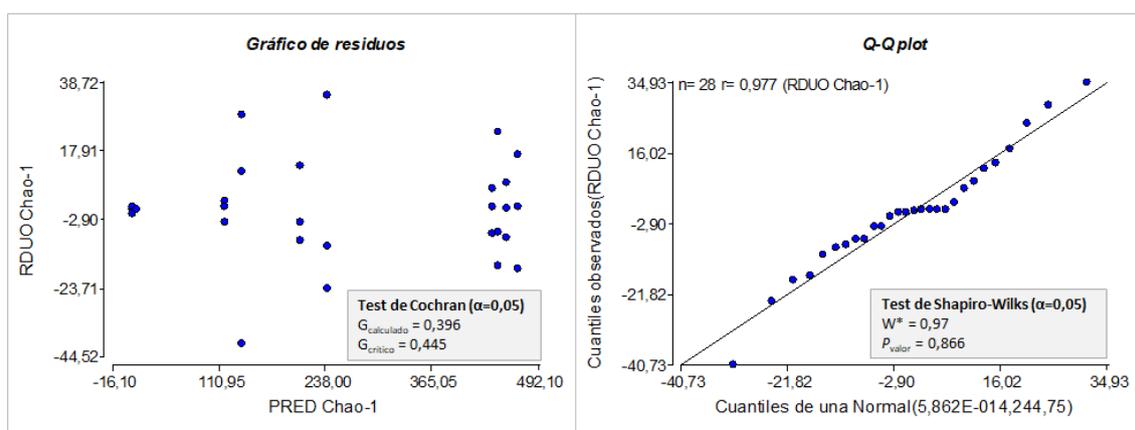
Tabla 5.3.2d Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Chao-1 a nivel de orden; α=0,05; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=12,22. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

MUESTRA	CHAO-1 (ORDEN)
Rizosfera	155,6 a
Suelo	151,5 a
Raíz	76,6 b
Tallo	44,2 c
Fruto	5,3 d

5.3.2.3 ANAVA del índice Chao-1 a nivel de género

Tabla 5.3.2e Análisis de varianza del índice Chao-1 a nivel de género calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Chao-1 a nivel de género; N=28; CV=7,1.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	726779,14	4	181694,79	494,91	<0,01
Establecimiento	144,00	1	144,00	0,39	0,54
Muestra*Establecimiento	3408,02	4	852,00	2,32	0,10
Error	6608,24	18	367,12		
Total	810428,01	27			

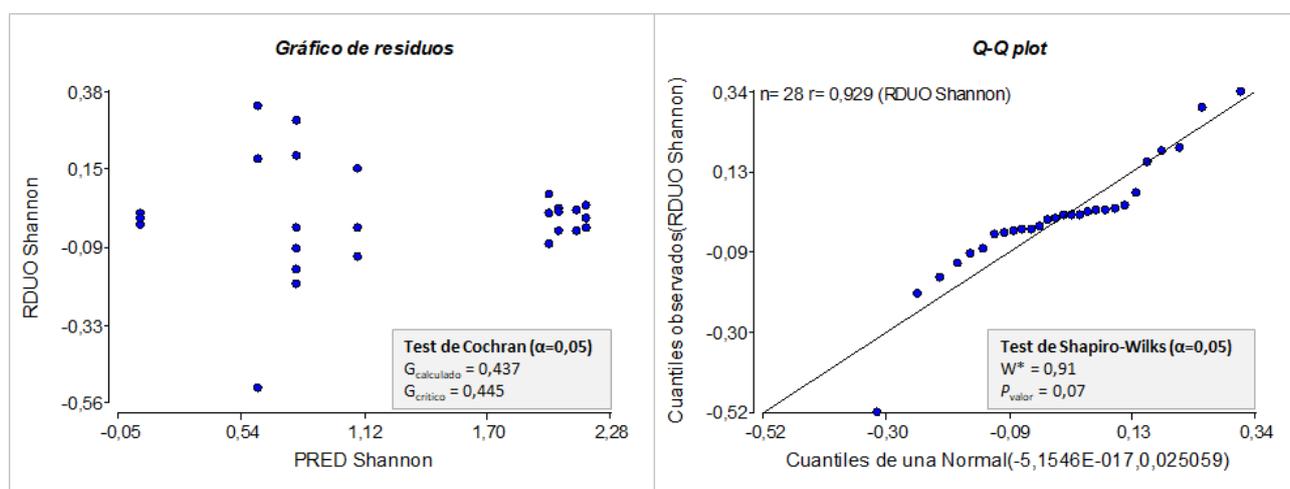
**Figura 5.3.2c** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2f** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Chao-1 a nivel de género; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=35,1. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	CHAO-1 (GÉNERO)
Rizosfera	456,5 a
Suelo	446,0 a
Raíz	224,4 b
Tallo	128,7 c
Fruto	10,0 d

5.3.2.4 ANAVA del índice de Shannon-Wiener a nivel de phylum

Tabla 5.3.2g Análisis de varianza del índice de Shannon-Wiener a nivel de phylum calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Shannon-Wiener nivel de phylum; N=28; CV=15,4.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	14,93	4	3,73	99,28	<0,01
Establecimiento	1,0E-04	1	1,0E-04	2,7E-03	0,96
Muestra*Establecimiento	0,18	4	0,04	1,18	0,35
Error	0,68	18	0,04		
Total	17,27	27			

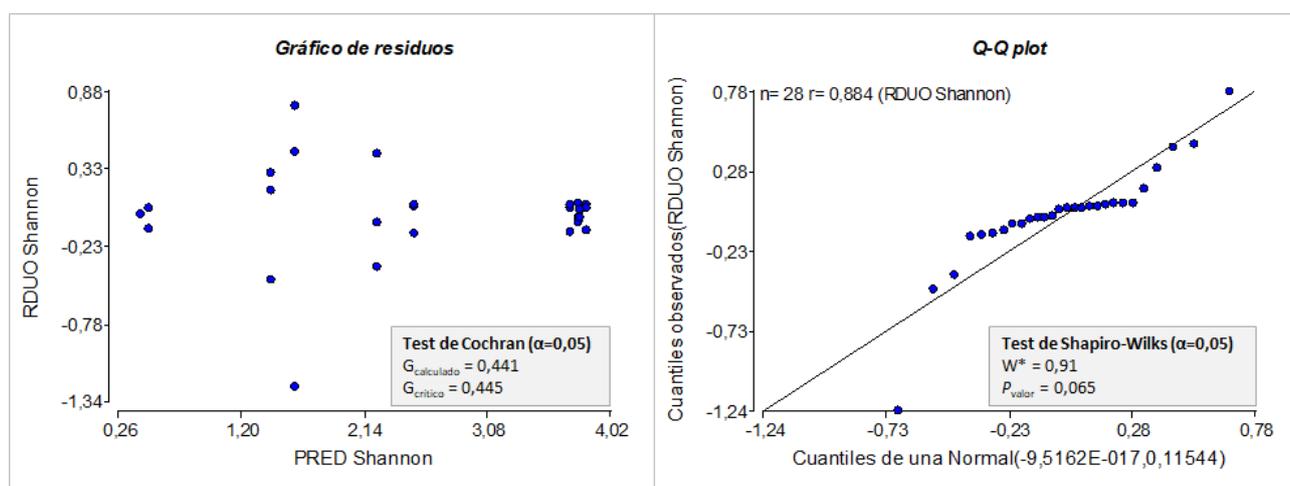
**Figura 5.3.2d** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2h** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Shannon-Wiener a nivel de phylum; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=0,23. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	SHANNON-WIENER (PHYLUM)
Rizosfera	2,15 a
Suelo	2,2 a
Raíz	0,95 b
Tallo	0,71 c
Fruto	0,06 d

5.3.2.5 ANAVA del índice de Shannon-Wiener a nivel de orden

Tabla 5.3.2i Análisis de varianza del índice de Shannon-Wiener a nivel de orden calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Shannon-Wiener nivel de orden; N=28; CV=16,4.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	37,94	4	9,49	54,78	<0,01
Establecimiento	0,07	1	0,07	0,41	0,5323
Muestra*Establecimiento	0,11	4	0,03	0,16	0,9559
Error	3,12	18	0,17		
Total	45,41	27			

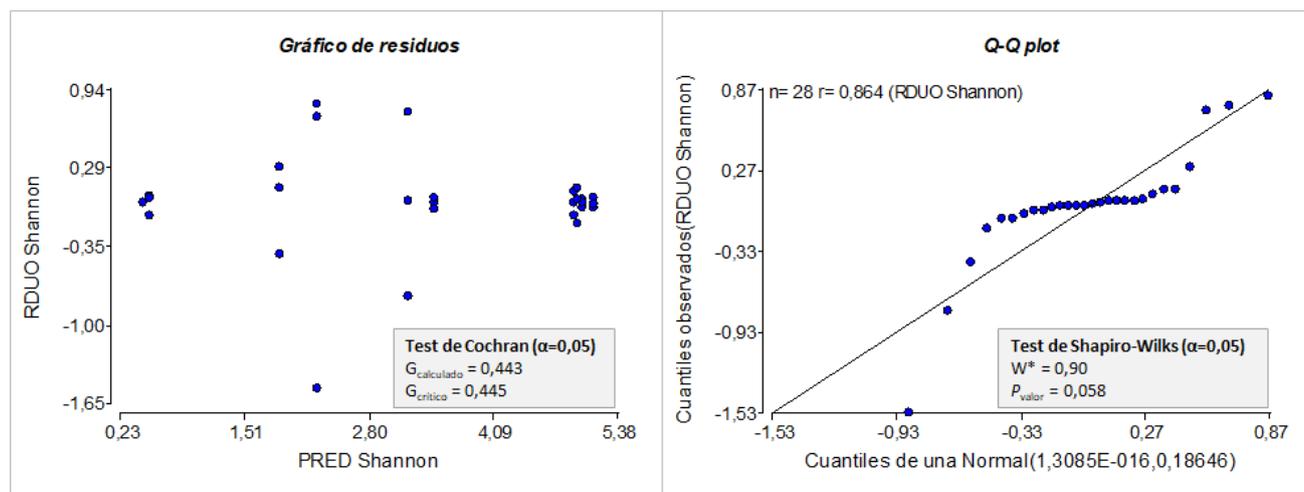
**Figura 5.3.2e** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2j** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Shannon-Wiener a nivel de orden; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=0,76. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	SHANNON-WIENER (ORDEN)
Rizosfera	3,82 a
Suelo	3,76 a
Raíz	2,39 b
Tallo	1,52 c
Fruto	0,46 d

5.3.2.6 ANAVA del índice de Shannon-Wiener a nivel de género

Tabla 5.3.2k Análisis de varianza del índice de Shannon-Wiener a nivel de género calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Shannon-Wiener nivel de género; N=28; CV=15,6.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	67,27	4	16,82	60,13	<0,01
Establecimiento	0,05	1	0,05	0,19	0,67
Muestra*Establecimiento	0,32	4	0,08	0,29	0,88
Error	5,03	18	0,28		
Total	80,99	27			

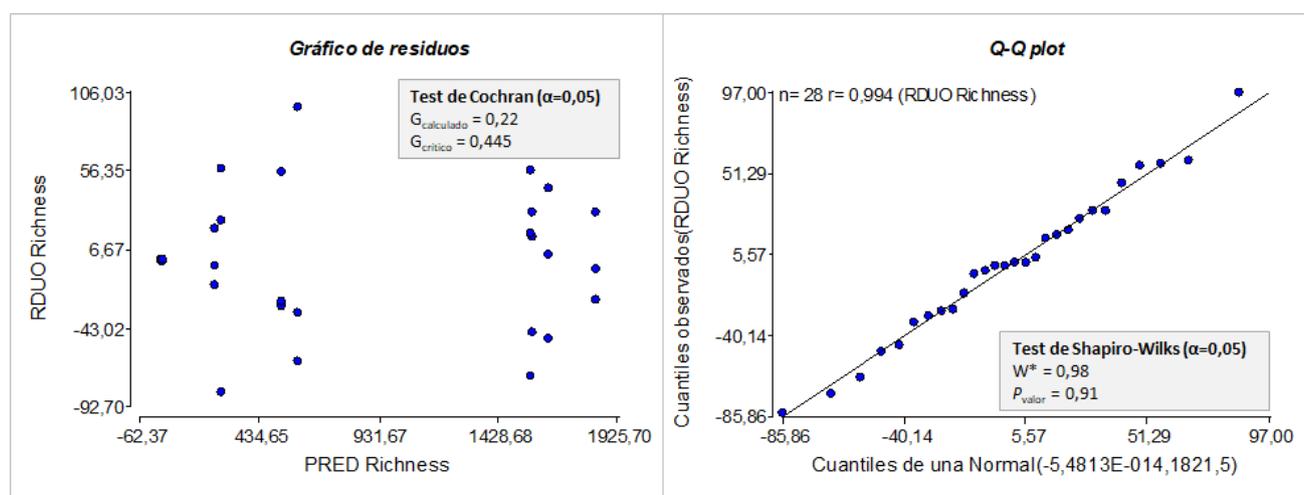
**Figura 5.3.2f** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2l** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Shannon-Wiener a nivel de género; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=0,97. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	SHANNON-WIENER (GÉNERO)
Rizosfera	5,06 a
Suelo	4,99 a
Raíz	3,35 b
Tallo	2,08 c
Fruto	0,49 d

5.3.2.7 ANAVA del índice Richness a nivel de OTU

Tabla 5.3.2m Análisis de varianza del índice richness a nivel de OTU calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Richness nivel de OTU; N=28; CV=5,9.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	12985609,86	4	3246402,46	1188,18	<0,01
Establecimiento	39658,67	1	39658,67	14,51	<0,01
Muestra*Establecimiento	75933,05	4	18983,26	6,95	<0,01
Error	49180,67	18	2732,26		
Total	13157300,86	27			

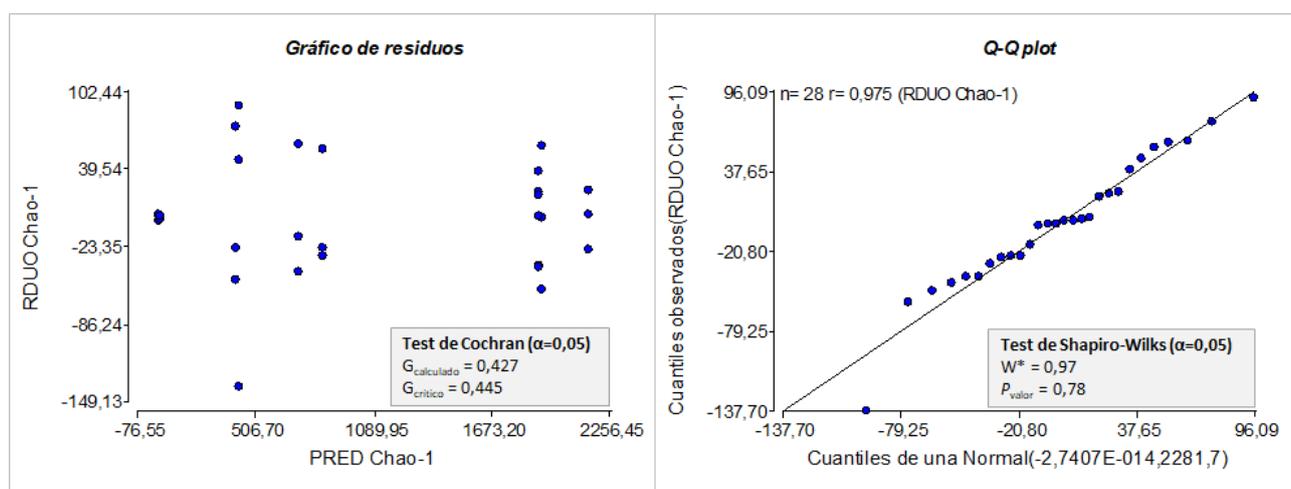
**Figura 5.3.2g** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2n** Comparación de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Richness a nivel de OTU; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=160. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	RICHNESS (OTUs)
Rizosfera	Productor Mario	1835,33 a
Suelo	Productor Mario	1637,33 b
Suelo	Viento Norte	1573,33 b
Rizosfera	Viento Norte	1566,33 b
Raíz	Productor Mario	597 c
Raíz	Viento Norte	528,33 c
Tallo	Viento Norte	273,67 d
Tallo	Productor Mario	251,33 d
Fruto	Productor Mario	30 e
Fruto	Viento Norte	28 e

5.3.2.8 ANAVA del índice Chao-1 a nivel de OTU

Tabla 5.3.2o Análisis de varianza del índice Chao-1 a nivel de OTU calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Chao-1 nivel de OTU; N=28; CV=5,3.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	17156293,4	4	4289073,35	1253,19	<0,01
Establecimiento	35038,49	1	35038,49	10,24	<0,01
Muestra*Establecimiento	68953,02	4	17238,25	5,04	<0,01
Error	61605,68	18	3422,54		
Total	17328032,33	27			

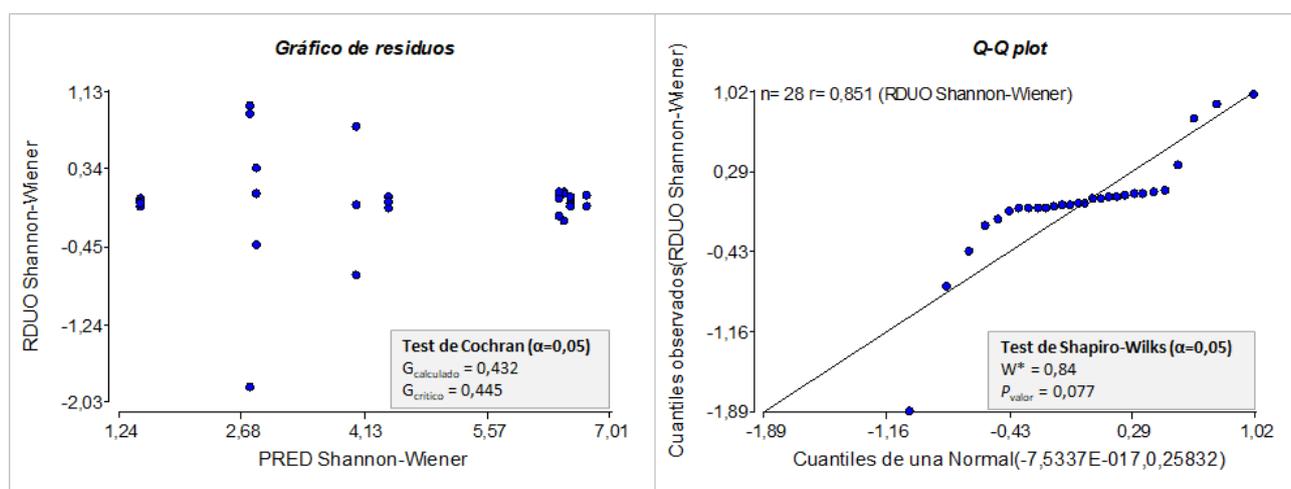
**Figura 5.3.2h** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2p** Comparación de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Chao-1 a nivel de OTU; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=179,6. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	CHAO-1 (OTUs)
Rizosfera	Productor Mario	2150,4 a
Suelo	Productor Mario	1924,33 b
Rizosfera	Viento Norte	1908,07 b
Suelo	Viento Norte	1906 b
Raíz	Productor Mario	839,27 c
Raíz	Viento Norte	721,4 c
Tallo	Viento Norte	427,8 d
Tallo	Productor Mario	406,2 d
Fruto	Productor Mario	31 e
Fruto	Viento Norte	29,5 e

5.3.2.9 ANAVA del índice Shannon-Wiener a nivel de OTU

Tabla 5.3.2q Análisis de varianza del índice Shannon-Wiener a nivel de OTU calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Shannon-Wiener a nivel de OTU; N=28; CV=13,7.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	103,67	4	25,92	66,89	<0,01
Establecimiento	0,0015	1	0,0015	0,0038	0,9516
Muestra*Establecimiento	0,4	4	0,1	0,26	0,9015
Error	6,97	18	0,39		
Total	111,04	27			

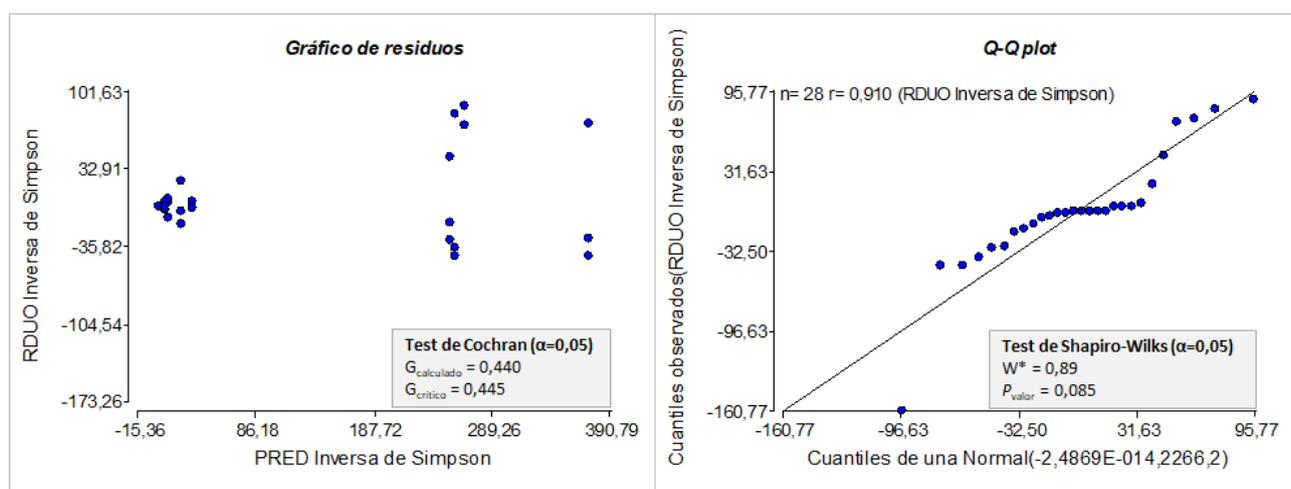
**Figura 5.3.2i** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2r** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Shannon-Wiener a nivel de OTU; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=1,14. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

MUESTRA	SHANNON-WIENER (OTUs)
Rizosfera	6,58 a
Suelo	6,52 a
Raíz	4,23 b
Tallo	2,82 c
Fruto	1,51 d

5.3.2.10 ANAVA del índice inversa de Simpson a nivel de OTU

Tabla 5.3.2s Análisis de varianza del índice inversa de Simpson a nivel de OTU calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Inversa de Simpson a nivel de OTU; N=28; CV=44,35.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	519549,02	4	129887,26	38,21	<0,01
Establecimiento	2594	1	2594	0,76	0,3938
Muestra*Establecimiento	18263,63	4	4565,91	1,34	0,2924
Error	61187,11	18	3399,28		
Total	602057,43	27			

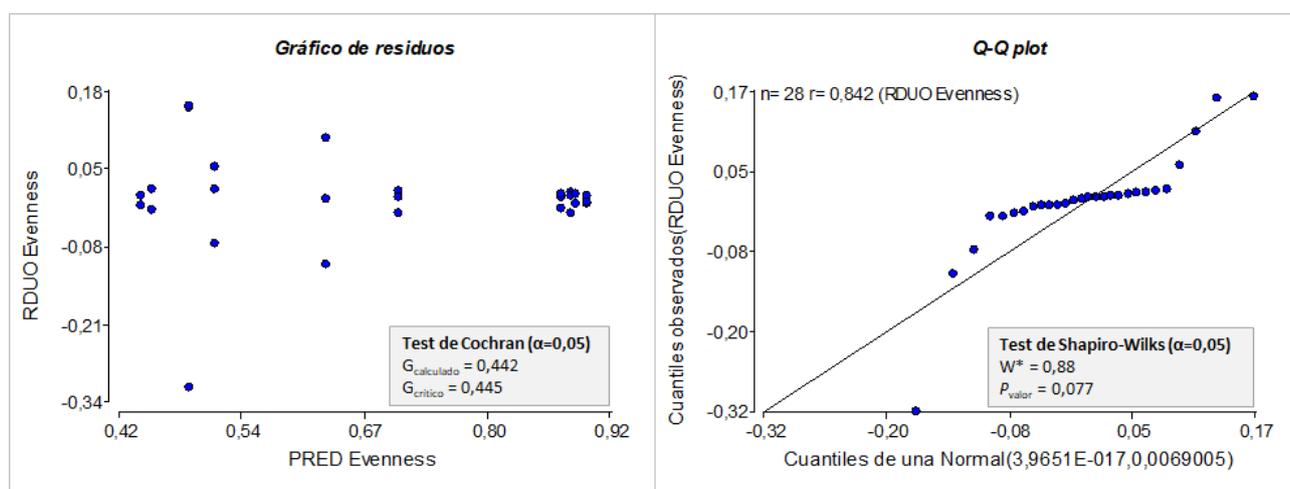
**Figura 5.3.2j** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2t** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Inversa de Simpson a nivel de OTU; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=106,7. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

MUESTRA	INVERSA DE SIMPSON (OTUs)
Rizosfera	313,07 a
Suelo	262,5 a
Raíz	27,1 b
Tallo	9,7 b
Fruto	3,1 b

5.3.2.11 ANAVA del índice Evenness a nivel de OTU

Tabla 5.3.2u Análisis de varianza del índice Evenness a nivel de OTU calculado con los datos de secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Variable: Evenness a nivel de OTU; N=28; CV=14,7.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	0,9	4	0,23	21,75	<0,01
Establecimiento	0,00023	1	0,00023	0,02	0,882
Muestra*Establecimiento	0,01	4	0,0026	0,25	0,9065
Error	0,19	18	0,01		
Total	1,1	27			

**Figura 5.3.2k** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.3.2v** Comparación de medias del factor Muestra mediante test de Tukey. Variable: Evenness a nivel de OTU; $\alpha=0,05$; N=6 para suelo, rizosfera, raíz y tallo; N=4 para fruto; Diferencia mínima significativa=0,18. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

MUESTRA	EVENNESS (OTUs)
Rizosfera	0,89 a
Suelo	0,88 a
Raíz	0,67 b
Tallo	0,5 bc
Fruto	0,45 c

5.4 RESULTADOS DE qPCR DE GENES FUNCIONALES

5.4.1. CUANTIFICACIÓN DEL GEN *nifH*

5.4.1.1 Construcción de curva estándar

La curva estándar se generó empleando el stock sin dilución y 4 diluciones, determinándose el Ct por triplicado (N=15) (Tabla 5.4.1a). Se utilizó la transformación logarítmica decimal para el número de copias del gen con el objetivo de estabilizar las varianzas y linealizar la regresión. Los valores de Ct se ajustaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos al siguiente modelo (Figura 5.4.1a):

$$Y_i = 41,517 - 3,4092 X_i$$

Se evaluó la regresión entre las variables y la falta de ajuste de los datos al modelo obtenido mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% (Tabla 5.4.1b). Se calculó la eficiencia de amplificación de la qPCR utilizando la pendiente (B = -3,4092) del modelo en la siguiente ecuación:

$$Eficiencia (\%) = 10^{(-1/B)-1} * 100$$

Una pendiente próxima a -3,3 indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. El valor obtenido (104,6%) se encuentra dentro del rango considerado aceptable para una curva estándar.

Tabla 5.4.1a Determinación del Ct para distintas diluciones del stock patrón del gen sintético *nifH*.

DILUCIÓN	N° COPIAS / μ L	LOG N° COPIAS / μ L	VALOR DE CT
Stock s/d = 1	13148842	7,12	17,40
1 (1:10)	1314884	6,12	20,50
2 (1:100)	131488	5,12	23,95
3 (1:1000)	13149	4,12	27,46
4 (1:10000)	1315	3,12	30,85

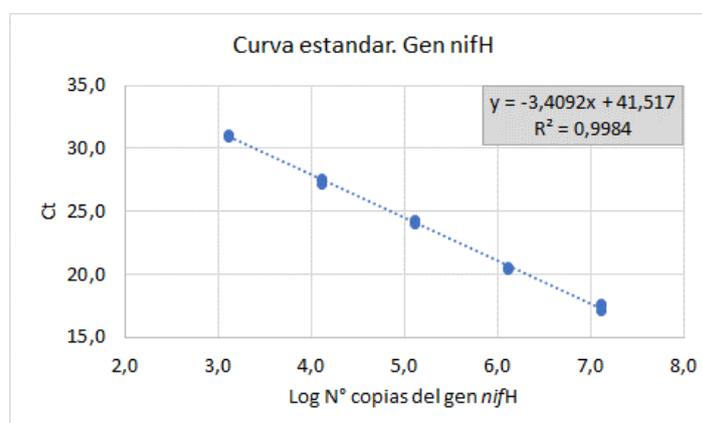


Figura 5.4.1a Resultados de Ct de la qPCR para las diluciones a partir del stock sintético del gen *nifH*. Sobre la gráfica se detalla el modelo lineal ajustado y su coeficiente de determinación.

Tabla 5.4.1b Análisis de varianza del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de Ct determinados en las diferentes diluciones del stock patrón del gen *nifH*. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen *nifH*; $\alpha=0,05$; Transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; N=12; R²=0,9984.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Log N° copias/ μ l	348,67	1	348,67	8481,2	<0,01
Falta de ajuste	0,21	3	0,07	1,703	0,224
Error Puro	0,37	19	0,041		
Total	349,24	13			

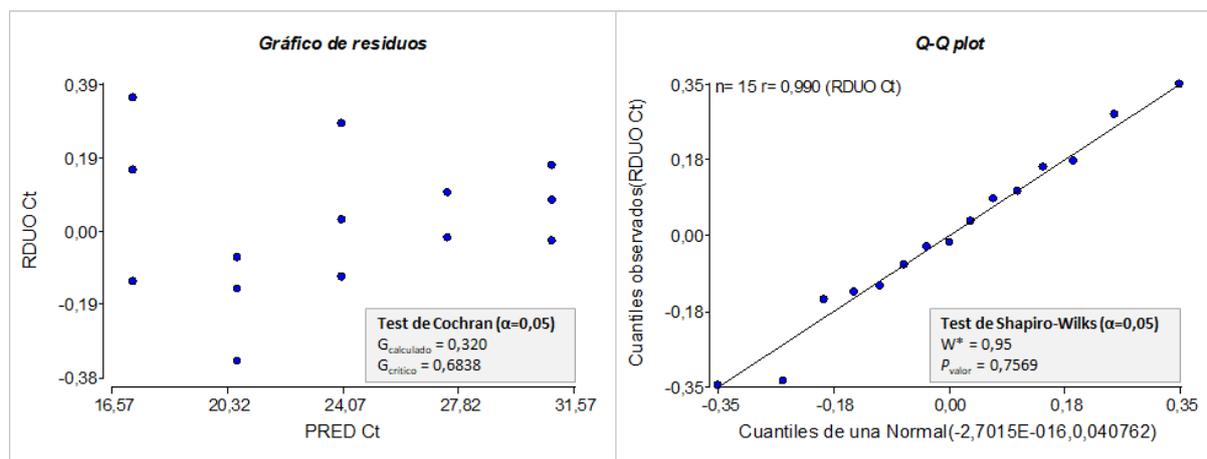


Figura 5.4.1b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico Q-Q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

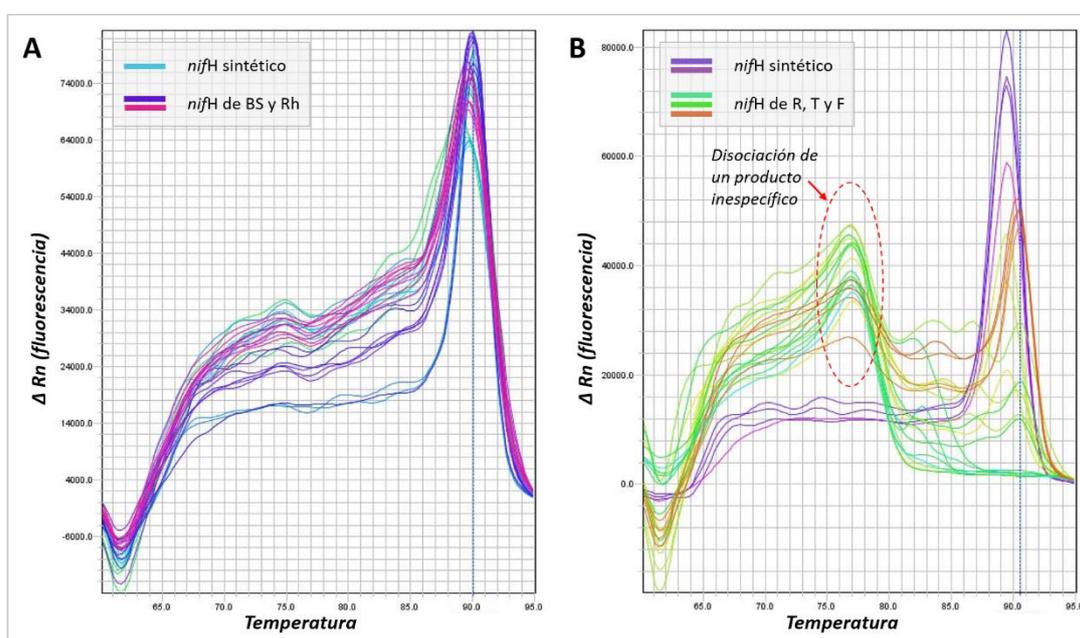
5.4.1.2 Resultados de cuantificación del gen *nifH*

A continuación, se muestran los resultados de la cuantificación del número de copias del gen *nifH* para cada una de las muestras de ambos establecimientos hortícolas (Tabla 5.4.1c), la corroboración de la especificidad de la qPCR (Figura 5.4.1c) y el análisis estadístico de los datos (Tabla 5.4.1d). Si bien fue posible la amplificación y cuantificación del gen *nifH* en todas las muestras, al analizar las curvas de melting (Figura 5.4.1c) se observó la inespecificidad en la amplificación en las muestras de endosfera de órganos vegetales, por lo cual se descartaron dichos resultados.

Tabla 5.4.1c Resultados de la cuantificación del gen *nifH* en muestras de suelo y rizosfera de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata.

MUESTRAS	VIENTO NORTE			PRODUCTOR MARIO		
	Ct prom.	N° copias g ⁻¹ (x10 ⁶)	Prom. + IC ^a (x10 ⁶)	Ct prom.	N° copias g ⁻¹ (x10 ⁶)	Prom. + IC ^a (x10 ⁶)
Suelo	27,81	7,14	5,34 ± 0,8	26,34	11,1	7,05 ± 1,4
	27,78	4,52				
	28,00	4,35				
Rizosfera	25,30	40,3	43,2 ± 6,0	26,58	12,3	13,5 ± 2,0
	25,99	30,9				
	24,88	58,4				

^a Es el valor promedio del número de copias para cada muestra de cada establecimiento con el intervalo de confianza del 95% de la estimación, utilizando el modelo de regresión lineal ajustado.

**Figura 5.4.1c** Curva de melting del gen *nifH* del patrón sintético y de las diferentes muestras de (A) suelo (BS) y rizosfera (Rh), y (B) endosfera de raíz (R), tallo (T) y fruto (F).**Tabla 5.4.1d** Análisis de varianza de resultados de cuantificación del gen *nifH* en suelo y rizosfera de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen *nifH*; $\alpha=0,05$; Transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; N=12; CV=1,93.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Muestra	1,11	1	1,11	51,8	<0,01
Establecimiento	0,11	1	0,11	5,1	0,05
Muestra*Establecimiento	0,26	1	0,26	12,1	<0,01
Error	0,15	7	0,02		
Total	1,64	10			

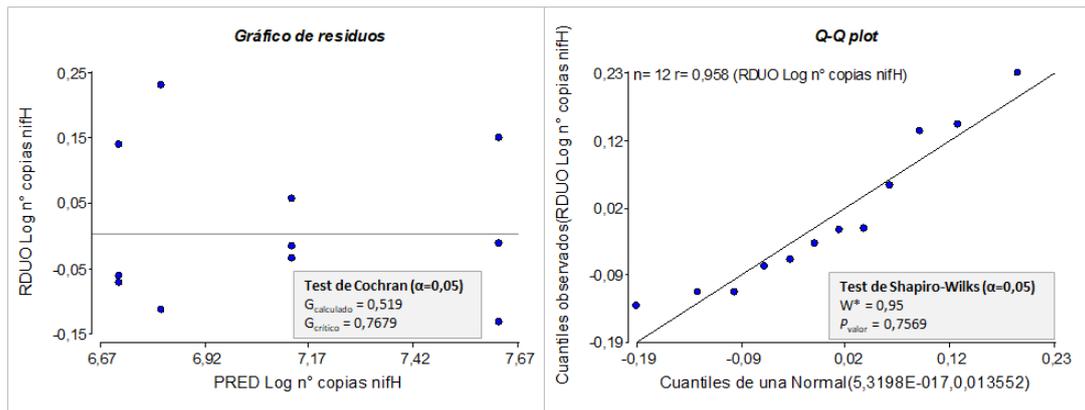


Figura 5.4.1d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico Q-Q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.4.1e Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: N° de copias g^{-1} del gen *nifH* por gramo; $\alpha=0,05$; Diferencia mínima significativa=0,35. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	MEDIA DEL LOG. N° COPIAS <i>nifH</i>
Rizosfera	Viento Norte	7,62 a
Rizosfera	Productor Mario	7,13 b
Suelo	Productor Mario	6,82 bc
Suelo	Viento Norte	6,72 c

5.4.2. CUANTIFICACIÓN DEL GEN *PHOD*.

5.4.2.1 Construcción de las curva estándar.

La curva estándar se generó empleando 5 diluciones a partir del stock con el gen sintético, determinándose el Ct por triplicado (N=15) (Tabla 5.4.2a). Se utilizó la transformación logarítmica decimal para el número de copias del gen con el objetivo de estabilizar las varianzas y linealizar la regresión. Los valores de Ct se ajustaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos al siguiente modelo (Figura 5.4.2a):

$$Y_i = 32,184 - 3,2163 X_i$$

Se evaluó la regresión entre las variables y la falta de ajuste de los datos al modelo obtenido mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% (Tabla 5.4.2b). Se calculó la eficiencia de amplificación de la qPCR utilizando la pendiente (B = -3,2163) del modelo en la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia (\%)} = 10^{(-1/B)-1} * 100$$

Una pendiente próxima a -3,3 indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. El valor obtenido (96,5%) se encuentra dentro del rango considerado aceptable para una curva estándar.

Tabla 5.4.2a Determinación del Ct para distintas diluciones del stock patrón del gen sintético *phoD*.

DILUCIÓN	N° COPIAS / μL	LOG N° COPIAS / μL	VALOR DE CT		
Stock s/d = 1	11387602000	10,06	No determinado		
6 (1:1000000)	11387,60	4,06	19,25	19,73	18,93
7 (1:10000000)	1138,76	3,06	21,91	22,63	21,67
8 (1:100000000)	113,88	2,06	25,84	25,62	25,13
9 (1:1000000000)	11,39	1,06	28,94	28,76	29,42
10 (1:10000000000)	1,14	0,06	31,49	31,97	32,25

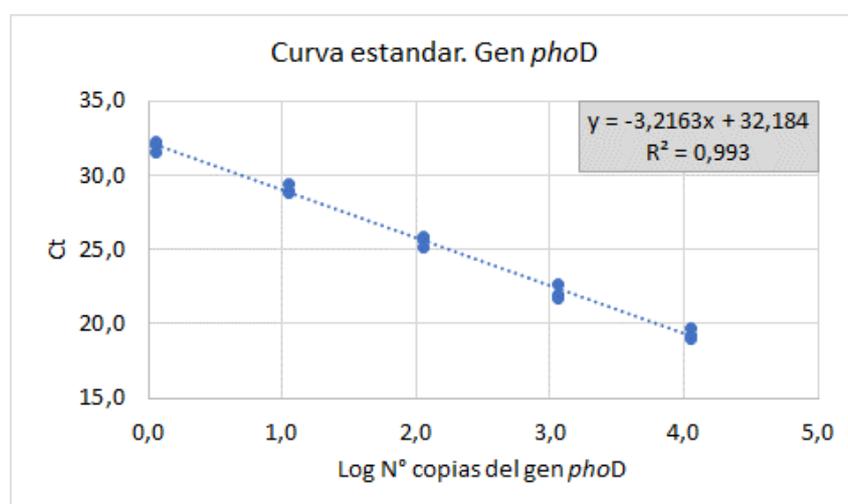


Figura 5.4.2a Resultados de Ct de la qPCR para las diluciones a partir del stock sintético del gen *phoD*. Sobre la gráfica se detalla el modelo lineal ajustado y su coeficiente de determinación.

Tabla 5.4.2b Análisis de varianza del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de Ct determinados en las diferentes diluciones del stock patrón del gen *phoD*. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen *phoD*; transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; N=30; R²=0,993.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Log N° copias/ μ l	310,34	1	310,34	1724,1	<0,01
Falta de ajuste	0,56	3	0,19	1,056	0,331
Error Puro	1,62	9	0,18		
Total	312,52	13			

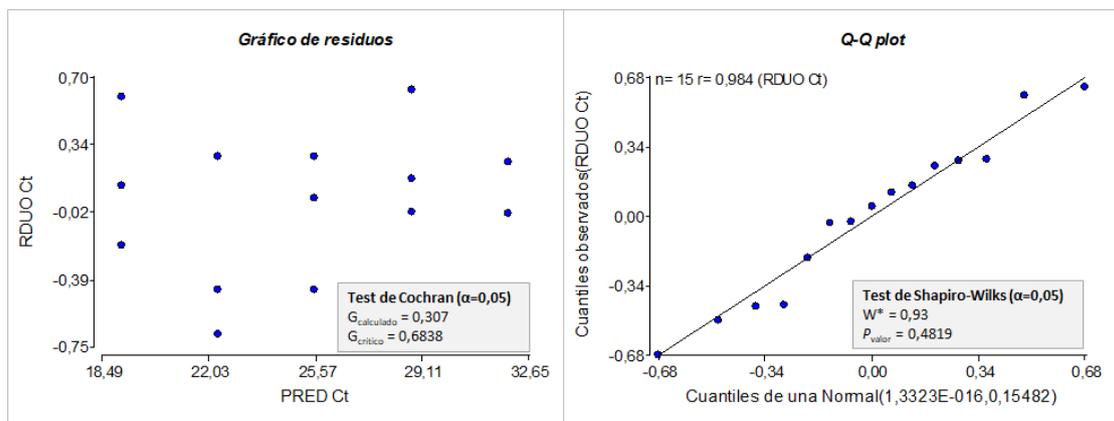


Figura 5.4.2b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

5.4.2.2 Resultados de cuantificación del gen *phoD*

A continuación, se muestran los resultados de la cuantificación del número de copias del gen *phoD* para cada una de las muestras de ambos establecimientos hortícolas (Tabla 5.4.2c), la corroboración de la especificidad de la qPCR (Figura 5.4.2c) y el análisis estadístico de los datos (Tabla 5.4.2d).

Tabla 5.4.2c Resultados de la cuantificación del gen *phoD* en muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata.

MUESTRAS	VIENTO NORTE			PRODUCTOR MARIO		
	Ct prom.	N° copias g ⁻¹ (x10 ⁴)	Prom. + IC ^a (x10 ⁴)	Ct prom.	N° copias g ⁻¹ (x10 ⁴)	Prom. + IC ^a (x10 ⁴)
Suelo	21,9	102	97,4 ± 34,4	21,2	97,3	98,0 ± 35,6
	21,4	94,1		21,2	85,5	
	21,5	95,8		21,1	111	
Rizosfera	21,6	132	171 ± 61,2	21,0	152	166 ± 60,9
	21,3	207		21,0	202	
	21,4	176		21,2	144	
Raíz	23,0	90,0	85,5 ± 27,4	27,9	3,72	12,7 ± 3,91
	22,9	114		24,5	28,5	
	24,2	52,2		27,0	5,82	
Tallo	33,1	0,44	0,46 ± 0,20	31,2	0,24	0,22 ± 0,09
	31,7	0,54		31,8	0,23	
	31,6	0,40		31,9	0,19	
Fruto	32,3	0,18	0,16 ± 0,07	32,2	0,14	0,31 ± 0,13
	32,5	0,13		31,5	0,28	
	31,8	0,18		31,4	0,51	

^a Es el valor promedio del número de copias para cada muestra de cada establecimiento con el intervalo de confianza del 95% de la estimación, utilizando el modelo de regresión lineal ajustado.

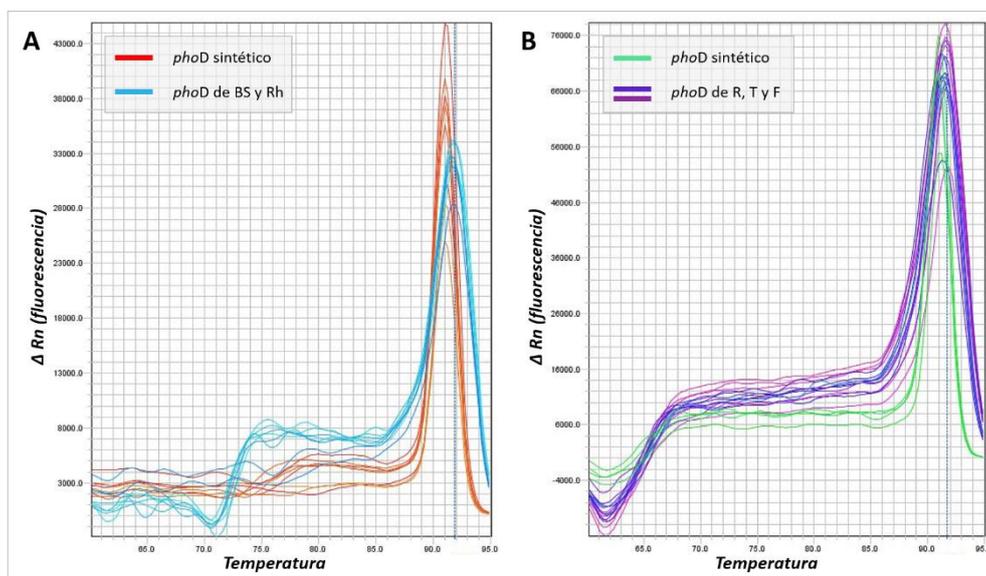


Figura 5.4.2c Curva de melting del gen *phoD* del patrón sintético y de las diferentes muestras de (A) suelo (BS) y rizosfera (Rh), y (B) endosfera de raíz (R), tallo (T) y fruto (F).

Tabla 5.4.2d Análisis de varianza de resultados de cuantificación del gen *phoD* en suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen *phoD*; transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; N=30; CV=3,9.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Muestra	45,88	4	11,47	298,53	<0,01
Establecimiento	0,35	1	0,35	9,11	<0,01
Muestra*Establecimiento	1,31	4	0,33	8,59	<0,01
Error	0,73	19	0,038		
Total	48,27	28			

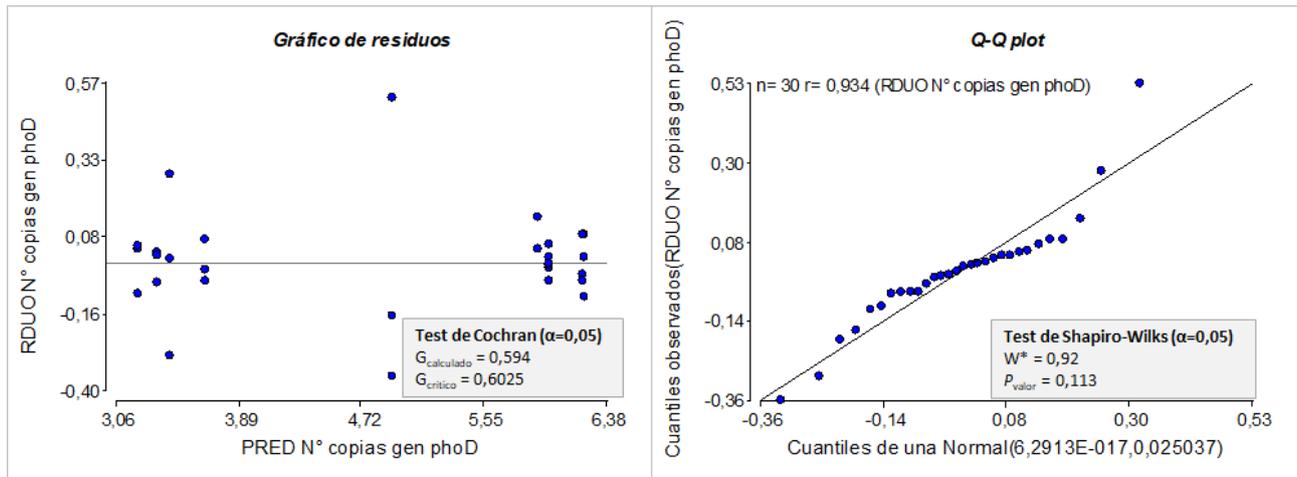


Figura 5.4.2d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.4.2e Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen *phoD* por gramo; $\alpha=0,05$; Diferencia mínima significativa=0,67. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	MEDIA DEL LOG. N° COPIAS <i>phoD</i>
Rizosfera	Viento Norte	6,23 a
Rizosfera	Productor Mario	6,22 a
Suelo	Productor Mario	5,99 a
Suelo	Viento Norte	5,99 a
Raíz	Viento Norte	5,91 a
Raíz	Productor Mario	4,93 b
Tallo	Viento Norte	3,66 c
Fruto	Productor Mario	3,43 c
Tallo	Productor Mario	3,35 c
Fruto	Viento Norte	3,21 c

5.4.3. CUANTIFICACIÓN DEL GEN *acdS*.

5.4.3.1 CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR.

La curva estándar se generó empleando 5 diluciones a partir del stock con el gen sintético, determinándose el Ct por triplicado (N=15) (Tabla 5.1.3a). Se utilizó la transformación logarítmica decimal para el número de copias del gen con el objetivo de estabilizar las varianzas y linealizar la regresión. Los valores de Ct se ajustaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos al siguiente modelo (Figura 5.4.3a):

$$Y_i = 48,151 - 3,5355 X_i$$

Se evaluó la regresión entre las variables y la falta de ajuste de los datos al modelo obtenido mediante el análisis de la varianza (ANAVA) con un nivel de confianza de 95% (Tabla 5.4.3b). Se calculó la eficiencia de amplificación de la qPCR utilizando la pendiente (B = -3,5355) del modelo en la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia (\%)} = 10^{(-1/B)-1} * 100$$

Una pendiente próxima a -3,3 indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. El valor obtenido (91,8%) se encuentra dentro del rango considerado aceptable para una curva estándar.

Tabla 5.4.3a Determinación del Ct para distintas diluciones del stock patrón del gen sintético *acdS*.

DILUCIÓN	N° COPIAS / μL	LOG N° COPIAS / μL	VALOR DE CT		
stock s/d = 1	11622460000	10,07	No determinado		
2 (1:100)	116224600	8,07	19,36	19,95	19,80
3 (1:1000)	11622460	7,07	22,60	22,91	23,48
4 (1:10000)	1162246	6,07	27,33	26,93	26,60
5 (1:100000)	116224,6	5,07	30,05	29,52	30,46
6 (1:1000000)	11622,5	4,07	33,82	34,23	33,57

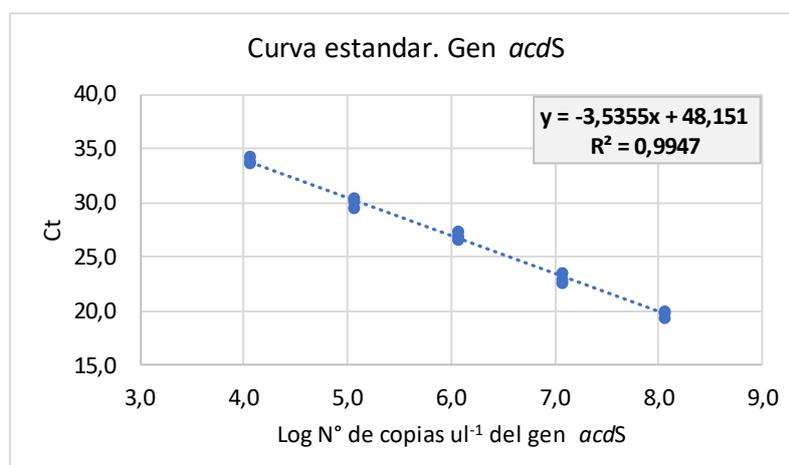


Figura 5.4.3a Resultados de Ct de la qPCR para las diluciones a partir del stock sintético del gen *acdS*. Sobre la gráfica se detalla el modelo lineal ajustado y su coeficiente de determinación.

Tabla 5.4.3b Análisis de varianza del modelo de regresión lineal ajustado a los datos de Ct determinados en las diferentes diluciones del stock patrón del gen *acdS*. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen *acdS*; transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; N=15; R²=0,9947.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Log N° copias/ μ l	374,99	1	374,99	2220,3	<0,01
Falta de ajuste	0,47	3	0,1567	1,03	0,465
Error Puro	1,52	9	0,1689		
Total	376,97	13			

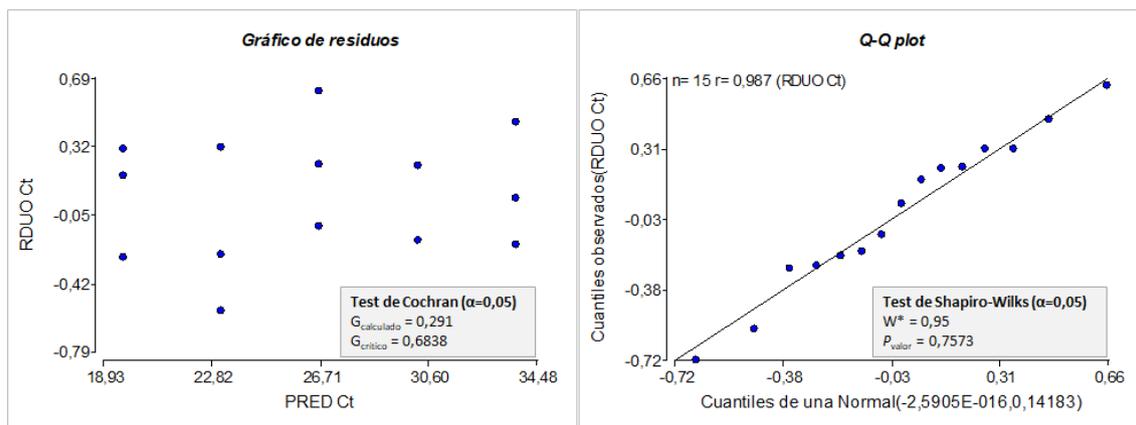


Figura 5.4.3b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

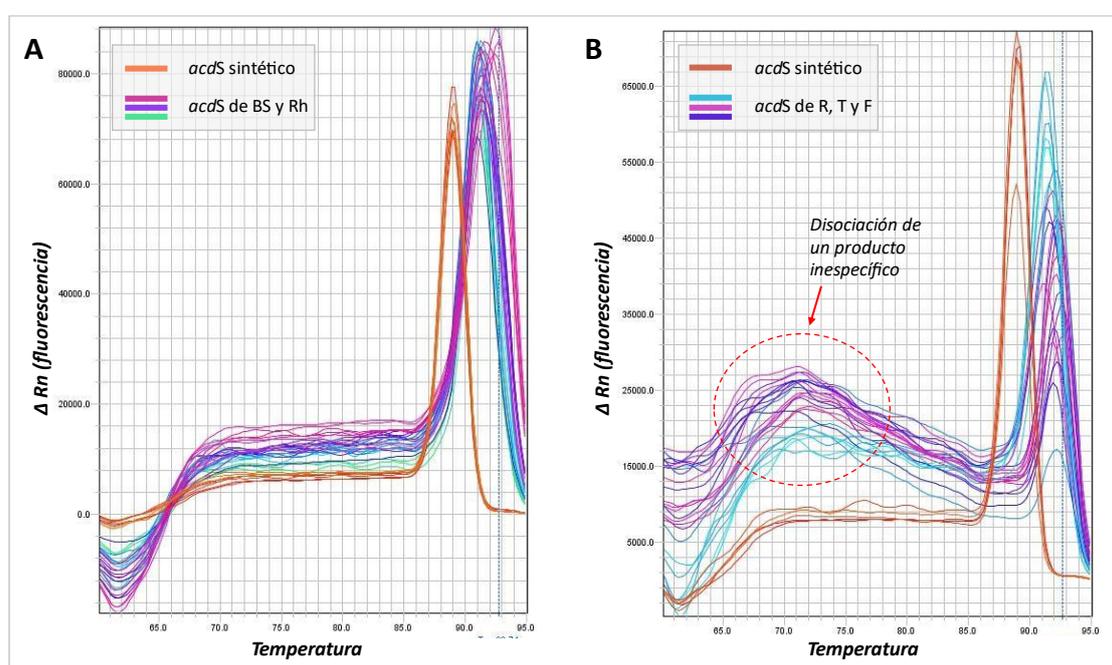
5.4.3.2 RESULTADOS DE CUANTIFICACIÓN DEL GEN *acdS* EN MUESTRAS AMBIENTALES DE SUELO, RIZOSFERA Y ENDOSFERA DE RAÍZ, TALLO Y FRUTO DE TOMATE.

A continuación, se muestran los resultados de la cuantificación del número de copias del gen *acdS* para cada una de las muestras de ambos establecimientos hortícolas (Tabla 5.4.3c), la corroboración de la especificidad de la qPCR (Figura 5.4.3c) y el análisis estadístico de los datos (Tabla 5.4.3d). Si bien fue posible la amplificación y cuantificación del gen *acdS* en todas las muestras, al analizar las curvas de melting (Figura 5.4.3c) se observó la inespecificidad en la amplificación en las muestras de endosfera de órganos vegetales, por lo cual se descartaron dichos resultados.

Tabla 5.4.3c Resultados de la cuantificación del gen *acdS* en muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata.

MUESTRAS	VIENTO NORTE			PRODUCTOR MARIO		
	Ct prom.	N° copias g ⁻¹ (x10 ⁷)	Prom. + IC ^a (x10 ⁷)	Ct prom.	N° copias g ⁻¹ (x10 ⁷)	Prom. + IC ^a (x10 ⁷)
Suelo	22,23	1440	847 ± 267	21,33	1490	977 ± 313
	22,86	592		22,55	590	
	23,27	509		22,22	847	
Rizosfera	22,82	1020	793 ± 248	21,76	1510	1540 ± 493
	23,87	632		21,96	1700	
	23,47	730		21,99	1400	

^a Es el valor promedio del número de copias para cada muestra de cada establecimiento con el intervalo de confianza del 95% de la estimación, utilizando el modelo de regresión lineal ajustado.

**Figura 5.4.3c** Curva de melting del gen *acdS* del patrón sintético y de las diferentes muestras de suelo (BS) y rizosfera (Rh), y endosfera de raíz (R), tallo (T) y fruto (F).**Tabla 5.4.3d** Análisis de varianza de resultados de cuantificación del gen *acdS* en suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de cultivos de tomate de dos establecimientos del cinturón hortícola de La Plata. Variable: N° de copias g⁻¹ del gen *acdS*; transformación: logarítmica decimal; $\alpha=0,05$; $N=12$; $CV=1,69$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P valor
Muestra	0,04	1	0,04	1,22	0,31
Establecimiento	0,1	1	0,1	3,04	0,12
Muestra*Establecimiento	0,03	1	0,03	0,91	0,37
Error	0,23	7	0,03		
Total	0,41	10			

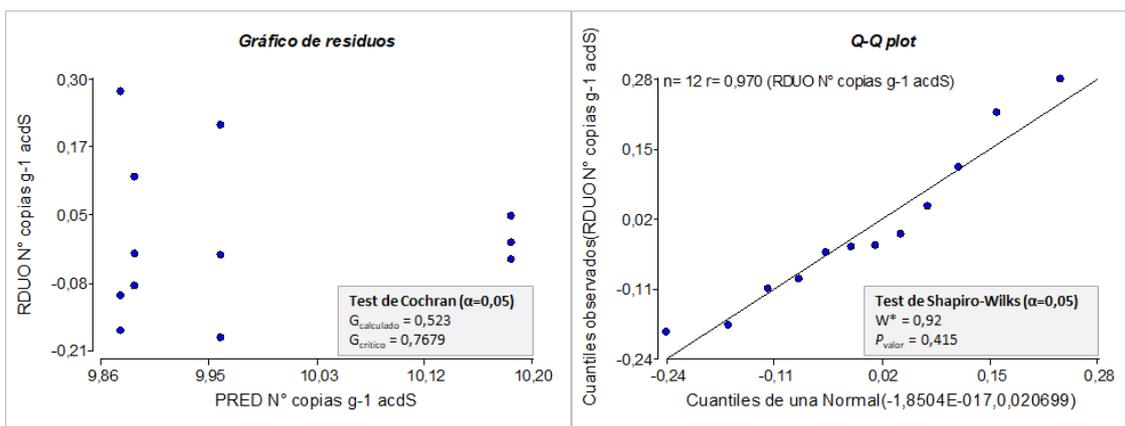


Figura 5.4.3d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

5.4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE GENES FUNCIONALES RELATIVIZADOS AL GEN ARNR 16S

5.4.4.1 Abundancia relativa del gen *nifH* respecto al gen ARNr 16S.

Análisis estadístico: ANAVA bifactorial (Tabla 5.4.4a, Figura 5.4.4a y Tabla 5.4.4b)

Tabla 5.4.4a Análisis de varianza de abundancia relativa del gen *nifH* respecto al gen ARNr 16s en muestras de suelo y rizosfera asociadas al cultivo de tomate de dos establecimientos. Variable: abundancia relativa gen *nifH*; transformación: logarítmica decimal; n=12; cv=2,46.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	0,74	1	0,74	22,52	<0,01
Establecimiento	0,01	1	0,01	0,30	0,601
Muestra*Establecimiento	0,54	1	0,54	16,43	<0,01
Error	0,23	7	0,033		
Total	1,52	10			

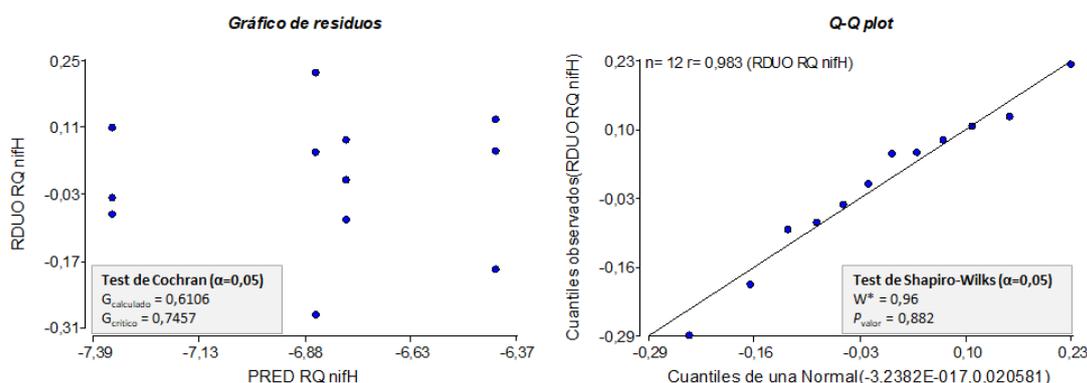


Figura 5.4.4a comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.4.4b Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Abundancia relativa gen *nifH*; $\alpha=0,05$; Diferencia mínima significativa=0,44. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	MEDIA LOG. N° COPIAS <i>nifH</i>	MEDIA ABUNDANCIA RELATIVA
Rizosfera	Viento Norte	-6,42 a	0,4 por millón
Rizosfera	Productor Mario	-6,78 a	0,17 por millón
Suelo	Productor Mario	-6,85 a	0,16 por millón
Suelo	Viento Norte	-7,34 b	0,05 por millón

5.4.4.2 Abundancia del gen *phoD* relativizada a la abundancia del gen ARNr 16S

Análisis estadístico: ANAVA bifactorial (Tabla 5.4.4c, Figura 5.4.4b, Tabla 5.4.4d).

Tabla 5.4.4c Análisis de varianza de abundancia relativa del gen *phoD* respecto al gen ARNr 16s en muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de dos establecimientos. Variable: Abundancia relativa gen *phoD*; transformación: logarítmica decimal; N=30; cv=3,09.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	47,69	4	11,92	294,13	<0,01
Establecimiento	0,1	1	0,1	2,47	0,13
Muestra*Establecimiento	1,75	4	0,44	10,86	<0,01
Error	0,77	19	0,041		
Total	50,31	28			

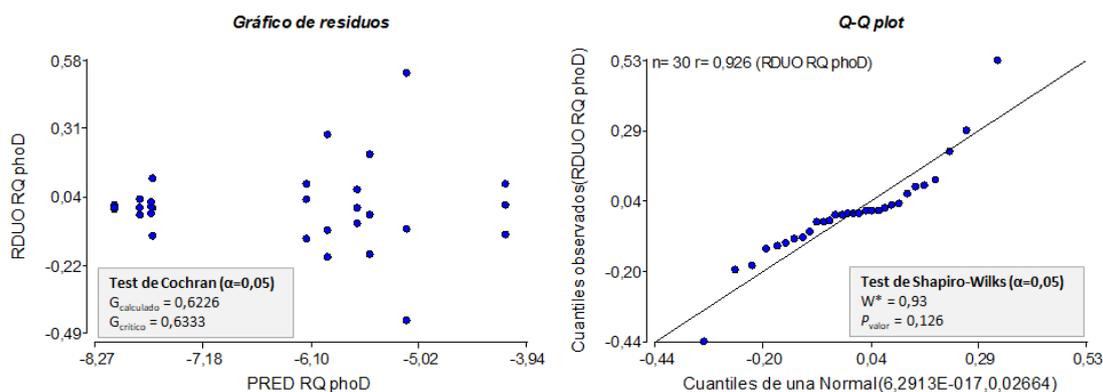


Figura 5.4.4b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.4.4d Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Abundancia relativa gen *phoD*; $\alpha=0,05$; Diferencia mínima significativa=0,57. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	MEDIA LOG. N° COPIAS <i>phoD</i>	MEDIA ABUNDANCIA RELATIVA
---------	-----------------	----------------------------------	---------------------------

Raíz	Viento Norte	-4,14 a	74,4
Raíz	Productor Mario	-5,14 b	11,1
Fruto	Productor Mario	-5,49 bc	3,5
Fruto	Viento Norte	-5,63 bcd	2,3
Tallo	Viento Norte	-5,92 cd	1,3
Tallo	Productor Mario	-6,14 d	0,74
Suelo	Productor Mario	-7,68 e	0,02
Rizosfera	Productor Mario	-7,69 e	0,02
Rizosfera	Viento Norte	-7,81 e	0,01
Suelo	Viento Norte	-8,07 e	0,008

5.4.4.3 Abundancia del gen *acdS* relativizada a la abundancia del gen ARNr 16S

Análisis estadístico: ANAVA bifactorial (Tabla 5.4.4e, Figura 5.4.4c, Tabla 5.4.4f).

Tabla 5.4.4e Análisis de varianza de abundancia relativa del gen *acdS* respecto al gen ARNr 16s en muestras de suelo y rizosfera de plantas de tomate de dos establecimientos. Variable: Abundancia relativa gen *acdS*; transformación: logarítmica decimal; N=12; cv=4,49.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	0,00019	1	0,00019	0,0053	0,94
Establecimiento	0,6	1	0,6	16,8	<0,01
Muestra*Establecimiento	0,0013	1	0,0013	0,036	0,85
Error	0,25	7	0,036		
Total	0,85	10			

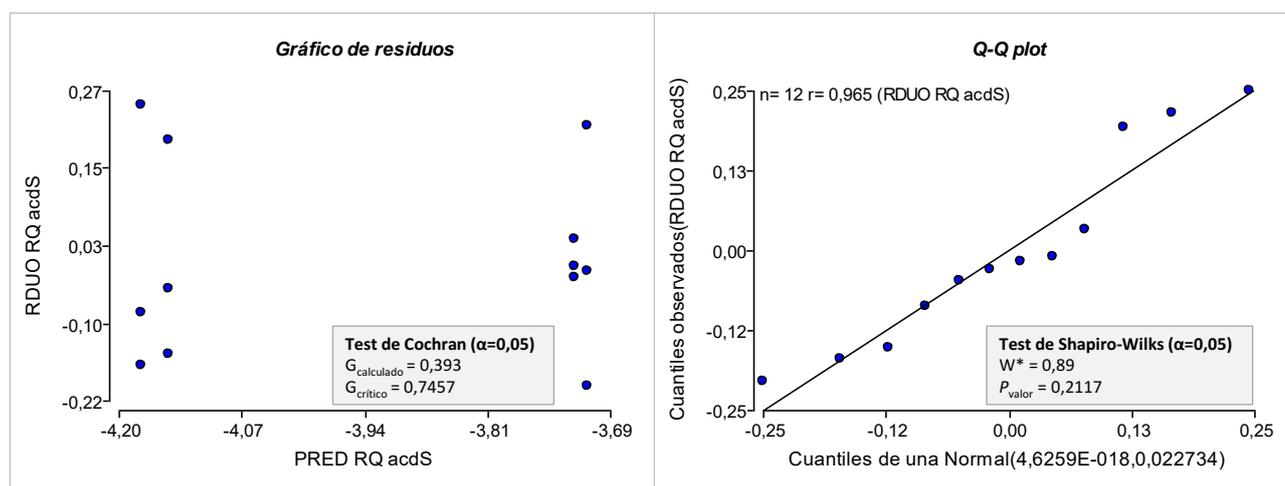


Figura 5.4.4c Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.4.4f Medias del factor Establecimiento. Variable: Abundancia relativa gen *acdS*; $\alpha=0,05$; Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	MEDIA LOG. N° COPIAS <i>acdS</i>	MEDIA ABUNDANCIA RELATIVA
Suelo y Rizosfera	Productor Mario	-3,72 a	200,5 por millón
Suelo y Rizosfera	Viento Norte	-4,16 b	74,1 por millón

5.5 CARACTERIZACIÓN POR HUELLA GENÉTICA O *FINGERPRINT*. DGGE

Fundamentado en que cada organismo tiene un contenido genético único, la caracterización por *huella genética* o *fingerprint* engloba diferentes técnicas de biología molecular que permiten perfilar e identificar un organismo basado en el análisis directo de productos de PCR amplificados a partir de su ADN. Esta misma lógica puede emplearse a nivel de microhábitat vegetal y caracterizar una comunidad bacteriana asociada a determinado entorno mediante un perfilado de su huella genética (Enespa & Chandra, 2022). Diversas técnicas de biología molecular (DGGE/TTGE, SSCP, T-RFLP, entre otras) permiten perfilar los productos de PCR en base a polimorfismos de longitud y/o de secuencia (bases constitutivas) a través de distintos fenómenos, cuyo resultado deriva en un gel donde se evidencian las *huellas genéticas* (perfiles de bandas) de la muestra.

La *electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)* puede ser aplicada a los productos de PCR amplificados a partir de ADN bacteriano metagenómico, utilizando primers para un marcador molecular específico (ARNr 16S, genes funcionales, etc.), para evidenciar polimorfismos en sus secuencias (Figura 5.5a). Uno de los primers a utilizar deberá contar con una secuencia de 30-50 nucleótidos guanina y citosina (GC) (denominada *GC-clamp*) en el extremo -5', lo cual será añadido a la secuencia del gen durante la PCR. La electroforesis se realiza en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente de urea-formamida desnaturalizante: el producto de PCR migrará a través del gel debido al gradiente electroforético hasta el punto en que el gradiente desnaturalizante urea-formamida provoque la separación parcial de las dos hebras de ADN (ya que la secuencia de GC añadida las mantendrá fuertemente unidas). De esta forma, las diferencias en las secuencias de los productos de PCR se evidencian a través de su mayor o menor movimiento a través del gel, el cual queda condicionado por la mayor o menor resistencia a la desnaturalización (un mayor contenido de GC en la molécula determina enlaces más fuertes y resistentes a la desnaturalización de la molécula) (Rastogi & Sani, 2011). Los resultados alcanzados por esta técnica son fácilmente visibles luego del revelado del gel, los cuales pueden ser utilizados para (i) la comparación directa entre los patrones de bandas obtenidos de diferentes muestras, (ii) la identificación de bandas de interés mediante el corte, la purificación y la secuenciación de las mismas, y (iii) la digitalización del gel y el posterior análisis bioinformático.

El análisis de geles de DGGE mediante softwares bioinformáticos utiliza las variables presencia/ausencia e intensidad (la cual traduce en abundancia) para inferir variables ecológicas y calcular índices de diversidad, así como similitudes entre las comunidades de diferentes muestras, por lo que su uso se ha extendido a explorar relaciones filogenéticas y la diversidad taxonómica y funcional de microorganismos en entornos naturales.

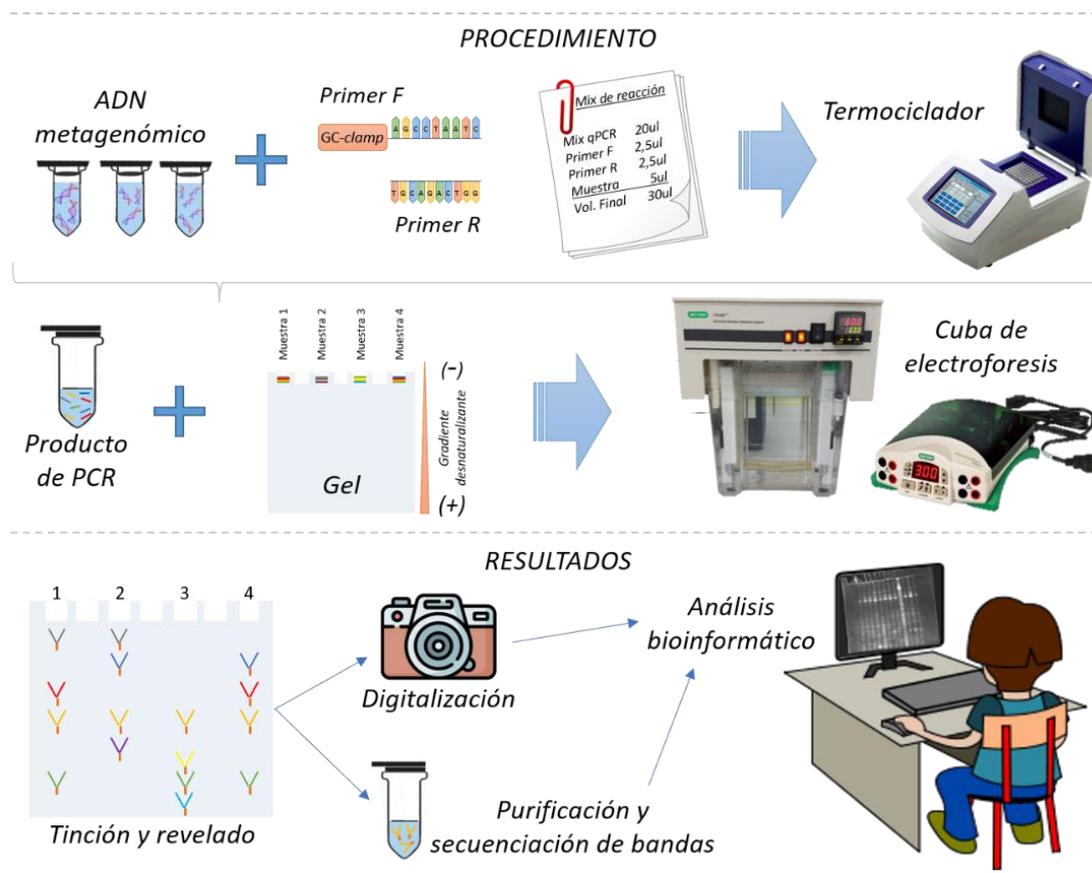


Figura 5.5a Resumen de la técnica DGGE para detectar polimorfismos de secuencia en productos de PCR.

5.5.1. PUESTA A PUNTO DE LOS GRADIENTES DESNATURALIZANTES PARA LA DGGE DE LOS GENES *NIFH* Y *PHOD*

El quipo utilizado permite correr un número máximo de 20 calles en el mismo gel, por lo que no se pudieron correr todas las muestras juntas. Debido a esto, inicialmente se realizaron pruebas para determinar el gradiente de desnaturalización más apropiado para cada una de las muestras y, en base a resultados obtenidos durante la puesta a punto, se decidió agrupar las muestras en suelo y rizosfera (N=12) y las muestras de endosfera de raíz, fruto y tallo (N=18) para correrlas juntas en dos geles distintos con distintos gradientes (Figura 5.5.1a). La elección de los gradientes de desnaturalización se hizo en base a las observaciones de los productos de PCR y cuan abiertos se encontraban los perfiles de bandas obtenidos para cada una de las muestras.

Por otro lado, cabe destacar que la digitalización del gel y el posterior análisis bioinformático se realiza de forma individual para cada gel, no pudiendo agrupar dos geles distintos (ya que no arroja resultados confiables). Por ello no fue posible analizar todas las muestras de ambos establecimientos en conjunto para cada gen. Sin embargo, los distintos gradientes de desnaturalización empleados para correr cada grupo de muestras (suelo/rizosfera y endosferas) ya denotan que existen diferencias en los productos de PCR de los grupos. El NMDS resultante de la DGGE del gen *phoD* con un pool de muestras de distintos microhábitats y

establecimientos denota una clara separación entre muestras de suelo-rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto (Figura 5.1.3b)

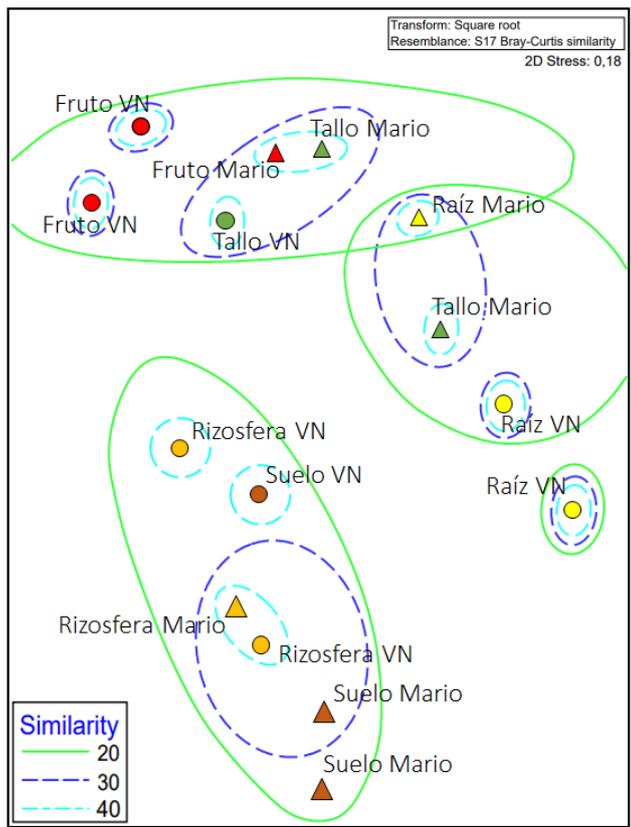


figura 5.5.1a Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) del análisis por DGGE del gen *phoD* para las muestras de suelo, rizosfera y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de dos establecimientos (VN: Viento Norte y Mario: Productor Mario) del CHP. Se utilizó la matriz de índices de similitud de Bray-Curtis, $\alpha=0,05$ y estrés $<0,1$.

5.5.2. DGGE DEL GEN *NIFH*

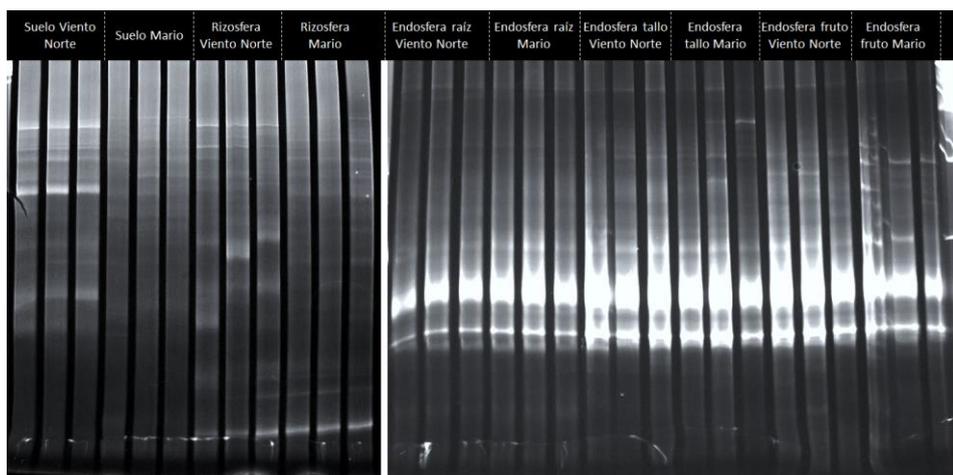


Figura 5.5.2a Fotografía de los gels de DGGE donde se corrieron los productos de PCR amplificados con los primers PolF1-PolR-GC.

Para cada uno de los índices de alfa-diversidad calculados (Riqueza (S), Shannon-Wiener(H) e Inversa de Simpson (1/D)) se realizó un análisis de la varianza para determinar diferencias entre las muestras y ambos establecimientos. Los resultados se presentan a continuación:

5.5.2.1 ANAVA del índice Riqueza (S)

Tabla 5.5.2a Análisis de varianza del índice Riqueza (S) del gen *nifH* calculado a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE. Variable: Riqueza (S); N=30; cv=13,8.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	19,2	4	4,8	2,32	0,092
Establecimiento	0,3	1	0,3	0,15	0,707
Muestra*Establecimiento	32,53	4	8,13	3,94	0,016
Error	41,33	20	2,07		
Total	93,37	29			

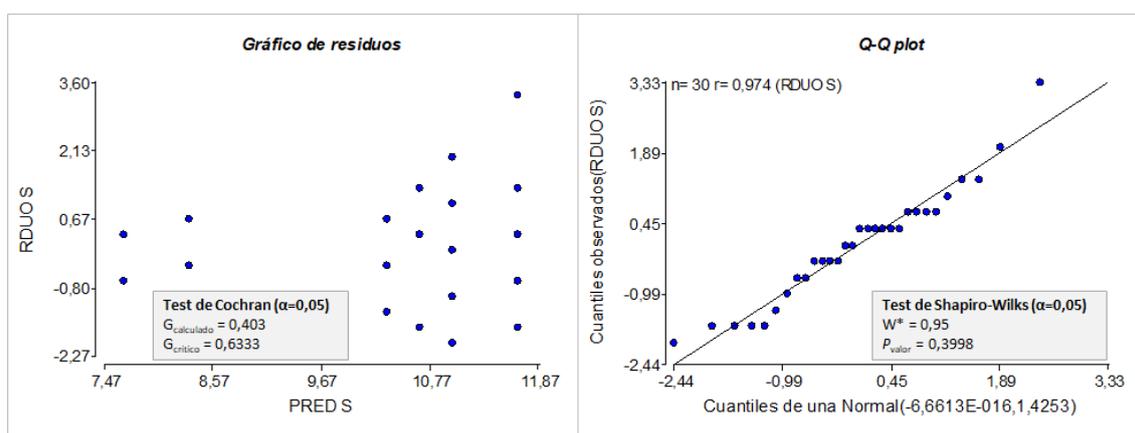


Figura 5.5.2b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

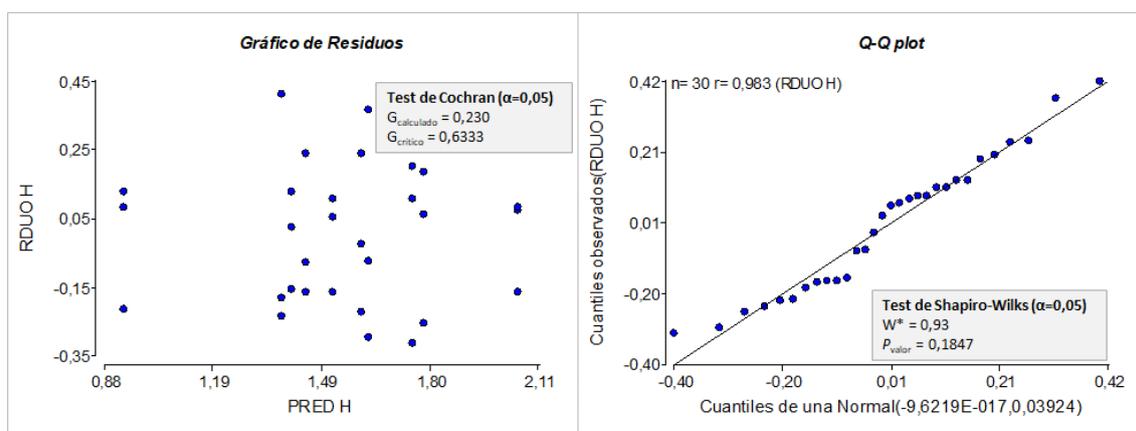
Tabla 5.5.2b Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Riqueza (S); $\alpha=0,05$; N=3; Diferencia mínima significativa=3,87. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	RIQUEZA (S)
Rizosfera	Viento Norte	11,67 a
Tallo	Productor Mario	11,67 a
Raíz	Productor Mario	11,67 a
Fruto	Viento Norte	11,00 ab
Tallo	Viento Norte	11,00 ab
Rizosfera	Productor Mario	10,67 ab
Fruto	Productor Mario	10,33 ab
Suelo	Viento Norte	10,33 ab
Suelo	Productor Mario	8,33 ab
Raíz	Viento Norte	7,67 b

5.5.2.2 ANAVA del índice Shannon-Wiener (H)

Tabla 5.5.2c Análisis de varianza del índice de Shannon-Wiener (H) del gen *nifH* calculado a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE. Variable: Shannon-Wiener (H); N=30; cv=15,4.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	1,44	4	0,36	6,32	<0,01
Establecimiento	0,55	1	0,55	9,6	<0,01
Muestra*Establecimiento	0,38	4	0,1	1,67	0,1956
Error	1,14	20	0,06		
Total	3,5	29			

**Figura 5.5.2c** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 5.5.2d** Comparación de medias del efecto principal de la Muestra mediante test de Tukey. Variable: Shannon-Wiener (H); $\alpha=0,05$; N=6; Diferencia mínima significativa=0,41. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	SHANNON-WIENER (H)
Rizosfera	1,9 a
Suelo	1,7 ab
Fruto	1,45 bc
Tallo	1,43 bc
Raíz	1,28 c

Tabla 5.5.2e Comparación de medias del efecto principal del establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Shannon-Wiener (H); $\alpha=0,05$; N=15; Diferencia mínima significativa=0,18. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ESTABLECIMIENTO	SHANNON-WIENER (H)
Productor Mario	1,69 a
Viento Norte	1,42 b

5.5.2.3 ANAVA del índice inversa de Simpson (1/D)

Tabla 5.5.2f Análisis de varianza del índice inversa de Simpson (1/D) del gen *nifH* calculado a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE. Variable: Inversa de Simpson (1/D); N=30; cv=27,3.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	24,25	4	6,06	5,22	<0,01
Establecimiento	11,28	1	11,28	9,71	<0,01
Muestra*Establecimiento	5,08	4	1,27	1,09	0,3868
Error	23,22	20	1,16		
Total	63,82	29			

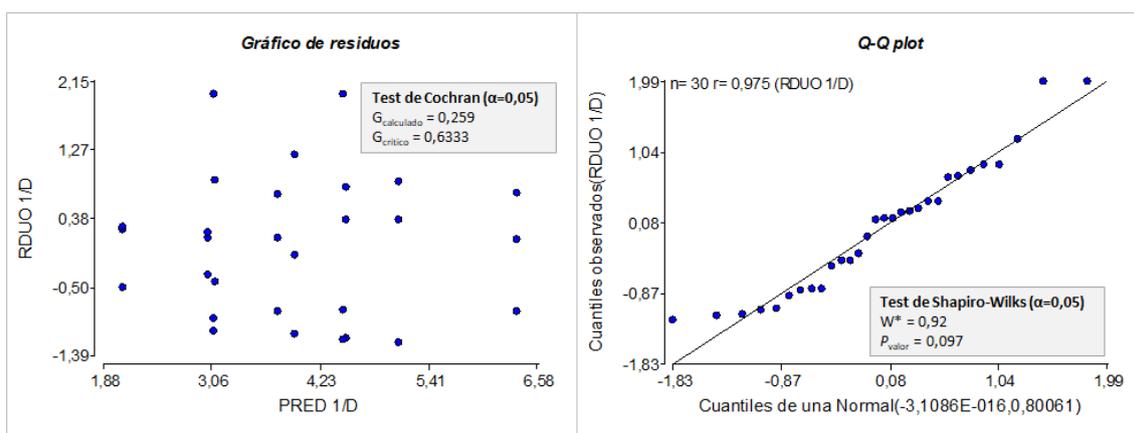


Figura 5.5.2d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.5.2g Comparación de medias del efecto principal de la Muestra mediante test de Tukey. Variable: Inversa de Simpson (1/D); α=0,05; N=6; Diferencia mínima significativa=1,86. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	INVERSA DE SIMPSON (1/D)
Rizosfera	5,44 a
Suelo	4,52 ab
Fruto	3,43 b
Raíz	3,29 b
Tallo	3,06 b

Tabla 5.5.2h Comparación de medias del efecto principal del establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Inversa de Simpson (1/D); α=0,05; N=15; Diferencia mínima significativa=0,18. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ESTABLECIMIENTO	INVERSA DE SIMPSON (1/D)
Productor Mario	4,56 a
Viento Norte	3,34 b

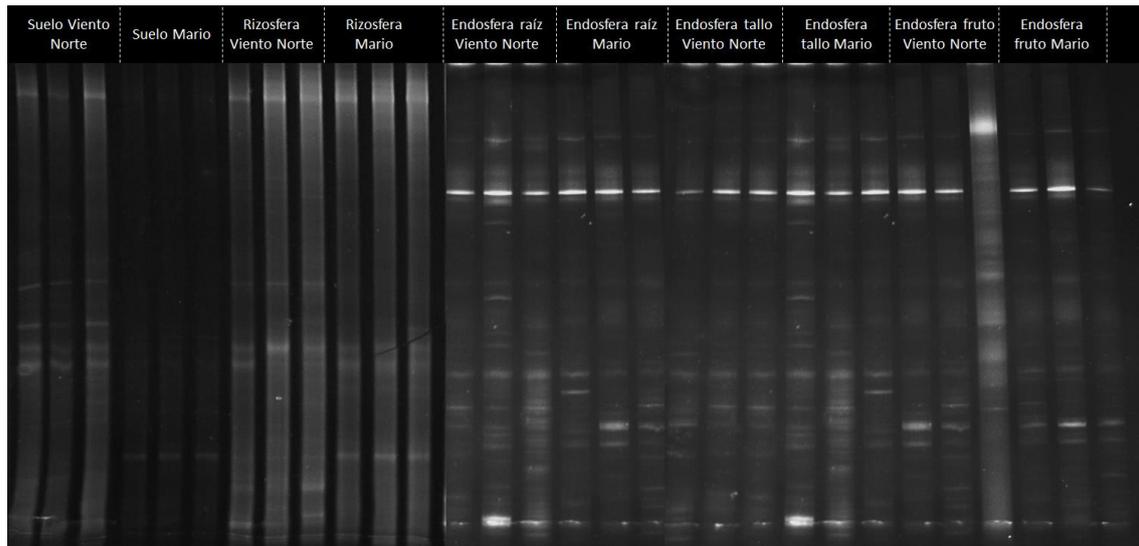
5.5.3. DGGE DEL GEN *PHOD*

Figura 5.5.3a Fotografía de los geles de DGGE donde se corrieron los productos de PCR del gen *phoD* amplificados con los primers ALPS-F730 y ALPS-R1101-GC.

Para cada uno de los índices de alfa-diversidad calculados (Riqueza (S), Shannon-Wiener(H) e Inversa de Simpson (1/D)) se realizó un análisis de la varianza para determinar diferencias entre las muestras y ambos establecimientos. Los resultados se presentan a continuación:

5.5.3.1 ANAVA del índice Riqueza (S)

Tabla 5.5.3a Análisis de varianza del índice Riqueza (S) del gen *phoD* calculado a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE. Variable: Riqueza (S); N=30; CV=17,3.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	340,87	4	85,22	16,6	<0,01
Establecimiento	45,63	1	45,63	8,89	<0,01
Muestra*Establecimiento	67,53	4	16,88	3,29	0,032
Error	102,67	20	5,13		
Total	556,7	29			

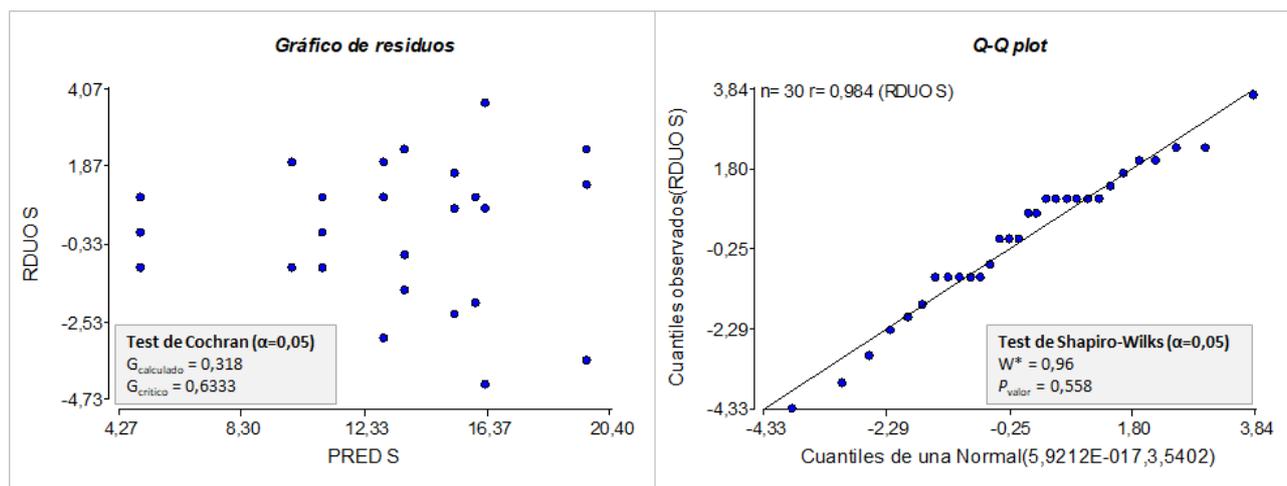


Figura 5.5.3b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.5.3b Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Riqueza (S); $\alpha=0,05$; $N=3$; Diferencia mínima significativa=6,5. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	RIQUEZA (S)
Raíz	Viento Norte	19,67 a
Tallo	Productor Mario	16,33 ab
Raíz	Productor Mario	16 ab
Rizosfera	Viento Norte	15,33 ab
Fruto	Viento Norte	13,67 ab
Tallo	Viento Norte	13 b
Fruto	Productor Mario	11 bc
Rizosfera	Productor Mario	11 bc
Suelo	Viento Norte	10 bc
Suelo	Productor Mario	5 c

5.5.3.2 ANAVA del índice Shannon-Wiener (H)

Tabla 5.5.3c Análisis de varianza del índice de Shannon-Wiener (H) del gen *phoD* calculado a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE. Variable: Shannon-Wiener (H); $N=30$; $CV=13,97$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	8,97	4	2,24	48,88	<0,01
Establecimiento	0,19	1	0,19	4,04	0,058
Muestra*Establecimiento	1,25	4	0,31	6,83	<0,01
Error	0,92	20	0,05		
Total	11,33	29			

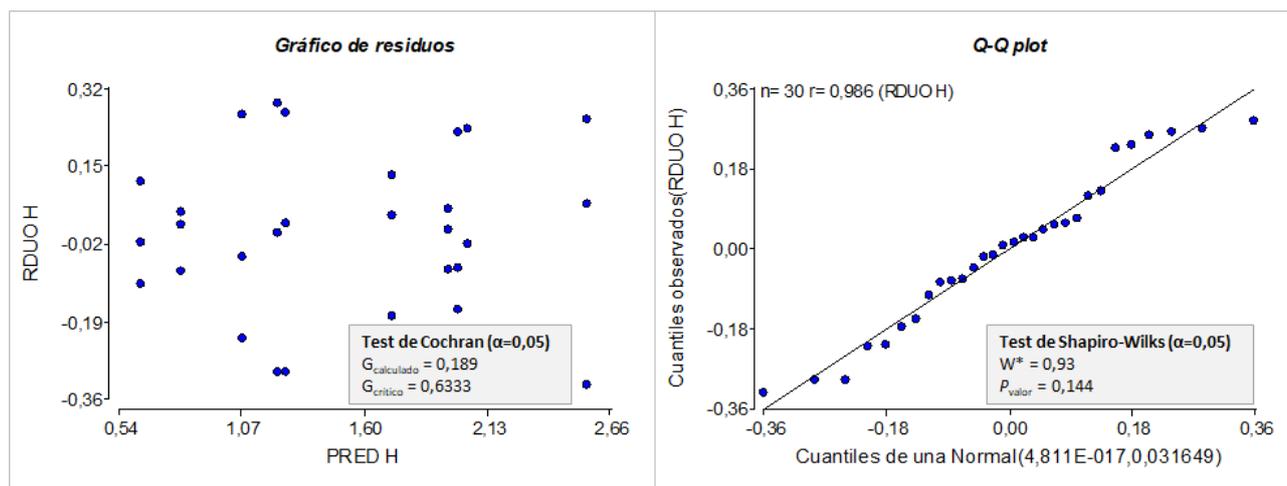


Figura 5.5.3c Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.5.3d Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Riqueza (S); $\alpha=0,05$; $N=3$; Diferencia mínima significativa=0,62. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	SHANNON-WIENER (H)
Raíz	Productor Mario	2,57 a
Rizosfera	Viento Norte	2,05 ab
Raíz	Viento Norte	2,01 ab
Suelo	Viento Norte	1,96 ab
Rizosfera	Productor Mario	1,73 bc
Suelo	Productor Mario	1,26 cd
Tallo	Viento Norte	1,23 cde
Tallo	Productor Mario	1,08 de
Fruto	Viento Norte	0,81 de
Fruto	Productor Mario	0,64 e

5.5.3.3 ANAVA del índice inversa de Simpson (1/D)

Tabla 5.5.3e Análisis de varianza del índice inversa de Simpson (1/D) del gen *phoD* calculado a partir del análisis bioinformático del gel de DGGE. Variable: Inversa de Simpson (1/D); $N=30$; $CV=16,04$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Muestra	66,06	4	16,52	38,3	<0,01
Establecimiento	6,31	1	6,31	14,63	<0,01
Muestra*Establecimiento	12,04	4	3,01	6,98	<0,01
Error	8,62	20	0,43		
Total	93,03	29			

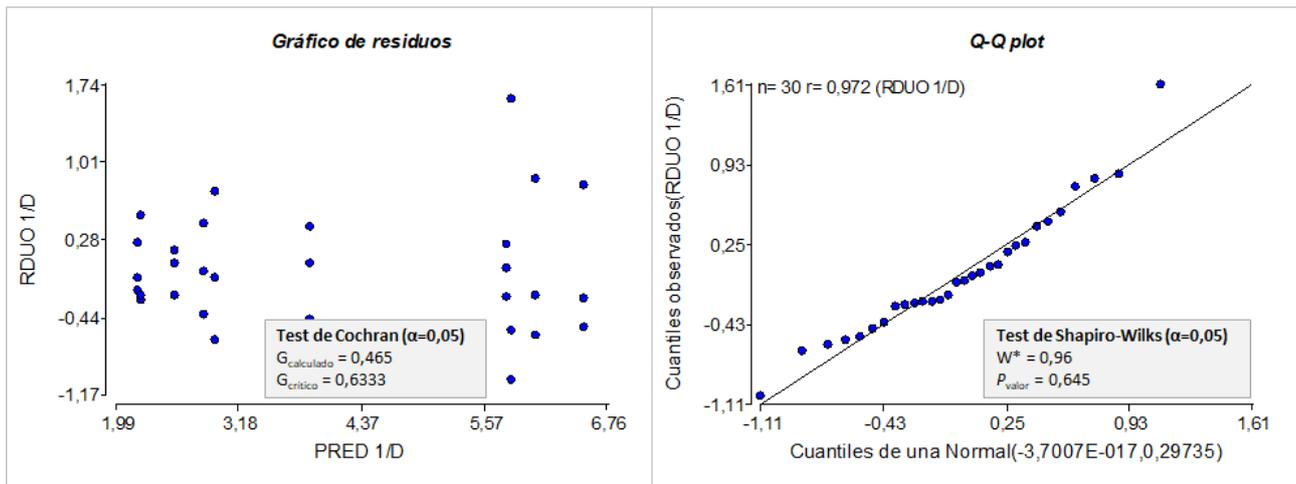


Figura 5.5.3d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 5.5.3f Comparación de medias de la interacción Muestra*Establecimiento mediante test de Tukey. Variable: Riqueza (S); $\alpha=0,05$; $N=3$; Diferencia mínima significativa=1,89. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	INVERSA DE SIMPSON (1/D)
Raíz	Productor Mario	6,55 a
Raíz	Viento Norte	6,07 a
Rizosfera	Viento Norte	5,84 a
Suelo	Viento Norte	5,8 a
Rizosfera	Productor Mario	3,88 b
Suelo	Productor Mario	2,96 b
Tallo	Viento Norte	2,85 b
Tallo	Productor Mario	2,57 b
Fruto	Productor Mario	2,23 b
Fruto	Viento Norte	2,2 b

CAPITULO 5: ANEXO B

Resultados y análisis estadísticos aplicados en los estudios descritos en el Capítulo 3

6.1 AISLAMIENTOS BACTERIANOS: RECUENTO POBLACIONAL Y CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

6.1.1 RECUENTO POBLACIONAL

En la [Tabla 6.1.1a](#) se detalla la cantidad de muestra procesadas para la obtención de aislamientos bacterianos de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate de ambos establecimientos hortícolas en estudio (Viento Norte y Productor Mario).

Tabla 6.1.1a Cantidad de muestra procesada y recuento de UFC g⁻¹ de las distintas muestras de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto.

MUESTRA	ESTABLECIMIENTO	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)	UFC g ⁻¹ peso seco	LOG UFC g ⁻¹ peso seco
Suelo	Viento Norte	10,0	7,23	1,01 x 10 ⁷	7,00
		10,0	7,39	1,16 x 10 ⁷	7,06
		10,0	7,37	1,44 x 10 ⁷	7,16
	Productor Mario	10,0	7,60	2,53 x 10 ⁷	7,40
		10,0	7,59	1,54 x 10 ⁷	7,19
		10,0	7,67	1,14 x 10 ⁷	7,06
Rizosfera	Viento Norte	3,0	2,06	8,29 x 10 ⁸	8,92
		3,0	2,02	8,52 x 10 ⁹	9,93
		3,0	1,93	2,82 x 10 ⁹	9,45
	Productor Mario	3,0	2,09	8,36 x 10 ⁹	9,92
		3,0	2,04	7,77 x 10 ⁹	9,89
		3,0	2,07	7,85 x 10 ⁹	9,89
Raíz	Viento Norte	4,3	0,43	3,71 x 10 ⁴	4,57
		5,4	0,54	2,43 x 10 ³	3,39
		5,8	0,58	2,33 x 10 ³	3,37
	Productor Mario	6,6	0,53	4,52 x 10 ³	3,65
		5,7	0,52	9,14 x 10 ³	3,96
		7,6	0,76	3,63 x 10 ³	3,56
Tallo	Viento Norte	13,2	1,31	3,78 x 10 ²	2,58
		17,3	1,59	4,98 x 10 ²	2,70
		15,1	1,39	2,95 x 10 ²	2,47
	Productor Mario	11,3	1,42	4,98 x 10 ²	2,70
		17,4	1,55	2,83 x 10 ²	2,45
		16,4	1,79	4,25 x 10	1,63
Fruto	Viento Norte	12,8	1,38	3,65	0,56
		7,4	0,70	4,27 x 10	1,63
		10,8	0,87	3,69 x 10	1,57
	Productor Mario	13,1	1,24	6,60	0,82
		10,8	0,73	4,64	0,67
		13,1	0,71	7,88	0,90

6.1.1.1 Análisis estadístico de las poblaciones bacterianas ($UFC\ g^{-1}$)

Tabla 6.1.1b Análisis de varianza del Log. de $UFC\ g^{-1}$ de las distintas muestras de suelo, rizosfera, y endosfera de raíz, tallo y fruto de plantas de tomate crecida en dos establecimientos del CHP. Variable: Log. de $UFC\ g^{-1}$; $\alpha=0,05$; Transformación: Logarítmica; Tratamientos: 10; $r=3$; $N=30$; $CV=8,1$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Microhábitat	301,16	4	75,29	498,85	<0,01
Establecimiento	0,01	1	0,01	0,1	0,7561
Microhábitat. * Establec.	0,82	4	0,2	1,35	0,2856
Error	3,02	20	0,15		
Total	305,01	29			

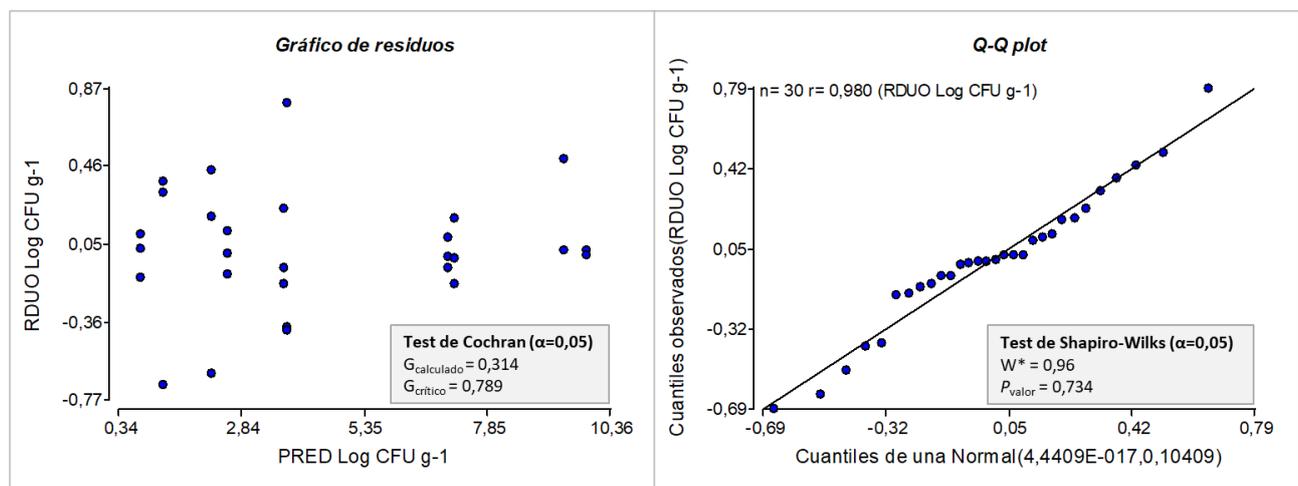


Figura 6.1.1a Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.1.1c Comparación de medias del factor Microhábitat mediante test de Tukey. Variable: Log. de $UFC\ g^{-1}$; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 5; $r=6$ para todos los niveles. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).

MICROHÁBITAT	LOG. UFC g^{-1}
Rizosfera	9,67 a
Suelo	7,15 b
Raíz	3,75 c
Tallo	2,42 d
Fruto	1,03 d

6.1.2 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA DE AISLAMIENTOS ENDÓFITOS

Tabla 6.1.2a Resultado de la asignación taxonómica de los diferentes aislamientos bacterianos de la colección, indicando largo de secuencia, género y especie, porcentaje de identidad y número de acceso del mejor resultado del alineamiento con la base de datos del NCBI.

Muestra	Largo de Secuencia	Género	Especie	% de identidad	N° acceso (NCBI)
RhI 5	754	<i>Pseudomonas</i>	<i>brassicacearum</i>	100,00%	MT533925.1
RhI 25	665	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	99,85%	MT192475.1
RhI 28	860	<i>Brevibacterium</i>	<i>anseongense</i>	99,88%	NR_165697.1
RhM 5	560	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	99,64%	MT192475.1
RhM 11	891	<i>Pseudomonas</i>	<i>guariconensis</i>	98,88%	MT293652.1
RhM 20	879	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	99,54%	HM152698.1
RhM 21	692	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
RhM 23	664	<i>Pseudomonas</i>	<i>brassicacearum</i>	100,00%	MT533925.1
RhM 40	812	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	OQ231521.1
RhM 47	652	<i>Peribacillus</i>	<i>frigoritolerans</i>	100,00%	OQ186650.1
RI 1	575	<i>Priestia</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	OQ217022.1
RI 2	856	<i>Bacillus</i>	<i>solisilvae</i>	99,88%	MK226324.1
RI 3	792	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MK514989.1
RI 4	738	<i>Pseudomonas</i>	<i>alcaliphila</i>	98,91%	MH127731.1
RI 5	783	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MK318254.1
RI 6	847	<i>Pseudomonas</i>	<i>brassicacearum</i>	100,00%	MK417830.1
RI 7	845	<i>Pseudomonas</i>	<i>alcaliphila</i>	99,88%	LC333758.1
RI 8	644	<i>Microbacterium</i>	<i>zeae</i>	100,00%	MT409535.1
RI 9	815	<i>Brachybacterium</i>	<i>rhamnosum</i>	99,51%	KT714130.1
RI 10	847	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	99,88%	KT222849.1
RI 11	968	<i>Peribacillus</i>	<i>simplex</i>	100,00%	OP941662.1
RI 12	666	<i>Microbacterium</i>	<i>zeae</i>	99,40%	MT409535.1
RI 13	846	<i>Peribacillus</i>	<i>simplex</i>	100,00%	OP941662.1
RI 14	989	<i>Sphingomonas</i>	<i>phyllosphaerae</i>	99,80%	NR_029111.1
RI 15	964	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MT487598.1
RI 16	859	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MT487598.1
RI 17	790	<i>Agrobacterium</i>	<i>larrymoorei</i>	100,00%	MT409553.1
RI 18	847	<i>Bacillus</i>	<i>aryabhatai</i>	100,00%	MT102987.1
RI 19	846	<i>Priestia</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	OQ217022.1
RI 20	871	<i>Microbacterium</i>	<i>oleivorans</i>	97,39%	MT487599.1
RI 21	965	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MK318254.1
RI 24	933	<i>Microbacterium</i>	<i>hydrocarbonoxydans</i>	99,89%	KC934825.1
RI 25	765	<i>Luteibacter</i>	<i>rhizovicinus</i>	100,00%	MN181092.1
RI 26	859	<i>Dyella</i>	<i>yeojuensis</i>	100,00%	FN796854.1
RI 27	933	<i>Microbacterium</i>	<i>testaceum</i>	99,89%	MT367847.1
RI 29	846	<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>	99,76%	MT078675.1
RI 30	765	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MT487598.1
RI 31	994	<i>Priestia</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	OQ130677.1
RI 32	1070	<i>Pseudomonas</i>	<i>brassicacearum</i>	100,00%	MT533925.1
RI 33	953	<i>Rhizobium</i>	<i>pusense</i>	99,90%	MK993456.1

Tabla 6.1.2a (continuación) Resultado de la asignación taxonómica de los diferentes aislamientos bacterianos de la colección, indicando largo de secuencia, género y especie, porcentaje de identidad y número de acceso del mejor resultado del alineamiento con la base de datos del NCBI.

<i>Muestra</i>	<i>Largo de Secuencia</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>% de identidad</i>	<i>N° acceso (NCBI)</i>
RI 34	849	<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>	100,00%	MN826155.1
RI 35	809	<i>Fictibacillus</i>	<i>enclensis</i>	99,38%	MK519114.1
RI 36	821	<i>Arthrobacter</i>	<i>globiformis</i>	99,88%	HG941738.1
RI 37	823	<i>Curtobacterium</i>	<i>Flaccumfaciens</i>	100,00%	MT323132.1
RI 38	830	<i>Arthrobacter</i>	<i>aureescens</i>	100,00%	JF700433.1
RI 40	871	<i>Microbacterium</i>	<i>oleivorans</i>	99,31%	MT487599.1
RI 41	824	<i>Arthrobacter</i>	<i>aureescens</i>	100,00%	JF700433.1
RI 42	861	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MT605432.1
RI 43	839	<i>Janibacter</i>	<i>melonis</i>	99,88%	KR085938.1
RI 45	510	<i>Priestia</i>	<i>megaterium</i>	99,02%	CP065213.1
RI 47	823	<i>Microbacterium</i>	<i>oleivorans</i>	100,00%	KR186187.1
RI 48	774	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	99,35%	MT487598.1
RI 51	821	<i>Pseudoarthrobacter</i>	<i>scleromae</i>	100,00%	ON693727.1
RI 52	846	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	99,76%	MT487598.1
RI 53	834	<i>Janibacter</i>	<i>melonis</i>	100,00%	KF424704.1
RM 1	651	<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>	97,08%	KM434254.1
RM 2	765	<i>Chryseobacterium</i>	<i>nepalense</i>	98,95%	MK123412.1
RM 3	768	<i>Pseudomonas</i>	<i>mediterranea</i>	99,48%	MN826143.1
RM 4	762	<i>Pseudomonas</i>	<i>gessardii</i>	97,52%	MT520143.1
RM 5	642	<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>	98,44%	KM434254.1
RM 6	833	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	99,88%	MT487598.1
RM 7	656	<i>Chryseobacterium</i>	<i>nepalense</i>	90,23%	MK829504.1
RM 13	571	<i>Luteibacter</i>	<i>rhizovicinus</i>	100,00%	MT158527.1
RM 16	815	<i>Microbacterium</i>	<i>arthrosphaerae</i>	99,75%	KY292472.1
RM 17	754	<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>	99,73%	KM434254.1
TI 1	851	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	100,00%	MN704544.1
TI 2	824	<i>Microbacterium</i>	<i>paraoxydans</i>	99,88%	MT793577.1
TI 3	830	<i>Curtobacterium</i>	<i>citreum</i>	99,88%	MK934434.1
TI 4	783	<i>Lysobacter</i>	<i>enzymogenes</i>	100,00%	KT851480.1
TI 5	602	<i>Enterobacter</i>	<i>hormaechei</i>	100,00%	OQ164623.1
TI 6	775	<i>Curtobacterium</i>	<i>luteum</i>	100,00%	MT367812.1
TI 7	844	<i>Pseudomonas</i>	<i>koreensis</i>	99,88%	MH725617.1
TI 8	835	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
TI 9	822	<i>Microbacterium</i>	<i>hydrocarbonoxydans</i>	99,88%	KC934825.1
TI 10	844	<i>Pseudomonas</i>	<i>koreensis</i>	99,88%	MH725617.1
TI 11	1013	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
TI 12	658	<i>Curtobacterium</i>	<i>luteum</i>	100,00%	MT367812.1
TI 13	813	<i>Curtobacterium</i>	<i>Flaccumfaciens</i>	100,00%	MN826580.1
TI 14	826	<i>Brachybacterium</i>	<i>phenoliresistens</i>	100,00%	OM665407.1
TI 15	432	<i>Pseudomonas</i>	<i>guariconensis</i>	100,00%	MT293652.1

Tabla 6.1.2a (continuación) Resultado de la asignación taxonómica de los diferentes aislamientos bacterianos de la colección, indicando largo de secuencia, género y especie, porcentaje de identidad y número de acceso del mejor resultado del alineamiento con la base de datos del NCBI.

<i>Muestra</i>	<i>Largo de Secuencia</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>% de identidad</i>	<i>N° acceso (NCBI)</i>
TI 17	290	<i>Pantoea</i>	<i>vagans</i>	98,97%	MT367794.1
TI 19	836	<i>Chryseobacterium</i>	<i>phosphatilyticum</i>	99,76%	NR_171432.1
TI 21	860	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	100,00%	MT605412.1
TI 23	660	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
TI 24	689	<i>Microbacterium</i>	<i>paraoxydans</i>	100,00%	MT605416.1
TI 25	845	<i>Ensifer</i>	<i>adhaerens</i>	91,37%	MT160396.1
TI 26	860	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	100,00%	MT605412.1
TI 28	532	<i>Pseudomonas</i>	<i>ceruminis</i>	100,00%	MT498800.1
TI 31	844	<i>Pantoea</i>	<i>dispersa</i>	100,00%	MN833539.1
TI 32	829	<i>Chryseobacterium</i>	<i>indoltheticum</i>	99,15%	KF730745.1
TI 33	442	<i>Pseudomonas</i>	<i>plecoglossicida</i>	99,55%	KC431802.1
TM 1	662	<i>Curtobacterium</i>	<i>luteum</i>	99,40%	MT367812.1
TM 2	790	<i>Curtobacterium</i>	<i>pusillum</i>	99,75%	MT487611.1
TM 3	722	<i>Curtobacterium</i>	<i>Flaccumfaciens</i>	99,59%	CP041259.1
TM 4	602	<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>	99,00%	CP043397.1
TM 5	732	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	100,00%	KY014981.1
TM 6	797	<i>Curtobacterium</i>	<i>citreum</i>	98,24%	MK934434.1
TM 7	223	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
TM 8	792	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	100,00%	MG755778.1
TM 9	787	<i>Curtobacterium</i>	<i>pusillum</i>	99,62%	MT487611.1
TM 10	847	<i>Bacillus</i>	<i>acidiceler</i>	99,05%	MN543770.1
TM 11	463	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	97,30%	MK207435.1
TM 12	652	<i>Brachybacterium</i>	<i>phenoliresistens</i>	100,00%	MT434776.1
TM 13	585	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
TM 14	500	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
TM 16	917	<i>Flavobacterium</i>	<i>anhuiense</i>	100,00%	MK993467.1
TM 17	494	<i>Enterobacter</i>	<i>ludwigii</i>	99,39%	MT367806.1
TM 19	537	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	100,00%	MT192475.1
TM 20	571	<i>Luteibacter</i>	<i>rhizovicinus</i>	96,54%	MT158527.1
TM 21	828	<i>Brachybacterium</i>	<i>ginsengisoli</i>	97,84%	MZ452383.1
TM 22	667	<i>Microbacterium</i>	<i>testaceum</i>	100,00%	MT367847.1
TM 23	860	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	99,77%	MT605300.1
TM 25	508	<i>Microbacterium</i>	<i>testaceum</i>	100,00%	MK883192.1
TM 26	664	<i>Pseudoarthrobacter</i>	<i>siccitolerans</i>	99,70%	MT640311.1
TM 27	171	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	99,42%	OP891022.1
TM 28	834	<i>Brevibacterium</i>	<i>aureum</i>	99,01%	KM273868.1
TM 30	859	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	100,00%	MT605412.1
TM 31	924	<i>Enterobacter</i>	<i>hormaechei</i>	100,00%	MG372001.1
TM 33	602	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	99,67%	KJ210327.1
TM 34	786	<i>Curtobacterium</i>	<i>pusillum</i>	99,11%	MN006541.1

Tabla 6.1.2a (continuación) Resultado de la asignación taxonómica de los diferentes aislamientos bacterianos de la colección, indicando largo de secuencia, género y especie, porcentaje de identidad y número de acceso del mejor resultado del alineamiento con la base de datos del NCBI.

Muestra	Largo de Secuencia	Género	Especie	% de identidad	N° acceso (NCBI)
TM 35	852	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	100,00%	MG705751.1
TM 36	861	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	99,88%	MT605412.1
TM 38	827	<i>Paenarthrobacter</i>	<i>ureafaciens</i>	100,00%	MH385000.1
TM 39	850	<i>Bacillus</i>	<i>altitudinis</i>	100,00%	MH041215.1
TM 40	829	<i>Chryseobacterium</i>	<i>proteolyticum</i>	99,52%	AB039830.2
TM 42	636	<i>Paenibacillus</i>	<i>polimyxa</i>	99,84%	KR109256.1
TM 43	439	<i>Arthrobacter</i>	<i>sp.</i>	79,83%	LR536345.1
TM 44	588	<i>Luteibacter</i>	<i>rhizovicinus</i>	9701,00%	MT158527.1
TM 46	692	<i>Microbacterium</i>	<i>phyllosphaerae</i>	99,13%	MT533897.1
TM 47	793	<i>Curtobacterium</i>	<i>pusillum</i>	97,73%	MT487611.1
TM 48	840	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	99,40%	MK156164.1
FI 1	654	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	99,69%	MT507079.1
FI 2	791	<i>Curtobacterium</i>	<i>Flaccumfaciens</i>	99,62%	CP041259.1
FI 3	804	<i>Bacillus</i>	<i>aryabhattai</i>	99,88%	MT184818.1
FI 4	661	<i>Serratia</i>	<i>rhizosphaerae</i>	98,34%	CP041764.1
FI 5	690	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	99,57%	MT507079.1
FI 6	783	<i>Curtobacterium</i>	<i>pusillum</i>	100,00%	MT487611.1
FI 9	848	<i>Kluyvera</i>	<i>sp.</i>	99,18%	MH465499.1
FI 10	790	<i>Pectobacterium</i>	<i>carotovorum</i>	98,61%	FJ906788.1
FI 11	799	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>funkei</i>	99,12%	MT527528.1
FI 12	747	<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	98,93%	MK999934.1
FI 13	558	<i>Pantoea</i>	<i>sp.</i>	98,21%	JN853256.1
FI 14	492	<i>Pantoea</i>	<i>sp.</i>	98,17%	JN853256.1
FI 15	718	<i>Bacillus</i>	<i>muralis</i>	96,17%	MT043737.1
FI 17	791	<i>Phyllobacterium</i>	<i>ifriqiyense</i>	99,62%	MK475012.1
FI 18	759	<i>Curtobacterium</i>	<i>Flaccumfaciens</i>	99,60%	CP041259.1
FM 1	730	<i>Pantoea</i>	<i>sp.</i>	100,00%	JN853251.1
FM 2	838	<i>Chryseobacterium</i>	<i>sp.</i>	98,81%	MH769285.1
FM 3	663	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	100,00%	KJ865603.1
FM 4	861	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	100,00%	MT605432.1
FM 5	845	<i>Pseudomonas</i>	<i>koreensis</i>	100,00%	MT409531.1
FM 6	850	<i>Xhantomonas</i>	<i>campestris</i>	100,00%	MN565570.1
FM 7	730	<i>Pantoea</i>	<i>sp.</i>	98,50%	JN853251.1
FM 8	853	<i>Chryseobacterium</i>	<i>sp.</i>	99,18%	MH769285.1
FM 9	744	<i>Chryseobacterium</i>	<i>sp.</i>	98,66%	MH769285.1
FM 10	791	<i>Curtobacterium</i>	<i>Flaccumfaciens</i>	99,87%	CP041259.1
FM 13	716	<i>Enterobacter</i>	<i>ludwigii</i>	100,00%	OQ223404.1
FM 14	839	<i>Pantoea</i>	<i>dispersa</i>	99,88%	MZ798462.1
FM 15	813	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	100,00%	MN889399.1
FM 16	829	<i>Curtobacterium</i>	<i>Flaccumfaciens</i>	99,88%	OP684136.1

6.2 CARACTERIZACIÓN RELACIONADA A LA COLONIZACIÓN VEGETAL Y LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA *IN VITRO*

6.2.1 RESUMEN DE ÍNDICES

Tabla 6.2.1a Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA											
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB
SI 1		-	+	0,5	++	0,50	+	-	+	-	0,50	0	0	0,3	0	0,30	0,55	0,53
SI 2		-	-	0,0		0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
SI 3		+	NC	1,0	-	0,50	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25
SI 4		-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13
SI 5		-	NC	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25
SI 6		-	NC	0,0	++	0,25	-	-	+	-	0,25	0,46	0,32	0,46	0,38	0,41	0,53	0,39
SI 7		-	NC	0,0	++	0,25	-	NC	-	-	0,00	0	0,26	0	0	0,26	0,26	0,26
SI 8		-	NC	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25
SI 9		+	+	1,0	+++	0,50	-	NC	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25
SI 10		-	NC	0,0	++	0,25	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,19
SI 11		-	NC	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
SI 12		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
SM 1		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
SM 2		+	-	0,5	+	0,38	+	-	+	+	0,75	0,44	0,28	0,26	0,28	0,32	0,69	0,53
SM 3		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
SM 4		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
SM 5		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
SM 6		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
SM 8		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
SM 9		-	-	0,0	-	0,00	-	NC	+	+	0,67	0	0	0	0	0,00	0,33	0,17

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamientos	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA											
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB
SM 10		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
SM 11		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
SM 12		+	-	0,5	-	0,25	-	-	+	NC	0,33	0	0	0	0	0,00	0,17	0,21
Rhl 1	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	NC	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 2		-	NC	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 3		-	NC	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 4		-	NC	0,0	+++	0,38	-	NC	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,19
Rhl 5		+	-	0,5	-	0,25	-	+	-	+	0,50	0,82	0	0,44	0,36	0,54	0,79	0,52
Rhl 6		-	-	0,0	+++	0,38	-	NC	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,19
Rhl 7		-	NC	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Rhl 8		-	-	0,0	++	0,25	-	-	+	+	0,50	0,3	0,34	0	0	0,32	0,57	0,41
Rhl 9		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
Rhl 10		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
Rhl 11		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
Rhl 12		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 13		+	+	1,0	+	0,63	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,38
Rhl 14		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
Rhl 16		-	-	0,0	+	0,13	+	-	-	NC	0,33	0	0	0	0	0,00	0,17	0,15
Rhl 17		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Rhl 18		-	NC	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,19

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA											
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB
Rhl 19	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
Rhl 20		-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,19
Rhl 21		-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13
Rhl 22		+	+	1,0	+++	0,88	+	-	+	-	0,50	0,48	0,3	0,34	0,44	0,39	0,64	0,76
Rhl 23		+	+	1,0	+	0,63	+	-	+	-	0,50	0	0	0	0	0,00	0,25	0,44
Rhl 24		-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,19
Rhl 25		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 27		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
Rhl 28		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 29		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 30		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
Rhl 31		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
Rhl 33		-	-	0,0	-	0,00	-	NC	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Rhl 34		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Rhl 35		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,36	0,36	0,36	0,24
RhM 1	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	NC	0,00	0,28	0	0	0	0,28	0,28	0,14	
RhM 2	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0,2	0	0	0	0,20	0,20	0,16	
RhM 3	+	-	0,5	-	0,25	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
RhM 4	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0,32	0	0,32	0,32	0,35	
RhM 5	-	-	0,5	-	0,25	-	-	-	+	0,25	0,3	0	0	0	0,30	0,43	0,34	

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA												
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB	
RhM 6	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0,34	0	0	0	0,34	0,34	0,17	
RhM 7		-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13	
RhM 8		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0,24	0	0	0	0,24	0,24	0,18	
RhM 9		-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0,36	0,2	0	0	0,28	0,28	0,33	
RhM 11		-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0,2	0	0	0	0,20	0,20	0,29	
RhM 10		+	+	1,0	+	0,63	+	NC	+	+	1,00	0,38	0,24	0,44	0,28	0,34	0,84	0,73	
RhM 12		+	+	1,0	++	0,75	+	-	+	-	0,50	0,3	0	0	0	0,30	0,55	0,65	
RhM 13		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
RhM 14		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0,26	0	0,26	0,26	0,13	
RhM 15		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
RhM 16		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0,22	0	0,22	0,22	0,24	
RhM 17		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
RhM 18		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,19	
RhM 19		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
RhM 20		NC	+	1,0	++++	1,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,50	
RhM 21		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0,32	0	0	0	0,32	0,32	0,29	
RhM 22		-	-	0,0	++	0,25	+	NC	-	NC	0,50	0	0	0,24	0	0,24	0,49	0,37	
RhM 23		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
RhM 24		-	+	0,5	++	0,50	-	+	+	+	0,75	0,34	0,24	0	0	0,29	0,67	0,58	
RhM 25		-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,19	

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA											
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB
RhM 26	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
RhM 27		-	-	0,0	-	0,00	-	NC	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
RhM 28		+	-	0,5	-	0,25	+	-	-	+	0,50	0	0	0	0	0,00	0,25	0,25
RhM 29		-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
RhM 30		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
RhM 31		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
RhM 32		+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,31
RhM 33		+	-	0,5	++++	0,75	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,44
RhM 34		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13
RhM 35		-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,19
RhM 36		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06
RhM 37		-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25
RhM 38		+	+	1,0	++++	1,00	+	-	+	+	0,75	0,44	0,28	0,44	0,5	0,42	0,79	0,90
RhM 39		-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	+	0,25	0,32	0,38	0	0	0,35	0,48	0,49
RhM 40		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
RhM 41		-	-	0,0	+	0,13	-	NC	-	+	0,33	0	0	0	0	0,00	0,17	0,15
RhM 42		-	-	0,0	++	0,25	-	NC	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
RhM 43		-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,25
RhM 44		-	-	0,0	++	0,25	-	NC	-	+	0,33	0	0	0	0	0,00	0,17	0,21
RhM 45		-	-	0,0	+	0,13	-	NC	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA												
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB	
RhM 46	<i>Peribacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	+	-	+	0,50	0,24	0	0	0	0,24	0,49	0,31	
RhM 47		-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25	
RhM 48		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
RhM 49		-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25	
RhM 50		-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
RhM 51		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
RhM 52		-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0,3	0	0,32	0,26	0,29	0,29	0,27	
RhM 53		-	-	0,0	++	0,25	-	-	+	NC	0,33	0	0	0	0	0,00	0,17	0,21	
RhM 54		<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	NC	0,33	0	0	0	0,00	0,17	0,15	
RI 1	<i>Priestia</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	+	-	0,25	0,36	0	0,32	0	0,34	0,47	0,48	
RI 2	<i>Bacillus</i>	-	NC	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,06		
RI 3	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0,00	0,13	0,31		
RI 4	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	-	0,00	+	-	+	-	0,50	0,28	0	0	0	0,28	0,53	0,27	
RI 5	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,00		
RI 6	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0,3	0	0	0	0,30	0,43	0,28	
RI 7	<i>Pseudomonas</i>	-	NC	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,00		
RI 8	<i>Microbacterium</i>	-	NC	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,19		
RI 9	<i>Brachyacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	+	0,50	0	0	0	0,00	0,25	0,19		
RI 10	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0,00	0,13	0,25		
RI 11	<i>Peribacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0,36	0	0	0,36	0,49	0,31	

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA											
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB
RI 12	<i>Microbacterium</i>	+	-	0,5	+++	0,63	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,31
RI 13	<i>Peribacillus</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,31
RI 14	<i>Sphingomonas</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
RI 15	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	+	-	+	-	0,50	0	0	0	0	0,00	0,25	0,19
RI 16	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13
RI 17	<i>Agrobacterium</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25
RI 18	<i>Bacillus</i>	-	+	0,5	+++	0,63	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,38
RI 19	<i>Priestia</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,25
RI 20	<i>Microbacterium</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25
RI 21	<i>Bacillus</i>	-	+	0,5	+++	0,63	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,38
RI 24	<i>Microbacterium</i>	+	-	0,5	+++	0,63	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,31
RI 25	<i>Luteibacter</i>	+	-	0,5	+++	0,63	+	+	-	-	0,50	0,34	0	0	0	0,34	0,59	0,61
RI 26	<i>Dyella</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	+	+	-	0,50	0,34	0	0	0	0,34	0,59	0,48
RI 27	<i>Microbacterium</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,25
RI 29	<i>Bacillus</i>	-	NC	0,0	++++	0,50	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,31
RI 30	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0,4	0	0,40	0,53	0,33
RI 31	<i>Priestia</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13
RI 32	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	++	0,25	+	-	+	-	0,50	0	0	0	0	0,00	0,25	0,25
RI 33	<i>Rhizobium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0,28	0	0	0	0,28	0,28	0,20
RI 34	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA												
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB	
RI 35	<i>Fictibacillus</i>	+	-	0,5	-	0,25	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,19	
RI 36	<i>Arthrobacter</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
RI 37	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,19	
RI 38	<i>Arthrobacter</i>	+	-	0,5	-	0,25	+	+	-	-	0,50	0,32	0	0	0	0,32	0,57	0,41	
RI 40	<i>Microbacterium</i>	-	NC	0,0	-	0,00	NC	-	+	-	0,33	0	0	0	0	0,00	0,17	0,08	
RI 41	<i>Arthrobacter</i>	NC	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
RI 42	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
RI 43	<i>Janibacter</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13	
RI 45	<i>Priestia</i>	-	-	0,0	+	0,13	+	-	-	+	0,50	0,24	0	0,24	0	0,24	0,49	0,31	
RI 47	<i>Microbacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
RI 48	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0,24	0	0,24	0	0,24	0,24	0,18	
RI 51	<i>Pseudoarthrobacter</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0,3	0	0	0	0,30	0,30	0,28	
RI 52	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0,22	0	0,24	0	0,23	0,23	0,12	
RI 53	<i>Janibacter</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
RM 1	<i>Bacillus</i>	+	-	0,5	++++	0,75	-	NC	+	+	0,67	0,58	0,28	0,64	0	0,50	0,83	0,79	
RM 2	<i>Chryseobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13	
RM 3	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	+	0,25	0,44	0,44	0,52	0,44	0,46	0,59	0,36	
RM 4	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	+	0,25	0,38	0,36	0,52	0,3	0,39	0,52	0,32	
RM 5	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0,44	0,42	0,52	0,32	0,43	0,55	0,34	
RM 6	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0,42	0,38	0,46	0,44	0,43	0,55	0,34	

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA												
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB	
RM 7	<i>Chryseobacterium</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	+	-	-	0,25	0,6	0,4	0,5	0,36	0,47	0,59	0,42	
RM 13	<i>Luteibacter</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	+	-	-	0,25	0,46	0	0,36	0	0,41	0,54	0,33	
RM 16	<i>Microbacterium</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	NC	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,25		
RM 17	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	+	0,25	0	0	0,36	0	0,36	0,49	0,43	
TI 1	<i>Bacillus</i>	-	+	0,5	+	0,38	+	-	-	-	0,25	0,64	0,24	0	0,4	0,43	0,55	0,46	
TI 2	<i>Microbacterium</i>	NC	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,31	
TI 3	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	+	-	+	0,50	0	0	0	0	0,00	0,25	0,38	
TI 4	<i>Lysobacter</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	+	+	0,50	0	0	0	0	0,00	0,25	0,13	
TI 5	<i>Enterobacter</i>	NC	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
TI 6	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,19	
TI 7	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,25	
TI 8	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,06	
TI 9	<i>Microbacterium</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25	
TI 10	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,25	
TI 11	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
TI 12	<i>Curtobacterium</i>	NC	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0,36	0	0	0	0,36	0,36	0,24	
TI 13	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
TI 14	<i>Brachybacterium</i>	+	NC	1,0	+	0,63	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,31	
TI 15	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
TI 17	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0,62	0,3	0,74	0,44	0,53	0,53	0,33	

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA												
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR ^{Aa}	PICR ^{Bc}	PICR ^{Fo}	PICR ^{Ss}	PICR ^{prom}	IPA	IPB	
TI 19	<i>Chryseobacterium</i>	-	+	0,5	-	0,25	+	-	+	-	0,50	0	0	0	0,2	0,20	0,45	0,35	
TI 21	<i>Bacillus</i>	-	+	0,5	+++	0,63	+	-	-	-	0,25	0,7	0,32	0,78	0	0,60	0,73	0,68	
TI 23	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
TI 24	<i>Microbacterium</i>	NC	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
TI 25	<i>Ensifer</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25	
TI 26	<i>Bacillus</i>	-	+	0,5	++++	0,75	+	-	-	-	0,25	0,72	0,28	0,72	0,48	0,55	0,68	0,71	
TI 28	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,25	
TI 31	<i>Pantoea</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
TI 32	<i>Chryseobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	+	-	-	-	0,25	0	0	0,28	0	0,28	0,41	0,27	
TI 33	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	+	-	-	0,25	0,3	0	0,3	0,2	0,27	0,39	0,26	
TM 1	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,31	
TM 2	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	+	-	0,25	0	0	0,46	0	0,46	0,59	0,48	
TM 3	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
TM 4	<i>Leclercia</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
TM 5	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0,58	0	0,64	0	0,61	0,61	0,56	
TM 6	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
TM 7	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
TM 8	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13	
TM 9	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,13	
TM 10	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0,34	0	0,34	0	0,34	0,47	0,30	

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA												
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB	
TM 11	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0,00	0,13	0,13		
TM 12	<i>Brachy bacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	-	0,25	0,4	0	0	0,40	0,53	0,33		
TM 13	<i>Pseudomonas</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,25		
TM 14	<i>Pseudomonas</i>	+	-	0,5	++++	0,75	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,38		
TM 16	<i>Flavobacterium</i>	+	-	0,5	++++	0,75	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,38		
TM 17	<i>Enterobacter</i>	+	-	0,5	++++	0,75	-	-	-	-	0,00	0,6	0	0	0,60	0,60	0,68		
TM 19	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,06		
TM 20	<i>Luteibacter</i>	NC	-	0,0	+	0,13	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,06		
TM 21	<i>Brachy bacterium</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,25		
TM 22	<i>Microbacterium</i>	+	-	0,5	-	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,13		
TM 23	<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0,46	0,54	0	0,50	0,50		
TM 25	<i>Microbacterium</i>	+	-	0,5	+	0,38	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0,00	0,13	0,25		
TM 26	<i>Pseudoarthrobacter</i>	-	-	0,0		0,00	-	-	-	NC	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,00		
TM 27	<i>Bacillus</i>	+	-	0,5	++++	0,75	-	-	-	-	0,00	0,24	0	0	0,24	0,24	0,50		
TM 28	<i>Brevibacterium</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,25		
TM 30	<i>Bacillus</i>	+	+	1,0	++++	1,00	+	NC	+	-	0,67	0,58	0,28	0,66	0,4	0,48	0,81		
TM 31	<i>Enterobacter</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,25		
TM 33	<i>Enterobacter</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0,00	0,13	0,31		
TM 34	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,13		
TM 35	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0,06		

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA												
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB	
TM 36	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	++++	0,50	+	NC	+	-	0,67	0,6	0,32	0,68	0,46	0,52	0,85	0,67	
TM 38	<i>Paenarthrobacter</i>	+	-	0,5	+++	0,63	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,31	
TM 39	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	
TM 40	<i>Chryseobacterium</i>	-	+	0,5	-	0,25	+	-	+	-	0,50	0	0	0,38	0	0,38	0,63	0,44	
TM 42	<i>Paenibacillus</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,13	
TM 43	<i>Arthrobacter</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	NC	-	-	0,00	0	0	0,4	0	0,40	0,40	0,26	
TM 44	<i>Luteibacter</i>	NC	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	NC	0,00	0,36	0	0,34	0	0,35	0,35	0,36	
TM 46	<i>Microbacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0,36	0	0	0	0,36	0,36	0,24	
TM 47	<i>Curtobacterium</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0,38	0	0,38	0,38	0,44	
TM 48	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
FI 1	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	+	0,25	0,8	0	0,34	0,2	0,45	0,57	0,35	
FI 2	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	-	0,00	0	0	0,36	0	0,36	0,36	0,37	
FI 3	<i>Bacillus</i>	+	-	0,5	-	0,25	-	-	+	-	0,25	0,26	0	0,36	0,2	0,27	0,40	0,32	
FI 4	<i>Serratia</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	+	0,25	0,5	0	0	0	0,50	0,63	0,56	
FI 5	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	+	0,25	0,82	0	0,4	0	0,61	0,74	0,43	
FI 6	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	+++	0,38	-	-	-	+	0,25	0	0	0	0	0,00	0,13	0,25	
FI 9	<i>Kluyvera</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25	
FI 10	<i>Pectobacterium</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	-	0,00	0,38	0	0	0	0,38	0,38	0,44	
FI 11	<i>Cellulosimicrobium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	+	+	0,50	0	0	0	0	0,00	0,25	0,19	
FI 12	<i>Pantoea</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	+	+	0,50	0,42	0	0,34	0	0,38	0,63	0,57	

Tabla 6.2.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividad celulasa, pectinasa y crecimiento en biofilm) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, quitinasa, proteasa, y lipasa, inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEC, ICV, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	COLONIZACIÓN VEGETAL					ACTIVIDAD ANTAGONISTA											
		CELULASA	PECTINASA	ICEC	BIOFILM	ICV	AMILASA	QUITINASA	PROTEASA	LIPASA	ICEA	PICR _{Aa}	PICR _{Bc}	PICR _{Fo}	PICR _{Ss}	PICR _{prom}	IPA	IPB
FI 13	<i>Pantoea</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	-	0,00	0	0,2	0,48	0	0,34	0,34	0,30
FI 14	<i>Pantoea</i>	+	-	0,5	++	0,50	-	-	-	0,00	0	0,22	0	0	0,22	0,22	0,36	
FI 15	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	0,00	0,46	0,24	0,46	0	0,39	0,39	0,44	
FI 17	<i>Phyllobacterium</i>	+	-	0,5	+++	0,63	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,31	
FI 18	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	+	+	0,50	0	0	0	0,00	0,25	0,13	
FM 1	<i>Pantoea</i>	-	+	0,5	++	0,50	-	-	-	0,00	0	0	0	0,3	0,30	0,30	0,40	
FM 2	<i>Chryseobacterium</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	0,00	0	0	0,24	0	0,24	0,24	0,12	
FM 3	<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	+	-	0,25	0	0	0,58	0	0,58	0,60	
FM 4	<i>Bacillus</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	+	-	0,25	0	0	0	0,00	0,13	0,06	
FM 5	<i>Pseudomonas</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	+	+	0,50	0,9	0	0,86	0,28	0,68	0,59	
FM 6	<i>Xhantomonas</i>	-	-	0,0	-	0,00	+	-	+	-	0,50	0,38	0	0,36	0	0,37	0,31	
FM 7	<i>Pantoea</i>	-	-	0,0	-	0,00	-	-	-	0,00	0,4	0	0	0	0,40	0,40	0,20	
FM 8	<i>Chryseobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	0,00	0	0	0,56	0	0,56	0,56	0,34	
FM 9	<i>Chryseobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	0,00	0	0	0,32	0	0,32	0,32	0,22	
FM 10	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	+	0,13	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,06	
FM 13	<i>Enterobacter</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	0,00	0,62	0	0,8	0	0,71	0,71	0,61	
FM 14	<i>Pantoea</i>	-	-	0,0	++	0,25	-	-	-	0,00	0,28	0	0,3	0	0,29	0,29	0,27	
FM 15	<i>Stenotrophomonas</i>	NC	-	0,0	++++	0,50	-	-	+	+	0,50	0,38	0	0,8	0	0,59	0,84	0,67
FM 16	<i>Curtobacterium</i>	-	-	0,0	++++	0,50	-	-	-	0,00	0	0	0	0	0,00	0,00	0,25	

6.2.2 ENSAYOS DE ANTAGONISMO

6.2.2.1 Ensayos de germinación de conidios

- Cultivos bacterianos utilizados como inóculos para el ensayo**Tabla 6.2.2a** Concentración de UFC ml⁻¹ y pH final de los cultivos líquidos de los aislamientos bacterianos seleccionados como antagonistas específicos y/o generales por sus mayores valores de **PICR** e **IPB**, respectivamente.

AISLAMIENTO	GÉNERO	UFC ml⁻¹	pH
TM 30	<i>Bacillus</i>	8,54 x 10 ⁸	7,75
RhM38	No identificado	8,09 x 10 ⁸	8,1
RM 1	<i>Bacillus</i>	4,32 x 10 ⁸	7,74
RhI 22	No identificado	6,12 x 10 ⁸	7,96
TI 26	<i>Bacillus</i>	6,86 x 10 ⁸	7,84
FM 5	<i>Pseudomonas</i>	6,12 x 10 ⁸	8,10
RhI 5	<i>Pseudomonas</i>	3,05 x 10 ⁹	8,03
FI 5	<i>Pseudomonas</i>	9,54 x 10 ⁸	8,12
FI 1	<i>Pseudomonas</i>	1,27 x 10 ⁹	8,13
TM 23	<i>Stenotrophomonas</i>	1,64 x 10 ⁹	7,78
RM 3	<i>Pseudomonas</i>	4,85 x 10 ⁹	7,97
RM 5	<i>Bacillus</i>	8,14 x 10 ⁸	7,96
RM 7	<i>Chryseobacterium</i>	3,44 x 10 ⁸	7,74
RM 6	<i>Bacillus</i>	9,09 x 10 ⁸	7,98
FM 13	<i>Enterobacter</i>	7,14 x 10 ⁸	7,63
FM 15	<i>Stenotrophomonas</i>	8,95 x 10 ⁸	7,71
TI 21	<i>Bacillus</i>	6,49 x 10 ⁸	8,14
TI 17	<i>Bacillus</i>	8,02 x 10 ⁸	7,75
TM 36	<i>Bacillus</i>	2,35 x 10 ⁸	7,97

- Inhibición de la germinación de conidios de *Alternaria alternata*

Tabla 6.2.2b Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios de *Alternaria alternata* en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos antagonistas. Variable: % de germinación; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 40; r: 3; N=120; CV=36,2.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Aislamiento	5493,68	9	610,41	194,29	<0,01
Tiempo	188,02	3	62,67	19,95	<0,01
Aislamiento*Tiempo	1054,56	27	39,06	12,43	<0,01
Error	251,33	80	3,14		
Total	6987,59	119			

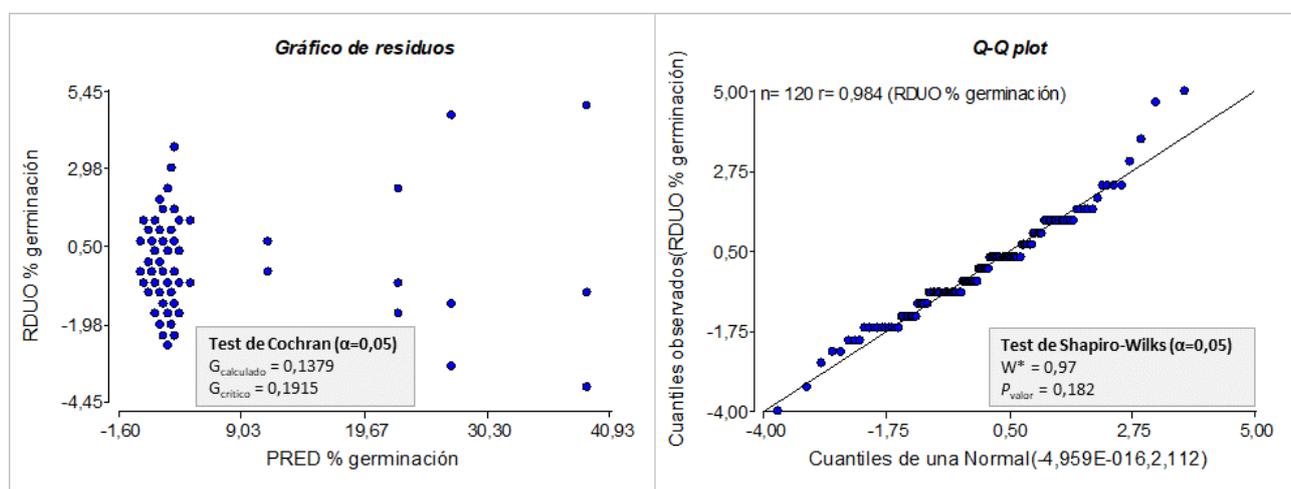


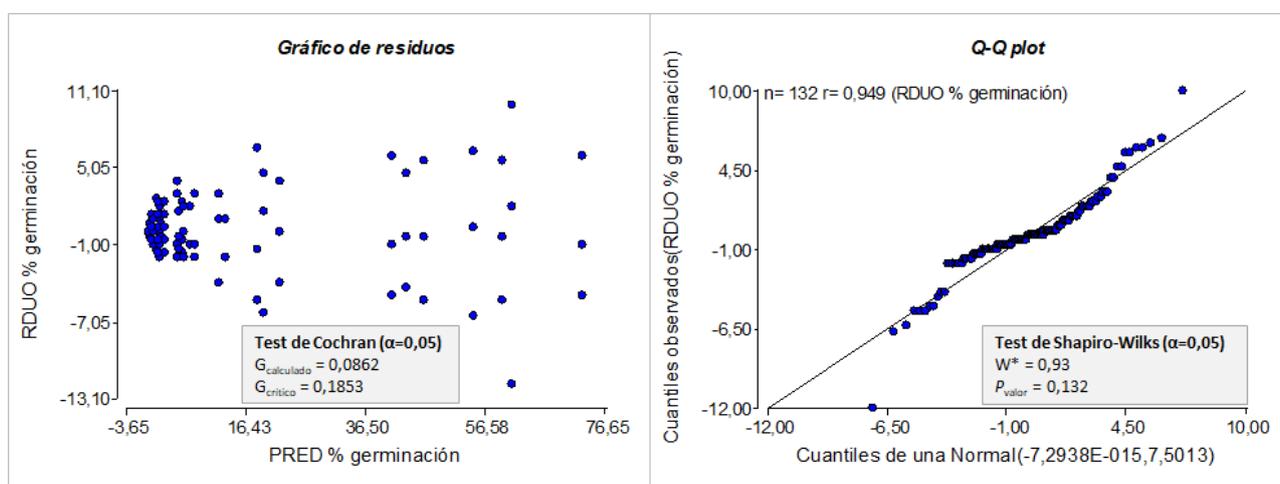
Figura 6.2.2a Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.2.2c Comparación de medias de la interacción Aislamiento*Tiempo mediante test de Tukey. Variable: % de germinación; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 40; r: 3 para todos los niveles. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).

TRATAMIENTO	TIEMPO	GERMINACIÓN DE CONIDIOS (%)
Resto de los tratamientos	Todos los tiempos	<4,7 a
Control	24 h	11,3 b
Control	48 h	22,7 c
Control	72 h	27,3 c
Control	168 h	39,0 d

- Inhibición de la germinación de conidios de *Botrytis cinerea***Tabla 6.2.2d** Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios de *Botrytis cinerea* en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos antagonistas. Variable: % de germinación; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 44; $r=3$; $N=132$; $CV=27,4$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Aislamiento	45280,21	10	4528,02	405,49	<0,01
Tiempo	1251,55	3	417,18	37,36	<0,01
Aislamiento*Tiempo	3096,45	30	103,22	9,24	<0,01
Error	982,67	88	11,17		
Total	50610,88	131			

**Figura 6.2.2b** Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).**Tabla 6.2.2e** Comparación de medias de la interacción Aislamiento*Tiempo mediante test de Tukey. Variable: % de germinación; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 44; $r=3$ para todos los niveles. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

TRATAMIENTO	TIEMPO	GERMINACIÓN DE CONIDIOS (%)
Resto de los tratamientos	Todos los tiempos	<8,0 a
TI 26	24 h	12,0 b
RhM 28	48 h	13,0 b
RhM 28	72 h	18,3 b
RhM 28	24 h	19,3 b
RhM 28	168 h	22,0 b
TI 26	48 h	41,0 c
TI 26	72 h	43,3 c
Control	24 h	46,3 c
TI 26	168 h	54,7 d
Control	48 h	59,3 d
Control	72 h	61,0 d
Control	168 h	73,0 e

- Inhibición de la germinación de conidios de *Fusarium oxysporum*

Tabla 6.2.2f Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos antagonistas. Variable: % de germinación; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 44; $r=3$; $N=132$; $CV=43,1$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Aislamiento	5200,24	10	520,02	123,46	<0,01
Tiempo	615,88	3	205,29	48,74	<0,01
Aislamiento*Tiempo	1703,45	30	56,78	13,48	<0,01
Error	370,67	88	4,21		
Total	7890,24	131			

i

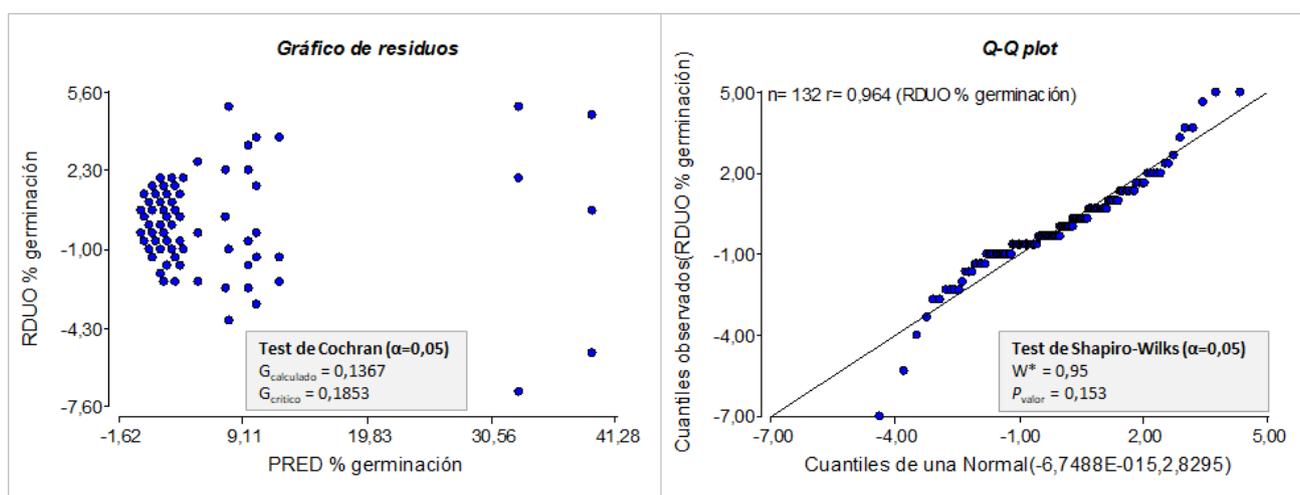


Figura 6.2.2c Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.2.2g Comparación de medias de la interacción Aislamiento*Tiempo mediante test de Tukey. Variable: % de germinación; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 44; $r=3$ para todos los niveles. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

TRATAMIENTO	TIEMPO	GERMINACIÓN DE CONIDIOS (%)
Resto de los tratamientos	Todos los tiempos	<4,0 a
Rhi 22	48 h	5,3 b
TM 30	72 h	7,7 b
TM 30	48 h	8,0 b
CONTROL	24 h	9,7 b
TM 30	168 h	9,7 b
Rhi 22	72 h	10,3 b
Rhi 22	168 h	10,3 b
CONTROL	48 h	12,3 c
CONTROL	72 h	33,0 d
CONTROL	168 h	39,3 d

6.2.2.2 Antagonismo contra *Botrytis cinerea* en germinación de semillas de lechuga

Tabla 6.2.2h Análisis de varianza de la incidencia de la enfermedad provocada por *Botrytis cinerea* en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos antagonistas. Variable: % de incidencia; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 9; $r=2$; $N=18$; $CV=37,5$.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
Tratamiento	1,11	8	0,14	13,68	<0,01
Error	0,09	9	0,01		
Total	1,2	17			

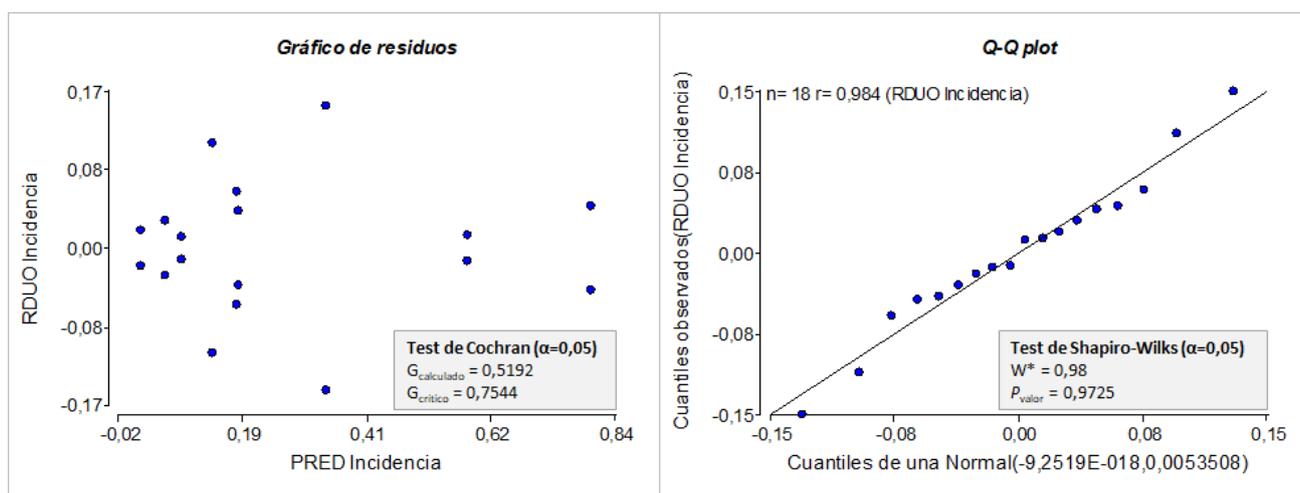


Figura 6.2.2d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA. Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.2.2i Comparación de medias entre los tratamientos mediante test de Tukey. Variable: % de incidencia; $\alpha=0,05$; Tratamientos: 9; $r=2$ para todos los niveles. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

TRATAMIENTO	INCIDENCIA (%)
TM 23	1,92 a
RM 3	6,17 a
RM 5	8,86 a
RM 6	14,42 a
RM 1	18,57 a
RM 7	18,78 a
TM 30	33,89 ab
Rhl 22	58,57 bc
<i>B. cinerea</i>	79,91 c

6.2.2.3 Análisis de componentes principales sobre índices de antagonismo

- Tomando todos los aislamientos sin criterio de clasificación

Tabla 6.2.2j Matriz de correlación/probabilidades entre los índices calculados en base a la actividad antagonista.

	ICV	ICEA	PICRA α	PICRBc	PICRFo	PICRSs
ICV						
ICEA	0,0007					
PICRA α	0,0018	<0,0001				
PICRBc	0,0006	<0,0001	<0,0001			
PICRFo	0,0019	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
PICRSs	0,0049	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
IPB	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabla 6.2.2k Autovalores y autovectores

Lambda	Autovalores			Autovectores			
	Valor	Proporción	Acumulado	Variables	e1	e2	e3
1	3,7	0,53	0,53	ICV	0,27	0,72	-0,37
2	1,18	0,17	0,7	ICEA	0,31	0,16	0,89
3	0,75	0,11	0,8	PICRA α	0,41	-0,2	0,01
4	0,62	0,09	0,89	PICRBc	0,37	-0,29	-0,22
5	0,39	0,06	0,95	PICRFo	0,4	-0,22	-0,13
6	0,33	0,05	1	PICRSs	0,39	-0,36	-0,11
7	0,03	4,70E-03	1	IPB	0,46	0,39	-0,01

- Tomando todos los aislamientos clasificados según el microhábitat

Tabla 6.2.2l Matriz de correlación/probabilidades entre los índices calculados en base a la actividad antagonista.

	ICV	ICEA	PICRA α	PICRBc	PICRFo	PICRSs
ICV						
ICEA	0,9822					
PICRA α	0,2308	0,4208				
PICRBc	0,5157	0,3288	0,5877			
PICRFo	0,306	0,5276	0,0054	0,583		
PICRSs	0,2348	0,666	0,4094	0,6535	0,3682	
IPB	0,133	0,477	0,0017	0,5831	0,0136	0,3181

Tabla 6.2.2m Autovalores y autovectores

<i>Lambda</i>	<i>Autovalores</i>			<i>Autovectores</i>				
	<i>Valor</i>	<i>Proporción</i>	<i>Acumulado</i>	<i>Variables</i>	<i>e1</i>	<i>e2</i>	<i>e3</i>	
1	4,12	0,59	0,59	ICV	0,39	-0,2	0,46	
2	1,72	0,25	0,83	ICEA	0,2	0,61	-0,41	
3	0,9	0,13	0,96	PICRAa	0,48	-0,01	-0,26	
4	0,26	0,04	1	PICRBc	-0,14	0,72	0,21	
5	0	0	1	PICRFo	0,46	-0,03	-0,23	
6	0	0	1	PICRSs	0,33	0,27	0,67	
7	0	0	1	IPB	0,49	-0,03	-0,12	

6.3 CARACTERIZACIÓN RELACIONADA A LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL *IN VITRO*

6.3.1 RESUMEN DE INDICES

Tabla 6.3.1a Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
SI 1		0,50	++	0,34	0,19	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,13	0,38
SI 2		0,00	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,17
SI 3		0,50	++	0,67	0,36	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,09	0,34
SI 4		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
SI 5		0,50	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,08	0,33
SI 6		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,13
SI 7		0,25	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,21
SI 8		0,50	++	0,37	0,20	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,05	0,30
SI 9		0,50	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,42
SI 10		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,08	0,21
SI 11		0,00	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,00
SI 12		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
SM 1		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	++	0,67	0,17	0,23
SM 2		0,38	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,27
SM 3		0,13	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,15
SM 4		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	++	0,67	0,17	0,23
SM 5		0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,01
SM 6		0,00	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,17
SM 8		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
SM 9		0,00	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,08

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
SM 10		0,00	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	+	0,33	0,17	0,17
SM 11		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
SM 12		0,25	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,29
Rhl 1		0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,08
Rhl 2		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
Rhl 3		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	+++	1	0,25	0,31
Rhl 4		0,38	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+++	1	0,26	0,45
Rhl 5	<i>Pseudomonas</i>	0,25	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	+	0,33	0,17	0,29
Rhl 6		0,38	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,35
Rhl 7		0,00	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	+++	1	0,42	0,42
Rhl 8		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,13
Rhl 9		0,25	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,29
Rhl 10		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,13
Rhl 11		0,25	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,29
Rhl 12		0,13	+++	0,58	0,31	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,24	0,31
Rhl 13		0,63	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,40
Rhl 14		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,13
Rhl 16		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
Rhl 17		0,00	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	+++	1	0,25	0,25
Rhl 18		0,38	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+++	1	0,26	0,45

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
RhI 19		0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,14
RhI 20		0,38	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,19
RhI 21		0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,08
RhI 22		0,88	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,52
RhI 23		0,63	+	0,10	0,05	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,10	0,41
RhI 24		0,38	+	0,10	0,05	+++	1,00	ND	ND	ND	-	0	0,26	0,45
RhI 25	<i>Pseudomonas</i>	0,13	++	0,35	0,19	++	0,66	-	-	0	-	0	0,21	0,27
RhI 27		0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,14
RhI 28	<i>Brevibacterium</i>	0,13	+++	0,89	0,48	++	0,66	-	-	0	-	0	0,29	0,35
RhI 29		0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	++	0,67	0,18	0,24
RhI 30		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,08	0,15
RhI 31		0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+++	1	0,26	0,39
RhI 33		0,00	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,00
RhI 34		0,00	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,08	0,08
RhI 35		0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,08
RhM 1		0,00	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	+	0,33	0,17	0,17
RhM 2		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
RhM 3		0,25	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,21
RhM 4		0,38	+++	1,11	0,60	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,15	0,34
RhM 5	<i>Pseudomonas</i>	0,25	+	0,10	0,05	++	0,66	-	+	1	-	0	0,43	0,55

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISolP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
RhM 6		0,00	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,00
RhM 7		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
RhM 8		0,13	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	+++	1	0,33	0,40
RhM 9		0,38	-	ND	0,00	+++	1,00	ND	ND	ND	-	0	0,25	0,44
RhM 11	<i>Pseudomonas</i>	0,38	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,48
RhM 10		0,63	+++	1,17	0,63	+	0,33	-	-	0	-	0	0,24	0,43
RhM 12		0,75	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,46
RhM 13		0,25	+++	0,56	0,30	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,16	0,28
RhM 14		0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,01
RhM 15		0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,10	0,16
RhM 16		0,25	+++	0,22	0,12	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,03	0,16
RhM 17		0,25	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,21
RhM 18		0,25	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	+	0,33	0,25	0,37
RhM 19		0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,10	0,10
RhM 20	<i>Pseudomonas</i>	1,00	++	0,30	0,16	+	0,33	-	-	0	-	0	0,12	0,62
RhM 21	<i>Pseudomonas</i>	0,25	+++	0,59	0,32	+	0,33	-	+	1	-	0	0,41	0,54
RhM 22		0,25	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,21
RhM 23	<i>Pseudomonas</i>	0,13	+	0,10	0,05	+	0,33	-	-	0	-	0	0,10	0,16
RhM 24		0,50	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,25
RhM 25		0,38	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,19

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
RhM 26		0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,08
RhM 27		0,00	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,00
RhM 28		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,13
RhM 29		0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,01
RhM 30		0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,14
RhM 31		0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,10	0,22
RhM 32		0,50	+++	0,37	0,20	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,13	0,38
RhM 33		0,75	+++	0,44	0,24	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,14	0,52
RhM 34		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	+++	1	0,25	0,31
RhM 35		0,38	+++	0,94	0,51	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,13	0,32
RhM 36		0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,10	0,16
RhM 37		0,50	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	+	0,33	0,10	0,35
RhM 38		1,00	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,58
RhM 39		0,50	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,25
RhM 40	<i>Bacillus</i>	0,25	++	1,61	0,87	+	0,33	-	+	1	-	0	0,55	0,68
RhM 41		0,13	+	0,10	0,05	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,10	0,16
RhM 42		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,13
RhM 43		0,38	+	0,10	0,05	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,10	0,28
RhM 44		0,25	++	0,33	0,18	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,13	0,25
RhM 45		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
RhM 46		0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
RhM 47	<i>Peribacillus</i>	0,50	+++	0,42	0,23	+	0,33	-	-	0	-	0	0,14	0,39
RhM 48		0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,01	0,14
RhM 49		0,50	+	0,10	0,05	+	0,33	ND	ND	ND	+++	1	0,35	0,60
RhM 50		0,13	-	ND	0,00	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,17	0,23
RhM 51		0,25	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,13
RhM 52		0,25	++	0,33	0,18	++	0,66	ND	ND	ND	-	0	0,21	0,34
RhM 53		0,25	-	ND	0,00	+	0,33	ND	ND	ND	-	0	0,08	0,21
RhM 54		0,13	+	0,10	0,05	+	0,33	ND	ND	ND	+++	1	0,35	0,41
RI 1	<i>Priestia</i>	0,50	++	1,85	1,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,33	0,58
RI 2	<i>Bacillus</i>	0,13	+++	0,63	0,34	-	0,00	+	-	1	-	0	0,34	0,40
RI 3	<i>Bacillus</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,17	0,42
RI 4	<i>Pseudomonas</i>	0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,18	0,18
RI 5	<i>Bacillus</i>	0,00	++	0,21	0,11	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,20	0,20
RI 6	<i>Pseudomonas</i>	0,13	+++	0,42	0,23	-	0,00	+	-	1	-	0	0,31	0,37
RI 7	<i>Pseudomonas</i>	0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,10	0,10
RI 8	<i>Microbacterium</i>	0,38	+	0,10	0,05	-	0,00	-	+	1	++	0,67	0,43	0,62
RI 9	<i>Brachybacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
RI 10	<i>Bacillus</i>	0,38	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,17	0,36
RI 11	<i>Peribacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL												
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV	
RI 12	<i>Microbacterium</i>	0,63	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,10	0,41	
RI 13	<i>Peribacillus</i>	0,50	-	ND	0,00	++	0,66	-	+	1	-	0	0,42	0,67	
RI 14	<i>Sphingomonas</i>	0,25	-	ND	0,00	+	0,33	+	-	1	-	0	0,33	0,46	
RI 15	<i>Bacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,08	0,15	
RI 16	<i>Bacillus</i>	0,25	-	ND	0,00	+	0,33	-	+	1	+	0,33	0,42	0,54	
RI 17	<i>Agrobacterium</i>	0,50	+	0,10	0,05	+	0,33	-	+	1	+	0,33	0,43	0,68	
RI 18	<i>Bacillus</i>	0,63	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	++	0,67	0,25	0,56	
RI 19	<i>Priestia</i>	0,38	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+++	1	0,25	0,44	
RI 20	<i>Microbacterium</i>	0,50	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,18	0,43	
RI 21	<i>Bacillus</i>	0,63	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,18	0,49	
RI 24	<i>Microbacterium</i>	0,63	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,31	
RI 25	<i>Luteibacter</i>	0,63	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,31	
RI 26	<i>Dyella</i>	0,38	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,19	
RI 27	<i>Microbacterium</i>	0,38	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,18	0,37	
RI 29	<i>Bacillus</i>	0,50	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	-	0	0,17	0,42	
RI 30	<i>Bacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+++	1	0,25	0,31	
RI 31	<i>Priestia</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,08	0,15	
RI 32	<i>Pseudomonas</i>	0,25	+++	0,56	0,30	-	0,00	+	-	1	-	0	0,33	0,45	
RI 33	<i>Rhizobium</i>	0,13	+	0,10	0,05	+	0,33	-	-	0	+++	1	0,35	0,41	
RI 34	<i>Bacillus</i>	0,00	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	-	0	0,17	0,17	

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cuatitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
RI 35	<i>Fictibacillus</i>	0,25	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	-	0	0,08	0,21
RI 36	<i>Arthrobacter</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+++	1	0,25	0,25
RI 37	<i>Curtobacterium</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,13
RI 38	<i>Arthrobacter</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	+	1	-	0	0,25	0,38
RI 40	<i>Microbacterium</i>	0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	-	0	0,01	0,01
RI 41	<i>Arthrobacter</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
RI 42	<i>Bacillus</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	+	1	-	0	0,25	0,25
RI 43	<i>Janibacter</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
RI 45	<i>Priestia</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,17	0,23
RI 47	<i>Microbacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,08	0,15
RI 48	<i>Bacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	+	-	1	++	0,67	0,42	0,48
RI 51	<i>Pseudoarthrobacter</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	+	1	+	0,33	0,33	0,46
RI 52	<i>Bacillus</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,08	0,08
RI 53	<i>Janibacter</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,13
RM 1	<i>Bacillus</i>	0,75	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	-	0	0,17	0,54
RM 2	<i>Chryseobacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
RM 3	<i>Pseudomonas</i>	0,13	+	0,10	0,05	++	0,66	-	-	0	-	0	0,18	0,24
RM 4	<i>Pseudomonas</i>	0,13	+	0,10	0,05	++	0,66	-	-	0	-	0	0,18	0,24
RM 5	<i>Bacillus</i>	0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	-	0	0,01	0,08
RM 6	<i>Bacillus</i>	0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,10	0,16

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cuantitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
RM 7	<i>Chryseobacterium</i>	0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	-	0	0,01	0,14
RM 13	<i>Luteibacter</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,08	0,15
RM 16	<i>Microbacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,25
RM 17	<i>Nocardioides</i>	0,38	-	ND	0,00	+++	1,00	-	+	1	-	0	0,50	0,69
TI 1	<i>Bacillus</i>	0,38	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	-	0	0,08	0,27
TI 2	<i>Microbacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,25
TI 3	<i>Curtobacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	-	0	0,08	0,33
TI 4	<i>Lysobacter</i>	0,00	+	0,10	0,05	++	0,66	-	-	0	+	0,33	0,26	0,26
TI 5	<i>Enterobacter</i>	0,00	+	0,10	0,05	++	0,66	-	-	0	++	0,67	0,35	0,35
TI 6	<i>Curtobacterium</i>	0,25	+++	0,68	0,37	++	0,66	-	+	1	-	0	0,51	0,63
TI 7	<i>Pseudomonas</i>	0,38	++	0,32	0,17	+	0,33	-	-	0	-	0	0,13	0,31
TI 8	<i>Pseudomonas</i>	0,00	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	+	0,33	0,25	0,25
TI 9	<i>Microbacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,25
TI 10	<i>Pseudomonas</i>	0,38	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	-	0	0,01	0,20
TI 11	<i>Pseudomonas</i>	0,00	+++	0,47	0,25	++	0,66	-	-	0	-	0	0,23	0,23
TI 12	<i>Curtobacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	-	0	0,17	0,23
TI 13	<i>Curtobacterium</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,00
TI 14	<i>Brachy bacterium</i>	0,63	-	ND	0,00	-	0,00	-	+	1	-	0	0,25	0,56
TI 15	<i>Pseudomonas</i>	0,25	+++	1,68	0,91	+	0,33	-	+	1	++	0,67	0,73	0,85
TI 17	<i>Pantoea</i>	0,13	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	-	0	0,08	0,15

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
TI 19	<i>Chryseobacterium</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,13
TI 21	<i>Bacillus</i>	0,63	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,31
TI 23	<i>Pseudomonas</i>	0,25	+++	1,50	0,81	++	0,66	-	-	0	-	0	0,37	0,49
TI 24	<i>Microbacterium</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,00
TI 25	<i>Ensifer</i>	0,50	+++	0,59	0,32	+	0,33	+	-	1	+	0,33	0,50	0,75
TI 26	<i>Bacillus</i>	0,75	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,38
TI 28	<i>Pseudomonas</i>	0,38	+++	1,84	1,00	+	0,33	-	+	1	-	0	0,58	0,77
TI 31	<i>Pantoea</i>	0,00	++	0,46	0,25	-	0,00	-	-	0	-	0	0,06	0,06
TI 32	<i>Chryseobacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	+	0,33	0,25	0,31
TI 33	<i>Pseudomonas</i>	0,13	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	-	0	0,17	0,23
TM 1	<i>Curtobacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,08	0,33
TM 2	<i>Curtobacterium</i>	0,38	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	+	0,33	0,17	0,35
TM 3	<i>Curtobacterium</i>	0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,18	0,24
TM 4	<i>Leclercia</i>	0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	-	0	0,01	0,08
TM 5	<i>Bacillus</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	+	0,33	0,08	0,33
TM 6	<i>Curtobacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
TM 7	<i>Pseudomonas</i>	0,25	+	0,10	0,05	+	0,33	-	-	0	-	0	0,10	0,22
TM 8	<i>Bacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
TM 9	<i>Curtobacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
TM 10	<i>Bacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cualitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
TM 11	<i>Bacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
TM 12	<i>Brachy bacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
TM 13	<i>Pseudomonas</i>	0,50	+++	0,47	0,26	++	0,66	-	+	1	-	0	0,48	0,73
TM 14	<i>Pseudomonas</i>	0,75	+++	0,79	0,43	++	0,66	-	+	1	-	0	0,52	0,90
TM 16	<i>Flavobacterium</i>	0,75	+	0,10	0,05	++	0,66	-	+	1	-	0	0,43	0,80
TM 17	<i>Enterobacter</i>	0,75	+++	1,26	0,68	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,34	0,71
TM 19	<i>Pseudomonas</i>	0,13	+++	0,63	0,34	++	0,66	-	-	0	-	0	0,25	0,31
TM 20	<i>Luteibacter</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,06
TM 21	<i>Brachy bacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,25
TM 22	<i>Microbacterium</i>	0,25	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	+	0,33	0,17	0,29
TM 23	<i>Stenotrophomonas</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,25
TM 25	<i>Microbacterium</i>	0,38	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,19
TM 26	<i>Pseudoarthrobacter</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,00
TM 27	<i>Bacillus</i>	0,75	+++	0,38	0,21	+	0,33	-	+	1	-	0	0,38	0,76
TM 28	<i>Brevibacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,25
TM 30	<i>Bacillus</i>	1,00	-	ND	0,00	++	0,66	-	+	1	-	0	0,42	0,92
TM 31	<i>Enterobacter</i>	0,50	+++	1,74	0,94	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,40	0,65
TM 33	<i>Enterobacter</i>	0,50	+	0,10	0,05	++	0,66	-	-	0	+	0,33	0,26	0,51
TM 34	<i>Curtobacterium</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,13
TM 35	<i>Bacillus</i>	0,13	-	ND	0,00	++	0,66	-	+	1	-	0	0,42	0,48

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL											
			Solub. de P cuantitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV
TM 36	<i>Bacillus</i>	0,50	-	ND	0,00	+	0,33	-	+	1	-	0	0,33	0,58
TM 38	<i>Paenarthrobacter</i>	0,63	+++	1,40	0,76	+	0,33	-	-	0	-	0	0,27	0,58
TM 39	<i>Bacillus</i>	0,00	-	ND	0,00	+	0,33	-	+	1	-	0	0,33	0,33
TM 40	<i>Chryseobacterium</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,13
TM 42	<i>Paenibacillus</i>	0,25	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,13
TM 43	<i>Arthrobacter</i>	0,13	-	ND	0,00	++	0,66	-	-	0	-	0	0,17	0,23
TM 44	<i>Luteibacter</i>	0,38	-	ND	0,00	-	0,00	ND	ND	ND	-	0	0,00	0,19
TM 46	<i>Microbacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
TM 47	<i>Curtobacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,25
TM 48	<i>Bacillus</i>	0,13	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	-	0	0,01	0,08
FI 1	<i>Pseudomonas</i>	0,13	+	0,10	0,05	+	0,33	+	-	1	-	0	0,35	0,41
FI 2	<i>Curtobacterium</i>	0,38	+++	0,32	0,17	-	0,00	-	-	0	-	0	0,04	0,23
FI 3	<i>Bacillus</i>	0,25	-	ND	0,00	+	0,33	-	+	1	-	0	0,33	0,46
FI 4	<i>Serratia</i>	0,50	++	0,38	0,21	-	0,00	-	+	1	-	0	0,30	0,55
FI 5	<i>Pseudomonas</i>	0,13	+++	0,55	0,30	-	0,00	-	-	0	-	0	0,07	0,14
FI 6	<i>Curtobacterium</i>	0,38	+	0,10	0,05	+	0,33	-	-	0	-	0	0,10	0,28
FI 9	<i>Kluyvera</i>	0,50	+++	0,37	0,20	-	0,00	-	-	0	-	0	0,05	0,30
FI 10	<i>Pectobacterium</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	+	1	-	0	0,25	0,50
FI 11	<i>Cellulosimicrobium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06
FI 12	<i>Pantoea</i>	0,50	++	0,94	0,51	-	0,00	-	-	0	-	0	0,13	0,38

Tabla 6.3.1a (continuación) Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (*ICV*) y a la promoción del crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de auxinas, fijación biológica del nitrógeno), y resultado de los índices para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	Género	Índice de Colonización Vegetal (<i>ICV</i>)	ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL												
			Solub. de P cuatitativa	ESFI	ISoIP	Sideróforos	SID	FBN - LGI	FBN - NFb	FBN	Auxinas	AUX	IMPCV	IPPCV	
FI 13	<i>Pantoea</i>	0,25	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,18	0,31	
FI 14	<i>Pantoea</i>	0,50	++	0,38	0,21	-	0,00	+	-	1	++	0,67	0,47	0,72	
FI 15	<i>Bacillus</i>	0,50	+	0,10	0,05	-	0,00	-	-	0	-	0	0,01	0,26	
FI 17	<i>Phyllobacterium</i>	0,63	-	ND	0,00	+	0,33	-	-	0	-	0	0,08	0,40	
FI 18	<i>Curtobacterium</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,00	
FM 1	<i>Pantoea</i>	0,50	+++	0,30	0,16	-	0,00	+	-	1	++	0,67	0,46	0,71	
FM 2	<i>Chryseobacterium</i>	0,00	+	0,10	0,05	-	0,00	+	+	1	-	0	0,26	0,26	
FM 3	<i>Stenotrophomonas</i>	0,50	+++	1,33	0,72	++	0,66	-	-	0	-	0	0,35	0,60	
FM 4	<i>Bacillus</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	++	0,67	0,17	0,17	
FM 5	<i>Pseudomonas</i>	0,25	+	0,10	0,05	+	0,33	-	-	0	-	0	0,10	0,22	
FM 6	<i>Xhantomonas</i>	0,00	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,00	
FM 7	<i>Pantoea</i>	0,00	++	0,35	0,19	+	0,33	-	+	1	-	0	0,38	0,38	
FM 8	<i>Chryseobacterium</i>	0,13	++	0,55	0,29	-	0,00	+	+	1	-	0	0,32	0,39	
FM 9	<i>Chryseobacterium</i>	0,13	++	0,53	0,28	-	0,00	-	+	1	-	0	0,32	0,38	
FM 10	<i>Curtobacterium</i>	0,13	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,06	
FM 13	<i>Enterobacter</i>	0,50	++	0,38	0,21	+	0,33	-	-	0	+++	1	0,38	0,63	
FM 14	<i>Pantoea</i>	0,25	+++	0,60	0,32	+	0,33	-	-	0	-	0	0,16	0,29	
FM 15	<i>Stenotrophomonas</i>	0,50	-	ND	0,00	-	0,00	-	-	0	-	0	0,00	0,25	
FM 16	<i>Curtobacterium</i>	0,50	++	0,30	0,16	-	0,00	-	-	0	-	0	0,04	0,29	

6.3.1.1 Análisis de componentes principales sobre índices de promoción del crecimiento vegetal

- Tomando todos los aislamientos sin criterio de clasificación

Tabla 6.3.1a. Matriz de correlación/probabilidades entre los índices calculados en base a la actividad antagonista.

	ICV	ISoIP	SID	AUX
ICV				
ISoIP	0,0013			
SID	0,0845	0,0807		
AUX	0,2896	0,8979	0,0247	
IPPCV	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabla 6.3.1b. Autovalores y autovectores

Lambda	Autovalores			Autovectores			
	Valor	Proporción	Acumulado	Variables	e1	e2	e3
1	2,08	0,42	0,42	ICV	0,51	-0,03	-0,41
2	1,12	0,22	0,64	ISoIP	0,42	0,04	-0,36
3	0,88	0,18	0,82	SID	0,35	-0,47	0,74
4	0,81	0,16	0,98	AUX	0,08	0,87	0,38
5	0,11	0,02	1	IPPCV	0,66	0,15	0,1

- Tomando todos los aislamientos clasificados según el microhábitat

Tabla 6.3.1c. Matriz de correlación/probabilidades entre los índices calculados en base a la actividad antagonista.

	ICV	ISoIP	SID	AUX
ICV				
ISoIP	0,0478			
SID	0,8621	0,967		
AUX	0,7747	0,4268	0,3704	
IPPCV	0,0321	0,1238	0,6581	0,8242

Tabla 6.3.1d. Autovalores y autovectores

Lambda	Autovalores			Autovectores			
	Valor	Proporción	Acumulado	Variables	e1	e2	e3
1	2,76	0,55	0,55	ICV	0,59	-2x10 ⁻³	0,3
2	1,64	0,33	0,88	ISolP	0,58	-0,1	-0,31
3	0,57	0,11	1	SID	-0,01	-0,67	0,69
4	0,02	4,60E-03	1	AUX	-0,17	0,67	0,55
5	0	0	1	IPPCV	0,54	0,3	0,19

6.3.2 ENSAYOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVO DE LECHUGA Y TOMATE *IN VIVO*

6.3.2.1 Cultivos bacterianos para ensayos de promoción del crecimiento vegetal *in vivo*

Tabla 6.3.2a Concentración de UFC ml⁻¹ y pH final de los cultivos líquidos de los aislamientos bacterianos seleccionados como potenciales promotores del crecimiento vegetal por sus mayores valores de *IMPCV* e *IPPCV*.

AISLAMIENTO	GÉNERO	UFC ml ⁻¹	pH
TM 30	<i>Bacillus</i>	1,23 x 10 ⁹	7,75
TI 15	<i>Pseudomonas</i>	7,16 x 10 ⁹	7,73
TM 16	<i>Flavobacterium</i>	2,38 x 10 ⁸	7,89
TI 28	<i>Pseudomonas</i>	7,24 x 10 ⁹	7,26
RI 17	<i>Agrobacterium</i>	2,39 x 10 ⁹	7,53
RhM 40	<i>Bacillus</i>	3,88 x 10 ⁹	8,34
RI 13	<i>Peribacillus</i>	1,30 x 10 ⁸	7,87
TM 31	<i>Enterobacter</i>	4,57 x 10 ⁷	7,48
FM 13	<i>Enterobacter</i>	7,35 x 10 ⁸	7,63
TI 6	<i>Curtobacterium</i>	2,35 x 10 ⁷	7,34

6.3.2.2 Análisis estadístico de los ensayos de promoción del crecimiento vegetal en etapa de plantin

- Ensayo en plantines de lechuga var. sagess en condiciones controladas (lab-1)**Tabla 6.3.2b** Análisis de varianza del peso seco de raíces de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de raíces (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=16,3.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	696,69	10	69,67	4,04	<0,01
Error	568,44	33	17,23		
Total	1265,13	43			

Tabla 6.3.2c Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de parte aérea (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=8,9.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	4181,4	10	418,14	15,61	<0,01
Error	883,9	33	26,78		
Total	5065,3	43			

Tabla 6.3.2d Análisis de varianza del peso seco total de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso total (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=8,94.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	7064,65	10	706,47	12,59	<0,01
Error	1851,24	33	56,1		
Total	8915,89	43			

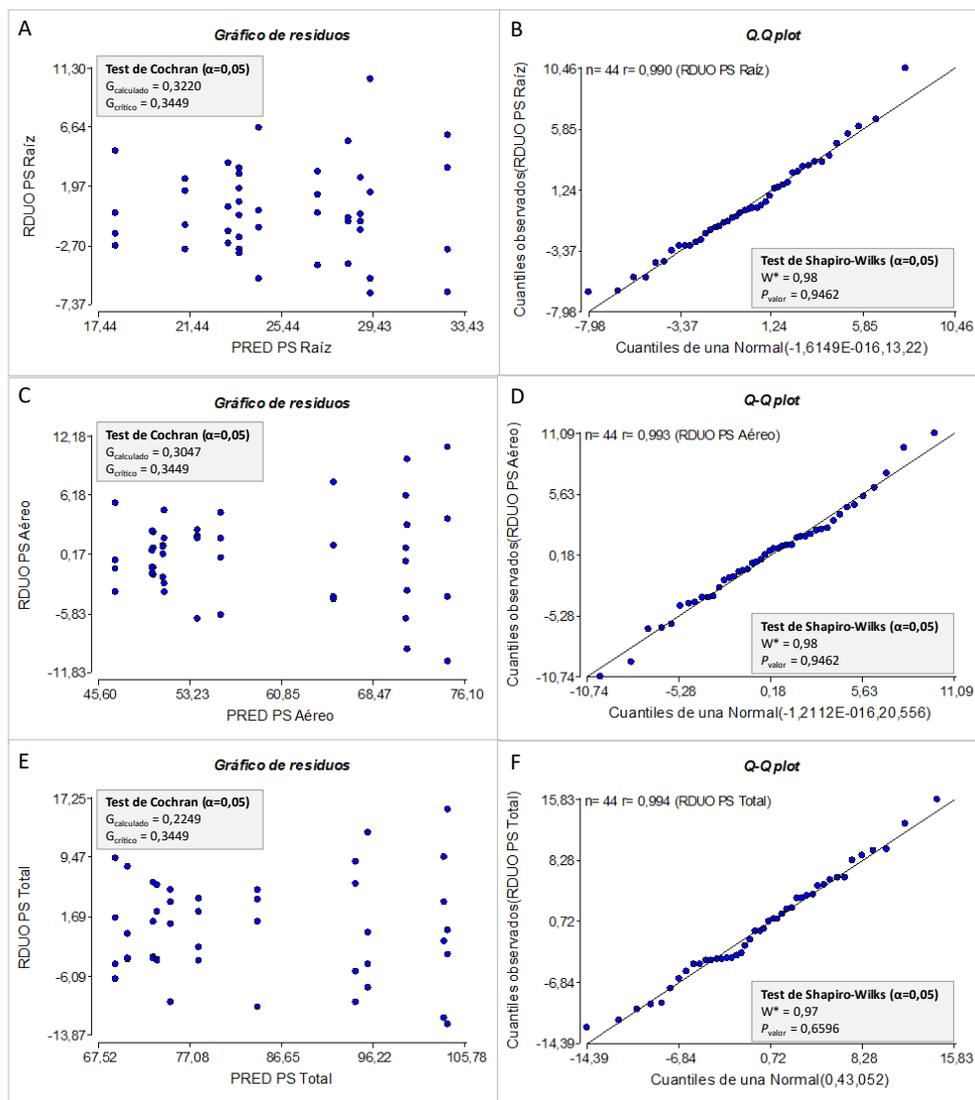


Figura 6.3.2a Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA para las variables de peso seco de raíz (A y B), parte aérea (C y D) y total del plantin (E y F). Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.3.2e Comparación de medias entre los tratamientos mediante test de Dunnett. Variables: Peso seco de raíces, parte aérea y total (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4 para todos los niveles. El asterisco denota diferencias significativas respecto al control ($p>0,05$).

TRATAMIENTO	PS RAÍCES (mg)	PS AÉREO (mg)	PS TOTAL (mg)
CONTROL	18,2	51,1	69,3
FM 13	23,6	47,0	70,6
TI 6	23,1	50,2	73,3
RI 17	23,6	50,1	73,6
TM 31	21,3	53,8	75,1
TM 16	27,0 *	51,0	78,0
TI 15	28,4 *	55,8	84,1 *
RI 13	29,3 *	65,1 *	94,4 *
RhM 40	24,5 *	71,2 *	95,7 *
TI28	28,9 *	74,7 *	103,6 *
TM 30	32,7 *	71,3 *	104,0 *

- Ensayo en plantines de lechuga var. sagess en condiciones controladas (lab-2)

Tabla 6.3.2f Análisis de varianza del peso seco de raíces de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de raíces (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=10,1.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	256,31	10	25,63	8,65	<0,01
Error	97,73	33	2,96		
Total	354,05	43			

Tabla 6.3.2g Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de parte aérea (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=12,6.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	2293,3	10	229,33	8,93	<0,01
Error	847,26	33	25,67		
Total	3140,56	43			

Tabla 6.3.2h Análisis de varianza del peso seco total de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso total (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=10,7.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	3934,69	10	393,47	10,55	<0,01
Error	1230,89	33	37,3		
Total	5165,57	43			

Tabla 6.3.2i Análisis de varianza del área foliar de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: área foliar (cm² plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=17,2.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	921,59	10	92,16	23,98	<0,01
Error	126,79	33	3,84		
Total	1048,38	43			

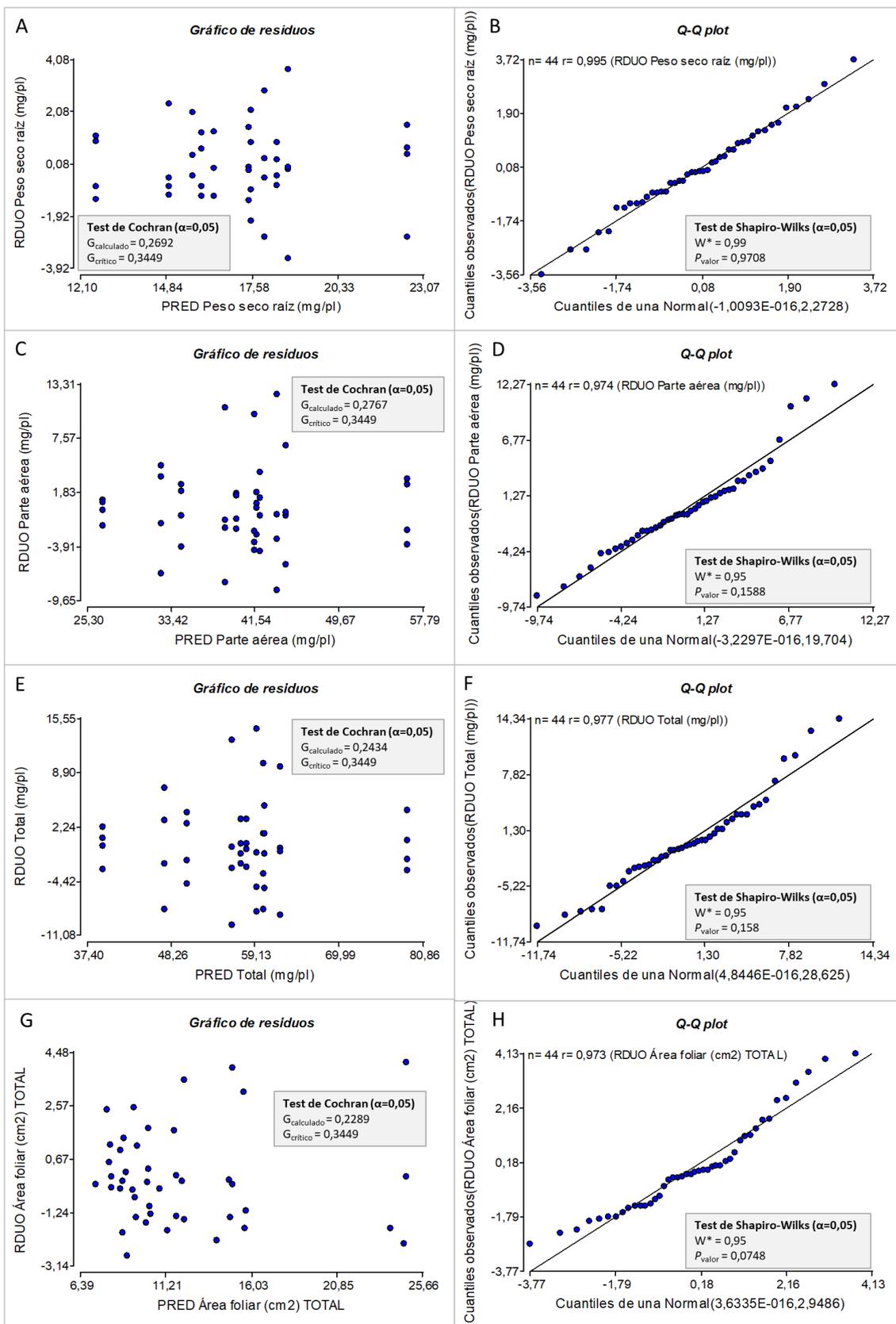


Figura 6.3.2b Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA para las variables de peso seco de raíz (A y B), parte aérea (C y D), total del plantin (E y F), y área foliar (G y H). Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.3.2j Comparación de medias entre los tratamientos mediante test de Dunnett. Variables: Peso seco de raíces, parte aérea y total (mg plantin⁻¹), y área foliar (cm²); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4 para todos los niveles. El asterisco denota diferencias significativas respecto al control ($p>0,05$).

TRATAMIENTO	PS RAÍCES (mg)	PS AÉREO (mg)	PS TOTAL (mg)	AREA FOLIAR (cm ²)
FM 13	12,6	26,8	39,4	8,5
RI 17	14,9	32,5	47,4	7,9
TM 31	15,7	43,6 *	59,3 *	10,0
Control	16,0	34,4	50,4	10,1
TM 16	16,4	41,7 *	58,1	12,0 *
RI 13	17,5	39,8	57,3	11,5 *
TI 6	17,6	38,6	56,2	8,8
TI 15	18,0	44,48 *	62,5 *	15,5 *
RhM 40	18,4 *	42,0 *	60,4 *	14,8 *
TI 28	18,8 *	41,5 *	60,3 *	24,5 *
TM 30	22,6 *	56,3 *	78,9 *	9,3

- Ensayo en plantines de lechuga var. emilia en codiciones productivas comerciales

Tabla 6.3.2k Análisis de varianza del peso seco de raíces de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de raíces (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=10,1.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	280,77	10	28,08	2,95	<0,01
Error	313,97	33	9,51		
Total	594,74	43			

Tabla 6.3.2l Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de parte aérea (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=12,6.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	556,02	10	55,6	4,95	<0,01
Error	370,41	33	11,22		
Total	926,44	43			

Tabla 6.3.2m Análisis de varianza del peso seco total de plantines de lechuga en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso total (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=10,7.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	1445,73	10	144,57	4,11	<0,01
Error	1160,35	33	35,16		
Total	2606,08	43			

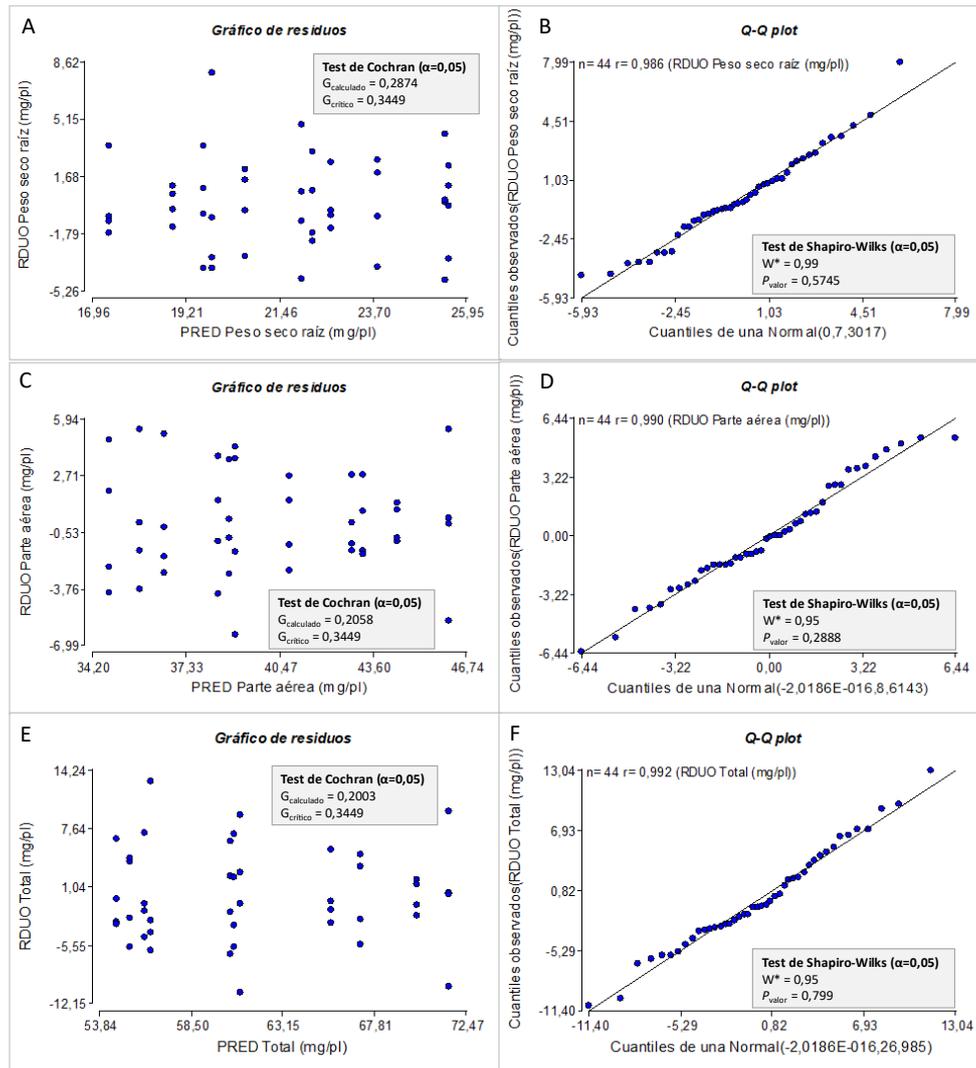


Figura 6.3.2c Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA para las variables de peso seco de raíz (A y B), parte aérea (C y D) y total del plantin (E y F). Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.3.2n Comparación de medias entre los tratamientos mediante test de Dunnett. Variables: Peso seco de raíces, parte aérea y total (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; $r=4$ para todos los niveles. El asterisco denota diferencias significativas respecto al control ($p>0,05$).

TRATAMIENTO	PS RAÍCES (mg)	PS AÉREO (mg)	PS TOTAL (mg)
FM 13	17,37	38,8	56,2
Control	18,89	35,8	54,7
TI 6	19,65	40,8 *	60,5
RI 17	19,84	36,6	56,5
TM 31	20,63	34,8	55,3
TI 28	21,99	39,0	61,0
TM 16	22,28	38,4	60,7
RhM 40	22,71	42,9 *	65,6 *
TI 15	23,82 *	43,3 *	67,1 *
TM 30	25,45 *	46,2 *	71,6 *
RI 13	25,54 *	44,4 *	70,0 *

- Ensayo en plantines de tomate var. Elpida en condiciones controladas**Tabla 6.3.2o** Análisis de varianza del peso seco de raíces de plantines de tomate en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de raíces (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=20,6.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	535,0	10,0	53,5	0,71	0,7057
Error	2474,62	33	74,99		
Total	3009,65	43			

Tabla 6.3.2p Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea de plantines de tomate en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso de parte aérea (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=15,6.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	13941,41	10	1394,14	3,53	<0,01
Error	13046,32	33	395,34		
Total	26987,74	43			

Tabla 6.3.2q Análisis de varianza del peso seco total de plantines de tomate en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: Peso total (mg plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=15,9.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	16838,86	10	1683,89	2,32	0,034
Error	23910,61	33	724,56		
Total	40749,47	43			

Tabla 6.3.2r Análisis de varianza del área foliar de plantines de tomate en los distintos tratamientos con aislamientos bacterianos promotores del crecimiento vegetal. Variable: área foliar (cm² plantin⁻¹); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; r=4; N=44; CV=16,7.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P VALOR
TRATAMIENTO	358,14	10	35,81	3,74	<0,01
Error	316,13	33	9,58		
Total	674,27	43			

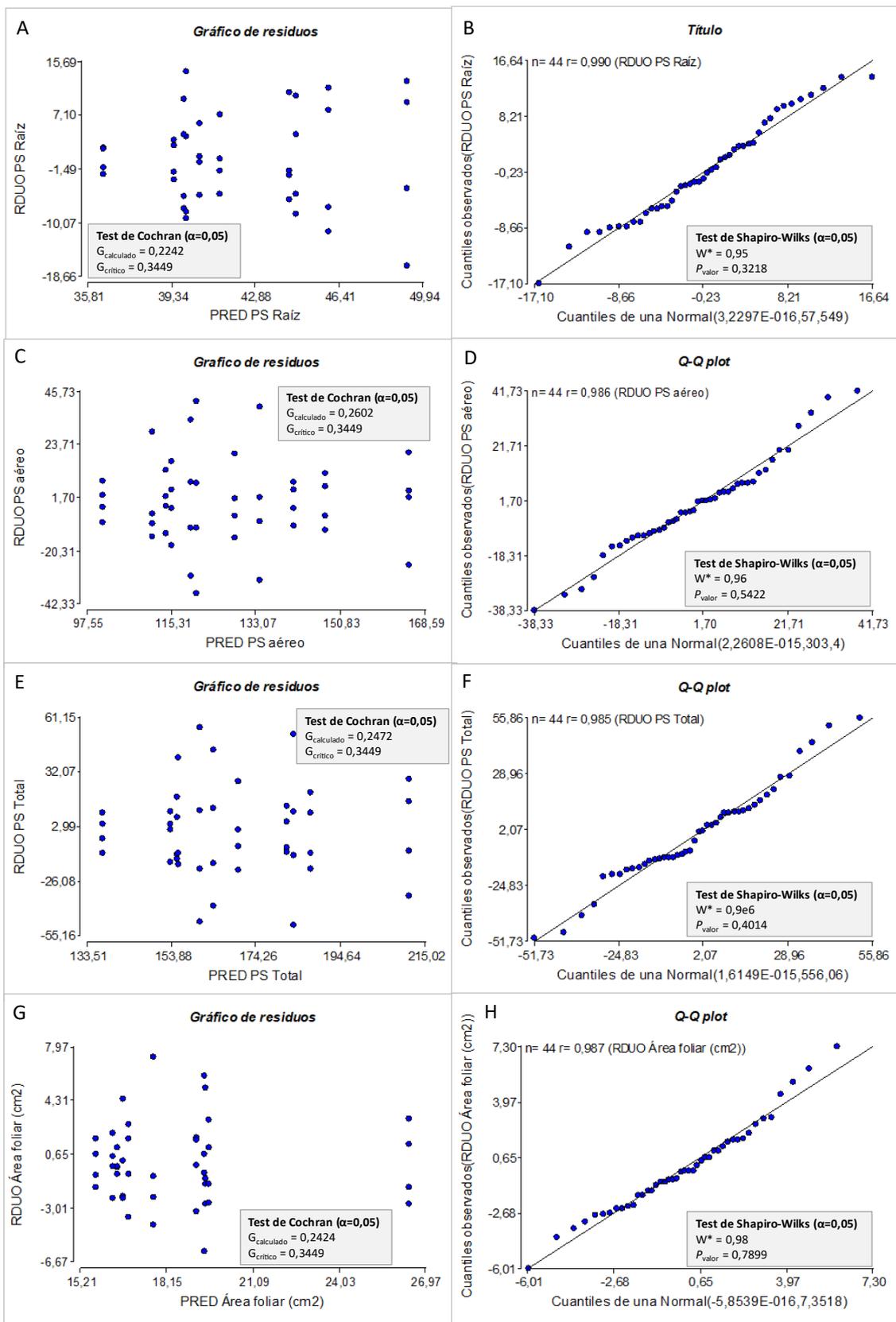


Figura 6.3.2d Comprobación gráfica y estadística de los supuestos del ANAVA para las variables de peso seco de raíz (A y B), parte aérea (C y D) y total del plantín (E y F). Homogeneidad de varianzas a través del gráfico de residuos y el test de Cochran (izq) y normalidad de los residuales a través del gráfico q-q plot y test de Shapiro-Wilks (der).

Tabla 6.3.2s Comparación de medias entre los tratamientos mediante test de Dunnett. Variables: Peso seco de raíces, parte aérea y total (mg plantin^{-1}), y área foliar (cm^2); $\alpha=0,05$; Tratamientos: 11; $r=4$ para todos los niveles. El asterisco denota diferencias significativas respecto al control ($p>0,05$).

TRATAMIENTO	PS RAÍCES (mg)	PS AÉREO (mg)	PS TOTAL (mg)	ÁREA FOLIAR (cm^2)
FM 13	36,45	100,8	137,2	16,3
Control	39,44	114,2	153,6	12,7
TI 28	39,89	147,5 *	187,5	17,7
TI 15	39,98	115,3	155,3	16,7
TM 31	39,98	120,7	160,6	19,5
TI 6	40,51	141,1 *	181,6	16,9
RhM 40	41,38	128,7	170,0	19,2
TM 16	44,33	111,2	155,5	16,5
RI 13	44,61	119,3	163,9	19,5
TM 30	45,95	165,4 *	211,3 *	26,4 *
RI 17	49,3	134,0	183,3	19,6

6.3.2.3 Análisis de suelos de la estación experimental Gorina (MDA)

Tabla 6.3.2t Resultado del análisis de suelo en invernadero de la chacra experimental Gorina (Ministerio de Desarrollo Agrario) previo a la realización de ensayos de promoción del crecimiento ecultivo de tomate y lechuga.

Determinación	Unidades	Valor	Consideraciones
Materia orgánica	%	3,6	Bien provisto
Carbono orgánico	%	2,1	
Nitrógeno total	%	0,19	Medianamente provisto
Relación C/N:		11,0	Óptima
pH en pasta	-	7,59	Moderadamente básico
Conductividad Eléctrica a 25°C	dS.m^{-1}	1,15	Efecto despreciable de la salinidad
Fósforo	ppm	68	Suelo provisto
Sodio	Meq.100g^{-1}	4,1	
Potasio	Meq.100g^{-1}	2,6	
Calcio	Meq.100g^{-1}	15,6	
Magnesio	Meq.100g^{-1}	7,0	
Capacidad de Intercambio Catiónico	Meq.100g^{-1}	24,4	Alta
Saturación de Sodio (PSI)	%	16,8	Medianamente sódico
Saturación potásica	%	10,7	Moderada
Saturación cálcica	%	63,9	Moderada
Saturación magnésica	%	28,7	Elevada
Relación Ca/Mg		2,2	Posible deficiencia en calcio
Relación Ca+Mg/K		8,7	Adecuada
Relación K/Mg:		0,4	Adecuada

CAPITULO 5: ANEXO C

Medios de cultivo y preparaciones

7.1 ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Tabla 7.1a Composición del medio de cultivo R₂A.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
Extracto de Levadura	0,5
Peptona	0,5
Casaminoácidos	0,5
Glucosa	0,5
Almidón soluble	0,5
Piruvato de sodio	0,3
Fosfato dipotásico	0,3
Sulfato de magnesio	0,05
Agar	15,0
<i>pH ajustado = 6,5</i>	

Tabla 7.1b Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas celulasas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Peptona	0,2
Carboximetilcelulosa	2,0
Agar	15,0
<i>pH ajustado = 5,5</i>	

Tabla 7.1c Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas pectinasas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
Pectina cítrica	10,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Solución nutritiva ^a	1,0
Peptona	0,5
Extracto de Levadura	0,5
Agar	15
<i>pH ajustado = 5,5</i>	

^a 5 mg l⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; 1,6 mg l⁻¹ de MnSO₄.H₂O; 1,4mg l⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 2 mg l⁻¹ de CoCl₂.

Tabla 7.1d Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas quitinasas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7
K ₂ HPO ₄	2,7
KH ₂ PO ₄	0,3
NaCl	0,5
KCl	0,5
Extracto de Levadura	0,13
Quitina Coloidal en pasta (~97% H°)	4,5
Púrpura de Bromocresol	0,15
Agar	15,0
<i>pH ajustado = 4,7</i>	

Preparación de la quitina coloidal en pasta mediante el protocolo descrito por [Agrawal & Kotasthane \(2012\)](#) con algunas modificaciones:

1. Se pesó 1,40 g de quitina coloidal Sigma® y se tomaron 25 ml de H₃PO₄ 85%. Luego de enfriados a 4°C durante dos horas, se mezclaron en erlenmeyer en agitación magnética a 4°C durante 24 horas.
2. Se agregaron 375 ml de etanol 96% previamente enfriado a 4°C y se dejó en agitación a 4°C durante 90 minutos.
3. Se centrifugó a 8000 rpm manteniendo la temperatura a 4°C durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante.
4. Se realizaron 3 lavados agregando en cada lavado 300 ml de agua destilada a 4°C, resuspendiendo el pellet con agitación magnética por 3 minutos y centrifugando a 6000 rpm y 4°C durante 10 min. Finalizado estos pasos se consiguió lavar el etanol y obtener la quitina en consistencia pastosa con un 90-95% de humedad, la cual se guardó a 4°C hasta su uso.

Tabla 7.1e Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas lipasas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
NaCl	5,0
CaCl ₂	0,1
Peptona	10,0
Tween 80	10,0
Agar	15,0
<i>pH ajustado = 5,5</i>	

Tabla 7.1f Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas amilasas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
Almidón soluble	10,00
CaCl ₂	0,15
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
NaCl	0,50
Peptona	5,00
Extracto de Levadura	2,00
Agar	15,00
<i>pH ajustado = 5,50</i>	

Tabla 7.1g Composición del medio de cultivo NBrip para determinación de solubilización de fósforo

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
Glucosa	10,00
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
KCl	0,20
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
<i>pH ajustado = 6,50</i>	

7.1.1 MÉTODO DE LA BICAPA PARA LA DETERMINACIÓN DE SIDERÓFOROS

Se hacen crecer las bacterias en medio de cultivo R₂A y luego de 48 horas se vierte la segunda capa de medio de cultivo que contiene Cromo Azurol S (CAS).

La preparación de la BICAPA (volumen final de 250 ml) se preparó con el siguiente protocolo:

1. Preparado A. Disolver 15,12 mg de cromo azurol S (CAS) en 12,5 ml de agua destilada. Luego agregar 2,5 ml de FeCl₃.

2. Preparado B. Disolver 18,23 mg de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) en 10 ml de agua destilada.

3. Preparado C. Agregar lentamente el **preparado A** al **preparado B** en constante agitación. Finalizado este paso, llevar el pH a 6,8.

4. Preparación final. Disolver 7,50 g de pipes en 225ml de agua destilada agitando constantemente. Ajustar el pH a 6,8 con KOH y agregar 2,25g de agarosa. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min y cuando baje la temperatura del preparado a ~50°C mezclar con el **preparado C**.

5. Agregado de la bicapa. Una vez que entibió la preparación, antes de que solidifique se vierte sobre la placa con el crecimiento bacteriano. Luego de 30 min se lee el resultado: la bicapa (de color azul) se decolorará a anaranjado-amarillo alrededor de los aislamientos bacterianos que hayan producido sideróforos.

Tabla 7.1h Composición del medio de cultivo LGI semisólido sin fuente nitrogenada

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
Sacarosa	5,0
K ₂ HPO ₄	0,2
KH ₂ PO ₄	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,002
Fe-EDTA 1,64% p/v	4,0 ml l ⁻¹
Azul de Bromotimol 0,5% en KOH 0,2N	5,0 ml l ⁻¹
Vitamina (10mg biotina + 20mg Piridoxina en 100ml AD)	1,0 ml l ⁻¹
Agar	1,8
<i>Ajustar pH a 6.0 - 6.2</i>	

Tabla 7.1i Composición del medio de cultivo NFb semisólido sin fuente nitrogenada

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)
Ac. Málico	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
Fe-EDTA 1,64% [p/v]	4,0 ml l ⁻¹
KOH	4,5
Azul de Bromotimol 0,5% en KOH 0,2N	2,0 ml l ⁻¹
Micronutrientes	2,0 ml l ⁻¹
Agar	1,8
<i>Ajustar pH a 6.5 - 6.8 con NaOH</i>	

Tabla 7.1j composición del medio de cultivo DF sal con L-triptofano.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l⁻¹)	Stock elementos traza 1000X	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	FeSO ₄ .2H ₂ O	0,338 g
KH ₂ PO ₄	4,0	H ₃ BO ₃	0,005 g
Na ₂ HPO ₄	6,0	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0055 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0625 g
Trazas stock 1000x	1 ml l ⁻¹	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,039 g
Glucosa	2,0	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,00895 g
L-triptofano	0,5	Agua destilada	50 ml
<i>Ajustar pH a 7</i>			

El L-triptofano se prepara separado del medio, en una parte del volumen final del medio de cultivo y se esteriliza por filtración usando un filtro de membrana 0,22 μm . Luego de filtrado se agrega al resto del medio de cultivo previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15min.

Tabla 7.1k Composición de la solución nutritiva Hoagland modificada para crecimiento de plantas.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (g l^{-1})	REACTIVO	CONCENTRACIÓN (mg l^{-1})
KNO ₃	0,50	FeSO ₄ .2H ₂ O	3,00
KH ₂ PO ₄	0,14	H ₃ BO ₃	2,86
Ca ₂ (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,18	MnCl.4H ₂ O	1,81
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
		Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	2,00
		EDTANa ₂	3,73
<i>Ajustar pH a 6,5</i>			

Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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–. doi:10.1186/s40538-015-0051-3
- Abdeljalil NO, Vallance J.** (2016) Characterization of Tomato-associated Rhizobacteria Recovered from Various Tomato-growing Sites in Tunisia. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7(5), –. doi:10.4172/2157-7471.1000351
- Acuña JJ, Durán P, Lagos L, et al.** (2016) Bacterial alkaline phosphomonoesterase in the rhizospheres of plants grown in Chilean extreme environments. *Biology and Fertility of Soils*, 52(6), 763–773. doi:10.1007/s00374-016-1113-9
- Afridi MS, Javed MA, Ali S, et al.** (2022) New opportunities in plant microbiome engineering for increasing agricultural sustainability under stressful conditions. *Front. Plant Sci.* 13:899464. doi:10.3389/fpls.2022.899464
- Agaras BC, Scandiani M, Luque A, et al.** (2015) Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. *Biological Control*, 90(), 173–186. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.07.003
- Ali S, Charles TC, Glick BR.** (2012) Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1139–1144. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05409.x
- Allard SM, Walsh CS, Wallis AE, et al.** (2016) *Solanum lycopersicum* (tomato) hosts robust phyllosphere and rhizosphere bacterial communities when grown in soil amended with various organic and synthetic fertilizers. *Science of The Total Environment*, 573(), 555–563. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.157
- Amara U, Khalid R, Hayat R.** (2015) Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production. In *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*, Maheshwari DK (Ed.). Springer International, pp. 87–103. doi:10.1007/978-3-319-24654-3
- Amasan N, Jayakumar V, Kumar K, et al.** (2012) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Ann Microbiol* 62, 805–810. doi:10.1007/s13213-011-0321-7
- Anguita-Maeso M, Olivares-García C, Haro C, et al.** (2020) Culture-dependent and culture-independent characterization of the olive xylem microbiota: effect of sap extraction methods. *Frontiers in Plant Science*, 10(), 1708–. doi:10.3389/fpls.2019.01708
- Angus AA, Hirsch AM** (2013) Biofilm formation in the rhizosphere: multispecies interactions and implications for plant growth. In: *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, John Wiley and Sons (ed), United States, New Jersey 1:701–712. doi:10.1002/9781118297674.ch66
- Anzalone A, Di Guardo M, Bella P, et al.** (2021) Bioprospecting of beneficial bacteria traits associated with tomato root in greenhouse environment reveals that sampling sites impact more than the root compartment. *Front. Plant Sci.* 12:637582. doi:10.3389/fpls.2021.637582
- Arif I, Batool M, Schenk PM.** (2020) Plant Microbiome Engineering: Expected Benefits for Improved Crop Growth and Resilience. *Trends in Biotechnology*, 38(12), 1385–1396. doi:10.1016/j.tibtech.2020.04.015
- Armanhi JSL, de Souza RSC, Damasceno de Brito N, et al.** (2018) A Community-Based Culture Collection for Targeting Novel Plant Growth-Promoting Bacteria from the Sugarcane Microbiome. *Frontiers in Plant Science*, 8(), 2191–. doi:10.3389/fpls.2017.02191
- Asghar H, Zahir Z, Arshad M, et al.** (2002) Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol Fertil Soils*, 35(4), 231–237. doi:10.1007/s00374-002-0462-8
- Azarbad H, Tremblay J, Bainard LD, et al.** (2022) Relative and Quantitative Rhizosphere Microbiome Profiling Results in Distinct Abundance Patterns. *Front. Microbiol.* 12:798023. doi:10.3389/fmicb.2021.798023
- Baldani JI, Reis VM, Videira SS, et al.** (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384(1-2), 413–431. doi:10.1007/s11104-014-2186-6
- Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, et al.** (2008) Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina
- Bao L, Gu L, Sun B, et al.** (2020) Seasonal variation of epiphytic bacteria in the phyllosphere of *Ginkgo biloba*, *Pinus bungeana* and *Sabina chinensis*. *FEMS Microbiol Ecol* 96:17. doi:10.1093/femsec/faa017
- Bar-On YM, Bar-On RP, Ron M.** (2018) The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 6506–6511. doi:10.1073/pnas.1711842115
- Barret M, Guimbaud J, Darrasse A, et al.** (2016) Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Mol Plant Pathol*, 17:791–795. doi:10.1111/mpp.12382

- Barros-Rodríguez A, Rangseekeaw P, Lasudee K, et al.** (2021) Impacts of Agriculture on the Environment and Soil Microbial Biodiversity. *Plants*, 10, 2325. doi:10.3390/plants10112325
- Bashan Y, Holguin G.** (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 1225e1228. doi:10.1016/s0038-0717(97)00187-9
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, et al.** (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1–33. doi:10.1007/s11104-013-1956
- Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, et al.** (2000) Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 396–402. doi:10.1038/sj.jim.7000010
- Bender SF, Wagg C, van der Heijden MGA.** (2016) An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends in Ecology & Evolution*, S0169534716000616–. doi:10.1016/j.tree.2016.02.016
- Beng KC, Corlett RT.** (2020) Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: Opportunities, challenges and prospects. *Biodivers. Conserv.*, 29, 2089–2121. doi:10.1007/s10531-020-01980-0
- Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA.** (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.*, 17(8):478–86. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al.** (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103–. doi:10.1186/s40168-020-00875-0
- Bergna A, Cernava T, Rändler M, et al.** (2018) Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes. *Phytobiomes J.*, 2, 183–193. doi:10.1094/PBIOMES-06-18-0029-R
- Bocchetto R, Gauna D, Bravo G, et al.** (2021) Bioeconomía del Norte Argentino: situación actual, potencialidades y futuros posibles. MINCYT - INTAINTE-UNNE-UNSa-UNSE. Síntesis para Tomadores de Decisiones. Buenos Aires.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al.** (2012) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
- Bonaterrea A, Badosa E, Daranas N, et al.** (2022) Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms* 10, no. 9: 1759. doi:10.3390/microorganisms10091759
- Bouffaud ML, Renoud S, Dubost A, et al.** (2018) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producers associated to maize and other Poaceae species. *Microbiome*, 6(1), 114–. doi:10.1186/s40168-018-0503-7
- Bouffaud ML, Renoud S, Moëgne-Loccoz Y, et al.** (2016) Is plant evolutionary history impacting recruitment of diazotrophs and *nifH* expression in the rhizosphere?. *Scientific Reports*, 6(1), 21690–. doi:10.1038/srep21690
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, et al.** (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, et al.** (2012) Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91–95. doi:10.1038/nature11336
- Campisano A, Antonielli L, Pancher M, et al.** (2014) Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pestmanagement. *PLoS ONE*, 9:e112763. doi:10.1371/journal.pone.0112763
- Caradonia F, Ronga D, Catellani M, et al.** (2019) Nitrogen Fertilisers Shape the Composition and Predicted Functions of the Microbiota of Field-Grown Tomato Plants. *Phytobiomes Journal*. doi:10.1094/PBIOMES-06-19-0028-R
- Castree N.** (2003) Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*, 28(1), 35–55. doi:10.1111/1475-5661.00076
- Chang WT, Chen YC, Jao CL.** (2007) Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology*, 98, 1224–1230. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.005
- Chen L, Zhang M, Liu D, et al.** (2022) Designing specific bacterial 16S primers to sequence and quantitate plant endobacteriome. *Sci. China Life Sci.* 65, 1000–1013. doi:10.1007/s11427-021-1953-5
- Chen S, Waghmode TR, Sun R, et al.** (2019) Root-associated microbiomes of wheat under the combined effect of plant development and nitrogen fertilization. *Microbiome*, 7(1), 136–. doi:10.1186/s40168-019-0750-
- CHFBA, Censo hortiflorícola provincia de Buenos Aires** (2005) Dirección Provincial de Estadística, Buenos Aires, Argentina.
- Chialva M, Lanfranco L, Bonfante P.** (2022) The plant microbiota: composition, functions, and engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 135–142. doi:10.1016/j.copbio.2021.07.003
- Chong J, Liu P, Zhou G, et al.** (2020) Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*. doi:10.1038/s41596-019-0264-1

- Chun-Juan W, YaHui G, Chao W, et al.** (2012) Enhancement of tomato (*Lycopersicon esculentum*) tolerance to drought stress by plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) *Bacillus cereus* AR156. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 20, 1097–1105. ISSN:1674-7968
- Cisneros Rojas CA, Sánchez de Prager M, Menjivar Flores JC.** (2017) Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en un Andisol de la región cafetera colombiana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 21–28. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65966
- Collavino MM, Cabrera EV, Ramos B, et al.** (2020) Effect of soil chemical fertilization on the diversity and composition of the tomato endophytic diazotrophic community at different stages of growth. *Brazilian Journal of Microbiology*. doi:10.1007/s42770-020-00373-3
- Compant S, Christophe C, Angela Sessitsch** (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. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.024
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, et al.** (2011) Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *MicrobEcol*, 62, 188–197. doi:10.1007/s00248-011-9883-y
- Compant S, Sessitsch A, Mathieu F.** (2012) The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria—a tribute to M.L.V. Galippe. *Plant Soil*, 356:299–301. doi:10.1007/s11104-012-1204-9
- Compant S, Samad A, Faist H, et al.** (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, doi:10.1016/j.jare.2019.03.004
- Cortés-López NG, Ordóñez-Baquera PL, Domínguez-Viveros J.** (2020) Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150-1173. doi:10.22319/rmcp.v11i4.5202
- Dastogeer KMG, Tumpa FH, Sultana A, et al.** (2020) Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Current Plant Biology*, 100161–. doi:10.1016/j.cpb.2020.100161
- Davis MW, Jorgensen EM** (2022) ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Front. Bioinform.* 2:818619. doi:10.3389/fbinf.2022.818619
- de Graaff MA, Hornslein NB, Heather L, et al.** (2019) Chapter One - Effects of agricultural intensification on soil biodiversity and implications for ecosystem functioning: A meta-analysis Author links open overlay panel. *Advances in Agronomy*, 155, 1–44. doi:10.1016/bs.agron.2019.01.001
- Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, et al.** (2013) Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*, 2(1), 154–. doi:10.1186/2193-1801-2-154
- de-Bashan LE, Nannipieri P, Antoun H, et al.** (2020) Application of beneficial microorganisms and their effects on soil, plants, and the environment: the scientific legacy of Professor Yoav Bashan. *Biology and Fertility of Soils*, s00374-020-01466-9–. doi:10.1007/s00374-020-01466-9
- Defensor del Pueblo de la Provincia de Buenos Aires, & Universidad Nacional de La Plata.** (2015) Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la provincia de Buenos Aires. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): https://www.agro.unlp.edu.ar/sites/default/files/paginas/informe_agroquimicos_comprimido.pdf
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, et al.** (2009) Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:16428–33. doi:10.1073/pnas.0905240106
- Dhanarajan A.** (2017) Sustainable Agriculture towards Food Security || Role of Organic Amendments in Sustainable Agriculture. *Springer Singapore*, doi:10.1007/978-981-10-6647-4_7.
- di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, et al.** (2018) Infostat versión 2018. Grupo Infostat, FCA. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible online (ultimo acceso: Febrero 2023): <https://www.infostat.com.ar/>
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y.** (2003) Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 107–149. doi:10.1080/713610853
- Dong CJ, Wang LL, Li Q, et al.** (2019) Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLOS ONE*, 14(11), e0223847–. doi:10.1371/journal.pone.0223847
- Donkor A, Osei-Fosu P, Dubey B, et al.** (2016) Pesticide residues in fruits and vegetables in Ghana: a review. *Environ Sci Pollut Res*, 23, 18966–18987. doi:10.1007/s11356-016-7317-6
- Doran JW, Zeiss MR.** (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 0–11. doi:10.1016/s0929-1393(00)00067-6

- Dunne C, Crowley JJ, Moenne-Loccoz Y, et al.** (1997) Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology*, 143(12), 3921–3931. doi:10.1099/00221287-143-12-3921
- Edgar RC.** (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, et al.** (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), E911–E920. doi:10.1073/pnas.1414592112
- Enespa y Chandra P.** (2022) Tool and techniques study to plant microbiome current understanding and future needs: an overview. *Commun Integr Biol*, 10;15(1):209-225. doi:10.1080/19420889.2022.2082736
- Escudero-Martinez C, Bulgarelli D.** (2019) Tracing the evolutionary routes of plant–microbiota interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 34–40. doi:10.1016/j.mib.2019.09.013
- FAO.** (2015) Construyendo una visión común para la agricultura y alimentación. Principios y enfoques. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ISBN: 978-92-5-308471-5
- FAO.** (2018) Codex Alimentarius. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Disponible online (último acceso: Febrero 2023): <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
- Fernandez-Acevedo V, del Pino M, Gamboa S.** (2015) Caracterización de los agroquímicos usados en los cultivos hortícolas de La Plata en relación a las Buenas Prácticas Agrícolas. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): https://www.researchgate.net/profile/Victoria-Fernandez-Acevedo/publication/324535737_Caracterizacion_de_los_agroquimicos_usados_en_los_cultivos_hortícolas_de_La_Plata_en_relacion_a_las_Buenas_Practicas_Agrícolas/links/5ad3f0aa0f7e9b2859360616/Caracterizacion-de-los-agroquimicos-usados-en-los-cultivos-hortícolas-de-La-Plata-en-relacion-a-las-Buenas-Practicas-Agrícolas.pdf
- Ferraris G, Bravo ML.** (2014) Organizaciones de productores hortícolas del Cinturón Verde de La Plata. *VIII Jornadas de Sociología de la UNLP, Departamento de Sociología de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, La Plata*. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): https://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/trab_eventos/ev.4751/ev.4751.pdf
- Lauría A.** (2010) Informe de Estructura La Plata - Berisso – Ensenada: Caracterización productiva regional 2010. *Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Económicas MBA - Maestría en Dirección de Empresas*. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/72092/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Fierer N.** (2017) Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 15(10):579-590. doi:10.1038/nrmicro.2017.87
- Figueiredo Santos L, Lopes Olivares F.** (2021) Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology*, 26, 100–128. doi:10.1016/j.cpb.2021.100198
- Figuerola ELM, Guerrero LD, Türkowsky D, et al.** (2015) Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. *Environmental Microbiology*, 17(3), 678–688. doi:10.1111/1462-2920.12497
- Fitzpatrick CR, Salas-González I, Conway JM, et al.** (2020) The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, 74(1). doi:10.1146/annurev-micro-022620-014327
- Flemer B, Gulati S, Bergna A, et al.** (2022) Biotic and Abiotic Stress Factors Induce Microbiome Shifts and Enrichment of Distinct Beneficial Bacteria in Tomato Roots. *Phytobiomes Journal*, 6:4, 276-289. doi:10.1094/PBIOMES-10-21-0067-R
- Flouri TT, Nichols B, Quince C, et al.** (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. doi:10.7717/peerj.2584
- Fraser TD, Lynch DH, Bent E, et al.** (2015) Soil bacterial *phoD* gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. *Soil Biology and Biochemistry*, 88(), 137–147. doi:10.1016/j.soilbio.2015.04.014
- Frene JP, Wall LG, Gabbarini LA.** (2018) El manejo agrícola como herramienta clave para una agricultura de conservación. Su análisis desde la bioquímica y la microbiología del suelo. *Divulgatio. Perfiles académicos De Posgrado*, 2(05), 1–16. doi:10.48160/25913530di05.55
- Gamalero E, Glick BR.** (2015). Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. *Plant Physiology*, 169(1), 13–22. doi:10.1104/pp.15.00284
- García M** (2011) El cinturón hortícola platense: ahogándonos en un mar de plásticos. Un ensayo acerca de la tecnología, el ambiente y la política. *Theomai*, 23, 35-53. ISSN: 1515-6443

- García M.** (2015) Horticultura de La Plata (Buenos Aires): Modelo productivo irracionalmente exitoso. *Rev. Fac. Agron.* 114, 190-201. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/48777/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, et al.** (1999) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, *World Scientific*, London. 270 pp. doi:10.1142/p130
- Glick BR.** (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 1–15. doi:10.6064/2012/963401
- Glick BR.** (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
- Goswami D, Thakkar IN, Dhandhukia P.** (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1): 1127500. doi:10.1080/23311932.2015.1127500
- Grobkopf T, Soyer OS.** (2014) Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 72–77. doi:10.1016/j.mib.2014.02.002
- Gupta A, Singh UB, Sahu PK, et al.** (2022) Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19, 3141. doi:10.3390/ijerph19053141
- Gupta R, Anand G, Gaur R, et al.** (2021) Plant–microbiome interactions for sustainable agriculture: a review. *Physiol Mol Biol Plants*, 27, 165–179. doi:10.1007/s12298-021-00927-1
- Hacquard S.** (2016) Disentangling the factors shaping microbiota composition across the plant holobiont. *New Phytologist*, 209(2):454–7. doi:10.1111/nph.13760
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, et al.** (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 79(3):293-320. doi:10.1128/MMBR.00050-14.
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, et al.** (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil*, 321:235–75. doi:10.1007/s11104-008-9814-y
- Herrera-Quiterio A, Toledo-Hernández E, Aguirre-Noyola JL, et al.** (2020) Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*, S032575411930118X–. doi:10.1016/j.ram.2019.08.003
- Hiltner L** (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb DLG* 98:59–78.
- Huhe, Borjigin S, Cheng Y, et al.** (2014) Effect of Abandonment on Diversity and Abundance of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria and Total Bacteria in the Cropland Soils of Hulun Buir, Inner Mongolia. *PLoS ONE*, 9(9), e106714. doi:10.1371/journal.pone.0106714
- Iturralde ET, Stocco MC, Faura A, et al.** (2020) Coinoculation of soybean plants with *Bradyrhizobium japonicum* and *Trichoderma harzianum*: Coexistence of both microbes and relief of nitrate inhibition of nodulation. *Biotechnology Reports*, 26(6), 1-6. doi:10.1016/j.btre.2020.e00461
- Jacoby R, Peukert M, Succurro A, et al.** (2017) The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1617–. doi:10.3389/fpls.2017.01617
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0020396
- Jorquera MA, Martínez OA, Marileo LG, et al.** (2014) Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(1), 99–107. doi:10.1007/s11274-013-1427-9
- Kandel S, Joubert P, Doty S.** (2017) Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*, 5(4), 77–. doi:10.3390/microorganisms5040077
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, et al.** (2020) Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, S0966842X20300871–. doi:10.1016/j.tim.2020.03.016
- Kavamura VN, Hayat R, Clark IM, et al.** (2018) Inorganic Nitrogen Application Affects Both Taxonomical and Predicted Functional Structure of Wheat Rhizosphere Bacterial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1074–. doi:10.3389/fmicb.2018.01074
- Kavamura VN, Robinson RJ, Hayat R, et al.** (2019) Land management and microbial seed load effect on rhizosphere and endosphere bacterial community assembly in wheat. *Front. Microbiol.*, 10, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2019.02625.
- Ke J, Wang B, Yoshikuni Y.** (2020) Microbiome Engineering: Synthetic Biology of Plant-Associated Microbiomes in Sustainable Agriculture. *Trends in Biotechnology*, S0167779920302031–. doi:10.1016/j.tibtech.2020.07.008

- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al.** (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- Kim BR, Shin J, Guevarra RB, et al.** (2017) Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27:2089-2093. doi:10.4014/jmb.1709.09027
- Kim HS, Mee KS, Ho WJ, et al.** (2012) Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuense* strain KJ9C8 as a biocontrol agent of Phytophthora blight of pepper. *Crop protection*, 32, 129–137. doi:10.1016/j.cropro.2011.10.018
- Kloepper JW, Schroth MN** (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Station de Pathologie Végétale et Phyto-Bactériologie (Ed.), Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. II. Gilbert-Clarey, Tours, France, pp. 879-882. doi:10.12691/wjar-6-4-2
- Konopka A.** (2009). What is microbial community ecology?. *ISME J*, 3(11), 1223–1230. doi:10.1038/ismej.2009.88
- Kress WJ, Erickson DL.** (2012) Chapter 1: Methods in Molecular Biology™: DNA Barcodes. *Methods and Protocols*, 3–8. doi:10.1007/978-1-61779-591-6_1
- Kumar I, Mondal M, Gurusamy R, et al.** (2019) Plant-microbiome interaction and the effects of biotic and abiotic components in agroecosystem. In: Rhizosphere, Microbiome Agro-Ecology Vol. 2. *Microb. Interv. Agric. Environ.*, 517–546. doi:10.1007/978-981-13-8383-0_18.
- Kumar J, Singh D, Ghosh P, et al.** (2017) Endophytic and epiphytic modes of microbial interactions and benefits. In: Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds) Plant–microbe interactions in agro-ecological perspectives. *Springer*, Singapore, pp 227–253x. doi:10.1007/978-981-10-5813-4_12
- Kumar U; Kumar NA, Shahid M, et al.** (2018) Continuous application of inorganic and organic fertilizers over 47 years in paddy soil alters the bacterial community structure and its influence on rice production. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 262(), 65–75. doi:10.1016/j.agee.2018.04.016
- Kwak MJ, Kong HG, Choi K, et al.** (2018) Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nat. Biotechnol.*, 36, 1100–1109.
- Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW.** (2016) Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome*, 4:27. doi:10.1186/s40168-016-0174-1
- Lagos L, Maruyama F, Nannipieri P, et al.** (2015) Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2). doi:10.4067/S0718-95162015005000042
- Lahlali R, Dina SS, Ibrahim ZB, et al.** (2021) High-throughput molecular technologies for unraveling the mystery of soil microbial community: challenges and future prospects. *Heliyon*, 7(10). doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08142.Rognes
- Lang M, Li H, Lakshmanan P, et al.** (2022) *phoD*-harboring bacterial community composition dominates organic P mineralization under long-term P fertilization in acid purple soil. *Front. Microbiol.* 13:1045919. doi:10.3389/fmicb.2022.1045919
- Larousse M, Rancurel C, Syska C, et al.** (2017) Tomato root microbiota and Phytophthora parasitica-associated disease. *Microbiome*, 5, 56. doi:10.1186/s40168-017-0273-7
- Leclere V, Bechet M, Adam A, et al.** (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4577–4584. doi:10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005
- Lederberg J, McCray AT.** (2001) `Ome Sweet `Omics--A genealogical treasury of words. *The Scientist*. 2001;15(7):8–8
- Lee SA, Kim Y, Kim JM et al.** (2019) A preliminary examination of bacterial, archaeal, and fungal communities inhabiting different rhizocompartments of tomato plants under real-world environments. *Sci Rep*, 9, 9300. doi:10.1038/s41598-019-45660-8
- Lemanceau P, Blouin M, Muller D, et al.** (2017) Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, S1360138517300882. doi:10.1016/j.tplants.2017.04.008
- Lennon JT, Locey KJ.** (2020) More support for Earth's massive microbiome. *Biol Direct*, 4;15(1):5. doi: 10.1186/s13062-020-00261-8
- Lindow SE, Brandl MT.** (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.*, 69(4):1875-83. doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003
- Liu S, Meng J, Jiang L, et al.** (2017) Rice husk biochar impacts soil phosphorous availability, phosphatase activities and bacterial community characteristics in three different soil types. *Applied Soil Ecology*, 116, 12-22. doi:10.1016/j.apsoil.2017.03.020
- López SMY, Pastorino G, Franco M, et al.** (2018) Microbial endophytes that live within the seeds of two tomato hybrids cultivated in Argentina. *Agronomy* 8(8):136. doi:10.3390/agronomy8080136

- López SMY, Pastorino GN, Fernández-González AJ, et al.** (2020) The endosphere bacteriome of diseased and healthy tomato plants. *Archives of Microbiology*. doi:10.1007/s00203-020-01987-9
- López-López A, Rogel MA, Ormeño-Orillo E, et al.** (2010) *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 33: 322–327. doi:10.1016/j.syapm.2010.07.005
- Lucas R, Groeneveld J, Harms H, et al.** (2016) A critical evaluation of ecological indices for the comparative analysis of microbial communities based on molecular datasets. *FEMS Microbiology Ecology*. doi:10.1093/femsec/fiw209
- Lugtenberg B, Faina K.** (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63:1, 541-556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, et al.** (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488:86–90. doi:10.1038/nature11237
- Lyu D, Zajonc J, Pagé A, et al.** (2021) Plant Holobiont Theory: The Phytomicrobiome Plays a Central Role in Evolution and Success. *Microorganisms*, 9, 675. doi:10.3390/microorganisms9040675
- Mac Loughlin TM, Peluso L, Marino DJG.** (2017) Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Science of The Total Environment*, 598, 572–580. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.116
- Macedo G, Pieter H, van Veelen J, et al.** (2021) Targeted metagenomics reveals inferior resilience of farm soil resistome compared to soil microbiome after manure application. *Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145399
- Magurran A, Henderson P** (2003) Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature* 422, 714–716 (2003). doi:10.1038/nature01547
- MAGyP** (2020) La producción de tomate en Argentina. Dirección de Producción Agrícola, Dirección Nacional de Agricultura Subsecretaría de Agricultura, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/produccion-tomate-argentina-diciembre-2020.pdf>
- García M, Rozadilla G, Cano L.** (2020). Agua no potable para consumo en la Horticultura de La Plata (Buenos Aires): Causas, consecuencias y alternativas. *Ciencia, Docencia Y Tecnología*, 31(60), 245–262. doi:10.33255/3160/497
- Maheshwari DK, Dheeman S, Agarwal M.** (2015) Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture. In *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem* (pp. 159–182), D. K. Maheshwari (Ed.). Springer International. doi:10.1007/978-3-319-24654-3_7
- Mamani de Marchese A, Filippone MP.** (2018) Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 38(1), 9-21. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=2314-369X20180001&lng=pt&nrm=iso
- Marcon E, Héroult B, Freckleton R.** (2015) Decomposing phylodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(3), 333–339. doi:10.1111/2041-210X.12323
- Maron PA, Sarr A, Kaisermann A, et al.** (2018) High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.02738-17–. doi:10.1128/AEM.02738-17
- Meena RS, Kumar S, Datta R, et al.** (2020) Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. *Land*, 9(2), 34. doi:10.3390/land9020034
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM.** (2013) The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 634–663. doi:10.1111/1574-6976.12028
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, et al.** (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033):1097-100. doi:10.1126/science.1203980
- Mitter B, Pfaffenbichler N, Flavell R, et al.** (2017) A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds. *Front. Microbiol.* 8:11. doi: 10.3389/fmicb.2017.00011
- Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, et al.** (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLOS ONE*, 12(11), e0187913–. doi:10.1371/journal.pone.0187913
- Mongkolthananuk W** (2012) Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22:1597-1604. doi:10.4014/jmb.1204.04013
- Mortinho ES, Jalal A, da Silva Oliveira CE, et al.** (2022) Co-Inoculations with Plant Growth-Promoting Bacteria in the Common Bean to Increase Efficiency of NPK Fertilization. *Agronomy*, 12(6):1325. doi:10.3390/agronomy12061325
- Mueller UG, Sachs JL.** (2015) Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in Microbiology*, S0966842X15001729–. doi:10.1016/j.tim.2015.07.009

- Murillo N, Paliouff C.** (2021) Visión rural. Año XXVIII - Nº 139 SEPT. - OCTUBRE 2021 ISSN 0328-7009. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta_visionrural_139_0.pdf
- Eltlbany N, Baklawa M, Ding GC, et al.** (2019) Enhanced tomato plant growth in soil under reduced P supply through microbial inoculants and microbiome shifts. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9). doi:10.1093/femsec/fiz124
- Nautiyal CS.** (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 170(1), 265–270. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x
- Nielsen UN, Ayres E, Wall DH, et al.** (2011) Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function relationships. *European Journal of Soil Science*, 62: 105-116. doi:10.1111/j.1365-2389.2010.01314.x
- Noman M, Ahmed T, Ijaz U, et al.** (2021) Plant–Microbiome Crosstalk: Dawning from Composition and Assembly of Microbial Community to Improvement of Disease Resilience in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 6852. doi:10.3390/ijms22136852
- Obianuju EC, Babalola OO.** (2020) Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*, 126569–. doi:10.1016/j.micres.2020.126569
- Oksanen J.** (2015) Multivariate Analysis of Ecological Communities in R: Vegan Tutorial. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>
- Olimi E, Kusstatscher P, Wicaksono WA, et al.** (2022) Insights into the microbiome assembly during different growth stages and storage of strawberry plants. *Environmental Microbiome* 17, 21. doi:10.1186/s40793-022-00415-3
- Omomowo OI, Babalola OO.** (2019) Bacterial and fungal endophytes: tiny giants with immense beneficial potential for plant growth and sustainable agricultural productivity. *Microorganisms* 7:481. doi:10.3390/microorganisms7110481
- Orozco-Mosqueda C, Flores A, Rojas-Sánchez B, et al.** (2021) Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement . *Agronomy*. doi:10.3390/agronomy11061167
- Ortigoza V.** (2011) Análisis de eficiencia del Sector Primario en la región de La Plata, Berisso y Ensenada. Trabajo final de Magister, UNLP - FCE - Maestría en Dirección de Empresas. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/22750/Documento_completo.pdf?sequence=4
- O'Toole GA.** (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47). doi:10.3791/2437
- Ottesen AR, González Peña A, White JR, et al.** (2013) Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiol*, 13(1), 114–. doi:10.1186/1471-2180-13-114
- Pajares S, Bohannan BJM.** (2016) Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01045
- Parks DH, Beiko RG.** (2010) Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics*, 26(6), 715–721. doi:10.1093/bioinformatics/btq041
- Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, et al.** (2014) STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123–3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, et al.** (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods*, 70(1), 0–131. doi:10.1016/j.mimet.2007.03.02
- Petrini O.** (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (p 179 –197), Andrews JH, Hirano SS (eds). *Springer-Verlag*, NY. doi:10.1007/978-1-4612-3168-4_9.
- Pina JI.** (2012) Clasificación Toxicológica y Etiquetado de Productos Fitosanitarios: Volumen III (1 Ed.). International Life Science Institute. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): <https://www.casafe.org/wp-content/uploads/2019/05/Clasificacion-toxicologica-etiquetado-fitosanitarios.pdf>
- Polechová J, Storch D.** (2018) Ecological Niche. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 3, 72-80. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.11113-3
- Porto de Souza Vandenberghe L, Blandon Garcia LM, Rodrigues C, et al.** (2017) Potential applications of plant probiotic microorganisms in agriculture and forestry. *AIMS Microbiology*, 3(3): 629-648. doi:10.3934/microbiol.2017.3.629
- Poudel R, Jumpponen A, Kennelly MM, et al.** (2019) Rootstocks shape the rhizobiome: Rhizosphere and endosphere bacterial communities in the grafted tomato system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85, e01765–e01818. doi:10.1128/AEM.01765-18
- Pretty J.** (2008) Agricultural sustainability : concepts , principles and evidence. *Phil.Trans. R. Soc.*, 363, 447–465. doi:10.1098/rstb.2007.2163

- Rahman MM, Nahar K, Ali MM, et al.** (2020) Effect of Long-Term Pesticides and Chemical Fertilizers Application on the Microbial Community Specifically Anammox and Denitrifying Bacteria in Rice Field Soil of Jhenaidah and Kushtia District, Bangladesh. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104, 828–833. doi:10.1007/s00128-020-02870-5
- Rastogi G, Sani RK.** (2011) Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. In: *Microbes and Microbial Technology*, Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. (eds). Springer, NY. doi:10.1007/978-1-4419-7931-5_2
- Reasoner DJ, Geldreich EE.** (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1). doi:10.1128/aem.49.1.1-7.1985
- Reinhold-Hurek B, Hurek T.** (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:435–43. doi:10.1016/j.pbi.2011.04.004.
- Reinhold-Hurek B, Bünge W, Burbano C, et al.** (2015) Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 403–424. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102342
- Rilling JI, Acuña JA, Nannipieri P, et al.** (2018) Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth–promoting bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, S003807171830422X–. doi:10.1016/j.soilbio.2018.12.012
- Rilling JI, Acuña JA, Nannipieri P, et al.** (2018) Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth–promoting bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, S003807171830422X–. doi:10.1016/j.soilbio.2018.12.012
- Riva V, Mapelli F, Bagnasco A, et al.** (2022) A Meta-Analysis Approach to Defining the Culturable Core of Plant Endophytic Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol.*, 88(6):e0253721. doi: 10.1128/aem.02537-21
- Rodríguez Amor D, Dal Bello M.** (2019) Bottom-Up Approaches to Synthetic Cooperation in Microbial Communities. *Life*, 9(1), 22–. doi:10.3390/life9010022
- Rodríguez CE, Antonielli L, Mitter B, et al.** (2020) Heritability and functional importance of the Setariaviridis bacterial seed microbiome. *Phytobiomes J*, 4:40–52. doi:10.1094/PBIOMES-04-19-0023-R
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, et al.** (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 18;4:e2584. doi:10.7717/peerj.2584
- Romano I, Ventorino V, Pepe O.** (2020) Effectiveness of Plant Beneficial Microbes: Overview of the Methodological Approaches for the Assessment of Root Colonization and Persistence. *Front. Plant Sci.*, 11:6. doi:10.3389/fpls.2020.00006
- Romero FM, Marina M, Pieckenstain FL.** (2016) Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in Microbiology*, S0923250815001977–. doi:10.1016/j.resmic.2015.11.001p
- Romero FM, Marina M, Pieckenstain FL.** (2014) The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 351(2), 187–194. doi:10.1111/1574-6968.12377
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I.** (2022) The Role of Microorganisms in the Evolution of Animals and Plants. *Microorganisms*, 10, 250. doi:10.3390/microorganisms10020250
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E.** (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8):827-37. doi:10.1094/MPMI-19-0827
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al.** (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529–. doi:10.1186/s12859-017-1934-z
- Ryan PR, Dessaux Y, Thomashow LS, et al.** (2009) Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil*, 321(1-2), 363–383. doi:10.1007/s11104-009-0001-6
- Samad MYA, C.Nyonya AR, Abu Bakar S, et al.** (1989) A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9(1), 51–56. doi:10.1016/0167-7012(89)90030-
- San León D, Nogales J.** (2022) Toward merging bottom–up and top–down model-based designing of synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 69. doi:10.1016/j.mib.2022.102169
- Sánchez-Cañizares C, Jorrín B, Poole PS, et al.** (2017) Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 188–196. doi:10.1016/j.mib.2017.07.001

- Sankar G, Sundaramoorthy P, Nagarajan M, et al.** (2017) Chapter 7: Role of Organic Amendments in Sustainable Agriculture. In Sustainable Agriculture towards Food Security, Dhanarajan A (Ed). *Springer* Singapore, 111–124. doi:10.1007/978-981-10-6647-4_7
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MdC, et al.** (2015) Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. *Microbiological Research*, S094450131530029X-. doi:10.1016/j.micres.2015.11.008
- Sapkota R, Knorr K, Jorgensen LN, et al.** (2015) Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytol*, 207:1134–1144. doi:10.1111/nph.13418
- Sarhan MS, Hamza MA, Youssef HH, et al.** (2019) Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media – A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 15-27. doi:10.1016/j.jare.2019.04.002.
- Schloss PD, McBain AJ.** (2019) Reintroducing mothur: 10 Years Later. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(2). doi:10.1128/AEM.02343-19
- SENASA** (2012) Manual para la aplicación de fitosanitarios. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/GESTION%20AMBIENTAL/Manuales/6_Manual_Aplicadores.pdf
- Sessitsch A, Hardoim P, Doring J, et al.** (2011) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 25:28–36. doi:10.1094/MPMI-08-11-0204
- Shade A, Jacques MA, Barret M.** (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 37:15–22. doi:10.1016/j.mib.2017.03.010
- Shaik SP, Thomas P.** (2019) *In Vitro* Activation of Seed-Transmitted Cultivation-Recalcitrant Endophytic Bacteria in Tomato and Host-Endophyte Mutualism. *Microorganisms*, 7(5):132. doi: 10.3390/microorganisms7050132
- Sharma R, Pooniya V, Bisaria VS, et al.** (2020) Bioinoculants play a significant role in shaping the rhizospheric microbial community: a field study with *Cajanus cajan*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 44–. doi:10.1007/s11274-020-02818-1
- 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. doi:10.1186/1471-2164-14-271
- Shimahara K.** (1988) Preparation of crustacean chitin. In *Methods in Enzymology - Biomass Part B: Lignin, Pectin, and Chitin* Volume 161, Wood SA, Kellogg ST (Eds), 417–423. doi:10.1016/0076-6879(88)61049-4
- Silva HSA, Romeiro RDS, Macagnan D, et al.** (2004) Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29, 288–295. doi:10.1016/S1049-9644(03)00163-4
- Silveira R, Bandeira de Mello TdR, Silveira Sartori MR, et al.** (2021) Seasonal and long-term effects of nutrient additions and liming on the nifH gene in cerrado soils under native vegetation. *iScience*. doi:10.1016/j.isci.2021.102349
- Singh BK, Trivedi P.** (2017) Microbiome and the future for food and nutrient security. *Microb. Biotechnol.*, 10, 50–53. doi:10.1111/1751-7915.12592.
- Singh P, Singh J, Singh-Rajput R, et al.** (2019) Exploration of multitrait antagonistic microbes against *Fusarium oxysporum* *F. sp. lycopersici*. *Journal of Applied and Natural Science*, 11(2): 503 – 510. doi:10.31018/jans.v11i2.2111
- Sivakumar N, Sathishkumar R, Selvakumar G, et al.** (2020) Phyllospheric Microbiomes: Diversity, Ecological Significance, and Biotechnological Applications. In: *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*, Yadav A, Singh J, Rastegari A, et al. (eds). *Sustainable Development and Biodiversity*, 25. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-38453-1_5
- Sneha GR, Swarnalakshmi K, Sharma M, et al.** (2021) Soil type influence nutrient availability, microbial metabolic diversity, eubacterial and diazotroph abundance in chickpea rhizosphere. *World J Microbiol Biotechnol* 37, 167. doi:10.1007/s11274-021-03132-0
- Solis M, Cappelletti N, Bonetto C, et al.** (2021). Attenuation of insecticide impact by a small wetland in a stream draining a horticultural basin in Argentina. *Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.147317
- Someya N, Masaharu K, Tomohiro M, et al.** (2021) Detection of Culturable Bacteria from Tomato Seeds on Media Semi-selective for the Canker Pathogen. *Biocontrol Science*, 26(1), 61-65. doi:10.4265/bio.26.61
- Soriano S.** (1978) Fijación del nitrógeno atmosférico en el suelo por bacterias asimbióticas del grupo *Azotobacter*. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/29232>
- Staley JT, Konopka A.** (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* 1985 39:1, 321-346. doi: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541

- Stavisky A.** (2015) Situación actual de la plasticultura en Argentina. Comité Argentino de Plásticos para la Producción Agropecuaria. Congreso Internacional de plásticos en la agricultura. Revista Plásticos N°308. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): <http://www.revistaplasticos.com/308/files/assets/basic-html/page27.html>
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al.** (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*, 115(8), 891–899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Suman A, Govindasamy V, Ramakrishnan B, et al.** (2022) Microbial Community and Function-Based Synthetic Bioinoculants: A Perspective for Sustainable Agriculture. *Front. Microbiol.* 12:805498. doi:10.3389/fmicb.2021.805498
- Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al.** (2013) Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 5962–5969. doi:10.1128/AEM.01282-13
- Tabacchioni S, Passato S, Ambrosino P, et al.** (2021) Identification of Beneficial Microbial Consortia and Bioactive Compounds with Potential as Plant Biostimulants for a Sustainable Agriculture. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms9020426
- Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, et al.** (2014) Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE*, 9(8), e105592–. doi:10.1371/journal.pone.0105592
- Tariq M, Noman M, Ahmed T, et al.** (2017) Antagonistic features displayed by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. *J Plant Sci Phytopathol.*, 1: 038-043. DOI: 10.29328/journal.jpssp.1001004
- Teather RM, Wood PJ.** (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.*, 43(4):777-80. doi: 10.1128/aem.43.4.777-780.1982.
- Thomas P, Shaik SP.** (2019) Molecular Profiling on Surface-Disinfected Tomato Seeds Reveals High Diversity of Cultivation-Recalcitrant Endophytic Bacteria with Low Shares of Spore-Forming Firmicutes. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-019-01440-5
- Thomludi EE, Tsalgatidou PC, Douka D, et al.** (2019) Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants - The compatibility issue. *Hellenic Plant Protection Journal*, 12(2), 61-77. doi:10.2478/hppj-2019-0007
- Tian BY, Cao Y, Zhang KQ.** (2015) Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots. *Sci. Rep.*, 5, 17087. doi:10.1038/srep17087
- Tian B, Zhang C, Ye Y, et al.** (2017) Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 247, 149–156. doi:10.1016/j.agee.2017.06.041
- Toju H, Peay KG, Yamamichi M, et al.** (2018) Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*, 4(5), 247–257. doi:10.1038/s41477-018- 0139-4.
- Treonis AM, Erin EA, Jeffrey SB, et al.** (2010) Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Applied Soil Ecology*, 46(1), 0–110. doi:10.1016/j.apsoil.2010.06.017
- Turner TR, James E, Poole P.** (2013) The plant microbiome. *Genome Biol.*, 14, 209. doi:10.1186/gb-2013-14-6-209
- Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J, et al.** (2013) Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J.* 7:2248–58. doi:10.1038/ismej.2013.119
- Turner BL.** (2010) Variation in pH Optima of Hydrolytic Enzyme Activities in Tropical Rain Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6485–6493. doi:10.1128/AEM.00560-10
- Větrovský T, Baldrian P, Morais D, et al.** (2018). SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*. doi:10.1093/bioinformatics/bty071
- Vishwakarma K, Kumar N, Shandilya C, et al.** (2020) Revisiting Plant-Microbe Interactions and Microbial Consortia Application for Enhancing Sustainable Agriculture: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 560406–. doi:10.3389/fmicb.2020.560406
- Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Morales-García YE, et al.** (2016) Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 1(1):1–10. Disponible online (último acceso: Febrero 2023): <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.26a62fnd2t88>
- Vorholt JA, Vogel C, Carlström CI, et al.** (2017) Establishing Causality: Opportunities of Synthetic Communities for Plant Microbiome Research. *Cell Host Microbe.*, 22(2):142-155. doi:10.1016/j.chom.2017.07.004. PMID: 28799900.
- Wall LG, Gabbarini LA, Ferrari AE, et al.** (2019) Changes of paradigms in agriculture soil microbiology and new challenges in microbial ecology. *Acta Oecologica*, 95, 68–73. doi:10.1016/j.actao.2019.02.001

- Wall D, Nielsen U, Six J.** (2015) Soil biodiversity and human health. *Nature*, 528, 69–76. doi:10.1038/nature15744
- Wang Q, Wang C, Yu W, et al.** (2018) Effects of Nitrogen and Phosphorus Inputs on Soil Bacterial Abundance, Diversity, and Community Composition in Chinese Fir Plantations. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1543–. doi:10.3389/fmicb.2018.01543
- Wang X, Wang M, Xie X, et al.** (2020) An amplification-selection model for quantified rhizosphere microbiota assembly. *Science Bulletin*, S2095927320301341–. doi:10.1016/j.scib.2020.03.005
- Wassermann B, Cernava T, Müller H, et al.** (2019) Seeds of native alpine plants host unique microbial communities embedded in cross-kingdom networks. *Microbiome*, 7, 108. doi:10.1186/s40168-019-0723-5.
- Watson JD, Crick FHC.** (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*, 171:4356, 737-738.
- Weiss SJ, Xu Z, Amir A, et al.** (2015) Effects of library size variance, sparsity, and compositionality on the analysis of microbiome data. *PeerJ PrePrints*, 3:e1157v1. doi:10.7287/peerj.preprints.1157v1
- Whipps JM, Lewis K, Cooke R.** (1988) Mycoparasitism and plant disease control. In: *Fungi Biol Control Syst*, Burge M (Ed). *Manchester University Press*, 161-187.
- Whipps JM, Hand P, Pink D, et al.** (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol*, 105:1744–1755. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x
- Wilson JJ.** (2018) DNA Barcoding: Bioinformatics Workflows for Beginners. *Reference Module in Life Sciences*. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20468-8
- Xu M, Sheng J, Chen L, et al.** (2014) Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* v (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 835–845. doi:10.1007/s11274-013-1486-y
- Youseif SH, Abd El-Megeed FH, Humm EA, et al.** (2021) Comparative analysis of the cultured and total bacterial community in the wheat rhizosphere microbiome using culture-dependent and culture-independent approaches. *Microbiol Spectr*, 9:e00678-21. doi:10.1128/Spectrum.00678-21
- Zhang YJ, Xie M, Peng DL, et al.** (2016) Dynamics of microbial population size in rhizosphere soil of Monsanto's Cry1Ac cotton. *Plant, Soil and Environment*, 62(2), 92–97. doi:10.17221/770/2015-pse
- Zuluaga MYA, Lima Milani KM, Azeredo Goncalves LS, et al.** (2020) Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of *Solanum*. *PLoS ONE*, 15(1): e0227422. doi:10.1371/journal.pone.0227422