

**Evaluación de factores útiles para orientar la prospección de PGPR formadoras de endospora en maíz**

Por

David Andrés Borrego Muñoz

Tesis para optar por el título de Magister en Biotecnología

Corporación Académica Ambiental

Universidad de Antioquia

Medellín, Antioquia

15 de Agosto de 2016

Tutor

Camilo Andrés Ramírez Cuartas MSc, PhD.

## Resumen

Dentro de las bacterias benéficas asociadas a plantas, las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), especialmente las formadoras de endospora, poseen un gran potencial en agricultura. Este potencial se ve reflejado en el biocontrol de plagas y enfermedades, y en la biofertilización de plantas. Este grupo de bacterias posee la capacidad de formar endosporas, una estructura que les proporciona grandes ventajas de formulación en productos comerciales, ya que genera larga vida útil de anaquel. En el entendimiento y aprovechamiento de este grupo bacteriano, principalmente en procesos de búsqueda y selección sistemática (prospección), además de evaluar aspectos ecológicos y evolutivos de bacterias, especialmente en términos de diversidad y de especiación ecológica, son de gran importancia para el éxito en su uso. El objetivo de este estudio fue evaluar factores útiles que podrían orientar la prospección de PGPR formadoras de endosporas en una planta modelo, como lo es el maíz. Se determinó la diversidad de PGPR formadoras de endospora asociadas a una planta nativa *Carludovica palmata* y dos plantas cultivadas: maíz *Zea mays* var. 109 y pepino *Cucumis sativus* poinsett 76, establecidas en dos suelos de fertilidad contrastante, en diferentes zonas del Urabá Antioqueño. De acuerdo a la diferenciación del morfotipo, se aislaron 310 cepas y solo se identificaron 140 con base en la secuencia del ADNr 16S mediante los amplificadores obtenidos a partir de la técnica whole-cell PCR, posteriormente se realizó un análisis de demarcación Ecotipos Putativos (EP) para el clado *B. subtilis* - *B. amyloliquefaciens*, basados en la secuencia del gyrA, mediante los algoritmos Ecotype Simulation (ES) y AdaptML. Los resultados muestran que la fertilidad del suelo tiene efecto en la diversidad de los morfotipos aislados ( $P=0.06$ ) y no

así el tipo de planta ( $P=0.27$ ). La demarcación de Ecotipos estrechamente relacionados, mostro 11 EP mediante ES y 4 con AdaptML y se encontró una asociación significativa entre la demarcación del Ecotipo y el tipo de planta ( $P<0.01$ ), lo cual evidencia la especialización de estas bacterias a las plantas de donde se aislaron y no así a la fertilidad de los suelos. Estos resultados apoyan el estudio de la diversidad y de la sistemática de bacterias con potencial benéfico para plantas y a futuras estrategias de prospección.

**Palabras clave:** PGPR formadoras de endospora, diversidad, Ecotipos y prospección.

## **Agradecimientos**

A Dios, mi familia, mi tutor y compañeros... por toda la ayuda y paciencia.

## Tabla de contenidos

<b>Resumen</b> .....	ii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Tabla de contenidos</b> .....	v
<b>Listado de tablas</b> .....	vii
<b>Listado de figuras</b> .....	viii
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR.....	1
1.2 PGPR formadoras de endospora .....	2
1.3 Mecanismos de acción de las PGPR .....	3
1.4 Influencia del ambiente en la función PGPR .....	4
1.5 Especiación ecológica (Ecotipos).....	4
1.6 Ecología de la interacción PGPR-planta .....	8
1.7 Prospección de PGPR formadoras de endospora .....	10
<b>2. Objetivos</b> .....	13
2.1 Objetivo general .....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	14
3.1 Diversidad de BAFE asociadas a dos tipos de suelos y de plantas en el Urabá Antioqueño ..	14
3.1.1 Muestreo.....	14
3.1.2 Aislamiento selectivo .....	17
3.1.3 Identificación molecular y análisis filogenético.....	18
3.1.4 Diseño experimental y análisis de información.....	19
3.2 Demarcación de ecotipos putativos a partir de secuencias de ADN en el clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> .....	19
3.3 Pruebas <i>in planta</i> con aislados del clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> .....	22
3.3.1 Prueba de colonización temprana de plántulas de maíz .....	22
3.3.2 Efecto de la inoculación sobre la arquitectura radicular de plántulas de maíz.....	24

<b>4. Resultados</b> .....	27
4.1 Diversidad de BAFE asociadas a dos tipos de suelos y de plantas en el Urabá Antioqueño..	27
4.2 Demarcación de ecotipos putativos a partir de secuencias de ADN en el clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> . .....	37
4.3 Pruebas <i>in planta</i> con aislados del clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> . .....	41
<b>5. Discusión</b> .....	48
<b>6. Bibliografía</b> .....	53

## **Listado de tablas**

Tabla 1. Sitios seleccionados para el muestreo, ubicación y clasificación de fertilidad .....	27
Tabla 2. Análisis físico químico de suelos y clasificación según su fertilidad .....	29
Tabla 3. Riqueza de morfotipos BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo y el tipo de planta (Iraca, Maíz v y Pepino v). .....	31
Tabla 4. Riqueza de especies por 16S de BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo y el tipo de planta .....	34

## Listado de figuras

Figura 1. <i>Carludovica palmata</i> , especie nativa seleccionada para el estudio .....	16
Figura 2. Cultivo de maíz var 109 en suelos seleccionados, bajo condiciones de invernadero .....	17
Figura 3. Análisis de correspondencia de zonas muestreadas en suelos del grupo 1 (alta) y 2 (baja) fertilidad .....	30
Figura 4. Análisis de la diversidad de morfotipos BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo (alta y baja) y el tipo de planta (Iraca, Maíz v y Pepino v). .....	32
Figura 5. Árbol Neighbor Joining (NJ) 16S de aislados BAFE .....	35
Figura 6. Frecuencias del número de aislados totales y de cada clado por condición (fertilidad y planta).....	36
Figura 7. Análisis de la diversidad (riqueza) de especies por 16S de BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo y el tipo de planta.....	37
Figura 8. Demarcación de Ecotipos Putativos (EP) utilizando Ecotype Simulation (ES) y AdaptML a partir de secuencias de <i>gyrA</i> en el clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> . .....	39
Figura 9. Frecuencias de Ecotipos Putativos (EP) demarcados por Ecotype Simulation (ES) y AdaptML por condición (fertilidad y planta) en el clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> . .....	40
Figura 10. Colonización temprana en plántulas de maíz evaluando aislados del clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> . .....	41
Figura 11. Efecto de la inoculación Ecotipos Putativos sobre la arquitectura radicular de plántulas de maíz mediante el método (SF-ROBS).....	42
Figura 12. Efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> sobre el peso fresco aéreo en plántulas de maíz .....	44
Figura 13. Efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> sobre la longitud total de raíces en plántulas de maíz.....	45
Figura 14. Efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> sobre el número de raíces orden 2 en plántulas de maíz.....	46
Figura 15. Producción de índoles ( <i>in vitro</i> ) de Ecotipos Putativos del clado <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> .....	47



## **1. Introducción**

### **1.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR**

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR, por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper y Schroth, 1978), son bacterias de la rizosfera que colonizan activamente las raíces de las plantas y promueven crecimiento de las mismas (Glick, 1995; Kloepper, 1994). Una característica contundente de las PGPR y que hace que se diferencien de las bacterias del suelo, es la colonización activa de la raíz. Este es un proceso en el cual estas bacterias sobreviven a la inoculación y se multiplican en respuesta a los exudados radiculares (Siddiqui, 2005). Estas rizobacterias también se transfieren al sistema radicular en desarrollo y se multiplican en él, influyendo en la fisiología de las plantas (Heidari y Golpayegani, 2011; Kloepper y Schroth, 1981).

Las PGPR son utilizadas, en esencia, en la industria del agro, pues poseen mecanismos propios que hacen que tengan un alto potencial como biofertilizantes, promoviendo el crecimiento vegetal (Yasmin *et al.*, 2007), y como controladoras de plagas y enfermedades (biocontroladoras) (Kita y Ohya, 2005). El uso de las PGPR también aplica a temáticas ambientales como la fitorremediación y la recuperación de suelos degradados por efectos de minería o condiciones climáticas extremas (Bacilio *et al.*, 2006; Compant *et al.*, 2005; Gerhardt *et al.*, 2009) .

## 1.2 PGPR formadoras de endospora

Dentro de la PGPRs se encuentran las bacterias aeróbicas formadoras de endospora (BAFE), este grupo tienen un alto potencial biotecnológico, ya que cuenta con la capacidad de formar endosporas, las cuales son estructuras de resistencia. Esta característica permite la formulación de la bacteria para productos comerciales (Brar *et al.*, 2006) con larga vida útil y bajos requerimientos de almacenamiento, al no requerir cadena de frío (Emmert y Handelsman, 1999). Esta propiedad ha llevado a que la mayor parte de los productos que son comercializados con cepas PGPR tengan como componente activo aislados BAFE, incluyendo principalmente bacterias del género *Bacillus* (Ramírez, 2010), las cuales han demostrado reducción de enfermedades en plantas por medio de la producción de antibióticos y otros tipos de mecanismos (Kokalis *et al.*, 2006).

Dentro del género *Bacillus*, sin duda una de las especies más nombrada y estudiadas es *B. subtilis*, esta no sólo es reconocida como un organismo modelo en genética, también es usada ampliamente a nivel industrial en procesos de fermentación, así como en la agricultura (Fritze, 2004). Especies de *Bacillus* muy emparentadas taxonómicamente con *Bacillus subtilis*, como es el caso de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. atrophaeus*, en donde las diferencias genéticas y fenotípicas son pocas (McSpadden Gardener, 2010; Ramírez, 2010), son utilizadas ampliamente para promover el crecimiento y mejorar la salud de las plantas (Arguelles Arias *et al.*, 2009; Borriss *et al.*, 2011).

### 1.3 Mecanismos de acción de las PGPR

Los mecanismos de acción de las PGPR aún no se entienden completamente. Se han estudiado y evidenciado varias maneras en que las PGPR pueden beneficiar a las plantas (Ramírez, 2010). Estos beneficios pueden ocurrir por uno de dos mecanismos generales: estos se denominan directos o indirectos (Kloepper *et al.*, 1988). El efecto de promoción del crecimiento por los mecanismos directos, se produce cuando los metabolitos de la bacteria estimulan el crecimiento de las plantas, siendo este efecto independiente de la microflora nativa de la zona radicular (Lifshitz *et al.*, 1987). En contraste, la promoción del crecimiento por mecanismos indirectos se generan cuando las PGPR desplazan o antagonizan a la microflora nativa o deletérea, estos mecanismos tienen que ver con la mayoría de publicaciones que se conocen al respecto (Glick *et al.*, 1999; Vessey, 2003), y es especialmente asociado con la antibiosis y, por ende, al control de patógenos (Beauchamp *et al.*, 1991).

Dentro de los mecanismos directos se tienen: la fijación biológica de nitrógeno por efecto de la enzima nitrogenasa, la producción de sustancias biológicamente activas y de reguladores del crecimiento vegetal (fitohormonas), así como la solubilización de nutrientes (Vessey, 2003), como es el caso de la enzima fitasa y su participación en la solubilización de fósforo orgánico a partir de la molécula de fitato (Ramírez, 2010). Y dentro de los mecanismos indirectos se encuentran la generación de antibióticos, producción de moléculas quelantes de hierro o sideróforos, competencia, parasitismo, inducción de resistencia sistémica (SIR) e interrupción del *quorum sensing* (Vessey, 2003).

#### **1.4 Influencia del ambiente en la función PGPR**

El uso de PGPR como inoculantes en el suelo, además de alterar la estructura de las comunidades, también influye en la actividad microbiana, y esto podría ser relacionado con la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente. Algunos de los factores que pueden influir en la supervivencia y actividad de las bacterias en la rizosfera son netamente físicos, tales como la textura, temperatura y humedad, mientras que otros son químicos, tales como pH, la disponibilidad de nutrientes, el contenido de materia orgánica y, sobre todo, las interacciones con otros microorganismos de la rizosfera. Esta interacción con el factor biótico es muy importante ya que la PGPR debe ocupar un nicho, debe competir por los nutrientes disponibles y debe mantener una población mínima capaz de ejercer su efecto biológico (Barriuso *et al.*, 2008).

Esta influencia del ambiente en la función PGPR lleva a una limitación en el uso de estas bacterias en agricultura, ya que se generan resultados inconsistentes cuando las plantas se cultivan en los diferentes suelos o ambientes (Ramírez y Kloepper, 2010).

#### **1.5 Especiación ecológica (Ecotipos)**

La conceptualización ecológica del nicho sobre los procesos evolutivos de estos organismos (Cohan, 2010b), la categorización y selección de una cepa como PGPR podría dejar de ser un asunto exclusivamente funcional, y podría involucrar también aspectos taxonómicos y evolutivos.

El estudio de las PGPR en donde se incluye sus rasgos fenotípicos como su clasificación taxonómica es una tarea que no se ha desarrollado aún, y el motivo principal para esto es la falta en el consenso de la generación del concepto de especie bacteriana, el cual debe estar basado en la teoría evolutiva y ecológica, y no en una mera consideración operativa (Cohan, 2002).

El concepto de especie ha sido uno sobre los que más se ha escrito y uno de los que mayor controversia ha causado en la biología evolutiva (Cohan, 2002; Mayden, 1997; Mayr, 1970). El término especie se usa tanto para representar una categoría taxonómica como para representar a los individuos que se ordenan en un sistema de clasificación. Estos términos tienen dos categorías filosóficas diferentes (Eguiarte *et al.*, 2007). La primera, es la categoría taxonómica de especie, la cual se refiere a que esta es una clase, que no tiene existencia real y que se usa para ordenar objetos. La segunda trata a las especies como individuos, las especies están limitadas espacial y temporalmente, tienen cohesión intrínseca, se reproducen, participan en los procesos naturales y cambian con el tiempo (Eguiarte *et al.*, 2007).

La definición de especie en procariontes ha estado basada en una consideración meramente operativa (Wayne *et al.*, 1987), pues este grupo de microorganismos carecen de reproducción sexual, lo cual no permite que sea aplicado el concepto biológico de especie del cual participan los demás organismos (Mayr, 1970). Esta peculiaridad ha generado que no se tenga en cuenta un concepto evolutivo concreto para la definición de especies bacterianas y, por lo tanto, se optó por ajustar la clasificación por métodos basados en DNA (Stackebrandt *et al.*, 2002) a la clasificación que estaba basada en rasgos bioquímicos. Considerando entonces el aporte de la biología molecular, el criterio aceptado durante décadas para la definición de una

especie bacteriana ha sido el tener porcentajes mayores al 70% en experimentos de hibridación DNA-DNA y una temperatura de Melting inferior a 5°C (Wayne *et al.*, 1987), además de tener una similaridad del RNAr 16S mayor al 97% (Stackebrandt *et al.*, 2002). Este es un concepto generado *ad hoc* para bacterias y no es aplicable a todos los seres vivos, si se aplicara este concepto de especie a otros seres vivos encontraríamos que, por ejemplo, todos los primates pertenecemos a la misma especie (Maynard Smith *et al.*, 1993; Ward, 1998).

Esta categorización, la cual es principalmente operativa, le permitió a los análisis de ADN dar peso a la clasificación basada en caracteres fenotípicos. Además, esta definición ha permitido que cepas bacterianas que tiene diversas actividades sean clasificadas dentro de una misma especie, impidiendo establecer una adecuada relación entre su clasificación y su desempeño ecológico (Cohan, 2002).

Actualmente, dentro de la variadas definiciones de especies (Eguiarte *et al.*, 2007), se ha desarrollado una que está basada en un concepto evolutivo y que prevalece a la definición operativa (Cohan, 2002; Koepfel *et al.*, 2008). Este concepto parte del principio de que existen factores que demarcan a un grupo de organismo como especie: uno que aporta divergencia y otro cohesión, y que se dan naturalmente entre individuos (Cohan, 2010a). En este sentido, el concepto biológico de especie propuesto por Mayr (1970), toma como base que el principal factor de cohesión es el intercambio génico y, por lo tanto, lo que demarca a un grupo de individuos como especie es la capacidad con que éste se dé (Beurton, 2002). Pero en este orden de ideas, el intercambio genético en bacterias es de poca relevancia, pues es raro y de carácter promiscuo (Cohan, 2010a). En su lugar, Cohan y colaboradores vienen

demostrando que la selección natural periódica es esa fuerza de cohesión que es capaz de purgar la diversidad genética dentro de aquellos grupos de que son sometidos a un mismo evento de selección (Cohan, 2010a).

De estas nociones parte el concepto de Ecotipo, el cual sería equivalente a la unidad de especie en bacterias, pues el Ecotipo es un grupo cepas que ocupan un mismo nicho ecológico y, por lo tanto, están sometidas a los mismos eventos de selección periódica (Cohan, 2010b). Sin embargo, algunos autores señalan que en presencia de recombinación intra-específica, este modelo evolutivo propuesto para procariontes puede no ser correcto (Eguiarte *et al.*, 2007).

La propuesta puede tener como debilidades, que la teoría evolutiva detrás de este concepto no toma en cuenta que muchos de los caracteres adaptativos están codificados en elementos móviles y extra-cromosomales (Segovia *et al.*, 1993).

Lo anterior se podría contrarrestar con evidencia, ya que dentro del género *Bacillus* se ha demostrado que los Ecotipos pueden ser identificados como clusters formados a partir de secuencias específicas de ADN, lo que podría demostrar, que el nicho ecológico determina el linaje evolutivo (Koeppel *et al.*, 2008). Sin embargo con este grupo bacteriano, aún no se han efectuado exploraciones bajo condiciones del trópico, en donde se podría esperar que los procesos de especiación sean más pronunciados que en otras partes del mundo. Este conocimiento sería de gran significancia para el registro de nuestra biodiversidad bacteriana y la orientación de procesos de bioprospección de bacterias benéficas. Con el concepto de Ecotipo, las PGPR y en especial las formadoras de endospora, podrían comenzar a pensarse, ya no solo desde una visión exclusivamente funcional, sino también desde un punto de vista

evolutivo. Y en especial los procesos de búsqueda de cepas PGPR no serían altamente demandantes de tiempo y recursos, pues habría una aproximación al conocimiento de los principios básicos que hacen de una cepa bacteriana una PGPR (Nelson, 2004).

## **1.6 Ecología de la interacción PGPR-planta**

Las interacciones planta-microorganismo-ambiente en la rizosfera son las principales determinantes de la salud vegetal y la fertilidad del suelo (Klyuchnikov y Kozherin, 1990). Se conoce que las plantas afectan a las poblaciones microbianas en el suelo, y cada especie de planta podría seleccionar las poblaciones microbianas específicas que contribuyen a su condición fisiológica, creando un ambiente selectivo y con diversidad limitada (Berg y Smalla, 2009).

Las plantas interactúan continuamente con los microorganismos, principalmente a través de exudados de las raíces ricos en carbono, los cuales pueden regular las actividades y la comunidad bacteriana que habita la rizosfera (Beschoren da Costa *et al.*, 2013). Se cree que los exudados de las raíces son específicos de la planta y que esta especificidad puede reflejar la evolución o adaptación específica a las condiciones de un hábitat en particular, tanto de ella misma como la de su microbiota acompañante (Zahir *et al.*, 2004). El tipo de exudados de las raíces es crucial para la distribución de los ecosistemas y de especificidad de nicho de los microorganismos (Jaeger *et al.*, 1999).

Pero no solo la planta modula las interacciones y los efectos de los microorganismos, también la diversidad es un factor determinante del crecimiento y la actividad de las comunidades



bacterianas (Eisenhauer *et al.*, 2013). El estudio de la diversidad (taxas y funciones) y de acuerdo como se asocien, puede proporcionar pistas sobre el carácter distintivo de cepas benéficas y ofrece diferentes cuestionamientos con respecto a la escala y fuerzas evolutivas que llevaron al desarrollo de las actividades o funciones específicas (McSpadden Gardener, 2010).

Las PGPR es un subgrupo de las bacterias de la rizosfera cuyos efectos benéficos se han atribuido a los cambios en la ecología microbiana de la misma rizosfera (Kokalis *et al.*, 2006), la cual se cree, juega un papel fundamental en la actividad que tienen estas bacterias, cuyas interacciones con la planta pueden determinar la salud y fertilidad del suelo (Heidari y Golpayegani, 2011).

Dentro de los diferentes fenómenos de interacción de una PGPR, la competencia en la rizosfera es un requisito necesario. Esta implica la colonización efectiva de la raíz combinada con la capacidad de sobrevivir y reproducirse (adaptación) a lo largo de las raíces de las plantas que crecen en la presencia de una microbiota autóctona (Kumar *et al.*, 2011). La diversidad de estas especies microbianas pueden facilitar unos a otros la captación de recursos, pero también competir por los recursos compartidos y antagonizar el uno al otro (Becker *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que la comprensión de la variación en la dinámica de cepas PGPR en respuesta al tipo de suelo, tipo de planta, o etapa de desarrollo de la misma aún puede ser limitada (Mcspadden Gardener, 2004). La complejidad de las diferentes interacciones entre PGPR, la planta y el suelo, pueden reflejar el número de nichos disponibles, y es probable que sea un motor importante de relaciones de funcionamiento y de la biodiversidad en los

ecosistemas. La comprensión de esta complejidad puede contribuir significativamente a la comprensión de los mecanismos de acción y del uso en sí de una PGPR (Bais *et al.*, 2004).

### **1.7 Prospección de PGPR formadoras de endospora**

La principal limitación para el uso de rizobacterias en plantas y en general en la agricultura, son los resultados inconsistentes cuando estas plantas se cultivan en los suelos (Ramírez y Kloepper, 2010). El conocimiento de estos mecanismos de acción y de cómo interactúan con las propiedades del suelo, podrían dar evidencia para optimizar y predecir los resultados y, por lo tanto, ver reducida la variabilidad en campo (Ramírez y Kloepper, 2010). Y es por esto, que uno de los retos en el desarrollo de inoculantes PGPR es asegurar una forma efectiva de selección, para que los organismos más prometedores sean identificados y utilizados como un producto funcional (do Vale Barreto *et al.*, 2011).

Los esfuerzos para mejorar los efectos benéficos de las PGPR y optimizar su aplicación en cultivos agrícolas viene desde la década de 1950, a partir de estudios en la antigua Unión Soviética y más tarde en otros países (Zehnder *et al.*, 2001). Estos esfuerzos hoy en día se centran en procesos de bioprospección, los cuales se centran la búsqueda y evaluación sistemática de organismos vivos y sus sustancias, los cuales generan productos valiosos para la actividad humana (Artuso, 2002). Esta necesidad de nuevos bienes biológicos, que sean útiles para proporcionar asistencia y alivio en todos los aspectos de la condición humana es cada vez más creciente, en especial con lo que tiene que ver con la siembra de alimentos en diferentes zonas de del mundo (Strobel y Daisy, 2003).

Estos procesos de bioprospección de cepas PGPR se han caracterizado por ser altamente demandantes de tiempo y recursos, debido a que el desconocimiento de los principios básicos que hacen de una cepa bacteriana una PGPR han impedido el diseño de estrategias eficientes de búsqueda y aislamiento de cepas (Nelson, 2004). Son incontables los casos en donde se evalúan una gran cantidad de cepas, en donde solo un pequeño número de estos aislados presenta algún rasgo PGPR (Ahmad *et al.*, 2008; Dey *et al.*, 2004; Hariprasad *et al.*, 2011; Ribeiro y Cardoso, 2012) sumándole la variabilidad en la aplicación de estas en campo.

Propuestas de selección de cepas, como la de Penrose y Glick (2003), basada en el mecanismo de producción de la aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa (Glick *et al.*, 2007), y por lo tanto en la utilización de ACC como única fuente de nitrógeno para el crecimiento y desarrollo de la cepa (Penrose y Glick, 2003), puede ayudar a los investigadores a aislar y seleccionar fácilmente nuevas cepas PGPR adaptadas a ambientes específicos.

Si bien, los mecanismos de acción de las PGPR han dado evidencia sobre su actividad y son de suma importancia, pues han ayudado a la selección de cepas; estos resultados apuntan a que los rasgos fisiológicos necesarios para que una cepa se desempeñe como PGPR son diversos (Compant *et al.*, 2005; Glick *et al.*, 1999). A esto se le suma que las hipótesis con respecto al sitio más apropiado para buscar cepas PGPR siguen siendo especulativas y carentes de la evidencia científica suficiente como para orientar de manera confiable la bioprospección (Barriuso *et al.*, 2008), en donde se especula que puede ser importante considerar la especificidad de la planta huésped o adaptación a un suelo en particular, las

condiciones climáticas o la interacción con patógenos (do Vale Barreto *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, se establece la necesidad fundamental de establecer estrategias de bioprospección eficientes para la búsqueda de PGPR, especialmente a las pertenecientes al grupo de las BAFE, en donde se evalúen factores potencialmente útiles, con un énfasis en la ecología y funcionalidad de las cepas, para así orientar la prospección de rizobacterias formadoras de endospora capaces de promover el crecimiento. Estas estrategias de bioprospección se pueden desarrollar al aumentar el conocimiento y la comprensión de la diversidad y de bases ecológicas de la especiación en este grupo bacteriano.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de factores potencialmente útiles para orientar la prospección de rizobacterias formadoras de endospora capaces de promover el crecimiento temprano de maíz.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar la diversidad de especies de bacterias aeróbicas formadoras de endospora (BAFE) asociadas a la rizosfera de una planta nativa y de maíz crecidas en suelos de alta y baja fertilidad en el Urabá Antioqueño.
- Identificar, a partir de secuencias de ADN, posibles ecotipos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* asociados a la rizosfera de una planta nativa y de maíz crecidas en suelos de alta y baja fertilidad en el Urabá Antioqueño.
- Evaluar la asociación entre el efecto de la inoculación de aislados del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* sobre el crecimiento temprano de maíz y parámetros de interés en la prospección de PGPR como colonización, origen, ecotipo y filogenia de las cepas.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1 Diversidad de BAFE asociadas a dos tipos de suelos y de plantas en el Urabá Antioqueño**

##### **3.1.1 Muestreo**

La toma de muestras se llevó a cabo en el Urabá Antioqueño, ubicado en la zona ecológica del bosque húmedo tropical, 28 m de altitud, 24-34°C, 2500-3.500 mm de precipitación anual y 80-90% de humedad relativa. Esta zona fue seleccionada por poseer condiciones ambientales privilegiadas para la diversidad, por el conocimiento previo de la zona, y por estar detectados en la misma zona suelos de las características deseadas.

Se seleccionaron 5 suelos, considerados de alta fertilidad, y 5 más considerados de baja. Estos suelos fueron seleccionados con base en un reconocimiento previo de campo a lo largo de todo el eje bananero, geo-referenciando, mediante GPS, cada uno de los sitios de muestreo. Se tomó como criterio de selección el nivel de pH, por considerarlo un indicador global de la fertilidad del suelo, buscando obtener suelos con pH (*i.e.* fertilidad) contrastante. El pH de suelos provenientes de todo el eje bananero (desde Apartadó, al norte, hasta Mutatá al sur) fue, inicialmente, determinado directamente en campo, en suspensión 1:1 (suelo:agua), mediante el uso de pH-metro. Posteriormente, muestras preseleccionadas fueron llevadas al laboratorio y se volvió a determinar su pH en suspensión 1:1. Este pH fue corroborado posteriormente mediante determinación en el laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, usando la misma proporción de suspensión pero con

suelo tamizado a 2 mm, tal como lo requieren los estándares internacionales (Osorio, 2014). Adicionalmente, en el mismo laboratorio y para las mismas muestras, fueron determinados los demás parámetros de fertilidad química del suelo: conductividad eléctrica (extracto de saturación), materia orgánica (Walkley Black), Al (KCl 1M), Ca, Mg, K (acetato de amonio 1M), CICE (suma de cationes de cambio), S (fosfato monocálcico 0.008M), Fe, Mn, Cu, Zn (Olsen – EDTA), B (agua caliente), y P (Bray II), además la textura se midió por el método de Bouyoucos (Osorio, 2014).

Con respecto a las plantas a evaluar, se seleccionaron 3 especies vegetales para el estudio, dos cultivadas y una nativa. Las especies cultivadas seleccionadas fueron maíz (*Zea mays* L.) var. 109, apta para clima cálido y pepino (*Cucumis sativus*) var. poinsett 76. En cuanto a la especie nativa, dado que, de acuerdo con el diseño experimental, se requerían muestras de individuos de las especies vegetales crecidos en los mismos suelos, ésta se seleccionó con base en un reconocimiento previo de la vegetación del eje bananero, buscando que la especie tuviera amplia distribución en la zona. Con la ayuda de personal del herbario de la Universidad de Antioquia, la especie nativa seleccionada fue *Carludovica palmata*, comúnmente conocida como Iraca, la cual presentaba una distribución amplia en la zona y suficientes individuos en los suelos seleccionados (Figura 1).

En cada uno de los 10 sitios seleccionados con base en la fertilidad del suelo, se tomaron muestras de raíces y suelo rizosférico (suelo adherido a raíces) de la especie nativa (Iraca), las cuales fueron guardadas en bolsas plásticas limpias y llevadas al laboratorio para el aislamiento selectivos de Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endospora (BAFE). Inicialmente, se sembraron 10 semillas de las especies cultivadas (maíz y pepino) en cada

uno de los sitios de muestreo, para dejarse crecer por 2 meses en el suelo seleccionado y asegurar un efecto rizosfera suficiente. Sin embargo, fuertes ataques de hormiga arriera en la mayoría de los sitios acabaron con las plantas en menos de un mes de sembradas. Por tal razón, se decidió crecer el maíz y el pepino en los mismos suelos pero bajo condiciones de invernadero, en las instalaciones del Centro de Investigaciones del Banano, ubicado en el mismo eje bananero, en el municipio de Carepa (Figura 2). De cada sitio seleccionado (exactamente el mismo punto donde estaba creciendo la Iraca), se tomó suelo y se llevó hasta el invernadero, para luego ser servido en potes de poliestireno de 40 onzas. Se sembraron 10 semillas de maíz y de pepino en cada pote (uno por sitio de muestreo) y por separado, y se dejaron crecer durante 2 meses. Luego se cortó la parte aérea de las plantas y el pote con suelo y raíces, adecuadamente cerrado, para el aislamiento de BAFE (todo el suelo del pote fue considerado como rizosférico, pues la totalidad del volumen de suelo en el recipiente fue abundantemente colonizado por raíces).

**Figura 1.** *Carludovica palmata*, especie nativa seleccionada para el estudio



Esta figura muestra la planta *Carludovica palmata* (Iracá), en una de las zonas de muestreo. Se muestra la morfología típica de la hoja la cual posee hojas simples, agrupadas y que conforman una roseta.



**Figura 2. Cultivo de maíz var 109 en suelos seleccionados, bajo condiciones de invernadero**



Esta figura muestra plantas maíz var 109 y pepino var poinsett 76, crecidas en pots de poliestireno bajo condiciones de invernadero en el Urabá antioqueño.

### **3.1.2 Aislamiento selectivo**

Se procedió a preparar diluciones seriadas 1:10 a partir del suelo rizosférico. Las diluciones  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  fueron sometidas a choque térmico ( $80^{\circ}\text{C}$  por 15 min), al baño maría, para la selección de esporas bacterianas. Después del tratamiento térmico, dichas diluciones se sembraron en medio TSA (Trypticosa Soya Agar) por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente, por 48 horas, para luego hacer conteo de morfotipos (riqueza y abundancia de cada uno de ellos) por muestra y UFC totales. Los morfotipos se seleccionaron por forma, color y elevación. De cada una de las muestras, se purificó por medio de repique en TSA de una sola colonia, solo un representante de los morfotipos seleccionados, documentando, mediante fotografía al estereoscopio, cada uno de ellos. Además de estos luego se identificaron por medio de la secuencia del 16S. Cada morfotipo fue almacenado, luego de ser purificado, con 3 copias en medio TSB (Trypticosa Soya Caldo) + 20% glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3 Identificación molecular y análisis filogenético

Los aislados de Iraca y maíz, 140 en total, fueron identificados mediante la secuencia parcial del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (ADNr 16S) (Stackebrandt y Goebel, 1994). Se excluyó la plata pepino debido a la disponibilidad presupuestal del proyecto para el secuenciamiento. Se estandarizó con éxito la metodología de amplificación del gen, partiendo de PCR de célula completa (“Whole-cell PCR”). Para su amplificación se usaron, bajo condiciones estándar de PCR, los primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), y en la secuenciación se usó el primer 8F junto con el 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Gotz *et al.*, 2002). Las condiciones estandarizadas para la PCR fueron las siguientes: pre-desnaturalización a 94°C por 3 min; 31 ciclos de 94°C por 3 min, 57°C por 45 seg y 70°C por 2 min, con una extensión final de 70°C por 8 min.

Todos los amplicones obtenidos fueron enviados en conjunto a la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciamiento. Una vez obtenidas las secuencias se editaron mediante el programa Bioedit (Hall, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Las secuencias se compararon con las almacenadas en el GenBank (NCBI web site), Ribosomal Database Project (RDP, Michigan State University), y una base de datos de *Bacillus* spp. Y relacionados, que incluía únicamente secuencias para cepas tipo o cepas ampliamente reconocidas y estudiadas. El número y tipo de especies fueron analizados en función del tipo de suelo y planta, mediante la construcción de tablas de contingencia. Adicionalmente, estas secuencias fueron usadas para evaluar relaciones entre las especies

BAFE y los factores de tipo de suelo y planta, por medio de métodos basados en distancia, construyendo un árbol en neighbor joining (NJ) con 1000 réplicas de bootstrap con el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2011), previo alineamiento de las secuencias usando Clustal W (Larkin *et al.*, 2007).

### **3.1.4 Diseño experimental y análisis de información**

Con la estructura de muestreo descrita, se tuvo un diseño en parcelas divididas, con el tipo de suelo como parcela principal (alta y baja fertilidad) y las especies vegetales como subparcela (especie nativa -Iraca- y cultivadas –maíz y pepino-). Para cada uno de los 2 tipos de suelo, se muestrearon 5 sitios diferentes (repeticiones), tomando muestras tanto de Iraca como de maíz y pepino crecidos en dichos suelos, para un total de 30 unidades muestréales. Los análisis se realizaron en el software R®.

### **3.2 Demarcación de ecotipos putativos a partir de secuencias de ADN en el clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens***

Para la demarcación de Ecotipos Putativos (EP) a partir de secuencias de ADN se seleccionó un subgrupo de cepas del total de aislados, 25 en total, pertenecientes al clado *B. subtilis*-*B. amyloliquefaciens*, esto debido a que los cebadores diseñados son para el análisis de Ecotipos son específicos para este grupo bacteriano. Además se incluyó la cepa *B. subtilis* UA321, evaluada y caracterizada en el grupo de investigación (Ramírez, 2010).

Se utilizaron los algoritmos Ecotype Simulation (ES) y AdaptML, ambos ampliamente utilizados, y que han mostrado efectividad para demarcar ecotipos dentro del clado *B. subtilis-licheniformis*, el cual también incluye a *B. amyloliquefaciens* (Connor *et al.*, 2010). Este análisis se efectuó con las secuencias del gen girasa A (*gyrA*), el cual ha mostrado tener una buena señal filogenética en este tipo de análisis con aislados de este clado (Connor *et al.*, 2010; Reva *et al.*, 2004).

Para la amplificación del gen *gyrA* no se logró estandarizar con éxito la metodología de PCR a partir de célula completa (“Whole-cell PCR”). Por esta razón se utilizó el kit de extracción de DNA “DNeasy Blood & Tissue” de Qiagen®. Los cebadores utilizados fueron los siguientes: *gyrAf* (5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3') y *gyrAr* (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3') (Koeppel *et al.*, 2008).

En todos los casos, la amplificación de esta región se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización a 94°C por 5 min; 32 ciclos de 94°C por 1 min, 51°C por 45 seg y 72°C por 2 min, con una extensión final de 72°C por 8 min.

Los amplicones obtenidos de las 26 cepas fueron enviados en conjunto a la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciamiento. Una vez obtenidas las secuencias se editaron mediante el programa Bioedit (Hall, 1999) y se realizó un alineamiento múltiple tipo ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Este alineamiento fue usado para la construcción del árbol filogenético y para el análisis de los datos con los algoritmos Ecotype Simulation (ES) (Koeppel *et al.*, 2008) y AdaptML (Hunt *et al.*, 2008).

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa raxML 1.3 (Silvestro y Michalak, 2011) y se utilizó el software Jmodel Test 2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012) para seleccionar el modelo de sustitución nucleotídica en la reconstrucción filogenética. Se utilizó bootstrap con 1000 réplicas como método de remuestreo. Como grupo externo se utilizó la secuencia de *gyrA* de *Bacillus halodurans* C125. El árbol fue editado en el programa Figtree 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para el análisis de las secuencias en la demarcación de EP se analizaron por separado las secuencias de las cepas pertenecientes al clado *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Se utilizó el algoritmo ES incluido en el software “Parameter Solutions” (Koeppel *et al.*, 2008), en primer lugar para obtener el número, tasas de formación de ecotipos y selección periódica, esta información fue utilizada para la demarcación manual, utilizando además, la construcción de un árbol en neighbor joining como guía en la demarcación manual. Las terminales del árbol, que al compararse dentro de la demarcación mostraran un valor óptimo de 1 y un intervalo de confianza igual a 1 se consideraban dentro del mismo Ecotipo.

Para la demarcación por AdaptML (Hunt *et al.*, 2008), el archivo de alineamientos fue modificado, colocando en el nombre o código de la secuencia la información categórica referente al hábitat de donde se había aislado la cepa. Con este archivo, se construyó nuevamente un árbol filogenético utilizando el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) bajo un modelo de sustitución nucleotídica K80 (Kimura, 1980), el análisis del árbol y la obtención de resultados en la demarcación de Ecotipos Putativos se realizó vía online (<http://almLab.mit.edu/adaptmL/>).

Los EP obtenidos del análisis en ES y AdaptML fueron demarcados como clusters en el árbol previamente construido en raxML. Para relacionar los EP demarcados con las categorías del hábitat (fertilidad y planta) se realizaron análisis de Chi<sup>2</sup>.

### **3.3 Pruebas *in planta* con aislados del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens***

#### **3.3.1 Prueba de colonización temprana de plántulas de maíz**

Para el desarrollo de este experimento se preparó un inóculo de esporas de cada uno de los 26 Ecotipos aislados y evaluados del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. Para esto, cada bacteria se sembró por triplicado en medio de esporulación modificado por Ramírez (2010). Un litro de este medio contiene: proteosa peptona 3.3 g; extracto de carne, 1.0 g; D-lactosa monohidrato 5.0 g; NaCl 5.0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g; KCl 1.0 g; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.25 g; MnSO<sub>4</sub> 10 mg; y agar 18 g (Ramírez, 2010).

Después de una incubación por 14 días a temperatura ambiente, las esporas fueron recolectadas agregándole a cada caja de Petri 10 mL de Agua Destilada Estéril (ADE) y raspando la biomasa con ayuda de un asa de Drigalsky. La suspensión de cada una de las bacterias se traspasó a un tubo Falcon de 50 mL, y estos fueron sometidos a choque térmico (80°C por 15 min), al baño maría, para la selección de esporas bacterianas.

Se procedió a preparar diluciones seriadas 1:10 a partir de cada una de las suspensiones. Las diluciones 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-10</sup> se sembraron en medio TSA por duplicado y se incubaron a 26-28 °C,

por 48 horas, para luego hacer conteo de UFC/mL. Luego, cada una de las suspensiones se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para que fueran inoculadas en semillas pregerminadas de maíz var. 109, cada de estas tenía aproximadamente 1 cm de longitud en sus radículas. Estas semillas fueron lavadas y desinfectadas previamente, se utilizó jabón de manos para extraer el fungicida incorporado. Posteriormente para su desinfección, se sumergieron en NaClO al 1% durante 3 min y luego en etanol al 70% durante 5 min. Las semillas fueron lavadas varias veces con ADE y secadas con servilletas estériles, para luego ser colocadas en cámara húmeda para su germinación. Cuando estuvieron germinadas y tenían aproximadamente 1 cm de longitud en su radícula, fueron embebidas en cada una de las suspensiones bacterianas con concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL por 1 hora. Luego estas se sacaron y se colocaron en un tubo Falcon el cual contenía 25 mL de agar-agar al 0.9 % (p/v). Las plantas se cosecharon después de 5 días de sembradas.

La cosecha y el conteo de UFC consistió en sacar la planta de cada tubo y tomar solo la raíz sin el medio de cultivo, esta raíz se colocó en otro tubo Falcon de 50 mL el cual contenía 10 mL de ADE, para luego realizar dilución en placa en medio TSA, estas diluciones fueron 1:10 y fueron de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . Después de realizar las diluciones se tomó la raíz y se midió el peso húmedo. Las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  se sembraron en medio TSA por duplicado y se incubaron a 26-28 °C, por 48 horas, para luego hacer conteo de UFC/mL, con el peso de la raíz el conteo se expresó en UFC/mg de raíz.

Con la estructura del experimento descrita, se tuvo un diseño completamente aleatorizado, teniendo como factor cada una de las 26 cepas del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* y un control sin inocular, como variable dependiente se tomó el número de UFC/mg de raíz.

La unidad experimental era el tubo Falcon el cual contenía 25 mL de agar-agar al 0.9 % (p/v) con una semilla de maíz pre-germinada y embebida en la suspensión de esporas. Se tenía 4 repeticiones por tratamiento para un total de 108 unidades experimentales. El experimento se repitió dos veces en el tiempo.

Se realizó el test de Kruskal Wallis, ya que no se cumplieron los supuestos de normalidad de residuales y homogeneidad de varianza, además se hizo una prueba *post hoc* de Dunn ( $P < 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron en el software R<sup>®</sup>.

### **3.3.2 Efecto de la inoculación sobre la arquitectura radicular de plántulas de maíz**

Para este experimento se modificó la metodología descrita por Planchamp *et al.* (2013), en la cual se describe un sistema de observación de raíces libre de suelo o SF-ROBS (por sus siglas en inglés: Soil-Free Root Observation System) (Hund *et al.*, 2009; Planchamp *et al.*, 2013).

El experimento consistió en tomar semillas pre-germinadas de maíz var. 109, las cuales fueron lavadas y desinfectadas previamente, como se describe en el experimento 3.3.1. Para el montaje del experimento se tomaron semillas con una radícula de aproximadamente 1 cm de longitud. Estas se embebieron en una suspensión de esporas de cada bacteria a evaluar, a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, (26 ecotipos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*), suspensión preparada en la metodología anterior (3.3.1).

Después de dejar 1 hora embebida las semillas, estas fueron transferidas al sistema SF-ROBS modificado. El sistema consistía en colocar una semilla pre-germinada e impregnada del inóculo bacteriano en el centro de dos servilletas humedecidas con agua destilada y envueltas



por una bolsa de plástico negra, este sistema se mantenía unido por clips. Las bolsas estaban unidas por varas de balsa que sostenían al sistema, y estas fueron colocadas en una canasta transparente con agua suficiente para que esta tuviera contacto con el papel y este se mantuviera húmedo. Este sistema se mantuvo durante 15 días a temperatura ambiente y se exponían a la luz solar durante 8 horas en periodos de 20 min, esto debido a que las bolsas negras se calentaban alrededor de unos 70°C.

Al cosechar las plantas, a estas se les determinó el peso fresco de raíz y aéreo, la raíz fue escaneada en un escáner Hewlett Packard a 600 puntos por pulgadas (dpi). Las plantas fueron secadas para después determinarles el peso seco de la raíz y el peso seco aéreo.

Con la estructura del experimento descrita, se tuvo un diseño completamente aleatorizado, teniendo como factor cada una de las 26 cepas del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* y un control sin inocular. Como variables dependientes se tomaron el peso fresco aéreo y radicular, el peso seco aéreo y radicular, el número y la longitud total de todas las raíces, de las raíces de orden 1 y orden 2. La unidad experimental fue la bolsa en el sistema SF-ROBS con una semilla de maíz pre-germinada y embebida en la suspensión de esporas. Se tenía 5 repeticiones por tratamiento para un total de 135 unidades experimentales. El experimento se repitió dos veces en el tiempo.

Se realizaron análisis de varianza por cada una de las variables dependientes, prueba post hoc de Dunnett ( $P < 0.05$ ) y t-Student ( $P < 0.05$ ), cuando no se cumplieron supuestos de normalidad y homogenicidad de varianza se realizó Kruskal Wallis ( $P < 0.05$ ) prueba *post hoc* de Dunn ( $P < 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó en el software R<sup>®</sup>.

Se realizó una determinación adicional, la de la producción de indoles sobre aislados del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. La evaluación de compuesto indólicos como una medida indirecta de la producción de AIA, se realizó siguiendo la metodología de (Glickmann y Dessaux, 1995) utilizando la solución indicadora de Salkowski, diseñada por Gordon y Weber (Gordon y Weber, 1951), y adecuada para el uso en sobrenadantes de cultivos bacterianos por Patten y Glick (Patten y Glick, 2002).

La absorbancia del color producido fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm. Se construyó una curva estándar con AIA comercial el software Excel® de Microsoft, que permitiera calcular la concentración de indoles producidos por cada aislado bacteriano evaluado.

Se realizaron análisis de varianza ANOVA ( $P < 0.05$ ) y pruebas t-Student ( $P < 0.05$ ) para comparar el efecto de cada Ecotipo Putativo dentro de cada clado formado, demarcados con cada uno de los algoritmos utilizados. El análisis estadístico para esta variable se realizó en el software R®.

## 4. Resultados

### 4.1 Diversidad de BAFE asociadas a dos tipos de suelos y de plantas en el Urabá Antioqueño.

Después del recorrido y pre-muestreo por el eje bananero, que incluyó de Norte a Sur los municipios de Apartadó, Carepa, Chigorodó y Mutatá, se seleccionaron 10 sitios de muestreo (Tabla 1). En este recorrido, se observó un marcado gradiente de pH, con los valores más altos en la región norte y una disminución gradual hacia el sur. Este gradiente de pH está claramente relacionado con la existencia de una climosecuencia en la región, a lo largo del eje bananero, donde existe un gradiente de precipitación, con valores bajos hacia el norte y aumentos graduales en este parámetro hacia el sur.

**Tabla 1. Sitios seleccionados para el muestreo, ubicación y clasificación de fertilidad**

Sitio	Nombre	Ubicación	pH <i>in situ</i> <sup>1</sup>	pH Lab <sup>2</sup>	Clasificación fertilidad <sup>3</sup>	Geo-referencia
1	Tulenapa 1	Norte	5.9	5.7	Grupo 1	7° 46' 49.5''N y 76° 40' 13.3''O
2	Tulenapa 2	Norte	6.1	5.8	Grupo 1	7° 46' 49.3''N y 76° 40' 12.13''O
3	Cancha 1	Norte	6	6.3	Grupo 1	7° 46' 24.60''N y 76° 39' 10.92''O
4	Piscina 2	Norte	6.6	6.6	Grupo 1	7° 46' 24.63''N y 76° 39' 10.94''O
5	Apartadó	Norte	5.8	5.5	Grupo 1	7° 60' 34.6''N y 76° 42' 12.3''O
6	Guapacito	Sur	4.6	5.1	Grupo 2	7° 34' 26.8''N y 76° 37' 26''O
7	Mutatá 2	Sur	4.9	5.1	Grupo 2	7° 25' 42.54''N y 76° 31' 16.8''O
8	Mutatá 3	Sur	4.8	4.9	Grupo 2	7° 19' 56.31''N y 76° 28' 18.08''O
9	Mutatá 4	Sur	4.9	5.2	Grupo 2	7° 15' 13.86''N y 76° 26' 43.47''O
10	Mutatá 6	Sur	4.8	4.9	Grupo 2	7° 13' 11.24''N y 76° 25' 42.3''O

<sup>1</sup>Valor de pH determinado en campo, en el sitio de muestreo, durante reconocimiento inicial.

<sup>2</sup>Valor de pH obtenido en laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

<sup>3</sup>Grupo 1: suelos con pH>5.5, ausencia de Al intercambiable, fertilidad medio-alta a alta. Grupo 2: suelos con pH<5.5, presencia de Al intercambiable, fertilidad medio-baja a baja.

Los suelos muestreados han sido clasificados en dos grupos, de acuerdo con su nivel de fertilidad (Tabla 2). Dentro del grupo 1 han sido considerados los suelos que presentaron valores de pH superiores a 5.5 y ausencia de aluminio (Al) intercambiable, indicadores de niveles medio-alto y alto de fertilidad. De igual forma, aquellos suelos que presentaron valores de pH inferiores a 5.5 y presencia de Al en el complejo de cambio fueron reunidos en el grupo 2, clasificándolos como suelos de fertilidad medio-baja a baja.

Para tener certeza de la elección de las zonas de muestreo con respecto a los grupos de fertilidad del suelo, se realizó un análisis de correspondencia para observar si existía separación de las muestras según los parámetros de fertilidad del suelo, este tipo de análisis permitió observar que tipo de variables aportaban más a la separación en los respectivos grupos (Figura 3).

**Tabla 2. Análisis físico químico de suelos y clasificación según su fertilidad**

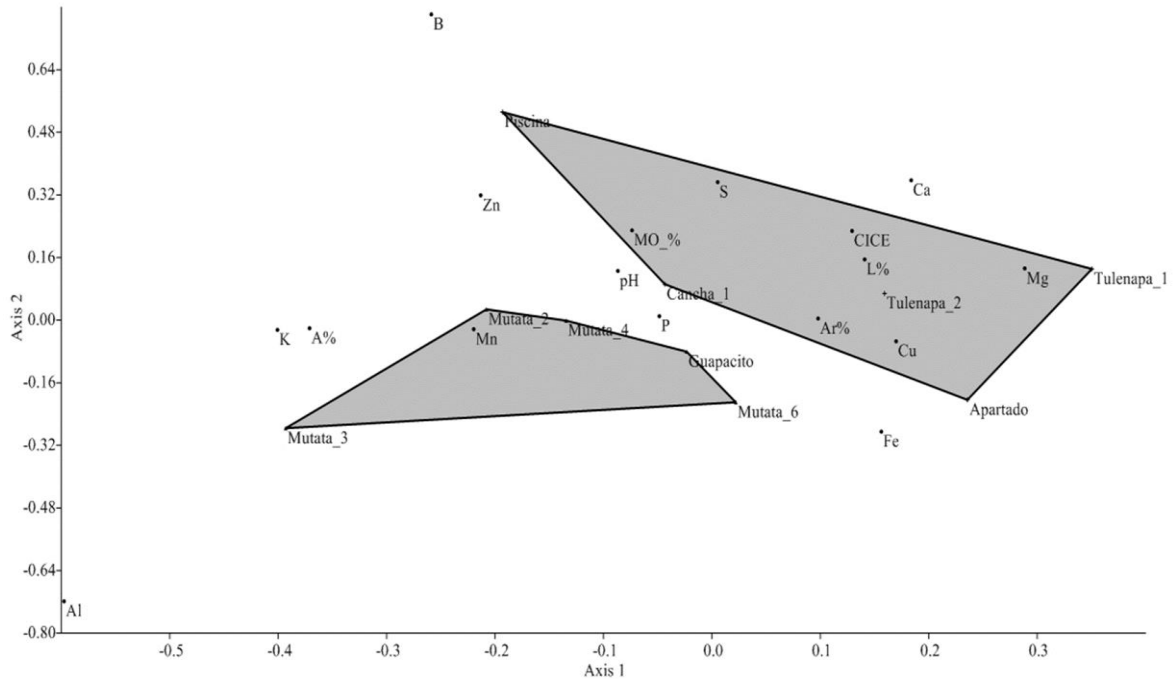
Clase Fertilidad <sup>1</sup>	Nombre	Textura				pH	MO %	Al	Ca	Mg	K	CICE	P	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B
		A %	L %	Ar%	Clase			cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>			mg kg <sup>-1</sup>								
<b>Grupo 1</b>	Tulenapa 1	20	42	38	FAr-FArL	5.7	3.9	-	21.1	5.38	0.83	27.3	7	11	68	5	4	1	0.3
	Tulenapa 2	40	36	24	F	5.8	6.3	-	16.9	6.87	0.71	24.5	6	13	74	8	5	3	0.3
	Cancha 1	48	38	14	F	6.3	3.1	-	11	2.08	0.81	13.9	9	5	43	2	2	1	0.3
	Piscina	50	30	20	F	6.6	5.2	-	16.9	3.24	0.74	20.9	6	16	8	8	2	3	1.3
	Mutatá 1	60	20	20	FArA-FA	5.7	4.8	-	19.4	3.31	1.33	24	16	8	28	6	3	1	0.3
	Apartadó	40	40	20	F	5.5	2.4		13.4	6.2	0.46	20.1	11	8	114	8	6	1	0.24
<b>Grupo 2</b>	Cancha 2	56	20	24	FArA	5.1	3.7	0.4	9.92	3.49	1.14	15	4	13	97	7	4	2	0.3
	Guapacito	46	28	26	F	5.1	4.7	0.3	6.56	2.56	1.09	10.5	6	16	70	15	2	1	0.3
	Mutatá 2	56	24	20	FArA-FA	5.1	3.6	1.5	11	3.03	1.11	16.6	9	5	41	16	3	1	0.2
	Mutatá 3	74	12	14	FA	4.9	2.8	2.2	2.7	0.75	1.73	7.4	6	6	61	5	2	2	0.2
	Mutatá 4	52	26	22	FArA	5.2	3.8	1.7	11.1	3.93	1.36	18.1	7	5	48	18	4	1	0.2
	Mutatá 6	36	22	42	Ar	4.9	2.8	4.5	6.7	2.3	0.2	13.5	5	2	60	11	3	1	0.29

Métodos de determinación son detallados en la sección “materiales y métodos”.

<sup>1</sup>Grupo 1: suelos con pH>5.5, ausencia de Al intercambiable, fertilidad medio-alta a alta. Grupo 2: suelos con pH<5.5, presencia de Al intercambiable, fertilidad medio-baja a baja.

A%: porcentaje de arena, L%: porcentaje de limo, Ar%: porcentaje de arcilla, MO%: porcentaje de materia orgánica y CICE: capacidad de intercambio catiónica efectiva.

**Figura 3. Análisis de correspondencia de zonas muestreadas en suelos del grupo 1 (alta) y 2 (baja) fertilidad**



Análisis de correspondencia en el software PAST 3.6. En este se muestra la demarcación de los dos grupos de fertilidad 1 (alta) y 2 (baja), analizando todos los parámetros del análisis de suelos.

De cada una de las muestras se contabilizó, purificó y almacenó todos los morfotipos de BAFE (Tabla 3). Con estos aislamientos, en un principio se estableció una colección de 310 aislados, pero se seleccionaron solo 140 aislados obtenidos de Iraca y maíz, en primera instancia por cuestiones de tiempo y presupuesto no se pudieron evaluar las cepas que correspondían a pepino. De las 219 cepas obtenidas de las otras dos plantas, algunas de estas no fueron viables después de su almacenamiento o después de la identificación con 16S no correspondían a *Bacillus* spp. o relacionados, a su vez, de las 187 y después de estos

inconvenientes quedaron solo 140 se pudieron evaluar a nivel de rasgos PGPR *in vitro* e *in planta* (proyecto paralelo a cargo del Dr. Daniel Uribe, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá). En la Tabla 3 se muestra la riqueza de todos los morfotipos obtenidos.

**Tabla 3. Riqueza de morfotipos BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo y el tipo de planta (Iracá, Maíz y Pepino).**

<b>Clasificación de fertilidad</b>	<b>Nombre<sup>1</sup></b>	<b>Iracá</b>	<b>Maíz v.</b>	<b>Pepino v.</b>	<b>Promedio por suelo</b>
Grupo 1 (Alta)	Tulenapa 1	16	8	11	11.05
	Tulenapa 2	10	6	8	
	Cancha 1	11	16	9	
	Piscina	12	12	13	
	Apartadó	13	15	10	
	Promedio	12.4	11.4	10.2	
Grupo 2 (Baja)	Guapacito	8	11	9	8.9
	Mutatá 2	11	16	9	
	Mutatá 3	6	5	6	
	Mutatá 4	10	12	8	
	Mutatá 6	10	11	8	
	Promedio	9	11	8	
<b>Promedio por planta</b>		10.7	11.2	9.1	

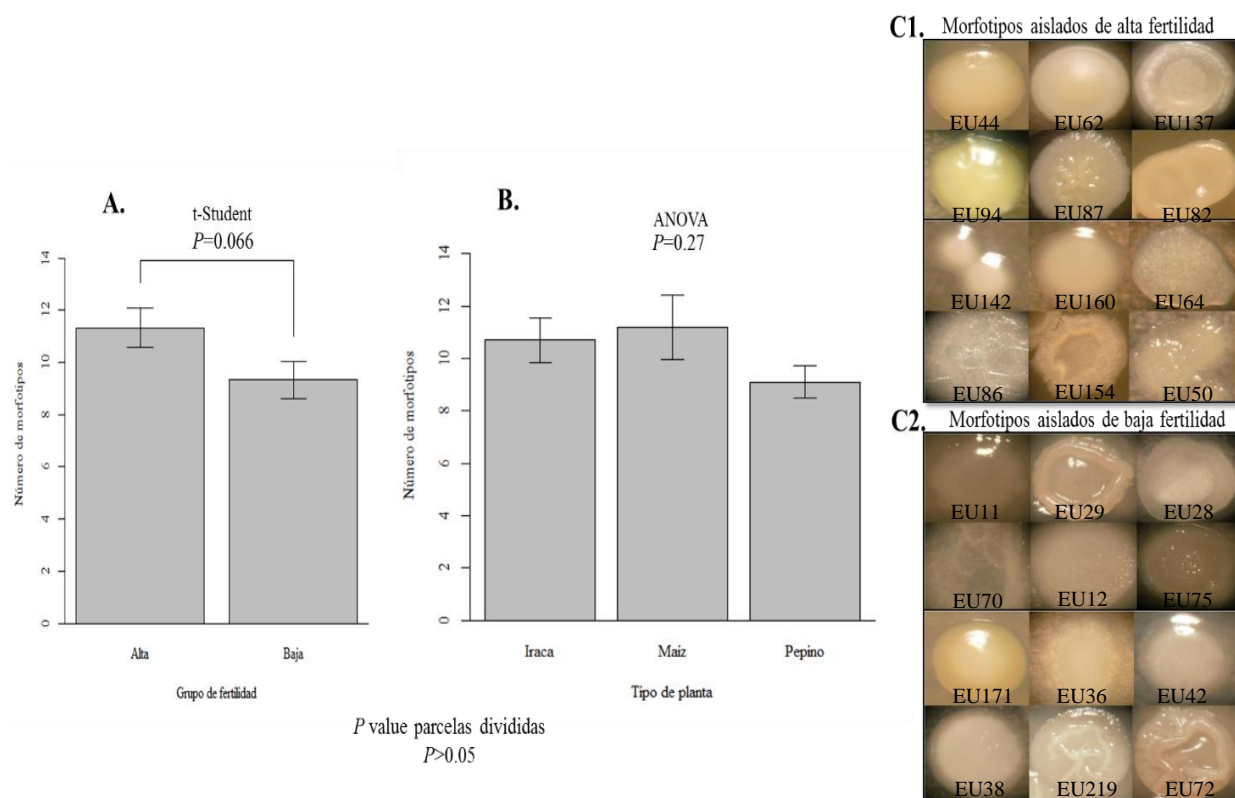
<sup>1</sup> Nombre de cada una de las zonas de muestreo.

Se muestran los totales de los morfotipos BAFE aislados, purificados y caracterizados de las diferentes zonas de muestreo de acuerdo a la clasificación de la fertilidad y tipo de planta. A su vez se muestran los promedios para cada condición (grupo de fertilidad y tipo de planta).

En el análisis del total de morfotipos aislados (Tabla 3), a nivel de fertilidad del suelo y del tipo de planta, se realizó un análisis bajo un modelo en parcelas divididas, evaluando la interacción que tenía el suelo y el tipo de planta (Figura 4); se interpretó que esta no fue significativa ( $P>0.05$ ). Al analizar por medio de una prueba t-Student (Figura 4.A) los morfotipos de acuerdo al tipo de suelo ( $P=0.06$ ) y de ANOVA ( $P=0.27$ ) por tipo de planta

(Figura 4.B), se interpretó que había diferencias significativas entre los dos grupos de fertilidad de acuerdo al número de morfotipos aislados para cada condición. Con respecto a los morfotipos BAFE aislados se encontró una interesante diversidad (en términos de riqueza) de estos, asociados a las diferentes muestras (Figura 4.C1 y 4.C2), lo cual podría sugerir también diversidad (en termino de riqueza) de especies.

**Figura 4. Análisis de la diversidad de morfotipos BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo (alta y baja) y el tipo de planta (Iraca, Maíz v y Pepino v).**



Análisis de parcelas divididas, valor  $P$  de la interacción entre parcela principal y subparcela ( $P>0.05$ ), donde se tomó como parcela principal (grupo de fertilidad) y subparcela (tipo de planta). A) Comparación entre número de morfotipos aislados de los grupos de fertilidad 1 (alta) y 2 (baja), (t-Student- $P=0.06$ ). B) Comparación entre número de morfotipos aislados por tipo de planta (ANOVA- $P=0.27$ ). C1) Algunos morfotipos seleccionados de suelos del grupo 1 (alta fertilidad). C2) Algunos morfotipos seleccionados de suelos del grupo 2 (baja fertilidad).



En la figura 5, se muestra el agrupamiento y los porcentajes de los clados de las 140 cepas evaluadas, estos se seleccionaron con base en el soporte de bootstrap (>70%). De acuerdo a esto se obtuvieron 16 clados, el cual uno de ellos correspondía al outgroup utilizado a en el análisis filogenético de NJ. Los clados más representativos fueron: *Bacillus thuringiensis/cereus* (32.9%), *B. amyloliquefaciens* (11.4%), *B. altitudinis/stratosphericus* (15.7%), *B. megaterium* (14.3%) y un clado que se consideró algo heterogéneo debido al agrupamiento mostrado en el árbol, el cual contenía las especies *Bacillus psychrodurans/B. fusiformis/B. sphaericus/B. massiliensi/Lysinibacillus boronitolerans* (7.14%). El análisis de NJ evidenció una separación del clado *B. subtilis* con *B. amyloliquefaciens* (Figura 5), esta separación difícilmente se ve en los análisis comparativos que se realizan con la secuencia parcial del 16S.

Se analizaron las frecuencias en porcentaje de los totales de aislados BAFE por condición (fertilidad y planta) (Figura 6), se observa que el tipo de planta (Iraca y maíz) aporta igual número de representantes BAFE (Figura 6.B). El grupo de fertilidad 1 (alta) aporta un mayor número de aislados que el grupo de fertilidad 2 (baja). La figura 6.A muestra la numeración de los clados en el árbol NJ 16S, esta numeración se ve esquematizada en la figura 6.C, en donde se expone las frecuencias de aislados por cada clado, en esta figura los más representativos son el 1, 4, 5, 9 y 11, que corresponden en su orden a *Bacillus thuringiensis/anthracis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus altitudinis/stratosphericus*, *Bacillus megaterium* y al formado por las especies *Bacillus psychrodurans/fusiformis/sphaericus/massiliensi* y *Lysinibacillus boronitolerans* respectivamente, estos

evidencian un efecto de la condición de aislamiento (fertilidad y planta). Análisis de  $\chi^2$  revelaron una asociación significativa entre el número de aislados por clado y la condición, el grupo de fertilidad ( $\chi^2$ - $P < 0.05$ ) tuvo una asociación significativa, y en el tipo de planta fue altamente significativa ( $\chi^2$ - $P < 0.001$ ).

Al analizar la riqueza de especies BAFE 16S por la condición de aislamiento (Tabla 4 y Figura 7), no se encuentra asociación entre el grupo de fertilidad y el tipo de planta ( $P > 0.05$ ), tampoco de evidenciaron diferencias significativas analizando las variables por separado (Wilcoxon- $P > 0.05$ ).

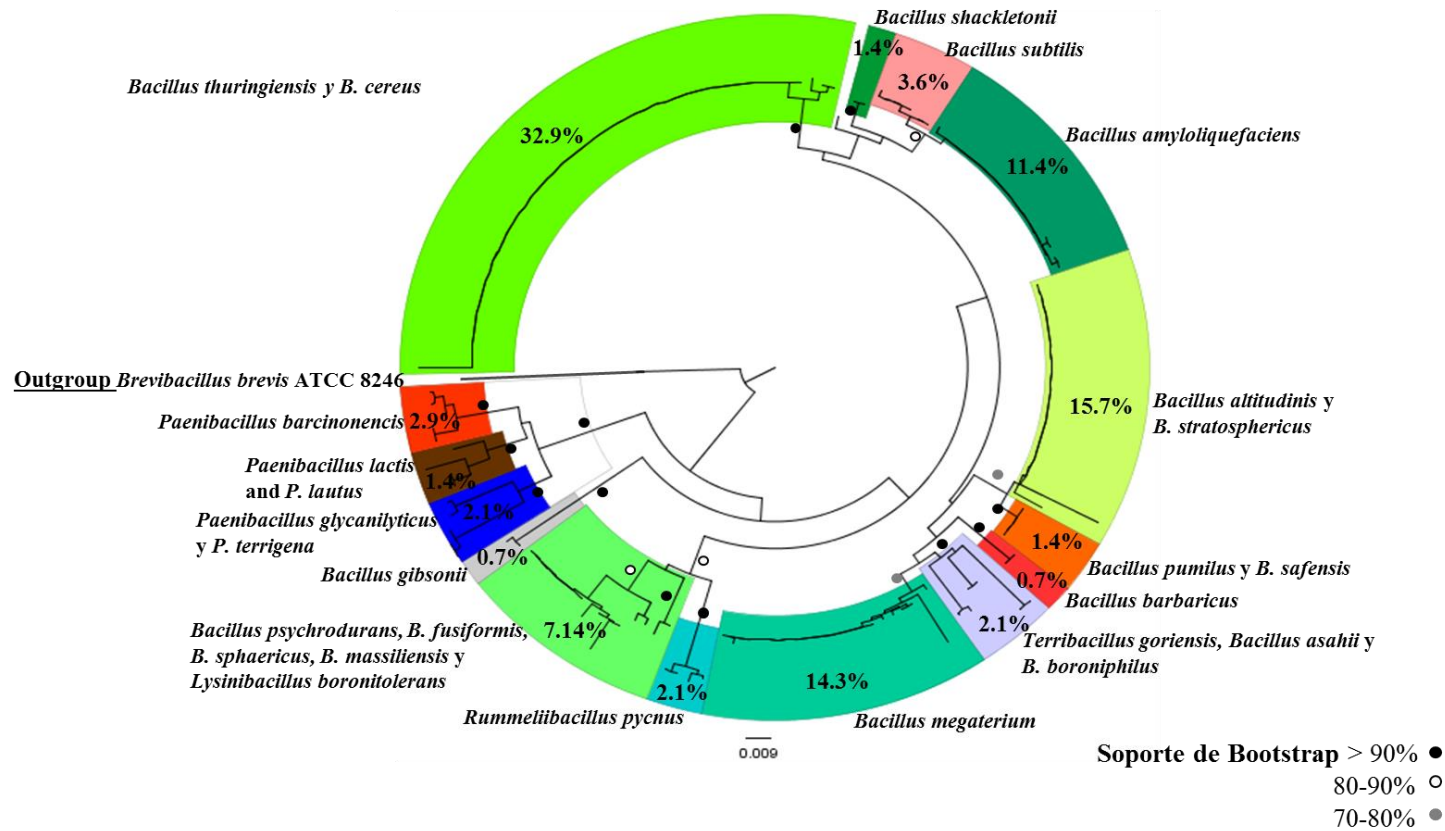
**Tabla 4. Riqueza de especies por 16S de BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo y el tipo de planta.**

Clasificación de fertilidad	Nombre <sup>1</sup>	Iraca	Maíz v.	Promedio por suelo
<b>Grupo 1 (Alta)</b>	Tulenapa 1	6	5	<b>6</b>
	Tulenapa 2	5	4	
	Cancha 1	6	6	
	Piscina	6	7	
	Apartadó	7	8	
	<b>Promedio</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	
<b>Grupo 2 (Baja)</b>	Guapacito	3	8	<b>5.1</b>
	Mutatá 2	5	7	
	Mutatá 3	2	3	
	Mutatá 4	4	7	
	Mutatá 6	6	6	
	<b>Promedio</b>	<b>4</b>	<b>6.2</b>	
<b>Promedio por planta</b>		<b>5</b>	<b>6.1</b>	

<sup>1</sup> Nombre de cada una de las zonas de muestreo.

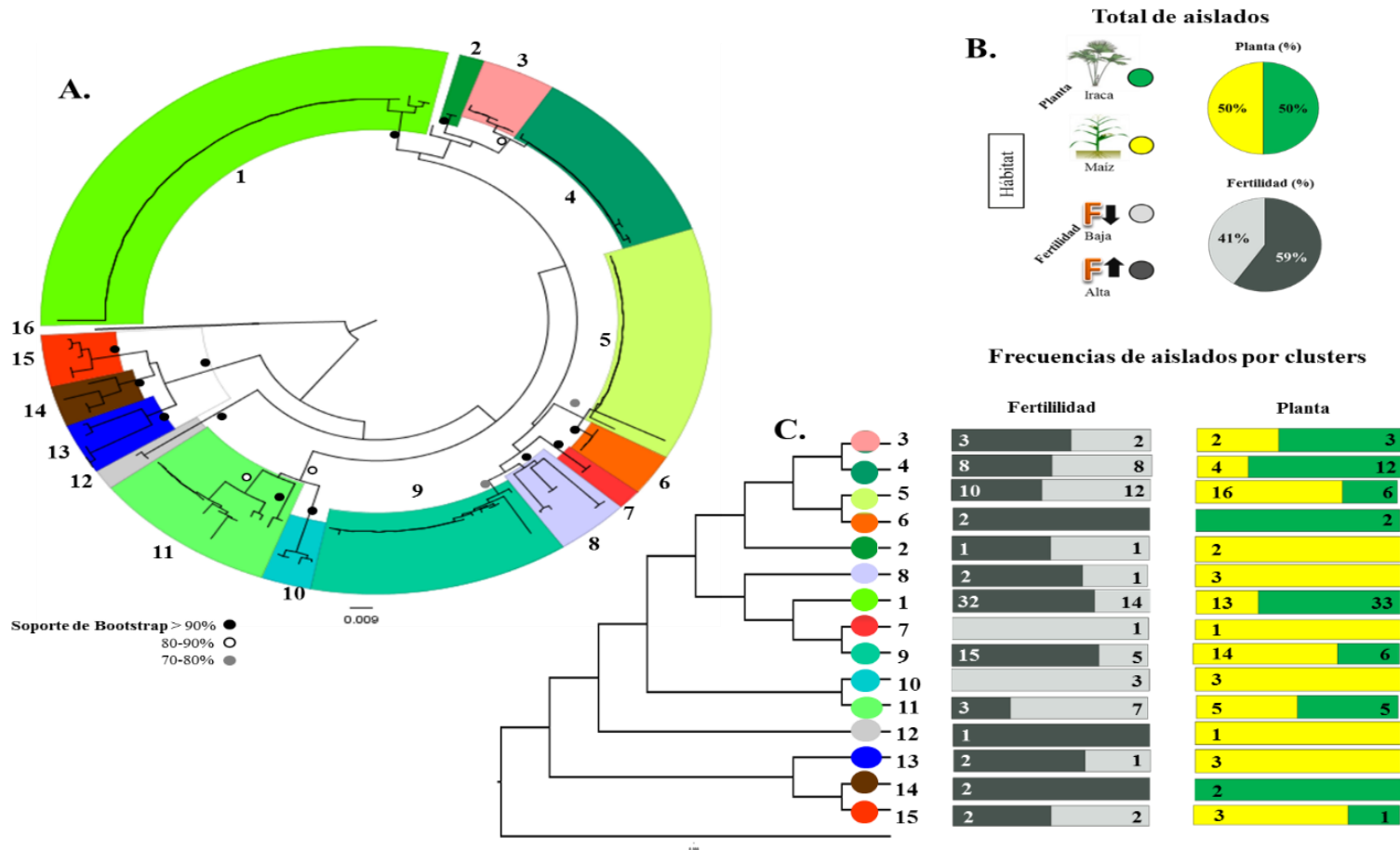
Se muestran los totales de las diferentes especies BAFE identificadas por 16S de acuerdo a las diferentes zonas de muestreo, clasificación de la fertilidad y tipo de planta. A su vez se muestran los promedios para cada condición (grupo de fertilidad y tipo de planta).

Figura 5. Árbol Neighbor Joining (NJ) 16S de aislados BAFE



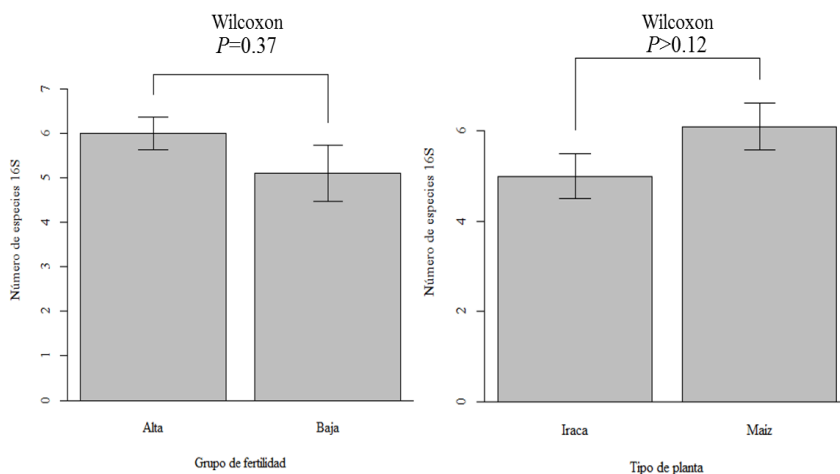
Filogenia del 16S de todos los aislados BAFE basada en el método de Neighbor Joining (NJ) con 1000 repeticiones de bootstrap. Cada color indica un clado diferente, y su porcentaje de representatividad se ve indicado dentro de cada uno de estos.

Figura 6. Frecuencias del número de aislados totales y de cada clado por condición (fertilidad y planta)



Análisis de las frecuencias del número de aislados (140) y de cada clado de BAFE por condición (fertilidad y planta). A) Árbol NJ 16S con división de números de clados, 16 en total incluyendo el outgroup. B) Frecuencias del total de aislados por condición. C) Filogenia del 16S de cepas tipo BAFE, basada en el método de Neighbor Joining (NJ) con 1000 repeticiones de bootstrap, se relaciona el agrupamiento por clado (número) y las frecuencias de cada uno por condición (fertilidad y planta).

**Figura 7. Análisis de la diversidad (riqueza) de especies por 16S de BAFE de acuerdo con la fertilidad del suelo y el tipo de planta**



Análisis de la diversidad de especies BAFE por 16S por medio de un diseño en parcelas divididas divididas ( $P>0.05$ ), donde se tomó como parcela principal (grupo de fertilidad) y subparcela (tipo de planta). Comparación entre número de especies BAFE 16S con respecto a los grupos de fertilidad 1 (alta) y 2 (baja), (Wilcoxon- $P=0.37$ ). Comparación entre número de especies BAFE 16S con respecto al tipo de planta (Wilcoxon- $P=0.12$ )

#### 4.2 Demarcación de ecotipos putativos a partir de secuencias de ADN en el clado

##### *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens.*

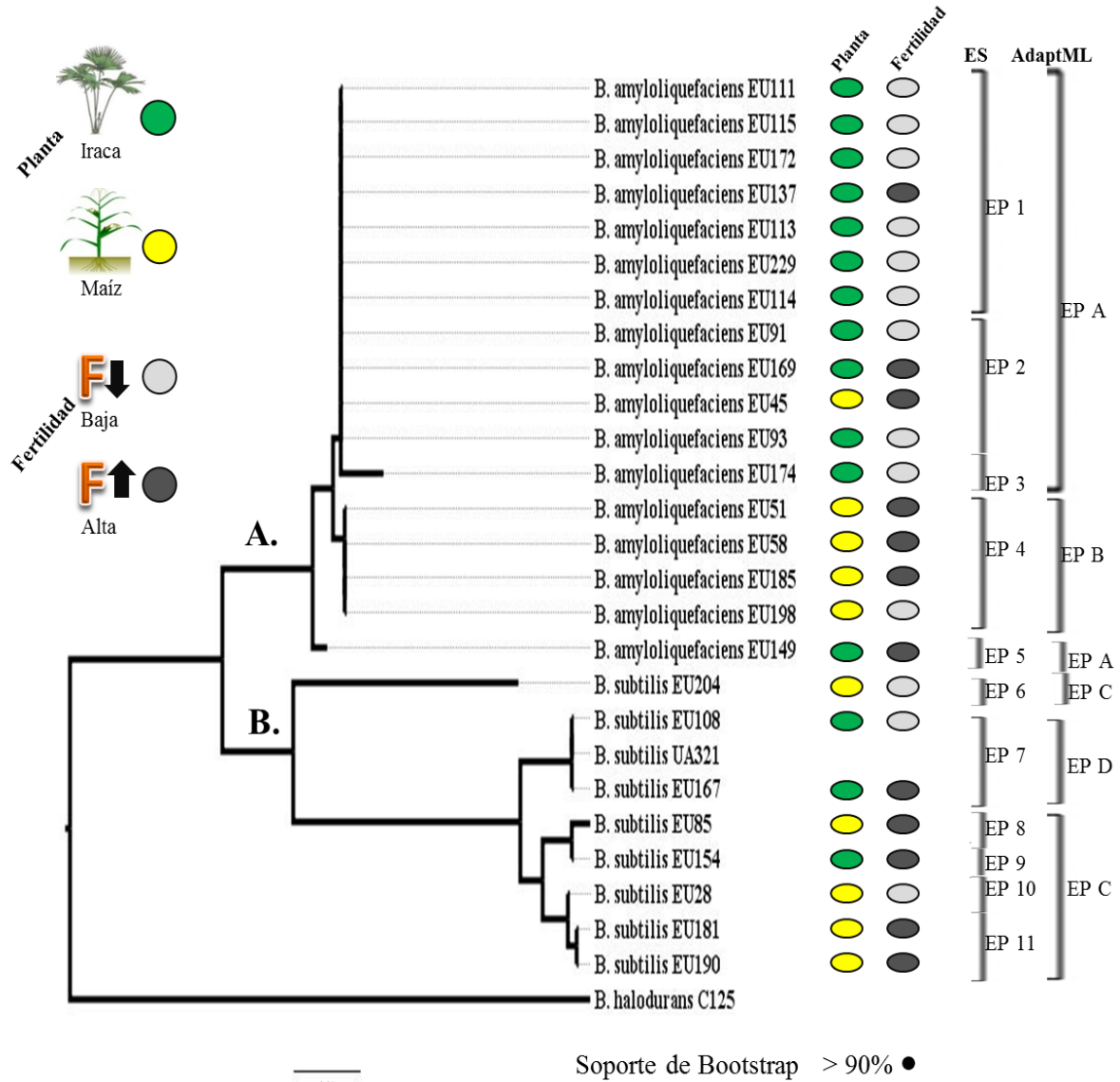
Al realizar la demarcación de los tipos ecológicos o Ecotipos Putativos (EP) mediante los algoritmos Ecotype Simulation (ES) y AdaptML, se obtuvieron 11 EP por ES y 4 EP por AdaptML (Figura 8), estos se evidencian como clusters en el árbol filogenético. El árbol del gen *gyrA* construido bajo el criterio de optimización de maximum likelihood (ML) (Figura 8) muestra la separación del clado *Bacillus subtilis* del clado *Bacillus amyloliquefaciens*. Varios EP fueron demarcados igual, independientemente del algoritmo utilizado, estos fueron el EP4-EPB, EP6-EPC y EP7-EPD; EPA y EPC demarcados por AdaptML incluyeron algunos EP demarcados por ES. En esta misma figura

también se esquematiza las condiciones del hábitat de aislamiento (fertilidad y planta) de cada una de las cepas, para la cepa *B. subtilis* UA321 no posee las mismas categorías de hábitat, ya que es una cepa del laboratorio que se ha trabajado en múltiples proyectos.

Es importante considerar que cada muchas de las cepas dentro de un mismo EP poseían diversas morfologías (Anexo 1-Figura 1) lo cual podría ser un factor diferenciador e importante para considerar que hay variabilidad en las cepas en un mismo tipo ecológico.

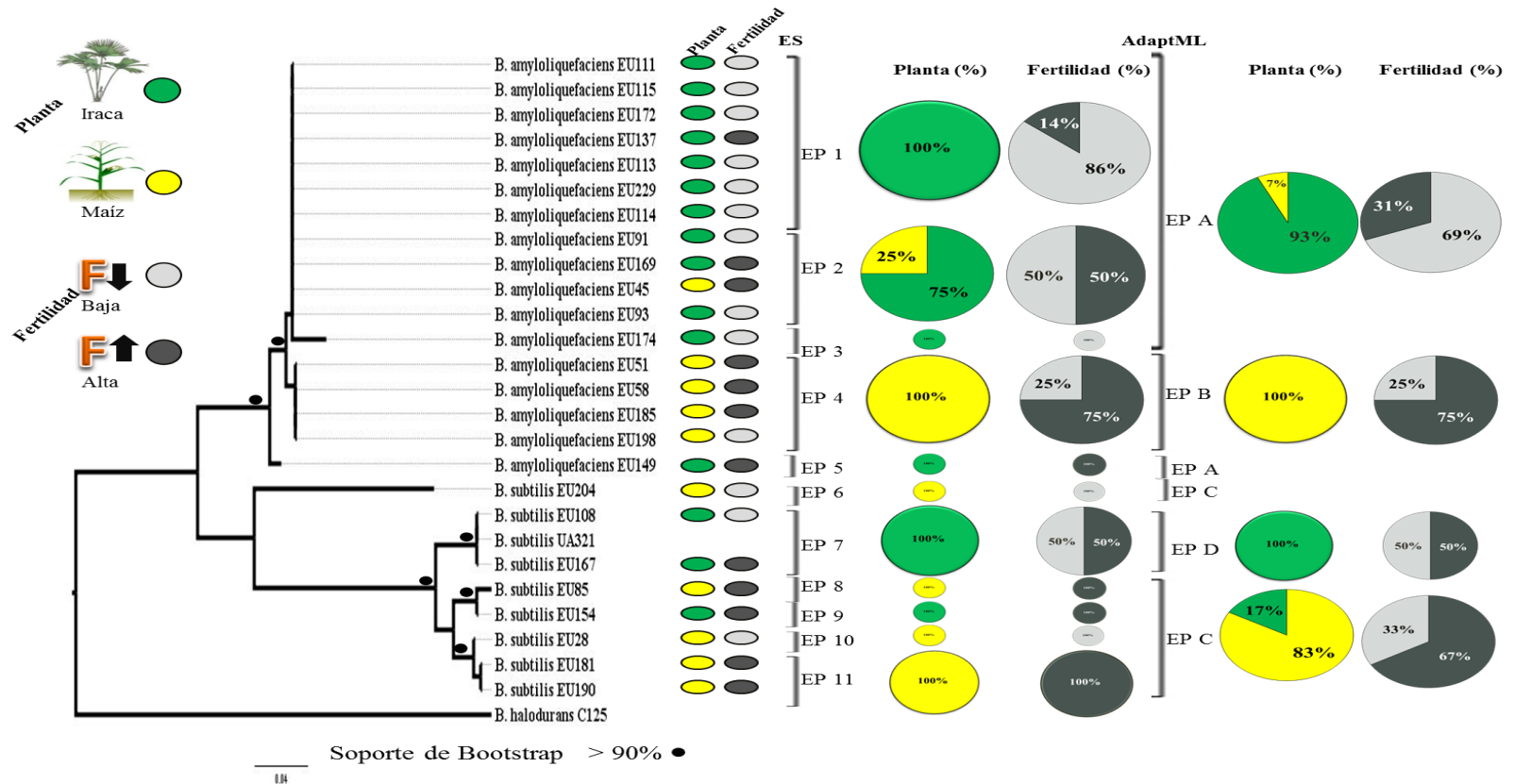
Para cada condición se esquematizó su representatividad en porcentaje dentro de cada EP demarcado por los dos algoritmos (Figura 9), esto se representó por diagramas de tortas ubicadas en cada cluster de EP. Mediante análisis de Chi2 se evidencio como la condición, especialmente el tipo de planta ( $\chi^2$ - $P < 0.01$ ) y no el grupo de fertilidad del suelo ( $\chi^2$ - $P > 0.05$ ), se asocia con la demarcación de EP para los dos algoritmos, lo que apoyaría la hipótesis de que la planta estuviera mediando, mayoritariamente, las condiciones de nicho ecológico y evolución de bacterias incluidas dentro del clado de evaluación (*Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*).

**Figura 8. Demarcación de Ecotipos Putativos (EP) utilizando Ecotype Simulation (ES) y AdaptML a partir de secuencias de *gyrA* en el clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*.**



Filogenia basada en el criterio de optimización de Maximum Likelihood (ML) bajo un modelo de sustitución nucleotídica GTR+I con 1000 repeticiones de bootstrap del gen *gyrA*. A) *Bacillus amyloliquefaciens*. B) Clado *Bacillus subtilis*. Demarcación de Ecotipos Putativos por ES y AdaptML, los círculos de colores representan la condición de aislamiento de la cepa.

**Figura 9. Frecuencias de Ecotipos Putativos (EP) demarcados por Ecotype Simulation (ES) y AdaptML por condición (fertilidad y planta) en el clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*.**



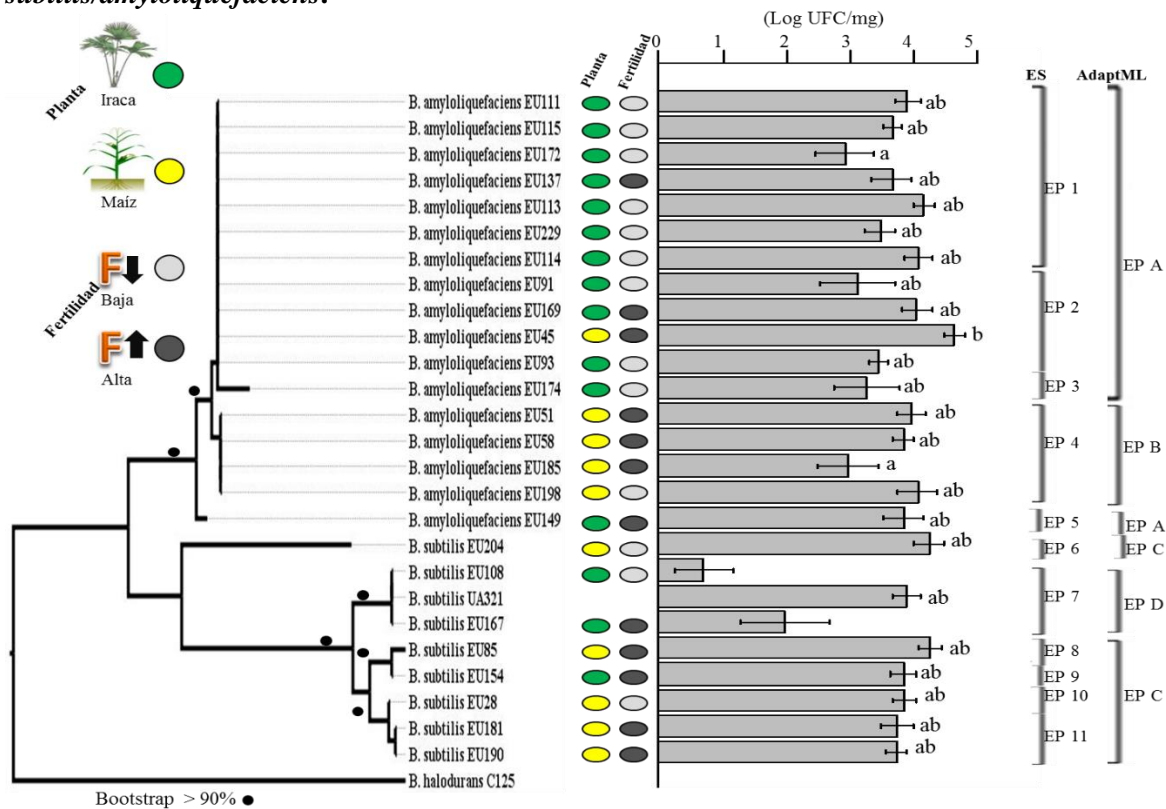
Filogenia basada en el criterio de optimización de maximum likelihood (ML) bajo un modelo de sustitución nucleotídica GTR+I con 1000 repeticiones de bootstrap del gen *gyrA*. Se muestra la demarcación de Ecotipos Putativos por ES y AdaptML. Los diagramas de tortas esquematizan las frecuencias absolutas por tipo de planta y grupo de fertilidad de cada uno de los Ecotipos demarcados. Se realizaron análisis de Chi<sup>2</sup> para evaluar asociación significativa entre Ecotipos demarcados (ES y AdaptML) y el tipo de planta ( $\chi^2$ - $P < 0.01$ ), y Ecotipos demarcados (ES y AdaptML) y grupo de fertilidad de los suelos ( $\chi^2$ - $P > 0.05$ ).



### 4.3 Pruebas *in planta* con aislados del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*.

En el ensayo de colonización temprana en plántulas de maíz (Figura 10) se encontró diferencia significativa entre los tratamientos (EP) (Kruskal Wallis- $P=0.008$ ), el test de comparaciones múltiples no paramétricas de Dunn muestra diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre las cepas de *B. amyloliquefaciens* EU45 y EU172 - EU185. No se observó ningún patrón o asociación entre los Ecotipos, en donde se pudiera evidenciar que cierto EP estuviera relacionado con una mayor o menor colonización.

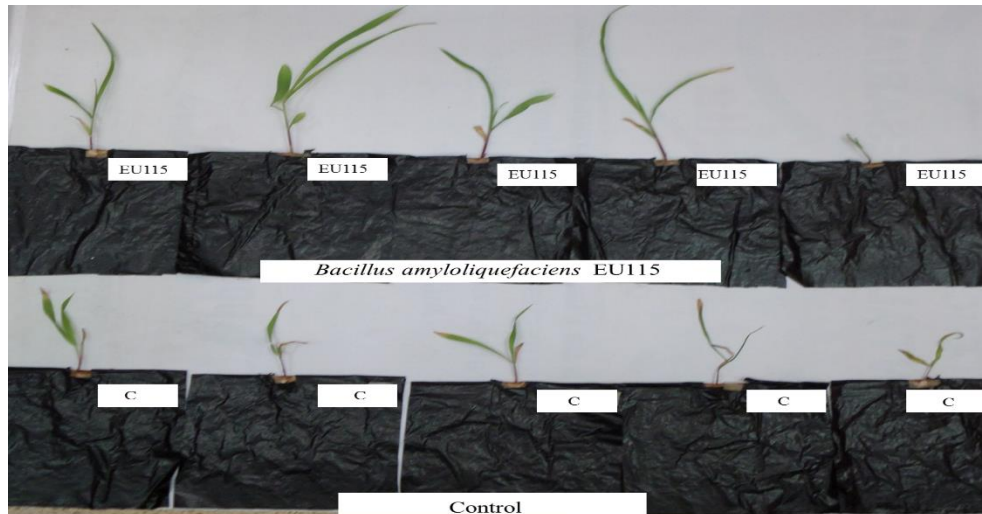
**Figura 10. Colonización temprana en plántulas de maíz evaluando aislados del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*.**



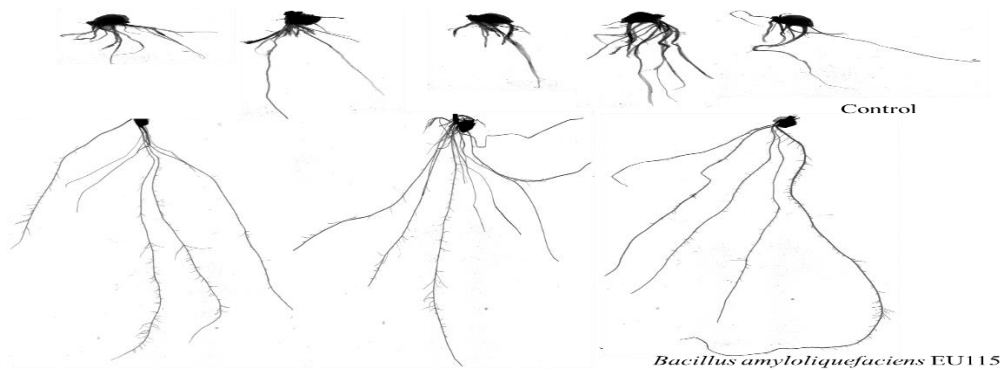
Determinación de la colonización temprana en plántulas de maíz expresada en el Log de UFC/mL. Test de Kruskal Wallis ( $P=0.008$ ) y test de comparaciones múltiples no paramétricas de Dunn, letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ). Las cepas *Bacillus subtilis* EU108 y EU167 fueron excluidas del análisis, debido a sus valores atípicos.

Figura 11. Efecto de la inoculación Ecotipos Putativos sobre la arquitectura radicular de plántulas de maíz mediante el método (SF-ROBS).

A.



B.



A) cosecha del experimento SF-ROBS, imágenes del tratamiento con la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* EU115 y su comparación con el control. B) raíces de maíz escaneadas después de la cosecha del experimento SF-ROBS de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* EU115 y su comparación con el control.

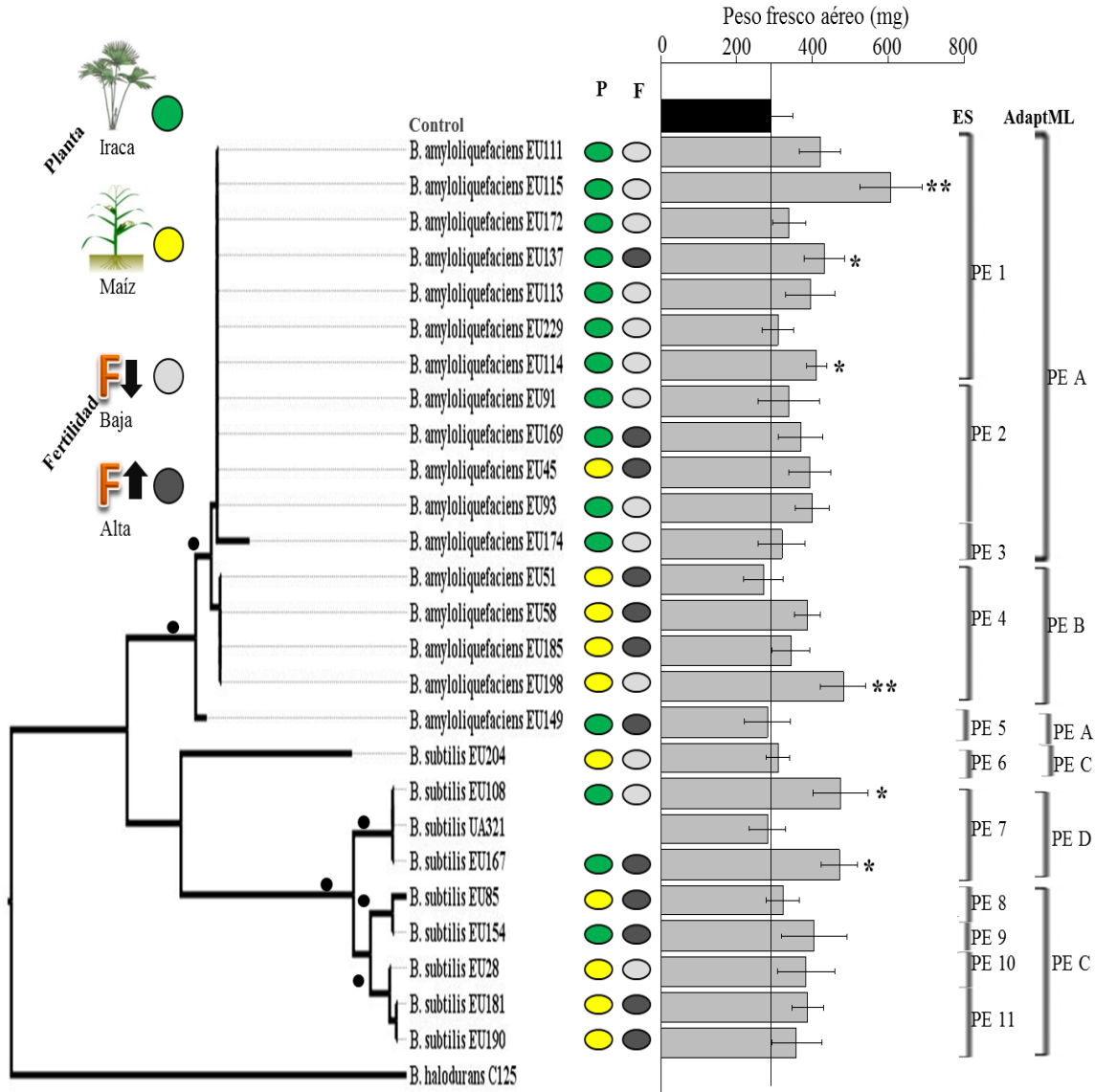
El experimento de arquitectura radicular mostró que hay efecto de cepas dentro de cada EP demarcado por ES y AdaptML en algunas de las variables evaluadas. Una de las cepas que reveló mayor efecto en la evaluación de variables, como lo es el peso aéreo de la planta así como su arquitectura radicular fue *B. amyloliquefaciens* EU115 (Figura 11.A y B).

Las figuras 12, 13 y 14, que corresponden a la evaluación de las variables peso fresco aéreo, longitud total de raíces y número de raíces de segundo orden, evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Las demás variables no son mostradas en este segmento (Anexo 1 – Figuras 2 a la 8) ya que no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

Para las variables que mostraron diferencias significativas (Figuras 12, 13 y 14), se realizó un análisis adicional, en este se evaluó si los EP demarcados con alguno de los dos algoritmos tenían diferencias significativas entre sí con respecto a estas tres variables, el análisis de varianza (ANOVA- $P > 0.05$ ) no reveló diferencias significativas y por lo tanto no se evidenció ningún patrón entre los diferentes tipos ecológicos.

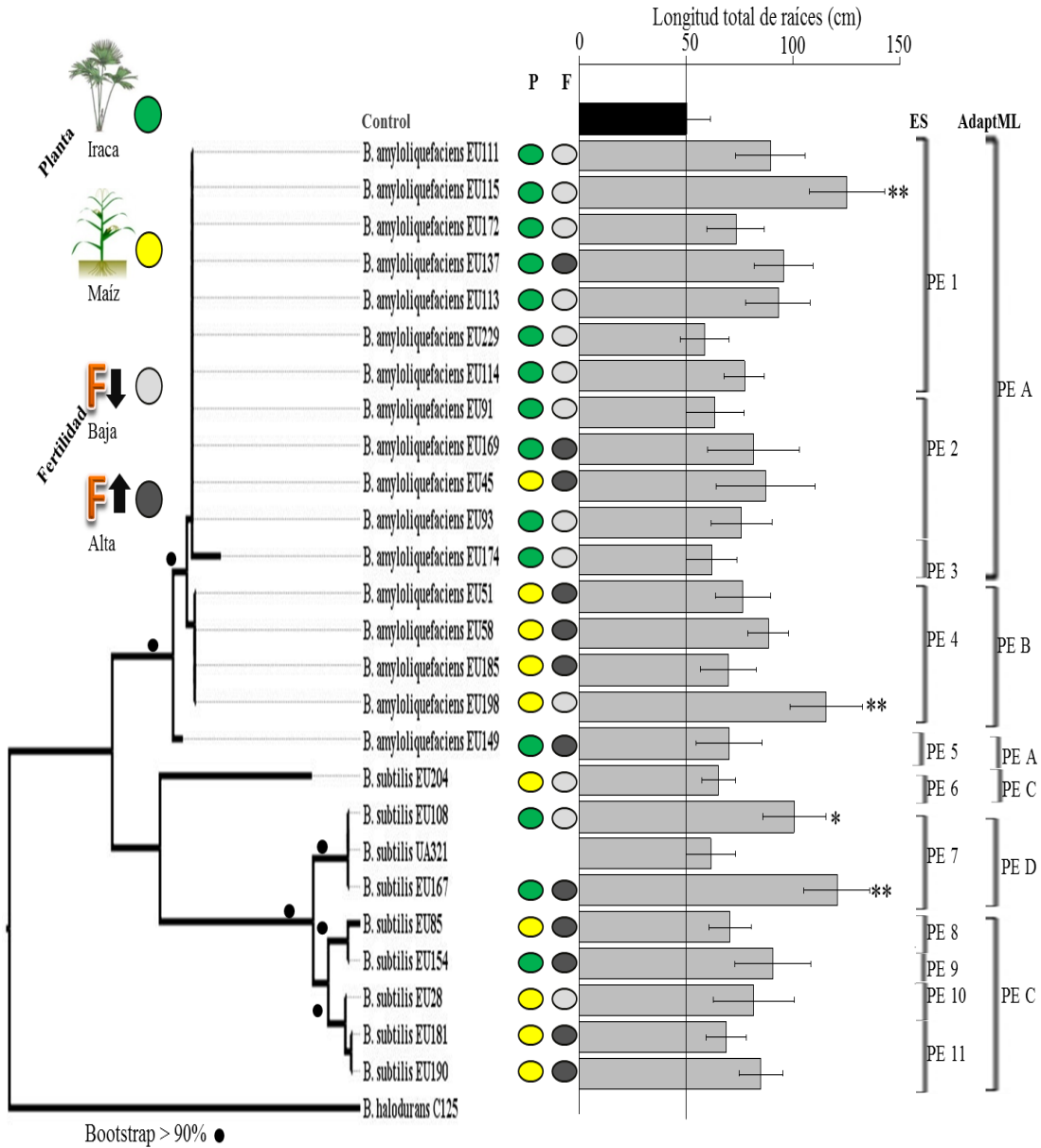
Los resultados de la medición de índoles como medida indirecta de la producción de ácido indol acético AIA (Figura 15) indican que no hay diferencias significativas entre las cepas evaluadas (ANOVA- $P > 0.05$ ). Cuando se realizó un análisis para comprobar si había diferencias significativas entre los EP para cada clado (*B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*) dentro del análisis filogenético por ML y que fueron demarcados con ES y con AdaptML, se obtuvieron diferencias significativas en el clado *B. amyloliquefaciens* para el EP4 por ES (ANOVA- $P = 0.008$ ), el cual es el mismo EP demarcado como EPB para AdaptML (t-Student- $P = 0.029$ ), sin embargo no para el clado *B. subtilis*, ningún EP presentó diferencias significativas en el clado *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens*. Es de considerar que en el EP4 o EPB todas las cepas provenían de zonas de aislamiento diferentes, pero todas fueron aisladas de la planta maíz.

**Figura 12. Efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* sobre el peso fresco aéreo en plántulas de maíz.**



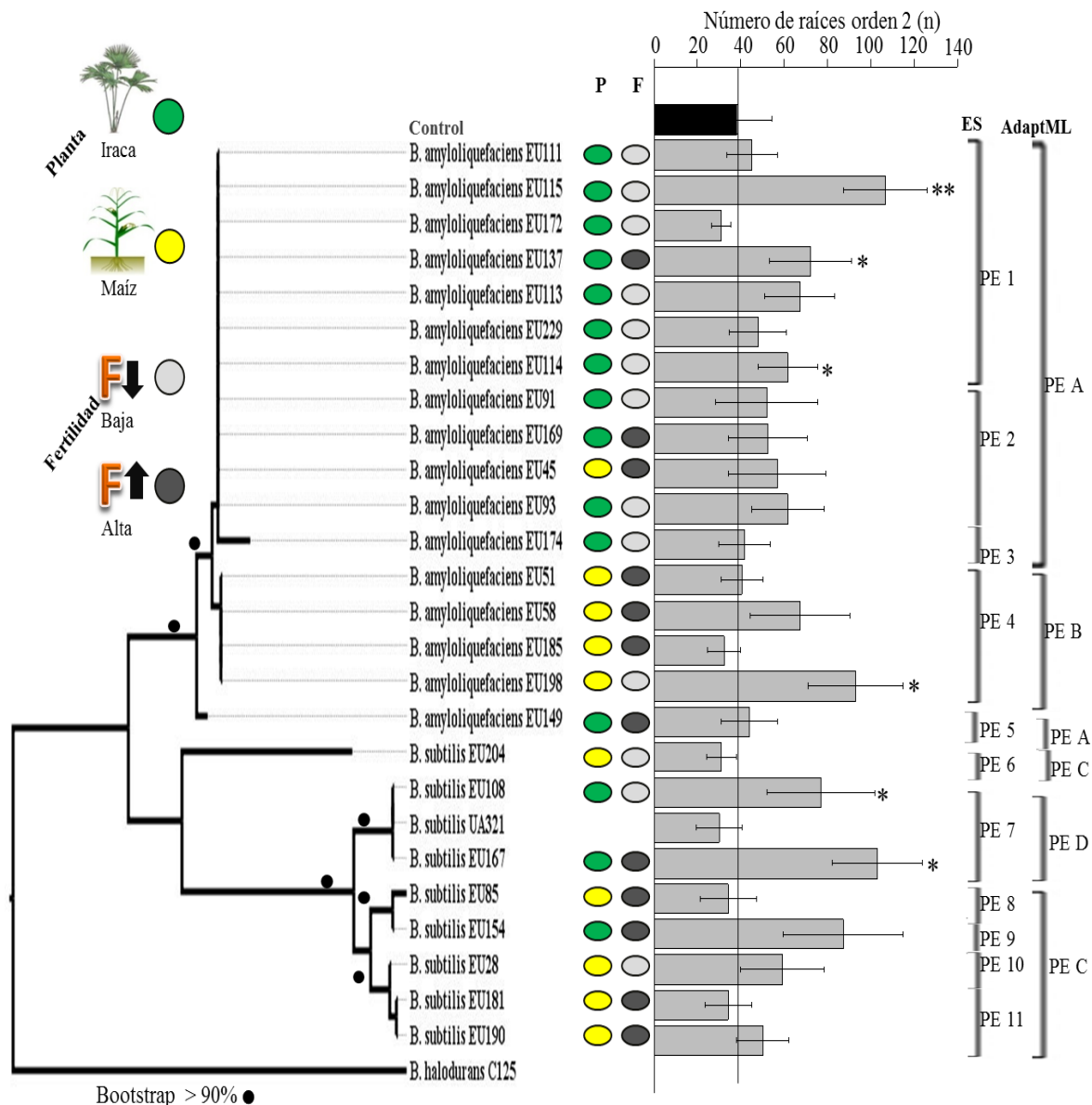
Evaluación del efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* sobre el peso fresco aéreo en plántulas de maíz expresado en miligramos (mg). Análisis de varianza ANOVA ( $P=0.025$ ) y pruebas t-Student, las diferencias significativas entre los tratamientos y el control se representan con asteriscos (\*\* $P<0.05$  - \* $P<0.1$ ).

**Figura 13. Efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* sobre la longitud total de raíces en plántulas de maíz.**



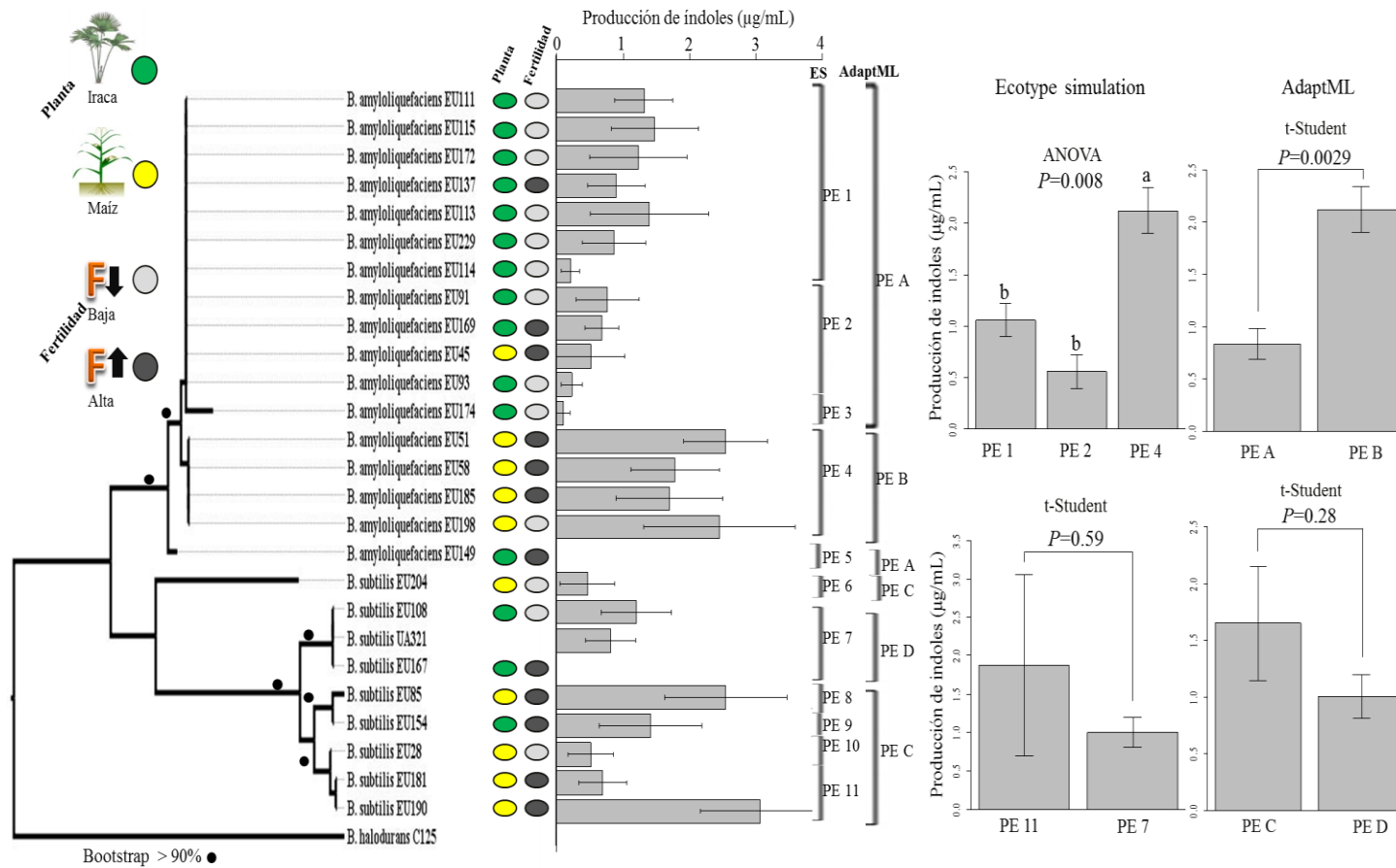
Evaluación del efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* sobre la longitud total de raíces de plántulas de maíz expresado en centímetros (cm). Análisis de varianza ANOVA ( $P=0.03$ ) y pruebas t-Student, las diferencias significativas entre los tratamientos y el control se representan con asteriscos (\*\*  $P<0.01$  - \*  $P<0.1$ ).

**Figura 14. Efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* sobre el número de raíces orden 2 en plántulas de maíz.**



Evaluación del efecto de la inoculación de Ecotipos Putativos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* sobre el número de raíces de segundo orden en plántulas de maíz expresado en centímetros (cm). Análisis de varianza ANOVA ( $P=0.05$ ) y pruebas t-Student, las diferencias significativas entre los tratamientos y el control se representan con asteriscos (\*\* $P<0.01$  - \* $P<0.1$ ).

**Figura 15. Producción de índoles (*in vitro*) de Ecotipos Putativos del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens***



Evaluación de compuesto indólico como medida indirecta de la producción de AIA, para cada uno de los Ecotipos Putativos (EP) demarcados. Se realizó análisis estadísticos para determinar diferencias significativas entre EP del clado *B. amyloliquefaciens* por Ecotype Simulation (ANOVA- $P=0.008$ ) y AdaptML (t-Student- $P=0.029$ ) de forma separada. Así mismo para el clado *B. subtilis* por Ecotype Simulation (t-Student  $P=0.59$ ) y AdaptML (t-Student- $P=0.28$ ).

## 5. Discusión

Uno de los resultados más destacables del estudio es la existencia de una climosecuencia en Urabá, con menores precipitaciones y mayores niveles de fertilidad del suelo hacia el norte de la región, y mayores precipitaciones y menores niveles de fertilidad (gracias a la lixiviación de bases intercambiables) del suelo hacia el sur (Tabla 2), lo que hace que haya dos zonas de fertilidad contrastantes (Figura 3). Esto hace que esta región se constituya en una zona sumamente adecuada y propicia para el estudio de la diversidad microbiana asociada a dichos parámetros y de procesos evolutivos de microbios asociados a ambientes tropicales.

Es de destacarse que hay un efecto en la diversidad, expresada en riqueza, de los morfotipos aislados en suelos de alta fertilidad (Figura 4), esto puede estar directamente asociado por la mayor disponibilidad de nutrientes en este tipo de suelos (Tabla 2). La diversidad y la riqueza de las comunidades bacterianas del suelo también pueden diferir según el tipo de ecosistema, y estas diferencias podrían, en gran medida, ser explicadas por el pH (Fierer y Jackson, 2006), donde la diversidad bacteriana es más alta en ambientes básicos que en ambientes ácidos, pues variables como la presencia de aluminio intercambiable puede afectar el establecimiento y desarrollo de estas poblaciones (Duxbury, 1981). Bajo las condiciones experimentales descritas no se evidenció que el tipo de planta tuviera un efecto sobre la riqueza de morfotipos encontrados.



Es pertinente mencionar que en este modelo experimental la selección de morfotipos tuvo un carácter subjetivo, ya que fue el criterio del investigador el que ayudaba a seleccionarlos, esto pudo haber permitido subestimar o sobrestimar la diversidad presente en cada una de las muestras. Este tipo de selección fue necesaria ya que siendo un estudio de prospección biológica para bacterias benéficas en planta era la manera de poder lograr una representatividad de aislados con un patrón diferenciador fácilmente reconocible (morfotipo), que pudieran ser evaluados *in vitro* e *in planta*.

Una hipótesis que se consideró, pero que no fue evaluada con este modelo experimental, es que hay asociación entre el morfotipo y la especie bacteriana identificada por 16S, esta asociación puede ser de importancia ya que permitiría tener un acercamiento entre la morfología y su presunta identificación (Figura 4.C1 y C2).

Los resultados obtenidos al analizar la diversidad de especies bacterianas identificadas con el gen de 16S, dan un acercamiento a la riqueza y abundancia de estas (Figura 5), y permite hacer asociaciones directas con las condiciones de donde fueron aisladas. Los clados más representativos en abundancia, se asociaron a diferentes condiciones de hábitat (tipo de suelo o planta) (Figura 6), especialmente al tipo de planta, esto permitiría especular, bajo estas condiciones experimentales, que buscar estos microorganismos estaría sujeto a estas condiciones y que sería más probable encontrarlos si el investigador guiara su búsqueda a una de estas, claro, dependiendo del clado en que se quiera enfatizar.

Cuando se analiza la riqueza de especies, y no su abundancia, esta variable no se asocia con las condiciones evaluadas.

La evaluación de los tipos ecológico o Ecotipos Putativos (EP) teóricos dentro del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, es una nueva propuesta que permitiría hacer prospección de bacterias PGPR. Este modelo se basa en la hipótesis que la taxonomía puede reflejar la función PGPR. Clasificar de una manera más fina las especies bacterianas, en donde no solo se tenga en cuenta la aproximación operativa sino también la ecológica, permitiría acercarse a su nicho ecológico, y por lo tanto, a su función. La demarcación de EP mediante los algoritmos Ecotype Simulation y AdaptML genera grupos ecológicamente homogéneos a nivel teórico, en donde se especula que si los EP demarcados son ecológicamente similares, estos deben tener el mismo nicho ecológico, eso quiere decir que su ubicación-función es similar a nivel biológico.

La evidencia en este modelo experimental apunta a que el tipo de planta es determinante en la especiación ecológica de los representantes del clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (Figuras 8 y 9), por lo tanto, este tipo de condición está ejerciendo una mayor representatividad en la demarcación de su actividad biológica. Esta idea se apoya en la hipótesis de la selección de la planta en cuanto su comunidad microbiana (Garbeva *et al.*, 2008). En cambio el tipo de suelo (alta y baja fertilidad) no tuvo efecto sobre la demarcación de los EP.

En los experimentos *in planta* no se encontraron patrones con respecto a la demarcación de EP (Figuras 10, 12 a 14), no se generó evidencia de que un grupo ecológicamente homogéneo se diferenciara significativamente de otro en las variables evaluadas. Esto se puede explicar en vía de que los Ecotipos demarcados son netamente teóricos “putativos”, y puede haber errores en esta aproximación. Aunque la resolución que da el gen de la *gyrA* es buena con respecto a estas inferencias de especiación ecológica, se podrían utilizar otros genes para la demarcación, como por ejemplo *rpoB* o *dnaJ* (Connor *et al.*, 2010), lo que permitiría una aproximación más certera a los tipos ecológicos en este clado.

Los métodos utilizados para las pruebas *in planta*, específicamente, el que permitió evaluar colonización temprana en plántulas de maíz, lo hizo de manera eficiente. Es importante considerar que este método puede complicarse si no se conoce bien el morfotipo de la bacteria y si la semilla trae abundantes microorganismos acompañantes. El método SF-ROBS también permitió evaluar efecto en promoción de crecimiento, especialmente en la arquitectura radicular. Se especula que este efecto de algunas de las cepas evaluadas pueda deberse a la producción de fitohormonas, especialmente de ácido indol acético AIA. Aunque esto no se asoció con la producción de índoles *in vitro* (Figura 15), esto se puede explicar debido a que la producción de esta molécula *in vitro* no es la misma *in planta*.

En este ensayo se encontró un patrón con respecto a la producción de índoles, el EP4 demarcado con Ecotype Simulation, el cual es el mismo EPB por AdaptML, presentó diferencias con los otros EP al producir más compuestos indólicos. Se especula que con aporte de más evidencia (evaluación de más cepas del mismo clado), tal vez bajo las mismas condiciones experimentales y cuya secuencia(s) de

gyrA se asocia(n) con este EP, es probable que también produzcan índoles de manera similar. Estos resultados apoyarían la hipótesis de un nuevo modelo de prospección de PGPR formadoras de endospora asociadas a las especies pertenecientes al clado *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, en donde lo taxonómico se pueda asociar a la función PGPR. Esto pudiera conllevar a utilizar menos recursos y tiempo de los investigadores en la búsqueda de bacterias benéficas asociadas a plantas.

Para poder generar más evidencia a este tipo de estudios se sugiere promover la ejecución de investigaciones basadas en el tema de la búsqueda sistemática de bacterias benéficas, en donde se evalúen más cepas y diferentes modelos experimentales, en donde se puedan contrastar el genotipo con el fenotipo. En la evaluación de hipótesis evolutivas y de especiación ecológica, se podría aumentar el número de genes evaluados, o considerar tener genomas completos para hacer las respectivas inferencias.

## 6. Bibliografía

- Ahmad, F., L. Ahmad y M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163, 173-181.
- Arguelles Arias, A., M. Ongena, B. Halimi, Y. Lara, A. Brans, B. Joris y P. Fickers. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8, 63.
- Artuso, A. 2002. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. *World Development* 30, 1355–1368.
- Bacilio, M., J.P. Hernandez y Y. Bashan. 2006. Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* 43, 112-119.
- Bais, H.P., S.W. Park, T.L. Weir, R.M. Callaway y J.M. Vivanco. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci* 9, 26–32.
- Barriuso, J., R.-S. B., J. Lucas, A. Probanza, A. García-Villaraco y J. Gutiérrez-Mañero. 2008. Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). p. 1-17. En: Ahmad I. P. J. y. H. S. (ed.). *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.
- Beauchamp, C., P. Dion, J.W. Kloepper y H. Antoun. 1991. Physiological characterization of opine-utilizing rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. *Plant and Soil* 132: 273-279, 1991. 132.
- Becker, J., N. Eisenhauer, S. Scheu y A. Jousset. 2012. Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters* 15, 468–474.
- Berg, G. y K. Smalla. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68, 1–13.
- Beschoren da Costa, P., A. Beneduzi, R. de Souza, R. Schoenfeld, L. Vargas y L. Passaglia. 2013. The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: guidelines for directed bacterial prospection and testing. *Plant Soil* 368, 267–280.
- Beurton, P. 2002. Ernst Mayr through time on the biological species concept ? a conceptual analysis. *Theory in Biosciences* 121, 81-98.
- Borriss, R., X. Chen, C. Rueckert, J. Blom, A. Becker, B. Baumgarth, B. Fan, R. Pukall, P. Schumann, C. Spröer, H. Junge, J. Vater, A. Pühler y H. Klenk. 2011. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence

- comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 1786-1801.
- Brar, S.K., M. Verma, R.D. Tyagi y J.R. Valéro. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41, 323-342.
- Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? . *Annual Review of Microbiology* 56, 457-487.
- Cohan, F.M. 2010a. Are species cohesive? A view from bacteriology, *In* P W. S. y. F., (ed.) *Bacterial Population Genetics: A Tribute to Thomas S. Whittam*. . American Society for Microbiology Press, Washington.
- Cohan, F.M. 2010b. A theory-based pragmatism for discovering and classifying newly divergent bacterial species, *In* M T., (ed.) *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, Burlington.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément y E. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4951-4959.
- Connor, N., J. Sikorski, A.P. Rooney, S. Kopac, A.F. Koepfel, A. Burger, S.G. Cole, E.B. Perry, D. Krizanc, N.C. Field, M. Slaton y F.M. Cohan. 2010. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1349-1358.
- Darriba, D., T. GL., R. Doallo y D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.
- Dey, R., K. Pal, D. Bhatt y S. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159, 371-394.
- do Vale Barreto, M., A. Ferreira de Araújo, H. Almeida Burity y M. de Andrade Lira Junior. 2011. Biodiversity and the potential of PGPR: plant-microorganism interactions. p. 332. En: Araújo A. S. F. d. (ed.). *Microbial Ecology of Tropical Soils*. Nova Science Publishers. New York.
- Duxbury, T. 1981. Toxicity of heavy metals to soil bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 11, 217-220.
- Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. 2007. *Ecología molecular*. Mexico. 594 p.
- Eisenhauer, N., W. Schulz, S. Scheu y A. Jousset. 2013. Niche dimensionality links biodiversity and invasibility of microbial communities. *Functional Ecology* 27, 282–288
- Emmert, E. y J. Handelsman. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171, 1-9.

- Fierer, N. y R. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. PNAS 103, 626-631.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. Phytopathology 94, 1245-1248.
- Garbeva, P., J.D. van Elsas y J.A. van Veen. 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. Plant Soil 302.
- Gerhardt, K.E., X.D. Huang, B.R. Glick y B.M. Greenberg. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. Plant Science 176, 20-30.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol 41, 109-117.
- Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin y D. Penrose. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London. 267 p p.
- Glick, B.R., B. Todorovic, J. Czarny, Z. Cheng, J. Duan y B. McConkey. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Critical Reviews in Plant Sciences 26, 227 - 242.
- Glickmann, E. y Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 61, 793.
- Gordon, S.A. y R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiology 26, 192.
- Gotz, D., A. Banta, T.J. Beveridge, A.I. Rushdi, B. Simoneit y A.L. Reysenbach. 2002. *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogenoxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1349-1359.
- Guindon, S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk y G. O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology 59, 307-321.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.
- HariPrasad, P., S.T. Divakara y S.R. Niranjana. 2011. Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of *Fusarium* wilt in tomato. Crop Protection 30, 1606-1612.

- Heidari, M. y A. Golpayegani. 2011. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 11, 57–61.
- Hund, A., S. Trachsel y P. Stamp. 2009. Growth of axile and lateral roots of maize: I development of a phenotyping platform. *Plant Soil* 325, 335–349.
- Hunt, D., D. Lawrence, D. Gevers, S. Preheim, E. Alm y M. Polz. 2008. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* 320 1081-1085.
- Jaeger, C.H., S.E. Lindow, W. Miller, E. Clark y M.K. Firestone. 1999. Mapping of sugar and amino acids availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol* 65, 2685–2690.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions between homologous nucleotide sequences. *J. Mol. Evol* 16, 111–120.
- Kita, N. y T. Ohya. 2005. Biological Control of Damping-Off of Tomato Seedlings and Cucumber Phomopsis Root Rot by *Bacillus subtilis* RB14-C. *JARQ* 39, 109-114.
- Kloepper, J.W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria. p. 137–166. En: Okon Y. (ed.). *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Kloepper, J.W. y M. Schroth. 1978. Plant-growth promoting rhizobacteria on radishes, pp. 879-882, *In* A. A. D., (ed.) *Proceedings of the Fourth International Conference in Plant Pathogenic Bacteria*, Vol. 2. Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Paris.
- Kloepper, J.W. y M.N. Schroth. 1981. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71, 1020-1024.
- Kloepper, J.W., R. Lifshitz y M.N. Schroth. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sc.: Anita. Plant Sci*, 60-64.
- Klyuchnikov, A.A. y P.A. Kozherin. 1990. Dynamics of *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense* populations during the formation of the vesicular arbuscular mycorrhiza. *Microbiology* 59, 449-452.
- Koepfel, A., E.B. Perry, J. Sikorski, D. Krizanc, A. Warner, D.M. Ward, A.P. Rooney, E. Brambilla, N. Connor, R.M. Ratcliff, E. Nevo y F.M. Cohan. 2008. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 2504-2509.
- Kokalis, N., J.W. Kloepper y M. Reddy. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology* 31, 91–100.



- Kumar, A., A. Prakash y B.N. Johri. 2011. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. En: Maheshwari D. K. (ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer. Verlag Berlin Heidelberg.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson y D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948
- Lifshitz, R., J.W. Kloepper, M. Kozlowski, C. Simonson, J. Carlson, E.M. Tipping y I. Zaleska. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* 33, 390-395.
- Mayden, R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. Pages in: *Species: the units of biodiversity* Chapman y Hall. London.
- Maynard Smith, J., N.H. Smith, M. O'Rourke y B.G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4384-4388.
- Mayr, E. 1970. *Populations, species and evolution*. Massachusetts.
- Mcspadden Gardener, B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* species in agricultural systems. *Phytopathology* 94, 1252-1258.
- McSpadden Gardener, B. 2010. Biocontrol of Plant Pathogens and Plant Growth Promotion by *Bacillus*. En: al. U. G. e. (ed.). *Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century 1*. Springer Science+Business Media.
- Nelson, L.M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management Online*.
- Osorio, W. 2014. *Manejo de nutrientes en suelos del trópico*. Medellín. 416 p.
- Patten, C.L. y B.R. Glick. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 635-642.
- Penrose, D. y B.R. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 118, 10-15.
- Planchamp, C., D. Balmer, A. Hund y B. Mauch-Mani. 2013. A soil-free root observation system for the study of root-microorganism interactions in maize. *Plant Soil* 367, 605-614.
- Ramírez, C. 2010. Exploring the relation between plant phosphorus nutrition and growth promotion by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* strains, Auburn University, Auburn, AL. 144 p.
- Ramírez, C. y J.W. Kloepper. 2010. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils* 46, 835-844.

- Reva, O.N., C. Dixelius, J. Meijer y F.G. Priest. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 249-259.
- Ribeiro, C. y E. Cardoso. 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiol Res* 167, 69-78.
- Segovia, L., J.P. Young y E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 374-377.
- Siddiqui, Z. 2005. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. p. 111–142. En: Siddiqui Z. A. (ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer. Netherlands.
- Silvestro, D. y I. Michalak. 2011. raxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*.
- Stackebrandt, E. y B. Goebel. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 846-849.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G.M. Garrity, P.A. Grimont, P. Kampfner, M.C. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H.G. Truper, L. Vauterin, A.C. Ward y W.B. Whitman. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 52, 1043-1047.
- Strobel, G. y B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 67, 491–502.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571–586.
- Ward, D.M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol* 1, 271-277.
- Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr y H.G. Truper. 1987. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 463-464.
- Yasmin, F., R. Othman, M.S. Saad y K. Sijam. 2007. Screening for beneficial properties of Rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *J. Biotec.* 6, 49-52.

Zahir, Z., M. Arshad y J.T. Frankenberger. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* 81, 97-168.

Zehnder, G., J. Murphy, E. Sikora y J.W. Kloepper. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107, 39–50.