



Lorch, Melani

Análisis de la viabilidad sobre semillas, de la colonización radicular y de la competencia rizosférica de aislamientos probióticos de *Pseudomonas*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Lorch, M. (2025). *Análisis de la viabilidad sobre semillas, de la colonización radicular y de la competencia rizosférica de aislamientos probióticos de Pseudomonas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/5293>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Análisis de la viabilidad sobre semillas, de la colonización radicular y de la competencia rizosférica de aislamientos probióticos de *Pseudomonas*

TESIS DOCTORAL

Melani Lorch

mglorch@gmail.com

Resumen

El tratamiento de semillas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal es una de las estrategias principales para incorporar microorganismos benéficos en los ecosistemas agrícolas, especialmente en cultivos bajo manejo extensivo como el maíz, el trigo y la soja. En las últimas décadas, este tipo de prácticas ha crecido enormemente como alternativa sostenible frente a otros manejos más tradicionales, que implican el uso de agroquímicos. Entre los microorganismos promotores del crecimiento vegetal que habitan los suelos, se encuentran las bacterias del género *Pseudomonas*. Algunas especies dentro del género son capaces de promover y mejorar el desarrollo de las plantas mediante la producción de metabolitos secundarios, lo que las convierte en interesantes candidatas para el desarrollo de nuevos bioinsumos agrícolas.

Esta tesis se centra en el estudio de 6 aislamientos autóctonos del género *Pseudomonas* provenientes de lotes agrícolas de la Pampa Húmeda Argentina, caracterizados de acuerdo a su capacidad antagonista de hongos fitopatógenos *in vitro*. Con el objetivo de evaluar el desempeño de cada uno de ellos como inoculantes en cultivos extensivos, en primer lugar, llevamos a cabo un estudio de supervivencia en semillas de maíz, trigo y soja, mediante recuentos selectivos en placa. Luego, analizamos el patrón de colonización radicular de cada aislamiento por microscopía confocal de fluorescencia en condiciones axénicas. Por último, analizamos la competitividad rizosférica en invernáculo utilizando suelo como sustrato.

Los resultados indican que los niveles de bacterización y la capacidad de persistir en semillas pre-inoculadas son propiedades específicas de cada combinación bacteria-semilla, al igual que el efecto de la adición de protectores. Los aislamientos, que mostraron distintos patrones de colonización en los ensayos de microscopía, se detectaron en la rizósfera en cantidades que correlacionaron con el grado de bacterización de las semillas. En la mayoría

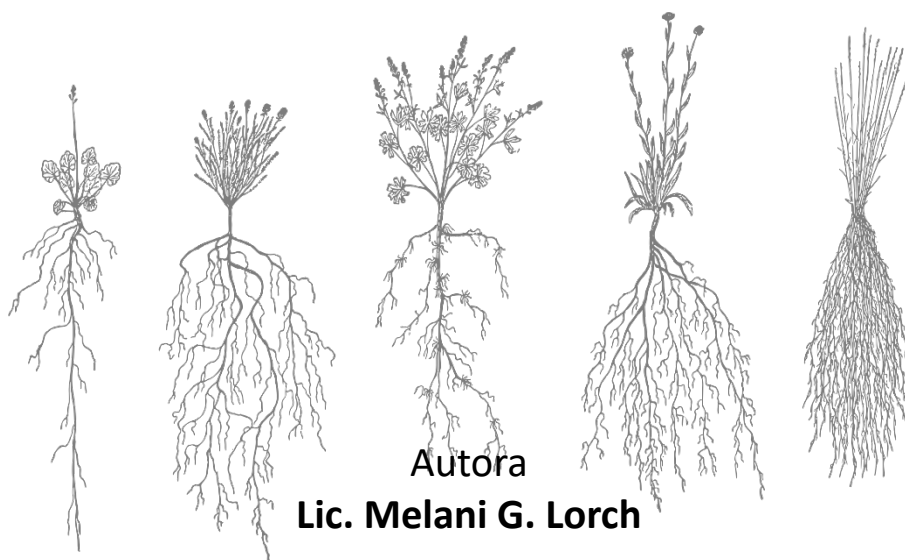
de los casos, la mayor ocupación rizosférica se vinculó con una mayor eficiencia en la promoción del crecimiento.

Aunque suele aceptarse que bacterias de un mismo género presentan comportamientos similares al ser empleadas como inoculantes, nuestros resultados destacan la importancia de optimizar el tratamiento de bacterización para cada sistema planta-bacteria, incluyendo la selección de los compuestos protectores más adecuados para cada caso.



Laboratorio de Fisiología y Genética de Bacterias Beneficiosas para Plantas
Centro de Bioquímica y Microbiología del Suelo
Universidad Nacional de Quilmes

Análisis de la viabilidad sobre semillas, de la colonización radicular y de la competencia rizosférica de aislamientos probióticos de *Pseudomonas*



Autora
Lic. Melani G. Lorch

Directora
Dra. Betina Agaras

Co-director
Dr. Claudio Valverde

**Tesis Doctoral para optar por el título de Doctora en Ciencia y
Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes**



Índice de Contenidos

Agradecimientos	6
Resumen	8
Abreviaturas.....	10
Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos	12
Introducción	13
1.1 El suelo	13
1.2 La biología del suelo	16
1.3 La rizósfera	19
1.4 Interacciones planta-microorganismo	21
1.5 El género <i>Pseudomonas</i> en el suelo.....	26
1.6 Promoción directa del crecimiento vegetal	28
1.7 Promoción indirecta del crecimiento vegetal	30
1.8 La agricultura sustentable	34
1.9 Inoculantes microbianos en la agricultura	38
1.10 Cultivos de importancia económica en Argentina	43
Hipótesis y Objetivos del trabajo	46
Capítulo 2: Marcaje cromosomal de los aislamientos de <i>Pseudomonas</i>.....	48
Introducción	49
Materiales y Métodos	52
2.1 Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y variedades de plantas	52
2.2 Marcaje cromosomal de los aislamientos seleccionados	54
2.2.1 Verificación del sitio de inserción del <i>cassette</i>	55
2.2.2 Verificación de la expresión de las proteínas fluorescentes por microscopía	56
2.2.3 Estabilidad de la inserción cromosomal	57
2.3 Curvas de crecimiento de las variantes marcadas	57
2.4 Verificación de las actividades PGPR de las variantes marcadas	57
2.4.1 Producción de ácido cianhídrico.....	58
2.4.2 Actividad proteolítica extracelular.....	58
2.4.3 Actividad fosfolipasa	58
2.4.4 Solubilización de fosfatos	59
2.4.5 Antagonismo de hongos fitopatógenos.....	59

2.5 Análisis estadísticos.....	60
Resultados.....	61
2.6 Generación de variantes marcadas con proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos.....	61
2.6.1 Evaluación de las resistencias naturales a antibióticos	61
2.6.2 Marcaje cromosomal y verificación del sitio de inserción del cassette	61
2.6.3 Verificación de la expresión de las proteínas fluorescentes por microscopía	62
2.6.4 Estabilidad de la inserción cromosomal	64
2.7 Curvas de crecimiento en medio mínimo	64
2.8 Verificación de las actividades PGPR de las variantes marcadas.....	65
2.8.1 Producción de exoproteasas, fosfolipasas, producción de HCN y solubilización de fosfatos.....	66
2.8.2 Antagonismo de hongos fitopatógenos.....	68
2.8.3 Los casos particulares de 1008 y SVBP6	68
Discusión	70
Conclusiones	71
Capítulo 3: Bacterización de semillas y cinéticas de decaimiento del inóculo	72
Introducción.....	73
Materiales y Métodos.....	75
3.1 Bacterización y recuperación de las bacterias a partir de las semillas	75
3.1.1 Cinéticas de decaimiento de la bacterización	76
3.1.2 Evaluación de otros aditivos	77
3.1.3 Bacterización de semillas pre-hidratadas	77
3.2 Análisis estadísticos.....	78
Resultados.....	79
3.3 Bacterización de semillas de maíz, trigo y soja	79
3.3.1 Recuperación de las bacterias adheridas a las semillas a día 0.....	79
3.3.2 Cinéticas de decaimiento de la bacterización	86
3.3.3 Evaluación de la suspensión utilizada en la inoculación en las condiciones de almacenamiento	92
3.3.4 Evaluación de la germinación	96
3.3.5 Efecto de la pre-hidratación de las semillas sobre la recuperación	96
Discusión	102

Conclusiones	111
Capítulo 4: Análisis de la colonización radicular de los aislamientos de <i>Pseudomonas</i> por microscopía confocal.....	112
Introducción.....	113
Materiales y Métodos	115
4.1 Visualización de los patrones de colonización radicular mediante microscopía confocal en condiciones axénicas	115
4.2 Análisis estadísticos.....	117
Resultados.....	118
4.3 Patrones de colonización radicular en el rizoplaneo de plantas de maíz, trigo y soja	118
Discusión	129
Conclusiones	132
Capítulo 5: Evaluación de la competitividad rizosférica de los aislamientos de <i>Pseudomonas</i> utilizando suelo como sustrato	133
Introducción.....	134
Materiales y Métodos	136
5.1 Ensayos en invernáculo	136
5.1.1 Evaluación de efectos PGPR sobre los parámetros de la planta	137
5.1.2 Recuentos en placa	138
5.2 Análisis estadísticos.....	139
Resultados.....	140
5.3 Competitividad de los aislamientos en la rizósfera	140
Discusión	152
Conclusiones	158
Conclusiones Finales.....	159
Bibliografía	160

Agradecimientos

Me gusta pensar que todo está interconectado. Desde el recuerdo de estar en el jardín de chica, metiendo las manos en la tierra para armar una maceta, pasando por aprender el nombre de todas las plantas de casa (que son muchas), hasta encontrarme regando unas plantas de soja en el invernadero de la Universidad Nacional de Quilmes. Me acuerdo que una vez le dije a mi hermano que quería hacer plantas en "frascos" cuando recién estaba arrancando la carrera y, aunque no tenía idea de lo que hablaba, la frase fue muy acertada. Pienso que quizás el camino estaba claro, consciente o inconscientemente, desde siempre.

Es difícil encarar esta sección cuando hay tantas personas a las que agradecer. Todas ellas son pilares fundamentales que le dan sentido a esta tesis, que está lejos de ser un trabajo meramente individual, y que, por el contrario, es el resultado del acompañamiento de un montón de gente maravillosa. Quiero comenzar agradeciendo a todos los integrantes y exintegrantes del LFGBBP por estos casi 10 años, el lugar que elegí para comenzar mi tesina de grado allá por el 2015, y en el que cierro este recorrido, de alguna forma, con esta tesis de doctorado. Quiero agradecer especialmente:

A Fede, por acompañarnos mutuamente desde la licenciatura. Por las risas, por las preguntas tontas, por la infinidad de crisis compartidas a las 2 de la mañana durante este año. Gracias por ser el mejor coequiper que me podía tocar. Ojalá todos tengan un Muzio en sus vidas.

A Bel, por los recitales, las meriendas, y las aventuras en CABA en días atípicos (con frío y a mitad de la semana). Encontré una gran amiga en el LBS. Te quiero.

A Andy, por ser el becario "mayor" a quien acudía cuando tenía dudas. Por sumarte a todas nuestras locuras, desde meterme en una caja hasta el experimento de evaluar si entramos los dos juntos en el bajo mesada.

A Meli, por las risas dentro y fuera del labo. Por los congresos más divertidos a los que fui. Tu amistad es una de las mejores cosas que me llevo.

A Yai, por nuestras charlas de camino a los asados en otras partes del conurbano sur.

A Ari, por todos los mates con café sin los que no hubiese sobrevivido. Por ser muchas veces la voz de la sensatez en nuestras discusiones filosóficas de los almuerzos.

A Juli, por las charlas, los consejos y la buena onda cada vez que iba al LBS.

A Fer. Podría decir con seguridad que me agarraste de la mano y me empujaste a terminar la tesis. Sin dudas no hubiese podido sola.

A Claudio, por abrirme las puertas de su laboratorio. Por su buena predisposición siempre que tenía un problema, y por sus ideas y aportes que hicieron que este trabajo se materialice de la mejor manera.

A Pato, porque gracias a tus clases de microbiología me interesé y me animé a golpear la puerta del Laboratorio 9.

A Beti, por la paciencia y la guía durante todos estos años. Gracias por confiar en mí desde el minuto 0, y por siempre alentarme a más. Por contestar todas mis dudas por más pavas que fueran, y apoyarme en todo momento en mi formación. Por los mejores postres que el Lab 9 haya probado.

Además de mi grupo de trabajo, quiero agradecer también:

Al grupo de Microscopía del Instituto Leloir. Por la buena onda y la infinidad de turnos en el confocal, siempre acompañados de unos mates.

Al Dr. Pablo Nikel, por permitirme terminar esta tesis exponiendo los resultados en la *International Pseudomonas Conference* este año, algo que parecía imposible.

A mis amigos UNQ: Chechu, Javi, Leti, Nani, Juli, Vale, Toto. Mención especial para Agus, pilar fundamental de todo esto desde el curso de ingreso. Los quiero.

A mis amigas de toda la vida. Gracias por "bancar la parada" durante todo este año.

A Nacho. Gracias por el apoyo incondicional, aún a la distancia. Me escuchaste hablar por meses de único tema: la tesis. Estoy segurísima de que con este trabajo te estas doctorando por segunda vez. Te amo.

A mi familia y, en especial, a mis papás. Por las incontables veces que me llevaron a la Universidad a pesar de vivir cerca y me esperaron cuando tenía que largar cultivos los fines de semana. Por renegar conmigo cuando las cosas salían mal, pero también celebrar cuando funcionaban. A mi hermano, por presentarme la carrera que ambos elegimos. A mis abuelas.

A todas las mascotas que pasaron por mi vida en todos estos años. Llegar a casa del laboratorio no hubiese sido lo mismo sin ustedes.

Finalmente, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Quilmes y al CONICET, sin los cuales nada de esto hubiese sido posible. Gracias.

Abreviaturas

2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético

ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AHL: N-acilhomoserino lactona

AIA: Ácido 3-indolacético

ANOVA: Análisis de la varianza

Ap: Ampicilina

Atb: antibiótico

BIOSPAS: Biología del Suelo y Producción Agraria Sustentable

CLSM: Microscopio Confocal de Barrido Laser (del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*)

Cm: Cloranfenicol

CNN: Competencia por nicho y nutrientes

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

Dpi: Días post-inoculación

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés *Food and Agriculture Organization*)

Gm: Gentamicina

Ha: Hectáreas

HCN: Ácido cianhídrico

ISR: Resistencia Sistémica inducida (del inglés *Induced Systemic Resistance*)

Km: Kanamicina

NA: Agar nutritivo

NYB: Caldo nutritivo

O.n: *Overnight*

PBM: Microbios beneficiosos para las plantas (del inglés *Plant Beneficial Microbes*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDA: Agar Papa Glucosado

PGPM: Microorganismos promotores del crecimiento vegetal (del inglés *Plant Growth Promoting Microorganisms*)

PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (del inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*)

PVP: Polivinilpirrolidona

QS: *Quorum sensing*

RASA: Rizobacter Argentina Sociedad Anónima

Sm: Estreptomicina

SOM: Materia orgánica del suelo (del inglés *Soil Organic Matter*)

Spi: Semanas post-inoculación

SS: Solución salina

Tre: Trehalosa

TSA: Agar triptona de soja

UFC: Unidades formadoras de colonias

VBNC: Viable no cultivable (del inglés *Viable But Non-Culturable*)

Wt: cepa salvaje (del inglés *Wild type*)

Capítulo 1: Introducción, Hipótesis y Objetivos

Introducción

1.1 El suelo

El **suelo** se define como un cuerpo natural compuesto por sólidos, líquidos y gases que ocupa la superficie terrestre, y se caracteriza por la presencia de horizontes o capas que se distinguen del material rocoso original como resultado de adiciones, pérdidas y transformaciones de materia y energía, y/o por la habilidad de soportar el crecimiento de las plantas [1]. Considerado uno de los hábitats más complejos y dinámicos del planeta, su evolución constante se debe a la interacción de múltiples factores como el clima, la topografía, el material parental del cual proviene y la actividad de los organismos vivos que lo habitan [2]. Esta variabilidad en sus propiedades químicas, físicas e incluso biológicas ha llevado a que los habitantes de este ecosistema desarrollen múltiples mecanismos de adaptación para enfrentar, por ejemplo, condiciones cambiantes de humedad, temperatura y disponibilidad de nutrientes, con el fin de garantizar su supervivencia [3], [4].

La matriz del suelo está constituida por 3 fases. La fracción sólida comprende el material orgánico y mineral, cuya disposición permite la formación de poros y espacios libres en la matriz, que serán ocupados por las otras dos fases presentes: agua con iones solubles o en suspensión y/o aire [3], [5]. Las proporciones relativas de las 3 fases varían espacial y temporalmente, y dependen del clima, la vegetación y las diferentes actividades humanas [5]. Estas últimas dan lugar a los llamados suelos antropogénicos o antropoles, suelos naturales que han sido altamente influenciados y modificados por las prácticas humanas [6]. Se sabe que los suelos desarrollados están estructurados en varias capas, aproximadamente paralelas a la superficie, conocidas como **horizontes**, que difieren entre sí por su textura, color, estructura y otras propiedades distintivas [7]. En la base de cualquier perfil de suelo se encuentra la roca madre o material parental, que es el tipo de formación geológica a partir de la cual se ha desarrollado el suelo superior [3]. Usualmente, la composición de la fracción mineral está relacionada con el tipo y la cantidad de minerales presentes en la roca madre, aunque estos pueden sufrir modificaciones químicas y físicas posteriores diferenciándose ampliamente del material de partida [8]. La zona inmediatamente superior a la roca madre se conoce como horizonte C, constituido por material rocoso parcialmente erosionado y con una muy

baja actividad microbiana, debido a la escasez de materia orgánica y oxígeno [3], [7]. Por encima de este se encuentra el horizonte B, que comprende la zona de iluviación o acumulación de carbonatos, silicatos, óxidos de aluminio y de hierro, así como también de una baja cantidad de compuestos orgánicos y otros minerales que son arrastrados desde las capas superiores por acción del agua. Dado que el horizonte B posee típicamente una baja cantidad de materia orgánica, presenta escasa actividad biológica [3]. El horizonte más enriquecido en materia orgánica es el **horizonte A**, que se ubica cerca de la superficie, y es el punto de partida donde ocurren los fenómenos de interés para esta tesis. En este horizonte la estructura de la roca madre original ha sido alterada completamente por los procesos de formación del suelo [4], [9]. Presenta un color oscuro por la acumulación de materia orgánica mezclada con la fracción mineral, y es la capa del suelo en la que se establecen las raíces de las plantas y donde los organismos son más activos [7], [9]. Además, es el más impactado por la actividad humana [8]. Por último, el horizonte O constituye la capa más externa, compuesta principalmente por materia orgánica en descomposición, como restos de plantas y/o residuos de origen animal [3]. Este horizonte no siempre está presente, y es más relevante en ecosistemas boscosos [7].

Como consecuencia de los procesos de erosión de las rocas, las partículas minerales pueden presentar diferentes tamaños, considerándose estrictamente como suelo aquellas menores a 2 mm independientemente de su naturaleza [1], [2]. Estas partículas se clasifican según su tamaño en arena (2 mm a 50 μm), limo (50 μm a 2 μm) y arcilla (< 2 μm), y la proporción de cada una define la **textura** de un suelo [2]. La textura está íntimamente relacionada con la capacidad de retención de agua, la cual influye directamente en la actividad biológica del suelo [3]. Por ejemplo, si se compara una misma unidad de volumen, las partículas más pequeñas presentan mayor área superficial expuesta y menor porosidad, lo cual se traduce en una mayor retención de agua y, por ende, en la creación de ambientes más anaeróbicos. Contrariamente, los suelos arenosos presentan menor área superficial expuesta y un mayor flujo de agua a través de poros de mayor tamaño, siendo incapaces de retener agua y generando suelos áridos [2]. Los suelos que contienen una mezcla equilibrada de los tres tipos de partículas y un buen balance en la proporción agua/aire son los suelos más fértiles. Estos suelos se

denominan **francos**, y sus condiciones favorecen el desarrollo de los sistemas radiculares de las plantas y el metabolismo aeróbico [7].

Las partículas de arena, limo y arcilla, generalmente no permanecen como partículas individuales en el suelo, sino que se unen entre sí para formar unidades estructurales llamadas **agregados**, que se componen por la combinación de las partículas minerales con sustancias orgánicas e inorgánicas. Estos agregados suelen clasificarse por su tamaño en macroagregados ($> 250 \mu\text{m}$) y microagregados ($< 250 \mu\text{m}$), creando una matriz porosa que define la **estructura** de un suelo. Mientras que la formación de agregados favorece la infiltración del agua, la aireación y facilita la penetración de las raíces, la pérdida de la estructura del suelo es considerada una forma de degradación, y en general se asocia a las prácticas agrícolas tradicionales [10], [11].

Otro factor determinante en los suelos es su contenido de **materia orgánica** (SOM, por sus siglas en inglés *Soil Organic Matter*). Esta puede ser definida como una mezcla heterogénea de productos “no vivos” generados por la transformación biológica y química de los desechos orgánicos. Estas transformaciones, que forman parte del llamado proceso de humificación, dan lugar al **humus**: una mezcla de sustancias carbonadas que presentan alta estabilidad y resistencia a la degradación [12]. Además del humus, otros autores incluyen dentro de la SOM a los restos de animales y plantas en diversos estadios de descomposición, y a la biomasa microbiana que participa en dicho proceso [7], [13]. Si bien esta última representa solo el 5% de la SOM, las bacterias, hongos, protozoos y nematodos son actores claves en los procesos de transformación de la misma (mineralización, humificación y fermentación), además de intervenir en la provisión de nutrientes para las plantas y participar en la estabilización de la estructura del suelo [14]. Debido a que las plantas son la principal fuente de materia orgánica en los suelos, los polisacáridos (principalmente celulosa y hemicelulosa) y la lignina son los compuestos orgánicos más abundantes incorporados a partir de la hojarasca. Otros biopolímeros, como proteínas, taninos, poliésteres (como cutina y suberina), porfirinas (como la clorofila) y moléculas más pequeñas, como aminoácidos, terpenos, ácidos grasos también están presentes, producto de la transformación de la SOM. Una fracción de estos compuestos sufrirá modificaciones posteriores, como polimerizaciones y condensaciones, formando una mezcla compleja de sustancias húmicas de carácter

aromático y peso molecular variable, que contienen los grupos funcionales principales (carboxilo, hidroxilo, etc.) [14].

El contenido de materia orgánica de un suelo es fundamental para mejorar su fertilidad, ya que esta interviene en la retención de agua, en la absorción de radiación solar, en la retención de nutrientes (gracias a sus propiedades de intercambio de iones) y en la liberación de los mismos como resultado de procesos degradativos. Además, como hemos mencionado, la SOM posee un papel importante en la formación y estabilización de la estructura del suelo [12]. Por todo esto, la cantidad de SOM está directamente relacionada con la **calidad** de un suelo, término definido por la Sociedad Americana de Ciencias del Suelo como la capacidad del mismo para funcionar dentro de un ecosistema, sustentar la productividad vegetal y animal, mantener y/o mejorar la calidad del aire y el agua, y promover la salud de las plantas y animales [15]. Mientras que el término calidad está generalmente asociado con la aptitud de un suelo para un uso específico [15], el concepto de **salud** del suelo se utiliza de manera mucho más amplia, e incluye el rol del mismo en el mantenimiento de la calidad del agua, la salud humana, la mitigación del cambio climático, así como también la importancia de la conservación de su biodiversidad y manejo sustentable [16].

1.2 La biología del suelo

Las comunidades biológicas en el suelo están compuestas tanto por numerosas especies de animales como por microorganismos y, en conjunto, su diversidad es varios órdenes de magnitud mayor que la que se encuentra por encima de la superficie. Los animales que habitan este ecosistema se clasifican según su tamaño en macrofauna (mayor a 2 mm), mesofauna (de 0,1 a 2 mm), y microfauna (menores a 0,1 mm) [17]. Entre los integrantes de la macrofauna se incluyen las lombrices, hormigas, termitas y milpiés, capaces de generar sus propios espacios en la matriz del suelo a través de procesos de excavación, alterando la estructura física del mismo. Dentro de la mesofauna se destacan los ácaros, colémbolos y pequeños insectos, que se ubican en los poros de la matriz y son los encargados de fragmentar la hojarasca en descomposición, mejorando su disponibilidad para los microorganismos. Por su parte, los animales más pequeños que constituyen la microfauna, como los protozoos, rotíferos

y pequeños nematodos, se ubican en películas de agua, y generalmente se alimentan de raíces y de otros microorganismos [4].

Si consideramos el número de especies, la mayor parte de la **diversidad biológica** del suelo está compuesta por cientos o miles de especies de hongos y bacterias que, junto con arqueas, virus, protistas y otros eucariotas, constituyen el **microbioma** del suelo [17], [18]. Este término, utilizado por primera vez en 1988, hace referencia a una comunidad microbiana que ocupa un hábitat bien definido, con propiedades fisicoquímicas distintivas [19].

Los poros y canales generados por la disposición de los agregados en la matriz del suelo, las raíces de las plantas, y los animales, proporcionan un hábitat natural para los microorganismos, que mayormente se adhieren a la superficie de las partículas formando **microcolonias**, aunque aquellos de vida libre pueden ser transportados por el agua que se mueve a través de dichos poros (Figura 1) [20], [21]. Si bien la microbiota se distribuye a lo largo de todo el perfil del suelo, es más abundante en los horizontes cercanos a la superficie y en el suelo circundante a las raíces de las plantas, comúnmente denominado **rizósfera**. En esta zona, la diversidad taxonómica y funcional de los microorganismos está influenciada por las raíces de las plantas, que modifican localmente la química del suelo al secretar y absorber nutrientes. Por ende, la abundancia y la diversidad microbiana es más alta en los primeros 10 cm de suelo, y disminuye con la profundidad [20]. Incluso, se sabe que la composición de la comunidad bacteriana en los horizontes superficiales es mucho más variable, mientras que en los horizontes más profundos es relativamente similar [22].

El creciente interés por la diversidad biológica de los suelos de las últimas décadas proviene del reconocimiento de que los organismos que lo habitan regulan procesos ecológicos cruciales, y que la retroalimentación entre las comunidades de la superficie y las subterráneas desempeña un papel fundamental en la regulación del ecosistema [17]. En este sentido, los microorganismos del suelo son capaces de sustentar y regular diversos **servicios ecosistémicos**, concepto que hace referencia a los beneficios que las poblaciones humanas obtienen de manera directa o indirecta, a partir de las funciones de los ecosistemas [23]. La microbiota del suelo participa en los ciclos de elementos como del carbono, nitrógeno y fósforo, en la producción de materia orgánica, la mineralización y detoxificación de sustancias, la biosíntesis de compuestos

antimicrobianos y la solubilización de nutrientes que son aprovechados por las plantas [20]. De hecho, la **productividad** de los agroecosistemas está íntimamente relacionada con el microbioma del suelo. Por ejemplo, se estima que los hongos micorrícicos y las bacterias fijadoras de nitrógeno son responsables de entre el 5-20% del nitrógeno total adquirido anualmente por las plantas en pastizales, y de hasta un 80% en bosques templados y boreales [24].

La estructura de las comunidades microbianas del suelo es afectada por diversos factores, entre los cuales se encuentran el tipo de suelo y sus características (salinidad, pH, contenido de nutrientes), la vegetación presente, la historia del uso del suelo y las prácticas agrícolas [25], [26], [27]. La disponibilidad de agua, la temperatura, los cambios climáticos y estacionales, y el uso de fertilizantes químicos también son factores que alteran la abundancia relativa y la diversidad de los microorganismos presentes [28], [29].

Las bacterias y los hongos son generalmente los microorganismos dominantes en el suelo. Estos grupos suelen aportar entre 10^2 y 10^4 veces más biomasa que los otros

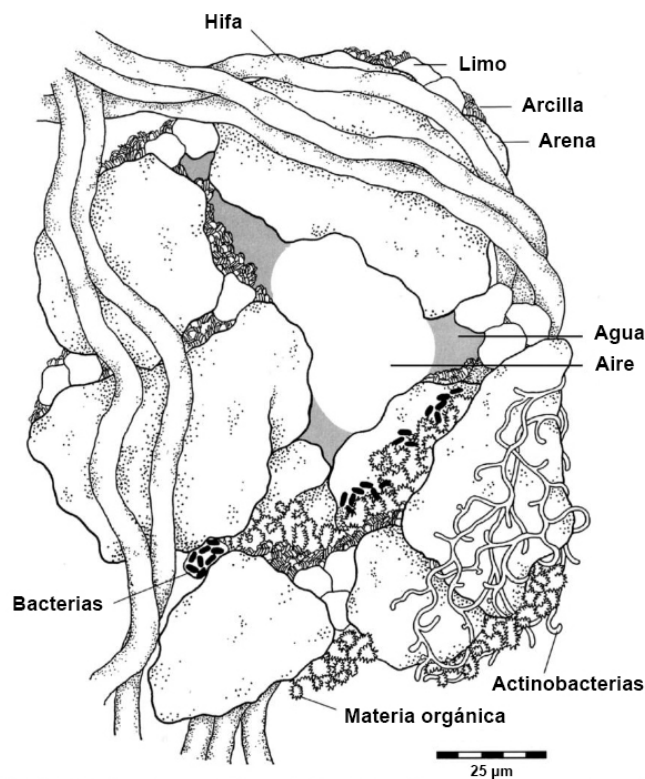


Figura 1. Un agregado de suelo típico. Las partículas de arena, limo y arcilla, permanecen unidas entre sí gracias a la materia orgánica, los microorganismos y otros compuestos inorgánicos precipitados. Nótese que los agregados ofrecen diversos microhábitats para los microorganismos a lo largo de distancias muy pequeñas. Adaptado de [30].

componentes principales del microbioma (protistas, arqueas y virus) [18]. Particularmente, se estima que un gramo de suelo puede contener hasta 10^{10} bacterias [23]. Si bien la abundancia de los principales filos bacterianos varía de acuerdo al tipo de suelo, los miembros de los grupos Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria están ampliamente distribuidos y usualmente son los más abundantes. Por el contrario, los miembros de los grupos Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi, Planctomycetes y Gemmatimonadetes son menos prevalentes [20]. Dentro del subgrupo de las γ -Proteobacterias está incluido el género *Pseudomonas*, del que hablaremos más adelante.

1.3 La rizósfera

El término “rizósfera” fue introducido por primera vez en 1904 por el científico alemán Lorenz Hiltner, quien propuso que la nutrición de las plantas está influenciada por los microorganismos presentes en las proximidades de la raíz, y que los **exudados** atraen no solo bacterias beneficiosas sino también "invitados no deseados". Hiltner observó células bacterianas en el interior de raíces sanas y, en analogía con los simbiontes fúngicos, nombró a la comunidad bacteriana estrechamente asociada con las raíces como "bacteriorriza". Basado en sus observaciones, hipotetizó que “la resistencia de las plantas frente a la patogénesis depende de la composición de la microflora de la rizósfera” [31]. La rizósfera se define entonces como la porción de suelo alrededor de las raíces de las plantas que está influenciado por la actividad de las mismas. Esta zona supone un ambiente único, que se diferencia del suelo “libre” de raíces. Los cambios en las propiedades químicas y físicas del suelo en la rizósfera surgen a partir de procesos en los que las raíces son directamente responsables, en conjunto con las actividades de microorganismos que se estimulan en su cercanía como consecuencia de la liberación de exudados, también llamado **rizodeposición** [32]. Este fenómeno, en el que la abundancia de las comunidades microbianas alrededor de las raíces es mucho mayor que en el suelo libre, es conocido como **efecto rizosférico** [19].

La rizósfera actualmente se divide en tres zonas, las cuales se definen según su proximidad relativa a la raíz y, por lo tanto, el grado de influencia de la misma (Figura 2). La **endorrizósfera** incluye parte del córtex y la endodermis de la raíz, donde los microorganismos pueden ocupar el "espacio libre" entre las células o espacio

apoplástico. El **rizoplano** es la zona adyacente a la raíz que incluye la epidermis y el mucílago, una sustancia producida principalmente en la zona apical, que forma una capa superficial y protege a las células vegetales. La zona más externa es la **ectorrizósfera**, también llamada suelo rizosférico, que se extiende desde el rizoplano hacia el suelo circundante. Dada la complejidad y diversidad de los sistemas radiculares, la rizósfera no es una región de tamaño completamente definido, sino que consiste en un gradiente de propiedades químicas, biológicas y físicas que cambian tanto radial como longitudinalmente a lo largo de la raíz [33], [34]. Las raíces normalmente crecen en los poros mayores a $10\ \mu\text{m}$ que contienen aire. Las propiedades del suelo afectan el diámetro y la distribución de las raíces, el patrón de ramificación de las raíces laterales y los **pelos radiculares**, que son extensiones a partir de las células epidérmicas de la raíz involucradas en la absorción de nutrientes [34].

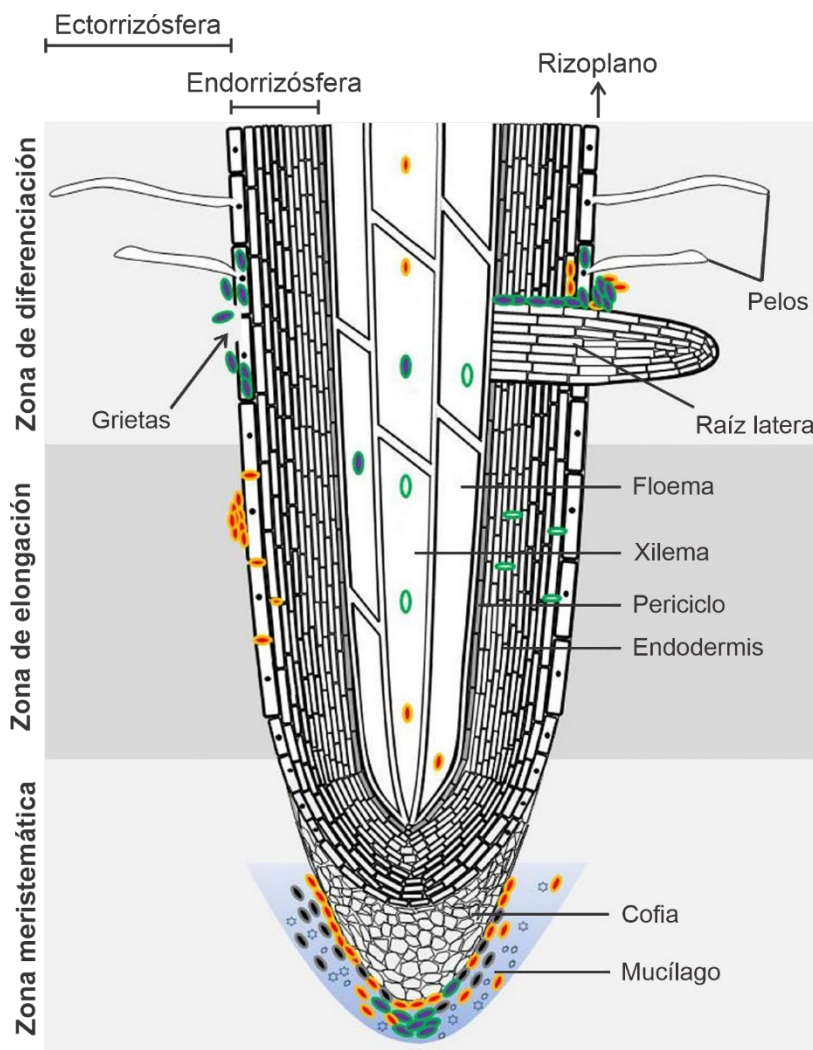


Figura 2. Representación esquemática de una raíz colonizada por bacterias (óvalos coloreados). Se muestran las tres zonas que componen la rizósfera: la ectorrizósfera, el rizoplano y la endorrizósfera. Adaptado de [35].

Como hemos mencionado, la rizósfera se considera un punto crítico o *hot spot* para las interacciones microbianas, ya que el carbono fijado por las plantas y liberado a través de las raíces es una importante fuente de nutrientes para los microorganismos [36]. De hecho, las plantas depositan en la rizósfera entre el 10 y el 44% del carbono fijado fotosintéticamente [19]. Se ha visto que las plantas pueden moldear el microbioma de los suelos a través de sus exudados, entre los que se incluyen diversos compuestos como azúcares, aminoácidos, flavonoides, ácidos orgánicos, proteínas y ácidos grasos [26]. Las sustancias no solo son utilizadas como nutrientes, sino que algunas actúan como compuestos antimicrobianos, permitiendo la selección de poblaciones de microorganismos específicas [37]. Incluso, otras moléculas depositadas en la rizósfera intervienen en la comunicación raíz-microorganismo y entre raíces [38].

Los grupos presentes en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas y microartópodos. Si bien algunos miembros de esta comunidad tienen un **efecto neutral** sobre las plantas, otros pueden ejercer **efectos perjudiciales o benéficos**. Mientras que los hongos y las bacterias pueden actuar de ambas formas, los oomicetes y nematodos en general afectan negativamente el crecimiento y la salud de las plantas. Por su parte, las endo y ectomicorrizas pertenecen al grupo de microorganismos benéficos [36].

Es posible medir el efecto rizosférico para una planta particular y una población de interés teniendo en cuenta el número de microorganismos de dicha población presentes en la rizósfera (R) y en el suelo libre (S). La proporción R:S indica la magnitud del efecto rizosférico sobre ese organismo y, por lo tanto, está relacionado íntimamente con su **competencia rizosférica**, entendida como la habilidad de colonizar la rizósfera de una planta. Entonces, un microorganismo con una relación R:S alta indica que este es capaz de alcanzar una buena colonización de las raíces, condición deseable al momento de desarrollar un inoculante [34].

1.4 Interacciones planta-microorganismo

En lugar de ser consideradas como entidades autónomas, actualmente las plantas son entendidas como “holobiontes”, término que involucra a la planta propiamente dicha y a su microbiota asociada [19]. De hecho, Berendsen y colaboradores se refirieron al microbioma de la raíz como el segundo genoma de la planta, abarcando la totalidad

de las interacciones de la comunidad rizosférica [39]. Esta comunidad también es conocida como **rizobioma** [40].

Como se mencionó anteriormente, el establecimiento de los microorganismos en la rizósfera está ligado a la naturaleza de los rizodepósitos, que atraen o repelen poblaciones microbianas específicas del suelo libre [40]. Mediante el mecanismo de **quimiotaxis**, los microorganismos son capaces de detectar la presencia de exudados radiculares y moverse hacia la raíz en respuesta al gradiente de nutrientes [41]. Sin embargo, este proceso también puede comenzar con la previa colonización de las semillas. En este caso, al momento de iniciar la germinación, los microorganismos provenientes del suelo comienzan a ocupar el área alrededor de la semilla o **espermósfera**, aprovechando los exudados liberados durante el proceso de germinación. Esta colonización es el paso previo a la ocupación radicular, dado que a medida que emerge la radícula, los microorganismos se mueven y se multiplican gracias a su movilidad y al consumo de exudados, respectivamente, colonizando el nuevo órgano en crecimiento [34], [42]. La espermósfera es una zona de intensa competición entre los microorganismos del suelo y aquellos presentes en la semilla adquiridos por transmisión vertical [43]. La transferencia de microorganismos de una generación a la siguiente a través de las semillas es fundamental para la constitución del rizobioma [44]; y, según el mecanismo considerado, los microorganismos pueden disponerse en la superficie o en el interior del tejido de la semilla [42]. Si bien tanto la microbiota del suelo como aquella que proviene de la semilla participan en el ensamblaje del microbioma de la rizósfera [45], existe evidencia de que el microbioma de plantas juveniles está altamente influenciado por los microorganismos transmitidos por la semilla, y que éstos serían una fuente de inóculo aún más importante que la proveniente del suelo libre [44], [46].

Como hemos visto, los microorganismos que pretendan habitar la rizósfera, y particularmente aquellos que quieran ser empleados como inoculantes, deben ser **competentes** para colonizar las raíces de las plantas. Esto significa que deben ser capaces de establecerse y sobrevivir en ese entorno, lo que incluye no solo una colonización eficiente de la raíz, sino también la competencia con otros microorganismos por el consumo de los exudados [47], [48]. Varios mecanismos moleculares y celulares contribuyen a este proceso, entre los cuales encontramos aquellos relacionados con la

movilidad, la adhesión, la resistencia a distintos estreses y la producción de metabolitos secundarios [48]. Los procesos involucrados en la interacción planta-microorganismo que cumplen un rol importante durante la colonización rizosférica se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. *Mecanismos relevantes para una colonización eficiente de la rizósfera*

Mecanismo	Características y principales beneficios
Versatilidad metabólica y solubilización de nutrientes	La capacidad de utilizar diversos exudados liberados por las raíces, la producción de sideróforos quelantes de hierro, la solubilización de fósforo , la nitrificación y fijación de nitrógeno , son mecanismos que favorecen la habilidad de los microorganismos de colonizar y competir por los espacios de la raíz.
Movilidad y quimiotaxis	Una colonización exitosa requiere de la detección de los exudados radicales y de la movilización de los microorganismos en respuesta al gradiente de sustrato, permitiendo que estos se acerquen y se adhieran a la raíz.
Formación de biofilm	La formación de biofilms bacterianos en las raíces brinda mayor resistencia a la desecación y a la predación por otros microorganismos, además de mejorar la asimilación de nutrientes.
Producción de metabolitos antimicrobianos	Los microorganismos son capaces de producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos que favorecen la competencia por el nicho y los nutrientes en la rizósfera, como la producción de enzimas líticas, antibióticos y compuestos volátiles .
Evasión y supresión del sistema inmune de la planta	La evasión consiste en prevenir la activación del sistema inmune de la planta, mientras que la supresión implica eludir el sistema inmune de la planta mediante el uso de proteínas efectoras y los sistemas de secreción.
Protección frente a distintos estreses oxidativos	Diferentes estreses abióticos como la salinidad, el pH, las sequías, pueden causar daño oxidativo en los microorganismos. Existen diferentes mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para mitigar dichos efectos.

Información extraída de [41], [47], [48].

Una bacteria en las proximidades de la raíz o de una semilla puede cambiar de un estilo de vida libre a uno planctónico al **adherirse** a la superficie de la misma, formar una microcolonia y, posteriormente, un **biofilm** [41]. En los biofilms, las bacterias están embebidas en una matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos [47]. Esta disposición incrementa la resistencia a ciertos estreses ambientales y compuestos antimicrobianos, y brinda protección contra la depredación protozoaria, además de que la alta densidad de bacterias promueve la producción de metabolitos secundarios que dependen de mecanismos de comunicación intercelular o

quorum sensing. Una vez adherido a la superficie, el microorganismo podrá ejercer más fácilmente un efecto positivo sobre la planta, en el caso de un microorganismo benéfico, o negativo, si se trata de un patógeno [49]. La adhesión a superficies en bacterias está mediada por estructuras llamadas **adhesinas**, entre las que se incluyen polisacáridos y proteínas expresadas en la superficie. Estas estructuras, que promueven la unión tanto a una superficie como a otras bacterias, han sido identificadas en el género *Pseudomonas* asociadas a la rizósfera. Entre ellas se encuentran las proteínas de adhesión LapA y LapF, la proteína de adhesión MapA y el propio flagelo [41], [49]. LapA (por *Large adhesion protein*) es una adhesina relevante en algunas especies de *Pseudomonas* y, por ejemplo, en *P. putida* se demostró que cumple un rol clave en la adhesión a semillas [50].

La colonización microbiana en la superficie de las plantas no es uniforme, sino que ocurre en forma de “parches” a lo largo de la raíz, cubriendo entre el 15 y el 40% de la superficie [33]. Las zonas más comunes de colonización bacteriana son las uniones entre las células epidérmicas de la raíz, los pelos radiculares, las células de la cofia, y las zonas de unión con raíces laterales emergentes [49].

Como hemos adelantado, el rizobioma interacciona con las raíces de las plantas de diversas maneras, que pueden ser clasificadas como benéficas, neutrales o perjudiciales. Estas interacciones implican mecanismos complejos que operan en varios niveles de comunicación, incluyendo la activación e inactivación de genes, así como la inducción y represión de respuestas ante diferentes señales. Entre los efectos positivos sobre la planta encontramos el mejoramiento en la germinación de semillas y vigor de las plántulas, la promoción del crecimiento y el aumento en el desarrollo, nutrición y salud de las plantas. En contraste, los efectos negativos incluyen la aparición de enfermedades causadas por bacterias u hongos, el parasitismo, y la competencia por nutrientes [40]. Aquellos microorganismos que colonizan la rizósfera y ejercen efectos positivos sobre las plantas son comúnmente llamados Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o **PGPR** (del inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*). Este término fue utilizado por primera vez por Joseph Kloepper en 1980 [51], aunque con la aparición de nuevas especies asociadas con esta actividad, incluyendo no solo bacterias sino también hongos, el término se ha expandido a microorganismos promotores del crecimiento vegetal (**PGPM**, del inglés *Plant Growth Promoting Microorganisms*) [52] o microbios

beneficiosos para las plantas (**PBM**, del inglés *Plant Beneficial Microbes*) [53]. Entre los PGPMs más estudiados se incluyen diferentes especies de rizobios, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Trichoderma* y *Actinobacteria*, que se encuentran, en general, naturalmente enriquecidos en la rizósfera [54], [55].

Por otro lado, las interacciones positivas que suponen un beneficio tanto para la planta como para los microorganismos, pueden a su vez clasificarse en **mutualistas** o **cooperativas**. El mutualismo involucra interacciones específicas entre los microorganismos y un rango restringido de plantas hospedadoras, como ocurre en la simbiosis entre rizobios y plantas leguminosas, la cual implica eventos de señalización a nivel molecular altamente específicos que han sido muy caracterizados en la literatura [56]. En cambio, las cooperativas, corresponden a interacciones menos específicas y obligatorias, y comprenden a aquellas bacterias que colonizan la superficie de las raíces para promover la salud vegetal [57]. Si bien las PGPRs interactúan con un amplio rango de plantas hospedadoras, existe cierto grado de especificidad en este tipo de simbiosis asociativa. Incluso, esta especificidad puede alcanzar el nivel de especie. Como vimos, entonces, para ejercer un efecto benéfico deben ocurrir una serie de etapas que comprenden distintos mecanismos de adaptación tanto para una bacteria particular (capacidad de responder a un quimioattractante y habilidad metabólica para utilizarlo como nutriente; presencia de estructuras que permitan la adhesión a la superficie radicular; expresión de los genes involucrados en las actividades PGPR) como para la planta en cuestión (naturaleza de los exudados; propiedades de la superficie de la raíz; respuesta a las actividades de promoción) [58].

Por otro lado, la promoción del crecimiento de las plantas puede ocurrir por varios mecanismos. Mientras que el aumento de la disponibilidad de un nutriente (**biofertilización**), la producción de fitohormonas (**fitoestimulación**) y la degradación de compuestos tóxicos (**biorremediación**) tienen un efecto directo en el crecimiento, la fisiología y el desarrollo de las plantas, los mecanismos de **biocontrol** contribuyen indirectamente a la salud de las plantas al alterar el *fitness* de los microorganismos fitopatógenos. Existen varias estrategias de biocontrol reportadas: antagonismo directo mediado por la producción de antimicrobianos, inducción de la Resistencia Sistémica inducida (ISR, del inglés *Induced Systemic Resistance*) de las plantas a través de elicitores, competencia por nicho y nutrientes, parasitismo de patógenos o interferencia de los

sistemas de comunicación celular de patógenos (por ejemplo, *quorum quenching*) [54], [59]. Los microorganismos biocontroladores contribuyen a la formación de los llamados **suelos supresivos**, donde plantas susceptibles a ciertas enfermedades se encuentran protegidas a pesar de que los patógenos causantes de esas enfermedades están presentes en el suelo, ya que su actividad o virulencia se encuentra disminuida o suprimida por la presencia de altas densidades de microorganismos antagonistas [60].

1.5 El género *Pseudomonas* en el suelo

El género *Pseudomonas* abarca uno de los grupos más prolíficos y heterogéneos dentro de la subclase γ -Proteobacteria [61], cuyos miembros habitan ambientes muy diferentes en todo el mundo, principalmente por su adaptabilidad fisiológica y genética [62]. Una de las características que favoreció la distribución global de este género es su capacidad para interactuar íntimamente con eucariotas (insectos, animales y plantas), contribuyendo generalmente a su salud o enfermedad [63], [64], [65].

El término *Pseudomonas* fue acuñado en 1894 por el botánico alemán W. Migula. Migula nunca esclareció la etimología de la palabra "Pseudomonas", pero posteriormente algunos taxónomos sugirieron que podría derivar del griego *pseudo* ("falso") y *monás* ("una sola unidad"), significando "falsa unidad". Si bien no fue posible establecer la razón del uso de esa palabra, actualmente se cree que el término fue utilizado por la semejanza de estas bacterias con ciertos nanoflagelados, conocidos en ese tiempo como *Monas*, por lo que Migula podría haberse referido a "falsas monas" en lugar de "falsa unidad" [66]. Las *Pseudomonas* son bacilos gram-negativos, rectos o ligeramente curvos, con un largo promedio de 1,5 μm y un ancho promedio de 0,5 μm , no esporulantes y móviles, ya que cuentan con uno o más flagelos de localización polar. Son bacterias aeróbicas, aunque en algunos casos pueden utilizar nitrato como aceptor de electrones, y en su mayoría son incapaces de crecer a pH menores a 4,5 [67], [68]. Su habilidad para colonizar una amplia variedad de nichos está relacionada con su genoma de gran tamaño, el cual varía entre 3,7 Mpb y 7,1 Mpb. La presencia de elementos genéticos móviles como fagos, plásmidos, transposones, islas genómicas, en conjunto con la flexibilidad genómica para soportar grandes inversiones, translocaciones y recombinaciones, contribuyen a la diversidad metabólica y fisiológica de este género. Particularmente, el hecho de que sus genomas estén enriquecidos en genes regulatorios,

especialmente en los llamados sistemas de dos componentes, podría suponer una ventaja para la adquisición de nuevas secuencias por transferencia horizontal, las cuales deben ser rápidamente integradas al sistema regulatorio de la célula [62], [69].

Las bacterias del género *Pseudomonas* han estado estrechamente vinculadas al concepto de PGPR desde su definición [51]. De hecho, la rizósfera de una gran variedad de especies de plantas está enriquecida en bacterias de este género, una característica que ha sido demostrada tanto por enfoques dependientes como independientes de cultivo [70], [71], [72]. Su capacidad para colonizar este ambiente tan dinámico se debe, en parte, a que estas bacterias presentan una amplia versatilidad para utilizar diferentes fuentes de carbono, ya que la calidad de los exudados radiculares varía según el tipo de planta, la porción de la raíz considerada y el estadio de crecimiento de la planta en cuestión [73]. Así, las *Pseudomonas* son atraídas hacia las raíces mediante mecanismos de quimiotaxis, donde luego deberán competir con otros microorganismos por los nutrientes disponibles para alcanzar una buena colonización [63]. Como es esperable, en dicho proceso intervienen una amplia variedad de genes [74]. Varios estudios demuestran que mutantes que perdieron la actividad de genes relacionados con la quimiotaxis o la movilidad reducen su capacidad de colonizar la rizósfera [75], [76], [77], y que mutantes para los genes *lap*, que codifican para las adhesinas, redujeron su capacidad de adhesión a semillas y formación de biofilm [78]. Por otro lado, mutantes de los genes *sss* y *xerD*, que codifican para recombinasas involucradas en el mecanismo de cambio de fase, también vieron disminuida su capacidad de competir en la rizósfera frente a las cepas salvajes [79]. El proceso de cambio de fase es muy común durante la colonización de raíces en *Pseudomonas*, y consiste en la diversificación de una población bacteriana mediante mutaciones o reorganizaciones reversibles, para mejorar su desempeño en ciertas circunstancias [80].

Del mismo modo que otros microorganismos del suelo, la estructura y abundancia de la comunidad de *Pseudomonas* es afectada por los distintos sistemas de cultivo, el tipo de suelo, e incluso por las estaciones climáticas [81], [82], [83]. Particularmente, se vio que el monocultivo produce un descenso en su población [81]. Asimismo, se ha demostrado que la rizósfera se enriquece en distintos genotipos de estas bacterias de acuerdo a la especie vegetal presente, aun partiendo del mismo microbioma edáfico [84]. Aunque algunas especies dentro del género son fitopatógenas, como *P. syringae*,

existe una amplia variedad de *Pseudomonas* PGPR con distintos mecanismos de acción, tanto directos como indirectos, que contribuyen a mantener de la salud de las plantas [63]. Estos mecanismos serán abordados en las siguientes secciones.

1.6 Promoción directa del crecimiento vegetal

Como hemos visto, los mecanismos directos refieren a aquellas actividades que impactan directamente en la promoción del crecimiento de la planta [59]. Entre ellos, la **biofertilización** está relacionada con la provisión de nutrientes y microelementos por parte de los microorganismos, quienes aumentan la disponibilidad y facilitan el acceso a dichos compuestos [85]. Por ejemplo, el **fósforo** es relativamente abundante en los suelos, aunque el predominio de sus formas insolubles (fosfatos de aluminio, hierro y calcio) impide que las plantas lo aprovechen de forma directa [86]. Se ha visto que muchas especies de *Pseudomonas* cumplen un rol importante en la solubilización de fosfato, usualmente por la secreción de ácidos orgánicos al medio extracelular, como el ácido glucónico y el 2-cetoglucónico [87], [88]. Estos compuestos actúan por desorción del P inorgánico de las partículas de arcilla mediante el intercambio directo, o por quelación de los cationes presentes en el complejo catión-P [89]. Otras estrategias involucran la liberación de fosfatasas, que permiten obtener formas asimilables de P a partir de compuestos orgánicos [90], [91]. Asimismo, en condiciones de hierro limitantes, las *Pseudomonas* son capaces de producir moléculas quelantes del ion férrico (Fe^{+3}), conocidas como **sideróforos**. El hierro es un cofactor esencial para muchas enzimas, y, a pesar de ser abundante en el suelo, el ion Fe^{+3} tiende a precipitar formando óxidos, por lo que la presencia de estos quelantes ayudan a mantenerlo en solución. Posteriormente, el complejo Fe^{+3} -sideróforo es incorporado mediante receptores específicos presentes en la superficie de la bacteria, para luego ser liberado en el citoplasma como Fe^{+2} [59]. Aunque algunas especies de plantas son capaces de incorporar los complejos Fe^{+3} -sideróforo bacterianos, el hierro total adquirido por este mecanismo es poco significativo, por lo que esta estrategia suele estar más relacionada con el biocontrol de microorganismos patógenos que presenten mecanismos menos eficientes de incorporación de hierro [60], [85]. El sideróforo más caracterizado en *Pseudomonas* es la pioverdina, un pigmento verde-amarillento que fluoresce bajo la luz UV [92]. Por otro lado, si bien la fijación biológica del **nitrógeno** ha sido ampliamente

caracterizada en la simbiosis de rizobios con plantas leguminosas, se ha visto que algunas especies de *Pseudomonas* son capaces de llevar a cabo este proceso en vida libre, liberando amonio al suelo circundante [93]. Incluso se ha modificado exitosamente la cepa de *P. protegens* Pf-5 con los genes que codifican para la enzima nitrogenasa que, al ser utilizada para inocular plantas de trigo y maíz, logró un incremento en el contenido de nitrógeno en hojas y semillas respecto de la cepa Pf-5 salvaje [94], [95].

La **fitoestimulación** en *Pseudomonas* ocurre por la síntesis y exportación de fitohormonas que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluso cuando están presentes en concentraciones muy bajas. Muchas *Pseudomonas* promueven el crecimiento directo de las plantas mediante la producción de ácido 3-indolacético (AIA), una de las auxinas más comunes y estudiadas en literatura, que estimula la elongación, la división y la diferenciación celular [96]. Las bacterias productoras de AIA aumentan la longitud de la raíz, resultando en una mayor superficie radicular para adquirir nutrientes del suelo [97]. Se han reportado, además, distintas cepas de *Pseudomonas* productoras de otras fitohormonas, como las giberelinas por parte de *P. putida* H-2-3 [98], y las citoquininas por parte de *P. fluorescens* G20-18 [99]. Por otro lado, varias especies son capaces de modular la resistencia a estreses en las plantas, tanto bióticos como abióticos, mediante la disminución de los niveles de etileno [100]. Aunque el etileno es una hormona que estimula la germinación, promueve la formación de raíces y pelos radiculares, si su concentración se mantiene en niveles altos la elongación radicular se ve inhibida, así como también se inician procesos de senescencia, clorosis y abscisión de hojas [59], [96]. La enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa presente en muchas *Pseudomonas* hidroliza el precursor del etileno, resultando en un aumento en la colonización, elongación de las raíces y nodulación, y una mayor tolerancia a la sequía, estreses salinos o presencia de metales pesados. Se ha visto que mutantes para el gen *acdS* incapaces de expresar esta enzima redujeron su efecto protector frente a distintos patógenos *in planta* [100].

Las *Pseudomonas* son capaces de metabolizar un gran número de compuestos orgánicos, entre los que se incluyen hidrocarburos aromáticos, pesticidas, herbicidas y otros xenobióticos [101]. Por ejemplo, la cepa *P. nitroreducens* AR-3 proveniente de un suelo contaminado con clorpirifós (un pesticida organofosforado), fue capaz de degradar rápidamente este compuesto en medio mínimo [102]. Otros trabajos han reportado

Pseudomonas degradadoras de atrazina, obtenidas a partir de suelos contaminados con este herbicida [103], y de diferentes clorofenoles, como el herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) [104]. Estos microorganismos son empleados para remover contaminantes en distintas estrategias de **biorremediación**, siendo utilizados en algunos casos de forma combinada con plantas (fitorremediación), para potenciar la remoción. Por ejemplo, la cepa de *P. aeruginosa* ATCC® 9027 fue empleada en conjunto con plantas de alfalfa para degradar hidrocarburos, en un ensayo en microcosmos utilizando suelo contaminado [105].

1.7 Promoción indirecta del crecimiento vegetal

Entre los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal, el biocontrol por la producción de compuestos **antimicrobianos** es una estrategia que se encuentra ampliamente extendida dentro del género *Pseudomonas*. Estas bacterias son capaces de producir una variedad de compuestos que afectan directamente a distintos microorganismos patógenos, lo que se conoce también como **antagonismo** [60]. Muchos de estos compuestos provienen del metabolismo secundario, cuya expresión se dispara en condiciones limitantes de nutrientes o de alta densidad celular, suponiendo una ventaja para la competencia contra otros organismos en un ambiente natural. Generalmente, la expresión de estos metabolitos en *Pseudomonas* está determinada por mecanismos de *quorum sensing* o por mecanismos regulatorios post-transcripcionales, como la cascada Gac-Rsm [106]. Entre los metabolitos clásicos con actividad antibiótica producidos por *Pseudomonas* se incluyen los **lipopéptidos cíclicos**, surfactantes capaces de perturbar las membranas de hongos y bacterias; los **policétidos**, como el 2,4-diacetilfloroglucinol, que causa daño en las membranas de *Pythium* spp.; y los **pirroles**, como la pirrolnitrina, un inhibidor de la cadena respiratoria de hongos [60]. Otro grupo de antibióticos muy estudiados son las **fenazinas**, moléculas heterocíclicas y pigmentadas, que afectan a otras bacterias, hongos y oomicetes. El modo de acción de estas moléculas está relacionado con sus propiedades de oxido-reducción, que promueven la formación de especies reactivas del oxígeno, aunque también actúan por inhibición de topoisomerasas o por interacción con polinucleótidos. Se ha visto, además, que contribuyen a la colonización y competencia en la rizósfera, además de estar involucradas en la formación de biofilm y adhesión a raíces y semillas [107]. Otro

metabolito secundario típico producido por algunas *Pseudomonas* es el **ácido cianhídrico** (HCN), un compuesto volátil capaz de inhibir la citocromo oxidasa c y otras metaloenzimas, que cumple un rol importante en la supresión de diversos patógenos [108]. Mediante la utilización de mutantes para la producción de HCN se ha podido determinar su toxicidad directa sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* [64], [109], así como también sobre otros invertebrados, como las termitas [108], y sobre el crecimiento del oomicete *Phytophthora infestans* [110]. Por otro lado, las **tropolonas** constituyen un grupo de metabolitos antimicrobianos descritos en algunas cepas de *Pseudomonas*, que presentan un anillo aromático de 7 carbonos con un grupo carbonilo, y cuya actividad inhibitoria ha sido asociada al secuestro de hierro en condiciones limitantes [41]. Sin embargo, miembros de nuestro grupo han detectado la molécula 7-hidroxitropolona del aislamiento *P. donghuensis* SVBP6 como la principal responsable del amplio espectro fungistático que presenta esta cepa, y cuyo modo de acción es independiente de la disponibilidad de hierro [111]. Algunos de los antibióticos mencionados se muestran en la Figura 3.

La producción de **enzimas líticas** también es bastante común entre las bacterias del género *Pseudomonas* [112], [113]. Aunque la producción de proteasas extracelulares no ha sido tan estudiada en relación al biocontrol de patógenos como otros metabolitos, se ha visto que la producción de exoproteasa A en *P. protegens* CHA0 causa una mayor mortalidad de nematodos juveniles de *Meloidogyne incognita* y menor eclosión de huevos, respecto del mutante que no expresa la enzima [114]. Asimismo, algunas *Pseudomonas* productoras de quitinasas pueden hidrolizar las paredes celulares de los hongos, contribuyendo al control biológico de enfermedades fúngicas [115]. Por último, las fosfolipasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos, producidas en varias especies de *Pseudomonas*. Existen pocos trabajos sobre fosfolipasas extracelulares o ancladas a membrana externa en *Pseudomonas* biocontroladoras pero, aun así, se ha encontrado un incremento en la expresión del gen que codifica para una proteína de la familia de las fosfolipasas en *P. fluorescens* Pf29Arp, en presencia de los hongos patógenos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y *Magnaporthe grisea*, y de la ectomicorriza *Laccaria bicolor*. Dicha inducción podría estar relacionada, entonces, a la adhesión al micelio y la consiguiente modificación de la fisiología del hongo [116].

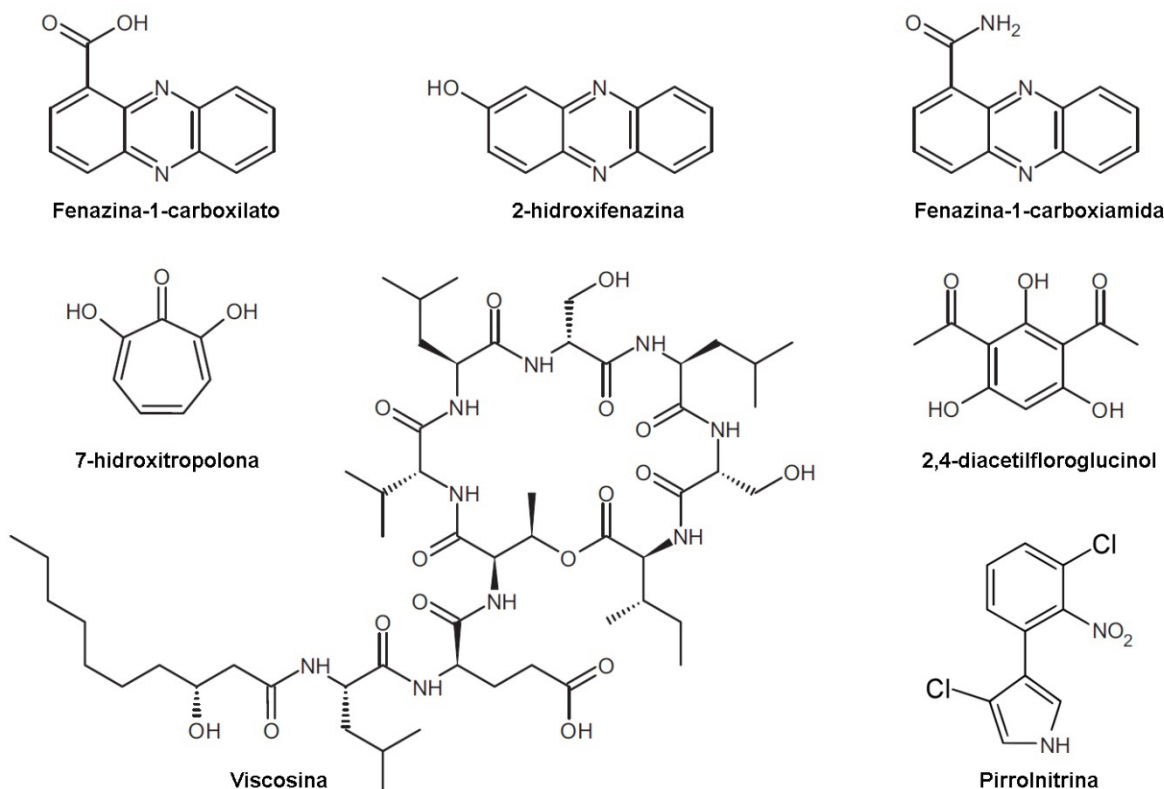


Figura 3. Variedad de moléculas producidas por bacterias del género *Pseudomonas* con actividad antimicrobiana. Se muestran a modo de ejemplo algunas moléculas de los grupos mencionados en el texto: fenazinas (fenazina-1-carboxilato, 2-hidroxifenazina y fenazina-1-carboxiamida); tropolonas (7-hidroxitropolona); lipopéptidos cíclicos (viscosina); policétidos (2,4-diacetilfloroglucinol) y pirroles (pirrolnitrina). Adaptado de [41].

Las bacterias PGPR pueden reducir la actividad patogénica de los microorganismos no solamente a través del antagonismo, sino también activando las defensas de las plantas. La **ISR** le confiere a la planta una mayor capacidad defensiva, es decir, que esta podrá responder más rápidamente o más fuertemente ante al encuentro con un patógeno, lo que se traduce en una disminución en el desarrollo o en la severidad de la enfermedad [117]. De forma similar a lo que ocurre ante el encuentro con un patógeno, la planta es capaz de reconocer ciertos componentes de las bacterias PGPR llamados **elicitors** que inducen la ISR, como la flagelina (el principal componente estructural del flagelo), los sideróforos, el lipopolisacárido presente en la membrana, y otras moléculas derivadas de microorganismos. Así, la planta es capaz de reforzar las paredes celulares, producir compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas, o expresar proteínas relacionadas con la patogénesis [118]. Este tipo de mecanismo de defensa no es

específico de un microorganismo y no solo se expresa en el sitio de inducción, sino que se extiende a toda la planta [59]. Por ejemplo, se ha visto que *P. putida* WCS358 es capaz de inducir la ISR en plantas de *Arabidopsis thaliana*, pero también en plantas de tomate y poroto, brindando protección frente a diversos patógenos como *P. syringae* pv. *tomato*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum* [119]. Es importante destacar que la colonización exitosa de un microorganismo PGPR requiere suprimir de forma local la respuesta de defensa del hospedador [120]. En relación a esto último, se encontró que la bacteria benéfica *P. simiae* WCS417r logra suprimir la respuesta de defensa contra la flagelina en las raíces de *Arabidopsis* mediante la secreción de pequeñas moléculas [121], mientras que la exoproteasa A, producida por muchas especies de *Pseudomonas*, podría evitar la activación de las defensas de *Arabidopsis* al degradar los monómeros de flagelina en condiciones *in vitro* [122]. Otras estrategias involucran la utilización de los sistemas de secreción de tipo III (T3SS), complejos de transporte transmembrana que actúan como *delivery* de distintos efectores directamente en las células del hospedador y que, en este caso, suprimen la respuesta inmune de la planta [41].

Algunas *Pseudomonas* también presentan mecanismos de interferencia para los sistemas de *quorum sensing* (QS), responsables de la expresión de genes en situaciones de alta densidad celular. Los mecanismos de QS están mediados por moléculas difusibles específicas, como las N-acilhomoserino lactonas (AHLs), que generalmente regulan la expresión de genes relacionados con la patogenicidad en bacterias. Una de las estrategias más conocidas para interrumpir la comunicación mediada por estas moléculas es el *quorum quenching* (QQ), que implica la degradación enzimática de las AHLs, reduciendo así la virulencia del patógeno. Se ha reportado recientemente que la cepa *P. segetis* P6 es capaz de degradar una amplia variedad de AHLs mediante una actividad acilasa, y que plantas de tomate tratadas con esta bacteria mostraron una mayor protección frente al patógeno *P. syringae* pv. *tomato* [123].

Finalmente, la **competencia por nicho y nutrientes** (CNN) es otro de los mecanismos relacionados con el biocontrol, donde el microorganismo mejor adaptado a la utilización de distintas fuentes de carbono podrá colonizar las raíces de forma más eficiente, desplazando, por ejemplo, a otros patógenos al ocupar los espacios disponibles en la raíz [54], [63]. Se encontró que las cepas *P. fluorescens* PCL1751 y *P. putida* PCL1760 protegen a las plantas de tomate del patógeno *Fusarium oxysporum*,

que causa la pudrición de las raíces, por medio de este mecanismo. Exceptuando la producción de proteasas de PCL1751, ambas cepas carecen de otras enzimas líticas, metabolitos tóxicos y tampoco inducen ISR [124], [125]. Asimismo, la competición puede ocurrir por micronutrientes, como es el caso del hierro. El mecanismo ya descrito de adquisición de hierro mediante la producción de sideróforos es esencialmente una estrategia de biocontrol, muy relevante en suelos donde el hierro se encuentra en baja disponibilidad [36]. Gu y colaboradores han podido demostrar el efecto biocontrolador de los sideróforos sobre la bacteria patógena de tomate *Ralstonia solanacearum*, al exponerlo directamente a sobrenadantes de cultivo de aislamientos productores de estas moléculas en condiciones limitantes de hierro. Este efecto inhibitorio desapareció con el agregado de hierro a dichos sobrenadantes [126].

Como vimos en esta sección las bacterias del género *Pseudomonas* presentan una variedad de actividades que resultan de interés tanto para la agricultura como para mantener y/o mejorar la calidad del ambiente. Los principales mecanismos abordados en las secciones anteriores se resumen en la Figura 4. La relativa facilidad para aislar y cultivar cepas de *Pseudomonas in vitro*, junto con la amplia variedad de herramientas para su identificación y caracterización genética y bioquímica, ha impulsado la investigación de distintos aislamientos de bacterias de este género para el desarrollo de insumos agrícolas, destinados a mejorar la salud de las plantas y, en consecuencia, aumentar el rendimiento de diferentes cultivos [127], [128], [129]. No se debe perder de vista que el conjunto de actividades mencionadas, que pueden ser potencialmente aprovechadas por las plantas, requiere de una colonización efectiva de la rizósfera, lo cual involucra el establecimiento y persistencia de estas bacterias en el tejido de la raíz [63].

1.8 La agricultura sustentable

Según el Foro Global sobre Seguridad Alimentaria y Nutrición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés *Food and Agriculture Organization*), se estima que la población humana alcanzará los 9,1 billones de personas para el año 2050, un 34% más que el valor actual, y que este aumento ocurrirá en mayor medida en los países en desarrollo. Para ello, será necesario

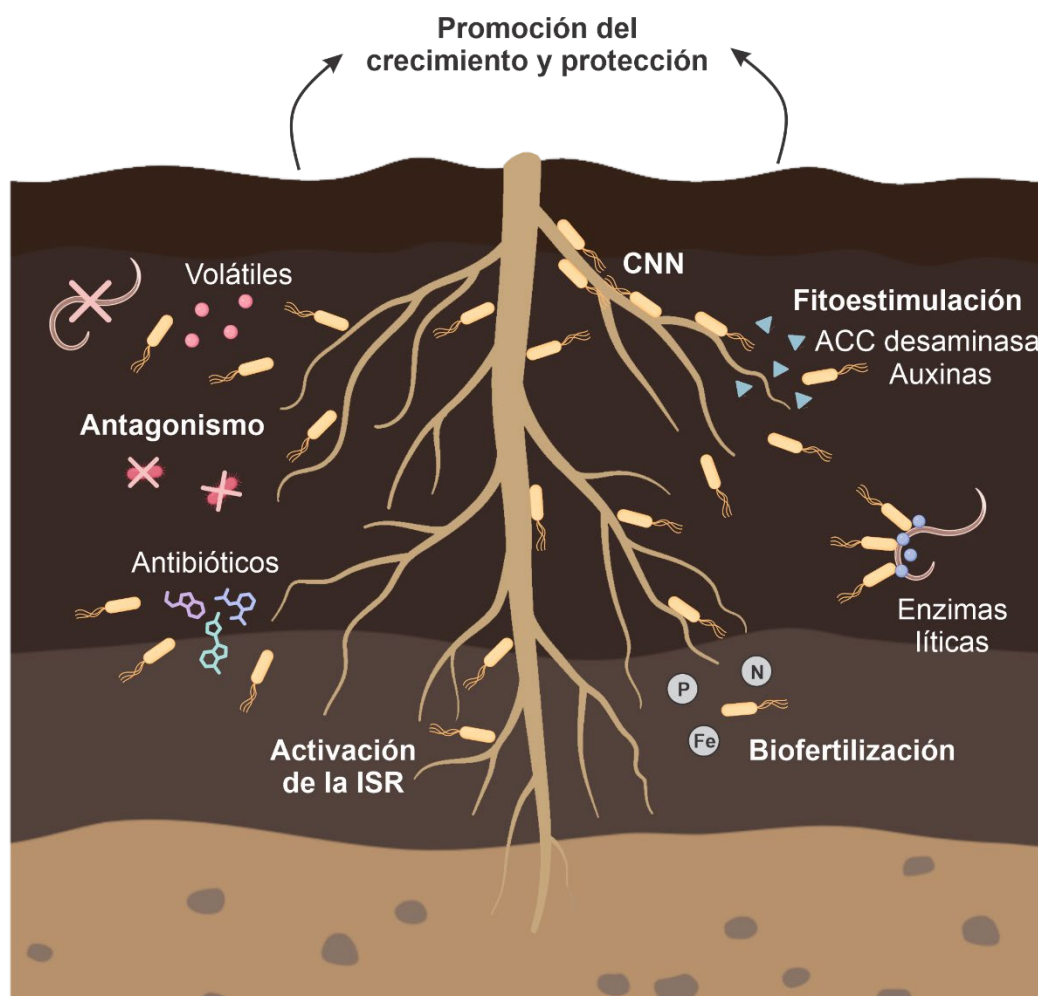


Figura 4. Algunos de los mecanismos PGPR llevados a cabo por bacterias del género *Pseudomonas*. Entre los directos se muestran la biofertilización y la fitoestimulación, mientras que entre los indirectos encontramos el antagonismo, la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR) y la competencia por nicho y nutrientes (CNN).

incrementar la producción de alimentos un 70%, lo cual significa un desafío para los sistemas agrícolas actuales. Paralelamente, muchos de los suelos destinados a la agricultura se encuentran actualmente en proceso de degradación: su uso intensivo ha llevado a la depleción de nutrientes, la erosión y desertificación, en conjunto con la disminución de las reservas de agua dulce y la pérdida de la biodiversidad de especies. Si bien el área cultivable para 2050 podría incrementarse hasta un 5%, las perspectivas a largo plazo sugieren que si no se adoptan políticas que reviertan los efectos de la degradación de los suelos y manejos agrícolas más sustentables, no será posible alcanzar la demanda global requerida [130].

Desde el inicio de la llamada “Revolución verde”, la agricultura moderna ha sido asociada con el uso de **agroquímicos**. El primer pesticida empleado en la agricultura fue

el diclorodifeniltricloroetano (DDT), un compuesto organoclorado cuyas propiedades insecticidas se descubrieron en 1939. En 1945 comenzó la comercialización del primer herbicida sintético, el 2,4-D, considerado el predecesor de otros compuestos para el control de malezas como la atrazina, la cual llegaría en 1970; y el glifosato, que aparecería en 1980. La aplicación de fertilizantes químicos, especialmente para el aporte de nitrógeno y fósforo, en combinación con pesticidas ha logrado aumentar el rendimiento de los cultivos mediante la provisión de nutrientes y la reducción de pérdidas por enfermedades y/o presencia de malezas, respectivamente [131]. Sin embargo, su uso intensivo en las últimas décadas ha generado la acumulación de estos compuestos en el suelo, el aire y los cuerpos de agua, facilitando su ingreso a las cadenas alimenticias y causando efectos negativos en la salud humana y de otros organismos [132]. En las últimas décadas, se ha puesto el foco en la alteración de la microbiota del suelo por la aplicación de agroquímicos. Por ejemplo, se reportaron variaciones en la composición bacteriana de la rizósfera y disminución de la biodiversidad luego de la aplicación del fungicida tebuconazol y del insecticida imidacloprid [133]. Asimismo, se observó un enriquecimiento de bacterias degradadoras del herbicida 2,4-D, luego de aplicar la dosis recomendada [134]. También se ha prestado particular atención a los efectos sobre microorganismos benéficos. Por ejemplo, la aplicación reiterada de glifosato en pasturas naturales, práctica utilizada para favorecer las pasturas de raigrás en el invierno en la Pampa Húmeda Argentina, redujo la abundancia de las *Pseudomonas* cultivables [135], hongos micorrícicos arbusculares y diazótrofos de vida libre [136]. Por otro lado, se observó que diferentes fungicidas afectan negativamente a la cepa de *Bacillus subtilis* BC8 en condiciones *in vitro*, causando daño celular y disminución en la producción de fitohormonas [137]. Con todo esto, resulta prioritario desarrollar prácticas agrícolas dirigidas a preservar y/o mejorar la salud y calidad del suelo, teniendo en cuenta el manejo adecuado de los recursos y el mantenimiento de la biodiversidad.

En la década del '80 surge el término **agricultura sustentable**, como un conjunto de conceptos, ideas y valores de cómo debían ser ejecutadas las prácticas agrícolas. Posteriormente se la definió como un sistema integrado de producción animal o vegetal, en un sitio específico de aplicación, que involucra el manejo eficiente de los recursos para satisfacer las necesidades humanas, mejora la calidad ambiental y de la sociedad, y es económicamente viable a largo plazo [138]. Las prácticas agrícolas sustentables

involucran la reducción de la fertilización química y del uso de pesticidas, y la selección de genotipos de plantas capaces de adaptarse y crecer eficientemente en ciertas condiciones ambientales (y no al revés, donde el buen desempeño de la planta es alcanzado con la utilización de agroquímicos) [139]. Pero estas medidas no son las únicas, sino que forman parte de una serie de pautas de manejo que, en conjunto, tienden a disminuir el impacto negativo de la agricultura en el ambiente, y favorecer la sustentabilidad biológica y ecológica de los suelos. Una de ellas es la adopción de la **siembra directa**, que, a diferencia de la labranza convencional, es un sistema de cultivo donde la semilla es directamente depositada en un suelo sin laboreo, conservando los residuos de cosecha del cultivo anterior en superficie. Este sistema contribuye al mantenimiento de la estructura del suelo, mejora la infiltración de agua, promueve la actividad biológica, favorece los ciclos de nutrientes y brinda protección frente a la erosión. La utilización de **cultivos de cobertura** es otra de las prácticas que se utiliza en conjunto con la siembra directa para prevenir la erosión de los suelos, controlar malezas y mejorar la fertilidad, lo cual también reduce los requerimientos de fertilizantes y herbicidas químicos [140], [141]. Muchas veces estos cultivos de cobertura se incluyen en estrategias de **rotación**, sobre todo si el periodo entre la cosecha de un cultivo y la siembra del próximo es demasiado largo. La rotación es una práctica que involucra la alternancia de cultivos en tiempo y espacio, reduciendo de esta forma la incidencia de patógenos y contribuyendo al balance de nutrientes. Por último, como vimos, una planificación racional de la fertilización, y un manejo eficiente y responsable de los agroquímicos también forman parte del conjunto de prácticas sustentables [142]. La utilización de todas estas técnicas permite obtener mejores resultados no solo en la conservación del ambiente, sino también en el incremento de los rendimientos productivos [141].

Los microorganismos benéficos constituyen una alternativa al uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos para mantener la productividad, y pueden ser introducidos de forma exógena en los sistemas agrícolas. Los **inoculantes microbianos**, generalmente formulados a partir de bacterias y hongos, son productos compuestos por microorganismos vivos capaces de impulsar el desarrollo de distintas especies de plantas. Se los suele clasificar en **biofertilizantes**, si los microorganismos que los componen intervienen en la provisión de nutrientes y/o aumentan la tolerancia a

estreses abióticos, o **biopesticidas**, si éstos brindan protección frente a patógenos [143], [144]. Asimismo, algunos inoculantes pueden tener una acción dual. Por ejemplo, ciertas especies de bacterias, como *Pseudomonas* o *Bacillus*, pueden ejercer una acción directa al estimular el crecimiento vegetal y, al mismo tiempo, antagonizar patógenos y/o estimular las defensas de las plantas [145], [146].

1.9 Inoculantes microbianos en la agricultura

Debido a los problemas relacionados con la aplicación de fertilizantes y pesticidas químicos, la agricultura ha comenzado a optar por métodos más ecológicos y limpios, como el empleo de biopesticidas y biofertilizantes [147]. La historia de comercialización de estos bioproductos comenzó hace más de 100 años con la aparición de "Nitragin" en 1896, el primer inoculante patentado en EEUU basado en *Rhizobium*. Los científicos Hiltner y Nobbe, además de obtener dicha patente, realizaron importantes aportes relacionados a la especificidad de estas preparaciones por la planta hospedadora, determinando la aplicabilidad de cepas particulares para ciertas leguminosas y mejorando las formulaciones para alargar la vida útil del inoculante [31], [144]. Actualmente los microorganismos fijadores de nitrógeno dominan el mercado de biofertilizantes, debido a la alta demanda de este nutriente por parte de las plantas y al éxito comprobado del uso de rizobios en cultivos de leguminosas [148]. En nuestro país, el mercado nacional de bioinsumos se estima en valores cercanos a USD 80 millones, donde el 62% de los productos registrados son biofertilizantes, y particularmente, más de la mitad de dichos productos son inoculantes bacterianos destinados al cultivo de soja [149].

Existen varios **métodos de inoculación** para introducir microorganismos benéficos en la planta hospedadora, los cuales influyen en el establecimiento y persistencia de los mismos en el sitio de acción. Entre ellos encontramos la **inoculación en semilla** antes de la siembra, la inoculación en raíces de plántulas, en hojas, y en el suelo. Mientras que la inoculación foliar no es muy común, la inoculación en semilla es la más utilizada [150]. Además de la selección de un método de inoculación adecuado, la efectividad de un inoculante microbiano requiere de la **supervivencia** de un número apropiado de microorganismos que puedan establecerse y desempeñar sus actividades luego de la aplicación. Por lo tanto, la **formulación** es otro factor clave para lograr la estabilidad del

inóculo no solo en el sitio de aplicación, sino también durante el almacenamiento [148], ya que muchas veces el vendedor y/o productor debe almacenar el producto a temperatura ambiente por periodos prolongados hasta su venta o aplicación [151]. El formulado proporciona, entonces, un microambiente favorable para el microorganismo, y apunta a maximizar la cantidad inicial de células viables y prevenir un rápido decaimiento posterior [152], [153]. Por otro lado, si bien la formulación y el método de aplicación son relevantes para el éxito del inoculante [152], en la práctica la facilidad de su uso, la logística en torno a la siembra, los costos, la compatibilidad con pesticidas y las condiciones del suelo deben ser tenidas en cuenta [148]. El momento de la aplicación también tiene un rol central, ya que si se trata de un biopesticida es ideal utilizarlo antes de la aparición de síntomas en la planta, y si se quiere aplicar un biofertilizante, la mejor opción es inocular en los primeros estadios de desarrollo de las plántulas o directamente en la semilla [154].

Los inoculantes pueden presentarse en formulaciones sólidas o líquidas [153]. En general se suele utilizar el término *carrier* para designar al soporte que actúa como vehículo de los microorganismos, y que está en mayor proporción en el formulado [152]. Las **formulaciones sólidas** se basan en sustratos orgánicos e inorgánicos, que a su vez pueden utilizarse húmedos o secos. Esos sustratos brindan protección frente a las condiciones ambientales, y se los suele clasificar según el tamaño de partícula en inoculantes tipo granulares e inoculantes en polvo. La mayoría de estas formulaciones involucran la inmovilización de los microorganismos empleando diferentes métodos, como la adhesión o formación de biofilm en el soporte, o el encapsulamiento con sustancias poliméricas. Particularmente, las formulaciones húmedas no requieren de métodos de secado, por lo tanto, las bacterias se exponen a un alto contenido de agua durante el almacenamiento o la aplicación. Por el contrario, las formulaciones secas, pueden extender la sobrevivencia de los microorganismos por periodos más largos e incluso soportar temperaturas más altas, debido a su bajo contenido de agua [153], [155]. Existe una gran variedad de materiales que son utilizados para las formulaciones sólidas, entre los que se incluyen turba [156], arcilla [157], talco [158], restos vegetales (como el bagazo de la caña de azúcar o malta) [159], perlita, vermiculita [160], encapsulamiento en esferas de alginato [161] o de quitosano, solo o en combinación con almidón [162]. Particularmente, en las formulaciones que requieren secado el soporte se suele

combinar con **adhesivos** o **protectores**, compuestos que mejoran la sobrevivencia de los microorganismos durante dicho proceso y durante el almacenamiento. Los inoculantes sólidos pueden ser directamente incorporados al suelo, o utilizados en la inoculación de semillas como recubrimiento de las mismas [163].

Los **inoculantes líquidos** son esencialmente cultivos o suspensiones microbianas que se combinan con sustancias acuosas, aceites o polímeros, comúnmente llamados **aditivos** [164]. Del mismo modo que para algunas formulaciones en sustrato sólido, la incorporación de estos aditivos mejora la adhesión, estabilización y dispersión de las células, además de funcionar como protectores [152]. En general los inoculantes líquidos son menos costosos que las formulaciones sólidas [153], y pueden ser aplicados de diversas formas. Se los suele utilizar en la inoculación de raíces, sumergiendo las mismas en una suspensión de microorganismos; en la inoculación en suelo, por incorporación directa de la suspensión en regiones cercanas a la raíz; o en la inoculación en semilla como recubrimiento [150], [165]. También se los emplea en aplicaciones en surco durante la siembra o en aplicaciones foliares [165].

Como vimos, la **desección** representa un problema en el desarrollo de las formulaciones. Si bien en los inoculantes sólidos el secado ocurre bajo condiciones controladas, se ha demostrado que tanto *Pseudomonas* como *Azospirillum* se ven afectadas durante el proceso [166]. En cambio, en las formulaciones líquidas, la desecación ocurre en condiciones ambientales no controladas, principalmente cuando son aplicadas en semilla. Por otro lado, luego de la aplicación a campo, los ciclos precipitación/riego y sequía afectan tanto a los inoculantes sólidos como a los líquidos. La desecación es aún más crítica para microorganismos no esporulantes, como las *Pseudomonas*, y se considera una de las principales razones de la pérdida de viabilidad tanto antes como después de la aplicación a campo [165]. Durante el proceso de desecación se generan especies reactivas del oxígeno que producen daños en el ADN y desnaturalización de proteínas, además de la pérdida de la fluidez de las membranas [167]. Una de las alternativas para mejorar la tolerancia a este proceso es el uso de los ya mencionados aditivos o protectores, que comúnmente se añaden a las células bacterianas después de cosechar el cultivo de los fermentadores, y antes del secado. Cuando se añaden de forma externa, estos adyuvantes actúan mediante la estabilización de la membrana de las células [165]. La **trehalosa** es uno de los osmoprotectores más

estudiados, y se cree que este disacárido es capaz de reemplazar las moléculas de agua durante la deshidratación, estabilizando así las biomoléculas y previniendo la desnaturalización. Por ejemplo, la trehalosa ha sido utilizada exitosamente en un formulado sólido con una cepa de *Pseudomonas*, en el cual este protector se añadió previo al proceso de secado [168]. La vitrificación es otro de los mecanismos propuestos para este azúcar, en el cual la formación de cristales en el citoplasma de la célula mantendría la integridad de las moléculas por periodos prolongados de tiempo [169]. En el caso de *Bradyrhizobium japonicum* y *Raoultella terrigena* se ha demostrado que el agregado de trehalosa al medio de cultivo permite su acumulación en el interior de las células, logrando un mayor efecto protector. Sin embargo, esta estrategia sería favorable solo en aquellas cepas que no metabolizan la trehalosa durante el crecimiento [170], [171]. Por otro lado, algunos microorganismos, entre los cuales se encuentra *Pseudomonas*, pueden promover la acumulación de trehalosa bajo distintas condiciones de estrés, mediante la activación de las rutas de síntesis [172], [173], [174]. La combinación de este disacárido con **polivinilpirrolidona** (PVP) mejora la viscosidad de las suspensiones, y podría mejorar además la adherencia de las células a las semillas. El PVP es un polímero que retiene una gran cantidad de agua, por lo que podría mantener las moléculas de agua alrededor de las células y así ralentizar el proceso de desecación. El efecto de esta combinación se ha reportado para *B. japonicum* y *P. putida* KT2440 [175], [176]. Además de estos compuestos, se han probado con diferentes niveles de éxito sustancias como sacarosa, lactosa, carboximetilcelulosa, goma arábiga, glicerol, xantano y otros compuestos con propiedades similares a las mencionadas para la trehalosa y el PVP [158], [160], [177], [178].

La desecación no es el único factor que puede afectar el desempeño de un inoculante cuando es aplicado a campo. En general, el desarrollo de nuevos inoculantes se basa en ensayos exploratorios en condiciones de laboratorio, los cuales se centran en mecanismos PGPR específicos que pueden o no reproducirse luego de la aplicación [55]. Primero, el o los microorganismos deben ser capaces de alcanzar un buen título en el formulado, y este se debe mantener durante la etapa de transporte, distribución, almacenamiento y aplicación del producto [151]. Lograr un alto número de bacterias en el formulado inicial supone un punto importante, ya que, por ejemplo, se ha reportado para rizobios que el número inicial de células en el inóculo correlaciona directamente

con el número de nódulos y el rendimiento final del cultivo [179], [180], [181]. Asimismo, como se mencionó, existe una amplia demanda de **semillas pre-inoculadas** por parte de los productores para evitar realizar el proceso de inoculación y abaratar costos, de manera tal que estas puedan permanecer almacenadas durante semanas o incluso meses antes de la siembra [182], [183]. Por ejemplo, semillas de soja pre-inoculadas con suspensiones comerciales de rizobios pueden almacenarse hasta 15 días antes de la siembra en un ambiente fresco y bien ventilado [184]. Sin embargo, otros trabajos han reportado que la supervivencia de los rizobios en semillas pre-inoculadas es variable y, en general, no logra alcanzar el número de bacterias requerido [183], [185]. Para el caso de *Pseudomonas*, hay pocos estudios de sobrevivencia en la superficie de las semillas. Sólo para *P. fluorescens* F113 se han observado variaciones en semillas de cebolla desinfectadas, dependiendo del aditivo utilizado y de la temperatura de almacenamiento de las semillas, pudiendo ser detectada hasta 70 días luego de ser conservadas a 4 °C [186]. Resultados aún mejores se han obtenido para bacterias formadoras de esporas, como en el caso de distintas cepas de *Bacillus* en semillas desinfectadas de maíz, lechuga y pepino, detectadas en estas semillas hasta los 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente [187]. Adicionalmente, la aplicación de fungicidas e insecticidas sobre las semillas puede tener efectos negativos en la supervivencia del inoculante [152].

Además de la densidad del inóculo y el método de aplicación, una vez introducido, el microorganismo deberá competir con una microflora nativa altamente adaptada por la colonización de los espacios. En este sentido, la especificidad por la planta hospedadora podría favorecer al microorganismo introducido por sobre la comunidad previamente establecida [148]. Por otro lado, entre otros mecanismos responsables de la disminución en el número y actividad de los inoculantes encontramos el tipo de suelo y sus características (textura, pH, temperatura, contenido de humedad, salinidad), la baja disponibilidad de nutrientes, presencia de microfauna depredadora, así como también las condiciones climáticas y el uso de agroquímicos [150], [151], [188]. De hecho, muchas veces es necesario reinocular para mantener una cantidad efectiva de inoculante en condiciones a campo [189]. Debido a estas inconsistencias en el desempeño de inoculantes a campo, se ha puesto el foco en el aislamiento de PGPMs a partir del mismo sitio o de la rizósfera de cultivos donde posteriormente se van a aplicar como

inoculantes. Esta estrategia de encontrar el mejor microorganismo o consorcio de microorganismos para un cultivo y/o un sitio de aplicación particular, podría evitar las dificultades que implica la adaptación de especies no nativas en un nuevo entorno [145], [150], [152].

1.10 Cultivos de importancia económica en Argentina

Desde su domesticación hace alrededor de 10.000 años, el **trigo** (*Triticum aestivum* L.) ha desempeñado un papel crucial en la alimentación global. Este cereal proporciona la quinta parte de las calorías y proteínas consumidas en el mundo, y es el cultivo con la mayor superficie sembrada a nivel mundial [190]. Su producción anual ronda los 808 millones de toneladas [191], siendo China el productor más importante [192]. El trigo es una monocotiledónea de la familia de las gramíneas, cuyo sistema radicular está formado por una raíz primaria y un número variable de raíces seminales de origen embrionario, además de raíces adventicias o nodales que se originan posteriormente en los primeros entrenudos. A partir de ambos tipos de raíces se desarrollan raíces laterales y pelos radiculares. A diferencia de otros cereales como el maíz y el sorgo, el trigo desarrolla nuevos tallos a partir de las raíces nodales, conocidos como macollos (Figura 5) [193]. Es una planta C3 que prospera en ambientes frescos, aunque también se cultiva en zonas templadas o cálidas, ya sean secas o con altas precipitaciones [194]. La producción de trigo en Argentina ocupa el 3° lugar entre los granos, después de la soja y el maíz, alcanzando los 15,9 millones de toneladas en la campaña 2023/2024. La provincia de Buenos Aires concentra la mitad de la producción del país, y luego le siguen Santa Fe, Entre Ríos y Córdoba [195]. La diversidad geográfica y climática de las áreas dedicadas al cultivo de trigo determina que la siembra del grano comience en los meses de marzo y abril en las provincias del Norte Argentino, y en los meses de julio y agosto en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. La cosecha se inicia en septiembre y concluye en enero [196].

El **maíz** (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más producidos y consumidos en el mundo. Su cultivo ocupa aproximadamente 203 millones de hectáreas (Ha) por año a nivel mundial, siendo el segundo cultivo más ampliamente sembrado en el mundo después del trigo, con 219 millones de hectáreas. Además, lidera la producción de cereales con 1163 millones de toneladas anuales gracias a sus altos rendimientos (5,7

toneladas/Ha) [191], [197]. El maíz es una monocotiledónea de la familia de las gramíneas, cuyos usos abarcan desde el consumo humano y animal hasta la producción de biocombustible. Es relativamente sensible a la sequía, y precisa de temperaturas cálidas para su desarrollo. Pertenece al grupo de las plantas C4, y presenta un sistema radicular fibroso, muy similar al de trigo (Figura 5) [193], [198]. En los últimos 20 años, se han registrado avances tecnológicos importantes con respecto a este cultivo, como el desarrollo de híbridos, semillas transgénicas, prácticas de manejo, cultivos tardíos y nuevas variedades, que permitieron no solo aumentar el rendimiento por hectárea, sino también diversificar la producción de este cereal [199]. Particularmente, nuestro país ocupa el quinto puesto entre los principales países productores de maíz [192]. La siembra de este cultivo suele iniciar en el mes de septiembre y se prolonga hasta el mes de enero según la región, mientras que la cosecha se realiza entre los meses de febrero y agosto del año siguiente. Durante la campaña 2022/2023 se produjeron 41,4 millones de toneladas, con un aporte del 33% y 29% proveniente de las provincias de Córdoba y Buenos Aires, respectivamente, que forman parte de la llamada zona núcleo maicera [195].

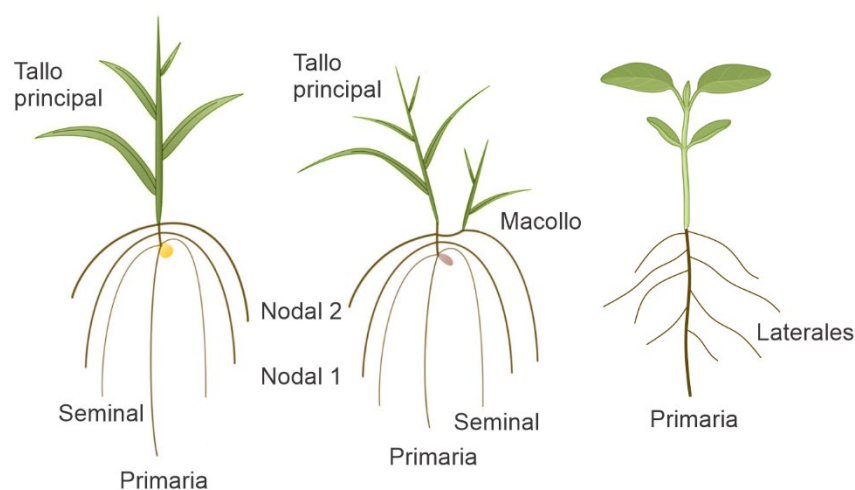


Figura 5. Representación esquemática de los sistemas radicales de maíz, trigo y soja. Se muestran, de izquierda a derecha, una planta de maíz, una planta de trigo y una planta de soja. El maíz y el trigo son monocotiledóneas, por lo que sus sistemas radicales son similares. Además, a pesar de que ambos son cereales, el maíz ha perdido su capacidad de macollamiento. Es importante notar que, a partir de la raíz primaria y de las raíces seminales, también emergen raíces laterales (no representadas en el esquema). En contraste, la soja, al ser una dicotiledónea, presenta un sistema radicular con una única raíz principal prominente, a partir de la cual surgen las raíces laterales. Adaptado de [193], [200].

Finalmente, la **soja** (*Glycine max* L.) es la principal oleaginosa cultivada en Argentina y el cultivo más relevante a nivel nacional, no sólo por la superficie que ocupa, sino también por el valor económico de su producción [201]. De hecho, nuestro país se encuentra en el tercer puesto a nivel mundial en términos productivos, con un aporte del 13% con respecto al total de la producción global [192]. La soja es una dicotiledónea, y como tal presenta un sistema radicular formado por una raíz primaria a partir de la cual proliferan raíces laterales (Figura 5) [200]. El cultivo de soja ha tenido una fuerte expansión en nuestro país desde su introducción en la década del setenta, y especialmente a partir de mediados de los años noventa. Esto último está vinculado a la introducción de semillas transgénicas y del herbicida asociado, el glifosato, en conjunto con nuevas prácticas de manejo, como la siembra directa [202]. Durante la campaña 2022/2023 se produjeron 25 millones de toneladas, con Buenos Aires concentrando el 34% de la producción del país, seguido por Córdoba (25%), Santa Fe (15%) y Santiago del Estero (11%) [195].

Hipótesis y Objetivos del trabajo

Como resultado del consorcio público-privado BIOSPAS (acrónimo de Biología del Suelo y Producción Agraria Sustentable), creado en 2007 con el objetivo de abordar un estudio multidisciplinario de los sistemas agrícolas bajo siembra directa en la Pampa Argentina [203], nuestro laboratorio cuenta con una colección de 20 aislamientos de *Pseudomonas* obtenidos a partir de suelos agrícolas y rizósferas de pasturas, y de cultivos de soja y maíz. Dichos aislamientos fueron seleccionados por su capacidad antagonista *in vitro* contra 12 hongos fitopatógenos aislados a partir de plantas infectadas de los mismos lotes donde fueron tomadas las muestras de suelo y rizósferas. Además, se los ha caracterizado en términos de sus propiedades de promoción y colonización *in vitro* [145], e incluso algunos han mostrado capacidad de promover el rendimiento en grano de trigo y maíz en experimentos a campo [127]. Sin embargo, además de la descripción del potencial probiótico vegetal evaluado *in vitro*, la bibliografía sugiere que el estudio de la interacción planta-bacteria en todas las etapas (inoculación / colonización competencia / ejecución de propiedades probióticas) es esencial para optimizar el rendimiento de los PGPM a campo. Con respecto a estos aislamientos, se desconoce su capacidad para sobrevivir en la superficie de las semillas y competir frente a la microflora nativa en la rizósfera. Tampoco conocemos su patrón de colonización de raíces. Por lo tanto, para el presente trabajo de Tesis hemos seleccionado un subgrupo de 6 aislamientos, con el objetivo de profundizar su caracterización en términos de la supervivencia en semilla, colonización radical, y competitividad y persistencia en suelo, requerimientos importantes para el desarrollo de bioinsumos basados en estos microorganismos. Los cultivos empleados serán maíz, trigo y soja, de relevancia para nuestro país y para los cuales la inoculación en semilla es la principal estrategia de aplicación de inoculantes.

A partir de los conocimientos previos, las **hipótesis** de trabajo particulares son:

- Contar con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* marcados con proteínas fluorescentes y antibióticos permitirá realizar un seguimiento de los mismos en condiciones comparables a las que se utilizan los inoculantes a campo (**Capítulo 2**).

- Los aislamientos de *Pseudomonas* podrán sobrevivir en la superficie de semillas pre-inoculadas de los 3 cultivos mencionados (**Capítulo 3**).
- Estas cepas podrán colonizar eficientemente las raíces de plántulas de maíz, trigo y soja (**Capítulo 4**).
- Los aislamientos podrán establecerse en la rizósfera y competir eficientemente con la microflora nativa presente en las raíces (**Capítulo 5**).

Los **objetivos** particulares de cada capítulo se detallan a continuación:

- Realizar el marcaje silencioso de los aislamientos con proteínas fluorescentes y antibióticos para su posterior seguimiento en condiciones no axénicas (**Capítulo 2**).
- Evaluar la capacidad de supervivencia en semillas no desinfectadas de maíz, trigo y soja, empleando diferentes tratamientos (**Capítulo 3**).
- Conocer el patrón de colonización radical en estos tres cultivos, en condiciones axénicas (**Capítulo 4**).
- Evaluar la competencia de nuestros aislamientos para colonizar raíces de plantas de maíz, trigo y soja en presencia de microflora nativa, utilizando suelo como sustrato (**Capítulo 5**).

Capítulo 2: Marcaje cromosomal de los aislamientos de *Pseudomonas*

Introducción

Para monitorear nuestros aislamientos de *Pseudomonas* spp. en condiciones no axénicas fue necesario contar, en primera instancia, con herramientas que nos permitieran detectar a estos microorganismos de manera selectiva frente a la microbiota de las semillas y/o del suelo. El medio de cultivo S1, desarrollado por W. Gould, ha sido utilizado exitosamente para el aislamiento selectivo de bacterias del género *Pseudomonas* a partir de muestras complejas [204]. Este medio basa su selectividad principalmente en dos de sus componentes: el detergente aniónico N-lauril sarcosina de sodio, que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas, y el antibiótico trimetoprima, que impide el desarrollo de bacterias Gram-negativas facultativas. Además, las altas concentraciones de glicerol y sacarosa contribuyen parcialmente a la selectividad, al generar un desbalance osmótico que es bien tolerado por *Pseudomonas*. Al estar limitado en hierro, el medio S1 permite distinguir entre *Pseudomonas* fluorescentes y no fluorescentes, dado que favorece la producción de sideróforos [204], [205], [206].

El marcaje de cepas bacterianas con proteínas fluorescentes es una herramienta esencial en estudios que requieren el seguimiento de microorganismos en ambientes complejos, como el suelo [207], la filósfera de las plantas [208] y el tracto digestivo de mamíferos [209]. En este sentido, el uso de plásmidos para la expresión de proteínas supone varias ventajas, ya que pueden ser introducidos fácilmente en las células hospedadoras, permitiendo una alta producción de la proteína debido a la presencia de múltiples copias. Sin embargo, su estabilidad depende de una presión de selección continua, como el uso de antibióticos, lo que resulta incompatible con experimentos llevados a cabo en condiciones similares a las naturales [210]. Por esto, se han desarrollado diferentes estrategias para introducir estos genes directamente en el cromosoma bacteriano, mediante técnicas como la recombinación homóloga [211], y sistemas basados en CRISPR-Cas9 [212] o en transposasas [213], [214].

En particular, el sistema de transposición mini-Tn7 facilita la inserción sitio- y orientación-específica en el cromosoma de bacterias Gram-negativas de una copia única del *cassette* Tn7, el cual incluye genes de resistencia a antibióticos junto con un gen que

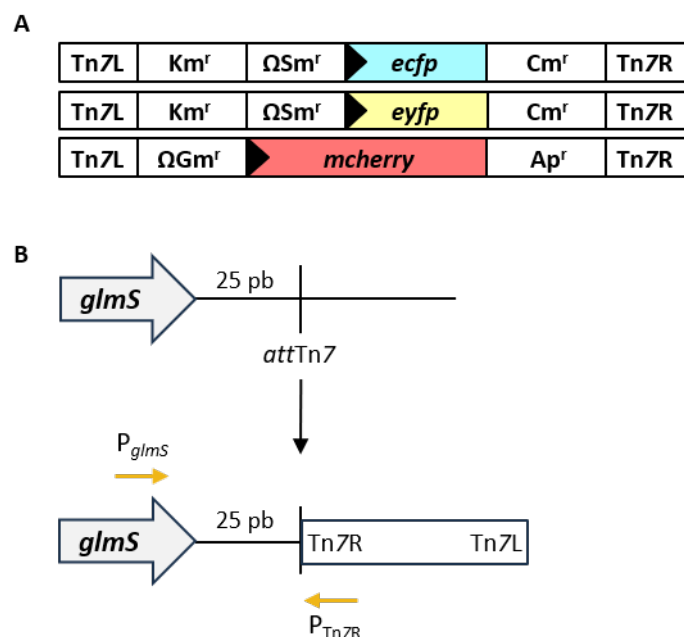


Figura 6. Sistema de transposición mini-Tn7. **a)** Representación de los vectores Tn7 utilizados para el marcaje genético (adaptado de [215], [216]). **b)** Integración cromosómica del mini-Tn7. La correcta inserción se verifica posteriormente por PCR utilizando *primers* específicos que hibridan en el transposón (P_{Tn7R}) y en el genoma bacteriano (P_{glmS}) (adaptado de [217]).

Gm^r hace referencia a la resistencia a gentamicina, proporcionada por el gen *aacC1* (gentamicina acetiltransferasa); Cm^r a la resistencia a cloranfenicol, proporcionada por el gen *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa); Km^r a la resistencia a kanamicina, proporcionada por el gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa); Sm^r, a la resistencia a estreptomycin, proporcionada por el gen *aadA* (aminoglucósido-3'-adeniltransferasa); y Ap^r a la resistencia a ampicilina, proporcionada por el gen *bla* (β-lactamasa). Ω indica que el gen de resistencia está flanqueado por terminadores de la transcripción y traducción.

codifica para una proteína fluorescente (en este trabajo eYfp, amarillo; eCfp, cian; mCherry, rojo) (Figura 6) [215]. Esta inserción ocurre en una región intergénica neutra llamada *attTn7*, ubicada río abajo del gen de la glucosamina-6-fosfato sintetasa (*glmS*) [218], [219]. Las secuencias insertadas se mantienen estables durante el crecimiento sin requerir la presencia del antibiótico, y no interfieren con el desarrollo de las bacterias [215], [220], [221].

Con el objetivo de asegurar la detección diferencial de nuestras cepas de *Pseudomonas* respecto de otras bacterias nativas del mismo género presentes en las muestras, se combinó la utilización del medio selectivo S1 con la generación de variantes resistentes a antibióticos, mediante el sistema mini-Tn7. Con estas estrategias, en el presente capítulo planteamos:

- Analizar las resistencias naturales a antibióticos de nuestros aislamientos.

- Obtener las variantes modificadas de los aislamientos de *Pseudomonas* mediante el método ya descrito.
- Comprobar la correcta inserción del *cassette* y la expresión de la proteína fluorescente en cada caso.
- Reevaluar las actividades PGPR de las cepas marcadas para confirmar que no hayan ocurrido alteraciones fisiológicas importantes luego del marcaje.

Materiales y Métodos

2.1 Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y variedades de plantas

Para este trabajo de tesis se utilizaron 6 aislamientos provenientes de nuestra colección de *Pseudomonas*, y sus variantes marcadas (Tabla 2). *P. pergaminensis* 1008, presente en el biofertilizante comercial Rizofos® (Rizobacter Argentina S.A, RASA) utilizado en trigo, maíz y girasol [129], fue incluido en los experimentos como referencia. Todas las cepas se mantuvieron en glicerol 20% p/v a -80 °C, y se cultivaron rutinariamente en agar nutritivo (NA; 40 g/l de agar triptona de soja, 5 g/l de extracto de levadura, ambos de Biokar) o en caldo nutritivo (NYB, caldo nutritivo 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l, Biokar), a 200 rpm para los cultivos líquidos. La temperatura de incubación para las cepas de *Pseudomonas* fue de 28 °C, y para las cepas de *Escherichia coli* fue de 37 °C. El medio selectivo para *Pseudomonas* Gould's S1 [204] se utilizó para determinar específicamente la carga de bacterias recuperadas a partir de semillas sin desinfectar. Los medios se suplementaron con el antibiótico adecuado cuando fue necesario (gentamicina, Gm 20 µg/ml; kanamicina, Km 25 µg/ml; ampicilina, Ap 100 µg/ml; estreptomicina, Sm 100 µg/ml). El medio Gould's S1 fue suplementado, además, con cicloheximida (100 µg/ml) para inhibir el desarrollo de hongos y levaduras [72].

Para los ensayos en condiciones de invernáculo se utilizó el medio agar triptona de soja (TSA) diluido al 10%, para obtener el número de bacterias heterótrofas mesófilas totales. Este medio también fue suplementado con cicloheximida (100 µg/ml).

Los cultivos utilizados fueron maíz (*Zea mays* L.), con semillas pertenecientes a la variedad KM 8701 VIP3 y KM 87 VIP3 (KWS Argentina S.A); trigo (*Triticum aestivum* L.), variedad Baguette 550 y Baguette 620 (Nidera Argentina S.A, ciclo corto y ciclo intermedio, respectivamente); y soja (*Glycine max* L.), variedad 13-146 (Bioceres S.A) (Figura 7).

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo de tesis

Aislamientos de <i>Pseudomonas</i> salvajes			
Nombre	Afiliación taxonómica ^a	Origen	Referencia
RBAN4	<i>P. protegens</i> ^b	Rizósfera de pasturas, Ambiente Natural, Bengolea, Córdoba, Argentina	[145]
SMMP3	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	Suelo libre de raíces, de parcelas con soja, Monte Buey, Córdoba, Argentina	[145]
SPAN5	<i>P. chlororaphis</i>	Suelo libre de raíces, de parcelas con pasturas, Ambiente Natural, Pergamino, Buenos Aires, Argentina	[145], [222]
SVMP4	<i>P. soli</i>	Suelo libre de raíces, de parcelas con pasturas, Viale, Entre Ríos, Argentina	[145], [223]
SVBP6	<i>P. donghuensis</i>	Suelo libre de raíces, de parcelas con soja, Viale, Entre Ríos, Argentina	[145], [224]
RPAN1	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>piscium</i>	Rizósfera de pasturas, Ambiente Natural, Pergamino, Buenos Aires, Argentina	[145]
1008	<i>P. pergaminensis</i>	Rizósfera de trigo de una parcela productiva, Pergamino, Buenos Aires, Argentina	[129]
Variantes marcadas derivadas de los aislamientos de <i>Pseudomonas</i>			
Nombre		Características relevantes	Referencia
RBAN4- <i>yfp</i>		RBAN4:: <i>attTn7-eyfp</i> ; Km ^r Sm ^r	Esta tesis
SMMP3- <i>yfp</i>		SMMP3:: <i>attTn7-eyfp</i> ; Km ^r Sm ^r	Esta tesis
SPAN5- <i>cfp</i>		SPAN5:: <i>attTn7-ecfp</i> ; Km ^r Sm ^r	Esta tesis
SVMP4- <i>yfp</i>		SVMP4:: <i>attTn7-eyfp</i> ; Km ^r Sm ^r	Esta tesis
SVBP6- <i>mche</i>		SVBP6:: <i>attTn7-mcherry</i> ; Gm ^r	Esta tesis
RPAN1- <i>yfp</i>		RPAN1:: <i>attTn7-eyfp</i> ; Km ^r Sm ^r	Esta tesis
1008- <i>cfp</i>		1008:: <i>attTn7-ecfp</i> ; Km ^r Sm ^r	Esta tesis
Cepas de <i>Escherichia coli</i>			
SM10		<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu, λ <i>pir</i> , Km ^r	[225]
HB101		Derivada de <i>E. coli</i> K12. F ⁻ Pro ⁻ Gal ⁻ Rec ⁻ Sm ^r	[226]
DH5 α		Derivada de <i>E. coli</i> K12. F ⁻ <i>recA1</i> ⁻ <i>endA1</i> ⁻ <i>lacZ</i> Δ M15	[227]
MT102		Derivada de <i>E. coli</i> K-12 cepa MC1000. <i>araD139 (ara-leu)7697 Δlac thi hsdR</i> , Sm ^r Rif ^r Azide ^r	[228]
Plásmidos			
pUX-BF13		Plásmido <i>helper</i> para la mutagénesis basada en el transposón Tn7, contiene las funciones de transposición; R6K-replicon; <i>mob</i> ⁺ ; Ap ^r	[229]
pME497		Plásmido mobilizable, IncP-1, Tra; RepA(Ts); Ap ^r	[230]
pME9407		Plásmido de <i>delivery</i> para mini-Tn7- <i>mcherry</i> ; pME3280a con <i>mcherry</i> bajo el promotor P _{lac} ; Ap ^r Gm ^r	[216]

miniTn7(Km, Sm) $P_{A1/04/03}$ - <i>ecfp</i> -a	Plásmido de delivery para mini-Tn7- <i>ecfp</i> ; derivado de pUC19 con <i>ecfp</i> bajo promotor constitutivo (derivado de P_{lac}). No replicativo en <i>Pseudomonas</i> . Cm ^r Km ^r Sm ^r	[215]
miniTn7(Km, Sm) $P_{A1/04/03}$ - <i>eyfp</i> -a	Plásmido de delivery para mini-Tn7- <i>eyfp</i> ; derivado de pUC19 con <i>eyfp</i> bajo promotor constitutivo (derivado de P_{lac}). No replicativo en <i>Pseudomonas</i> . Cm ^r Km ^r Sm ^r	[215]

^a Para SVBP6, RBAN4, SMMP3 y 1008, la afiliación taxonómica se realizó por filogenómica. Para SVMPP4 la afiliación se llevó a cabo con fragmentos de los genes *rpoD*, *pepN* and *gltX* [223], y para SPAN5 y RPAN1, se realizó con marcadores taxonómicos (16S rDNA, y los genes *oprF* y *rpoB* [145]).

^b La afiliación taxonómica fue recientemente corregida con un ANI, con el genoma secuenciado (no publicado).

2.2 Marcaje cromosomal de los aislamientos seleccionados

Se realizó el marcaje genético de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. con proteínas fluorescentes (eYfp, eCfp y mCherry) y genes de resistencia a antibióticos, mediante el sistema de transposición mini-Tn7 [215]. En primer lugar, se ensayaron las resistencias naturales a antibióticos de los 6 aislamientos de *Pseudomonas* y de la cepa de referencia 1008, contemplando las resistencias presentes en los *cassettes* mini-Tn7 disponibles en nuestro laboratorio. Para ello se realizaron agotamientos por estría en placas de NA, suplementadas con los antibióticos kanamicina, gentamicina o cloranfenicol (Cm) en las concentraciones correspondientes reportadas para *Pseudomonas* (25 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml, respectivamente). Para los aislamientos SVBP6, RPAN1 y 1008 que crecieron en Gm¹⁰, se ensayó además Gm²⁰. Las placas se incubaron por 24-48 hs.

Para llevar a cabo la conjugación tetraparental, cultivos líquidos de los aislamientos objetivo de *Pseudomonas* spp. se incubaron *overnight* (o.n.) a 35 °C, temperatura a la cual aumenta significativamente la eficiencia de incorporación de ADN heterólogo por reducción de la actividad de los sistemas de restricción, según lo descrito para *P. protegens* CHA0 [231]. *E. coli* SM10 λ pir/pUX-BF13, *E. coli* HB101/pME497 y la cepa dadora que contiene el vector de *delivery* de *eyfp*, *ecfp* (*E. coli* MT102) o *mcherry* (*E. coli* DH5- α), se incubaron a 37 °C. Luego de lavar 1,5 ml de cada cultivo y resuspender los *pellets* en 300 µl de NYB, las cuatro cepas se combinaron en un único tubo, se centrifugó y finalmente se resuspendió el *pellet* en 50 µl de NYB. La mezcla de conjugación se transfirió al borde de una placa de NA y se incubó durante 4 h a 37 °C,



Figura 7. Semillas de las variedades de los cultivos utilizados en este trabajo de tesis. **a)** De izquierda a derecha se muestran en ambos paneles una semilla de trigo variedad Baguette 550, una semilla de soja 13-146 y una semilla de maíz KM 8701 VIP3. **b)** Las mismas semillas se observaron bajo una lupa, con un aumento de 4× (las imágenes que aquí se presentan no están a escala). Las morfologías y los tamaños de las variedades de trigo Baguette 620 y de maíz KM 87 VIP3 (no mostradas) son muy similares a las variedades que se observan en la imagen.

temperatura no permisiva para el crecimiento de la mayoría de las *Pseudomonas* (diferentes de *P. aeruginosa*), pero sí para *E. coli*. Como solo *E. coli* es capaz de crecer y replicar eficientemente a esta temperatura, aumentan las posibilidades de conjugación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se resuspendieron en 1 ml de NYB y se sembraron 100 µl en placas de medio mínimo M9 [232] con citrato al 0,2% p/v como fuente de carbono, suplementadas con el antibiótico del *cassette* mini-Tn7 [215], [233]. A modo de control negativo se estió cada cepa salvaje empleada en la conjugación en dicho medio. Luego de una incubación a 28 °C durante 48 h, se repicaron 3 o 4 colonias de cada aislamiento de *Pseudomonas* en una nueva placa de Gould's S1 con el antibiótico correspondiente. Se prepararon lisados de cada una de las colonias transconjugantes por incubación a 100 °C durante 10 minutos, y luego se recuperó el sobrenadante, el cual se empleó como molde para las reacciones de PCR posteriores.

2.2.1 Verificación del sitio de inserción del *cassette*

Para verificar la correcta inserción del *cassette* mini-Tn7 en el genoma de los aislamientos, se realizó una PCR con los *primers* específicos Tn7R109 y Tn7-*glmS* [215] (Tabla 3), empleando como molde los lisados de cada una de las colonias seleccionadas luego de la conjugación. Como control negativo se utilizó un lisado de cada aislamiento

salvaje, sin marcar, y como control positivo un lisado de la bacteria *P. protegens* ARQ1, que contiene el *cassette* GFP-Km en el sitio *attTn7* [234]. Las reacciones, con un volumen final de 20 µl, contenían las siguientes concentraciones finales: 1× buffer de reacción (con Mg⁺² 1,5 mM, EasyTaq®, TransGen Biotech Co., China), 0,2 mM de dNTPs (PB-L, Argentina), 0,8 µM de oligonucleótidos (Invitrogen, EE.UU.), 1U de Taq polimerasa (EasyTaq®, TransGen Biotech Co., China) y 1 µl de lisado celular como molde. El ciclado incluyó una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de: 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 30 segundos a 53 °C (hibridación), y 30 segundos a 72 °C (elongación). Por último, se llevó a cabo una elongación final a 72 °C durante 5 minutos. Una vez finalizada la amplificación, 10 µl de cada tubo de reacción se corrieron en un gel de agarosa 1,2% p/v en 0,5× de TBE (Tris-Borato-EDTA), a 80 V durante 45 minutos, para comprobar la efectividad de la reacción de PCR. El tamaño de los amplicones, de alrededor de 150 pb, se corroboró utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L, Argentina). Por último, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV para observar la presencia/ausencia de las bandas de ADN.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para verificar la correcta inserción del *cassette* mini-Tn7
Características de los *primers*

Nombre del <i>primer</i>	Tn7R109	Tn7- <i>glmS</i>
Secuencia (5'→3')	CAGCATAACTGGACTGATTTCAG	AATCTGGCCAAGTCGGTGAC
Sitio de hibridación	Nucleótido 109 de la secuencia Tn7R ^a	Nucleótido 310 desde el sitio de inicio del gen <i>glmS</i> ^b
Temperatura de <i>melting</i> (°C)	57,4	58,9

^a Tn7R descrita en [235].

^b La secuencia utilizada fue elegida a partir del alineamiento de las secuencias *glmS* de *P. syringae* pv. *tomato* (gnl|TIGR_323|psyring_3888), *P. putida* KT2440 (gnl|TIGR|pputida_10722), *P. fluorescens* DR54 (AJ276127), *P. aeruginosa* (AE004681) y *Haemophilus influenzae* Rd (U32726) [215].

2.2.2 Verificación de la expresión de las proteínas fluorescentes por microscopía

La expresión de las distintas proteínas fluorescentes incorporadas tras el marcaje por conjugación tetraparental se evidenció utilizando el módulo de microscopía del equipo Cytation 5 (BioTek, Agilent®). Las imágenes se registraron con el objetivo de 20×, utilizando los filtros para Yfp, Cfp y Rfp, este último para visualizar mCherry. Las

longitudes de onda de excitación y emisión para Yfp fueron 500 nm y 542 nm; para Cfp 445 nm y 510 nm; y para Rfp 531 nm y 593 nm, respectivamente.

2.2.3 Estabilidad de la inserción cromosomal

Con el objetivo de corroborar que la inserción cromosomal del *cassette* fuese estable sin la presión de selección, las variantes marcadas se repicaron diariamente durante 5 días en medio NYB sin suplementar con el antibiótico del *cassette* [229]. Luego de los repiques, se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en solución salina (SS, NaCl al 0,85% p/v) y se sembraron 20 µl, por triplicado, en placas de agar NA y NA suplementado con Km²⁵ o Gm²⁰, según corresponda. Las mismas se incubaron 24 hs a 28 °C, se realizaron los conteos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y compararon los valores obtenidos en ambas condiciones.

2.3 Curvas de crecimiento de las variantes marcadas

Se realizaron y compararon las curvas de crecimiento en medio mínimo M9-glucosa (20 mM) y M9-trehalosa (10 mM) de los aislamientos salvajes y sus variantes generadas por conjugación en placas de 96 pocillos, con el fin de asegurar que el crecimiento no fue afectado por la inserción del *cassette*. A partir de cultivos *overnight* de cada una de las cepas se obtuvo una suspensión de densidad óptica (DO₆₀₀ o DO) de 1,0 en SS, para finalmente sembrar la placa con una DO de 0,1; utilizando un volumen final de 200 µl por pocillo. La placa se incubó a 28 °C y a 200 rpm. Para obtener las curvas de crecimiento se midió la DO a 600 nm cada 1 hora, con el equipo Cytation 5 (BioTek, Agilent®) durante 24 horas. El objetivo de evaluar el crecimiento de las cepas con trehalosa como única fuente de carbono fue conocer si ésta era metabolizada por alguno de los aislamientos y, en caso contrario, emplearla como osmoprotector en los posteriores ensayos con semillas [168].

2.4 Verificación de las actividades PGPR de las variantes marcadas

Se corroboró que las principales actividades PGPR, que los aislamientos salvajes habían demostrado *in vitro*, no se hayan visto afectadas en las variantes por la inserción del *cassette* [145]. Se realizaron ensayos de producción de HCN, producción de

proteasas extracelulares, producción de fosfolipasas, solubilización de fosfatos inorgánicos y antagonismo de hongos fitopatógenos en placa. Para ello, las variantes marcadas y los aislamientos salvajes se crecieron *overnight* en 5 ml de medio NYB, con el antibiótico correspondiente, a 28 °C y 200 rpm. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones celulares en SS normalizadas a $DO_{600} = 1,0$. Como control positivo y negativo se utilizaron las cepas *P. protegens* CHA0 y CHA89 [236], respectivamente, excepto para las actividades de solubilización de fosfatos inorgánicos y antagonismo de hongos. Los resultados de las variantes marcadas se compararon con los de los aislamientos salvajes.

2.4.1 Producción de ácido cianhídrico

Cada uno de los aislamientos salvajes y sus variantes se estriaron individualmente por agotamiento en placas de medio NA. Luego, se depositaron en las tapas trozos de papel de filtro de aproximadamente 1 cm², embebidos en una solución de ácido pícrico 0,5% p/v en Na₂CO₃ 2,5% p/v [237]. Las placas se sellaron con Parafilm® y se dejaron incubar durante 48 hs a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se analizó el cambio de color del papel de filtro de amarillo a naranja, generado por la formación de un complejo entre el ácido pícrico y el HCN producido por las cepas analizadas.

2.4.2 Actividad proteolítica extracelular

Las suspensiones celulares normalizadas se sembraron por gota (10 µl) en placas de agar leche (0,5 g de extracto de levadura, 4,0 g de agar base sangre, ambos de Biokar, 15% v/v de leche descremada libre de grasa) [113]. Las placas fueron incubadas durante 48 hs a 28 °C, para finalmente observar la ausencia o presencia de halos de diámetro similar entre la cepa salvaje y su variante marcada, generados por la hidrólisis de la caseína.

2.4.3 Actividad fosfolipasa

Se sembraron gotas de 10 µl de las suspensiones normalizadas en placas de agar yema de huevo (0,5 g de extracto de levadura, 4,0 g de agar base sangre, ambos de Biokar, y 10% v/v de una emulsión de yema de huevo 1:1 en SS) [113]. Las placas fueron

incubadas durante 48 hs a 28 °C, para comprobar la presencia o ausencia de halos de diámetro similar entre la versión salvaje y la marcada, generados por hidrólisis de los fosfolípidos.

2.4.4 Solubilización de fosfatos

Para analizar la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico, se sembraron gotas de 10 µl de las suspensiones en placas de medio NBRIP suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de fósforo [238], [239]. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 28 °C. Se compararon los halos de solubilización generados por las variantes y el aislamiento salvaje.

2.4.5 Antagonismo de hongos fitopatógenos

Se comprobó la capacidad inhibitoria de hongos fitopatógenos de los aislamientos salvajes y sus variantes marcadas en placa, seleccionando un aislamiento fúngico de los ya reportados para el cual estas cepas presentan antagonismo [145]. Para los aislamientos SPAN5, SVMP4 y RBAN4 se utilizó el patógeno *Macrophomina phaseolina* 131.2010, aislado a partir de plantas de maíz, mientras que para RPAN1 y SMMP3 se utilizó el aislamiento de *Fusarium oxysporum* 119.2010, obtenido de plantas de soja. El aislamiento SVBP6 se enfrentó al fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, aislado de plantas de girasol. Los aislamientos de *Macrophomina* y *Fusarium* fueron obtenidos y caracterizados por el grupo de fitopatología del Dr. Carmona de la Facultad de Agronomía de la UBA, mientras que *Sclerotinia* fue cedido por la Dra. Fernández de la Universidad Nacional del Sur. En placas de Agar Papa Glucosado (PDA) se depositó en el centro un taco de agar de alrededor de 1 cm², conteniendo micelio fúngico fresco del hongo correspondiente para cada cepa. Seguidamente se estrió cada aislamiento salvaje y sus variantes a ambos lados del taco de agar y se incubó a 28 °C durante 72-96 hs para *Macrophomina* y durante 10 días para *Fusarium*. Para *Sclerotinia* la incubación se realizó a 22 °C durante 5 días. A modo de control se utilizó una placa de PDA conteniendo únicamente el micelio, asegurando de que éste alcance el crecimiento máximo ocupando todo el espacio de la placa, durante los tiempos de incubación antes

mencionados. Finalmente, se evaluó cualitativamente el efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos y se comparó con sus versiones marcadas.

2.5 Análisis estadísticos

Para comprobar la estabilidad de la inserción cromosomal del *cassette* mini-Tn7, los datos de UFC/ml se transformaron con la fórmula $\log_{10}(x)$, donde x es el valor de UFC correspondiente, y se analizaron con el test estadístico t-test usando el programa GraphPad Prism V. 8.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU., www.graphpad.com). Los valores de $p < 0,05$ fueron aceptados como significativos. Con el objetivo de comparar las velocidades específicas de crecimiento del aislamiento salvaje y su variante marcada, se llevó a cabo un análisis de la covarianza (ANCOVA), con un $p < 0,05$; utilizando el software antes mencionado.

Resultados

2.6 Generación de variantes marcadas con proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos

2.6.1 Evaluación de las resistencias naturales a antibióticos

Se ensayaron las resistencias naturales de nuestros 6 aislamientos de *Pseudomonas*, y de la cepa de referencia *P. pergaminensis* 1008, con el objetivo de elegir correctamente el *cassette* Tn7 a utilizar para cada cepa (Tabla 4) [215]. Los controles consistieron en las cepas AKN86 (*E. coli* MT102 con el plásmido mini-Tn7-*eyfp*), DH5- α /pME9407 y la cepa *helper* HB101/pME497, como control negativo (Tabla 2).

Tabla 4. Resistencias naturales a antibióticos de los aislamientos de *Pseudomonas*^a

	Aislamientos									
	RBAN4	SMMP3	SPAN5	SVMP4	SVBP6	RPAN1	1008	AKN86	DH5- α /pME9407	HB101/pME497
Km²⁵	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X
Cm²⁰	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
Gm¹⁰	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	X	✓	X
Gm²⁰	-	-	-	-	X	✓	X	X	✓	X

^a Los ✓ representan resistencia al antibiótico y, por ende, crecimiento; las X indican sensibilidad. Los guiones indican no ensayado.

Todos los aislamientos evaluados fueron sensibles a Km²⁵ y resistentes a Gm¹⁰ (excepto 1008, que no fue ensayado a esa concentración). Dado que esto último podría estar relacionado con la concentración de gentamicina en el experimento, se evaluó también una concentración mayor del antibiótico (20 μ g/ml) para algunos de los aislamientos, resultando SVBP6 y 1008 sensibles a esta concentración. Por último, los aislamientos ensayados mostraron resistencia a Cm²⁰.

2.6.2 Marcaje cromosomal y verificación del sitio de inserción del *cassette*

Con los resultados anteriores, se decidió marcar los aislamientos RBAN4, SMMP3, SVMP4, RPAN1 con el vector mini-Tn7-*eyfp*, y los aislamientos SPAN5 y 1008 con el vector mini-Tn7-*ecfp*. SVBP6 se marcó con el vector mini-Tn7-*mcherry* (Tabla 2).

Luego de la conjugación, se comprobó la correcta inserción del *cassette* mini-Tn7 por PCR. Lograron obtenerse fragmentos del tamaño esperado, de alrededor de 150 pb, en los 6 aislamientos seleccionados y en la cepa de referencia 1008. En la Figura 8 se muestran dos electroforesis de cada set de colonias transconjugantes obtenidas de los aislamientos RPAN1 y SVMP4. Particularmente, para este último aislamiento es posible observar que la variante nro. 5 (SVMP4#5) no dio un resultado positivo para la inserción, por lo cual fue descartada para los ensayos posteriores.

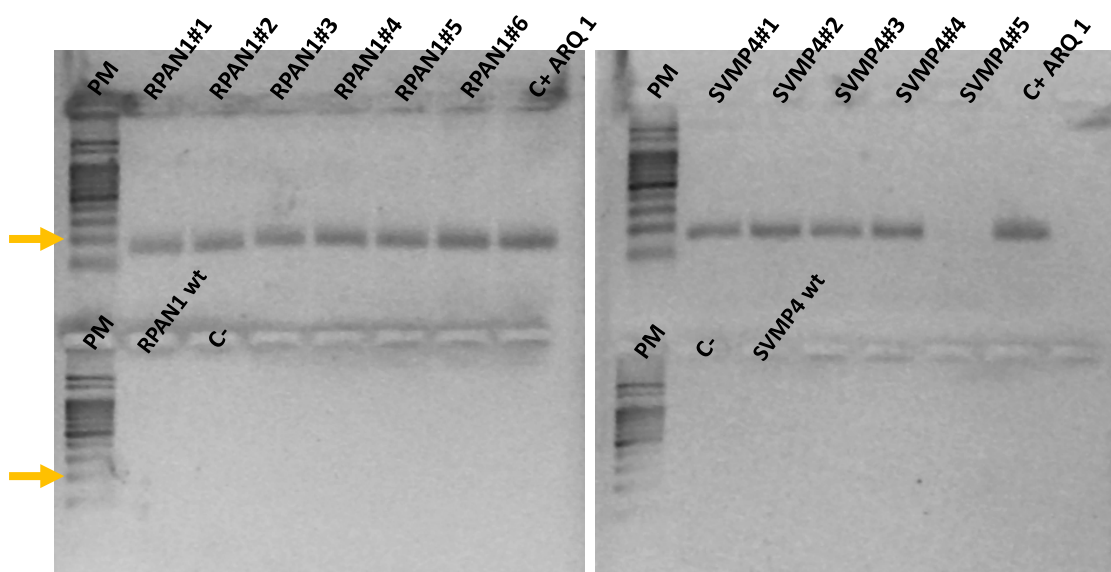


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1,2% p/v de las reacciones de PCR con los oligonucleótidos Tn7R109 y Tn7-*glmS*. Se muestran a modo de ejemplo las electroforesis de los aislamientos RPAN1 (izquierda) y SVMP4 (derecha). Los distintos clones obtenidos se indican con # seguido de un número identificador. Las calles correspondientes al marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L) se indican como PM, y las flechas naranjas indican la banda de 200 pb. Se utilizó la cepa ARQ1 como control positivo (C+) [234], y el aislamiento salvaje (wt) correspondiente como control negativo de la PCR. La calle C-, corresponde a la mezcla de reacción sin molde.

2.6.3 Verificación de la expresión de las proteínas fluorescentes por microscopía

Las variantes marcadas que dieron positivo en la reacción de PCR se observaron con el módulo de microscopía del equipo Cytation 5 (BioTek, Agilent®). Todas mostraron fluorescencia con los filtros adecuados, lo cual se condice con la correcta inserción y expresión del *cassette* mini-Tn7. Algunas de las imágenes adquiridas se muestran en la Figura 9. A modo de control negativo, se registraron también imágenes de los aislamientos salvajes con los mismos filtros.

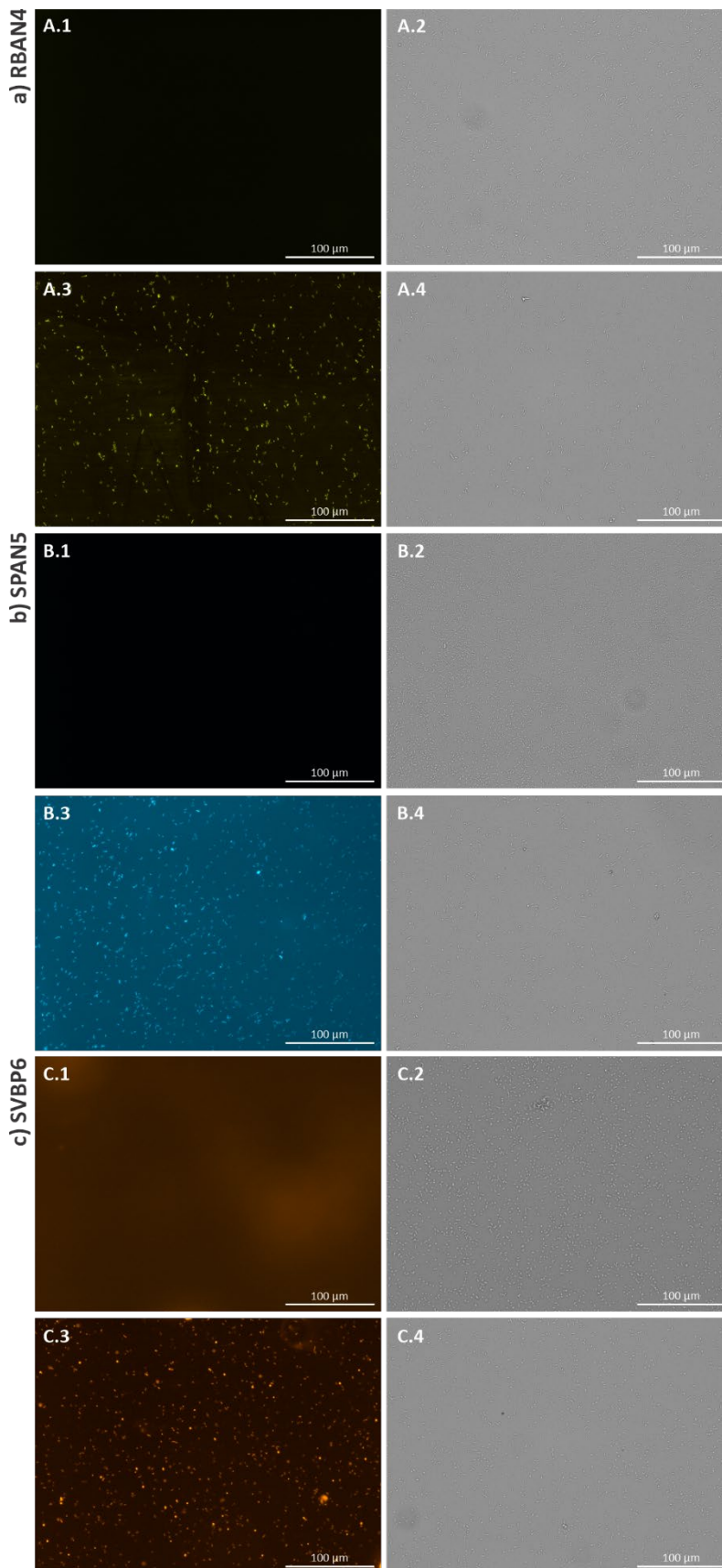


Figura 9. Imágenes tomadas con el equipo Cytation 5 (BioTek, Agilent®), con el objetivo de 20x. La columna de la izquierda corresponde a la microscopía de fluorescencia (i-iii) y la columna de la derecha a la microscopía de luz transmitida (ii-iv). A modo de ejemplo se muestra **a) 1-2** el aislamiento RBAN4 salvaje y **a) 3-4** su variante marcada con *eyfp*; **b) 1-2** el aislamiento SPAN5 salvaje y **b) 3-4** su variante marcada con *ecfp*, y **c) 1-2** el aislamiento SBVP6 salvaje y **c) 3-4** su variante marcada con *mcherry*. La escala está indicada con las barras blancas, y corresponde a 100 μm.

2.6.4 Estabilidad de la inserción cromosomal

Si bien el *cassette* mini-Tn7 se inserta en un sitio único en el cromosoma de *Pseudomonas*, se comprobó que dicha inserción fuese estable, es decir, que no se pierda en ausencia de la presión de selección del antibiótico. Para ello, se realizaron 5 repiques diarios en medio NYB sin antibiótico, y luego se sembró en placas de NA en presencia y ausencia del antibiótico correspondiente. De esta forma, si durante los repiques se produjera la escisión del *cassette*, se observaría una disminución en los recuentos en medio NA con antibiótico, lo cual se traduce en una reducción de la cantidad de bacterias resistentes al antibiótico codificado en el mini-Tn7. Las UFC/ml obtenidas para ambas condiciones se muestran en la Tabla 5, donde se observa que todas las variantes marcadas mostraron una estabilidad superior al 98%, sin diferencias significativas entre los recuentos con y sin antibiótico. En este caso solo se presentan los clones seleccionados con los que continuamos los ensayos posteriores. Estos resultados aseguran que los posteriores recuentos selectivos a partir de semillas inoculadas o raíces colonizadas con las variantes marcadas expresen la carga de células viables cultivables, luego de diferentes tiempos de incubación.

Tabla 5. Estabilidad del transposón en ausencia de la presión de selección del antibiótico

	log (UFC/ml) $\pm$ SD		% de Estabilidad
	Sin antibiótico	Con antibiótico	
RBAN4- <i>yfp</i>	9,11 $\pm$ 0,02	9,09 $\pm$ 0,03	99,78
RPAN1- <i>yfp</i>	8,90 $\pm$ 0,22	8,79 $\pm$ 0,12	98,76
SMMP3- <i>yfp</i>	9,15 $\pm$ 0,07	9,09 $\pm$ 0,10	99,34
SPAN5- <i>cfp</i>	8,63 $\pm$ 0,1	8,72 $\pm$ 0,11	100
SVMP4- <i>yfp</i>	8,62 $\pm$ 0,15	8,55 $\pm$ 0,15	99,19
SVBP6- <i>mche</i>	6,67 $\pm$ 0,14	6,87 $\pm$ 0,08	100
1008- <i>cfp</i>	6,52 $\pm$ 0,22	6,53 $\pm$ 0,30	100

No se observaron diferencias significativas con t-test, $p < 0,05$.

2.7 Curvas de crecimiento en medio mínimo

Los aislamientos salvajes y sus respectivas variantes marcadas no presentaron diferencias significativas en el crecimiento en los medios ensayados M9-glucosa y M9-trehalosa (Figura 10). Consecuentemente, se observó que los valores de velocidad de crecimiento (μ) para cada aislamiento salvaje y su variante marcada no fueron significativamente diferentes (Tabla 6).

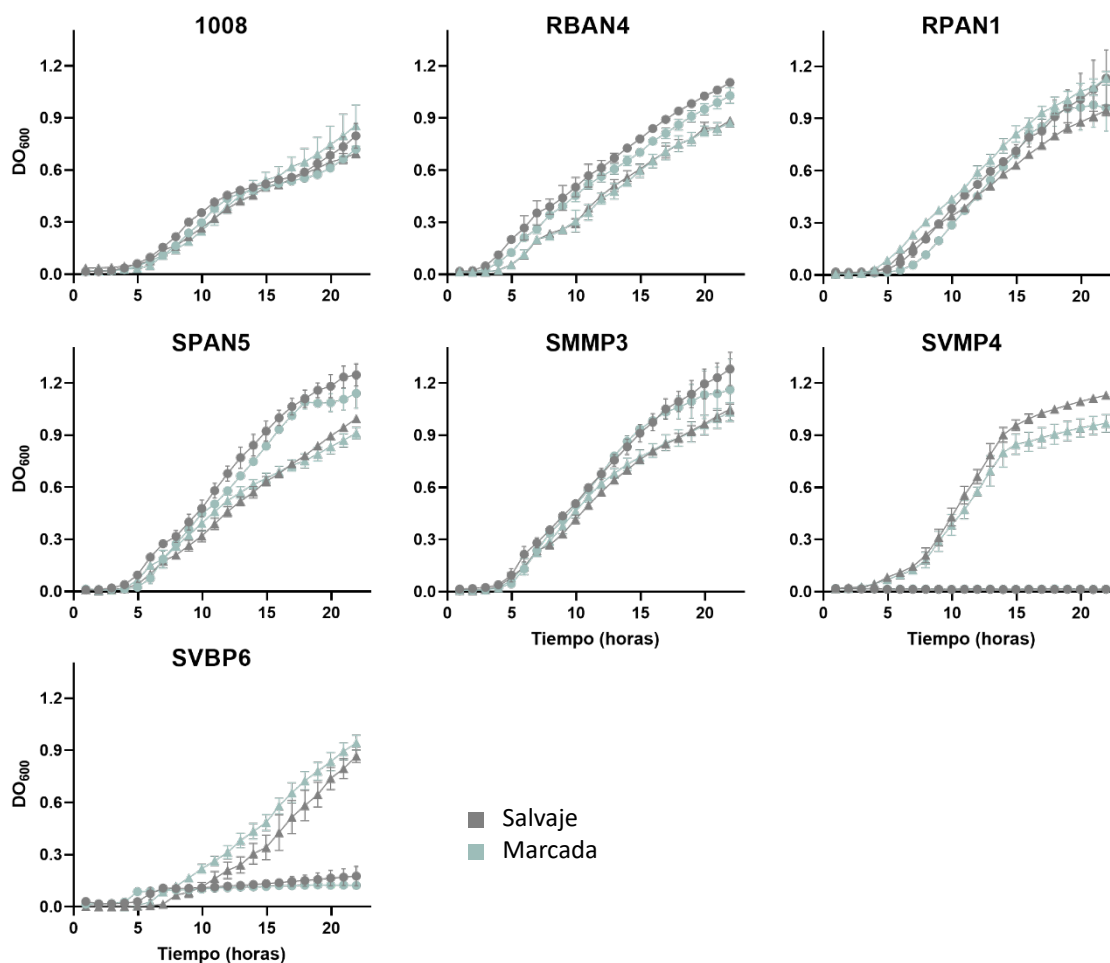


Figura 10. Curvas de crecimiento de los aislamientos salvajes (■) y sus variantes marcadas (▴) correspondientes en medio mínimo M9 suplementado con 20 mM de glucosa (triángulos) o 10 mM de trehalosa (círculos). El crecimiento fue monitoreado en el lector de placas Cytation 5 (BioTek, Agilent®; 200 μ l de cultivo en placas de 96 pocillos, 200 rpm y 28 °C) y los datos mostrados corresponden al promedio y el desvío estándar de $n = 3$ réplicas por cepa.

Únicamente los aislamientos SVBP6 y SVMP4 no fueron capaces de utilizar la trehalosa como fuente de carbono; por lo tanto, este disacárido podría ser utilizado exclusivamente como osmoprotector por estos aislamientos, manteniendo la integridad de la membrana y de las proteínas [240].

2.8 Verificación de las actividades PGPR de las variantes marcadas

El marcaje cromosomal con el transposón mini-Tn7 no debería generar efectos en el entorno genético de las variantes marcadas, ya que la inserción ocurre en un sitio neutral del genoma bacteriano. Aun así, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para

comprobar que las diferentes propiedades PGP de los aislamientos reportadas previamente [145], no se hayan visto modificadas por la inserción del *cassette*.

Tabla 6. Velocidades específicas de crecimiento para cada aislamiento en medio mínimo M9, con glucosa o trehalosa como única fuente de carbono

$\mu \text{ (h}^{-1}) \pm \text{SEM}$				
M9-glucosa			M9-trehalosa	
	Aislamiento	Variante marcada	Aislamiento	Variante marcada
RBAN4	0,146 $\pm$ 0,007	0,144 $\pm$ 0,008	0,105 $\pm$ 0,01	0,108 $\pm$ 0,006
RPAN1	0,131 $\pm$ 0,004	0,131 $\pm$ 0,005	0,206 $\pm$ 0,012	0,225 $\pm$ 0,011
SMMP3	0,177 $\pm$ 0,008	0,170 $\pm$ 0,013	0,116 $\pm$ 0,007	0,128 $\pm$ 0,005
SPAN5	0,124 $\pm$ 0,008	0,100 $\pm$ 0,01	0,153 $\pm$ 0,008	0,153 $\pm$ 0,006
SVMP4	0,264 $\pm$ 0,020	0,259 $\pm$ 0,023	-	-
SVBP6	0,215 $\pm$ 0,027	0,177 $\pm$ 0,011	-	-
1008	0,210 $\pm$ 0,011	0,235 $\pm$ 0,015	0,214 $\pm$ 0,014	0,242 $\pm$ 0,014

No se observaron diferencias significativas con un análisis de covarianza (ANCOVA), $p < 0,05$. Los guiones indican ausencia de crecimiento.

2.8.1 Producción de exoproteasas, fosfolipasas, producción de HCN y solubilización de fosfatos

Las nuevas variantes no mostraron diferencias respecto de sus aislamientos salvajes en cuanto a las actividades ensayadas, lo cual se resume en la Figura 11. Los halos generados como consecuencia de la hidrólisis de la caseína y de fosfolípidos, y por la solubilización de fosfatos por parte de las versiones marcadas, fueron muy similares a los de las cepas salvajes, así como también el viraje de color de amarillo a naranja que evidencia la producción de HCN. Particularmente en los ensayos de hidrólisis de fosfolípidos, se observa para el aislamiento SVMP4 y el control positivo CHA0 un halo translúcido y otro opaco, que no está presente en el resto de las cepas. Esta diferencia puede adjudicarse a la producción de la fosfolipasa C, que genera halos opacos, y fosfolipasa A que genera halos translúcidos [113]. Cabe destacar que el control negativo CHA89 para este ensayo, produce únicamente la fosfolipasa A. Esta misma cepa no fue utilizada como control negativo en la solubilización de fosfatos ya que esta actividad no se encuentra regulada por la cascada Gac-Rsm [241].

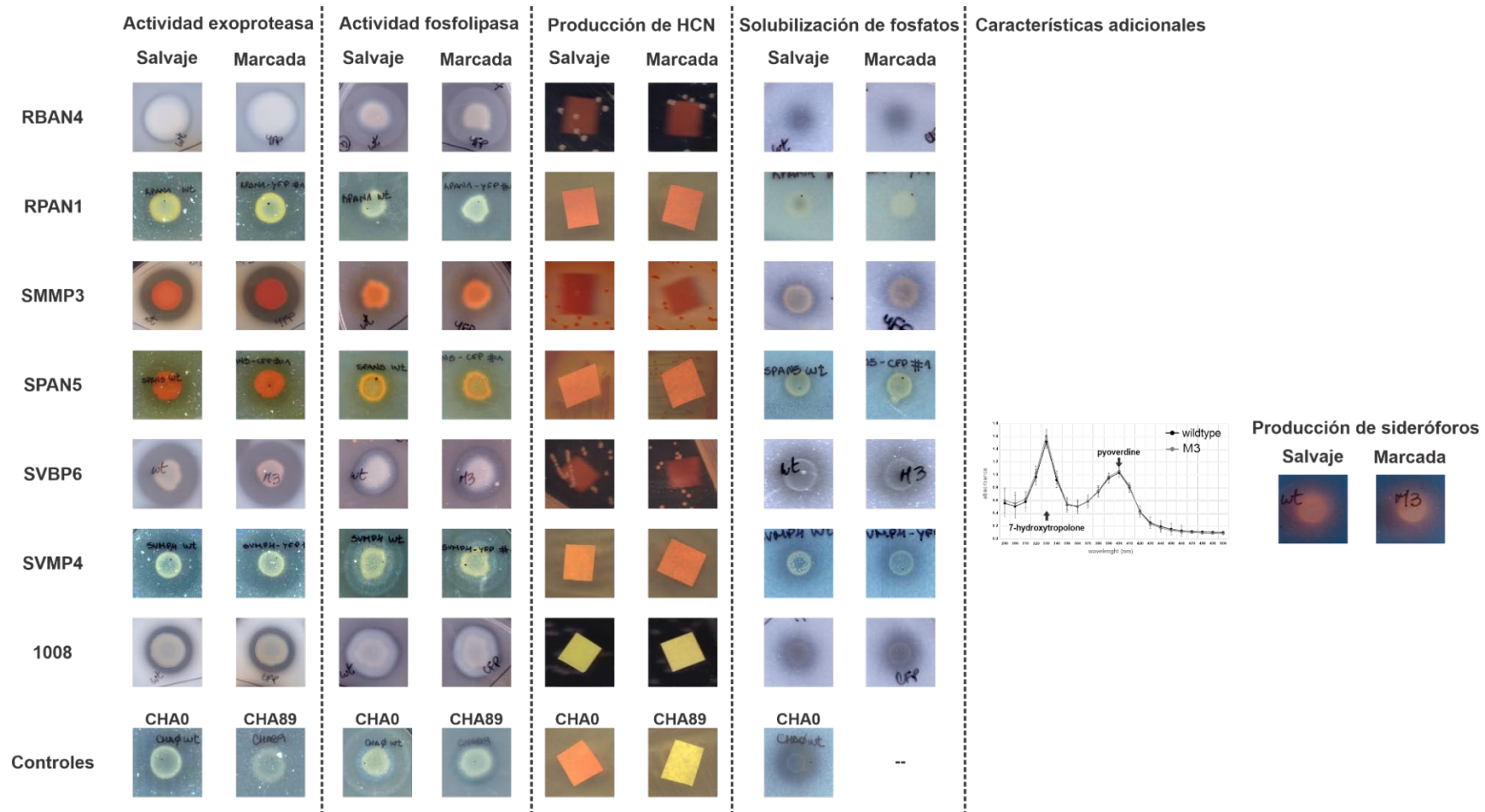


Figura 11. Evaluación de las actividades PGPM *in vitro* para comprobar la neutralidad de la inserción cromosomal del *cassette* mini-Tn7 en los aislamientos de *Pseudomonas*. Todas las actividades se evaluaron luego de 48 hs de incubación a 28 °C, excepto para el ensayo solubilización de fosfatos que se incubó durante 7 días. Para SVBP6, también se evaluó la producción de sideróforos y de 7-hidroxitropolona, en agar CAS [242] y por espectrometría UV-visible a partir de sobrenadantes de cultivo de medio King's B [111], respectivamente. Los guiones indican no ensayado. Como controles se emplearon las cepas *P. protegens* CHA0 y su cepa deficiente en el sistema Gac-Rsm, CHA89 [243], [244].

2.8.2 Antagonismo de hongos fitopatógenos

Si bien todos los aislamientos ensayados antagonizan el crecimiento de una variedad de hongos fitopatógenos [145], exceptuando la cepa de referencia *P. pergaminensis* 1008, se seleccionó un solo patógeno fúngico para chequear que las actividades relacionadas al antagonismo no se hayan afectado por la inserción del *cassette*. Al enfrentar las versiones marcadas de los aislamientos con los patógenos *M. phaseolina* 131.2010, *F. oxysporum* 119.2010 y *S. sclerotiorum*, no se detectaron diferencias significativas respecto de los aislamientos salvajes (Figura 12).

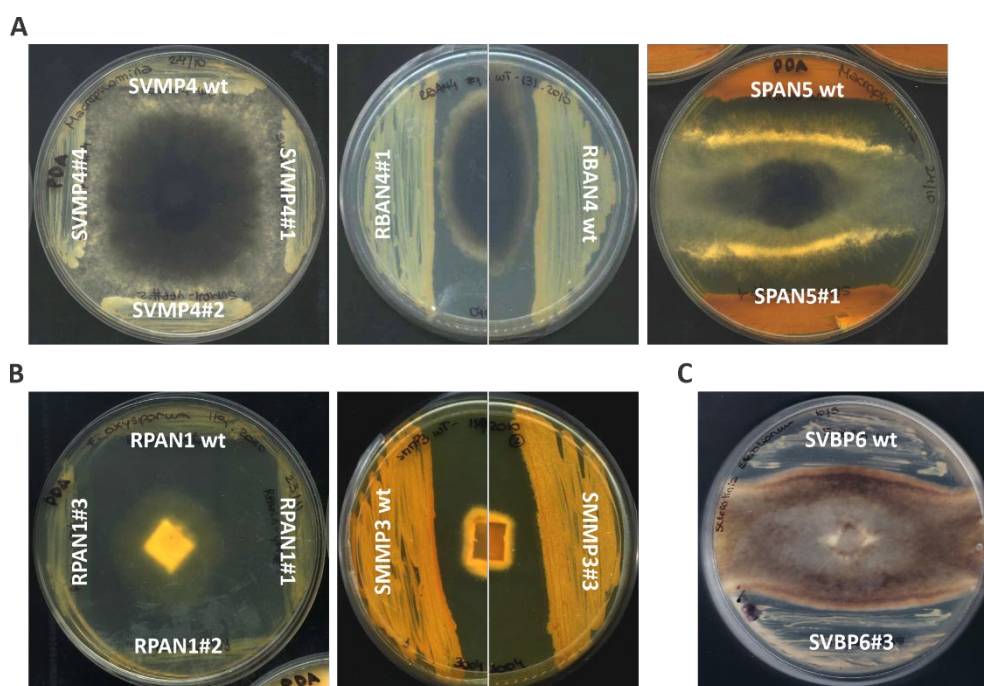


Figura 12. Comprobación del antagonismo de hongos fitopatógenos en placas de PDA, por los aislamientos salvajes (wt) y sus versiones marcadas con el *cassette* mini-Tn7: **a)** *M. phaseolina* 131.2010, luego de 72 hs de incubación a 28 °C; **b)** *F. oxysporum* 119.2010, luego de 10 días de incubación a 28 °C; y **c)** *S. sclerotiorum*, luego de 5 días de incubación a 22 °C. En todos los casos la placa control que contenía únicamente micelio fúngico presentó un crecimiento máximo, cubriendo toda la superficie de la placa al cabo de los tiempos de incubación mencionados (no mostrado). Para SVMP4 y RPAN1 se testearon varios clones obtenidos por conjugación, que se indican con # seguido de un número identificador.

2.8.3 Los casos particulares de 1008 y SVBP6

Aunque las actividades PGPR de las variantes marcadas presentadas hasta aquí no mostraron diferencias con los aislamientos salvajes, se detectó un comportamiento anómalo en dos de los aislamientos ensayados durante el desarrollo de esta tesis. Tanto la cepa 1008 como nuestro aislamiento SVBP6, que inicialmente fueron marcados con

el *cassette* mini-Tn7-*eyfp*, demostraron variaciones en ciertas propiedades evaluadas. Durante la realización de las curvas de crecimiento en M9-glucosa y M9-trehalosa, la variante 1008-*yfp* no fue capaz de utilizar la trehalosa como fuente de carbono y energía, a diferencia de la cepa salvaje (no mostrado). Asimismo, la variante SVBP6-*yfp* vio disminuida su capacidad de producir 7-hidroxitropolona, uno de sus metabolitos principales involucrados en el antagonismo de hongos fitopatógenos [111], en comparación con el aislamiento original (no mostrado). Ambos aislamientos se marcaron nuevamente, verificando en particular las actividades anteriormente mencionadas. Sin embargo, no fue posible repetir algunos de los ensayos con semillas debido al avance de la tesis en el momento en que se detectó este comportamiento, sumado a la falta de disponibilidad de la variedad de semilla utilizada. Por lo tanto, se mencionará oportunamente cuando los resultados mostrados correspondan a experimentos realizados con estas variantes.

Discusión

En este capítulo, en primera instancia, evaluamos las resistencias intrínsecas de cada cepa a los antibióticos seleccionados, y encontramos que nuestros aislamientos fueron resistentes a Cm²⁰. La resistencia a cloranfenicol es bastante común dentro del género *Pseudomonas*, mientras que la resistencia a kanamicina es menos prevalente [245], [246]. Posteriormente, se comprobó la correcta inserción del transposón y la expresión de la proteína fluorescente (Figuras 8 y 9), demostrando la marcación exitosa de nuestros aislamientos con el sistema mini-Tn7. Esta herramienta se ha utilizado en distintas especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* PAO1 [217], *P. fluorescens* DR54 [220], *P. putida* KT2440 [215], *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 [247], *P. protegens* Pf-5 X940 [95], así como también en *P. protegens* CHA0 y su mutante *gacS* [64], [234]. Adicionalmente, la integración estable del transposón en el cromosoma bacteriano supone una ventaja frente a otros sistemas de marcación que utilizan plásmidos, ya que otorga mayor estabilidad en ausencia de la presión de selección, lo cual es útil para estudios en la superficie de las semillas y en la rizósfera [248]. En este sentido, nuestros ensayos de estabilidad del inserto no mostraron diferencias significativas luego de aproximadamente 360 generaciones en presencia y ausencia del antibiótico (Tabla 5). Choi y colaboradores reportaron que la inserción es 100% estable luego de 100 generaciones sin la presión del antibiótico en *P. aeruginosa* [221].

En general, se asume que la expresión de las resistencias a antibióticos en ausencia de la presión de selección impacta en el desempeño de la bacteria modificada, debido a la alteración del funcionamiento metabólico normal de la célula y el requerimiento de recursos adicionales. Aun así, se ha demostrado que la integración de resistencias a antibióticos mediante el sistema Tn7, generalmente, no altera el crecimiento ni la competitividad de las cepas transformadas [217], [249]. En nuestro caso, si bien la introducción del *cassette* no modificó el *fitness* de nuestros aislamientos en las curvas de crecimiento ni las actividades PGP (Figuras 10, 11 y 12), obtuvimos dos variantes que presentaron anomalías respecto del aislamiento salvaje (no mostrado). Mientras que la variante 1008-*yfp* no fue capaz de metabolizar la trehalosa en medio mínimo, SVBP6-*yfp* mostró una disminución en la producción de uno de sus principales metabolitos antimicrobianos, la 7-hidroxitropolona [111]. La modificación en 1008-*yfp* podría tener

cierto impacto en los ensayos posteriores de supervivencia en semilla dado que el metabolismo de la trehalosa está involucrado en la tolerancia a la desecación. Por lo tanto, realizamos un nuevo marcaje que se comportó como la versión salvaje (Figuras 10 y 11). Además, corroboramos que esta nueva variante, marcada con la proteína fluorescente cian, no mostrara diferencias en los niveles de bacterización de semillas de maíz, respecto de la variante defectuosa (ver Capítulo 3, Figura 14a). Por otro lado, aunque la alteración de *SVBP6-yfp* podría no ser determinante en los experimentos de supervivencia en semilla, es posible que influya de manera crítica en los ensayos de competencia posteriores. Por ello, también se generó una nueva variante para esta cepa que mostró el fenotipo salvaje (Figuras 10 y 11). Alteraciones similares en las propiedades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol se observaron en una variante marcada de otro aislamiento de nuestra colección de *Pseudomonas* en el laboratorio [250]. La variante de *P. veronii* RPBP2 presentó incapacidad de hidrolizar la caseína en el ensayo de producción de proteasas y alteración de su capacidad antagónica contra *Fusarium graminearum in vitro*, en comparación con la cepa salvaje. Además, evidenció mayor inestabilidad de la inserción, con porcentajes entre el 77% y 85%. Curiosamente, el resultado de la PCR para esta variante fue acorde a lo esperado, al igual que las restantes actividades PGP ensayadas [250].

Conclusiones

En este capítulo logramos obtener las variantes marcadas de nuestros aislamientos de *Pseudomonas*, las cuales evidenciaron un comportamiento indistinguible de sus respectivas cepas salvajes. Nuestros hallazgos demuestran la importancia de llevar adelante las corroboraciones fenotípicas de las bacterias modificadas, con el objetivo de lograr efectivamente un marcaje cromosomal silencioso. De esta forma, nos aseguramos que las variantes obtenidas tengan un desempeño equivalente al del aislamiento salvaje en los experimentos posteriores.

Capítulo 3: Bacterización de semillas y cinéticas de decaimiento del inóculo

Introducción

El tratamiento biológico de semillas (inoculación o bacterización, en el caso de las bacterias) constituye la estrategia principal para introducir PGPMs exógenos en el agroecosistema, replicando el proceso de aplicación de los agroquímicos [182], [251], [252]. Este procedimiento se basa en la colocación de cantidades relativamente altas de uno o más microorganismos PGPM en la espermósfera, asegurando una posición ventajosa para la colonización por la proximidad a la futura radícula que se desarrollará en la germinación [43], [253]. Los tratamientos biológicos de semillas han demostrado no solo mejorar la producción de distintos tipos de cultivos, sino también potenciar la germinación de las semillas, la emergencia y el *stand* de las plántulas y el control de enfermedades, incluso bajo diversas condiciones geográficas y climáticas [254]. Además, dado que estos tratamientos requieren de la aplicación de un volumen menor de inoculante en comparación con otros métodos [255], son los preferidos para cultivos extensivos que se siembran directamente en el suelo, facilitando el establecimiento de los microorganismos introducidos en la rizósfera y, al mismo tiempo, simplificando las tareas del productor agrícola [160], [251], [256].

Los tratamientos biológicos de semillas involucran diversos procedimientos y técnicas. Uno de ellos es el *bio-priming*, que implica la imbibición de las semillas en una suspensión bacteriana durante un periodo de tiempo determinado, con un secado posterior que permite iniciar la germinación, pero previene la emergencia de la radícula. Este tipo de aproximación apunta no solo a introducir el microorganismo en la rizósfera, sino que también se emplea para sincronizar la germinación y mejorar la resistencia a estreses [257]. De hecho, el *hidro-priming*, que consiste en la inmersión de las semillas únicamente en agua antes de la inoculación, ha mostrado efectos positivos en el vigor de las plántulas y en la productividad en ensayos a campo, tanto en condiciones óptimas como bajo condiciones ambientales adversas, como las altas temperaturas, sequías o salinidad [258]. No obstante, debido a la gran cantidad de líquido requerida, los métodos de *priming* no suelen utilizarse en cultivos extensivos [251].

El recubrimiento de semillas (*seed coating*) es otra de las estrategias utilizadas, que consiste en la aplicación externa de materiales, los cuales forman una capa más o menos continua en la superficie de las semillas pudiendo o no modificar la forma, el peso y el

tamaño de las mismas. En el recubrimiento tipo *film* (*film coating*), a diferencia del bio-*priming*, el inóculo bacteriano se aplica como una suspensión líquida en pequeñas cantidades, junto con un adyuvante que actúa como adhesivo. De esta forma, se logra generar una capa muy delgada en la superficie de la semilla sin alterar su forma y tamaño, a diferencia de otros tratamientos como la peletización (*seed pelleting*) [259], [260]. Dado que la tecnología asociada a estas herramientas ha sido desarrollada principalmente para inoculantes basados en rizobios para leguminosas [163], [261], existe poca información sobre la aplicación de *Pseudomonas* en semillas de cultivos extensivos y, en particular, en semillas no desinfectadas. Adicionalmente, debido al creciente interés por las semillas pre-inoculadas y el impacto de los procesos de desecación sobre los microorganismos inoculados [182], es necesario evaluar la capacidad de los aislamientos candidatos de *Pseudomonas* de permanecer viables en semillas bacterizadas, en pos del desarrollo de un nuevo bioinsumo. Con base en estos antecedentes, en este capítulo se propone:

- Analizar los niveles de bacterización alcanzados por nuestros aislamientos de *Pseudomonas* luego de la inoculación en semillas no desinfectadas.
- Monitorear la sobrevivencia de cada aislamiento en semillas pre-inoculadas, utilizando diferentes aditivos.
- Evaluar los niveles de bacterización luego de la pre-hidratación de las semillas.

Materiales y Métodos

3.1 Bacterización y recuperación de las bacterias a partir de las semillas

En este capítulo se llevó a cabo la bacterización de semillas de maíz, trigo y soja con una posterior recuperación de las bacterias adheridas, para determinar la presencia o ausencia de los microorganismos previamente aplicados por métodos dependientes de cultivo.

Para preparar la mezcla de inoculación, las variantes marcadas de *Pseudomonas* se crecieron en Erlenmeyers con medio NYB suplementado con el antibiótico correspondiente, en una proporción de 5:1 respecto del volumen del frasco, a 200 rpm y 28 °C durante 16 horas. Seguidamente, las bacterias se centrifugaron a 2600 g y 4 °C durante 10 minutos. El *pellet* se lavó dos veces con SS. Para la inoculación de las semillas, se utilizaron suspensiones bacterianas normalizadas ($DO_{600} = 1,0$ en SS), que se cuantificaron mediante recuento por gota en medio NA con el antibiótico del *cassette* mini-Tn7, para chequear el número de células viables. Las semillas sin desinfectar se inocularon siguiendo la dosis recomendada por la empresa Rizobacter Argentina S.A (RASA) al momento de iniciar los experimentos para su producto Rizofos®. Para maíz (variedad KM 8701 VIP3) se aplicó una dosis de 7 ml/kg de semillas, para trigo (variedad Baguette 550 y Baguette 620) se aplicó una dosis de 10 ml/kg y para soja (variedad 13-146), una dosis de 0,5 ml/kg. Se evaluó, además, la bacterización en presencia o ausencia del aditivo comercial Premax® de RASA, un protector microbiano que mejora la adhesión a la semilla y brinda protección frente a estreses ambientales [262]. En maíz la mezcla de inoculación se preparó con 2 ml/kg del aditivo y 5 ml/kg de la suspensión bacteriana normalizada; mientras que para trigo y soja se siguió la proporción de 1 ml/kg del aditivo y 4 ml/kg de la suspensión bacteriana. En el tratamiento control, el volumen del aditivo se reemplazó con SS. El volumen total correspondiente de cada mezcla de inoculación se agregó a las semillas y se agitó de forma manual durante 1,5 minutos vigorosamente (Figura 13).

Inmediatamente después de la inoculación, se recuperaron las bacterias adheridas a las semillas, y se cuantificaron en placas de medio selectivo Gould's S1, con el antibiótico correspondiente (de aquí en adelante "día 0"). Para ello, 5 g de semillas de maíz se resuspendieron en 15 ml de SS en tubos Falcon estériles de 50 ml, mientras que

para trigo y soja 2 g de semillas se resuspendieron en 8 ml de SS. Después de la agitación en un vórtex por 10 segundos a máxima potencia, los tubos se sumergieron durante 10 minutos en un baño de sonicación (40 kHz, 160 W, Testlab TB04, Argentina), ambos procedimientos para promover el desprendimiento de bacterias de la superficie de las semillas, y la dispersión de agregados bacterianos. Los tubos se centrifugaron a $50 \times g$ a temperatura ambiente durante 1 minuto para eliminar el material grueso, y luego el sobrenadante conteniendo las bacterias se transfirió a tubos estériles de 50 ml. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se sembró por triplicado en placas de Gould's S1 con antibiótico, para cuantificar las *Pseudomonas* cultivables recuperadas de las semillas, por el método de recuento en gota [263].

3.1.1 Cinéticas de decaimiento de la bacterización

Se realizaron cinéticas de decaimiento del inóculo hasta 4 días post-inoculación (dpi), en las cuales diariamente se recuperaron y cuantificaron las bacterias a partir de las semillas (Figura 13). Durante este período, las semillas se colocaron dentro de bolsas termo-selladas y se incubaron en una cámara de crecimiento de plantas (Ingelab Argentina, I-501 PF) en oscuridad, con ciclos de temperatura de 24 °C a 13 °C (16-8 hs, respectivamente). Como control del decaimiento intrínseco del inóculo por las condiciones de almacenamiento, evaluamos la viabilidad de la suspensión bacteriana inicial que se empleó para realizar la mezcla de inoculación ($DO_{600} = 1,0$ en SS) mediante recuentos diarios en placas de NA con el antibiótico correspondiente, durante los 5 días de duración de las cinéticas. La suspensión bacteriana se conservó bajo las mismas condiciones de almacenamiento que las semillas inoculadas. También evaluamos el efecto de la bacterización de las semillas sobre la germinación, colocando algunas semillas de cada muestra en placas de agar agua al 1% p/v, y contando las semillas germinadas respecto del total de semillas sembradas. En aquellos casos en los que aún se recuperaron células viables a los 4 dpi, se extendió el período de evaluación de la bacterización. Para trigo, se llevaron a cabo cinéticas de hasta 4 semanas de duración, recuperando las bacterias adheridas a las semillas una vez por semana. En el caso de soja, las cinéticas se realizaron hasta 2 semanas post-inoculación (spi), procesando las semillas también una vez por semana (Figura 13).

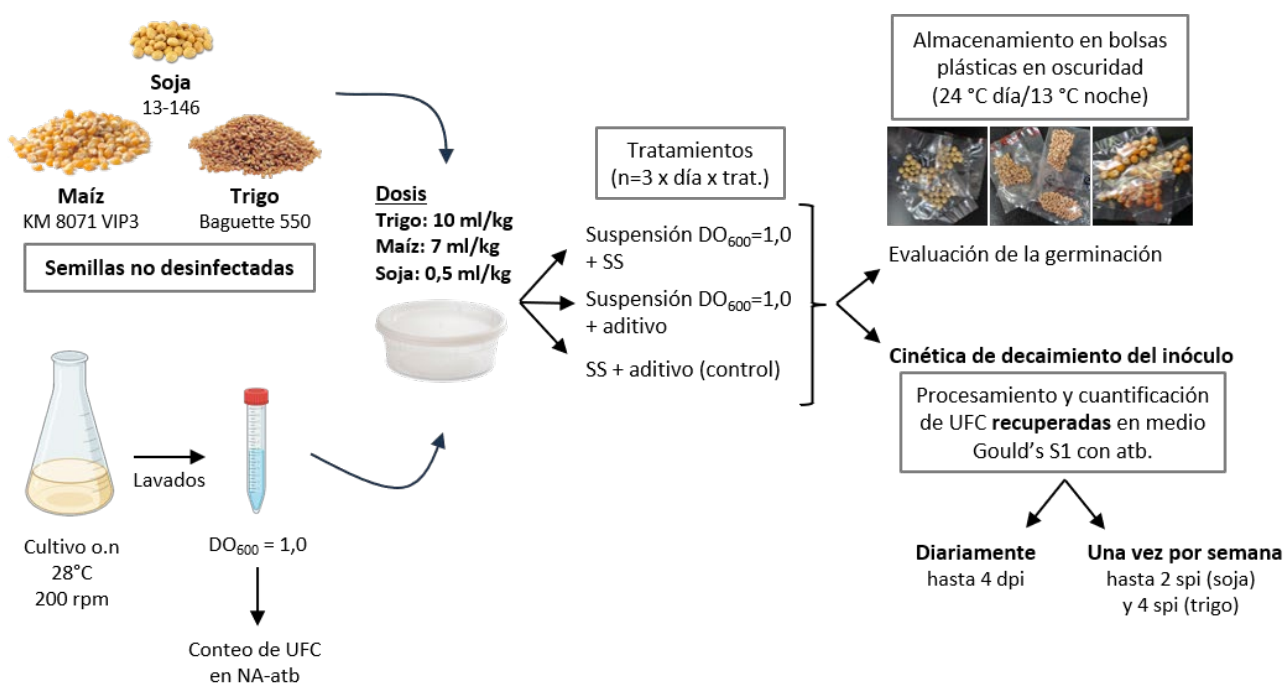


Figura 13. Esquema general utilizado para la bacterización de las semillas, y la posterior recuperación de las bacterias adheridas a las mismas. Los aditivos empleados variaron según el caso, e incluyeron el protector comercial Premax® (RASA), trehalosa, PVP, la combinación de trehalosa con PVP, glicerol y sacarosa.

3.1.2 Evaluación de otros aditivos

Cuando el aditivo comercial Premax® no mejoró los niveles de bacterización de las semillas, se evaluaron otras soluciones con comprobada actividad protectora en otros sistemas: trehalosa 1M (Tre) [175], polivinilpirrolidona (PVP) 1,5 % p/v [175], [264], la combinación de trehalosa y PVP (Tre+PVP), glicerol 20% p/v [264] y sacarosa 20% p/v [265]. La proporción entre la suspensión bacteriana y el aditivo se basó en las anteriormente mencionadas para cada semilla (5 ml/kg para la suspensión bacteriana y 2 ml/kg para el aditivo en maíz; y 4 ml/kg para la suspensión bacteriana y 1 ml/kg para el aditivo en trigo y soja). La inoculación se llevó a cabo con el mismo procedimiento ya descrito en la sección 3.1.

3.1.3 Bacterización de semillas pre-hidratadas

Para evaluar si el contenido de agua de las semillas tiene influencia en los niveles de bacterización, se inocularon las semillas después de hidratarlas con 250 ml de agua desionizada estéril. Para maíz y trigo, las semillas se hidrataron durante 16 horas a 120 rpm [266], [267], y para soja, las semillas se hidrataron durante 2 horas a 120 rpm [268].

Luego del pre-tratamiento de hidratación, se secaron en papel absorbente para eliminar el excedente de agua, y seguidamente se inocularon con el procedimiento descrito en la sección 3.1, con y sin la adición de Premax®. Dado que la hidratación (imbibición) de las semillas acelera el proceso de germinación [269], la recuperación de las bacterias a partir de las mismas solo se realizó inmediatamente después de la inoculación (día 0), mediante recuento por gota en medio selectivo, como se explicó anteriormente en la sección 3.1.

3.2 Análisis estadísticos

En los ensayos de recuperación de las bacterias a partir de las semillas se utilizaron tres réplicas por día ($n = 3$). Se realizaron recuentos de UFC en medio Gould's S1, por triplicado para cada réplica. Los valores de UFC fueron transformados con la fórmula $\log_{10}(x + 50)$ antes de los análisis estadísticos, para contemplar los valores nulos en la transformación [81]. El análisis de varianza (ANOVA) o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis se llevaron a cabo cuando fue apropiado, seguidos de las pruebas de "Diferencia Menos Significativa" (LSD-Fisher) o el test de Dunn sin corrección para evaluar diferencias significativas entre los valores, mediante el software GraphPad Prism V. 8.00. La estadística se realizó con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los incrementos entre los distintos tratamientos fueron calculados empleando los valores de UFC sin logaritmizar. Por otro lado, el monitoreo de las suspensiones bacterianas empleadas en la bacterización durante las condiciones de almacenamiento se analizó con el post-test de Tukey, y un $p < 0,05$.

Resultados

3.3 Bacterización de semillas de maíz, trigo y soja

Una vez obtenidas las variantes marcadas a partir de los aislamientos de *Pseudomonas* fue posible realizar ensayos en condiciones no axénicas, similares a una situación a campo. De esta manera, se analizaron los niveles de bacterización de semillas sin desinfectar por recuentos en placa en medio selectivo para *Pseudomonas*, con los antibióticos adecuados para cada *cassette* Tn7.

3.3.1 Recuperación de las bacterias adheridas a las semillas a día 0

La evaluación de los niveles de bacterización de las semillas de maíz inmediatamente después de inocular demostró que la incorporación del aditivo Premax® en las suspensiones bacterianas tuvo un efecto positivo en la recuperación de las bacterias cultivables. La adición del protector comercial mejoró significativamente la recuperación de todos los aislamientos a partir de las semillas, cuando se comparó con el tratamiento sin aditivo (Figura 14). Sin embargo, este aumento fue de diferente magnitud según el aislamiento, con una variación de 3,2× a 36,4×, sugiriendo un efecto de protección y/o adhesión del Premax® particular sobre las diferentes células bacterianas. Los aislamientos RBAN4-*yfp* y RAN1-*yfp* mostraron valores más altos de recuperación respecto de la cepa de referencia 1008-*yfp* en presencia del aditivo, mientras que solo RBAN4-*yfp* superó el valor de 1008-*yfp* en ausencia del aditivo (Figura 15). Contrariamente, SVMP4-*yfp* mostró niveles más bajos de bacterización que la cepa de referencia 1008-*yfp*, con y sin aditivo (Figuras 14 y 15). Debido a esto último, se testearon diferentes compuestos para SVMP4-*yfp* con potencial efecto protector y/o adhesivo, con el objetivo de mejorar la bacterización. Se observó que todos los aditivos probados mejoraron la recuperación de SVMP4-*yfp* en las semillas de maíz, siendo trehalosa, glicerol y la combinación de trehalosa con PVP los que mostraron los valores más altos de bacterización (9,7×; 9,4×; 11× respectivamente), al comparar con el control sin aditivo (Figura 14b). Para el aislamiento SBVP6-*mche* también se testeó la combinación de trehalosa con PVP, la cual mostró un incremento del 25,6× respecto del control sin aditivo, pero fue indistinto del agregado de Premax® a día 0 (Figura 14c). Cabe destacar que, luego de detectar la deficiencia en el uso de la trehalosa como nutriente

en la cepa 1008-*yfp*, se comprobó que la nueva variante obtenida, 1008-*cfp*, mostrase valores similares a la anterior en la recuperación a día 0 con la variedad KM 87 VIP3 (Figura 14a).

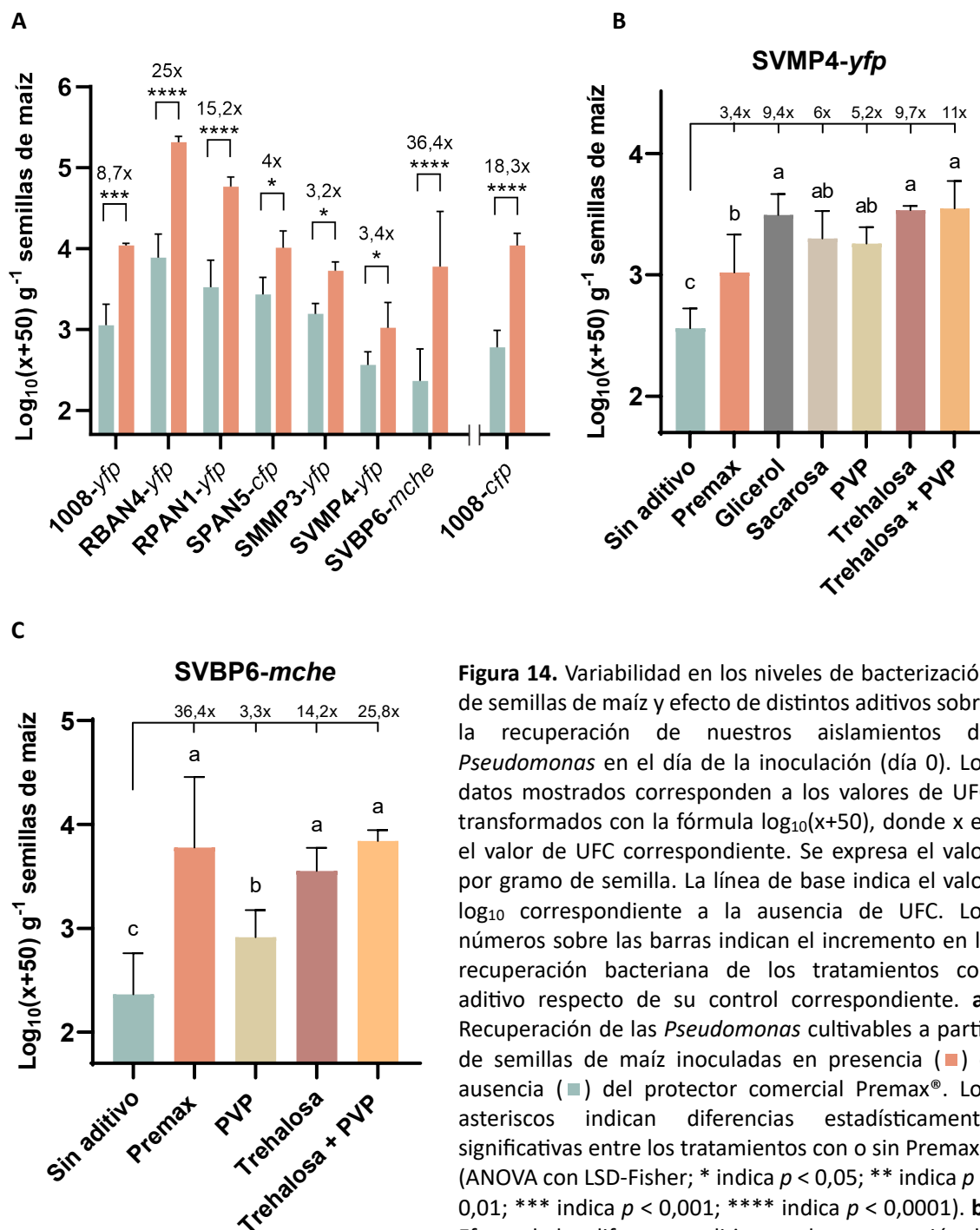


Figura 14. Variabilidad en los niveles de bacterización de semillas de maíz y efecto de distintos aditivos sobre la recuperación de nuestros aislamientos de *Pseudomonas* en el día de la inoculación (día 0). Los datos mostrados corresponden a los valores de UFC transformados con la fórmula $\log_{10}(x+50)$, donde x es el valor de UFC correspondiente. Se expresa el valor por gramo de semilla. La línea de base indica el valor $\log_{10}$ correspondiente a la ausencia de UFC. Los números sobre las barras indican el incremento en la recuperación bacteriana de los tratamientos con aditivo respecto de su control correspondiente. **a)** Recuperación de las *Pseudomonas* cultivables a partir de semillas de maíz inoculadas en presencia (■) o ausencia (■) del protector comercial Premax®. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con o sin Premax® (ANOVA con LSD-Fisher; * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$). **b)** Efecto de los diferentes aditivos en la recuperación de SVMP4-yfp de semillas de maíz bacterizadas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA con LSD-Fisher, $p < 0,05$). **c)** Efecto de los diferentes aditivos en la recuperación de SVBP6-mche de semillas de maíz bacterizadas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA con LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Estas diferencias observadas en los niveles de bacterización de semillas de maíz variedad KM 8701 VIP3 fueron similares a las obtenidos en ensayos preliminares en otra variedad de maíz (SY860 TD/TG C18M Syngenta; Tabla 7), lo cual refuerza la idea de que algunos aislamientos son capaces de adherirse con mayor o menor eficiencia a la superficie de este tipo de semillas, sin importar la variedad. Aun así, se detectaron algunas variaciones en los niveles de bacterización alcanzados respecto del híbrido KM 8701 VIP3, ya que la recuperación de RBAN4-*yfp* igualó a la de 1008-*yfp*; y los valores obtenidos para RPAN1-*yfp* fueron más bajos que los de 1008. En esta variedad de semilla

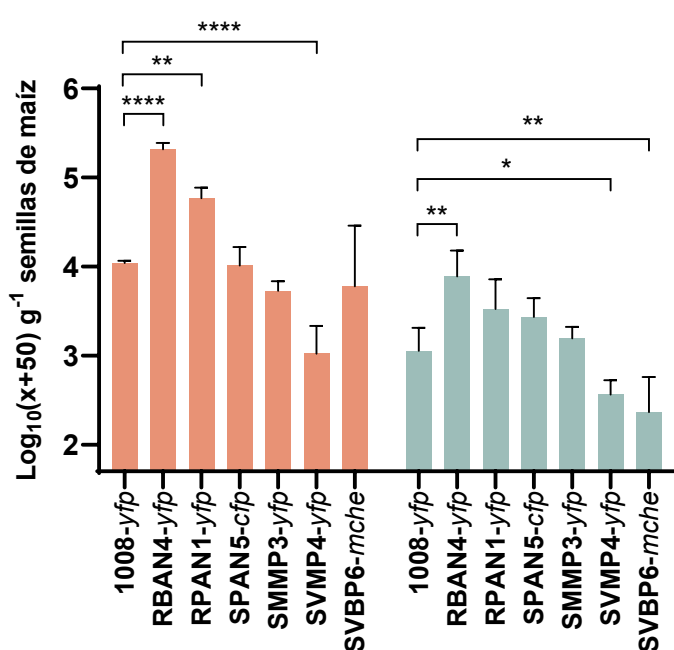


Figura 15. Comparación entre los niveles de bacterización alcanzados en semillas de maíz por nuestros aislamientos de *Pseudomonas* a día 0, en presencia o ausencia del protector comercial Premax[®]. La línea de base indica el valor 0 de UFC (log₁₀). Las barras de la izquierda (■) corresponden a los niveles de bacterización de los aislamientos inoculados en presencia de Premax[®] y las barras de la derecha (■) corresponden a la recuperación sin Premax[®]. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto de la cepa de referencia 1008-*yfp*, dentro de cada tratamiento (ANOVA con LSD-Fisher; * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

Tabla 7. Niveles de bacterización en semillas de maíz de la variedad SY860 TD/TG C18M Syngenta

	Log ₁₀ (UFC+50)/g de semilla de maíz (variedad SY860)					
	Sin Premax [®]			Con Premax [®]		
	Prom.	SD	ANOVA	Prom.	SD	ANOVA
RBAN4- <i>yfp</i>	4,15	0,44	a	4,97	0,21	A
RPAN1- <i>yfp</i>	2,83	1,03	b	4,02	0,30	B
SMMP3- <i>yfp</i>	2,65	0,28	b	3,47	0,44	C
SPAN5- <i>cfp</i>	2,99	0,47	b	4,18	0,41	B
SVMP4- <i>yfp</i>	2,32	0,17	bc	3,30	0,08	CD
SVBP6- <i>yfp</i>	1,76	0,13	c	2,79	0,74	D
1008- <i>yfp</i>	2,97	0,28	b	4,96	0,30	A

Prom. = valor promedio de las réplicas. Cada tratamiento fue analizado por separado con ANOVA, con LSD Fisher ($p < 0,05$).

la adición de Premax[®] resultó significativa en todos los casos, al realizar un ANOVA con LSD Fisher, $p < 0,05$.

Los resultados en semillas de trigo en el día de la inoculación evidenciaron una recuperación más pareja entre aislamientos, que además resultó significativamente mayor respecto de los niveles obtenidos en semillas de maíz (Figura 16). Esta diferencia se observó en todos los aislamientos, exceptuando a RBAN4-*yfp* y RPAN1-*yfp*, dado que sus recuentos por gramo de trigo con y sin Premax[®] no lograron superar los obtenidos por gramo de semillas de maíz con Premax[®] (Tabla 8). Contrariamente a lo visto en maíz, la adición del protector comercial Premax[®] no produjo un aumento en la recuperación de los aislamientos respecto del control sin aditivo (Figura 16 y Tabla 11). Esto se debe a que los recuentos a partir de semillas inoculadas con suspensiones bacterianas en SS, sin ningún protector, ya fueron altos (Figura 16): si comparamos los porcentajes de UFC recuperadas a partir de las semillas de maíz y trigo inoculadas sin Premax[®] se observan valores entre 4 y 296 veces superiores para trigo. Sin embargo, los porcentajes de UFC recuperadas cuando la inoculación se realizó con Premax[®] en ambas semillas fueron similares (Tablas 10 y 11).

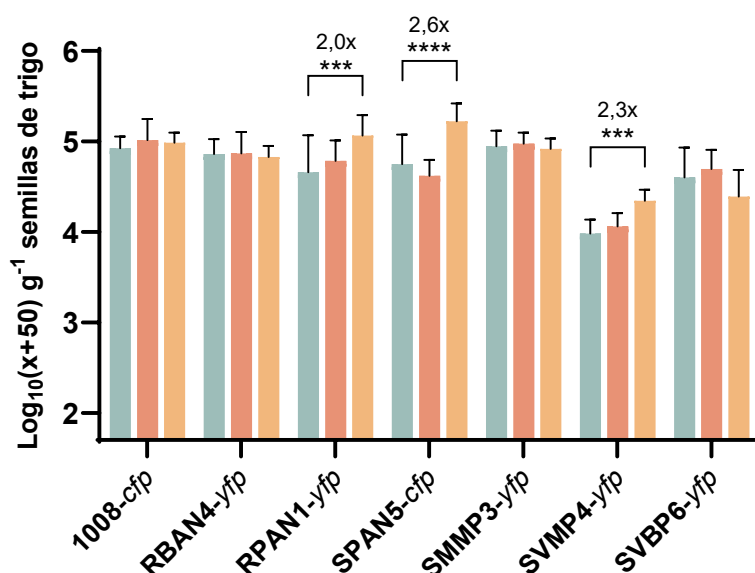


Figura 16. Variabilidad en los niveles de bacterización de semillas de trigo y efecto de los aditivos sobre la recuperación de los aislamientos a partir de semillas de trigo bacterizadas, en el día 0 de inoculación. Se muestra la recuperación de las *Pseudomonas* cultivables a partir de semillas de trigo inoculadas en presencia de trehalosa y PVP (■), Premax[®] (■) y ausencia de aditivo (■). Los números sobre las barras indican el incremento en la recuperación bacteriana de los tratamientos con aditivo respecto de su control con SS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, respecto del control sin aditivo (ANOVA con LSD-Fisher; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

Dado que se habían visto resultados satisfactorios en maíz (Figuras 14b y 14c), se testeó el desempeño de la combinación de trehalosa con PVP para todos los casos, con el objetivo de mejorar la recuperación. Solo se evidenció un incremento en los niveles de recuperación utilizando como aditivo la mezcla de trehalosa y PVP para los aislamientos RPAN1-*yfp*, SPAN5-*cfp* y SVMP4-*yfp* (2,0×; 2,6×; 2,3×; respectivamente), respecto de su control correspondiente (Figura 16). Por otro lado, las cepas SVBP6-*yfp* y SVMP4-*yfp* mostraron los valores más bajos de recuperación de toda la colección, siendo significativamente menores al compararlos con la cepa de referencia 1008-*cfp*, en todos los tratamientos (Figura 17). Este desempeño también se había observado en las semillas de maíz para SVMP4-*yfp*, e incluso para los recuentos de SVBP6-*mche* en ausencia del protector comercial (Figura 15). Es interesante mencionar que el aislamiento RPAN1-*yfp* igualó el nivel de bacterización de 1008 con la adición de trehalosa y PVP, mientras que SPAN5-*cfp* lo superó, siendo esta mezcla de aditivos la más adecuada para estas dos cepas en semillas de trigo (Figura 17).

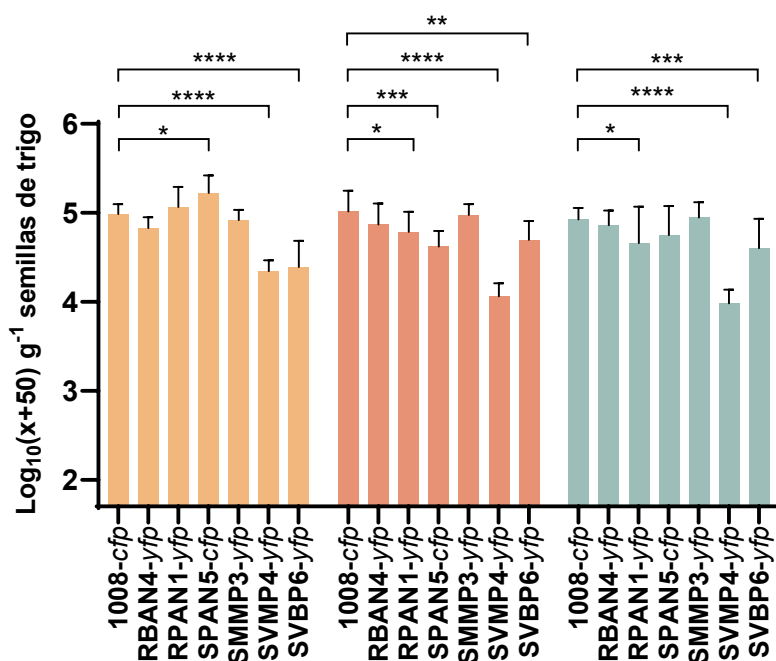


Figura 17. Comparación entre los niveles de bacterización alcanzados en semillas de trigo por los aislamientos de *Pseudomonas* a día 0, sin aditivo (■), con el aditivo comercial Premax® (■) o con la combinación de trehalosa y PVP (■). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto de la cepa de referencia 1008-*cfp*, dentro de cada tratamiento (ANOVA con LSD-Fisher; * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

El comportamiento de los aislamientos en semillas de soja a día 0 fue homogéneo entre cepas (Figura 18a), análogamente a lo visto en semillas de trigo, aunque en líneas generales la recuperación a partir de soja fue cuantitativamente menor que la obtenida para semillas de trigo (Tabla 8). Además, si se comparan los niveles de bacterización a

día 0 con respecto a maíz, es posible notar que la recuperación en soja fue levemente mayor, salvo para RBAN4-*yfp* y RPA1-*yfp* con Premax® (Tabla 8). Por otro lado, es importante destacar el impacto positivo y significativo del protector comercial Premax® en la bacterización de las semillas de soja para todos los aislamientos respecto del control sin aditivo, excepto para SVBP6-*mche* (Figura 18a). Esta mejora implicó una recuperación entre 1,8x y 6x veces más de bacterias en presencia del aditivo comercial.

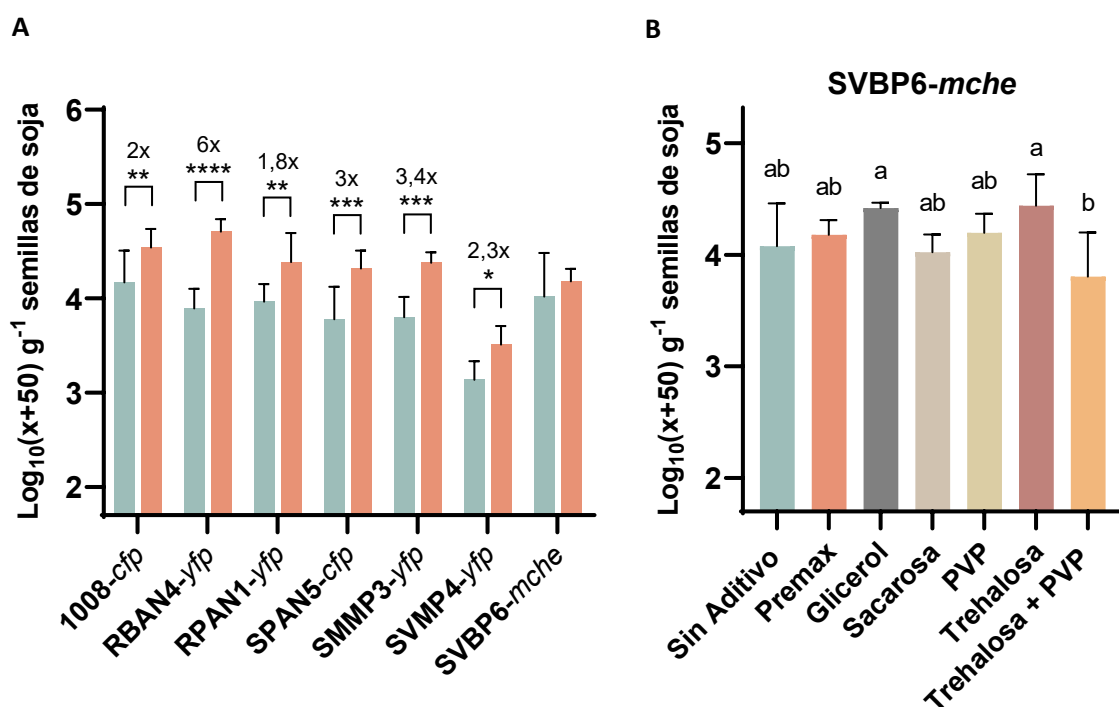


Figura 18. Variabilidad en los niveles de bacterización de semillas de soja y efecto de la utilización de aditivos sobre la recuperación de los aislamientos de *Pseudomonas*, a día 0. **a)** Recuperación de las *Pseudomonas* cultivables de las semillas de soja inoculadas en presencia (■) o ausencia (□) del protector comercial Premax®. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con o sin Premax® (ANOVA con LSD-Fisher, * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$). **b)** Impacto de los diferentes aditivos en la recuperación de SVBP6-*mche* de semillas de soja bacterizadas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA con LSD-Fisher; $p < 0,05$).

Como se mencionó anteriormente, el desempeño del aislamiento SVBP6-*mche* en presencia del protector Premax® fue equivalente estadísticamente a su control sin aditivo. Por lo tanto, para intentar mejorar los niveles de bacterización se ensayaron otros compuestos con efecto protector (Figura 18b). Si bien la trehalosa y el glicerol mostraron una tendencia a mejorar la bacterización, no hubo un incremento significativo en la cantidad de UFC obtenidas a partir de las semillas de soja con ninguno de los compuestos probados.

Aunque en soja se evidenciaron niveles de bacterización más parejos entre las distintas cepas, SVMP4-*yfp* fue el único aislamiento que obtuvo una recuperación significativamente más baja respecto de 1008-*cfp*, en presencia y ausencia de Premax® (Figura 19). Por su parte, SVBP6-*mche* tampoco logró alcanzar los niveles de la cepa de referencia con Premax®, a pesar de que sin Premax® sí lo había igualado. El resto de los aislamientos igualaron el nivel de bacterización alcanzado por 1008-*cfp* con el uso del protector comercial (Figura 19).

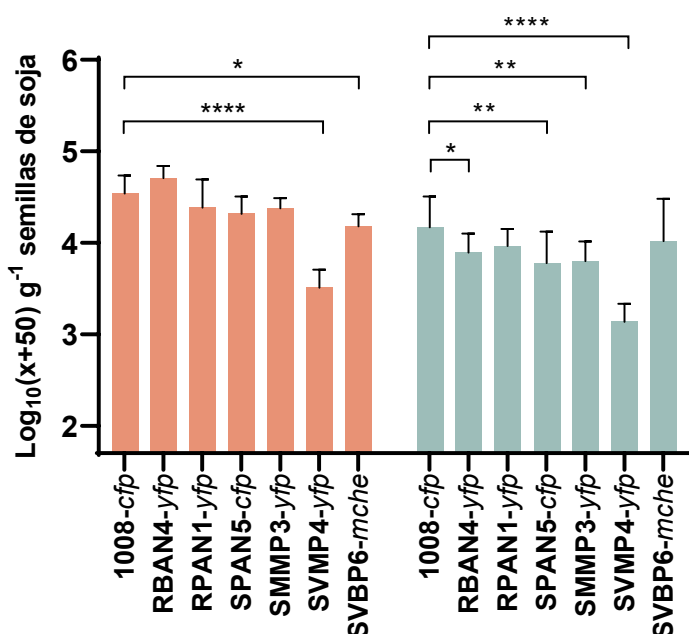


Figura 19. Comparación entre los niveles de bacterización alcanzados en semillas de soja por los aislamientos de *Pseudomonas* a día 0, en presencia (■) o ausencia (■) del protector comercial Premax®. La línea de base indica el valor 0 de UFC ($\log_{10}$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto de la cepa de referencia 1008-*cfp*, dentro de cada tratamiento (ANOVA con LSD-Fisher; * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

Tabla 8. Niveles de bacterización ($\log_{10}(\text{UFC}+50)/\text{g}$) en semillas de maíz, trigo y soja

	Maíz				Trigo				Soja			
	Sin Premax®		Con Premax®		Sin Premax®		Con Premax®		Sin Premax®		Con Premax®	
	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD
RBAN4- <i>yfp</i>	3,89 cd	0,29	5,31 a	0,07	4,86 ab	0,17	4,87 ab	0,24	3,89 d	0,21	4,70 bc	0,13
RPAN1- <i>yfp</i>	3,52 b	0,33	4,77 a	0,12	4,88 a	0,47	4,87 a	0,28	3,96 b	0,19	4,38 ab	0,31
SMMP3- <i>yfp</i>	3,19 c	0,13	3,73 bc	0,11	4,90 a	0,22	4,98 a	0,12	3,80 bc	0,22	4,38 b	0,11
SPAN5- <i>cfp</i>	3,43 c	0,21	4,01 bc	0,21	4,75 a	0,32	4,62 a	0,17	3,78 bc	0,34	4,32 ab	0,19
SVMP4- <i>yfp</i>	2,56 d	0,16	3,02 cd	0,31	3,98 ab	0,15	4,06 a	0,14	3,14 cd	0,20	3,51 bc	0,20
SVBP6- <i>mche/yfp</i>	2,36 c	0,40	3,45 bc	1,02	4,60 a	0,33	4,70 a	0,21	4,02 b	0,46	4,18 bc	0,13
1008- <i>cfp/yfp</i>	3,05 b	0,26	4,04 b	0,03	4,92 a	0,13	5,01 a	0,23	4,17 b	0,34	4,54 b	0,20

Prom. = valor promedio de las réplicas. Cada aislamiento fue analizado por separado con Kruskal-Wallis, considerando el efecto de la interacción semilla $\times$ tratamiento, con un $p < 0,05$. La variante SVBP6-*yfp* se utilizó en los ensayos de maíz y trigo, mientras que 1008-*yfp* solo en maíz.

3.3.2 Cinéticas de decaimiento de la bacterización

Con el objetivo de realizar un seguimiento de los niveles de bacterización alcanzados por nuestros aislamientos de *Pseudomonas* en cada una de las semillas, se estudió la caída en la recuperación de las bacterias cultivables a partir de las mismas hasta 4 días post-inoculación. Nuevamente, se ensayó el efecto del aditivo comercial Premax® para todas las cepas y se probaron, además, aquellos que mostraron un buen desempeño en la recuperación a día 0.

En cuanto a las cinéticas de maíz, RBAN4-*yfp* mostró los valores más altos de recuperación, con un efecto positivo y significativo del Premax® durante todo el experimento (Figura 20). La cepa de referencia 1008-*yfp* se comportó de manera similar, aunque la recuperación fue más baja (Figura 20). Para el resto de los aislamientos el efecto del protector Premax® fue observado únicamente el día de la inoculación (día 0) mientras que, en los días siguientes, los recuentos de UFC mostraron un decaimiento que resultó estadísticamente indistinguible de la presencia o ausencia del Premax® (Figura 20). Este patrón fue evidente incluso para RPAN1-*yfp*, que inicialmente mostró un nivel de bacterización mayor a día 0, pero decayó más rápidamente que 1008-*yfp* en los días posteriores (Figura 20). Para SVBP6-*mche* se observaron niveles heterogéneos de bacterización en el día 0 y una posterior caída en la recuperación, siendo prácticamente indetectable luego del día 1 post-inoculación. Por otro lado, tanto para este aislamiento como para SVMP4-*yfp*, la presencia de la combinación de trehalosa y PVP mejoró la recuperación, pero solo para SVMP4 logramos obtener colonias hasta 4 dpi. El uso del glicerol en esta cepa mejoró los recuentos hasta 1 dpi.

En contraposición a lo observado en maíz, las semillas de trigo mostraron mayores niveles de bacterización que se mantuvieron constantes durante los 5 días de duración del ensayo, tanto en presencia como en ausencia de aditivos (Figura 21). De esta forma, el número de bacterias recuperadas a partir de las semillas permaneció estable para todos los aislamientos (Figura 21). Particularmente, las cepas RBAN4-*yfp* y SMMP3-*yfp* no evidenciaron mejoras en la bacterización por la adición del protector comercial Premax® en ninguno de los tiempos de almacenamiento ensayados. No obstante, este aditivo y la combinación de trehalosa con PVP impactaron positivamente en la recuperación tanto de RPAN1-*yfp* como de SPAN5-*cfp*, a lo largo de todo experimento (Figura 21). En el caso de 1008-*cfp* y SBVP6-*yfp*, el Premax® aumentó significativamente

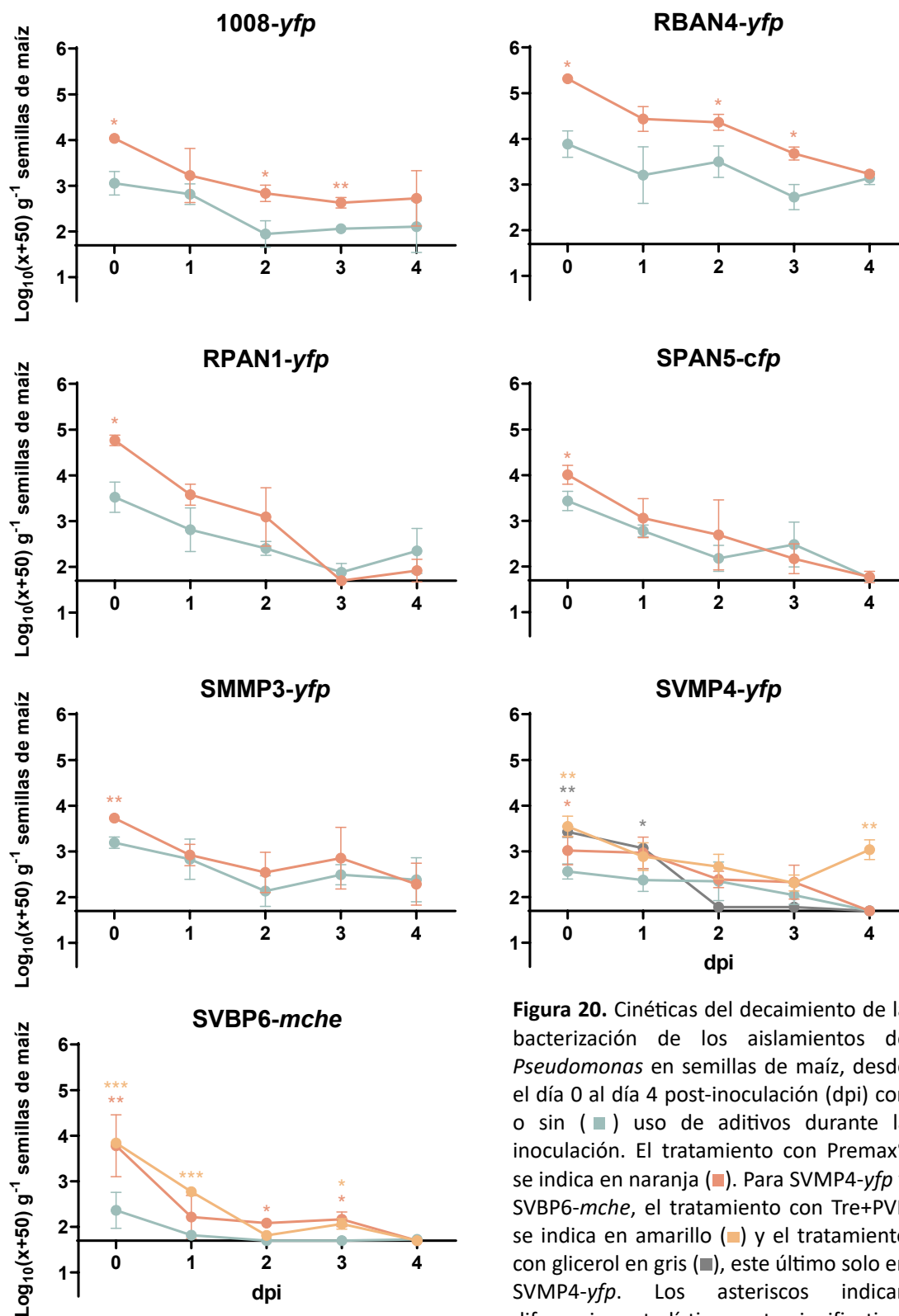


Figura 20. Cinéticas del decaimiento de la bacterización de los aislamientos de *Pseudomonas* en semillas de maíz, desde el día 0 al día 4 post-inoculación (dpi) con o sin (■) uso de aditivos durante la inoculación. El tratamiento con Premax® se indica en naranja (■). Para SVMP4-yfp y SVBP6-mche, el tratamiento con Tre+PVP se indica en amarillo (■) y el tratamiento con glicerol en gris (■), este último solo en SVMP4-yfp. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre el aditivo de su mismo color y el tratamiento control, en un mismo día (ANOVA de dos vías con LSD-Fisher; * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$).

la recuperación de estos aislamientos, siendo efectivo a partir del 2° dpi para SVBP6, y durante toda la cinética para 1008. SVMP4-*yfp* también mostró un incremento con la mezcla de trehalosa con PVP, aunque únicamente en el día 0. Luego, los recuentos se emparejaron con los otros aditivos y el control, manteniéndose constantes en los días posteriores (Figura 21). Dado que observamos que los niveles de bacterización comenzaban a mostrar un leve decaimiento al 2° o 3° dpi, específicamente para las cepas RPAN1-*yfp*, SPAN5-*cfp*, SMMP3-*yfp* y SVMP4-*yfp* sin aditivo; y que además los recuentos al 4° dpi fueron altos, se decidió ensayar estas cinéticas durante 4 semanas, procesando las semillas una vez por semana.

Los resultados de las cinéticas a largo plazo evidenciaron una disminución en la recuperación bacteriana a partir de la semana 1 en todos los casos, la cual no había podido advertirse en las cinéticas hasta 4 dpi (Figura 22). A su vez, fue notorio el efecto positivo del aditivo comercial Premax® a largo plazo, ya que se observó una mejora en los niveles de recuperación de los aislamientos RBAN4-*yfp*, SVMP4-*yfp* y de la cepa de referencia 1008-*cfp* con este protector a lo largo del experimento (Figura 22). Es interesante mencionar que SVMP4-*yfp*, a pesar de mostrar niveles bajos de bacterización, logró sostener esos valores en las muestras con y sin aditivo durante las 4 semanas evaluadas. Efectivamente, para las inoculaciones sin aditivo de SVMP4-*yfp*, observamos una disminución menos pronunciada que para otras cepas que habían mostrado números más altos de UFC en el día 0 (Figura 22). La bacterización con esos aislamientos decayó de tal manera que los recuentos fueron muy bajos o nulos a partir de la 2° o 3° spi. Solo en el caso de los aislamientos RPAN1-*yfp* y SPAN5-*cfp*, el protector comercial resultó beneficioso en la 1° y 2° spi. Por ello se decidió testear el desempeño de la adición de trehalosa con PVP (Figura 22). Esta mezcla logró mejorar el desempeño de todos nuestros aislamientos pertenecientes al grupo de *P. chlororaphis*: RPAN1-*yfp*, SPAN5-*cfp* y SMMP3-*yfp*. Para los dos primeros, el mejoramiento se vio en la 1° y 2° spi al igual que con Premax®. Por su parte SPAN5-*cfp* también mostró un incremento en el día 0, mientras que RPAN1-*yfp* superó el desempeño del protector comercial con esta combinación en la 3° spi. El agregado de trehalosa y PVP en la mezcla de inoculación para SMMP3-*yfp* evidenció un marcado aumento en la bacterización en todas las semanas, siendo significativo para las semanas 2, 3 y 4. SMMP3-*yfp* tratado con trehalosa y PVP, junto con RBAN4-*yfp*, SVMP4-*yfp* y 1008-*cfp* con y sin aditivo, fueron

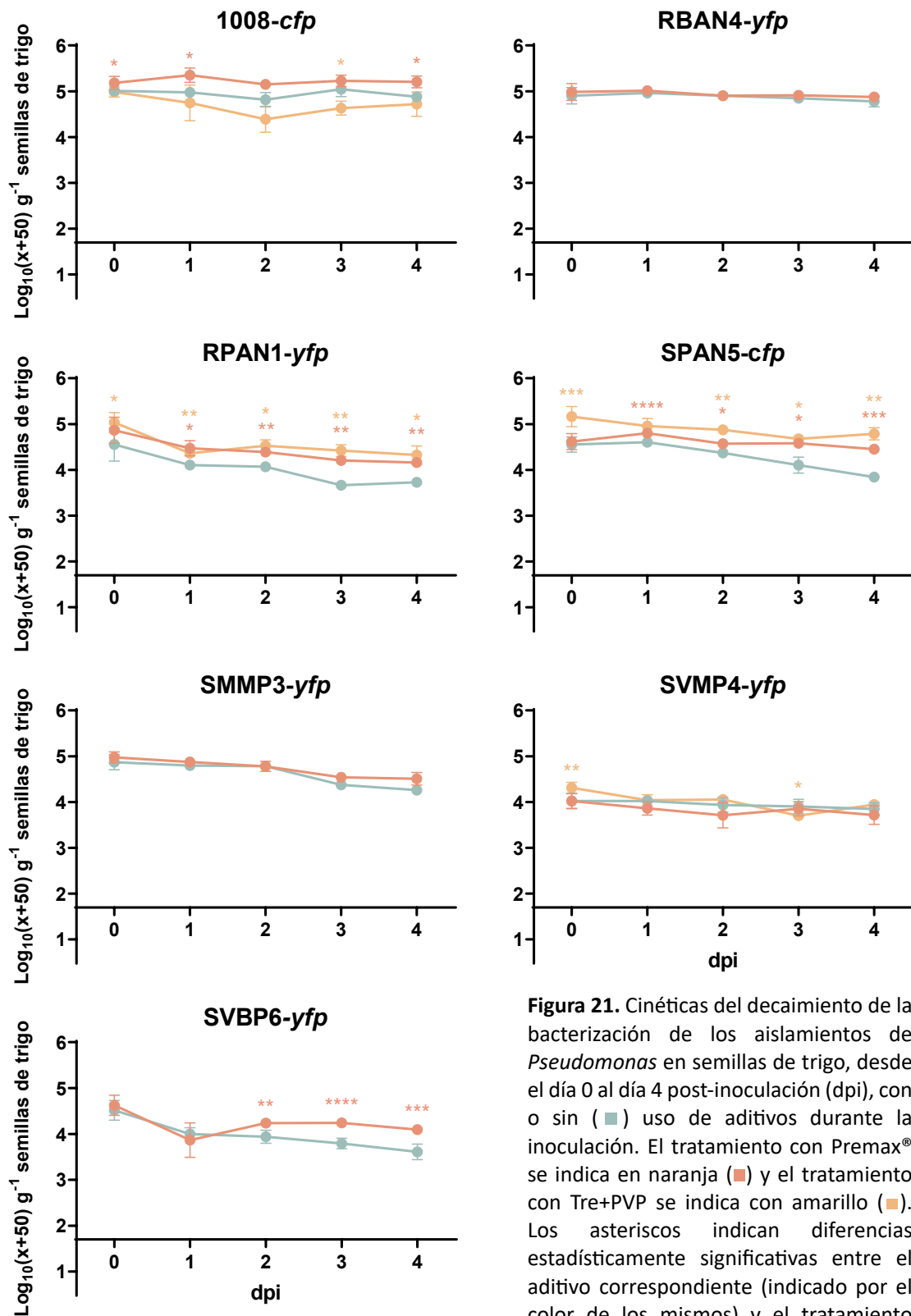


Figura 21. Cinéticas del decaimiento de la bacterización de los aislamientos de *Pseudomonas* en semillas de trigo, desde el día 0 al día 4 post-inoculación (dpi), con o sin (■) uso de aditivos durante la inoculación. El tratamiento con Premax® se indica en naranja (■) y el tratamiento con Tre+PVP se indica en amarillo (■). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre el aditivo correspondiente (indicado por el color de los mismos) y el tratamiento control para cada día ensayado (ANOVA de dos vías con LSD-Fisher; * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

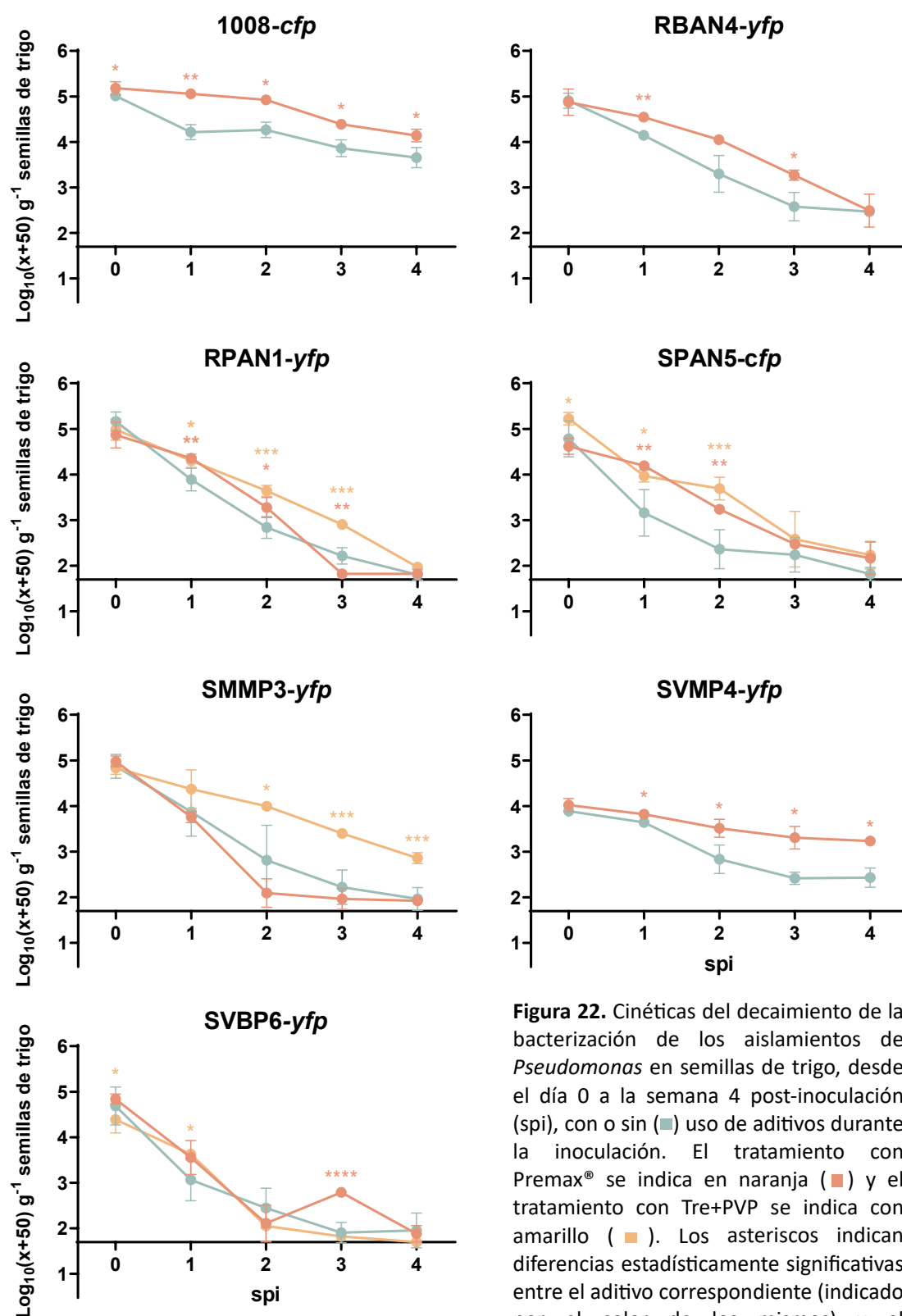


Figura 22. Cinéticas del decaimiento de la bacterización de los aislamientos de *Pseudomonas* en semillas de trigo, desde el día 0 a la semana 4 post-inoculación (spi), con o sin (■) uso de aditivos durante la inoculación. El tratamiento con Premax® se indica en naranja (■) y el tratamiento con Tre+PVP se indica con amarillo (▲). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre el aditivo correspondiente (indicado por el color de los mismos) y el tratamiento control para cada tiempo ensayado (ANOVA de dos vías con LSD-Fisher, * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

los aislamientos que lograron ser detectados hasta el final del ensayo (Figura 22). Por último, el aislamiento SVBP6-*mche* mostró un decaimiento rápido con todos los tratamientos, indistinguible del control sin aditivo, excepto en la 1° spi para la mezcla de trehalosa y PVP, y en la 3° spi para el aditivo comercial Premax® (Figura 22).

El efecto beneficioso de la incorporación de Premax® al inocular semillas de soja se mantuvo durante las cinéticas de 4 dpi, para todos los aislamientos (Figura 23). De esta forma los niveles de bacterización de nuestras cepas en esta semilla mostraron una amplia diferencia a favor del protector comercial, con una caída leve en la recuperación al transcurrir los días de experimento (Figura 23). En conjunto, los aislamientos en semillas de soja mostraron niveles de bacterización y permanencia intermedios respecto de las otras semillas testeadas: los recuentos fueron más sostenidos que en maíz, pero con un decaimiento mayor que el observado en trigo (Figuras 20, 21 y 23). El aislamiento RBAN4-*yfp* y la cepa de referencia 1008-*cfp* mostraron patrones prácticamente equivalentes en semillas de soja, llegando a valores muy similares de UFC recuperadas tanto en el control como en el tratamiento con aditivo. Estos recuentos fueron los más altos que se obtuvieron en el ensayo para cada tratamiento. En cuanto a SVMP4-*yfp*, esta cepa mostró niveles de recuperación bajos, aunque constantes hasta 4 dpi, al igual que como sucedió con trigo (Figuras 21 y 23). El desempeño de la cepa SVBP6-*mche* se asemejó al observado en semillas de maíz, con recuentos prácticamente nulos al 2° dpi en el tratamiento sin aditivo. Sin embargo, en este caso el agregado de Premax® mejoró notoriamente la bacterización, logrando recuperar células durante todo el ensayo, aunque en el día 0 no se había observado un incremento significativo en la recuperación con el aditivo (Figura 23). Se decidió ensayar, además del Premax®, la combinación de trehalosa y PVP que, aunque no dio buenos resultados a día 0, había mostrado mejoras en la bacterización de las otras semillas (Figura 18b). Como se observa en la Figura 23, el agregado de esta mezcla a la suspensión de inoculación no se diferenció del control sin aditivo durante el experimento.

Dado que aún se lograban recuperar células al 4° dpi en semillas de soja, se llevaron a cabo cinéticas más largas para comprobar si nuestras cepas de *Pseudomonas* eran capaces de mantenerse hasta 2 semanas post-inoculación (Figura 24). Cabe destacar que este experimento no se realizó con SVBP6-*mche* porque, como se observa en la Figura 23, no se detectaron colonias a 4 dpi en el tratamiento control, y los

recuentos en presencia de aditivo fueron bajos. Los resultados para las cinéticas a 15 días en semillas de soja revelaron una disminución en la bacterización para todas las cepas ensayadas, mucho más marcada que lo observado a 4 dpi. Incluso, en la primer semana post-inoculación, los recuentos sin aditivo fueron casi nulos para nuestros representantes del grupo de *P. chlororaphis*, SMMP3-*yfp*, RPAN1-*yfp*, SPAN5-*cfp*; y fueron muy bajos también para SVMP4-*yfp* (Figura 24). En cuanto al protector comercial, éste demostró ser efectivo hasta 2 spi donde los niveles de bacterización fueron significativamente más altos que en ausencia del mismo, excepto para SPAN5-*cfp*, para la cual no se recuperaron colonias; y para SVMP4-*yfp*, donde la recuperación no mejoró. Nuevamente, 1008-*cfp* y RBAN4-*yfp* fueron las cepas que mostraron el mejor desempeño en presencia de Premax®, con una caída en la recuperación menos pronunciada que el resto de los aislamientos y un buen nivel de bacterización a los 15 días de realizada la inoculación.

3.3.3 Evaluación de la suspensión utilizada en la inoculación en las condiciones de almacenamiento

Las suspensiones bacterianas de $DO_{600} = 1,0$ en solución salina a partir de las cuales se realizaron las mezclas de inoculación se almacenaron bajo las mismas condiciones que las semillas bacterizadas, con el objetivo de determinar si la viabilidad se veía afectada por las condiciones de almacenamiento. Para ello, tubos tipo Falcon de 15 ml conteniendo estas suspensiones se colocaron en la cámara de plantas en oscuridad a la temperatura adecuada, durante los 5 días de duración de las cinéticas a corto plazo. Nuestros resultados muestran que los recuentos bacterianos se mantuvieron estables y no se evidenciaron disminuciones significativas de la viabilidad durante el tiempo evaluado (Tabla 9), por lo que la temperatura de almacenamiento utilizada no explicaría el descenso en los recuentos en semilla vistos en las cinéticas.

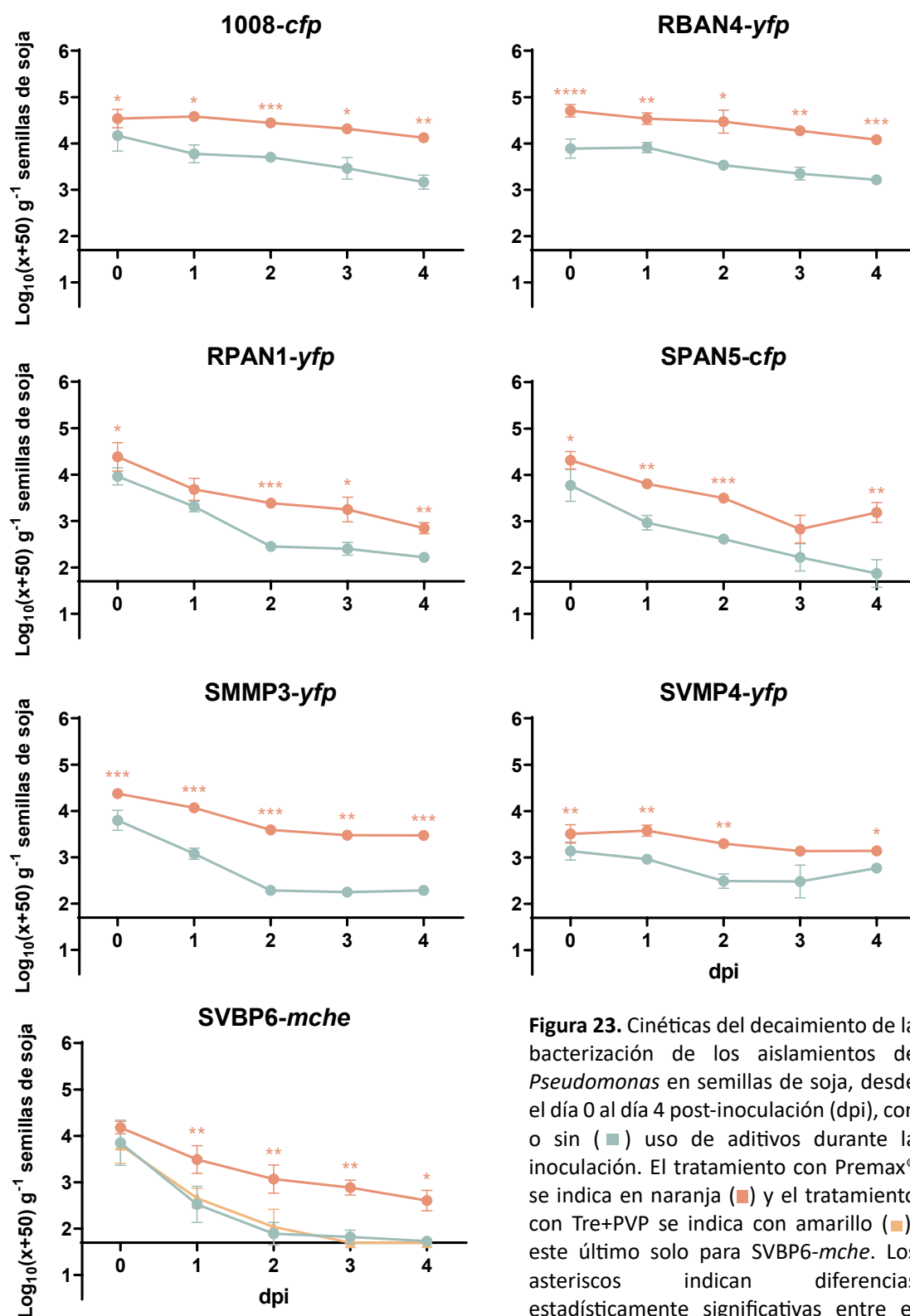


Figura 23. Cinéticas del decaimiento de la bacterización de los aislamientos de *Pseudomonas* en semillas de soja, desde el día 0 al día 4 post-inoculación (dpi), con o sin (■) uso de aditivos durante la inoculación. El tratamiento con Premax® se indica en naranja (■) y el tratamiento con Tre+PVP se indica con amarillo (■), este último solo para SVBP6-mche. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre el aditivo de su mismo color y el tratamiento control, en un mismo día (ANOVA de dos vías con LSD-Fisher, * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

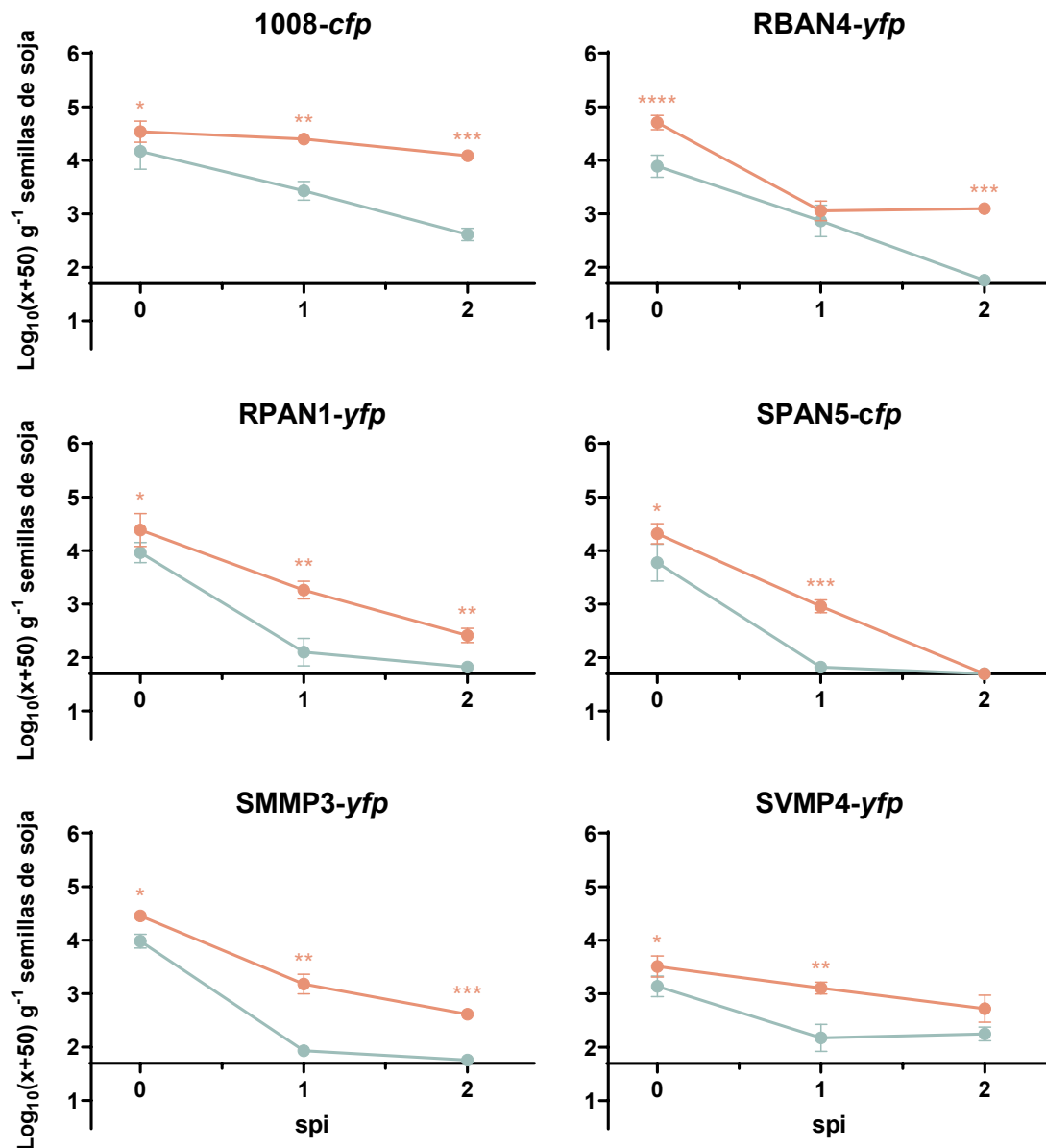


Figura 24. Cinéticas del decaimiento de la bacterización de los aislamientos de *Pseudomonas* en semillas de soja, desde el día 0 a la semana 2 post-inoculación (spi), con (■) o sin (□) uso del protector comercial Premax® durante la inoculación. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre el aditivo y el tratamiento control, en una misma semana (ANOVA de dos vías con LSD-Fisher, * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$).

Tabla 9. Monitoreo de la viabilidad de las suspensiones de los aislamientos ($\log_{10}(\text{UFC}+50)/\text{ml}$) empleadas en la inoculación de las semillas, incubadas bajo las mismas condiciones que las semillas bacterizadas durante 5 días

Días	SVBP6-mche			SVMP4-yfp			RBAN4-yfp			RPAN1-yfp			SPAN5-cfp			SMMP3-yfp			1008-cfp		
	Prom.	SD	ANOVA	Prom.	SD	ANOVA	Prom.	SD	ANOVA	Prom.	SD	ANOVA	Prom.	SD	ANOVA	Prom.	SD	ANOVA	Prom.	SD	ANOVA
0	9,02	0,14	ns	7,46	0,28	ns	8,56	0,03	c	9,06	0,07	a	8,45	0,26	ns	8,36	0,22	b	9,09	0,10	ns
1	9,11	0,06	ns	7,75	0,31	ns	8,88	0,20	ab	9,09	0,06	a	8,57	0,15	ns	8,89	0,04	a	8,98	0,11	ns
2	8,98	0,07	ns	7,69	0,13	ns	8,69	0,08	bc	9,20	0,08	a	8,28	0,17	ns	8,76	0,13	a	9,19	0,06	ns
3	9,16	0,02	ns	7,76	0,10	ns	9,11	0,06	a	9,17	0,05	a	8,35	0,37	ns	8,87	0,12	a	9,18	0,12	ns
4	9,02	0,06	ns	7,67	0,12	ns	8,98	0,07	a	9,21	0,05	a	8,77	0,12	ns	8,57	0,15	ab	9,17	0,08	ns

Prom. = promedio de las réplicas. Cada suspensión fue analizada por separado con ANOVA, con test de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

3.3.4 Evaluación de la germinación

Con el fin de estudiar si la inoculación con los aislamientos de *Pseudomonas* empleados en este trabajo y/o el uso de los distintos aditivos tenían un efecto en la germinación de semillas de maíz, trigo y soja, se evaluó diariamente en cada cinética la germinación de las semillas bacterizadas en agar agua 1%. No se detectaron alteraciones en el porcentaje de germinación de las semillas, el cual varió entre 80% y 100% en todos los ensayos, de forma equivalente a los controles con semillas sin tratar. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 25 una placa de Petri de cada semilla evaluada, que provienen de distintas cinéticas.

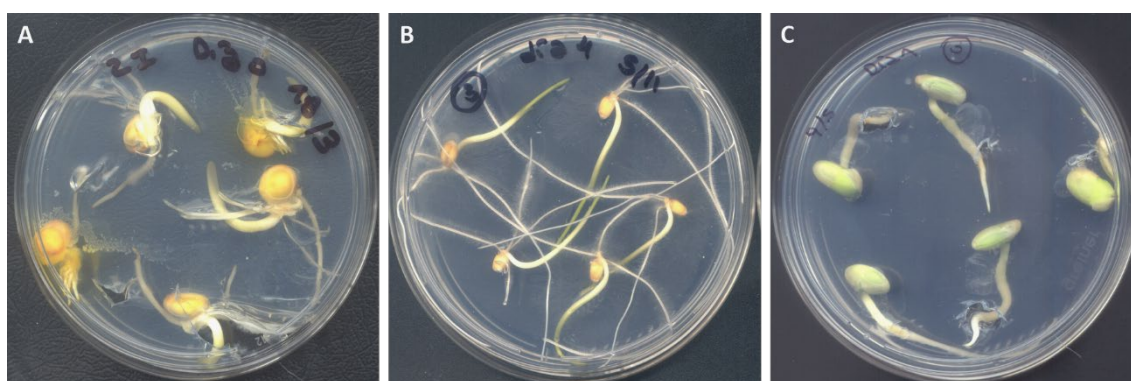


Figura 25. Placas de agar agua 1% p/v, utilizadas para evaluar germinación de las semillas tratadas, durante el transcurso de las cinéticas. **a)** Semillas de maíz inoculadas con la cepa SPAN5-*cfp* en el día 0, **b)** semillas de trigo inoculadas con SVBP6-*mche* en el día 4 post-inoculación, **c)** semillas de soja inoculadas con SVMP4-*yfp* en el día 1 post-inoculación.

3.3.5 Efecto de la pre-hidratación de las semillas sobre la recuperación

Dado que el uso de aditivos resultó favorable para aumentar los niveles de bacterización de las semillas, nos preguntamos si el desempeño de nuestros aislamientos podría verse afectado por un posible *shock* por desecación al entrar en contacto con las semillas secas, lo cual ocurre inmediatamente después de la inoculación [165].

En el caso de maíz, cuando las semillas se hidrataron previo a la inoculación, se detectaron niveles de bacterización muy altos para todas las cepas (excepto RBAN4-*yfp*), incluso mayores que los niveles mostrados en las semillas no hidratadas e inoculadas en presencia de Premax®. Además, se observó una pérdida del efecto mejorador del protector Premax® para todos los aislamientos (Figura 26). En particular, el impacto positivo de la hidratación de las semillas en la recuperación de SVMP4-*yfp* fue incluso

más significativo que el tratamiento con Premax® (Figura 26). Si consideramos que la dosis de inoculante utilizada para maíz corresponde a 5 µl de las suspensiones bacterianas por gramo de semillas, y que este volumen contiene 10^5 - 10^6 UFC, se recuperó entre el 0,3 y el 9,1% de las bacterias añadidas en semillas no hidratadas inoculadas en presencia de Premax®, mientras que dichos porcentajes no superaron el 0,5% cuando no se utilizaron aditivos. Dichas tasas de recuperación mejoraron significativamente con la pre-hidratación de las semillas, oscilando entre el 7,0 y el 12,0% con Premax® (Tabla 10). Sin embargo, para RBAN4-*yfp*, no hubo un aumento en el porcentaje de recuperación, dado que mostró los mismos valores de recuperación independientemente de la pre-hidratación o de la adición de Premax® (Figura 26). Incluso, algunos de los aislamientos que mostraron pérdida del efecto del aditivo con la pre-hidratación, alcanzaron porcentajes de recuperación mayores sin aditivo cuando las semillas se remojaron previamente (Tabla 10). En particular, para SVMP4-*yfp*, la recuperación a partir de semillas pre-hidratadas sin Premax® alcanzó el 29,5% de las bacterias inoculadas, lo cual contrasta fuertemente con el 1,8% de recuperación obtenida para la misma cepa en presencia de Premax® (Tabla 10).

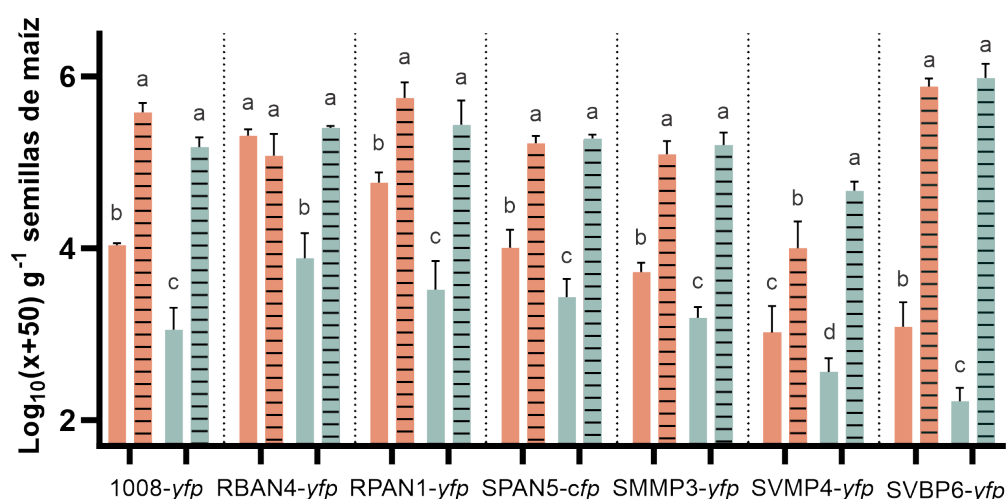


Figura 26. Recuperación de las *Pseudomonas* cultivables a partir de semillas de maíz con y sin hidratación previa a la bacterización. Se compararon los tratamientos con (■) y sin (□) la adición del protector comercial Premax®, y con (barras rayadas) o sin (barras lisas) el tratamiento de hidratación. Los datos fueron corregidos para expresar los valores según el peso de las semillas sin hidratar. La línea de base indica el valor $\log_{10}$ correspondiente al recuento nulo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada aislamiento (ANOVA con LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Tabla 10. Densidad celular de las suspensiones utilizadas para bacterizar las semillas de maíz y porcentaje de bacterias cultivables recuperadas a partir de las mismas

	UFC/ml $\pm$ SD ($\times 10^8$)	Porcentaje de bacterias recuperadas a partir de semillas de maíz en el día 0 ^a		Porcentaje de bacterias recuperadas a partir de semillas de maíz pre-hidratadas en el día 0 ^a	
		Sin Premax [®]	Con Premax [®]	Sin Premax [®]	Con Premax [®]
RBAN4- <i>yfp</i>	4,83 $\pm$ 2,57	0,37	9,13	13,88	7,3
RPAN1- <i>yfp</i>	9,17 $\pm$ 2,08	0,09	1,32	5,54	10,59
SMMP3- <i>yfp</i>	0,90 $\pm$ 0,24	0,35	1,21	13,24	10,56
SPAN5- <i>cfp</i>	0,95 $\pm$ 0,09	0,62	2,43	12,24	10,87
SVMP4- <i>yfp</i>	0,14 $\pm$ 0,05	0,51	1,83	29,47	6,99
SVBP6- <i>mche/yfp</i>	8,33 $\pm$ 2,31	0,01	0,47	15,08	11,95
1008- <i>yfp</i>	7,50 $\pm$ 3,91	0,03	0,29	3,83	9,41

^a Calculado como el número de UFC/g recuperado a partir de semillas, dividido por el número de UFC presente en las suspensiones por gramo de semilla en el momento de la inoculación.

SVBP6-*mche* se utilizó en los ensayos con semillas sin hidratar, y SVBP6-*yfp* en los experimentos con semillas pre-hidratadas.

Al igual que en maíz, la pre-hidratación de semillas de trigo dio como resultado la pérdida del efecto del protector Premax[®] y un aumento en los niveles de recuperación, al compararlos con las semillas sin hidratar (Figura 27). Sin embargo, este incremento fue de menor magnitud que para las semillas de maíz. Particularmente para RBAN4-*yfp* y SVMP4-*yfp*, el tratamiento de remojo de las semillas y la posterior inoculación sin aditivo no logró igualar la bacterización con Premax[®], como en el resto de los casos (Figura 27). Si se tiene en cuenta que la dosis de inoculante utilizada para trigo corresponde a 8 μ l de las suspensiones bacterianas por gramo de semillas, conteniendo entre 10^5 - 10^6 UFC, se recuperó entre 0,6 y 12,8% de las bacterias inoculadas a partir de semillas secas en presencia de Premax[®] (Tabla 11). Porcentajes similares se obtuvieron cuando las bacterias se inocularon solo con solución salina, dado que en el caso de trigo no se evidenciaron grandes mejoras con el uso del Premax[®] a día 0 (Figura 16). Por su parte, la pre-hidratación de las semillas aumentó entre 2 y 20 veces el porcentaje de bacterias recuperadas, el cual varió entre el 6,3 y el 21,7% con Premax[®] (Tabla 11). Los aislamientos pertenecientes al grupo *P. chlororaphis*, RPAN1-*yfp*, SPAN5-*cfp* y SMMP3-*yfp*, y el aislamiento SVBP6-*yfp* fueron aquellos que respondieron más fuertemente a la pre-hidratación. Además, para los tres primeros, el efecto de la pre-hidratación aumentó de forma pareja los valores de recuperación con y sin aditivo. En cambio, SVBP6-*yfp* y

1008-*cfp* mostraron porcentajes de recuperación más altos con la pre-hidratación en ausencia de aditivo que en presencia del mismo, sugiriendo que el efecto del aditivo no es suficiente para proteger completamente a las células del *shock* por desecación. Solo para RBAN4-*yfp* y SVMP4-*yfp* se vio un efecto positivo combinado de la pre-hidratación y del uso del aditivo (Tabla 11).

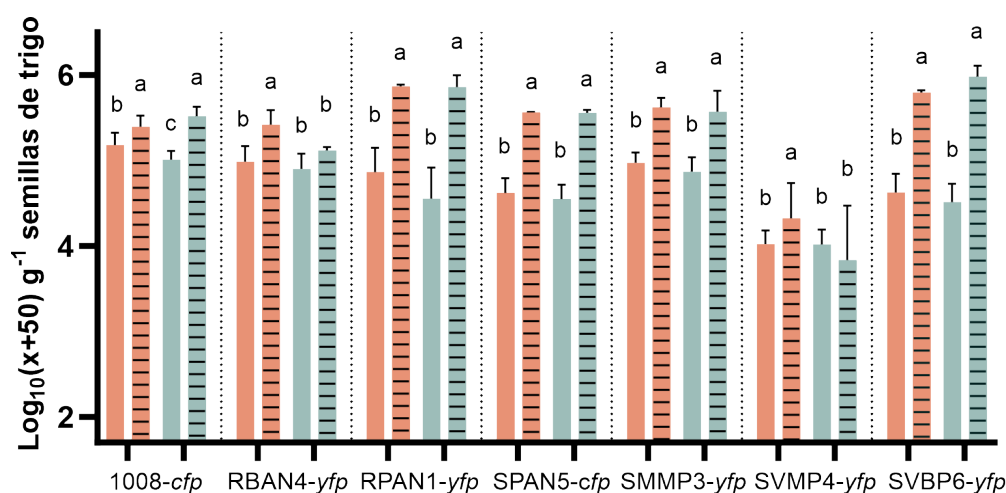


Figura 27. Recuperación de las *Pseudomonas* cultivables a partir de semillas de trigo con y sin hidratación previa a la bacterización. Se compararon los tratamientos con (■) y sin (■) la adición del protector comercial Premax®, y con (barras rayadas) o sin (barras lisas) el tratamiento de hidratación. Ver la leyenda de la Figura 18 para más detalles. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada aislamiento (ANOVA con LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Tabla 11. Densidad celular de las suspensiones utilizadas para bacterizar las semillas de trigo y porcentaje de bacterias cultivables recuperadas a partir de las mismas

	UFC/ml $\pm$ SD ($\times 10^8$)	Porcentaje de bacterias recuperadas a partir de semillas de trigo en el día 0 ^a		Porcentaje de bacterias recuperadas a partir de semillas de trigo pre-hidratadas en el día 0 ^a	
		Sin Premax®	Con Premax®	Sin Premax®	Con Premax®
RBAN4- <i>yfp</i>	1,38 $\pm$ 1,26	7,26	7,79	10,03	21,68
RPAN1- <i>yfp</i>	11,28 $\pm$ 2,41	1,26	0,98	8,39	8,43
SMMP3- <i>yfp</i>	2,00 $\pm$ 1,38	5,52	6,14	12,50	12,90
SPAN5- <i>cfp</i>	3,48 $\pm$ 2,75	2,60	1,61	17,29	16,87
SVMP4- <i>yfp</i>	0,27 $\pm$ 0,23	4,64	5,51	5,17	9,59
SVBP6- <i>yfp</i>	12,33 $\pm$ 3,65	0,49	0,56	10,13	6,31
1008- <i>cfp</i>	1,35 $\pm$ 0,50	8,90	12,75	25,74	19,60

^a Calculado como el número de UFC/g recuperado a partir de semillas, dividido por el número de UFC presente en las suspensiones por gramo de semilla en el momento de la inoculación.

Aunque el tratamiento de pre-hidratación de las semillas de soja no resultó tan efectivo como en maíz y en trigo para alcanzar una mayor bacterización, en la mayoría de las inoculaciones de las semillas hidratadas se logró igualar o superar los niveles de recuperación de las semillas secas inoculadas con Premax® (Figura 28). No se observaron diferencias con el protector comercial cuando las semillas se hidrataron antes de inocular, a pesar de que el Premax® había mejorado la bacterización de semillas de soja sin hidratar en todos los aislamientos, excepto para SVBP6-*mche* (Figura 18).

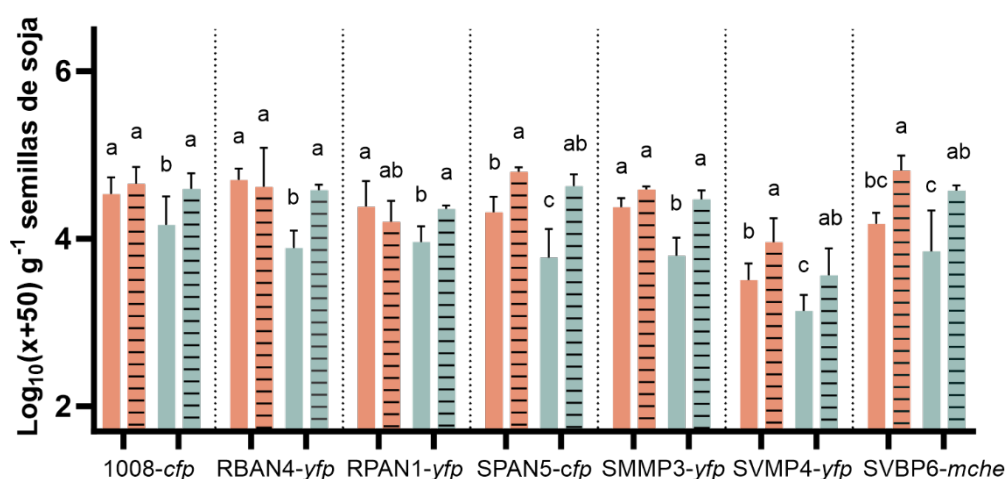


Figura 28. Recuperación de las *Pseudomonas* cultivables a partir de semillas de soja con y sin hidratación previa a la bacterización. Se compararon los tratamientos con (■) y sin (■) la adición del protector comercial Premax®, y con (barras rayadas) o sin (barras lisas) el tratamiento de hidratación. Ver la leyenda de la Figura 18 para más detalles. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada aislamiento (ANOVA con LSD-Fisher, $p < 0,05$).

Tabla 12. Densidad celular de las suspensiones utilizadas para bacterizar las semillas de soja y porcentaje de bacterias cultivables recuperadas a partir de las mismas

	UFC/ml $\pm$ SD ($\times 10^8$)	Porcentaje de bacterias recuperadas a partir de semillas de soja en el día 0 ^a		Porcentaje de bacterias recuperadas a partir de semillas de soja pre-hidratadas en el día 0 ^a	
		Sin Premax®	Con Premax®	Sin Premax®	Con Premax®
RBAN4-yfp	1,88 $\pm$ 0,42	11,63	69,93	66,38	100,00
RPAN1-yfp	14,58 $\pm$ 2,31	1,72	3,11	4,49	3,46
SMMP3-yfp	0,86 $\pm$ 0,38	21,02	71,50	57,94	74,02
SPAN5-cfp	1,79 $\pm$ 0,31	10,56	31,34	65,48	96,10
SVMP4-yfp	0,27 $\pm$ 0,22	13,98	32,70	22,01	55,02
SVBP6-mche	9,50 $\pm$ 4,25	4,16	4,21	13,80	24,88
1008-cfp	5,50 $\pm$ 0,95	8,59	17,13	15,93	18,16

^a Calculado como el número de UFC/g recuperado a partir de semillas, dividido por el número de UFC presente en las suspensiones por gramo de semilla en el momento de la inoculación.

En el caso de soja, el volumen de suspensión bacteriana utilizado para inocular un gramo de semillas fue de 0,4 μ l, mucho menor que el requerido en trigo y maíz. Esto se debe a que en soja siempre se inocula con el rizobio correspondiente, lo cual ya incorpora una cantidad de líquido en la semilla. Considerando que el volumen de suspensión de *Pseudomonas* empleado contiene entre 10^4 - 10^5 UFC, con el protector comercial se alcanzó una recuperación del 3,1% al 71,5% a partir de semillas sin hidratar (Tabla 12). Estos porcentajes fueron superiores a los obtenidos en las otras dos semillas en todos los casos. Incluso sin aditivo los porcentajes de recuperación a partir de las semillas secas de soja fueron muy superiores (entre 17 y 416 veces) a los de las semillas secas de maíz (Tablas 10 y 12). Con el pre-tratamiento de hidratación de las semillas de soja los porcentajes de recuperación fueron incluso mejores, alcanzando el 100% para RBAN4-*yfp* y el 96,1% para SPAN5-*cfp*, en presencia de Premax®. El único aislamiento que no presentó un incremento destacable en el porcentaje de bacterias recuperadas fue RPAN1-*yfp*, que alcanzó valores de recuperación similares al tratamiento sin hidratación con Premax® (Tabla 12).

Discusión

Generalmente, se asume que distintas bacterias pueden adherirse y sobrevivir en la superficie de las semillas con un éxito similar [251]. En consecuencia, este aspecto no suele ser estudiado en los microorganismos candidatos al desarrollo de un inoculante, aun cuando la inoculación es el paso crítico y fundamental para incorporar a estos microorganismos en el agroecosistema. En este capítulo se ha demostrado el comportamiento diferencial de diversas especies del género *Pseudomonas* en la superficie de semillas de maíz, trigo y soja. Estas diferencias se detectaron entre aislamientos, incluso al aplicarlos en un mismo tipo de semilla. Al compararlos con una cepa comercial de *Pseudomonas* utilizada como bioinsumo para cultivos extensivos [129], se encontró que algunos aislamientos lograron niveles de bacterización más altos, equivalentes o más bajos en el día 0 (Figuras 15, 17 y 19), con densidades que variaron entre $0,4$ y $8,8 \times 10^3$ UFC/g de semilla de maíz; entre $0,1$ y $1,1 \times 10^5$ UFC/g de semilla de trigo; y entre $0,1$ y $1,9 \times 10^4$ UFC/g de semilla de soja sin aditivos, dependiendo del aislamiento considerado (Tabla 8).

En general, los niveles de bacterización en semillas de maíz a día 0 fueron menores en comparación con los obtenidos en trigo, y levemente más bajos en ciertos casos respecto de soja. Además, se observaron amplias diferencias entre aislamientos en maíz (Figura 15). En contraste, la bacterización de las semillas de trigo fue más pareja entre cepas, con los recuentos más altos de todo el ensayo (Figura 16 y Tabla 8). Esta última observación coincide con estudios recientes que indican que la superficie de la semilla de trigo presenta una mayor carga microbiana natural en comparación a maíz, siendo de $7,1 \times 10^4$ UFC/semilla y $5,4$ UFC/semilla, respectivamente [270]. En soja, la carga recuperada en el día 0 fue levemente superior que en maíz en algunos casos (Figura 18 y Tabla 8), con recuentos similares entre aislamientos, al igual que en trigo (Figura 19). Si consideramos que el área superficial promedio de un bacilo del género *Pseudomonas* es $0,75 \mu\text{m}^2$ [68], y que el área promedio de una semilla de maíz de la variedad utilizada en nuestros experimentos es de 1250 mm^2 , las densidades alcanzadas implican una cobertura del $0,00001$ – $0,006\%$ de la superficie de la semilla. En el caso de trigo, con una superficie aproximada de 56 mm^2 por semilla, estos valores oscilan entre $0,0005$ y un $0,007\%$, mientras que en soja, cuya semilla tiene un área de aproximadamente 850 mm^2 ,

la cobertura varía entre 0,00002 y 0,001%. Con estas estimaciones, vemos que la ocupación de las semillas alcanzó porcentajes muy bajos en los tres casos, aunque la cobertura más alta se dio en las semillas de trigo. Cabe destacar que estos cálculos no tienen en cuenta la rugosidad diferencial de cada semilla. Estudios previos también han reportado una distribución heterogénea de las bacterias en la superficie de semillas de otros cultivos [271], [272]. Por ejemplo, un estudio de microscopía confocal en semillas de cebada inoculadas con *P. chlororaphis* mostró que las células bacterianas tienden a ocupar zonas específicas, como el surco central de la semilla [272]. Dado que el trigo y la cebada son fenotípica y genotípicamente similares [273], es probable que los aislamientos utilizados en nuestro estudio presenten una distribución espacial parecida en trigo, concentrándose en el surco central. Además, en el mismo estudio se observó que solo el 10% de las bacterias cuantificadas por microscopía en la superficie de las semillas pudieron ser recuperadas con recuentos en placa 20 hs post-inoculación [272].

Curiosamente, los aislamientos SVMP4-*yfp* y SVBP6-*mche* presentaron los recuentos más bajos en las tres semillas analizadas (Figuras 15, 17 y 19). La adhesión a las semillas en *Pseudomonas* se ha relacionado a la síntesis de proteínas de la superficie celular, como LapA y LapF, así como a la presencia de flagelos y pili [50], [78], [274], [275]. Entonces, diferencias en las propiedades bioquímicas y/o de expresión de estas macromoléculas en las cepas probadas podrían afectar su capacidad para adherirse a las semillas y, en consecuencia, repercutir en el número de bacterias recuperadas. Consistentemente con nuestros resultados de bacterización de semillas, la evaluación de la capacidad de adhesión a superficies abióticas, como el poliestireno, han demostrado que RBAN4, RPAN1, SPAN5 y SMMP3 se adhieren de manera más eficiente a dicha superficie en comparación con SVBP6 y SVMP4 [145]. Esta tendencia puede reflejar la capacidad de estos aislamientos para adherirse a superficies naturales, como las semillas, y explicaría parcialmente los bajos niveles de bacterización observados en SVMP4-*yfp* y SVBP6-*mche*.

La incorporación de aditivos en formulados líquidos ha demostrado mejorar la densidad bacteriana en la superficie de semillas inoculadas con otros microorganismos, como *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* en soja [276], [277]. Nuestros resultados confirman que la bacterización de semillas aumentó significativamente al agregar diferentes protectores y/o adhesivos en las suspensiones bacterianas, en la mayoría de los casos.

En maíz y en soja, la eficacia del aditivo comercial Premax® se observó inmediatamente después de inocular en el día 0 (Figuras 14a y 18a), siendo SVBP6-*mche* el único aislamiento que no mostró mejoras en semillas de soja. En maíz, la magnitud del incremento varió según el aislamiento, mientras que en soja el aumento fue más similar entre cepas. En comparación con otros estudios, nuestros resultados en semillas de maíz coinciden con lo reportado para aislamientos de *Pseudomonas* inoculados con distintas metodologías. Por ejemplo, un derivado de la cepa de *P. putida* mt-2 alcanzó una carga de 2×10^6 UFC por semilla de maíz mediante bio-*priming*, a pesar de que esta técnica utiliza volúmenes de inóculo significativamente mayores a los que se usaron en el presente trabajo [278]. En nuestro estudio, *P. protegens* RBAN4-*yfp* logró 1×10^5 UFC por semilla de maíz en presencia del aditivo Premax® a día 0, inoculando una menor cantidad de células, lo que podría señalar cierta limitación de estos métodos para favorecer la adhesión de una mayor cantidad de bacterias. En trigo, a diferencia de lo observado en maíz y soja, la adición de Premax® no resultó en una mayor recuperación de UFC en el día 0 (Figura 16). Dada la alta carga bacteriana inicial en esta semilla, los espacios disponibles podrían estar cerca del límite de ocupación bajo las condiciones de inoculación empleadas.

Como se mencionó, SVMP4-*yfp* y SVBP6-*mche* mostraron los niveles más bajos de recuperación a día 0 en semillas de maíz (Figura 14a). Sin embargo, la bacterización de SVMP4-*yfp* mejoró con el agregado de glicerol, trehalosa, o la combinación trehalosa y PVP, en comparación al Premax® (Figura 14b). En contraste, SVBP6-*mche* se comportó de manera similar tanto con Premax® como con la mezcla de trehalosa y PVP (Figura 14c). El uso de glicerol como aditivo en formulaciones líquidas para *Pseudomonas* ha sido probado con distinto grado de éxito, en concentraciones que varían desde 2% al 12,5% [178], [264], [279]. Su mecanismo de acción consiste en el mantenimiento de los niveles de humedad en la formulación, y la protección de las células al disminuir la tasa de deshidratación, al igual que ocurre durante la preservación de cultivos microbianos [280]. Por su parte, en trigo, la combinación de trehalosa con PVP incrementó la bacterización a día 0 únicamente en RPAN1-*yfp*, SPAN5-*cfp* y SVMP4-*yfp* (Figura 16). Como vimos en el Capítulo 2, SVBP6 y SVMP4 no son capaces de metabolizar la trehalosa (Figura 10). En concordancia con estos resultados, los análisis genómicos de SVBP6 revelaron la ausencia de genes homólogos asociados con el metabolismo de la trehalosa

(*treP*, *treA* y *treR*). Aunque no hemos secuenciado el genoma de SVMP4, estos genes tampoco están presentes en los genomas de otros aislamientos de *P. soli*. Con un enfoque similar, encontramos genes homólogos relacionados con la síntesis de trehalosa, como *treS* y *treY/Z*, tanto en SVBP6 como en otros aislamientos de *P. soli* y de *P. chlororaphis*, incluyendo SMMP3, cuyo genoma está secuenciado. En línea con esto, la introducción del operón *otsBA* de *E. coli* en la cepa *P. putida* KT2440, involucrado en la síntesis de trehalosa, mejora notablemente la alta sensibilidad al estrés por desecación de esta cepa, por acumulación de la molécula en el citoplasma [281]. Entonces, bajo las condiciones experimentales estresantes por la deshidratación súbita que ocurre en la bacterización de semillas, es posible que nuestros aislamientos capaces de producir trehalosa no activen esta ruta de síntesis, o que la cantidad de trehalosa sintetizada no sea suficiente para contrarrestar los efectos de la desecación rápida, como ocurre en la cepa de *P. putida* KT2440 sin modificar [175]. Incluso, se ha reportado que esta bacteria induce un estado viable pero no cultivable (VBNC, por sus siglas en inglés *viable but non-culturable*) bajo tales condiciones de estrés [282], [283]. Por otro lado, tanto SVMP4-*yfp* como SVBP6-*yfp* no vieron modificados sus niveles de bacterización en semillas de maíz con el agregado de 20 mM de trehalosa al medio de cultivo (datos no mostrados). Por lo tanto, hipotetizamos que ambos aislamientos no son capaces de internalizar esta molécula. La eficacia de la combinación de trehalosa con PVP en estas cepas, entonces, podría deberse a la modificación de las condiciones externas, favoreciendo la adherencia y reduciendo los efectos de la desecación por protección del entorno. Una variedad de trabajos ha documentado el efecto benéfico de la trehalosa en bacterias no productoras de este disacárido bajo diversos estreses [240], [284], [285]. Además, el rol protector de la combinación de trehalosa con PVP se ha reportado en distintos géneros bacterianos [176], [286]. Dado que tanto SVBP6 como SVMP4 pertenecen al subgrupo de *P. putida* [287], se sugiere que estos aislamientos también podrían entrar en el estado VBNC post-inoculación en respuesta al proceso de desecación en la superficie de las semillas, lo que explicaría la disminución posterior en los recuentos, principalmente en maíz. Pazos-Rojas y colaboradores han reportado que, tanto la rápida rehidratación en presencia de exudados radiculares de maíz como la interacción con las raíces de este mismo cultivo, permiten que las células VBNC de *P.*

putida KT2440 retornen al estado cultivable [283]. Un abordaje similar podría dilucidar si este es también el caso de nuestras cepas.

Dado que la pre-inoculación es una práctica muy común en leguminosas, la mayor parte de la bibliografía disponible sobre supervivencia en semillas se centra casi totalmente en rizobios. Todos estos estudios reportan una disminución de la densidad bacteriana en los días posteriores a la inoculación [183], [288], [289], fenómeno que también observamos en nuestras cinéticas. En particular, en soja se ha evaluado la supervivencia en semillas pre-inoculadas con diferentes especies de rizobios, en combinación con aditivos y tiempos variables: hasta 5, 10, 15, 30, 45 y 60 días post-inoculación [290], [291], [261], [292]. Interesantemente, se ha probado el efecto del almacenamiento de semillas de soja pre-inoculadas con *B. japonicum* (del inoculante Rizoliq LLI®, comercializado por RASA) en presencia del protector Premax® a 30, 45 y 60 días post-inoculación. Aunque la cantidad de bacterias en semilla disminuyó en algunos tratamientos, en todos los casos se obtuvo un desempeño a campo equivalente al de semillas inoculadas en el mismo día de la siembra [292]. Respecto de *Pseudomonas*, existen escasos o nulos trabajos publicados que empleen una metodología similar para evaluar la sobrevivencia en semillas de maíz, trigo y soja pre-inoculadas.

En nuestro caso, al analizar las cinéticas de maíz notamos que el aditivo Premax® mejoró la recuperación de RBAN4-*yfp* hasta 3 dpi (Figura 20), siendo este aislamiento el que obtuvo los recuentos más altos a lo largo del ensayo con esta semilla, junto con 1008-*yfp*. Sin embargo, a 4 dpi este incremento desaparece, alcanzando aproximadamente 10^3 UFC/g de semillas, independientemente de la presencia o ausencia del protector comercial. Un estudio con un abordaje similar al nuestro en *P. putida* KT2440, mostró que esta bacteria es recuperada hasta 9 días post-inoculación a partir de semillas de maíz almacenadas a 30 °C [293]. Ensayos adicionales que superen los 5 días permitirían averiguar si RBAN4 es capaz de permanecer por más tiempo en la superficie de las semillas de maíz. Adicionalmente, en las pruebas a día 0 con otra variedad de maíz (SY860 TD/TG C18M) tanto RBAN4-*yfp* como la cepa de referencia 1008-*yfp* alcanzaron los niveles de bacterización más altos, evidenciando un patrón análogo independientemente de la variedad de maíz empleada (Tabla 7). En trigo, si bien durante las cinéticas cortas solo ciertos aislamientos lograron un incremento en sus niveles de bacterización en presencia de trehalosa-PVP y/o Premax® (Figura 21), el

efecto de estos protectores se volvió más evidente luego de 7 dpi, cuando los recuentos comenzaron a disminuir (Figura 22). Además de la cepa de referencia 1008-*cfp*, RBAN4-*yfp* y SMMP3-*yfp* alcanzaron los títulos más altos a las 4 semanas de ensayo, con aproximadamente $3,7 \times 10^2$ UFC/g en presencia de Premax® y 7×10^2 UFC/g con trehalosa y PVP, respectivamente. Es importante destacar que, a pesar de su alta sensibilidad a la desecación demostrada en maíz y sus bajos niveles iniciales de bacterización, SVMP4-*yfp* alcanzó recuentos cercanos a los anteriores en trigo ($1,7 \times 10^2$ UFC/g), en presencia del protector comercial. En el caso de soja, se observó un efecto positivo del Premax® durante las cinéticas a corto y largo plazo, incluso más notorio que en trigo y maíz (Figuras 23 y 24). Los aislamientos se mantuvieron en semilla hasta 4 dpi, de manera comparable a lo ocurrido en trigo. Tanto la cepa de referencia 1008-*cfp* como nuestro aislamiento RBAN4-*yfp*, lograron los recuentos más altos a los 15 días post-inoculación, siendo $1,22 \times 10^4$ UFC/g y $1,24 \times 10^3$ UFC/g con Premax®, respectivamente. Estos resultados contrastan con el resto de los aislamientos, que fueron detectados en muy baja cantidad luego de 7 dpi (Figura 24).

El comportamiento excepcional de *P. protegens* RBAN4-*yfp* en los cultivos evaluados (Tabla 2), muchas veces más eficiente que *P. pergaminensis* 1008-*yfp/cfp* en cuanto a bacterización y persistencia en la superficie de las semillas, sugiere la presencia de características fisiológicas que permiten el mantenimiento de la viabilidad y cultivabilidad a lo largo del periodo evaluado. Este fenómeno podría facilitar la implementación de una estrategia de pre-inoculación de semillas de maíz, trigo y soja con esta cepa. Los miembros de la especie *P. protegens* son reconocidos por sus múltiples capacidades de promoción del crecimiento de las plantas, principalmente asociadas con el biocontrol [294], por lo que resulta esencial preservar las células viables durante la siembra para que estas colonicen la rizósfera. Sin embargo, se ha visto que la cepa modelo *P. protegens* CHA0 ingresa en un estado VBNC bajo condiciones de estrés, como la desecación o la baja disponibilidad de nutrientes, y en hábitats del suelo específicos [295], [296]. Posteriormente, las células pueden retornar al estado cultivable en ciertos casos, si se elimina la causa que genera dicho desbalance [297]. De manera similar, RBAN4 podría adquirir este estado bajo condiciones de estrés, como ocurre en la superficie de las semillas [183]. De ser así, el desempeño de esta cepa podría ser aún mayor que el observado empíricamente en nuestros resultados.

Las diferencias observadas en la persistencia de bacterias viables y cultivables en la superficie de las semillas de trigo, maíz y soja podrían estar relacionadas, en parte, con propiedades particulares de la superficie de cada semilla. Parámetros como la carga, humectabilidad, rugosidad, topografía y rigidez de las superficies son factores clave que influyen en la adhesión bacteriana y, consecuentemente, en la posterior formación de biofilms [298]. Por ejemplo, en semillas que han evolucionado para ser dispersadas mediante vías acuáticas, se ha documentado que ciertas microestructuras superficiales dificultan el anclaje de microorganismos [299]. Aun así, estudios previos han mostrado que cuanto mayor es la rugosidad de una superficie, mayor es la adhesión bacteriana [300]. El impacto de estas propiedades sobre la capacidad de adhesión de *Pseudomonas* ha sido comprobado en especies como *P. putida* KT2440 y *P. aeruginosa* [301], [302], [303]. En particular, los buenos resultados en trigo sugieren que esta semilla podría proporcionar un entorno más favorable para la adhesión y la formación de biofilms, probablemente debido a una mayor rugosidad o por la presencia del surco central. Dado que la disposición en biofilms confiere una mayor resistencia a condiciones de estrés en *Pseudomonas*, como la desecación [304], [305], explicaría la mayor persistencia de las bacterias en las semillas de trigo que observamos en este trabajo. Por otro lado, la composición química de las capas externas de la semilla podría tener un papel relevante en la adhesión. Algunos autores incluso mencionan que la presencia de sustancias inhibitorias propias de la misma semilla puede afectar negativamente la supervivencia de los rizobios [163]. En el caso de maíz, se ha visto que la capa de cera que recubre la cutícula está compuesta por una mayor cantidad de ácidos grasos en comparación a la de soja. Además, un análisis mediante microscopía electrónica reveló que la cutícula de maíz presenta una estructura estriada, con pequeños agregados cerosos, en contraste con la cutícula de soja, que es más irregular y presenta protrusiones y depresiones, con agregados cerosos más grandes [306]. Estas diferencias en la topografía de las semillas producen que la superficie de soja sea más rugosa, lo que posiblemente favorezca la adhesión bacteriana, impactando en la persistencia de las bacterias en la semilla como observamos en las cinéticas de soja (Figuras 23 y 24).

Por otro lado, Hartley y colaboradores evaluaron el efecto de la actividad del agua sobre los rizobios durante el proceso de desecación en semillas de leguminosas forrajeras, y observaron una correspondencia entre el descenso en la actividad del agua

y la sobrevivencia de estas bacterias. Además, observaron variabilidad en las tasas de deshidratación entre las distintas semillas, y respuestas diferenciales al utilizar distintos aditivos [183]. Esto sugiere que variaciones en las tasas de retención de humedad por parte de las semillas evaluadas podrían afectar la persistencia de las bacterias adheridas. Otros estudios señalan el estado de crecimiento de las células al momento de mezclarlas con el aditivo como un factor relevante para la sobrevivencia de las mismas, ya que impacta directamente en la viabilidad de las células incorporadas (células activas, esporas o células aglomeradas, entre otros) [307]. En un trabajo por Schoebitz y colaboradores, se demostró que la supervivencia de una cepa de *Azospirillum brasilense* encapsulada en alginato depende de la fase de crecimiento en la que se encuentra el inóculo al momento de la encapsulación. En contraste, para *Raoultella terrigena* no se observaron diferencias con células en fase exponencial o estacionaria [171]. Esto último tiene sentido dado que la fase de crecimiento óptima para incrementar la tolerancia a la desecación varía entre microorganismos. Sin embargo, en general, las células en fase estacionaria tienden a ser más resistente a los estreses físicos [308], [309]. En concordancia con lo anterior, se vio que, bajo condiciones de deficiencia nutricional, envejecimiento o estrés por calor, *Azospirillum* induce la formación de agregados celulares, que aumentan la tolerancia a estreses abióticos. La carga de esta bacteria en macroesferas de almidón/quitosano fue mayor cuando se utilizaron agregados celulares para la encapsulación [310]. Aunque en todos nuestros ensayos se utilizaron células en fase estacionaria, sería interesante evaluar si existen cambios al emplear bacterias en fase exponencial. De todas maneras, si se pretende una producción a gran escala, no sería factible obtener formulados en crecimiento exponencial.

Por último, la pre-hidratación de las semillas de maíz mostró un efecto aún mayor en los niveles de bacterización de todos los aislamientos en comparación con la adición de protectores (Figura 26). Estos resultados sugieren que nuestros aislamientos de *Pseudomonas* experimentan un *shock* por desecación en la superficie de la semilla, lo que provoca una reducción importante en su cultivabilidad en ausencia de aditivos. El efecto de la pre-hidratación fue más pronunciado para SVMP4-*yfp* que, como se mencionó anteriormente, mostró los niveles más bajos de bacterización (Tabla 10). En el caso de trigo, aunque la pre-hidratación de las semillas superó el efecto del agregado de protectores en la suspensión de inoculación (Figura 27 y Tabla 11), el impacto fue mucho

menor que el observado en maíz (Figura 26). Si consideramos que la semilla de trigo, sin pre-hidratar, ya presenta una alta ocupación de los espacios disponibles, con la hidratación y la posterior bacterización es posible que se alcance el límite de ocupación. En cuanto a soja, la pre-hidratación de las semillas aumentó la recuperación bacteriana en algunos casos, principalmente en ausencia del aditivo Premax®. En presencia del protector, la hidratación solo mejoró significativamente los niveles de bacterización de los aislamientos SPAN5-*cfp*, SVMPP4-*yfp* y SVBP6-*mche* (Figura 28), aunque este efecto fue menor que en maíz. Por otro lado, los porcentajes de recuperación de bacterias en soja respecto de la cantidad inoculada fueron mayores en comparación con los otros cultivos, con o sin pre-hidratación de las semillas (Tabla 12). Esto podría indicar, como vimos, que la superficie de la semilla de soja ofrece características más favorables para la adhesión de los aislamientos de *Pseudomonas*, en comparación con las otras semillas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la cantidad de bacterias inoculadas en soja fue mucho menor (0,5 ml/kg), respecto de trigo (10 ml/kg) y maíz (7,5 ml/kg). Por lo tanto, un porcentaje de recuperación mayor puede estar únicamente vinculado a la menor cantidad de células aplicadas. Sería interesante evaluar nuevamente los niveles de bacterización en soja aumentando la cantidad de bacterias inoculadas, para determinar si esto genera cambios en el número de bacterias que se recuperan; o si con esta cantidad se alcanza el límite de espacios ocupados, teniendo en cuenta que en soja también se aplican inoculantes basados en rizobios. Algunas pruebas previas que hemos realizado en maíz, utilizando densidades ópticas superiores a 1, no resultaron en un incremento consistente en el nivel de bacterias adheridas a la semilla (no mostrado), por lo que se podría hipotetizar que la dosis utilizada en soja es suficiente para alcanzar el máximo de bacterización.

Conclusiones

En este capítulo, se analizó el comportamiento de cada uno de los aislamientos de *Pseudomonas* en la superficie de semillas de maíz, trigo y soja, así como también el efecto de distintos aditivos. Nuestros resultados reflejan que la bacterización es dependiente de la semilla y de la especie bacteriana: en trigo y soja se obtienen las bacterizaciones más estables y duraderas, sugiriendo una superficie seminal más favorable para la adhesión de estos aislamientos. Además, el efecto protector de los aditivos evaluados también varía con cada sistema bacteria-semilla. De nuestros aislamientos analizados, RBAN4-*yfp* posee las características más favorables para adherirse y alcanzar altos niveles de bacterización en las tres semillas evaluadas. Particularmente, los aislamientos SVMP4-*yfp* y SVBP6-*mche*, muestran desempeños muy diferentes y particulares para cada una de las semillas probadas. Por otro lado, existe un efecto negativo y diferencial de la deshidratación de las semillas sobre la adhesión y/o supervivencia de las células de *Pseudomonas*, lo que sugiere que este *shock* por desecación tendría diferente incidencia en cada uno de los sistemas bacteria-semilla.

Capítulo 4: Análisis de la colonización radicular de los aislamientos de *Pseudomonas* por microscopía confocal

Introducción

La colonización de la rizósfera es un paso crucial para el establecimiento de las interacciones planta-microorganismo, las cuales son determinantes para el mantenimiento de la salud y de una alta productividad en las plantas. Como mencionamos en el Capítulo 1, este proceso complejo puede iniciar desde la rizósfera, con la quimioatracción de los microorganismos hacia la raíz, o desde la semilla, por los microorganismos presentes a medida que emerge la radícula. Las bacterias entonces deberán adherirse a la superficie de la raíz, para luego formar microcolonias y, posteriormente, biofilms [248]. En las proteobacterias, el mecanismo de adhesión generalmente se desarrolla en dos fases bien diferenciadas: la adhesión primaria y la adhesión secundaria. La adhesión primaria o adsorción se caracteriza por la unión reversible de las bacterias a la superficie de la raíz. Esto implica la formación de uniones débiles e inespecíficas, mediadas por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre las células bacterianas y las moléculas de la superficie radicular [248], [311]. Además de esta interacción inicial, ciertos factores de adhesión especie-específicos forman asociaciones más fuertes, aunque aún reversibles, como las proteínas de la superficie de la bacteria, los polisacáridos, flagelos y pili [312]. Por ejemplo, en bacterias del género *Pseudomonas* se ha visto que la porina F de la membrana externa (OprF), está involucrada en la adhesión inicial a las raíces [313], [314].

Una vez lograda la adsorción exitosa, el proceso avanza hacia la fase de adhesión secundaria, caracterizada por la unión irreversible de las bacterias al rizoplaneo. Durante esta etapa se induce la síntesis de fibrillas de celulosa extracelular y la producción de factores de adhesión secundarios específicos de cada especie, que promueven la acumulación de agregados bacterianos y la posterior formación de microcolonias [312]. Se ha demostrado que la producción de fibrillas extracelulares, particularmente de celulosa, no solo favorece la adhesión secundaria en especies de *Pseudomonas* [315], sino también en otras proteobacterias [316]. Como mencionamos en los capítulos anteriores, se han caracterizado factores adicionales en *P. putida* como la proteína de adhesión LapA de la superficie celular, que está involucrada en la iniciación del proceso de anclaje secundario [317], y la proteína LapF, cuya producción es necesaria para la disposición en microcolonias, ya que interviene en el establecimiento de interacciones

entre células bacterianas [274]. Ambas proteínas no solo han sido ligadas a la fijación a las raíces de las plantas, sino que también son críticas en la adhesión a semillas y otras superficies abióticas, sugiriendo que la colonización de ambos tipos de superficies seguiría mecanismos similares [78], [317].

En los últimos años, ha habido un creciente interés en los métodos que permiten obtener información detallada sobre la localización y visualización de los microorganismos durante las interacciones con el hospedador. Una de estas herramientas es la microscopía confocal de barrido laser (CLSM, por sus siglas en inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*) que, a diferencia de la microscopía de epifluorescencia convencional, adquiere la señal de fluorescencia únicamente del plano enfocado al utilizar un *pinhole* que excluye la luz fuera de dicho plano [318]. Dado que esta técnica permite la visualización de un microorganismo con una marca fluorescente en condiciones *in situ*, ha sido utilizada para evidenciar la colonización y la distribución espacial de distintos aislamientos de *Pseudomonas* en raíces de diversos cultivos, como la remolacha azucarera [319], cebada [320], [321], trigo [95] y tomate [322], e incluso en algunas especies de árboles [323]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente capítulo proponemos:

- Comprobar la colonización exitosa de nuestros aislamientos de *Pseudomonas* en plántulas de maíz, trigo y soja, a partir de la inoculación de las semillas, en condiciones axénicas, utilizando un microscopio confocal.
- Estudiar el patrón de colonización de nuestros aislamientos en el rizoplasma de estos tres cultivos.

Materiales y Métodos

4.1 Visualización de los patrones de colonización radicular mediante microscopía confocal en condiciones axénicas

Para los ensayos de microscopía las semillas de maíz (variedad KM 8701 VIP3) y trigo (variedad Baguette 620) se desinfectaron superficialmente, sumergiéndolas en 70% v/v de etanol durante 1 minuto, seguido de una solución de 1,1% v/v de NaClO durante 10 minutos, a 100 rpm [84]. Luego, se lavaron 5 veces con agua destilada estéril durante 2 minutos, y finalmente se colocaron sobre papel absorbente por 15 minutos en un flujo laminar. En el caso de soja, las semillas se agitaron en etanol 70% v/v durante 1 minuto, y luego en 0,055% v/v de NaClO durante 1 minuto, a 100 rpm. Seguidamente, se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril durante 2 minutos, y se orearon sobre papel absorbente por 15 minutos en flujo laminar.

La inoculación de las semillas se llevó a cabo como se mencionó anteriormente en la sección 3.1, utilizando el aditivo que mostró las recuperaciones más altas en el día de inoculación para cada cepa (“mejor condición”, Figura 29). Para maíz, el aditivo Premax® fue el elegido para RBAN4-*yfp*, RPAN1-*yfp*, SPAN5-*cfp*, SMMP3-*yfp* y 1008-*cfp*; mientras que para SVMP4-*yfp* y SVBP6-*mche* se seleccionó la combinación trehalosa-PVP. En trigo también se utilizó el Premax® con los aislamientos RBAN4-*yfp*, SMMP3-*yfp*, SVMP4-*yfp*, SVBP6-*mche* y 1008-*cfp*; y la mezcla de trehalosa con PVP se usó para RPAN1-*yfp* y SPAN5-*cfp*. Todos los aislamientos se inocularon con Premax® en semillas de soja. A modo de control, en todos los casos se inocularon las semillas con solución salina y el aditivo elegido en la proporción de uso. Después de la inoculación, las semillas de maíz y soja se colocaron en tubos de vidrio tapados con algodón estéril, que contenían 30 ml de solución mineral Jensen semi-sólida (0,5% p/v de agar) [324], y se incubaron en la cámara de plantas en oscuridad bajo las condiciones detalladas en la sección 3.1.1. En este caso se colocó una semilla por tubo. Para trigo, las semillas se colocaron en frascos de vidrio conteniendo 60 ml de la solución mineral, a razón de 3 semillas por frasco. El tiempo de incubación fue de 9 días para las semillas de maíz, 5 días para trigo y 7 días para soja, durante el cual se obtiene un buen desarrollo de raíces para cada cultivo. Particularmente en soja, las semillas se incubaron a 28 °C durante las primeras 48 hs para favorecer la germinación. Transcurrido el periodo de incubación en cámara para

cada planta, se cortaron las zonas apicales de las raíces de las plántulas en trozos pequeños (aproximadamente 1 cm) y se visualizaron explorando diferentes planos focales de la superficie utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 880 con Airyscan, Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron los objetivos Plan-Apochromat 20×/0,8 o C-Apochromat 40×/1,2 y el zoom electrónico para mejorar la visualización. Las longitudes de onda de excitación fueron 405 o 458 nm para aquellos aislamientos que expresan eCfp (1008 y SPAN5); 488 nm para aquellos que expresan eYfp (RBAN4, SMMP3, SVMP4 y RPAN1); o 543 nm para mCherry (SVBP6). Las longitudes de onda de emisión fueron entre 463 nm y 498 nm para eCfp (máx. en 480 nm); entre 515 nm y 574 nm para eYfp (máx en 544 nm o 547 nm); y entre 583 nm y 675 nm para mCherry (máx. en 629 nm).

A partir de los *z-stack* obtenidos para algunas de las cepas, se obtuvieron imágenes tridimensionales utilizando los métodos de proyección de máxima intensidad y textura de profundidad (*depth coding*). El primero toma el píxel más brillante de cada capa y muestra ese valor de intensidad de pixel en la imagen final, que comúnmente se proyecta a lo largo del eje z; mientras que la textura de profundidad reemplaza el color

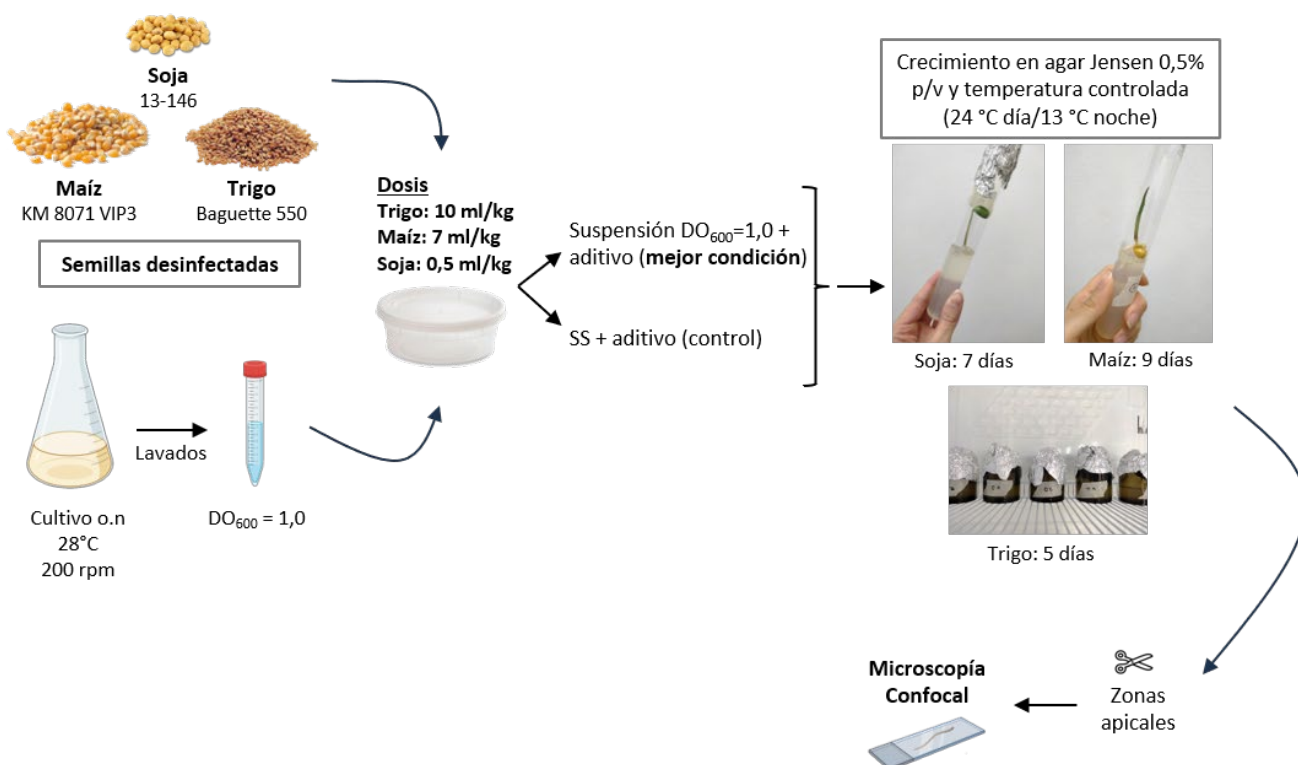


Figura 29. Esquema general utilizado para la observación del patrón de colonización de raíces de los distintos cultivos por nuestros aislamientos, mediante microscopía confocal.

de cada canal de la proyección por una escala de colores, donde cada color representa un valor del eje z o profundidad en el *z-stack* [325], [326].

4.2 Análisis estadísticos

Dado que las semillas utilizadas no estaban sincronizadas, el número de réplicas para la visualización de los patrones de colonización bacteriana en las raíces varió entre cepas, dependiendo del tiempo de germinación de las semillas. Por ello, el número de replicas que se observó bajo el microscopio osciló entre 2 y 4 semillas por aislamiento para maíz, y entre 2 o 3 semillas por aislamiento para soja. En trigo, aunque las semillas tampoco estaban sincronizadas, la germinación fue más uniforme. Por lo tanto, la cantidad de semillas inoculadas que se observaron fue de entre 3 y 6 por aislamiento. Por otro lado, para el tratamiento control inoculado con SS, se observaron 1 o 2 semillas en cada caso.

Resultados

4.3 Patrones de colonización radicular en el rizoplasma de plantas de maíz, trigo y soja

La observación de plántulas de maíz, trigo y soja bajo el microscopio confocal permitió demostrar que nuestras cepas son capaces de establecerse en las raíces de estas plantas luego de la inoculación de las semillas, en las condiciones óptimas establecidas en los ensayos previos. Además, se analizaron los diferentes patrones de colonización en la superficie radicular.

En primer lugar, se comprobó que es posible alcanzar un grado aceptable de colonización de raíces de plántulas de maíz con estos aislamientos, cuando se introducen mediante la estrategia de inoculación en semilla (Figura 30). En general, se observó que las células bacterianas ocuparon preferentemente las uniones intercelulares de la raíz. Además, fue posible discernir entre tres distribuciones principales de las bacterias en la superficie epidérmica: disposición en forma de cordones (Figuras 30e y 30g); microcolonias dispersas en la superficie (Figuras 30b y 30c); o una combinación de ambas (Figura 30a, 30d y 30f). RBAN4-*yfp*, que demostró el mejor desempeño en la bacterización de semilla de maíz (Figura 20), también fue uno de los aislamientos que presentó un buen nivel de colonización de raíces, con una alta densidad bacteriana en las superficies de las mismas (Figura 30a), similar al nivel de colonización de la cepa de referencia 1008-*cfp* (Figura 30e). En contraste, SVMP4-*yfp* mostró patrones inconsistentes y bajos niveles de colonización en casi todas las réplicas (Figura 30d). Esta observación es coherente con el menor rendimiento de este aislamiento durante la bacterización de semillas de maíz en el día 0 (Figura 20). SVBP6-*mche* también mostró un comportamiento variable en la colonización de raíces de maíz, dado que se observaron pocas raíces colonizadas, con densidades bacterianas variables (no mostrado). Esta heterogeneidad se condice con los niveles de bacterización dispares entre réplicas biológicas que se obtuvieron a día 0 para esta cepa (Figura 14a).

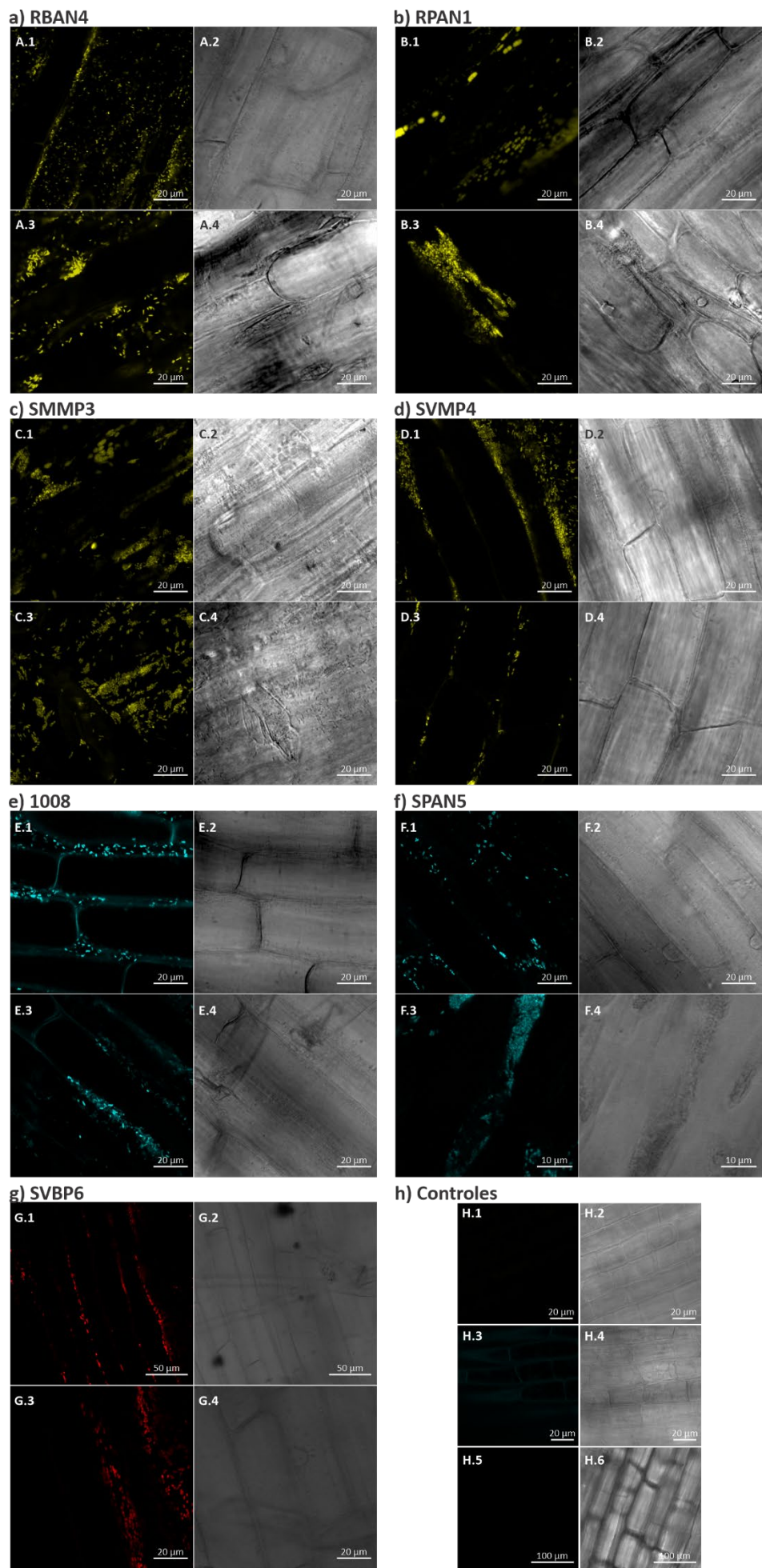
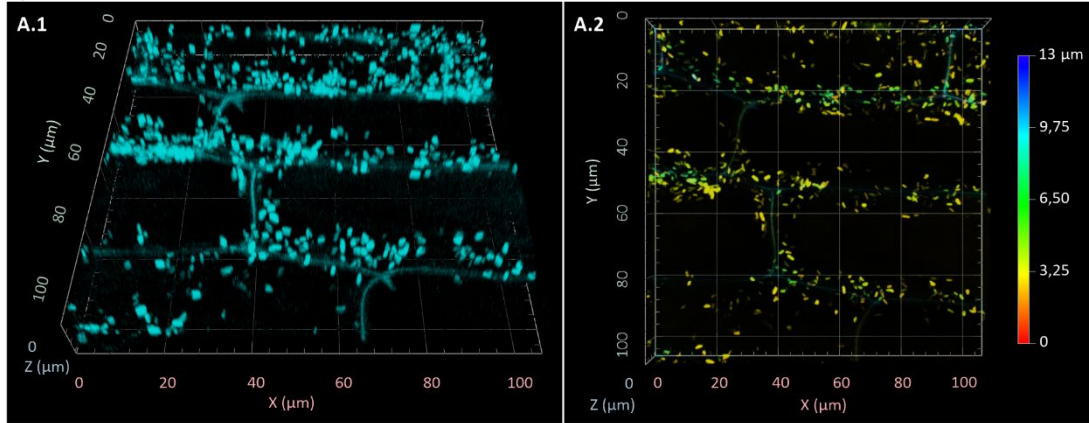


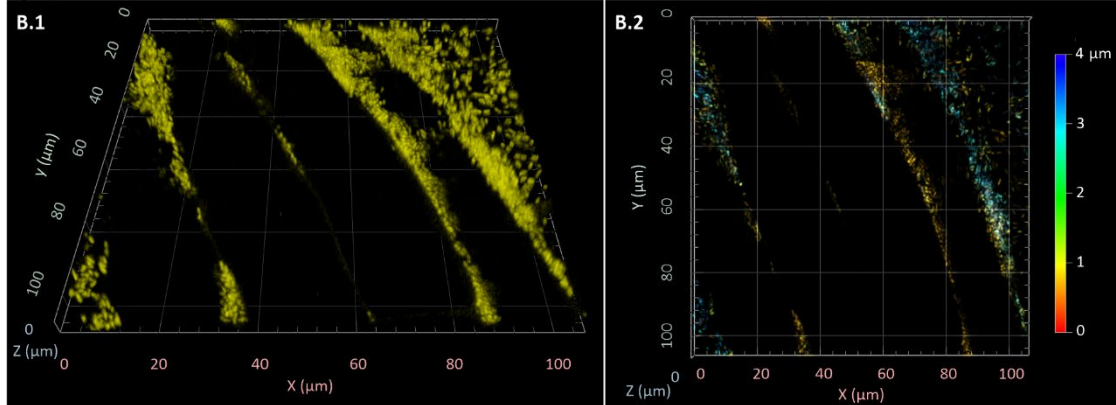
Figura 30. Microscopía confocal del tejido radicular de plántulas de maíz, obtenidas 9 días después de la inoculación con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* marcados con: *eyfp* (a-d), *ecfp* (e-f) y *mcherry* (g). Las imágenes en los paneles de la izquierda (1-3-5) corresponden a la microscopía confocal de fluorescencia y las de la derecha (2-4-6) a la microscopía de luz transmitida. Los controles (h) se inocularon con SS y el aditivo correspondiente. **h) 1** se tomó con el filtro para *eyfp*; **h) 3** con *ecfp* y **h) 5** con *mcherry*. Todas las imágenes se capturaron en la zona de elongación de las raíces de maíz (a 1 cm sobre la zona apical), utilizando un objetivo de 20× y un zoom electrónico de 4×, exceptuando a **g) 1-2** (zoom 2×); **h) 5-6** (zoom 1,5×); y **f) 3-4** (objetivo de 40× y zoom 4×). Se observaron diferentes patrones de colonización: en cordones (a-e-g), microcolonias dispersas en superficie (b-c); o la combinación de ambos (d-f). Las imágenes son representativas del patrón de colonización en todas las plántulas observadas. Los tratamientos control no mostraron fluorescencia en ningún caso (h). La escala está indicada con una barra blanca en cada imagen, que corresponde a 20 µm, excepto por **f) 3-4** (10 µm); **g) 1-2** (50 µm) y **h) 5-6** (100 µm).

A partir de los *z-stack* obtenidos para algunas de las cepas se obtuvieron imágenes tridimensionales utilizando la proyección de máxima intensidad y la textura de profundidad (*depth coding*), que se muestran en la Figura 31. Ambos abordajes permitieron visualizar la profundidad que alcanzan estas cepas en la colonización del tejido radicular, siendo de carácter más superficial para 1008-*cfp* y SVMP4-*yfp* (Figura 31a y 31b, respectivamente), o logrando una mayor penetración en el tejido para SPAN5-*cfp* (Figura 31c). Esta capacidad de SPAN5-*cfp* de alcanzar una mayor profundidad en la colonización, de 35 a 40 µm en la Figura 31c, se observó también en otra área de tejido de esta misma réplica, y en otras regiones de plántulas independientes, aunque alcanzando entre 15 a 18 µm de profundidad (no mostrado). En contraposición, para SVMP4-*yfp* ambos *z-stack* adquiridos en dos zonas diferentes de la misma réplica mostraron colonización hasta los 4 µm (en la Figura 31b se muestra uno de ellos). Por su parte 1008-*cfp*, evidenció una colonización de alrededor de 8 µm en todos los *z-stack* adquiridos, excepto por una región donde se observó colonización hasta los 17 µm (no mostrado).

a) 1008



b) SVM4



c) SPAN5

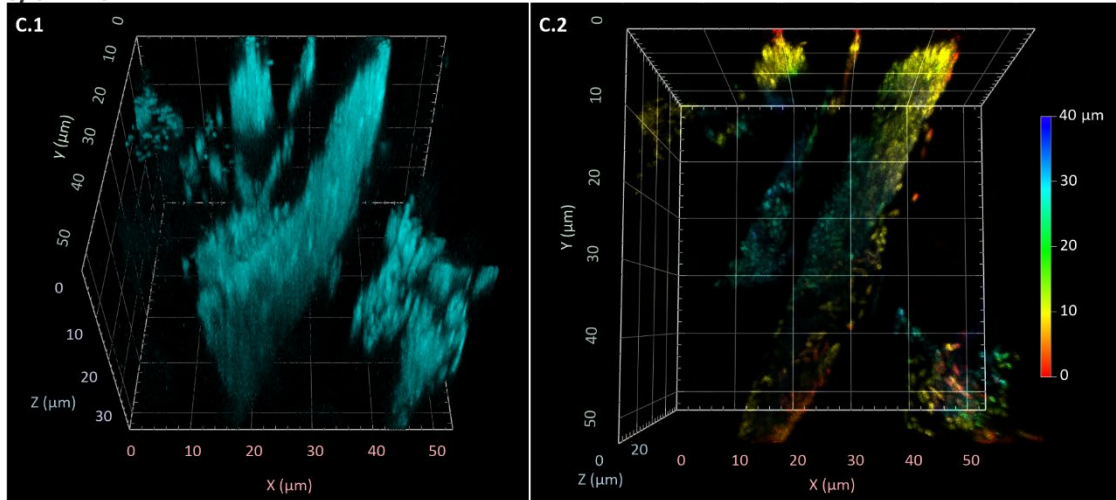


Figura 31. Imágenes tridimensionales a partir de los z-stack obtenidos durante la microscopía confocal de raíces de plántulas de maíz. Las imágenes de la izquierda corresponden a las proyecciones de máxima intensidad de fluorescencia (vista semi-lateral), mientras que las de la derecha indican la profundidad alcanzada por cada aislamiento en el tejido radicular (vista superior), según la escala de colores (μm). Nótese que la imagen **31a** corresponde a la proyección de la Figura 30e-1; la imagen **31b** corresponde a la 30d-1; y la imagen **31c** corresponde a la 30f-3.

Las imágenes de las raíces de plántulas de trigo evidenciaron una colonización muy pareja entre las réplicas de cada aislamiento, en concordancia con los buenos niveles de bacterización en semillas de trigo, y demostrando una vez más que nuestras cepas son capaces de colonizar la rizósfera a partir de este método de inoculación. Si bien se detectó una preferencia por colonizar los espacios intercelulares de la epidermis de la raíz, también se observó colonización en la superficie de las células vegetales en todos los casos. Por lo tanto, en estos tejidos los patrones de colonización fueron mixtos para todas las cepas (Figura 32). Particularmente *RPAN1-yfp* (Figura 32b) fue el aislamiento que más se diferenció del resto en cuanto a su marcada tendencia por formar microcolonias y aglomeraciones bacterianas, tanto en el espacio intercelular como sobre las células de la raíz. La cepa *SVMP4-yfp* mostró niveles de colonización más bajos que el resto de los aislamientos, lo cual coincide con el grado de bacterización alcanzado en las cinéticas. Además, fue posible detectar bacterias colonizando algunos pelos radiculares de las plántulas de trigo cuando se inoculó con los aislamientos *RBAN4-yfp*, *SMMP3-yfp*, *SPAN5-cfp* y *SVMP4-yfp* (Figura 33). No se observó interacción con pelos radiculares en el resto de los aislamientos.

Los *z-stack* revelaron una colonización en profundidad tanto para *RBAN4-yfp* como para *SVBP6-mche*, alcanzando hasta 30 y 21 μm , respectivamente (Figuras 34a y 34c). Para este último aislamiento, se detectó un comportamiento similar en otra de las réplicas analizadas. En contraste, el *z-stack* adquirido para *RPAN1-yfp* evidenció microcolonias superficiales (Figura 34b-1) que se perdían rápidamente al adentrarnos en el tejido de la raíz luego de los 2 μm , siendo solo la microcolonia central la que alcanzó los 5 μm de profundidad (Figura 34b-2). Al igual que en las raíces de maíz, *SVMP4-yfp* no mostró una gran penetración en el tejido, alcanzando alrededor de los 8 μm en los dos *z-stack* obtenidos para esta cepa (Figura 34d).



Figura 32. Microscopía confocal del tejido radicular de plántulas de trigo, obtenidas 5 días después de la inoculación con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* marcados con: *eyfp* (a-d), *ecfp* (e-f) y *mcherry* (g). Las imágenes en los paneles de la izquierda (1-3-5) corresponden a la microscopía confocal de fluorescencia y las de la derecha (2-4-6) a la microscopía de luz transmitida. Los controles (h) se inocularon con SS y el aditivo correspondiente. **h) 1** se tomó con el filtro para *eyfp*; **h) 3** con *ecfp* y **h) 5** con *mcherry*. Todas las imágenes se capturaron en la zona de elongación de las raíces de maíz (a 1 cm sobre la zona apical), utilizando un objetivo de 20× y un zoom electrónico de 4×, exceptuando a **h) 1-4** (zoom 2×) y **h) 5-6** (sin zoom). Se observaron patrones mixtos de colonización en todos los casos. Las imágenes son representativas del patrón de colonización en todas las plántulas observadas. Los tratamientos control no mostraron fluorescencia en ningún caso (**h**). La escala está indicada con una barra blanca en cada imagen, y corresponde a 20 µm, excepto por **h) 1-4** (50 µm) y **h) 5-6** (100 µm).

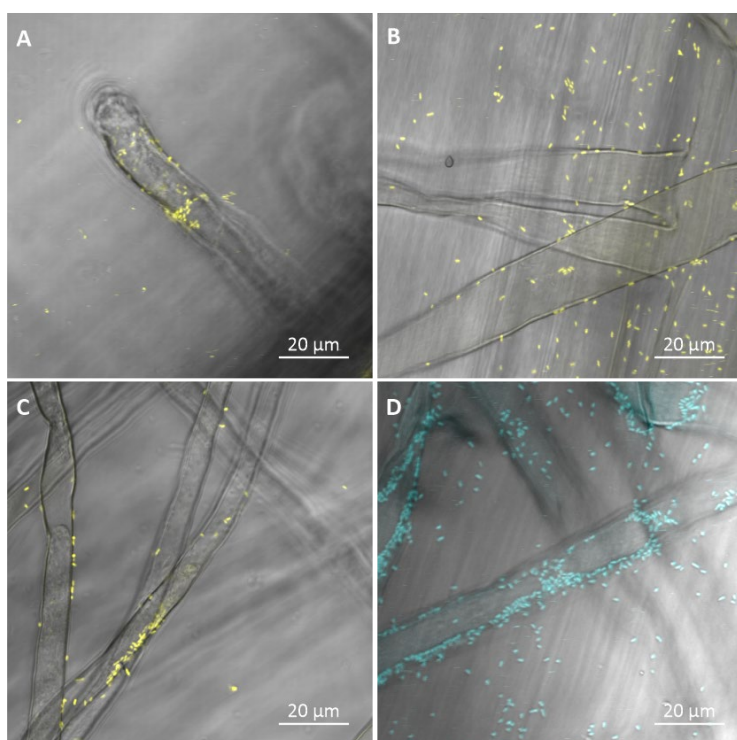


Figura 33. Microscopía confocal de los pelos radicales de plántulas de trigo. Se observa colonización con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* **a)** RBAN4-*yfp*, **b)** SMMP3-*yfp*, **c)** SVMPP4-*yfp*, **d)** SPAN5-*cfp*. Todas las imágenes se capturaron utilizando un objetivo de 20× y un zoom electrónico de 4×, y corresponden a la superposición de las imágenes obtenidas por microscopía de campo claro y fluorescencia. La escala está indicada con una barra blanca en cada imagen y corresponde a 20 µm.

La microscopía de raíces de plántulas de soja permitió corroborar la colonización exitosa de todos nuestros aislamientos, detectando la presencia de patrones de colonización mixtos para las cepas evaluadas (Figura 35). El grosor de la radícula dificultó en gran medida la exploración exhaustiva, aun cuando se empleaban cortes transversales de la misma. De todas formas, fue posible observar una tendencia a colonizar las uniones intercelulares de la epidermis vegetal con presencia de microcolonias sobre las células de la planta.

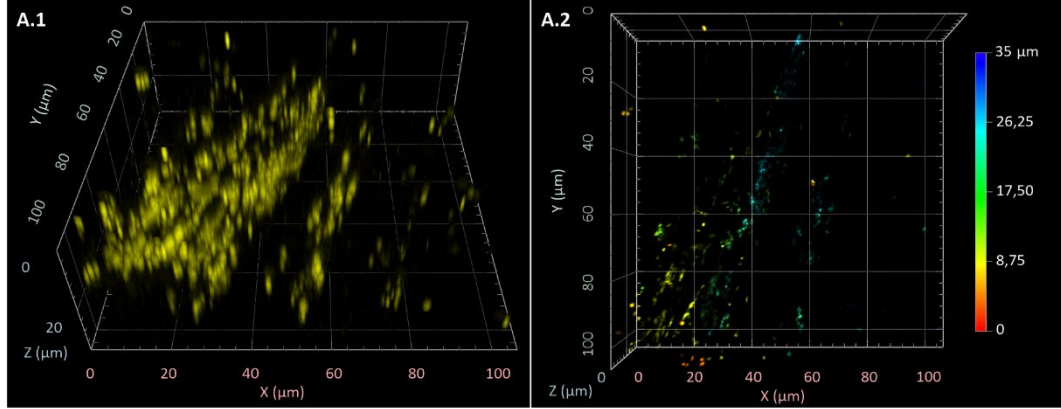
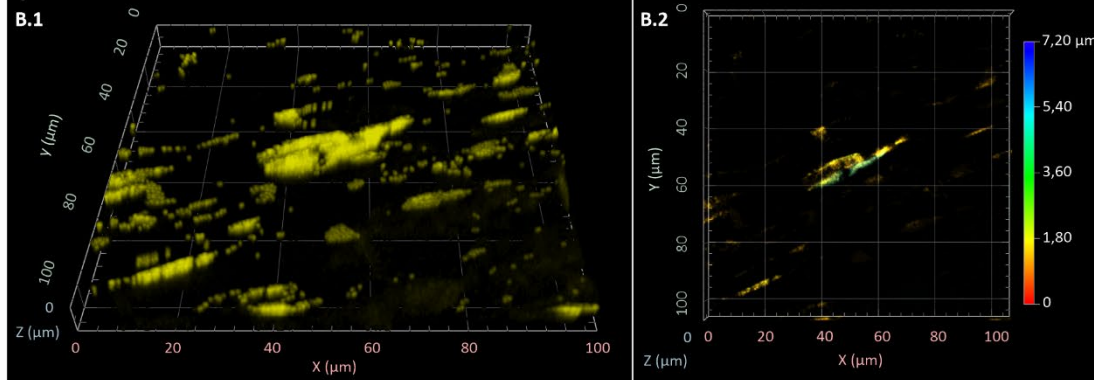
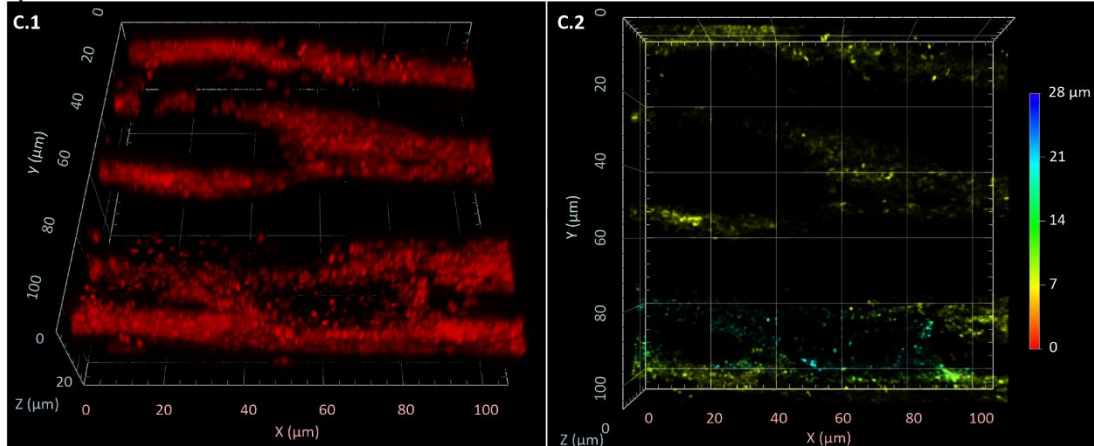
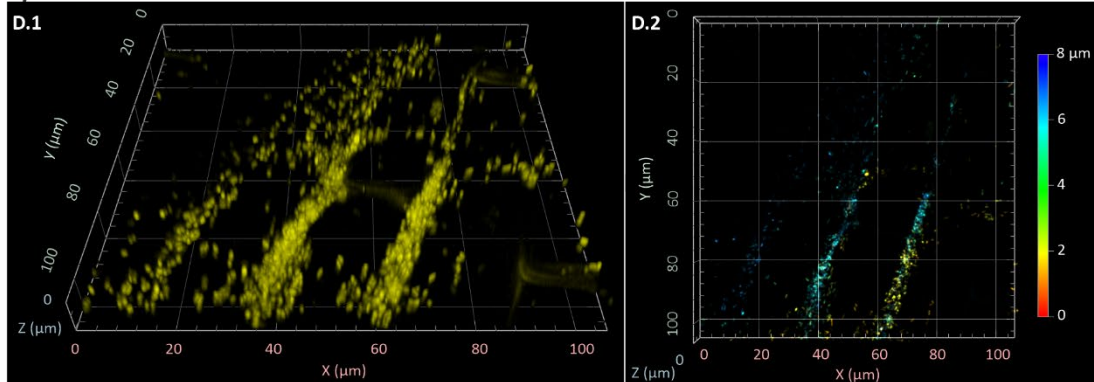
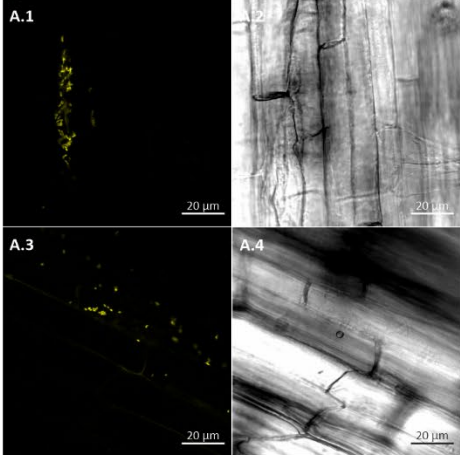
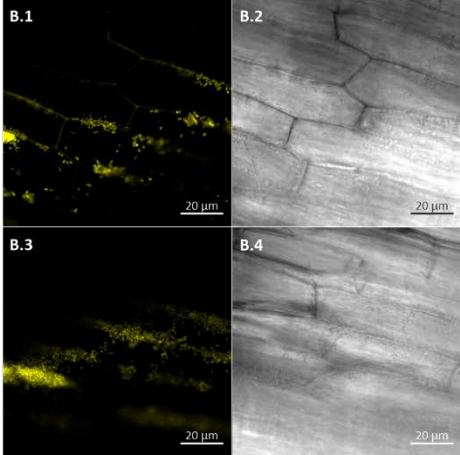
a) RBAN4**b) RPAN1****c) SVBP6****d) SVMPP4**

Figura 34. Imágenes tridimensionales a partir de los *z-stack* obtenidos durante la microscopía confocal de raíces de plántulas de trigo. Las imágenes de la izquierda corresponden a las proyecciones de máxima intensidad de fluorescencia, y las de la derecha indican la profundidad (μm) alcanzada por cada aislamiento en el tejido radicular (vista superior). La imagen **34c** corresponde a la proyección de la Figura 32g-1.

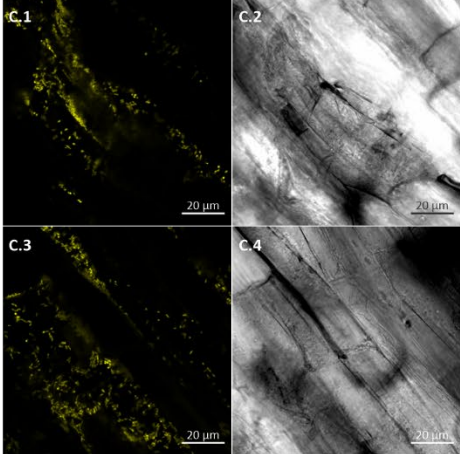
a) RBAN4



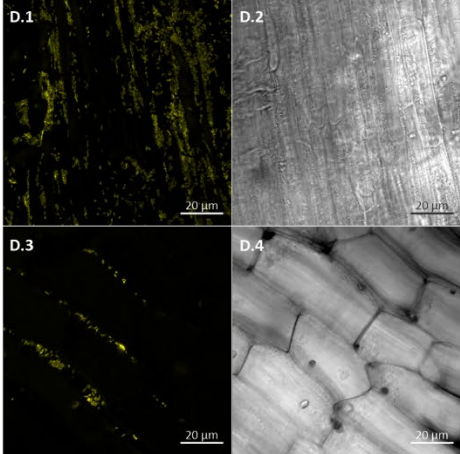
b) RPAN1



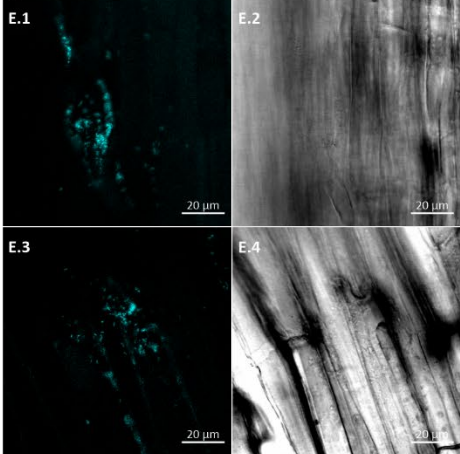
c) SMMP3



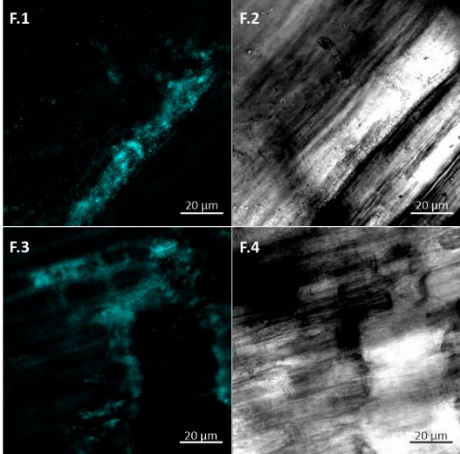
d) SVMPP4



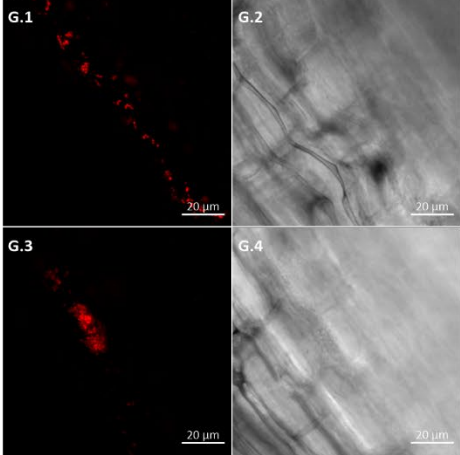
e) 1008



f) SPAN5



g) SVBP6



h) Controles

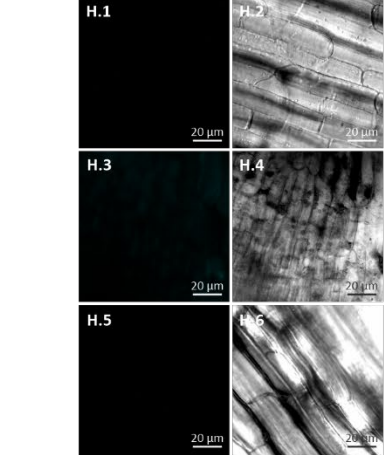


Figura 35. Microscopía confocal del tejido radicular de plántulas de soja, obtenidas 7 días después de la inoculación con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* marcados con: *eyfp* (a-d), *ecfp* (e-f) y *mcherry* (g). Las imágenes en los paneles de la izquierda (1-3-5) corresponden a la microscopía confocal de fluorescencia y las de la derecha (2-4-6) a la microscopía de luz transmitida. Los controles (h) se inocularon con SS y el aditivo correspondiente. **h) 1** se tomó con el filtro para *eyfp*; **h) 3** con *ecfp* y **h) 5** con *mcherry*. Todas las imágenes se capturaron en la zona de elongación de las raíces de maíz (a 1 cm sobre la zona apical), utilizando un objetivo de 20× y un zoom electrónico de 4×. Se observaron patrones mixtos de colonización en todos los casos. Las imágenes son representativas del patrón de colonización en todas las plántulas observadas. Los tratamientos control no mostraron fluorescencia en ningún caso (h). La escala está indicada con una barra blanca o negra en cada imagen, y corresponde a 20 µm.

Particularmente, las variantes *RPAN1-yfp*, *SMMP3-yfp* y *SVMP4-yfp* mostraron abundante colonización, no solo en la raíz principal sino también en raíces laterales (Figuras 35b, 35c y 35d). La colonización de *SBVP6-mche* (Figura 35g) en las distintas réplicas de las plántulas observadas fue dispar y menos abundante que en las imágenes tomadas en raíces de trigo: mientras que en una de las réplicas se observó una cantidad aceptable de bacterias colonizando la radícula, en las demás la densidad bacteriana fue mucho menor o casi nula (no mostrado). Por su parte, las imágenes tomadas para *SPAN5-cfp* y *1008-cfp* mostraron bastante ruido de fondo y menor definición que el resto de los aislamientos (Figuras 35e y 35f). Aun así, fue posible observar colonización de *SPAN5-cfp* en la raíz principal, y de *1008-cfp* en las raíces laterales. Tanto para la cepa de referencia como para *RBAN4-yfp* solo fue posible observar las raíces laterales de las plántulas de soja, dado que el grosor de la raíz principal no permitió su visualización bajo el microscopio (Figuras 35a y 35e).

En el caso de soja no se realizaron *z-stacks* como en los tejidos de plántulas de maíz y trigo dado que, en general, no se observaron áreas con colonización en profundidad. Además, el grosor y la densidad de las raíces dificultó la visualización. Aun así, fue posible capturar un *z-stack* para *SVMP4-yfp*, la cual alcanzó aproximadamente los 10 µm de profundidad al alojarse en las uniones intercelulares de la epidermis vegetal (Figura 36).

SVMP4

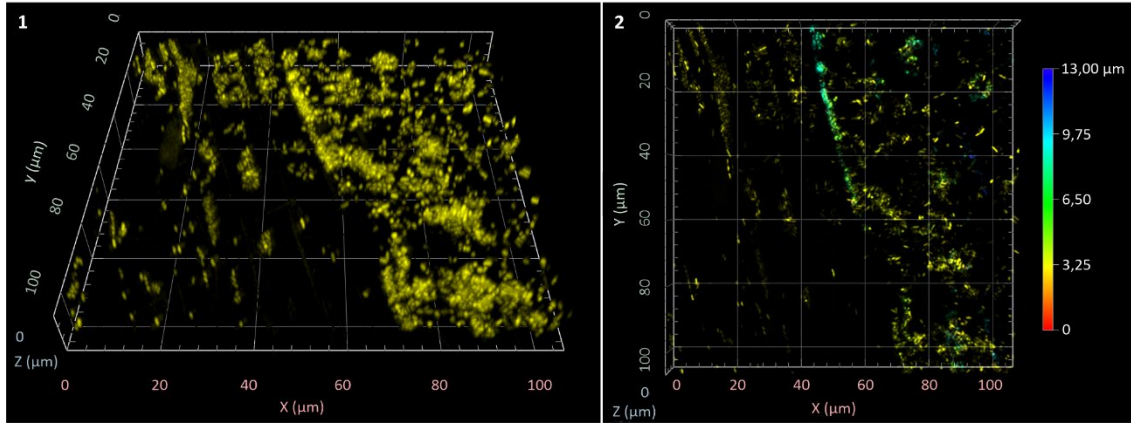


Figura 36. Imagen tridimensional a partir del *z-stack* obtenido para SVMP4-*yfp* durante la microscopía confocal de raíces de plántulas de soja. La imagen de la izquierda corresponde a la proyección de máxima intensidad de fluorescencia, y la de la derecha indica la profundidad (μm) alcanzada para este aislamiento en el tejido radicular (vista superior). Esta imagen corresponde a la proyección de la Figura 35d-1.

Discusión

La localización de las bacterias en la raíz juega un rol importante en el antagonismo de patógenos ya que, por ejemplo, cuando este es mediado por la producción de metabolitos secundarios, como sideróforos y antibióticos, se requiere que el agente biocontrol esté presente en el sitio donde el patógeno actúa [322]. Por ejemplo, Dekkers y colaboradores demostraron que la inoculación de semillas de tomate con *P. fluorescens* WCS365, una eficiente colonizadora de la porción apical de la raíz, antagoniza al patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, que ocupa ese mismo nicho [327]. En un estudio posterior donde seleccionaron subpoblaciones que colonizan más eficientemente el ápice de la raíz, los autores demuestran que esta bacteria actúa mediante competencia por nicho y nutrientes [124].

Durante este capítulo se evaluaron los patrones de colonización radicular en maíz, trigo y soja a partir de la inoculación de semillas desinfectadas, mediante microscopía confocal. Nuestros aislamientos lograron colonizar exitosamente la radícula de los diferentes cultivos (Figuras 30, 32 y 35), lo que constituye un paso fundamental para ejercer un efecto beneficioso en las plantas [328]. A diferencia de lo reportado por Dekkers en tomate, en nuestro caso no fue posible detectar una zona específica de colonización ya que los cortes se realizaron a 1 cm del ápice de la raíz. Sin embargo, no se observó colonización de las células de la cofia en ningún caso, a pesar de la abundante secreción de exudados en esta región [38]. En aquellos casos donde la porción de la radícula evaluada se encontraba cerca de la semilla, se observó una mayor densidad de colonización en las proximidades de la misma en comparación con el ápice (no mostrado). Esta tendencia ha sido reportada en trabajos previos en canola y tomate mediante técnicas de microscopía y/o recuentos en placa, tanto en plantas crecidas en suelo como en sistemas gnotobióticos con distintos soportes [322], [329], [330]. En el caso de *Pseudomonas*, se ha observado un patrón similar en diversas plantas entre los días 3 y 7 post-inoculación, donde la mayoría de las bacterias se concentran en las áreas de la raíz adyacentes a la semilla, disminuyendo en cantidad hacia el ápice [330], [331]. Un estudio gnotobiótico con *P. fluorescens* WCS365 en plantas de tomate mostró que, a pesar de ser una cepa con excelente capacidad de colonización del ápice, alcanza en esta zona una densidad de colonización 100 veces menor que en la base de la raíz, a los 7 días

de crecimiento [332]. Esta evidencia sugiere que la colonización de la radícula ocurriría de manera gradual, desde la semilla hacia la raíz en desarrollo. Además, en algunas bacterias con altos niveles de colonización el avance sobre la raíz es mayor [124], [327].

Las microscopías de nuestros aislamientos revelaron una marcada preferencia por ocupar los espacios entre las células epidérmicas de la raíz (Figuras 30, 32 y 35). En este sentido, nuestros resultados se corresponden con investigaciones previas que demuestran que la colonización de la raíz no es homogénea, sino que ocurre en forma de parches o en zonas específicas [49]. Si bien algunos estudios reportan que las rizodeposiciones ocurren principalmente en la zona apical de la raíz y en los sitios donde emergen las raíces laterales y los pelos radiculares [333], [334], las depresiones entre las células vegetales serían también un sitio altamente permeable para los exudados radiculares, ricos en compuestos carbonados y señales químicas [335], [336]. Esta distribución particular de las bacterias se ha documentado en diversas especies del género *Pseudomonas*, sugiriendo que estas regiones son favorables para la adhesión bacteriana. Por ejemplo, se observó que una cepa de *P. fluorescens* es capaz de ocupar estas grietas en las raíces de plantas de cebada en asociación con otras bacterias rizosféricas, incluso cuando se utiliza suelo como sustrato [321]. Un patrón similar se vio para *P. fluorescens* WCS365 en raíces de plantas de tomate, en donde también interactuó con los pelos radiculares [330], [337]. Este último comportamiento se observó en nuestras microscopías de plantas de trigo con los aislamientos RBAN4-*yfp*, SMMP3-*yfp*, SVMP4-*yfp* y SPAN5-*cfp*, que colonizaron algunos pelos radiculares (Figura 33). Watt y colaboradores examinaron la distribución de bacterias en raíces de trigo crecidas a campo, analizando particularmente la comunidad de *Pseudomonas* nativas, y detectaron una distribución relativamente uniforme de este género a lo largo de la raíz. Incluso, *Pseudomonas* ocupó la zona de elongación de las raíces, que es la menos colonizada por el resto de la microflora del suelo. Más de la mitad de las *Pseudomonas* detectadas en este estudio se encontraban agrupadas y en asociación a ciertas estructuras de la raíz, como los pelos radiculares, las depresiones entre células, y las células de la cofia. Otras bacterias del suelo siguieron también esta distribución, aunque fueron más abundantes en el ápice de la raíz que en la zona de elongación [338].

En contraposición con la hipótesis de que la alta secreción de exudados favorece la colonización de las uniones intercelulares, Morris et al. sugirieron que los agregados

de bacterias observados en estas zonas podrían ser el resultado de la acumulación de células bacterianas depositadas a medida que el agua se desplaza por la superficie de la raíz por capilaridad. Entonces, la formación de microcolonias en la superficie de la raíz estaría más vinculada a procesos activos de adhesión y producción de exopolisacáridos [339]. Si bien nuestros aislamientos mostraron mayoritariamente una disposición en cordones entre las células de la epidermis, como 1008-*cfp* y SVBP6-*mche* en maíz (Figuras 30e y 30g), otros formaron agregados o microcolonias entre y sobre las células vegetales (Figuras 30, 32 y 35). En particular, RPAN1-*yfp* se destacó por su mayor tendencia a formar aglomeraciones, especialmente en plantas de maíz y de trigo (Figuras 30b y 32b), mientras que SMMP3-*yfp* mostró un patrón similar en maíz (Figura 30c). Un trabajo de Hansen y colaboradores demostró que una cepa de *P. fluorescens* se dispone en el rizoplasma de plantas de cebada formando tanto cordones de bacterias como agregados irregulares entre las células de la raíz, a los 7 días post-inoculación [320]. En concordancia con lo anterior, nuestras microscopías mostraron patrones mixtos en maíz al inocular con RBAN4-*yfp*, SVMP4-*yfp* y SPAN5-*cfp*, mientras que en trigo y soja esta disposición se observó en todos los casos (Figuras 30a, 30d, 30f, 32 y 35). Las diferencias en los patrones de colonización probablemente influyen en la capacidad para ejercer de manera efectiva las actividades relacionadas al biocontrol, dado que la competencia por nicho y nutrientes es una de las estrategias llevadas a cabo por *Pseudomonas* spp. [125], [340]. Aunque nuestros aislamientos evidenciaron diferencias sutiles en los patrones de colonización, se han documentado diferencias más marcadas entre bacterias PGPR pertenecientes al mismo género bacteriano, e incluso patrones distintivos entre plantas colonizadas por una misma cepa [58]. Otro aspecto relevante es que, en las plantas de maíz inoculadas con SVBP6-*mche* y SVMP4-*yfp* que mostraron niveles de bacterización de semillas variables o bajos, se observó una colonización radicular escasa o limitada a ciertas réplicas (no mostrado). Por otro lado, la colonización de las raíces de trigo por nuestros aislamientos fue muy pareja (Figura 32), coincidiendo con lo observado en los experimentos de supervivencia en semilla. Estas evidencias respaldan la idea de que los niveles de bacterización iniciales en la semilla son relevantes para la posterior colonización de las raíces, como se ha visto para otras *Pseudomonas* [341].

Por otra parte, las imágenes tridimensionales de las raíces permitieron detectar diferencias en la profundidad de colonización entre algunos de los aislamientos. SVMP4-

yfp, por ejemplo, mostró una colonización superficial en los tres cultivos evaluados (Figuras 31b, 34d y 36), a diferencia de SPAN5-*cfp* en maíz (Figura 31c) y SVBP6-*mche* en trigo (Figura 34c), que mostraron mayor penetración en el tejido radicular. Sin embargo, las profundidades alcanzadas por los aislamientos se encuentran dentro del rango reportado para bacterias rizosféricas, variando entre los 2 μm a los 30 μm desde la superficie de la raíz [338]. Sería interesante evaluar si las diferencias observadas están relacionadas con capacidades propias de estos aislamientos, o con propiedades morfológicas de las raíces. Por último, resulta relevante evaluar qué ocurre con estos patrones de colonización radicular a periodos más largos de crecimiento de la planta, y en presencia de microflora competitiva.

Conclusiones

En este capítulo, demostramos mediante microscopía confocal que los aislamientos de *Pseudomonas* evaluados poseen la capacidad de colonizar la radícula de maíz, trigo y soja, a partir de una estrategia de inoculación en semilla. Se observó que estos aislamientos se localizan preferentemente en el espacio intercelular de las células epidérmicas de la raíz, formando cordones y/o microcolonias de mayor tamaño. Adicionalmente, se detectaron microcolonias sobre las células vegetales. Nuestras observaciones son coherentes con los niveles de bacterización alcanzados en semilla, sugiriendo que un alto nivel de bacterización en semilla se traduce en una buena colonización radical.

Capítulo 5: Evaluación de la competitividad rizosférica de los aislamientos de *Pseudomonas* utilizando suelo como sustrato

Introducción

Numerosos factores, tanto bióticos como abióticos, influyen en el rendimiento de las bacterias inoculadas en condiciones a campo. Un aspecto clave para la colonización es la capacidad de las bacterias introducidas para competir con los microorganismos nativos presentes en el suelo. Sin embargo, la compatibilidad con la planta, la temperatura, el pH, la radiación, el tipo de suelo, la disponibilidad de nutrientes, entre otros factores, pueden ser críticos para la supervivencia, la colonización y el establecimiento de los inoculantes en la rizósfera [342].

En la mayoría de los estudios con PGPM, el foco está puesto en las actividades relacionadas con el biocontrol o la biofertilización, y muchos ensayos de colonización se realizan con cepas individuales bajo condiciones estériles de laboratorio. Por lo tanto, resulta necesario adoptar un enfoque integral que incluya a las comunidades del suelo para evaluar el establecimiento y la supervivencia de los inoculantes en condiciones más similares a las del campo [248], [343]. Desde una perspectiva ecológica, el microbioma residente puede afectar significativamente el establecimiento de los microorganismos introducidos mediante diferentes mecanismos. Uno de ellos es la superposición de nichos, que fomenta la competencia entre microorganismos, generalmente resultando en la exclusión competitiva de uno de ellos [344]. Por ejemplo, un estudio realizado por Wang y colaboradores evidenció que ciertas cepas de *Pseudomonas* mostraron un efecto protector contra un patógeno del mismo género en plantas de *Arabidopsis*, en ausencia de producción de metabolitos antimicrobianos, y correlacionaron este fenómeno con los altos niveles de colonización de las cepas protectoras [345]. Por otro lado, los efectos de prioridad también cumplen un rol importante, en el cual los microorganismos que colonizan primero determinan la composición de la comunidad y evitan el establecimiento de otros que aparecen después, incluso si estos últimos son más competitivos [346], [347]. Esto refuerza la idea de que, cuando un nicho metabólico está ocupado por una microbiota residente, el éxito del establecimiento del inoculante disminuye [348]. Sin embargo, no todas las interacciones son competitivas; sino que también existen interacciones que facilitan la colonización [344]. Además, los bacteriófagos y organismos depredadores microbianos, como los protozoos, también pueden moldear las poblaciones microbianas del suelo [349], [350]. A su vez, la

inoculación con microorganismos exógenos puede impactar en la comunidad en la que han sido introducidos, principalmente en aquellos microorganismos que comparten el mismo nicho [344]. Sin embargo, en el caso de *Pseudomonas*, se han reportado alteraciones mínimas en la estructura de la comunidad del suelo [351], [352], incluso con inoculaciones secuenciales [353].

Los ensayos en condiciones controladas de invernáculo utilizando suelo como sustrato constituyen un paso esencial previo a los experimentos a campo [342], [354]. En este sentido, es primordial contar con metodologías que permitan monitorear el establecimiento del inoculante en la rizósfera y, principalmente, diferenciar el microorganismo introducido de la microbiota nativa. Las técnicas clásicas dependientes de cultivo son comúnmente utilizadas, aunque requieren de la utilización de medios selectivos [355]. Además, existe poca información sobre la implicancia de los niveles de bacterización de semillas en la colonización de raíces y la competitividad en *Pseudomonas*. Con estos antecedentes, en este capítulo se plantea:

- Analizar si los aislamientos de *Pseudomonas* inoculados en semilla se establecen y persisten en la rizósfera de plantas de maíz, trigo y soja, al cabo de un mes de crecimiento en suelo.
- Evaluar si existe correlación entre los niveles de bacterización en semilla y los de colonización rizosférica observada en etapas tempranas del crecimiento vegetal.
- Evaluar diferentes parámetros de las plantas asociados a los efectos de promoción del crecimiento por parte de estas cepas.

Materiales y Métodos

5.1 Ensayos en invernáculo

En este capítulo se llevaron a cabo experimentos de competitividad en condiciones de invernáculo en plantas de maíz, trigo y soja, inoculadas con nuestros aislamientos a partir de semillas sin desinfectar. En todos los ensayos se utilizó como sustrato una mezcla compuesta por partes iguales de perlita estéril y suelo, obtenido de la reserva natural municipal Santa Catalina, Lavallol, Provincia de Buenos Aires (34° 47' 12.8" S, 58° 26' 28.6" W; Tabla 13), el cual se tamizó empleando un tamiz de 2 mm. Se emplearon vasos descartables de 1 litro perforados en la parte inferior a modo de maceta, con 5 réplicas por tratamiento ($n = 5$) y 1 planta por pote para maíz y soja; y 5 plantas por pote para trigo. Luego del armado de las mismas, se humedeció la mezcla de sustrato a capacidad de campo con agua destilada estéril, hasta alcanzar entre el 25 y 30% del peso final de las macetas. Inmediatamente se sembraron las semillas.

Tabla 13. *Características del suelo utilizado en el ensayo de invernáculo*

Propiedades	
Clasificación	Argiudol típico
Textura	Franco limoso
Carbono orgánico total (%)	2,87
Materia orgánica total (%)	4,94
pH (1:2,5)	6,4
Nitrógeno total (%)	0,22
Fósforo total (mg kg ⁻¹)	52,99
Porcentaje de arcillas	16
Porcentaje de arena	14,8
Porcentaje de limo	69,2
Humedad	13,41

Las semillas sin desinfectar se inocularon con el aditivo óptimo para cada par aislamiento-semilla siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.1 (ver detalle de los aditivos utilizados en la sección 4.1). Para SVMP4-*yfp* se empleó la combinación de trehalosa y PVP en lugar de Premax®, en este caso. Se incluyó, además, un control que se inoculó únicamente con solución salina y el aditivo empleado. En los ensayos con maíz se utilizó la variedad KM 87 VIP3; para trigo se empleó la variedad Baguette 620; y para soja, la variedad 13-146. Previo a la siembra, se cuantificó la bacterización alcanzada en

cada semilla como se explicó antes en la sección 3.1, utilizando una única réplica por tratamiento. En cada maceta se colocaron 2 semillas inoculadas para maíz y soja, y 7/8 para trigo, que luego se cubrieron ligeramente con la mezcla de sustrato. Al cabo de 5-7 días, se ralearon las plántulas para dejar un único ejemplar por maceta para maíz y soja, y 5 ejemplares para trigo. Las macetas se incubaron bajo condiciones de invernáculo con una temperatura y humedad entre 20-24 °C y 60-80%, respectivamente, y un ciclo de luz-oscuridad de 16-8 hs. El riego fue realizado con agua destilada estéril, monitoreando las macetas por peso 3 veces por semana para llevarlas nuevamente a capacidad de campo. Al inicio de los ensayos, se realizó un recuento de bacterias heterótrofas totales en medio TSA 10% a partir de la mezcla de suelo-perlita empleada como sustrato [81]. Además, se evaluó la ausencia de crecimiento en el medio Gould's S1 suplementado con Gm, Km, o con la combinación de Km y Sm para asegurarnos de recuperar únicamente nuestras cepas a partir de la rizósfera de las plantas en el medio de cultivo Gould's S1 suplementado.

La cosecha se llevó a cabo luego de 4 semanas, la cual implicó la toma de muestras de rizósfera, definida como el sistema radicular junto con las partículas de suelo que se encuentran más firmemente adheridas al mismo. Para ello, luego de descalzar la maceta, se desprendió manualmente el suelo débilmente adherido a las raíces, para seguir con la medición de los parámetros de cada planta. Las muestras de la porción radicular de cada planta se mantuvieron a 4 °C hasta el procesamiento de las mismas (Figura 37).

5.1.1 Evaluación de efectos PGPR sobre los parámetros de la planta

Se evaluó el crecimiento de las plantas midiendo la longitud de la porción aérea, la longitud de la raíz, la biomasa fresca de las porción radicular y aérea, y la biomasa seca de la parte aérea únicamente. En el primer caso, cada planta se midió individualmente desde la base del tallo hasta el extremo de la hoja más alta. Seguidamente se midió la longitud de la raíz desde la base hasta el extremo de la raíz más larga. Para determinar la biomasa fresca, inmediatamente luego del descalce, la parte aérea de cada planta fue separada de la porción radicular, y ambas se pesaron por separado. Por último, la parte aérea se dejó secar en estufa a 60 °C en bolsas de papel durante una semana, y luego se volvió a registrar el peso para obtener la biomasa seca.

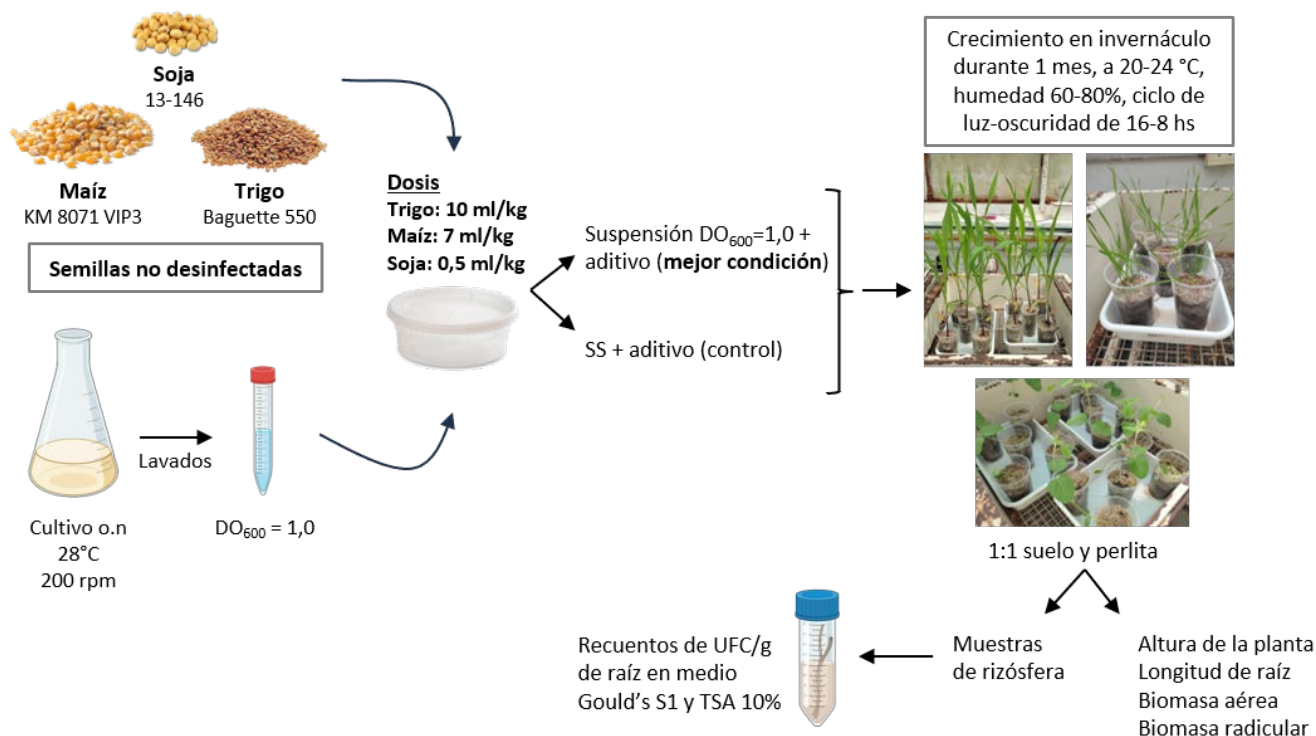


Figura 37. Esquema general de los ensayos realizados en condiciones de invernadero.

5.1.2 Recuentos en placa

Con el objetivo de conocer el número de *Pseudomonas* marcadas que se adhirieron a las raíces de maíz a partir de la inoculación en semilla, se pesaron 2 g de raíces y se resuspendieron en 18 ml de SS, mientras que para trigo y soja se pesó 1 g y se resuspendieron en 9 ml de SS. Luego de agitar en vórtex durante 1 minuto a máxima potencia, se sonicó (40 kHz, 160 W, Testlab TB04, Argentina) por 1 minuto [72]. Seguidamente, se colocaron las muestras en un agitador orbital durante 15 minutos a 250 rpm y luego se centrifugó a $50 \times g$ durante 1 minuto. Se realizaron diluciones seriadas a partir del sobrenadante y se sembraron gotas de 10 o 20 μ l por triplicado en placas de medio TSA 10%, para el recuento de bacterias heterótrofas totales, y en medio Gould's S1 suplementado con el antibiótico correspondiente para cada aislamiento, según las resistencias presentes en el *cassette* mini-Tn7 [263]. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 48 hs.

Dado que el objetivo era expresar los resultados de los recuentos en relación al peso seco de las raíces, se determinó el porcentaje de humedad de cada una de las

muestras. Para ello, se registró el peso de aproximadamente 0,150 g de raíces en un tubo tipo *eppendorf* de 1,5 ml, y se incubaron a 60 °C durante 1 semana. Luego de este tiempo, se volvió a pesar todo el contenido de los tubos y se calcularon los porcentajes de humedad antes mencionados.

5.2 Análisis estadísticos

El número de réplicas para los ensayos en invernáculo fue de 5 macetas por tratamiento ($n = 5$), y los recuentos se realizaron en medio TSA 10% y Gould's S1 por triplicado para cada réplica. Los valores de UFC se transformaron con la fórmula $\log_{10}(x + 50)$ antes de los análisis estadísticos (ver sección 3.2 para más detalles). Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism V. 8.00, según lo explicado anteriormente para la bacterización de semillas (sección 3.2).

Resultados

5.3 Competitividad de los aislamientos en la rizósfera

Con el objetivo de evaluar el desempeño de nuestros aislamientos en la colonización de las raíces frente a la microflora nativa del suelo, se llevaron a cabo ensayos en condiciones controladas de invernadero. Al cabo de un mes de crecimiento de las plantas, se estudió la competitividad de cada aislamiento por la ocupación de las raíces mediante la cuantificación de su abundancia rizosférica. El recuento inicial de bacterias heterótrofas y mesófilas en la mezcla suelo-perlita, la cual se utilizó posteriormente como sustrato, fue de $3,7 \pm 0,64 \times 10^5$ UFC/g, mientras que el número de *Pseudomonas* naturalmente resistentes a Km²⁵ provenientes de la misma mezcla fue de $5,4 \pm 2,33 \times 10^2$ UFC/g. Estas *Pseudomonas* no fueron detectadas cuando se suplementó el medio S1 con Sm¹⁰⁰ en combinación con Km²⁵, ambas resistencias contenidas en los *cassettes* Tn7 correspondientes (Tabla 2, [215]) Por otro lado, no se recuperaron *Pseudomonas* naturalmente resistentes a Gm²⁰. De esta forma se aseguró que al procesar el sistema radicular los recuentos de *Pseudomonas* en medio selectivo correspondiesen únicamente a nuestros aislamientos marcados.

En el caso de maíz, los recuentos a partir de las de las semillas variedad KM 87 VIP3 (Tabla 14) que luego se utilizarían para el ensayo en invernáculo (Figura 38), siguieron la misma tendencia que los ensayos de bacterización (Tabla 8). Aunque la carga en semilla fue en general más baja, RBAN4-*yfp* y 1008-*cfp* alcanzaron los niveles más altos. Sin embargo, SVMP4-*yfp* obtuvo recuentos más similares a SPAN5-*cfp* y SMMP3-*yfp*, y SBVP6-*mche* no fue detectado inmediatamente después de la inoculación.

Tabla 14. Número de bacterias recuperadas a partir de las semillas de maíz inoculadas, para el ensayo de invernáculo

Log ₁₀ (UFC+50)/g de semilla	
RBAN4- <i>yfp</i>	3,55
RPAN1- <i>yfp</i>	2,46
SMMP3- <i>yfp</i>	2,13
SPAN5- <i>cfp</i>	1,98
SVMP4- <i>yfp</i>	2,30
SBVP6- <i>mche</i>	n.d.
1008- <i>cfp</i>	4,11

n.d. = no detectado en semilla (< 200 UFC/g).

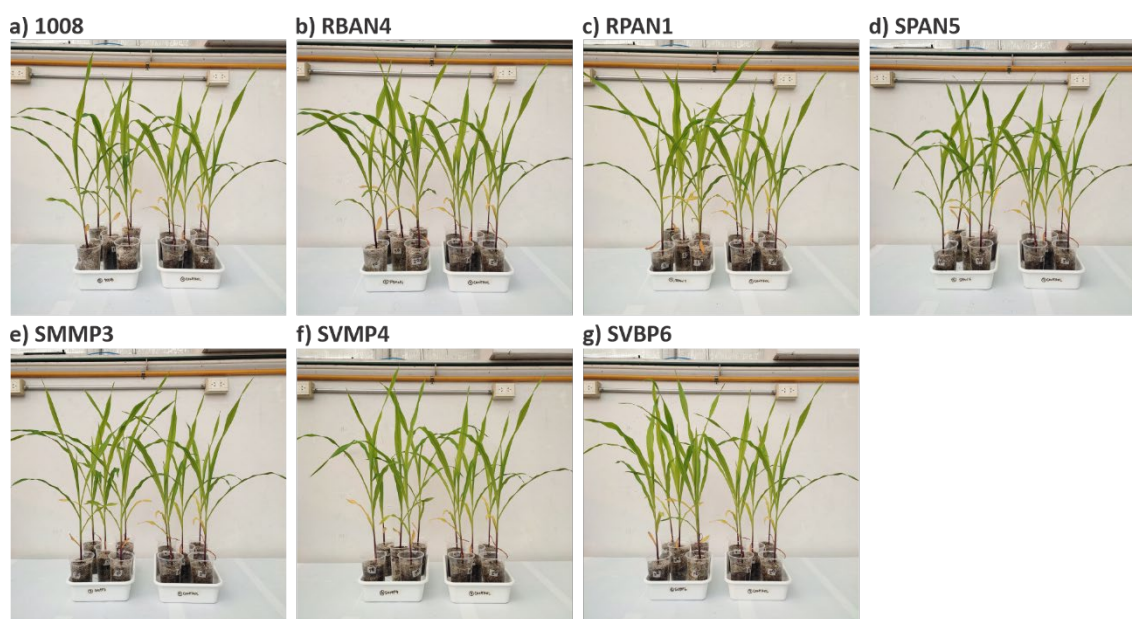


Figura 38. Plantas de maíz en estadio V3, al momento de la cosecha. En cada imagen se muestran las plantas inoculadas con el aislamiento indicado (izquierda) y el control inoculado con solución salina (derecha).

La carga de bacterias heterótrofas y mesófilas cultivables en la rizósfera luego de un mes de ensayo mostró valores entre $3,5 \times 10^7$ y $5,7 \times 10^8$ UFC por gramo de raíz seca (Tabla 15). En cuanto a los aislamientos ensayados, se detectó un mayor grado de colonización de raíces para aquellas cepas que habían mostrado los niveles más altos de bacterización en las semillas de maíz de ambas variedades, en el mismo día de la inoculación (Figura 39 y Tabla 14). En los recuentos, el aislamiento SMMP3-*yfp* representó el 0,63% del total de bacterias heterótrofas mesófilas cultivables, siendo el más alto después de la cepa de referencia 1008-*cfp*. Estos porcentajes cayeron al 0,18% y 0,04% para los aislamientos RBAN4-*yfp* y RPAN1-*yfp*, respectivamente (Tabla 15). SPAN5-*cfp* fue el único aislamiento que no fue detectado en la rizósfera de maíz, a pesar de haber mostrado buenos niveles de bacterización en semilla (Figura 14a), y de haberse encontrado en el grupo de semillas tratadas utilizadas para sembrar las macetas (Tabla 14). Consistentemente con los bajos niveles de bacterización en semilla conseguidos por SVBP6-*mche* y SVMP4-*yfp*, ambas cepas mostraron variabilidad al momento de ser detectadas en las muestras de rizósfera (Figura 39). Sin embargo, cuando se evaluaron los efectos de promoción del crecimiento vegetal de estas cepas de *Pseudomonas*, se observó que todos los aislamientos mejoraron la mayoría de los parámetros medidos (Figura 40). Particularmente, RBAN4-*yfp*, RPAN1-*yfp*, SMMP3-*yfp* y SVBP6-*mche* incrementaron significativamente la biomasa aérea de las plantas de maíz (Figuras 40a y

Tabla 15. Densidad de bacterias heterótrofas mesófilas cultivables en la rizósfera de plantas de maíz, y su relación con la abundancia de nuestros aislamientos.

	Heterótrofas mesófilas		Porcentaje del aislamiento en la rizósfera de maíz ^b
	Log ₁₀ (UFC+50)/g de raíz ± SD	ANOVA ^a	
Control	7,53 ± 0,13	c	-
RBAN4- <i>yfp</i>	8,72 ± 0,19	a	0,183
RPAN1- <i>yfp</i>	8,03 ± 0,19	bc	0,036
SMMP3- <i>yfp</i>	8,55 ± 0,21	ab	0,634
SPAN5- <i>cfp</i>	7,51 ± 0,03	c	0,000
SVMP4- <i>yfp</i>	8,14 ± 0,58	b	0,000
SVBP6- <i>mche</i>	8,57 ± 0,11	ab	0,027
1008- <i>cfp</i>	8,22 ± 0,73	b	1,222

^a Analizado con ANOVA, LSD Fisher ($p < 0,05$).
^b Calculado como el número de UFC/g de raíz dividido el número de UFC/g de heterótrofas cultivables.

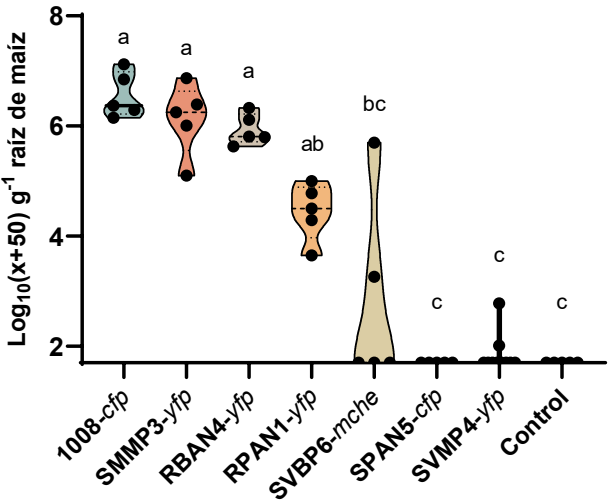


Figura 39. Colonización temprana de las raíces de maíz por parte de nuestros aislamientos de *Pseudomonas*, en presencia de microflora nativa del suelo. Los datos fueron corregidos para expresar los valores según el peso seco de las raíces. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Kruskal-Wallis con test de Dunn para comparaciones múltiples, $p < 0,05$).

y 40b), si bien las plantas inoculadas con RBAN4-*yfp* no evidenciaron una mayor altura (Figuras 38b y 40c). Aun así, se encontró una correlación positiva entre la biomasa aérea (fresca y seca), altura de las plantas, y biomasa radicular en el conjunto de datos (Figura 41). Si se analiza el crecimiento de las raíces, observamos un aumento en el peso fresco de las mismas como consecuencia de la inoculación con nuestros aislamientos; no obstante, se obtuvieron valores similares de largo de raíz en todos los tratamientos (Figura 40e). Finalmente, cuando se analiza la relación entre la biomasa aérea y la biomasa radicular (BA/BR), se encontró que SPAN5-*cfp* fue el único tratamiento que significativamente favoreció la porción aérea sin la necesidad de incrementar la biomasa radicular, aunque SVBP6-*mche* y SVMP4-*yfp* mostraron una tendencia similar (Figura 40f).

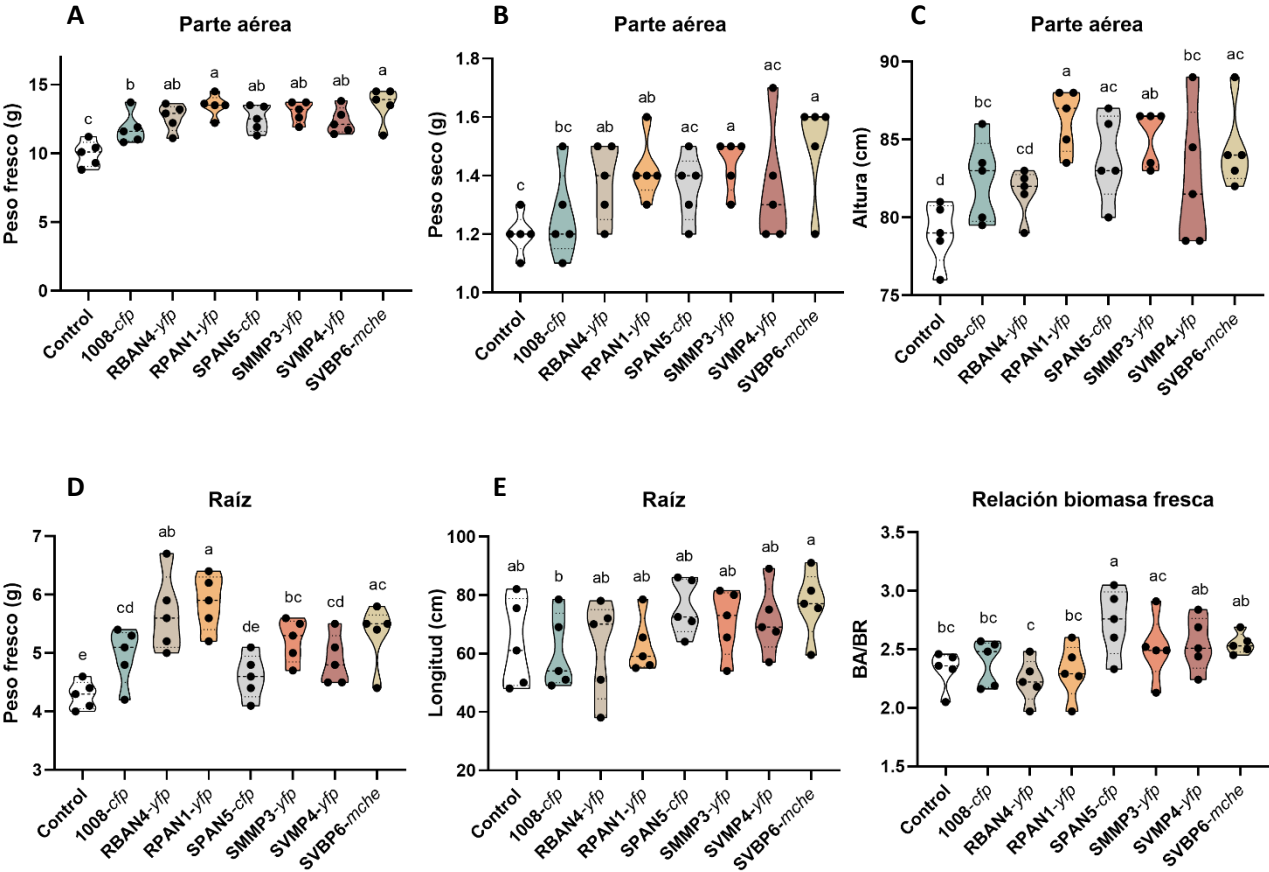


Figura 40. Estudio de los parámetros de las plantas de maíz en estadio V3, inoculadas con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* al cabo de un mes. Se evaluó **a)** peso fresco y **b)** seco de la parte aérea; **c)** altura de las plantas; **d)** peso fresco de las raíces; **e)** longitud de la raíz; y **f)** la relación entre la biomasa aérea/biomasa radicular (BA/BR). En blanco se muestra el control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA con LSD de Fisher, $p < 0,05$).

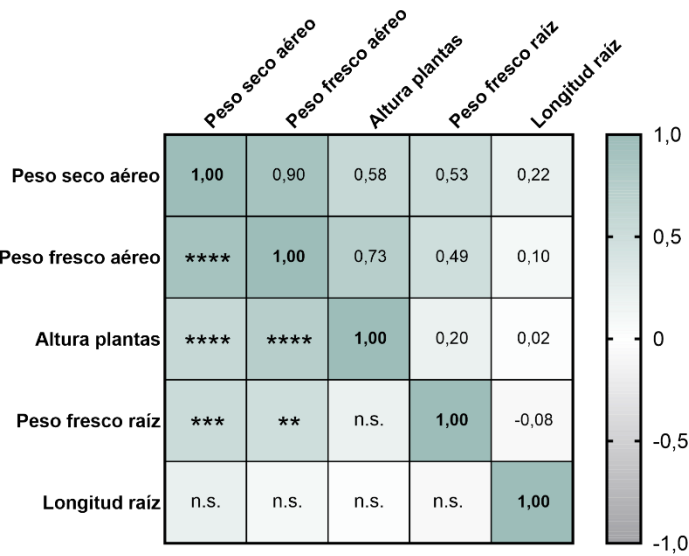


Figura 41. Correlación de Pearson entre los parámetros evaluados de las plantas de maíz. La parte superior de la diagonal muestra los valores de los coeficientes de Pearson, mientras que la inferior muestra el p valor asociado a cada comparación. ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$, **** indica $p < 0,0001$; n.s., no significativo).

En el ensayo de trigo (Figura 42), los niveles de bacterización de las semillas inoculadas previo a la siembra (Tabla 16) fueron consistentes con los obtenidos en los experimentos anteriores (Tabla 8). Luego de la cosecha, los recuentos de bacterias mesófilas oscilaron entre $7,46 \times 10^8$ y $4,24 \times 10^9$ por gramo de raíz seca, superando los valores obtenidos en el ensayo de maíz (Tabla 17). A pesar de ello, el porcentaje de cada uno de nuestros aislamientos en rizósfera de trigo respecto de la cantidad de bacterias heterótrofas fue más alto, excepto para 1008-*cfp* y SMMP3-*yfp* (Tabla 17). La abundancia total de cada uno de los aislamientos fue incluso más pareja (Figura 43), en concordancia con los niveles más homogéneos de bacterización de semillas para este cultivo en el día de la inoculación (Tablas 8 y 16).

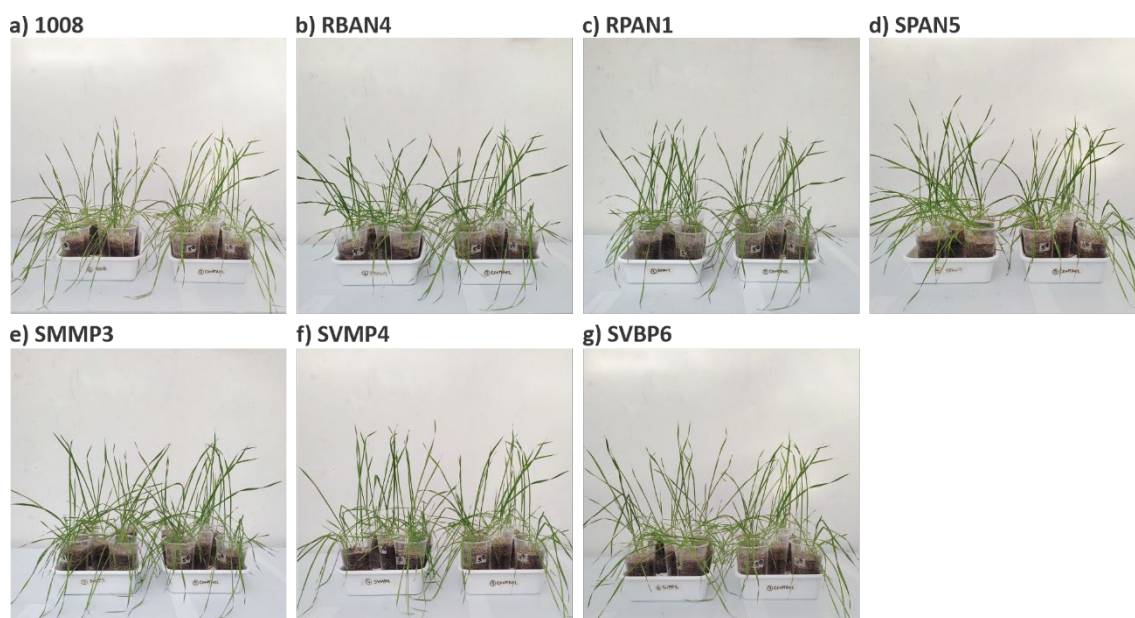


Figura 42. Plantas de trigo en estado final de macollaje (Z2 según la escala de Zadocks [356]), al momento de la cosecha. En cada imagen se muestran las plantas inoculadas con el aislamiento indicado (izquierda) y el control inoculado con solución salina (derecha).

Tabla 16. Número de bacterias recuperadas a partir de las semillas de trigo inoculadas, para el ensayo de invernáculo

Log₁₀ (UFC+50)/g de semilla	
RBAN4- <i>yfp</i>	5,13
RPAN1- <i>yfp</i>	4,96
SMMP3- <i>yfp</i>	5,23
SPAN5- <i>cfp</i>	4,80
SVMP4- <i>yfp</i>	4,20
SVBP6- <i>mche</i>	5,03
1008- <i>cfp</i>	4,86

SMMP3-*yfp*, SPAN5-*cfp* y 1008-*cfp* obtuvieron los porcentajes más altos de colonización en trigo (Tabla 17). Particularmente, SVMP4-*yfp* evidenció una carga más baja que el resto de las cepas (Figura 43), representando el 0,001% del total de bacterias heterótrofas cultivables (Tabla 17). Si tenemos en cuenta el nivel de bacterización conseguido en semillas de trigo, se observa que este aislamiento parte de un número más bajo en el día de la inoculación (Tabla 16). SVBP6-*mche* también mostró una abundancia total menor (Figura 43), a pesar de haber logrado una buena bacterización en semilla (Tabla 16). Aun así, su porcentaje en rizósfera en comparación al número de bacterias heterótrofas fue similar al de RBAN4-*yfp* y RPAN1-*yfp* (Tabla 17).

Tabla 17. Densidad de bacterias heterótrofas mesófilas cultivables en la rizósfera de plantas de trigo y su relación con la abundancia de nuestros aislamientos

	Heterótrofas mesófilas		Porcentaje del aislamiento en la rizósfera ^b
	Log ₁₀ (UFC+50)/g de raíz ± SD	ANOVA ^a	
Control	9,55 ± 0,08	a	-
RBAN4- <i>yfp</i>	9,02 ± 0,21	cd	0,277
RPAN1- <i>yfp</i>	9,51 ± 0,17	a	0,200
SMMP3- <i>yfp</i>	9,18 ± 0,12	bc	0,465
SPAN5- <i>cfp</i>	8,80 ± 0,21	d	0,364
SVMP4- <i>yfp</i>	9,61 ± 0,13	a	0,001
SVBP6- <i>mche</i>	9,01 ± 0,27	cd	0,200
1008- <i>cfp</i>	9,40 ± 0,15	ab	0,361

^a Analizado con ANOVA, LSD Fisher ($p < 0,05$).

^b Calculado como el número de UFC/g de raíz dividido el número de UFC/g de heterótrofas cultivables.

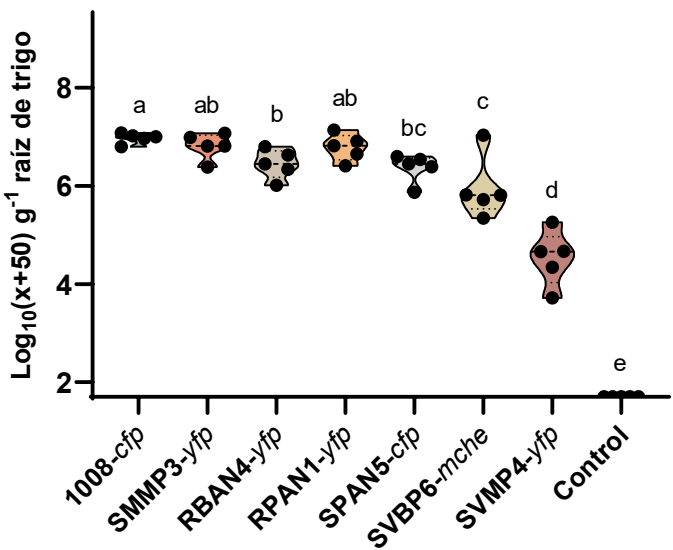


Figura 43. Colonización temprana de las raíces de trigo por parte de nuestros aislamientos de *Pseudomonas*, en presencia de microflora nativa del suelo. Los datos fueron corregidos para expresar los valores según el peso seco de las raíces. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA con LSD Fisher, $p < 0,05$).

Las diferencias en la abundancia de nuestros aislamientos en rizósfera no fue un factor determinante al analizar los efectos de promoción del crecimiento en plantas de trigo. Por ejemplo, se observaron valores equivalentes al control sin inocular en la biomasa aérea fresca y seca para todos los tratamientos (Figuras 44a y 44b), aunque RBAN4-*yfp*, SPAN5-*cfp*, SVMPP4-*yfp* y SVBP6-*mche* mostraron valores mayores al control a pesar de no ser estadísticamente significativos. RPAN1-*yfp* incluso obtuvo valores más bajos de altura de las plantas (Figura 44c). Por su parte, SPAN5-*cfp* fue el único aislamiento que logró incrementar el peso fresco de la raíz significativamente, aunque SVBP6-*mche* mostró la misma tendencia (Figura 44d). Esto no impactó en la longitud de

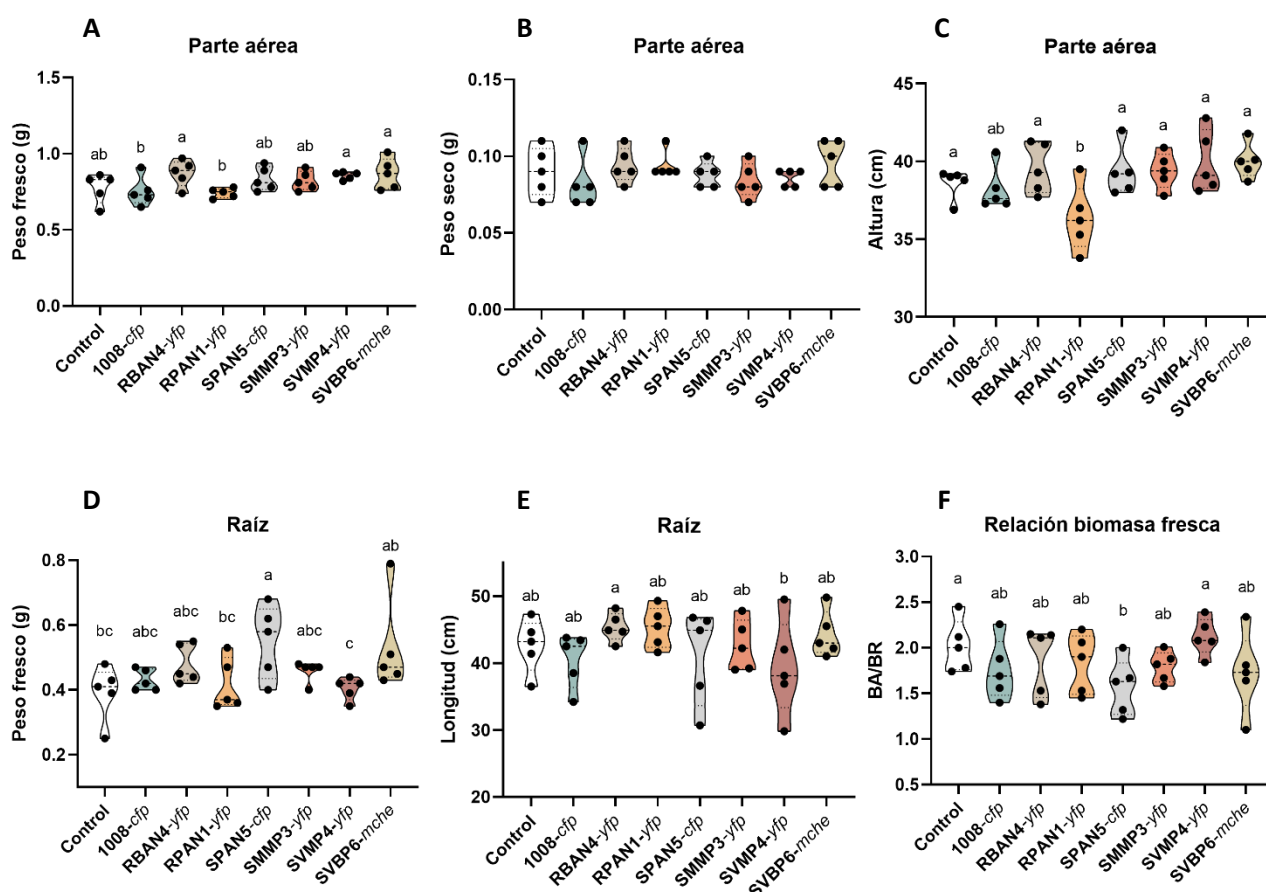
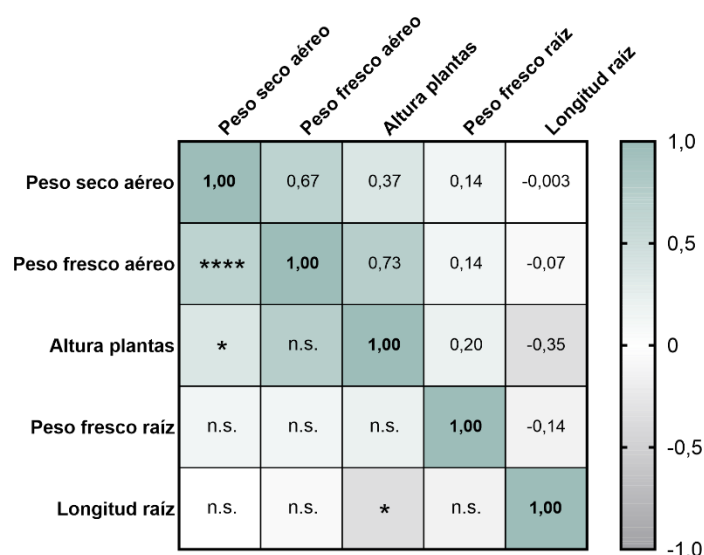


Figura 44. Estudio de los parámetros de las plantas de trigo en Z2, inoculadas con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* al cabo de un mes. Se evaluó **a)** peso fresco y **b)** seco de la parte aérea; **c)** altura de las plantas; **d)** peso fresco de las raíces; **e)** longitud de la raíz; y **f)** la relación entre la biomasa aérea/biomasa radicular (BA/BR). En blanco se muestra el control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA con LSD de Fisher para **a-c-e-f**, $p < 0,05$; y Kruskal-Wallis con test de Dunn para comparaciones múltiples en **b-d**, $p < 0,05$).



la raíz más larga (Figura 44e). De hecho, se encontró una correlación negativa y significativa entre la altura de las plantas y la longitud de la raíz en el conjunto de datos (Figura 45). El desempeño del resto de los aislamientos fue indistinguible del control sin inocular en este estadio particular de las plantas de trigo (Figura 44).

Para el ensayo en plantas de soja (Figura 46), los recuentos provenientes de semillas inoculadas con nuestros aislamientos (Tabla 18) fueron similares a los obtenidos en los ensayos de bacterización (Tabla 8). No obstante, *SVMP4-yfp* no fue recuperada de las semillas a diferencia de lo que se obtuvo anteriormente. La abundancia de bacterias heterótrofas mesófilas cultivables al cabo de un mes fue pareja en todas las muestras, variando entre $4,0$ y $5,2 \times 10^9$ por gramo de raíz seca, excepto por el tratamiento con *1008-cfp* donde la carga fue mayor (Tabla 19). Asimismo, estos valores fueron más altos que en el ensayo de maíz, pero comparables a los obtenidos en el ensayo de trigo (Tablas 15 y 17). Todos los aislamientos fueron detectados en rizósfera, incluyendo *SVMP4-yfp*, el cual no se había recuperado de las semillas (Figura 47). Además, los niveles de colonización mostraron el mismo patrón que en plantas de trigo (Figura 43). Aquellos aislamientos que mostraron un mayor grado de bacterización de semillas fueron los que colonizaron más abundantemente la rizósfera de soja (Tablas 18 y 19). La cepa de referencia *1008-cfp* fue el aislamiento con los recuentos más altos, alcanzando el 1,3% respecto del total de bacterias heterótrofas, mientras que para *SVBP6-mche* y *SVMP4-yfp* este porcentaje fue de 0,03 y 0,001%, respectivamente (Tabla 19). Es interesante que tanto *1008-cfp* como *SVBP6-mche* y *RBAN4-yfp* lograron colonizar la rizósfera de soja en

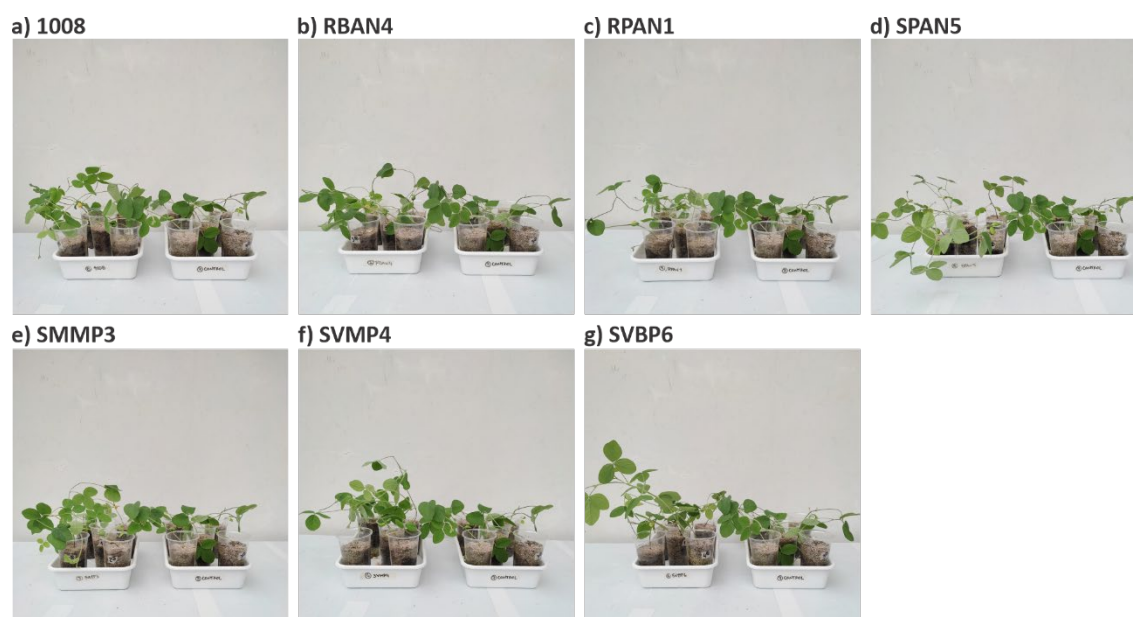


Figura 46. Plantas de soja en estadio V3-V4, al momento de la cosecha. En cada imagen se muestran las plantas inoculadas con el aislamiento indicado (izquierda) y el control inoculado con solución salina (derecha).

Tabla 18. Número de bacterias recuperadas a partir de las semillas de soja inoculadas, para el ensayo de invernáculo

	Log ₁₀ (UFC+50)/g de semilla
RBAN4- <i>yfp</i>	5,12
RPAN1- <i>yfp</i>	4,43
SMMP3- <i>yfp</i>	4,00
SPAN5- <i>cfp</i>	5,08
SVMP4- <i>yfp</i>	n.d.
SVBP6- <i>mche</i>	3,66
1008- <i>cfp</i>	4,59

n.d. = no detectado en semilla (< 250 UFC/g).

proporciones relativas a las bacterias heterótrofas totales equivalentes a las obtenidas en la rizósfera de maíz (Tablas 15 y 19). A pesar de obtener niveles más bajos de colonización en comparación al resto de las cepas, SVBP6-*mche* fue el único aislamiento que aumentó significativamente el peso seco de la porción aérea respecto del control sin inocular (Figura 48b), además de que las plantas inoculadas con este aislamiento alcanzaron una mayor altura y biomasa radicular (Figuras 48c y 48d). En relación a esto, se observó una correlación positiva y significativa entre el peso fresco y seco de la

porción aérea, altura de las plantas, biomasa radicular y longitud de la raíz para el conjunto de datos (Figura 49).

Aunque 1008-*cfp* obtuvo los recuentos más altos en rizósfera, el tratamiento con esta cepa mostró valores más bajos de peso seco de las plantas y peso fresco de raíz respecto del control (Figuras 48b, 48d y 50). Tampoco mejoró la altura de las plantas de soja (Figura 48c). Por su parte, RPAN1-*yfp* tuvo un impacto similar al de 1008 en los mismos parámetros, además de que las plantas inoculadas con este aislamiento presentaron raíces de menor longitud que el control (Figuras 48e y 50). Los aislamientos RBAN4-*yfp* y SMMP3-*yfp*, que obtuvieron niveles comparables de colonización, mejoraron únicamente la altura de las plantas (Figura 48c). Por otro lado, tanto la inoculación con SPAN5-*cfp* como con SVMP4-*yfp*, no alteró los parámetros medidos, siendo ambas indistinguibles del control sin inocular en todos los casos. Sin embargo, en la Figura 50 se puede observar que estos dos aislamientos en conjunto con SMMP3-*yfp* tuvieron un impacto positivo en la longitud radicular, lo cual se tradujo en promedios más altos de longitud de raíz en la Figura 48e. SPAN5-*cfp* y SVBP6-*mche*, por su parte, mostraron una mayor densidad de raíz (Figuras 48d y 50).

Tabla 19. Densidad de bacterias heterótrofas mesófilas cultivables en la rizósfera de plantas de soja y su relación con la abundancia de nuestros aislamientos.

	Heterótrofas mesófilas		Porcentaje del aislamiento en la rizósfera de soja ^b
	Log ₁₀ (UFC+50)/g de raíz ± SD	ANOVA ^a	
Control	9,68 ± 0,15	b	-
RBAN4- <i>yfp</i>	9,70 ± 0,03	b	0,247
RPAN1- <i>yfp</i>	9,69 ± 0,08	b	0,377
SMMP3- <i>yfp</i>	9,56 ± 0,22	b	0,442
SPAN5- <i>cfp</i>	9,57 ± 0,26	b	0,576
SVMP4- <i>yfp</i>	9,69 ± 0,10	b	0,001
SVBP6- <i>mche</i>	9,70 ± 0,09	b	0,030
1008- <i>cfp</i>	9,93 ± 0,25	a	1,279

^a Analizado con ANOVA, LSD Fisher ($p < 0,05$).

^b Calculado como el número de UFC/g de raíz dividido el número de UFC/g de heterótrofas cultivables.

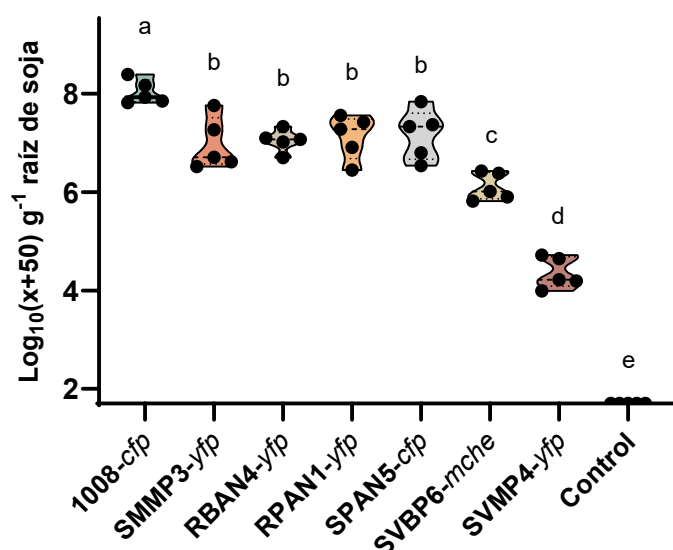


Figura 47. Colonización temprana de las raíces de soja por parte de nuestros aislamientos de *Pseudomonas*, en presencia de microflora nativa del suelo. Los datos fueron corregidos para expresar los valores según el peso seco de las raíces. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA con LSD Fisher, $p < 0,05$).

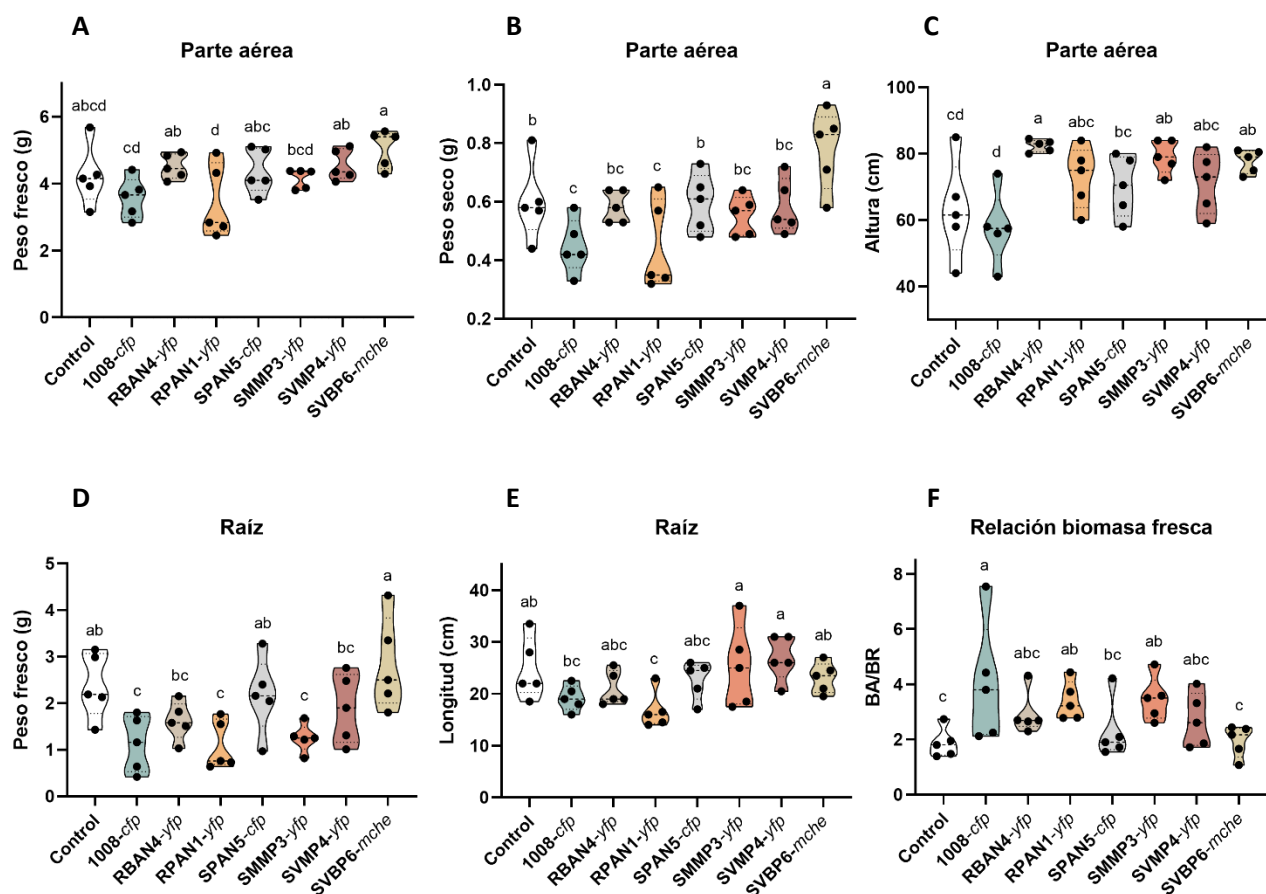


Figura 48. Estudio de los parámetros de las plantas de soja en estadio V3-V4, inoculadas con nuestros aislamientos de *Pseudomonas* al cabo de un mes. Se evaluó **a)** peso fresco y **b)** seco de la parte aérea; **c)** altura de las plantas; **d)** peso fresco de las raíces; **e)** longitud de la raíz; y **f)** la relación entre la biomasa aérea/biomasa radicular (BA/BR). En blanco se muestra el control sin inocular. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA con LSD de Fisher, $p < 0,05$).

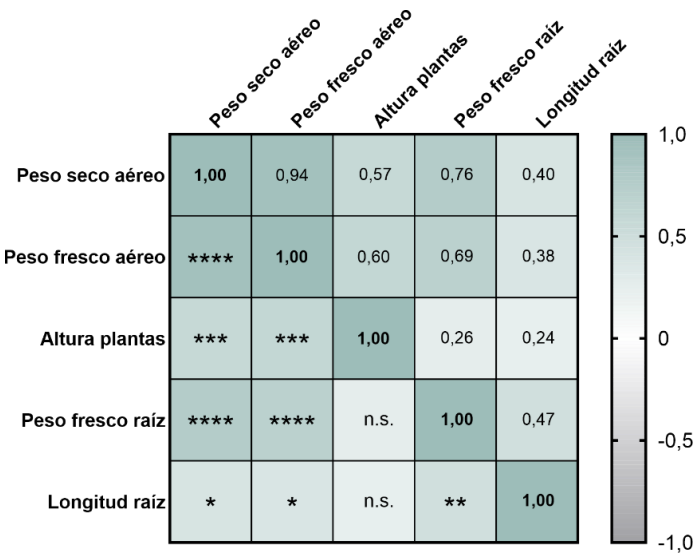


Figura 49. Correlación de Pearson entre los parámetros evaluados de las plantas de soja. La parte superior de la diagonal muestra los valores de los coeficientes de Pearson, mientras que la inferior muestra el p valor asociado a cada comparación. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$, **** indica $p < 0,0001$; n.s., no significativo).

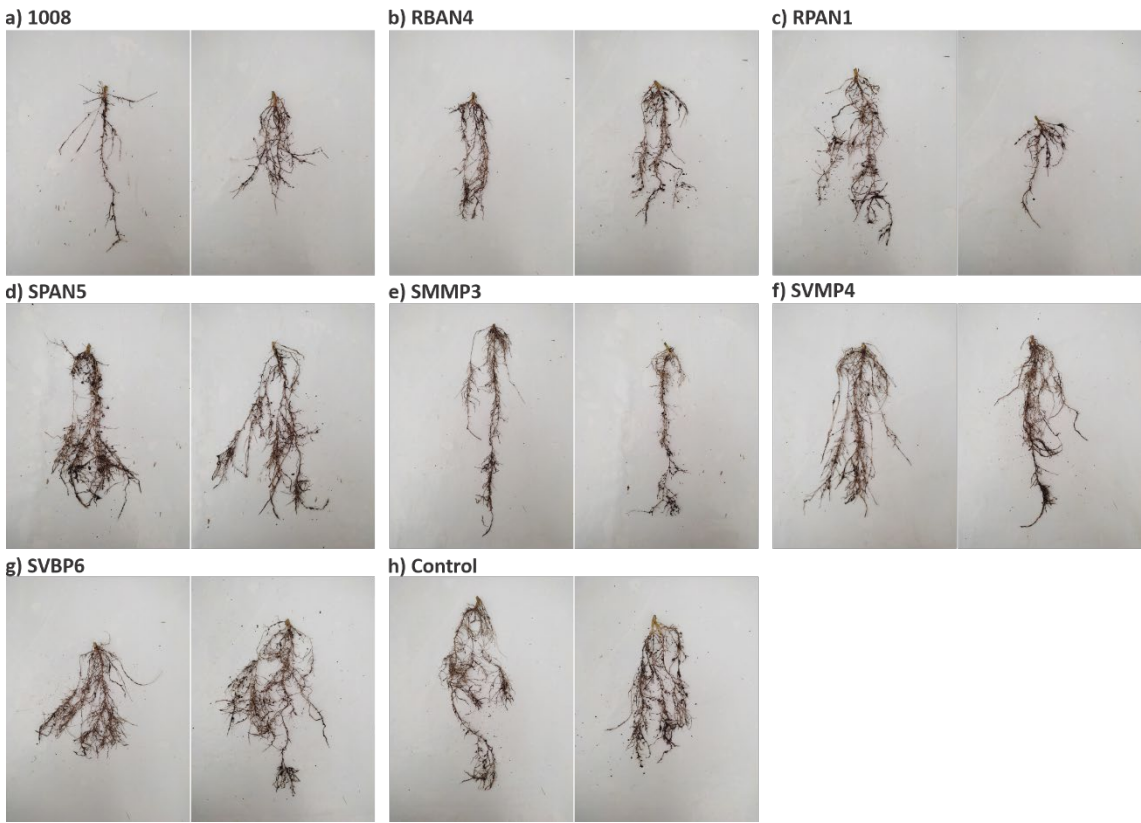


Figura 50. Sistema radical de las plantas de soja inoculadas con nuestros aislamientos de *Pseudomonas*, luego de un mes del ensayo. Se muestran dos de las 5 réplicas por cada experimento.

Discusión

Convencionalmente, se asume que la colonización de las raíces es esencial para la promoción efectiva del crecimiento de las plantas por parte de los microorganismos, ya que el contacto directo con los tejidos vegetales permite que los PGPM ejerzan sus efectos benéficos, mientras utilizan los exudados de las raíces como fuentes de nutrientes [139]. Además, se ha comprobado que la motilidad celular y la formación de biofilms están asociadas a una mayor eficiencia en la colonización [357], [358], [359], capacidades que exhiben todos nuestros aislamientos *in vitro* [145]. En este capítulo se evaluó la competitividad radicular de los aislamientos de *Pseudomonas* frente a la microflora del suelo, así como sus efectos de promoción del crecimiento en plantas de maíz, trigo y soja, al cabo de un mes de la inoculación.

Si consideramos el recuento inicial de bacterias heterótrofas y mesófilas presentes en la mezcla suelo-perlita utilizada en el ensayo (de 4×10^5 UFC/g, aproximadamente), se observa un incremento en la cantidad de UFC cuando de estas bacterias se recuperan a partir de la rizósfera de los tres cultivos. Este aumento podría deberse al enriquecimiento de ciertos grupos bacterianos en el rizoplano de las plantas evaluadas [70], [360], como se ha observado en estudios previos de nuestro laboratorio en lotes agrícolas, con un mismo tipo de suelo [72]. En maíz, los recuentos de bacterias heterótrofas alcanzaron aproximadamente entre 4×10^7 UFC/g y 6×10^8 de raíz (Tabla 15), en contraste con trigo (entre 8×10^8 y 4×10^9 UFC/g; Tabla 17) y soja (entre 4 y 5×10^9 UFC/g; Tabla 19), donde los valores fueron más altos. Se sabe que la naturaleza de las rizodeposiciones varía según la especie de planta, por lo que esta juega un rol clave en el reclutamiento de microorganismos hacia la rizósfera [361], [362]. Por lo tanto, sugerimos que las variaciones en la abundancia total de bacterias pueden estar relacionadas con dicho fenómeno. En otro trabajo de nuestro grupo, hemos visto que los recuentos de bacterias heterótrofas totales fueron más altos en la rizósfera de soja que en la de maíz [81], en concordancia con los resultados obtenidos en este experimento. Dado que, en general, las bacterias cultivables representan menos del 1% de la microflora, se podría evaluar con un método independiente de cultivo si estas diferencias en los efectos rizosféricos se mantienen.

La colonización de nuestras *Pseudomonas* en la rizósfera de maíz evidenció diferencias significativas entre los aislamientos evaluados (Figura 39), al igual que los recuentos observados en las semillas en el día 0 (Tabla 14). En contraposición, los recuentos a partir de raíces de trigo y soja fueron más homogéneos (Figuras 43 y 47), replicando lo observado en las semillas de estos cultivos (Tablas 16 y 18). Esta correspondencia entre la carga del aislamiento en semilla y la densidad alcanzada en rizósfera ocurrió en la mayoría de los casos. Al realizar un análisis de correlación de Pearson, se encontró una correlación positiva y significativa entre estas dos variables, siendo el valor del coeficiente 0,78; con $p < 0,0001$. RBAN4-*yfp*, SMMP3-*yfp* y la cepa de referencia 1008-*cfp* obtuvieron los recuentos más altos en la rizósfera de los tres cultivos, a pesar de la presencia de otros microorganismos competidores (Figuras 39, 43 y 47). En la rizósfera de maíz, estos aislamientos alcanzaron una colonización de aproximadamente $5; 1; \text{ y } 3 \times 10^6$ UFC/g de raíz, respectivamente. En trigo, estos valores fueron de $1; 0,3; \text{ y } 0,7 \times 10^7$ UFC/g de raíz, mientras que en soja fueron de $1; 0,1; \text{ y } 0,2 \times 10^8$ UFC/g. RPAN1-*yfp* y SPAN5-*cfp* alcanzaron una carga similar a los anteriores en plantas de trigo y soja (Figuras 43 y 47).

Por otro lado, SVMP4-*yfp*, que mostró los recuentos más bajos en el día 0 en todas las semillas, también presentó la menor colonización rizosférica en los tres cultivos (Figuras 39, 43 y 47). En particular, no fue detectado en la rizósfera de maíz luego de un mes de ensayo (Figura 39), por lo que la mejora en la bacterización lograda con la adición de trehalosa–PVP (Figura 14b) parecería insuficiente para permitirle colonizar la raíz y competir con la microflora natural del suelo (Figura 39). Sin embargo, SVMP4-*yfp* alcanzó cargas de aproximadamente 6×10^4 UFC/g y 3×10^4 UFC/g de raíz en plantas de trigo y soja, respectivamente (Figuras 43 y 47), aunque estuvo por debajo del límite de detección en semillas de soja antes de la siembra (<250 UFC/g; Tabla 18). De manera similar, en un experimento con *P. putida* KT2440, a pesar de que esta bacteria no pudo ser recuperada de semillas de maíz luego de 12 días de almacenamiento a temperatura ambiente, fue detectada en la rizósfera cuando las semillas se sembraron después de ese periodo [293]. Los autores sugieren que esta bacteria podría entrar en el estado VBNC, y volver al estado cultivable luego de la interacción con las raíces de maíz [293], fenómeno que podría ocurrir con SVMP4-*yfp*, como se remarcó en el Capítulo 2. En cuanto a SVBP6-*mche*, fue detectado en baja cantidad y de manera heterogénea en la

rizósfera de maíz (Figura 39), en concordancia con los ensayos en semilla (Figura 15) y con las microscopías de plántulas de maíz (Figura 30g). Este aislamiento, que se encontró por debajo del límite de detección en semillas de maíz antes la siembra (<200 UFC/g; Tabla 14), obtuvo recuentos en dos de las cinco réplicas (Figura 39). En la rizósfera de trigo y soja, SVBP6-*mche* también mostró una tendencia a colonizar las raíces en menor proporción que el resto de los aislamientos evaluados (Figuras 43 y 47), de forma similar a lo visto en las semillas de estos cultivos (Figuras 17 y 19). En línea con nuestros hallazgos, en un estudio a campo con plantas de maíz inoculadas en semilla con *P. putida* KT2442, se vio que esta bacteria presentó una abundancia de 5×10^3 a 6×10^5 UFC/g de suelo rizosférico, mientras que en la rizósfera de plantas de habas logró aproximadamente 4×10^6 UFC/g. Los autores propusieron que esta diferencia en la colonización podría atribuirse a que la carga bacteriana en semillas de maíz fue menor que en semillas de habas [278]. En trabajos con bacterias del género *Bacillus*, también se encontró una correlación entre el grado de bacterización de semillas de trigo y la densidad de colonización en raíces, utilizando carboximetilcelulosa como aditivo [363]. El mismo patrón se observó al inocular semillas de lupinos con una cepa de *Bradyrhizobium*, donde a mayor carga en la semilla se observó una mayor colonización [181]. Sin embargo, en otros trabajos con *Stenotrophomonas maltophilia* y *P. fluorescens* no se encontró una relación entre estos dos factores al inocular semillas de trigo desinfectadas [364]. En nuestro ensayo en maíz, SPAN5-*cfp* no fue detectado en rizósfera y RPA1-*yfp* mostró una menor colonización respecto del resto de los aislamientos (aunque no significativa), a pesar de que ambos habían alcanzado buenos títulos en los ensayos en semilla (Figuras 14a y 39). Sin embargo, en la cuantificación del día de siembra se observaron diferencias con los resultados previos, lo cual podría estar relacionado con los resultados poco satisfactorios en rizósfera (Tabla 14).

Varios trabajos han reportado que la población de *Pseudomonas* introducida en suelo tiende a decrecer luego de la inoculación, hasta alcanzar un nivel más o menos estable. Por ejemplo, en un estudio en rizósfera de trigo, las cepas evaluadas alcanzaron distintos recuentos a los 30 días post-inoculación en un suelo fertilizado, con títulos de alrededor de $6,3 \times 10^3$ UFC/g y 6×10^4 UFC/g de raíz [365]. Otro trabajo en maíz mostró que solo una de las dos cepas de *Pseudomonas* probadas pudo ser detectada hasta 8 semanas post-inoculación, y su densidad varió según el tipo de suelo empleado [366].

Con estos antecedentes, podríamos hipotetizar que nuestros aislamientos siguen una cinética de decaimiento en la rizósfera, incluso para *SPAN5-cfp*, el cual no fue detectado al mes en maíz, aunque son necesarios ensayos de recuperación periódicos para evaluar esta hipótesis.

La correspondencia entre la densidad alcanzada por el inoculante en rizósfera y su efecto positivo en la planta ha sido documentada en algunos estudios [163], [345], [367]. Más específicamente en *Pseudomonas* se ha visto que, para lograr el efecto benéfico deseado, se deben alcanzar niveles de colonización superiores a 10^5 UFC/g de raíz [368]. Los efectos positivos de las cepas *RBAN4-yfp*, *RPAN1-yfp* y *SMMP3-yfp* en el crecimiento de las plantas de maíz V3 (Figura 40) probablemente se ven favorecidos por sus buenos niveles de bacterización en semilla (Figura 15) y por la colonización efectiva de la rizósfera (Figura 39), superando el valor de 10^5 UFC/g de raíz. En resultados previos de nuestro grupo en condiciones axénicas, también observamos que *SMMP3* mejoró significativamente el crecimiento de plantas de maíz a los 15 días de crecimiento [145]. Además, este aislamiento aumentó el rendimiento en granos de maíz en ensayos experimentales a campo cuando se inoculó solo o en combinación con un aislamiento del hongo *Trichoderma harzianum* [127]. Sin embargo, en nuestro experimento con maíz también se observó una mejora en los parámetros de las plantas con aquellos aislamientos que colonizaron la rizósfera en niveles más bajos que el reportado, como *SVMP4-yfp*, *RPAN1-yfp*, *SPAN5-cfp* y *SVBP6-mche* (Figura 40). Esto sugiere que la escasa colonización es suficiente para generar un efecto benéfico en la planta, o bien que la presencia de estos aislamientos es importante en etapas tempranas del desarrollo de las plantas de maíz. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado que el contacto inicial de una cepa de *Bacillus subtilis* promotora del crecimiento vegetal con semillas de melón modifica el contenido de los cuerpos lipídicos de la semilla, generando un efecto benéfico en las plantas adultas [369]. De esta forma, las cepas de *Bacillus*, a pesar de no colonizar la radícula de plantas de melón por tiempos prolongados, mantienen su efecto promotor debido a la producción de metabolitos específicos, como la proteína amiloide TasA y el lipopéptido fengicina, que alteran el metabolismo en la semilla, trasladándose al desarrollo temprano de la planta [369]. De manera similar, se ha reportado en otro trabajo que los inoculantes pueden alterar permanentemente la fisiología de la planta por metilación diferencial del ADN, impactando en la promoción del crecimiento incluso

después de ser eliminados del suelo en el que se encuentran. Esto se observó en plantas de la especie *Phytolacca americana* inoculadas con cepas de *Bacillus* sp. y *Arthrobacter* sp., donde la colonización temprana de la raíz fue suficiente para generar un efecto de promoción [370]. Por lo tanto, proponemos que algunas de nuestras *Pseudomonas* podrían utilizar estrategias similares a las mencionadas, aunque se necesitan más experimentos para evaluar estas hipótesis. También sería necesario analizar si estos mecanismos son suficientes para generar un efecto de biocontrol en las plantas, por ejemplo, mediante la activación de la ISR.

A pesar de que todos los aislamientos alcanzaron altos niveles de colonización en trigo, no se observaron diferencias notorias respecto del control en los parámetros de las plantas en etapa Z2 (Figura 44). Esto señala que un alto nivel de colonización de la rizósfera no sería suficiente para tener un impacto significativo en el desarrollo de las plantas de trigo en el periodo evaluado. No obstante, RBAN4-*yfp*, SPAN5-*cfp*, SMMP3-*yfp* y SVBP6-*mche*, que mostraron una tendencia a incrementar la biomasa fresca y altura de las plantas en nuestros ensayos (Figuras 44b y 44c), aumentaron el rendimiento en granos en experimentos a campo, inoculados individualmente o con *T. harzianum* [127]. De forma similar, si bien 1008-*cfp* no mejoró significativamente los parámetros de las plantas al mes de crecimiento, en ensayos a campo se vio un aumento en el número de espigas y en el rendimiento en grano en las plantas inoculadas con esta cepa [129]. Es importante destacar que todos estos ensayos se realizaron en distintos tipos de suelo y con distintas variedades de trigo [127], [129], lo cual remarca la robustez de los resultados. Con estas evidencias, sería interesante evaluar los efectos de nuestros aislamientos en un mayor número de variedades y a ciclo completo, para determinar si el efecto de la inoculación se mantiene.

En soja ocurrió un fenómeno similar: si bien todos los aislamientos lograron colonizar y competir con la microflora nativa, no se observó un impacto significativo en las plantas respecto del control sin inocular (Figura 48). Incluso, tanto la inoculación con 1008-*cfp* como con RPAN1-*yfp*, mostraron valores más bajos que el control para ciertos parámetros de las plantas (Figuras 48b y 48d). Esto último refuerza la idea de que la respuesta fisiológica de estos sistemas depende de cada par bacteria-planta, y puede variar no solo con la especie de planta, sino también con el genotipo de la misma [371], [372], [373]. Curiosamente, el aislamiento SVBP6-*mche*, que mostró una colonización

radicular más baja en comparación con la mayoría de los aislamientos, incrementó el peso seco de la parte aérea, la biomasa radicular y la altura de las plantas (Figuras 48b, 48c y 48d). Son necesarios ensayos de ciclo completo para determinar si, a pesar de que no se observan cambios en las etapas tempranas para el resto de los aislamientos, existen mejoras en el rendimiento en granos.

Por último, se considera que un inoculante basado en un único microorganismo puede no ser la mejor estrategia si se lo quiere aplicar en un amplio rango de ambientes. Por lo tanto, la tendencia actual se dirige hacia el desarrollo de consorcios microbianos multi-especies, donde se tienen en cuenta las propiedades específicas de cada microorganismo y la biocompatibilidad entre las especies co-inoculadas [148]. *Pseudomonas* ha sido utilizada exitosamente en combinación con otras bacterias y en una variedad de cultivos [166], [374], [375], [376]. Sería interesante, entonces, explorar si existen efectos sinérgicos entre estos aislamientos o incluso con otros microorganismos, como ya se ha probado en experimentos a campo con *T. harzianum* [127]. En experimentos previos de compatibilidad con *B. japonicum* de nuestro grupo de trabajo, se observaron efectos positivos, neutros (SPAN5, RBAN4 y SVBP6) y negativos (RPAN1 y SMMP3) con algunos de los aislamientos de nuestra colección [250], por lo que resulta necesario llevar a cabo este tipo de ensayos si se quiere desarrollar un formulado mixto.

Conclusiones

Durante este capítulo, evaluamos la colonización y competitividad de nuestros aislamientos de *Pseudomonas* frente a otros microorganismos del suelo. Todos ellos fueron detectados en la rizósfera de maíz, trigo y soja, luego de un mes de la inoculación en semilla, excepto por SPAN5-*cfp* y SVMP4-*yfp* en plantas de maíz. Además, se observó una correlación entre el nivel de bacterización alcanzado por cada aislamiento en semilla y su densidad bacteriana en la rizósfera. Particularmente, la rizósfera de trigo y la rizósfera de soja mostraron abundancias más homogéneas entre aislamientos, mientras que en maíz se observó mayor variabilidad. Aunque la inoculación mejoró los parámetros de las plantas, principalmente en maíz, en ciertos casos un alto nivel de colonización no se tradujo en una mayor promoción del crecimiento de las plantas. Estos resultados subrayan la necesidad de realizar experimentos de ciclo completo para evaluar el impacto de la inoculación en la productividad de los cultivos, ya que es posible que los efectos en el rendimiento no siempre se manifiesten en las primeras etapas del desarrollo vegetal.

Conclusiones Finales

En este estudio, caracterizamos el desempeño de un grupo de aislamientos de *Pseudomonas* probióticas, en función de su capacidad para permanecer viables y cultivables en la superficie de semillas de maíz, trigo y soja, así como su patrón de colonización radicular y competitividad en la rizósfera.

Nuestras observaciones revelaron que las distintas cepas se comportan de manera diferencial en las semillas de estos cultivos, evidenciando variaciones en su capacidad para adherirse y persistir en superficie. Asimismo, demostramos que los aditivos agregados a las suspensiones bacterianas afectan de manera diversa la bacterización, mejorando la carga de los aislamientos en semilla en la mayoría de los casos.

Las cepas de *Pseudomonas* evaluadas lograron colonizar la radícula de los tres cultivos en condiciones axénicas, mostrando diferentes patrones en la superficie de las raíces. En general, los niveles de bacterización de semillas se correspondieron con la densidad de colonización observada tanto en los experimentos de microscopía como en los ensayos en suelo. Los efectos de promoción temprana del crecimiento se vieron principalmente en plantas de maíz. Sin embargo, considerando nuestros antecedentes de mejora en el rendimiento observados en maíz y trigo con algunos de estos aislamientos, se deberían evaluar los efectos a ciclo completo en todos los casos. Esto permitirá determinar si estas cepas tienen el potencial de funcionar como bioinsumos efectivos para la agricultura.

El desempeño de RBAN4-*yfp* y SMMP3-*yfp* en los tres cultivos fue comparable al de la cepa de referencia 1008-*cfp* presente en el bioinsumo Rizofos®, sugiriendo que ambos aislamientos podrían ser implementados en estrategias de inoculación en semilla, de manera similar al inoculante comercial.

Por último, nuestros hallazgos señalan la importancia de profundizar en características como la adhesión y persistencia en semilla, la colonización y competencia rizosférica, si se quiere introducir un PGPM en un sistema agrícola. La investigación detallada de cada sistema bacteria-semilla es fundamental para diseñar e implementar estrategias exitosas de inoculación, como hemos destacado a lo largo de esta tesis.

Bibliografía

- [1] Soil Survey Staff, *Keys to soil taxonomy*, 13th ed. Washington DC: USDA Natural Resources Conservation Service, 2022. [Online]. Available: <https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-09/Keys-to-Soil-Taxonomy.pdf>
- [2] J. Heritage, E. G. V Evans, and R. A. Killington, 'The microbiology of soil and of nutrient cycling', in *Microbiology in Action*, 1st ed., J. Heritage, E. G. V Evans, and R. A. Killington, Eds., Cambridge: Cambridge University Press, 1999, pp. 1–13.
- [3] J. E. Thies and J. M. Grossman, 'The Soil Habitat and Soil Ecology', in *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*, 2006, ch. Capítulo 5, pp. 59–78. doi: 10.1201/9781420017113.ch5.
- [4] E. A. Paul, Ed., *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, 3rd ed. Elsevier Inc., 2007.
- [5] M. M. Al-Kaisi, R. Lal, K. R. Olson, and B. Lowery, 'Fundamentals and Functions of Soil Environment', in *Soil Health and Intensification of Agroecosystems*, Elsevier, 2017, pp. 1–23. doi: 10.1016/B978-0-12-805317-1.00001-4.
- [6] G. F. Capra, A. Ganga, E. Grilli, S. Vacca, and A. Buondonno, 'A review on anthropogenic soils from a worldwide perspective', *J Soils Sediments*, vol. 15, no. 7, pp. 1602–1618, Jul. 2015, doi: 10.1007/s11368-015-1110-x.
- [7] N. C. Brady and R. R. Weil, *The Nature and Properties of Soils*, 15th Edition. Pearson, 2017.
- [8] F. E. Allison, Ed., *Soil Organic Matter and Its Role in Crop Production*. Elsevier Inc., 1973.
- [9] A. E. Hartemink *et al.*, 'Soil horizon variation: A review', 2020, pp. 125–185. doi: 10.1016/bs.agron.2019.10.003.
- [10] B. W. Murphy, *Soil Organic Matter and Soil Function – Review of the Literature and Underlying Data*. Department of the Environment, Canberra, Australia., 2014.
- [11] C. J. Bronick and R. Lal, 'Soil structure and management: a review', *Geoderma*, vol. 124, no. 1–2, pp. 3–22, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.geoderma.2004.03.005.
- [12] M. H. B. Hayes and R. S. Swift, 'The Chemistry of soil organic colloids', 1978, pp. 179–320.
- [13] F. J. Stevenson, *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 2nd Edition. Wiley, 1994.
- [14] C. Branco de Freitas Maia, E. Novotny, T. Rittl, and M. Bermingham Hayes, 'Soil Organic Matter: Chemical and Physical Characteristics and Analytical Methods. A Review', *Curr Org Chem*, vol. 17, no. 24, pp. 2985–2990, Dec. 2013, doi: 10.2174/13852728113179990123.
- [15] J. W. Doran and M. R. Zeiss, 'Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality', *Applied Soil Ecology*, vol. 15, pp. 3–11, 2000, doi: 10.1016/S0929-1393(00)00067-6.

- [16] J. Lehmann, D. A. Bossio, I. Kögel-Knabner, and M. C. Rillig, 'The concept and future prospects of soil health', *Nat Rev Earth Environ*, vol. 1, no. 10, pp. 544–553, Aug. 2020, doi: 10.1038/s43017-020-0080-8.
- [17] R. Bardgett, 'Causes and consequences of biological diversity in soil', *Zoology*, vol. 105, no. 4, pp. 367–375, 2002, doi: 10.1078/0944-2006-00072.
- [18] N. Fierer, 'Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome', *Nat Rev Microbiol*, vol. 15, no. 10, pp. 579–590, Oct. 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2017.87.
- [19] P. A. H. M. Bakker *et al.*, 'The Soil-Borne Identity and Microbiome-Assisted Agriculture: Looking Back to the Future', *Mol Plant*, vol. 13, no. 10, pp. 1394–1401, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.molp.2020.09.017.
- [20] J. Aislabie and J. R. Deslippe, 'Soil microbes and their contribution to soil services', in *Ecosystems services in New Zealand - conditions and trends*, J. R. Dymond, Ed., Lincoln: Manaaki Whenua Press, 2013, pp. 143–161.
- [21] D. Standing and D. Killham, 'The soil environment', in *Modern Soil Microbiology*, Second Edition., J. D. Van Elsas, J. K. Jansson, and J. T. Trevors, Eds., New York: CRC Press, 2007.
- [22] K. G. Eilers, S. Debenport, S. Anderson, and N. Fierer, 'Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil', *Soil Biol Biochem*, vol. 50, pp. 58–65, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.soilbio.2012.03.011.
- [23] M. L. Saccá, A. Barra Caracciolo, M. Di Lenola, and P. Grenni, 'Ecosystem Services Provided By Soil Microorganisms', in *Soil Biological Communities and Ecosystem Resilience*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 9–24. doi: 10.1007/978-3-319-63336-7_2.
- [24] M. G. A. Van Der Heijden, R. D. Bardgett, and N. M. Van Straalen, 'The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems', *Ecol Lett*, vol. 11, no. 3, pp. 296–310, 2008, doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.
- [25] J. C. Bedano, A. Domínguez, R. Arolfo, and L. G. Wall, 'Effect of Good Agricultural Practices under no-till on litter and soil invertebrates in areas with different soil types', *Soil Tillage Res*, vol. 158, pp. 100–109, 2016, doi: 10.1016/j.still.2015.12.005.
- [26] J. M. Chaparro, A. M. Shefflin, D. K. Manter, and J. M. Vivanco, 'Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility', *Biol Fertil Soils*, vol. 48, no. 5, pp. 489–499, 2012, doi: 10.1007/s00374-012-0691-4.
- [27] J. P. Frene, L. A. Gabbarini, and L. G. Wall, 'Soil physiology discriminates between no-till agricultural soils with different crop systems on winter season', *Soil Use Manag*, pp. 0–3, 2019, doi: 10.1111/sum.12568.
- [28] A. Dubey *et al.*, 'Soil microbiome: a key player for conservation of soil health under changing climate', *Biodivers Conserv*, vol. 28, no. 8–9, pp. 2405–2429, Jul. 2019, doi: 10.1007/s10531-019-01760-5.

- [29] R. D. Bardgett and W. H. van der Putten, 'Belowground biodiversity and ecosystem functioning', *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 505–511, Nov. 2014, doi: 10.1038/nature13855.
- [30] J. A. Howe and A. P. Smith, 'The soil habitat', in *Principles and Applications of Soil Microbiology*, Third Edition., D. A. Zuberer, J. J. Fuhrmann, and T. Gentry, Eds., Elsevier Science, 2021.
- [31] A. Hartmann, M. Rothballer, and M. Schmid, 'Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research', *Plant Soil*, vol. 312, no. 1–2, pp. 7–14, 2008, doi: 10.1007/s11104-007-9514-z.
- [32] P. Hinsinger, G. R. Gobran, P. J. Gregory, and W. W. Wenzel, 'Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes', *New Phytologist*, vol. 168, no. 2, pp. 293–303, Nov. 2005, doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x.
- [33] D. H. Mcnear Jr., 'The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between', *Nature education Knowledge*, vol. 4, no. 3, pp. 1–15, 2013.
- [34] A. C. Kennedy, 'Rhizosphere', in *Principles and Applications of Soil Microbiology*, 2nd ed., D. Sylvia, J. Fuhrmann, P. Hartel, and D. Zuberer, Eds., New Jersey: Pearson Education, 2005, pp. 242–262.
- [35] H. Liu *et al.*, 'Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria', *Front Microbiol*, vol. 8, Dec. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02552.
- [36] J. M. Raaijmakers, T. C. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette, and Y. Moënne-Loccoz, 'The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms', *Plant Soil*, vol. 321, pp. 341–361, 2009, doi: 10.1007/s11104-008-9568-6.
- [37] G. Berg and K. Smalla, 'Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere.', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 68, no. 1, pp. 1–13, 2009, doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
- [38] D. V. Badri and J. M. Vivanco, 'Regulation and function of root exudates', *Plant Cell Environ*, vol. 32, no. 6, pp. 666–681, Jun. 2009, doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x.
- [39] R. L. Berendsen, C. M. J. Pieterse, and P. a H. M. Bakker, 'The rhizosphere microbiome and plant health', *Trends Plant Sci*, vol. 17, no. 8, pp. 478–486, 2012, doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- [40] O. S. Olanrewaju, A. S. Ayangbenro, B. R. Glick, and O. O. Babalola, 'Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, no. 3, pp. 1155–1166, 2019, doi: 10.1007/s00253-018-9556-6.
- [41] A. Zboralski and M. Fillion, 'Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp.', *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 18, pp. 3539–3554, 2020, doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.025.
- [42] M. Barret *et al.*, 'Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota', *Appl Environ Microbiol*, vol. 81, no. 4, pp. 1257–1266, 2015, doi: 10.1128/AEM.03722-14.

- [43] E. B. Nelson, 'Microbial dynamics and interactions in the spermosphere', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 42, no. 28, pp. 271–309, 2004, doi: 10.1146/annurev.phyto.42.121603.131041.
- [44] D. Johnston-Monje, J. P. Gutiérrez, and L. A. B. Lopez-Lavalle, 'Seed-Transmitted Bacteria and Fungi Dominate Juvenile Plant Microbiomes', *Front Microbiol*, vol. 12, Oct. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.737616.
- [45] C. M. Walsh, I. Becker-Uncapher, M. Carlson, and N. Fierer, 'Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes', *ISME J*, vol. 15, no. 9, pp. 2748–2762, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41396-021-00967-1.
- [46] D. Johnston-Monje, D. S. Lundberg, G. Lazarovits, V. M. Reis, and M. N. Raizada, 'Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil', *Plant Soil*, 2016, doi: 10.1007/s11104-016-2826-0.
- [47] G. Santoyo, C. Alberto Urtis-Flores, P. Damián Loeza-Lara, M. del Carmen Orozco-Mosqueda, and B. R. Glick, 'Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)', 2021, doi: 10.3390/biology.
- [48] M. Barret, J. P. Morrissey, and F. O'Gara, 'Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence', *Biol Fertil Soils*, vol. 47, no. 7, pp. 729–743, Oct. 2011, doi: 10.1007/s00374-011-0605-x.
- [49] T. Danhorn and C. Fuqua, 'Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria', *Annu Rev Microbiol*, vol. 61, no. 1, pp. 401–422, Oct. 2007, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093316.
- [50] M. Espinosa-Urgel, A. Salido, and J.-L. Ramos, 'Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds', *J Bacteriol*, vol. 182, no. 9, pp. 2363–2369, May 2000, doi: 10.1128/JB.182.9.2363-2369.2000.
- [51] J. W. Kloepper, J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth, 'Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria', *Nature*, vol. 286, pp. 885–886, 1980, doi: 10.1038/286885a0.
- [52] V. V. Kumar, 'Plant Growth-Promoting Microorganisms: Interaction with Plants and Soil', in *Plant, Soil and Microbes*, 1st ed., K. R. Hakeem, M. S. Akhtar, and S. N. A. Abdullah, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 1–16. doi: 10.1007/978-3-319-27455-3.
- [53] O. M. Finkel, G. Castrillo, S. Herrera Paredes, I. Salas González, and J. L. Dangl, 'Understanding and exploiting plant beneficial microbes', *Curr Opin Plant Biol*, vol. 38, pp. 155–163, 2017, doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.018.
- [54] B. Lugtenberg and F. Kamilova, 'Plant-growth-promoting rhizobacteria', *Annu Rev Microbiol*, vol. 63, no. c, pp. 541–556, 2009, doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- [55] R. Backer *et al.*, 'Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture', *Front Plant Sci*, vol. 9, p. 1473, 2018, doi: 10.3389/fpls.2018.01473.

- [56] M. Mendoza-Suárez, S. U. Andersen, P. S. Poole, and C. Sánchez-Cañizares, 'Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses', *Front Plant Sci*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.690567.
- [57] J. Vacheron *et al.*, 'Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning', *Front Plant Sci*, vol. 4, 2013, doi: 10.3389/fpls.2013.00356.
- [58] B. Drogue, H. Doré, S. Borland, F. Wisniewski-Dyé, and C. Prigent-Combaret, 'Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?', *Res Microbiol*, vol. 163, no. 8, pp. 500–510, 2012, doi: 10.1016/j.resmic.2012.08.006.
- [59] O. S. Olanrewaju, B. R. Glick, and O. O. Babalola, 'Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria', *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 33, no. 11, p. 197, 2017, doi: 10.1007/s11274-017-2364-9.
- [60] D. Haas and G. Défago, 'Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads', *Nat Rev Microbiol*, vol. 3, no. 4, pp. 307–319, 2005, doi: 10.1038/nrmicro1129.
- [61] H. Passarelli-Araujo, G. R. Franco, and T. M. Venancio, 'Network analysis of ten thousand genomes shed light on *Pseudomonas* diversity and classification', *Microbiol Res*, vol. 254, p. 126919, 2022, doi: 10.1016/j.micres.2021.126919.
- [62] M. W. Silby, C. Winstanley, S. a C. Godfrey, S. B. Levy, and R. W. Jackson, '*Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable.', *FEMS Microbiol Rev*, vol. 35, pp. 652–680, 2011, doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x.
- [63] J. Mercado-Blanco and P. A. H. M. Bakker, 'Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection', *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 92, no. 4, pp. 367–389, 2007, doi: 10.1007/s10482-007-9167-1.
- [64] A. Romanowski, M. L. Migliori, C. Valverde, and D. a Golombek, 'Circadian variation in *Pseudomonas fluorescens* (CHA0)-mediated paralysis of *Caenorhabditis elegans*', *Microb Pathog*, vol. 50, pp. 23–30, 2011, doi: 10.1016/j.micpath.2010.09.001.
- [65] A. Behar, B. Yuval, and E. Jurkevitch, 'Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity.', *J Insect Physiol*, vol. 54, pp. 1377–1383, 2008, doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.07.011.
- [66] N. J. Palleroni, 'The *Pseudomonas* Story', *Environ Microbiol*, vol. 12, no. 6, pp. 1377–1383, 2010, doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.
- [67] N. J. Palleroni, '*Pseudomonas*', in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Wiley, 2015, pp. 1–1. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01210.
- [68] M. A. Ali *et al.*, 'Microbial Inoculation of Seeds for Better Plant Growth and Productivity', in *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*, Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 523–550. doi: 10.1007/978-981-13-8625-1_26.
- [69] A. J. Spiers, A. Buckling, and P. B. Rainey, 'The causes of *Pseudomonas* diversity', *Microbiology (N Y)*, vol. 146, pp. 2345–2350, 2000.

- [70] D. Chiniquy *et al.*, 'Microbial Community Field Surveys Reveal Abundant *Pseudomonas* Population in Sorghum Rhizosphere Composed of Many Closely Related Phylotypes', *Front Microbiol*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.598180.
- [71] L. D. Lopes *et al.*, 'Genomic and metabolic differences between *Pseudomonas putida* populations inhabiting sugarcane rhizosphere or bulk soil', *PLoS One*, vol. 14, no. 10, pp. e0223269–e0223269, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0223269.
- [72] B. Agaras, L. Wall, and C. Valverde, 'Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina', *Applied Soil Ecology*, vol. 61, pp. 305–319, 2012, doi: 10.1016/j.apsoil.2011.11.016.
- [73] L. Molina, A. Segura, E. Duque, and J.-L. Ramos, 'The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment', 2020, pp. 149–180. doi: 10.1016/bs.aambs.2019.12.002.
- [74] B. J. J. Lugtenberg, L. Dekkers, and G. V. Bloemberg, 'Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 39, pp. 461–490, 2001, doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.461.
- [75] S. de Weert *et al.*, 'Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*.', *MPMI*, vol. 15, no. 11, pp. 1173–1180, 2002, doi: 10.1094/MPMI.2002.15.11.1173.
- [76] S. Oku, A. Komatsu, Y. Nakashimada, T. Tajima, and J. Kato, 'Identification of *Pseudomonas fluorescens* Chemotaxis Sensory Proteins for Malate, Succinate, and Fumarate, and Their Involvement in Root Colonization', *Microbes Environ*, vol. 29, no. 4, pp. 413–419, 2014, doi: 10.1264/jsme2.ME14128.
- [77] S. Capdevila, F. M. Martínez-Granero, M. Sánchez-Contreras, R. Rivilla, and M. Martín, 'Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization', *Microbiology (N Y)*, vol. 150, no. 11, pp. 3889–3897, Nov. 2004, doi: 10.1099/mic.0.27362-0.
- [78] F. Yousef-Coronado, M. L. Travieso, and M. Espinosa-Urgel, 'Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 288, no. 1, pp. 118–124, 2008, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01339.x.
- [79] F. Martínez-Granero, S. Capdevila, M. Sánchez-Contreras, M. Martín, and R. Rivilla, 'Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*', *Microbiology (N Y)*, vol. 151, no. 3, pp. 975–983, Mar. 2005, doi: 10.1099/mic.0.27583-0.
- [80] D. Van Den Broek, G. V. Bloemberg, and B. Lugtenberg, 'The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria', *Environ Microbiol*, vol. 7, no. 11, pp. 1686–1697, Nov. 2005, doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00912.x.
- [81] B. C. Agaras, L. G. Wall, and C. Valverde, 'Influence of agricultural practices and seasons on the abundance and community structure of culturable pseudomonads in soils under no-till management in Argentina', *Plant Soil*, vol. 382, no. 1–2, pp. 117–131, 2014, doi: 10.1007/s11104-014-2095-8.

- [82] S. Mittal and B. N. Johri, 'Influence of management practices on the diversity of pseudomonads in rhizosphere soil of wheat cropping system', *Biol Fertil Soils*, vol. 44, no. 6, pp. 823–831, 2008, doi: 10.1007/s00374-007-0264-0.
- [83] J. B. Meyer *et al.*, 'Interplay between wheat cultivars, biocontrol pseudomonads, and soil.', *Appl Environ Microbiol*, vol. 76, no. 18, pp. 6196–6204, 2010, doi: 10.1128/AEM.00752-10.
- [84] M. A. Marrero, B. C. Agaras, L. G. Wall, and C. Valverde, 'Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplasma de distintas especies cultivadas', *Rev Argent Microbiol*, vol. 47, no. 2, pp. 132–137, 2015, doi: 10.1016/j.ram.2015.03.007.
- [85] J. K. Vessey, 'Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers', *Plant Soil*, vol. 255, pp. 571–586, 2003.
- [86] H. P. Bais, T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, and J. M. Vivanco, 'The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms.', *Annu Rev Plant Biol*, vol. 57, pp. 233–266, 2006, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
- [87] S. H. Miller, P. Browne, C. Prigent-Combaret, E. Combes-Meynet, J. P. Morrissey, and F. O'Gara, 'Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species', *Environ Microbiol Rep*, vol. 2, no. 3, pp. 403–411, 2010, doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x.
- [88] N. Oteino *et al.*, 'Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates', *Front Microbiol*, vol. 6, Jul. 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00745.
- [89] C. Mander, S. Wakelin, S. Young, L. Condron, and M. O'Callaghan, 'Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils', *Soil Biol Biochem*, vol. 44, no. 1, pp. 93–101, 2012, doi: 10.1016/j.soilbio.2011.09.009.
- [90] L. Fernández, B. Agaras, P. Zalba, L. G. L. G. Wall, and C. Valverde, '*Pseudomonas* spp. isolates with high phosphate-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management', *Biol Fertil Soils*, vol. 48, no. 7, pp. 763–773, 2012, doi: 10.1007/s00374-012-0665-6.
- [91] E. Viruel, M. E. Lucca, and F. Siñeriz, 'Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina', *Arch Microbiol*, vol. 193, no. 7, pp. 489–496, Jul. 2011, doi: 10.1007/s00203-011-0692-y.
- [92] P. Cornelis, 'Iron uptake and metabolism in pseudomonads', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 86, no. 6, pp. 1637–1645, 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2550-2.
- [93] S. Sanow *et al.*, 'Molecular Mechanisms of *Pseudomonas* -Assisted Plant Nitrogen Uptake: Opportunities for Modern Agriculture', *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, vol. 36, no. 9, pp. 536–548, Sep. 2023, doi: 10.1094/MPMI-10-22-0223-CR.
- [94] L. Setten *et al.*, 'Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for Nitrogen Fixation and its Application to Improve Plant Growth under Nitrogen-Deficient Conditions', *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e63666, May 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0063666.

- [95] A. R. Fox *et al.*, 'Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940', *Environ Microbiol*, vol. 18, no. 10, pp. 3522–3534, Oct. 2016, doi: 10.1111/1462-2920.13376.
- [96] R. Hayat, S. Ali, U. Amara, R. Khalid, and I. Ahmed, 'Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review', *Ann Microbiol*, vol. 60, no. 4, pp. 579–598, 2010, doi: 10.1007/s13213-010-0117-1.
- [97] V. Gravel, H. Antoun, and R. J. Tweddell, 'Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA)', *Soil Biol Biochem*, vol. 39, no. 8, pp. 1968–1977, 2007, doi: 10.1016/j.soilbio.2007.02.015.
- [98] S.-M. Kang *et al.*, 'Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions', *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 84, pp. 115–124, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.plaphy.2014.09.001.
- [99] D. K. Großkinsky *et al.*, 'Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis', *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 23310, Mar. 2016, doi: 10.1038/srep23310.
- [100] B. R. Glick and F. X. Nascimento, 'Pseudomonas 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase and Its Role in Beneficial Plant-Microbe Interactions', *Microorganisms*, vol. 9, no. 12, p. 2467, Nov. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9122467.
- [101] A. Zago and S. Chugani, 'Pseudomonas', in *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd ed., M. Schaechter, Ed., Elsevier Inc., 2009, pp. 245–260.
- [102] A. Aswathi, A. Pandey, and R. K. Sukumaran, 'Rapid degradation of the organophosphate pesticide – Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3', *Bioresour Technol*, vol. 292, p. 122025, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.122025.
- [103] A. F. Tonelli Fernandes, V. S. Braz, A. Bauermeister, J. A. Rizzato Paschoal, N. P. Lopes, and E. G. Stehling, 'Degradation of atrazine by *Pseudomonas* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from Brazilian agricultural soil', *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 130, pp. 17–22, May 2018, doi: 10.1016/j.ibiod.2018.03.011.
- [104] A. O. Olaniran, L. Singh, A. Kumar, P. Mokoena, and B. Pillay, 'Aerobic degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other chlorophenols by *Pseudomonas* strains indigenous to contaminated soil in South Africa: Growth kinetics and degradation pathway', *Appl Biochem Microbiol*, vol. 53, no. 2, pp. 209–216, Mar. 2017, doi: 10.1134/S0003683817020120.
- [105] A. C. Agnello, M. Bagard, E. D. van Hullebusch, G. Esposito, and D. Huguenot, 'Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation', *Science of The Total Environment*, vol. 563–564, pp. 693–703, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.061.

- [106] D. Haas and C. Keel, 'Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease.', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 41, no. 63, pp. 117–153, 2003, doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656.
- [107] D. V. Mavrodi, W. Blankenfeldt, and L. S. Thomashow, 'Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 44, no. 1, pp. 417–445, Sep. 2006, doi: 10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710.
- [108] K. K. Devi and D. Kothamasi, '*Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 300, no. 2, pp. 195–200, Nov. 2009, doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01782.x.
- [109] M. Nandi *et al.*, 'Pyrrolnitrin and Hydrogen Cyanide Production by *Pseudomonas chlororaphis* Strain PA23 Exhibits Nematicidal and Repellent Activity against *Caenorhabditis elegans*', *PLoS One*, vol. 10, no. 4, p. e0123184, Apr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0123184.
- [110] A. Anand, D. Chinchilla, C. Tan, L. Mène-Saffrané, F. L'Haridon, and L. Weisskopf, 'Contribution of Hydrogen Cyanide to the Antagonistic Activity of *Pseudomonas* Strains Against *Phytophthora infestans*', *Microorganisms*, vol. 8, no. 8, p. 1144, Jul. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8081144.
- [111] F. M. Muzio, B. C. Agaras, M. Masi, A. Tuzi, A. Evidente, and C. Valverde, '7-hydroxytropolone is the main metabolite responsible for the fungal antagonism of *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6', *Environ Microbiol*, vol. 22, no. 7, pp. 2550–2563, 2020, doi: 10.1111/1462-2920.14925.
- [112] J. E. Loper *et al.*, 'Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions.', *PLoS Genet*, vol. 8, no. 7, pp. e1002784–e1002784, 2012, doi: 10.1371/journal.pgen.1002784.
- [113] P. Sacherer, G. Défago, and D. Haas, 'Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 116, pp. 155–160, 1994.
- [114] I. A. Siddiqui, D. Haas, and S. Heeb, 'Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*', *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, no. 9, pp. 5646–5649, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.9.5646-5649.2005.
- [115] M. N. Nielsen, J. Sørensen, J. Fels, and H. C. Pedersen, 'Secondary Metabolite- and Endochitinase-Dependent Antagonism toward Plant-Pathogenic Microfungi of *Pseudomonas fluorescens* Isolates from Sugar Beet Rhizosphere', *Appl Environ Microbiol*, vol. 64, no. 10, pp. 3563–3569, Oct. 1998, doi: 10.1128/AEM.64.10.3563-3569.1998.
- [116] M. Barret *et al.*, 'The plant pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* improves bacterial growth and triggers early gene regulations in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp.', *New Phytol*, vol. 181, no. 2, pp. 435–447, 2009, doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02675.x.

- [117] U. Conrath *et al.*, 'Priming: Getting Ready for Battle', *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], vol. 19, no. 10, pp. 1062–1071, Oct. 2006, doi: 10.1094/MPMI-19-1062.
- [118] L. C. van Loon, 'Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria', *Eur J Plant Pathol*, vol. 119, pp. 243–254, 2007, doi: 10.1007/s10658-007-9165-1.
- [119] H. Meziane, L. Van der Sluis, L. C. Van Loon, M. Hofte, and P. A. H. M. Bakker, 'Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants', *Mol Plant Pathol*, vol. 6, no. 2, pp. 177–185, Mar. 2005, doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00276.x.
- [120] C. Zamioudis and C. M. J. Pieterse, 'Modulation of host immunity by beneficial microbes', *MPMI*, vol. 25, no. 2, pp. 139–150, 2012, doi: 10.1094/MPMI-06-11-0179.
- [121] Y. A. Millet *et al.*, 'Innate Immune Responses Activated in *Arabidopsis* Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns ', *Plant Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 973–990, Apr. 2010, doi: 10.1105/tpc.109.069658.
- [122] B. W. Bardoel *et al.*, 'Pseudomonas Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants', *PLoS Pathog*, vol. 7, no. 8, p. e1002206, Aug. 2011, doi: 10.1371/journal.ppat.1002206.
- [123] M. Rodríguez, M. Torres, L. Blanco, V. Béjar, I. Sampedro, and I. Llamas, 'Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6', *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 4121, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-61084-1.
- [124] F. Kamilova, S. Validov, T. Azarova, I. Mulders, and B. Lugtenberg, 'Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria', *Environ Microbiol*, vol. 7, no. 11, pp. 1809–1817, 2005, doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x.
- [125] S. Validov *et al.*, 'Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici in stonewool substrate', *J Appl Microbiol*, vol. 102, no. 2, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03083.x.
- [126] S. Gu *et al.*, 'Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes', *Nat Microbiol*, 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0719-8.
- [127] B. C. Agaras, F. Noguera, G. González Anta, L. Wall, and C. Valverde, 'Biocontrol potential index of pseudomonads, instead of their direct-growth promotion traits, is a predictor of seed inoculation effect on crop productivity under field conditions', *Biological Control*, vol. 143, p. 104209, 2020, doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104209.
- [128] M. Höfte, 'The use of *Pseudomonas* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases', 2021, pp. 301–374. doi: 10.19103/as.2021.0093.11.
- [129] M. Díaz *et al.*, 'Agronomic efficiency and genome mining analysis of the wheat-biostimulant rhizospheric bacterium *Pseudomonas pergaminensis* sp. nov. strain 1008T', *Front Plant Sci*, vol. 13, p. 894985, 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.894985.
- [130] 'How to Feed the World in 2050', in *FAO Global Forum on Food Security and Nutrition*, Rome, Oct. 2009.

- [131] P. I. Devi, M. Manjula, and R. V. Bhavani, 'Agrochemicals, Environment, and Human Health', *Annu Rev Environ Resour*, vol. 47, no. 1, pp. 399–421, Oct. 2022, doi: 10.1146/annurev-environ-120920-111015.
- [132] F. P. Carvalho, 'Agriculture, pesticides, food security and food safety', *Environ Sci Policy*, vol. 9, no. 7–8, pp. 685–692, 2006, doi: 10.1016/j.envsci.2006.08.002.
- [133] S. Cesco *et al.*, 'The hidden effects of agrochemicals on plant metabolism and root-associated microorganisms', *Plant Science*, vol. 311, p. 111012, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.plantsci.2021.111012.
- [134] M. C. Zabalo, J. L. Garland, and M. A. Gomez, 'Assessment of the impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on indigenous herbicide-degrading bacteria and microbial community function in an agricultural soil', *Applied Soil Ecology*, vol. 46, no. 2, pp. 240–246, 2010, doi: 10.1016/j.apsoil.2010.08.006.
- [135] M. Lorch*, B. Agaras*, P. García-Parisi, M. Druille, M. Omacini, and C. Valverde, 'Repeated annual application of glyphosate reduces the abundance and alters the community structure of soil culturable pseudomonads in a temperate grassland', *Agric Ecosyst Environ*, vol. 319, p. 107503, 2021, doi: 10.1016/j.agee.2021.107503.
- [136] M. Druille, P. García-parisi, R. Golluscio, F. Cavagnaro, and M. Omacini, 'Repeated annual glyphosate applications may impair beneficial soil microorganisms in temperate grassland', *Agric Ecosyst Environ*, vol. 230, pp. 184–190, 2016, doi: 10.1016/j.agee.2016.06.011.
- [137] M. Shahid and M. S. Khan, 'Cellular destruction, phytohormones and growth modulating enzymes production by *Bacillus subtilis* strain BC8 impacted by fungicides', *Pestic Biochem Physiol*, vol. 149, pp. 8–19, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.pestbp.2018.05.001.
- [138] G. Philip Robertson and R. R. Harwood, 'Agriculture, Sustainable', in *Encyclopedia of Biodiversity*, Elsevier, 2013, pp. 111–118. doi: 10.1016/B978-0-12-384719-5.00287-2.
- [139] L. Philippot, J. M. Raaijmakers, P. Lemanceau, and W. H. van der Putten, 'Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere', *Nat Rev Microbiol*, vol. 11, no. 11, pp. 789–799, 2013, doi: 10.1038/nrmicro3109.
- [140] D. Roberts and A. Mattoo, 'Sustainable Agriculture—Enhancing Environmental Benefits, Food Nutritional Quality and Building Crop Resilience to Abiotic and Biotic Stresses', *Agriculture*, vol. 8, no. 1, p. 8, Jan. 2018, doi: 10.3390/agriculture8010008.
- [141] AAPRESID, *Sistemas de Siembra Directa. Manual de prácticas para una agricultura productiva y de regeneración*. 2024.
- [142] AAPRESID, 'Manual de Buenas Prácticas Agrícolas e indicadores de gestión', Buenos Aires, 2013.
- [143] J. Poveda and D. Eugui, 'Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture', *Biological Control*, vol. 176, p. 105100, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.biocontrol.2022.105100.
- [144] M. S. Santos, M. A. Nogueira, and M. Hungria, 'Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial

- bacteria in agriculture', *AMB Express*, vol. 9, no. 1, p. 205, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13568-019-0932-0.
- [145] B. Agaras *et al.*, 'Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates', *Biological Control*, vol. 90, no. January, pp. 173–186, 2015, doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.07.003.
- [146] R. J. Akinrinlola, G. Y. Yuen, R. A. Drijber, and A. O. Adesemoye, 'Evaluation of *Bacillus* Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by *In Vitro* Physiological Traits', *Int J Microbiol*, vol. 2018, pp. 1–11, Oct. 2018, doi: 10.1155/2018/5686874.
- [147] A. Ortiz and E. Sansinenea, 'The Role of Beneficial Microorganisms in Soil Quality and Plant Health', *Sustainability*, vol. 14, no. 9, p. 5358, Apr. 2022, doi: 10.3390/su14095358.
- [148] M. O'Callaghan, R. A. Ballard, and D. Wright, 'Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities', *Soil Use Manag*, vol. 38, no. 3, pp. 1340–1369, Jul. 2022, doi: 10.1111/sum.12811.
- [149] L. Busellini, J. Claros, and H. Costa Vila, 'Informes de Cadenas de Valor - Agroquímicos y Bioinsumos', Buenos Aires, Argentina, Nov. 2023. Accessed: Jul. 19, 2024. [Online]. Available: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/ficha_sectorial_agroquimicos_2023_-_web.pdf
- [150] M. J. dos S. Lopes, M. B. Dias-Filho, and E. S. C. Gurgel, 'Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors', *Front Sustain Food Syst*, vol. 5, Feb. 2021, doi: 10.3389/fsufs.2021.606454.
- [151] N. K. Arora, E. Khare, and D. K. Maheshwari, 'Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Constraints in Bioformulation, Commercialization, and Future Strategies', in *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, vol. 18, no. Microbiology Monographs, D. K. Maheshwari, Ed., Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, pp. 97–116. doi: 10.1007/978-3-642-13612-2_5.
- [152] Y. Bashan, L. E. de-Bashan, S. R. Prabhu, and J. P. Hernandez, 'Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013)', *Plant Soil*, vol. 378, no. 1–2, pp. 1–33, 2014, doi: 10.1007/s11104-013-1956-x.
- [153] C. B. Lobo, M. S. Juárez Tomás, E. Viruel, M. A. Ferrero, and M. E. Lucca, 'Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies', *Microbiol Res*, vol. 219, pp. 12–25, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.micres.2018.10.012.
- [154] Ma. del C. Orozco-Mosqueda *et al.*, 'Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement', *Agronomy*, vol. 11, no. 6, p. 1167, Jun. 2021, doi: 10.3390/agronomy11061167.
- [155] T. Chaudhary *et al.*, 'Techniques for improving formulations of bioinoculants', *3 Biotech*, vol. 10, no. 5, p. 199, May 2020, doi: 10.1007/s13205-020-02182-9.

- [156] A. L. M. Oliveira *et al.*, 'Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input', *Front Microbiol*, vol. 8, Sep. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01873.
- [157] M. Schoebitz, C. Mengual, and A. Roldán, 'Combined effects of clay immobilized *Azospirillum brasilense* and *Pantoea dispersa* and organic olive residue on plant performance and soil properties in the revegetation of a semiarid area', *Science of The Total Environment*, vol. 466–467, pp. 67–73, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.012.
- [158] J. Cabrefiga, J. Francés, E. Montesinos, and A. Bonaterra, 'Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e for fire blight disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying lyoprotectant', *J Appl Microbiol*, vol. 117, no. 4, pp. 1122–1131, Oct. 2014, doi: 10.1111/jam.12582.
- [159] K. Khavazi, F. Rejali, P. Seguin, and M. Miransari, 'Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants', *Enzyme Microb Technol*, vol. 41, no. 6–7, pp. 780–784, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.06.011.
- [160] F. J. Temprano *et al.*, 'Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds', *International Microbiology*, vol. 5, no. 2, pp. 81–86, 2002, doi: 10.1007/s10123-002-0067-y.
- [161] A. S. Liffourrena and G. I. Lucchesi, 'Alginate-perlite encapsulated *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells: Preparation, characterization and potential use as plant inoculants', *J Biotechnol*, vol. 278, pp. 28–33, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.04.019.
- [162] J. J. Perez, N. J. Francois, G. A. Maroniche, M. P. Borrajo, M. A. Pereyra, and C. M. Creus, 'A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria', *Carbohydr Polym*, vol. 202, pp. 409–417, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.084.
- [163] R. Deaker, R. Roughley, and I. Kennedy, 'Legume seed inoculation technology - a review', *Soil Biol Biochem*, vol. 36, no. 8, pp. 1275–1288, 2004, doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.009.
- [164] S.-K. Lee *et al.*, 'Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 18, pp. 7977–7987, Sep. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7582-9.
- [165] T. Berninger, Ó. González López, A. Bejarano, C. Preininger, and A. Sessitsch, 'Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants', *Microb Biotechnol*, vol. 11, no. 2, pp. 277–301, Mar. 2018, doi: 10.1111/1751-7915.12880.
- [166] M. Fernández, L. A. Pagnussat, M. P. Borrajo, J. J. Perez Bravo, N. J. Francois, and C. M. Creus, 'Chitosan/starch beads as bioinoculants carrier: long-term survival of bacteria

- and plant growth promotion', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 106, no. 23, pp. 7963–7972, Dec. 2022, doi: 10.1007/s00253-022-12220-6.
- [167] A. H. García, 'Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications', *J Biosci*, vol. 36, no. 5, pp. 939–950, Dec. 2011, doi: 10.1007/s12038-011-9107-0.
- [168] K.-Y. Seong, O.-R. Ryu, and W.-Y. Choi, 'Effect of trehalose on the viability of fluorescent *Pseudomonas*, strain SSL3', *Korean Journal of Soil Science & Fertility*, vol. 33, no. 4, pp. 292–301, 2000.
- [169] G. Iturriaga, R. Suárez, and B. Nova-Franco, 'Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling', *Int J Mol Sci*, vol. 10, no. 9, pp. 3793–3810, Sep. 2009, doi: 10.3390/ijms10093793.
- [170] J. G. Streeter, 'Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation', *J Appl Microbiol*, vol. 95, no. 3, pp. 484–491, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02017.x.
- [171] M. Schoebitz, H. Simonin, and D. Poncelet, 'Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads', *J Microencapsul*, vol. 29, no. 6, pp. 532–538, Sep. 2012, doi: 10.3109/02652048.2012.665090.
- [172] M. Reina-Bueno *et al.*, 'Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*', *BMC Microbiol*, vol. 12, no. 1, p. 207, 2012, doi: 10.1186/1471-2180-12-207.
- [173] H. C. Park *et al.*, 'Toluene-induced accumulation of trehalose by *Pseudomonas* sp. BCNU 106 through the expression of *otsA* and *otsB* homologues', *Lett Appl Microbiol*, vol. 44, no. 1, pp. 50–55, Jan. 2007, doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02036.x.
- [174] R. Hengge-Aronis, W. Klein, R. Lange, M. Rimmele, and W. Boos, 'Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, vol. 173, pp. 7918–7924., 1991.
- [175] M. Manzanera, A. García de Castro, A. Tøndervik, M. Rayner-Brandes, A. R. Strøm, and A. Tunnacliffe, 'Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440', *Appl Environ Microbiol*, vol. 68, no. 9, pp. 4328–4333, 2002, doi: 10.1128/AEM.68.9.4328-4333.2002.
- [176] P. Singleton, H. Keyser, and E. Sande, 'Development and Evaluation of Liquid Inoculants', in *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*, D. Herridge, Ed., ACIAR, 2002, pp. 52–66.
- [177] J. C. Martínez-Álvarez, C. Castro-Martínez, P. Sánchez-Peña, R. Gutiérrez-Dorado, and I. E. Maldonado-Mendoza, 'Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants', *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 32, no. 5, p. 75, May 2016, doi: 10.1007/s11274-015-2000-5.
- [178] D. Stephan, A.-P. M. Da Silva, and I. L. Bisutti, 'Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and

- efficacy', *Biological Control*, vol. 94, pp. 74–81, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.12.004.
- [179] M. Elegba and R. Rennie, 'Effect of different inoculant adhesive agents on rhizobial survival, nodulation, and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill)', *Can J Soil Sci*, vol. 64, no. 4, pp. 631–636, 1984, doi: 10.4141/cjss84-063.
- [180] D. J. Hume and D. H. Blair, 'Effect of numbers of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario', *Can J Microbiol*, vol. 38, no. 6, pp. 588–593, 1992, doi: 10.1139/m92-097.
- [181] R. J. Roughley, L. G. Gemell, J. A. Thompson, and J. Brockwell, 'The number of *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of lupin', *Soil Biol Biochem*, vol. 25, no. 10, pp. 1453–1458, 1993, doi: 10.1016/0038-0717(93)90061-F.
- [182] G. Catroux, A. Hartmann, and C. Revellin, 'Trends in rhizobial inoculant production and use', *Plant Soil*, vol. 230, no. 1, pp. 21–30, 2001, doi: 10.1023/A:1004777115628.
- [183] E. J. Hartley, L. G. Gemell, and R. Deaker, 'Some factors that contribute to poor survival of rhizobia on preinoculated legume seed', *Crop Pasture Sci*, vol. 63, no. 9, p. 858, 2012, doi: 10.1071/CP12132.
- [184] G. Frontera, 'Estrategias de inoculación en soja', 2010, *Tucumán*. [Online]. Available: <http://www.produccion.com.ar/187/index.php?edicion=187&pageNumber=60#>
- [185] L. G. Gemell, E. J. Hartley, and D. F. Herridge, 'Point-of-sale evaluation of preinoculated and custom-inoculated pasture legume seed', *Aust J Exp Agric*, vol. 45, no. 3, p. 161, 2005, doi: 10.1071/EA03151.
- [186] M. O'Callaghan, J. Swaminathan, J. Lottmann, D. A. Wright, and T. A. Jackson, 'Seed coating with biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113', *New Zealand Plant Protection*, vol. 59, pp. 80–85, Aug. 2006, doi: 10.30843/nzpp.2006.59.4420.
- [187] E. O. Ugoji, M. D. Laing, and C. H. Hunter, 'An investigation of the shelf-life (storage) of *Bacillus* isolates on seeds', *South African Journal of Botany*, vol. 72, no. 1, pp. 28–33, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.sajb.2005.04.001.
- [188] Z. Qiu, E. Egidi, H. Liu, S. Kaur, and B. K. Singh, 'New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering', *Biotechnol Adv*, vol. 37, no. 6, p. 107371, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.03.010.
- [189] O. Martínez-Viveros, M. A. Jorquera, D. E. Crowley, G. Gajardo, and M. L. Mora, 'Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria', *J Soil Sci Plant Nutr*, vol. 10, no. 3, pp. 293–319, 2010, doi: 10.4067/S0718-95162010000100006.
- [190] O. Erenstein, M. Jaleta, K. A. Mottaleb, K. Sonder, J. Donovan, and H.-J. Braun, 'Global Trends in Wheat Production, Consumption and Trade', in *Wheat Improvement*, Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 47–66. doi: 10.1007/978-3-030-90673-3_4.
- [191] FAO Stat, 'FAO Statics'. Accessed: Jul. 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/faostat/en/>

- [192] USDA Foreign Agricultural Service, 'FAS Open Data Services'. Accessed: Jul. 21, 2024. [Online]. Available: <https://fas.usda.gov/data/production>
- [193] S. Maqbool, M. A. Hassan, X. Xia, L. M. York, A. Rasheed, and Z. He, 'Root system architecture in cereals: progress, challenges and perspective', *The Plant Journal*, vol. 110, no. 1, pp. 23–42, Apr. 2022, doi: 10.1111/tpj.15669.
- [194] M. R. Simón and S. I. Golik, Eds., *Cereales de Invierno*. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP, 2023.
- [195] Ministerio de Agricultura. Presidencia de la Nación., 'Estimaciones Agrícolas'. Accessed: Jul. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/tableros/tablero-cultivos.php>
- [196] L. Storti, 'Informes de cadenas de valor. Trigo', 2018. Accessed: Jul. 21, 2024. [Online]. Available: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_trigo.pdf
- [197] O. Erenstein, M. Jaleta, K. Sonder, K. Mottaleb, and B. M. Prasanna, 'Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications', *Food Secur*, vol. 14, no. 5, pp. 1295–1319, Oct. 2022, doi: 10.1007/s12571-022-01288-7.
- [198] J. M. Awika, 'Major Cereal Grains Production and Use around the World', 2011, pp. 1–13. doi: 10.1021/bk-2011-1089.ch001.
- [199] M. C. Paollili, S. M. Cabrini, F. A. Fillat, and L. O. Pagliaricci, 'Evolución de la cadena de maíz en Argentina', 2021.
- [200] Y. Chen *et al.*, 'Root physiology and morphology of soybean in relation to stress tolerance', 2022, pp. 77–103. doi: 10.1016/bs.abr.2022.02.005.
- [201] M. Paollili, S. Cabrini, and F. Fillat, 'Evolución de la cadena de soja en Argentina. Periodo 2000-2021', 2022.
- [202] L. Storti, 'Informes de cadenas de valor. Soja', 2019.
- [203] L. G. Wall, 'The BIOSPAS consortium: Soil Biology and Agricultural Production', in *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, 1st ed., F. de Bruijn, Ed., John Wiley & Sons, Inc., 2011, pp. 299–306.
- [204] W. D. Gould, C. Hagedorn, T. R. Bardinelli, and R. M. Zablotowicz, 'New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats', *Appl Environ Microbiol*, vol. 49, no. 1, pp. 28–32, 1985.
- [205] S. Tarnawski, J. Hamelin, L. Locatelli, M. Aragno, and N. Fromin, 'Examination of Gould's modified S1 (mS1) selective medium and Angle's non-selective medium for describing the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil and root environments.', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 45, no. 2, pp. 97–104, 2003, doi: 10.1016/S0168-6496(03)00130-2.
- [206] N. Aagot, O. Nybroe, P. Nielsen, and K. Johnsen, 'An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media.', *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 11, pp. 5233–5239, 2001, doi: 10.1128/AEM.67.11.5233-5239.2001.

- [207] E. Gamalero, E. Bona, and B. R. Glick, 'Current Techniques to Study Beneficial Plant-Microbe Interactions', *Microorganisms*, vol. 10, no. 7, p. 1380, Jul. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10071380.
- [208] M. N. P. Remus-Emsermann and R. O. Schlechter, 'Phyllosphere microbiology: at the interface between microbial individuals and the plant host', *New Phytologist*, vol. 218, no. 4, pp. 1327–1333, Jun. 2018, doi: 10.1111/nph.15054.
- [209] W. R. Whitaker, E. S. Shepherd, and J. L. Sonnenburg, 'Tunable Expression Tools Enable Single-Cell Strain Distinction in the Gut Microbiome', *Cell*, vol. 169, no. 3, pp. 538–546.e12, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.041.
- [210] R. O. Schlechter *et al.*, 'Chromatic Bacteria – A Broad Host-Range Plasmid and Chromosomal Insertion Toolbox for Fluorescent Protein Expression in Bacteria', *Front Microbiol*, vol. 9, Dec. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.03052.
- [211] R. Ledermann, I. Bartsch, M. N. Remus-Emsermann, J. A. Vorholt, and H.-M. Fischer, 'Stable Fluorescent and Enzymatic Tagging of *Bradyrhizobium diazoefficiens* to Analyze Host-Plant Infection and Colonization', *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], vol. 28, no. 9, pp. 959–967, Sep. 2015, doi: 10.1094/MPMI-03-15-0054-TA.
- [212] S. Wang *et al.*, 'Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 24, no. 10, pp. 1095–1099, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.cmi.2018.03.026.
- [213] J. E. Peters, 'Tn7', in *Mobile DNA III*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2015, pp. 647–667. doi: 10.1128/9781555819217.ch30.
- [214] W. S. Reznikoff, 'Transposon Tn 5', *Annu Rev Genet*, vol. 42, no. 1, pp. 269–286, Dec. 2008, doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091656.
- [215] L. Lambertsen, C. Sternberg, and S. Molin, 'Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins', *Environ Microbiol*, vol. 6, no. 7, pp. 726–732, 2004, doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00605.x.
- [216] L. Rochat, M. Péchy-tarr, E. Baehler, M. Maurhofer, and C. Keel, 'Combination of Fluorescent Reporters for Simultaneous Monitoring of Root Colonization and Antifungal Gene Expression by a Biocontrol Pseudomonad on Cereals with Flow Cytometry', *MPMI*, vol. 23, no. 7, pp. 949–961, 2010.
- [217] K.-H. H. Choi and H. P. Schweizer, 'mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*.', *Nat Protoc*, vol. 1, no. 1, pp. 153–161, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.24.
- [218] C. Lichtenstein and S. Brenner, 'Unique insertion site of Tn7 in the *E. coli* chromosome', *Nature*, vol. 297, no. 5867, pp. 601–603, Jun. 1982, doi: 10.1038/297601a0.
- [219] R. L. McKown, K. A. Orle, T. Chen, and N. L. Craig, 'Sequence requirements of *Escherichia coli* attTn7, a specific site of transposon Tn7 insertion', *J Bacteriol*, vol. 170, no. 1, pp. 352–358, Jan. 1988, doi: 10.1128/jb.170.1.352-358.1988.
- [220] B. Koch, L. E. Jensen, and O. Nybroe, 'A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral

- chromosomal site', *J Microbiol Methods*, vol. 45, no. 3, pp. 187–195, 2001, doi: 10.1016/S0167-7012(01)00246-9.
- [221] K.-H. Choi *et al.*, 'A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system', *Nat Methods*, vol. 2, no. 6, pp. 443–448, Jun. 2005, doi: 10.1038/nmeth765.
- [222] B. Agaras and C. Valverde, 'A mutation in the *gltA* gene from a native isolate of the *Pseudomonas chlororaphis* subgroup induces a phenotypic change associated with phenazine production', *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 52, no. 7–8, pp. 601–624, 2019, doi: 10.1080/03235408.2018.1549649.
- [223] M. Garavaglia, A. Muzlera, and C. Valverde, 'Comparative genomics and informational content analysis uncovered internal regions of the core genes *rpoD*, *pepN* and *gltX* for an MLSA with genome-level resolving power within the genus *Pseudomonas*', *Mol Phylogenet Evol*, vol. 179, p. 107663, 2023, doi: 10.1016/j.ympev.2022.107663.
- [224] B. C. Agaras, A. Iriarte, and C. F. Valverde, 'Genomic insights into the broad antifungal activity, plant-probiotic properties, and their regulation, in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6', *PLoS One*, vol. 13, no. 3, pp. e0194088–e0194088, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0194088.
- [225] R. Simon, U. Priefer, and A. Pühler, 'A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria', *Bio/Technology*, vol. 1, no. 9, pp. 784–791, 1983, doi: 10.1038/nbt1183-784.
- [226] H. W. Boyer and D. Roulland-Dussoix, 'A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*', *J Mol Biol*, vol. 41, no. 3, pp. 459–472, 1969, doi: 10.1016/0022-2836(69)90288-5.
- [227] D. M. Woodcock *et al.*, 'Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants', *Nucleic Acids Res*, vol. 17, no. 9, pp. 3469–3478, 1989, doi: 10.1093/nar/17.9.3469.
- [228] A. Valcek, S. Overballe-Petersen, F. Hansen, M. Dolejska, and H. Hasman, 'Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* MT102, a Plasmid-Free Recipient Resistant to Rifampin, Azide, and Streptomycin, Used in Conjugation Experiments', *Microbiol Resour Announc*, vol. 8, no. 20, 2019, doi: 10.1128/MRA.00383-19.
- [229] Y. Bao, D. P. Lies, H. Fu, and G. P. Roberts, 'An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria', *Gene*, vol. 109, no. 1, pp. 167–168, 1991, doi: 10.1016/0378-1119(91)90604-A.
- [230] C. Voisard, M. Rella, and D. Haas, 'Conjugative transfer of plasmid RP1 to soil isolates of *Pseudomonas fluorescens* is facilitated by certain large RP1 deletions', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 55, no. 1, pp. 9–13, 1988, doi: 10.1111/j.1574-6968.1988.tb02790.x.
- [231] B. Agaras, P. Sobrero, and C. Valverde, 'A CsrA/RsmA translational regulator gene encoded in the replication region of a *Sinorhizobium meliloti* cryptic plasmid complements *Pseudomonas fluorescens* *rsmA/E* mutants.', *Microbiology (N Y)*, vol. 159, no. Pt 2, pp. 230–242, 2013, doi: 10.1099/mic.0.061614-0.
- [232] M. R. ; Green and J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual 4th ed.* 2012.

- [233] E. Martínez-García, T. Aparicio, V. de Lorenzo, and P. I. Nikel, 'New transposon tools tailored for metabolic engineering of gram-negative microbial cell factories.', *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 2, no. October, p. 46, 2014, doi: 10.3389/fbioe.2014.00046.
- [234] A. Jousset, E. Lara, L. G. Wall, and C. Valverde, 'Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing', *Appl Environ Microbiol*, vol. 72, no. 11, pp. 7083–7090, 2006, doi: 10.1128/AEM.00557-06.
- [235] N. L. Craig, 'Transposon Tn7', in *Mobile DNA*, D. E. Berg and M. M. Howe, Eds., Washington DC: American Society for Microbiology, 1989, ch. 7, pp. 211–225.
- [236] C. Reimmann, C. Valverde, E. Kay, and D. Haas, 'Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0', *J Bacteriol*, vol. 187, no. 1, pp. 276–285, 2005, doi: 10.1128/JB.187.1.276.
- [237] S. V Egan, H. H. Yeoh, and J. H. Bradbury, 'Simple picrate paper kit for determination of the cyanogenic potential of cassava flour', *J Sci Food Agric*, vol. 76, no. 1, pp. 39–48, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199801)76:1<39::AID-JSFA947>3.0.CO;2-M.
- [238] C. S. Nautiyal, 'An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 170, no. 1, pp. 265–270, 1999, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9919677>
- [239] J. Kuklinsky-Sobral, W. L. Araújo, R. Mendes, I. O. Geraldi, A. A. Pizzirani-Kleiner, and J. L. Azevedo, 'Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion.', *Environ Microbiol*, vol. 6, no. 12, pp. 1244–1251, 2004, doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x.
- [240] S. B. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe, 'Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying', *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, no. 10, pp. 3592–3597, 1995.
- [241] R. An and L. A. Moe, 'Regulation of Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Glucose Dehydrogenase Activity in the Model Rhizosphere-Dwelling Bacterium *Pseudomonas putida* KT2440', *Appl Environ Microbiol*, vol. 82, no. 16, pp. 4955–4964, Aug. 2016, doi: 10.1128/AEM.00813-16.
- [242] B. C. Loudon, D. Haarmann, and A. M. Lynne, 'Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection.', *J Microbiol Biol Educ*, vol. 12, no. 1, pp. 51–53, 2011, doi: 10.1128/jmbe.v12i1.249.
- [243] E. Kay, C. Dubuis, and D. Haas, 'Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0', *PNAS*, vol. 102, no. 47, pp. 17136–17141, 2005.
- [244] S. Heeb and D. Haas, 'Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria.', *MPMI*, vol. 14, no. 12, pp. 1351–1363, 2001, doi: 10.1094/MPMI.2001.14.12.1351.
- [245] M. Fernández, S. Conde, J. de la Torre, C. Molina-Santiago, J.-L. Ramos, and E. Duque, 'Mechanisms of Resistance to Chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440',

- Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56, no. 2, pp. 1001–1009, 2012, doi: 10.1128/AAC.05398-11.
- [246] M. P. Silverio, G. B. Kraychete, A. S. Rosado, and R. R. Bonelli, 'Pseudomonas fluorescens Complex and Its Intrinsic, Adaptive, and Acquired Antimicrobial Resistance Mechanisms in Pristine and Human-Impacted Sites', *Antibiotics*, vol. 11, no. 8, p. 985, Jul. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11080985.
- [247] H. Shen, S. E. Gold, S. J. Tamaki, and N. T. Keen, 'Construction of a Tn7-lux system for gene expression studies in Gram-negative bacteria', *Gene*, vol. 122, no. 1, pp. 27–34, Dec. 1992, doi: 10.1016/0378-1119(92)90028-N.
- [248] H. E. Knights, B. Jorin, T. L. Haskett, and P. S. Poole, 'Deciphering bacterial mechanisms of root colonization', *Environ Microbiol Rep*, vol. 13, no. 4, pp. 428–444, 2021, doi: 10.1111/1758-2229.12934.
- [249] V. I. Enne, A. A. Delsol, G. R. Davis, S. L. Hayward, J. M. Roe, and P. M. Bennett, 'Assessment of the fitness impacts on Escherichia coli of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 56, no. 3, pp. 544–551, Sep. 2005, doi: 10.1093/jac/dki255.
- [250] F. Farina, 'Caracterización de bacterias del género Pseudomonas antagonistas de hongos fitopatógenos', 2014.
- [251] M. O'Callaghan, 'Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 13, pp. 5729–5746, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7590-9.
- [252] G. Idígoras, 'Mejoramiento de cultivos y producción de semillas', Buenos Aires, 2013. Accessed: Aug. 06, 2024. [Online]. Available: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/mejoramiento_cultivos_y_produccion_semillas-doc.pdf
- [253] B. Kumar and H. Dube, 'Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control', *Soil Biol Biochem*, vol. 24, no. 6, pp. 539–542, 1992, doi: 10.1016/0038-0717(92)90078-C.
- [254] J. R. Lamichhane, D. C. Corrales, and E. Soltani, 'Biological seed treatments promote crop establishment and yield: a global meta-analysis', *Agron Sustain Dev*, vol. 42, no. 3, p. 45, 2022, doi: 10.1007/s13593-022-00761-z.
- [255] M. Hungria, R. J. Campo, E. M. Souza, and F. O. Pedrosa, 'Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil', *Plant Soil*, vol. 331, no. 1–2, pp. 413–425, Jun. 2010, doi: 10.1007/s11104-009-0262-0.
- [256] A. J. Bennett and J. M. Whipps, 'Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming', *Biological Control*, vol. 44, no. 3, pp. 349–361, 2008, doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.11.005.

- [257] A. Mahmood, O. Turgay, M. Farooq, and R. Hayat, 'Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 98, no. 8, pp. 1–39, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiw112>.
- [258] A. Sher, T. Sarwar, A. Nawaz, M. Ijaz, A. Sattar, and S. Ahmad, 'Methods of Seed Priming', in *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*, Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 1–10. doi: 10.1007/978-981-13-8625-1_1.
- [259] A. Paravar, R. Piri, H. Balouchi, and Y. Ma, 'Microbial seed coating: An attractive tool for sustainable agriculture', *Biotechnology Reports*, vol. 37, pp. e00781–e00781, 2023, doi: 10.1016/j.btre.2023.e00781.
- [260] I. Rocha, Y. Ma, P. Souza-Alonso, M. Vosátka, H. Freitas, and R. S. Oliveira, 'Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops', *Front Plant Sci*, vol. 10, Nov. 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.01357.
- [261] R. Silva Araujo *et al.*, 'Preinoculation of Soybean Seeds Treated with Agrichemicals up to 30 Days before Sowing: Technological Innovation for Large-Scale Agriculture', *Int J Microbiol*, vol. 2017, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1155/2017/5914786.
- [262] Rizobacter Argentina S.A, 'Premax Safety Data sheet', 2017.
- [263] H. Naghili, H. Tajik, K. Mardani, S. M. Razavi Rouhani, A. Ehsani, and P. Zare, 'Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests.', *Vet Res Forum*, vol. 4, no. 3, pp. 179–83, 2013, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653794%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4312378>
- [264] R. Manikandan, D. Saravanakumar, L. Rajendran, T. Raguchander, and R. Samiyappan, 'Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against Fusarium wilt of tomato', *Biological Control*, vol. 54, no. 2, pp. 83–89, 2010, doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.04.004.
- [265] T. Taurian *et al.*, 'Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities', *Plant Soil*, vol. 329, no. 1–2, pp. 421–431, 2010, doi: 10.1007/s11104-009-0168-x.
- [266] C. S. Prazeres and C. M. M. Coelho, 'Hydration curve and physiological quality of maize seeds subjected to water deficit', *Semin Cienc Agrar*, vol. 38, no. 3, p. 1179, Jun. 2017, doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n3p1179.
- [267] B. Jiang, L. Wang, C. Xu, and M. Yan, 'Hydropriming enhances the germination of aged ultra-dry wheat seeds', *Seed Science and Technology*, vol. 48, no. 1, pp. 57–63, Apr. 2020, doi: 10.15258/sst.2020.48.1.08.
- [268] L.-Y. Dai, H.-D. Zhu, K.-D. Yin, J.-D. Du, and Y.-X. Zhang, 'Seed priming mitigates the effects of saline-alkali stress in soybean seedlings', *Chil J Agric Res*, vol. 77, no. 2, pp. 118–125, Jun. 2017, doi: 10.4067/S0718-58392017000200118.
- [269] M. F. Khalid *et al.*, 'Hydropriming for Plant Growth and Stress Tolerance', in *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*, Singapore: Springer Singapore, 2019, pp. 373–384. doi: 10.1007/978-981-13-8625-1_18.

- [270] V. Tkalec, A. Mahnic, P. Gselman, and M. Rupnik, 'Analysis of seed-associated bacteria and fungi on staple crops using the cultivation and metagenomic approaches', *Folia Microbiol (Praha)*, vol. 67, no. 3, pp. 351–361, Jun. 2022, doi: 10.1007/s12223-022-00958-5.
- [271] R. Fukui, 'Spatial Colonization Patterns and Interaction of Bacteria on Inoculated Sugar Beet Seed', *Phytopathology*, vol. 84, no. 11, p. 1338, 1994, doi: 10.1094/Phyto-84-1338.
- [272] R. Tombolini, D. J. van der Gaag, B. Gerhardson, and J. K. Jansson, 'Colonization Pattern of the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein', *Appl Environ Microbiol*, vol. 65, no. 8, pp. 3674–3680, Aug. 1999, doi: 10.1128/AEM.65.8.3674-3680.1999.
- [273] A. W. Schreiber *et al.*, 'Comparative transcriptomics in the Triticeae', *BMC Genomics*, vol. 10, no. 1, p. 285, 2009, doi: 10.1186/1471-2164-10-285.
- [274] M. Martínez-Gil, F. Yousef-Coronado, and M. Espinosa-Urgel, 'LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture', *Mol Microbiol*, vol. 77, no. 3, pp. 549–561, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07249.x.
- [275] M. DeFlaun, B. Marshall, E. Kulle, and S. Levy, 'Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds', *Appl Environ Microbiol*, vol. 60, no. 7, pp. 2637–2642, 1994.
- [276] G. M. Fipke *et al.*, 'Osmoprotectant in soybean seeds can increase the inoculation and co-inoculation time in pre-sowing', *Aust J Crop Sci*, no. 14(6):2020, pp. 905–912, 2020, doi: 10.21475/ajcs.20.14.06.p1696.
- [277] P. Tittabutr, W. Payakapong, N. Teaumroong, P. W. Singleton, and N. Boonkerd, 'Growth, Survival and Field Performance of Bradyrhizobial Liquid Inoculant Formulations with Polymeric Additives', *ScienceAsia*, vol. 33, no. 1, pp. 69–77, 2007, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.069.
- [278] L. Á. Molina *et al.*, 'Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions', *Soil Biol Biochem*, vol. 32, no. 3, pp. 315–321, 2000, doi: 10.1016/S0038-0717(99)00156-X.
- [279] S. Goljanian-Tabrizi, S. Amiri, D. Nikaein, and Z. Motesharrei, 'The comparison of five low cost liquid formulations to preserve two phosphate solubilizing bacteria from the genera *Pseudomonas* and *Pantoea*.', *Iran J Microbiol*, vol. 8, no. 6, pp. 377–382, Dec. 2016.
- [280] N. Vassilev *et al.*, 'Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms', *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 44, no. 4–5, pp. 735–743, May 2017, doi: 10.1007/s10295-016-1810-2.
- [281] J. Vílchez, C. García-Fontana, D. Román-Naranjo, J. González-López, and M. Manzanera, 'Plant Drought Tolerance Enhancement by Trehalose Production of Desiccation-Tolerant Microorganisms', *Front Microbiol*, vol. 7, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01577.

- [282] A. García de Castro, H. Bredholt, A. R. Strøm, and A. Tunnacliffe, 'Anhydrobiotic engineering of Gram-negative bacteria', *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, no. 9, pp. 4142–4144, 2000, doi: 10.1128/AEM.66.9.4142-4144.2000.
- [283] L. A. Pazos-Rojas *et al.*, 'Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy', *PLoS One*, vol. 14, no. 7, pp. e0219554–e0219554, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0219554.
- [284] G. Kumaresan and D. Reetha, 'Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives', *Journal of Phytology*, vol. 3, no. 10, pp. 48–51, 2011.
- [285] B. R. Lim, H. J. Choi, G.-S. Kwon, and W. H. Joo, 'Enhancement of solvent tolerance in *Pseudomonas* sp. BCNU 106 with trehalose', *Lett Appl Microbiol*, vol. 61, no. 6, pp. 607–612, 2015, doi: 10.1111/lam.12504.
- [286] A. Kuppardt, A. Chatzinotas, U. Breuer, J. R. van der Meer, and H. Harms, 'Optimization of preservation conditions of As (III) bioreporter bacteria', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 82, no. 4, pp. 785–792, 2009, doi: 10.1007/s00253-009-1888-9.
- [287] J. Lalucat, M. Gomila, M. Mulet, A. Zaruma, and E. García-Valdés, 'Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov', *Syst Appl Microbiol*, vol. 45, no. 1, p. 126289, 2022, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126289.
- [288] M. Hungria, M. F. Loureiro, I. C. Mendes, R. J. Campo, and P. H. Graham, 'Inoculant Preparation, Production and Application', in *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2005, pp. 223–253. doi: 10.1007/1-4020-3544-6_11.
- [289] N. Z. Lupwayi, G. W. Clayton, and W. A. Rice, 'Rhizobial Inoculants for Legume Crops', *J Crop Improv*, vol. 15, no. 2, pp. 289–321, Jun. 2006, doi: 10.1300/J411v15n02_09.
- [290] F. Anghinoni *et al.*, 'Pre-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. in Industrially Treated Soybean Seeds', *Agricultural Sciences*, vol. 08, no. 07, pp. 582–590, 2017, doi: 10.4236/as.2017.87044.
- [291] M. Hungria, M. A. Nogueira, L. J. M. Campos, P. Menna, F. Brandi, and Y. G. Ramos, 'Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems', *Agron J*, vol. 112, no. 6, pp. 5222–5236, Nov. 2020, doi: 10.1002/agj2.20392.
- [292] G. Machineski, A. S. Scaramal, M. Aparecida de Matos, O. Machineski, and A. Colozzi Filho, 'Efficiency of pre-inoculation of soybeans with *Bradyrhizobium* up to 60 days before sowing', *Afr J Agric Res*, vol. 13, no. 24, pp. 1233–1242, Jun. 2018, doi: 10.5897/AJAR2018.13108.
- [293] D. Molina-Romero *et al.*, 'Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth', *PLoS One*, vol. 12, no. 11, p. e0187913, Nov. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0187913.
- [294] A. Ramette *et al.*, '*Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and

- pyoluteorin', *Syst Appl Microbiol*, vol. 34, no. 3, pp. 180–188, 2011, doi: 10.1016/j.syapm.2010.10.005.
- [295] J. Troxler *et al.*, 'Persistence of a biocontrol *Pseudomonas* inoculant as high populations of culturable and non-culturable cells in 200-cm-deep soil profiles', *Soil Biol Biochem*, vol. 44, pp. 122–129, 2012, doi: 10.1016/j.soilbio.2011.09.020.
- [296] I. Arana, A. Muela, M. Orruño, C. Seco, I. Garaizabal, and I. Barcina, 'Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHAO: comparison with *Escherichia coli*', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 74, no. 3, pp. 500–509, 2010, doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00979.x.
- [297] L. A. Pazos-Rojas *et al.*, 'The Viable but Non-Culturable (VBNC) State, a Poorly Explored Aspect of Beneficial Bacteria', *Microorganisms*, vol. 12, no. 1, p. 39, Dec. 2023, doi: 10.3390/microorganisms12010039.
- [298] S. Zheng *et al.*, 'Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion', *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 9, Feb. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.643722.
- [299] A. Clasen and A. B. Kesel, 'Microstructural Surface Properties of Drifting Seeds—A Model for Non-Toxic Antifouling Solutions', *Biomimetics*, vol. 4, no. 2, p. 37, May 2019, doi: 10.3390/biomimetics4020037.
- [300] M. Mu *et al.*, 'Influence of Surface Roughness, Nanostructure, and Wetting on Bacterial Adhesion', *Langmuir*, vol. 39, no. 15, pp. 5426–5439, Apr. 2023, doi: 10.1021/acs.langmuir.3c00091.
- [301] D. Montag, M. Frant, H. Horn, and K. Liefeth, 'Dependence of the initial adhesion of biofilm forming *Pseudomonas putida* mt2 on physico-chemical material properties', *Biofouling*, vol. 28, no. 3, pp. 315–327, Mar. 2012, doi: 10.1080/08927014.2012.673219.
- [302] S. D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, and T. J. Webster, 'The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment', *Biomaterials*, vol. 31, no. 4, pp. 706–713, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.081.
- [303] G. Wei and J. Q. Yang, 'Impacts of hydrodynamic conditions and microscale surface roughness on the critical shear stress to develop and thickness of early-stage *Pseudomonas putida* biofilms', *Biotechnol Bioeng*, vol. 120, no. 7, pp. 1797–1808, Jul. 2023, doi: 10.1002/bit.28409.
- [304] M. van de Mortel, W.-S. Chang, and L. J. Halverson, 'Differential tolerance of *Pseudomonas putida* biofilm and planktonic cells to desiccation', *Biofilms*, vol. 1, no. 4, pp. 361–368, Oct. 2004, doi: 10.1017/S1479050504001528.
- [305] W.-S. Chang, M. van de Mortel, L. Nielsen, G. Nino de Guzman, X. Li, and L. J. Halverson, 'Alginate Production by *Pseudomonas putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions', *J Bacteriol*, vol. 189, no. 22, pp. 8290–8299, Nov. 2007, doi: 10.1128/JB.00727-07.
- [306] A. Stephens, 'The Characterisation of Corn and Soya Seed Epicuticular Wax Surfaces', University of Bristol, 2023.

- [307] Y. Bashan and L. De-Bashan, 'Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*', *Appl Environ Microbiol*, vol. 68, no. 6, pp. 2637–2643, 2002, doi: 10.1128/AEM.68.6.2637.
- [308] M. Boumahdi, P. Mary, and J.-P. Hornez, 'Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia', *J Appl Microbiol*, vol. 87, no. 4, pp. 611–619, Oct. 1999, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00860.x.
- [309] J. A. C. Vriezen, F. J. Bruijn, and K. Nusslein, 'Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability', *Lett Appl Microbiol*, vol. 42, no. 2, pp. 172–178, Feb. 2006, doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01808.x.
- [310] M. Fernández, 'Matrices poliméricas para la formulación de inoculantes microbianos de liberación controlada en el cultivo de maíz', Universidad Nacional de Mar del Plata, 2024.
- [311] D. N. Rodríguez-Navarro, M. S. Dardanelli, and J. E. Ruíz-Saínz, 'Attachment of bacteria to the roots of higher plants', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 272, no. 2, pp. 127–136, Jul. 2007, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x.
- [312] R. M. Wheatley and P. S. Poole, 'Mechanisms of bacterial attachment to roots', *FEMS Microbiol Rev*, Apr. 2018, doi: 10.1093/femsre/fuy014.
- [313] M. C. Alvarez Crespo and C. Valverde, 'A single mutation in the *oprF* mRNA leader confers strict translational control by the Gac/Rsm system in *Pseudomonas fluorescens* CHA0', *Curr Microbiol*, vol. 58, no. 2, pp. 182–188, 2009, doi: 10.1007/s00284-008-9306-6.
- [314] R. De Mot and J. Vanderleyden, 'Purification of a root-adhesive outer membrane protein of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 81, no. 3, pp. 323–327, Jul. 1991, doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04780.x.
- [315] A. Spiers, Y. Deeni, A. Folorunso, A. Koza, O. Moshynets, and K. Zawadzki, 'Cellulose Expression in *Pseudomonas fluorescens* SBW25 and Other Environmental *Pseudomonads*', in *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*, InTech, 2013. doi: 10.5772/53736.
- [316] M. A. Thompson, M. C. Onyeziri, and C. Fuqua, 'Function and Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* Cell Surface Structures that Promote Attachment', 2018, pp. 143–184. doi: 10.1007/82_2018_96.
- [317] S. M. Hinsa, M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos, and G. A. O'Toole, 'Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein', *Mol Microbiol*, vol. 49, no. 4, pp. 905–918, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x.
- [318] M. Cardinale, 'Scanning a microhabitat: plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy', *Front Microbiol*, vol. 5, Mar. 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00094.

- [319] P. S. Lübeck, M. Hansen, and J. Sørensen, 'Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and *in situ* hybridization techniques', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 33, no. 1, pp. 11–19, 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922498>
- [320] M. Hansen, 'Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 23, no. 4, pp. 353–360, Aug. 1997, doi: 10.1016/S0168-6496(97)00037-8.
- [321] B. Normander, N. B. Hendriksen, and O. Nybroe, 'Green Fluorescent Protein-Marked *Pseudomonas fluorescens* : Localization, Viability, and Activity in the Natural Barley Rhizosphere', *Appl Environ Microbiol*, vol. 65, no. 10, pp. 4646–4651, Oct. 1999, doi: 10.1128/AEM.65.10.4646-4651.1999.
- [322] E. Gamalero, G. Lingua, F. Giusy Capr , A. Fusconi, G. Berta, and P. Lemanceau, 'Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 48, no. 1, pp. 79–87, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.femsec.2003.12.012.
- [323] M.-F. Noirot-Gros *et al.*, 'Dynamics of Aspen Roots Colonization by Pseudomonads Reveals Strain-Specific and Mycorrhizal-Specific Patterns of Biofilm Formation', *Front Microbiol*, vol. 9, May 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00853.
- [324] J. Vincent, 'A manual for practical study of root-nodule bacteria', in *IBP Handbook*, Oxford: Backwell Scientific Publications, 1970, p. 164.
- [325] D. Crome and p. Jansma, 'Zeiss ZEN – performing a maximum intensity projection of a Z-stack', 2023. Accessed: Jul. 29, 2024. [Online]. Available: <https://microscopy.arizona.edu/learn/printable-materials>
- [326] *ZEISS ZEN 3.4 (blue edition) Software Manual*. Germany: ZEISS Group, 2021.
- [327] L. C. Dekkers, I. H. M. Mulders, C. C. Phoelich, T. F. C. Chin-A-Woeng, A. H. M. Wijfjes, and B. J. J. Lugtenberg, 'The sss colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. radicle-lycopersici biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 13, no. 11, pp. 1177–1183, 2000, doi: 10.1094/MPMI.2000.13.11.1177.
- [328] S. Compant, C. Clément, and A. Sessitsch, 'Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization', *Soil Biol Biochem*, vol. 42, no. 5, pp. 669–678, May 2010, doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024.
- [329] P. G. Dennis, A. J. Miller, I. M. Clark, R. G. Taylor, E. Valsami-Jones, and P. R. Hirsch, 'A novel method for sampling bacteria on plant root and soil surfaces at the microhabitat scale', *J Microbiol Methods*, vol. 75, no. 1, pp. 12–18, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.mimet.2008.04.013.

- [330] T. F. C. Chin-A-Woeng, W. de Priester, A. J. van der Bij, and B. J. J. Lugtenberg, 'Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365 , using scanning electron microscopy', *MPMI*, vol. 10, no. 1, pp. 79–86, 1997.
- [331] L. M. Dandurand, D. J. Schotzko, and G. R. Knudsen, 'Spatial Patterns of Rhizoplane Populations of *Pseudomonas fluorescens*', *Appl Environ Microbiol*, vol. 63, no. 8, pp. 3211–3217, Aug. 1997, doi: 10.1128/aem.63.8.3211-3217.1997.
- [332] M. Simons, A. van der Bij, I. Brand, L. de Weger, C. Wijffelman, and B. J. J. Lugtenberg, 'Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by Plant Growth-Promoting *Pseudomonas* bacteria', *MPMI*, vol. 9, no. 7, pp. 600–607, 1996.
- [333] C. Nguyen, 'Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls', *Agronomie*, vol. 23, no. 5–6, pp. 375–396, Jul. 2003, doi: 10.1051/agro:2003011.
- [334] M. Hassan, J. McInroy, and J. Kloepper, 'The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review', *Agriculture*, vol. 9, no. 7, p. 142, Jul. 2019, doi: 10.3390/agriculture9070142.
- [335] P. G. Dennis, A. J. Miller, and P. R. Hirsch, 'Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 72, no. 3, pp. 313–327, Mar. 2010, doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x.
- [336] A. Canarini, C. Kaiser, A. Merchant, A. Richter, and W. Wanek, 'Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli', *Front Plant Sci*, vol. 10, Feb. 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00157.
- [337] G. V. Bloembergen, G. A. O'Toole, B. J. Lugtenberg, and R. Kolter, 'Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp', *Appl Environ Microbiol*, vol. 63, no. 11, pp. 4543–4551, Nov. 1997, doi: 10.1128/aem.63.11.4543-4551.1997.
- [338] M. Watt, P. Hugenholtz, R. White, and K. Vinall, 'Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)', *Environ Microbiol*, vol. 8, no. 5, pp. 871–884, May 2006, doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00973.x.
- [339] C. E. Morris and J.-M. Monier, 'The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 41, no. 1, pp. 429–453, Sep. 2003, doi: 10.1146/annurev.phyto.41.022103.134521.
- [340] C. Pliego *et al.*, 'Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae', *Environ Microbiol*, vol. 10, no. 12, pp. 3295–3304, 2008, doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01721.x.
- [341] J. E. Loper, C. Haack, and M. Schroth, 'Population Dynamics of Soil pseudomonads in the Rhizosphere of Potato (*Solanum tuberosum* L.)', *Appl Environ Microbiol*, vol. 49, no. 2, pp. 416–422, 1985.

- [342] A. Basu *et al.*, 'Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects', *Sustainability*, vol. 13, no. 3, p. 1140, Jan. 2021, doi: 10.3390/su13031140.
- [343] L. M. Kaminsky, R. V. Trexler, R. J. Malik, K. L. Hockett, and T. H. Bell, 'The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants', *Trends Biotechnol*, vol. 37, no. 2, pp. 140–151, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.11.011.
- [344] S. W. Poppeliers, J. J. Sánchez-Gil, and R. de Jonge, 'Microbes to support plant health: understanding bioinoculant success in complex conditions', *Curr Opin Microbiol*, vol. 73, p. 102286, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.mib.2023.102286.
- [345] N. R. Wang *et al.*, 'Commensal *Pseudomonas fluorescens* Strains Protect *Arabidopsis* from Closely Related *Pseudomonas* Pathogens in a Colonization-Dependent Manner', *mBio*, vol. 13, no. 1, Feb. 2022, doi: 10.1128/mbio.02892-21.
- [346] R. Debray, R. A. Herbert, A. L. Jaffe, A. Crits-Christoph, M. E. Power, and B. Koskella, 'Priority effects in microbiome assembly', *Nat Rev Microbiol*, vol. 20, no. 2, pp. 109–121, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41579-021-00604-w.
- [347] E. Verbruggen, M. G. A. van der Heijden, M. C. Rillig, and E. T. Kiers, 'Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success', *New Phytologist*, vol. 197, no. 4, pp. 1104–1109, Mar. 2013, doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04348.x.
- [348] C. A. Mallon, X. Le Roux, G. S. van Doorn, F. Dini-Andreote, F. Poly, and J. F. Salles, 'The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche', *ISME J*, vol. 12, no. 3, pp. 728–741, Mar. 2018, doi: 10.1038/s41396-017-0003-y.
- [349] N. Amacker *et al.*, 'Biocontrol Traits Correlate With Resistance to Predation by Protists in Soil *Pseudomonads*', *Front Microbiol*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.614194.
- [350] B. Koskella and T. B. Taylor, 'Multifaceted Impacts of Bacteriophages in the Plant Microbiome', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 56, no. 1, pp. 361–380, Aug. 2018, doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-045858.
- [351] D. Garrido-Sanz *et al.*, 'Changes in structure and assembly of a species-rich soil natural community with contrasting nutrient availability upon establishment of a plant-beneficial *Pseudomonas* in the wheat rhizosphere', *Microbiome*, vol. 11, no. 1, p. 214, Sep. 2023, doi: 10.1186/s40168-023-01660-5.
- [352] J. Świątczak, A. Kalwasińska, A. Szabó, and M. Swiontek Brzezinska, '*Pseudomonas sivasensis* 2RO45 inoculation alters the taxonomic structure and functioning of the canola rhizosphere microbial community', *Front Microbiol*, vol. 14, May 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1168907.
- [353] M. Papin *et al.*, 'Survival of a microbial inoculant in soil after recurrent inoculations', *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, p. 4177, Feb. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-54069-x.
- [354] A. Fröhlich, K. Buddrus-Schiemann, J. Durner, A. Hartmann, and U. von Rad, 'Response of barley to root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 under laboratory,

- greenhouse, and field conditions', *J Plant Interact*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, Mar. 2012, doi: 10.1080/17429145.2011.597002.
- [355] F. Ahmad, F. M. Husain, and I. Ahmad, 'Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in PGPR Research', in *Microbes and Microbial Technology*, New York, NY: Springer New York, 2011, pp. 363–391. doi: 10.1007/978-1-4419-7931-5_14.
- [356] J. C. Zadoks, T. T. Chang, and C. F. Konzak, 'A decimal code for the growth stages of cereals', *Weed Res*, vol. 14, no. 6, pp. 415–421, Dec. 1974, doi: 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x.
- [357] M. Martínez-Gil, D. Romero, R. Kolter, and M. Espinosa-Urgel, 'Calcium Causes Multimerization of the Large Adhesin LapF and Modulates Biofilm Formation by *Pseudomonas putida*', *J Bacteriol*, vol. 194, no. 24, pp. 6782–6789, 2012, doi: 10.1128/JB.01094-12.
- [358] W. Achouak, S. Conrod, V. Cohen, and T. Heulin, 'Phenotypic Variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a Plant Root-Colonization Strategy', *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, vol. 17, no. 8, pp. 872–879, 2004, doi: 10.1094/MPMI.2004.17.8.872.
- [359] M. K. Sang and K. D. Kim, 'Biocontrol activity and root colonization by *Pseudomonas corrugata* strains CCR04 and CCR80 against Phytophthora blight of pepper', *BioControl*, vol. 59, no. 4, pp. 437–448, 2014, doi: 10.1007/s10526-014-9584-9.
- [360] N. Ling, T. Wang, and Y. Kuzyakov, 'Rhizosphere bacteriome structure and functions', *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, p. 836, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28448-9.
- [361] K. M. G. Dastogeer, F. H. Tumpa, A. Sultana, M. A. Akter, and A. Chakraborty, 'Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity', *Curr Plant Biol*, vol. 23, p. 100161, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.cpb.2020.100161.
- [362] J. Sasse, E. Martinoia, and T. Northen, 'Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome?', *Trends Plant Sci*, vol. 23, no. 1, pp. 25–41, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.tplants.2017.09.003.
- [363] L. Kuz'mina and A. Melent'ev, 'The Effect of Seed Bacterization by *Bacillus* Cohn Bacteria on Their Colonization of the Spring Wheat Rhizosphere', *Mikrobiologiya*, vol. 72, no. 2, pp. 268–274, 2003.
- [364] M. E. Juhnke, D. E. Mathre, and D. C. Sands, 'Relationship between bacterial seed inoculum density and rhizosphere colonization of spring wheat', *Soil Biol Biochem*, vol. 21, no. 4, pp. 591–595, Jan. 1989, doi: 10.1016/0038-0717(89)90134-X.
- [365] S. Fischer, E. C. Jofré, P. V Cordero, F. J. Gutiérrez Mañero, and G. B. Mori, 'Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi', *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 97, no. 3, pp. 241–251, 2010, doi: 10.1007/s10482-009-9405-9.
- [366] C. Mosimann *et al.*, 'Tracing of two *Pseudomonas* strains in the root and rhizoplane of maize, as related to their plant growth-promoting effect in contrasting soils', *Front Microbiol*, vol. 7, no. JAN, pp. 1–14, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2016.02150.

- [367] J. M. Raaijmakers, 'Dose-Response Relationships in Biological Control of Fusarium Wilt of Radish by *Pseudomonas* spp.', *Phytopathology*, vol. 85, no. 10, p. 1075, 1995, doi: 10.1094/Phyto-85-1075.
- [368] L. S. Thomashow, D. M. Weller, O. Mavrodi V, and D. V Mavrodi, 'Selecting, monitoring and enhancing the performance of bacterial biocontrol agents: principles, pitfalls and progress', in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, M. Vurro and J. Gressel, Eds., Springer, 2007, pp. 87–105.
- [369] M. V. Berlanga-Clavero *et al.*, 'Bacillus subtilis biofilm matrix components target seed oil bodies to promote growth and anti-fungal resistance in melon', *Nat Microbiol*, vol. 7, no. 7, pp. 1001–1015, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41564-022-01134-8.
- [370] C. Chen *et al.*, 'Long-term effect of epigenetic modification in plant–microbe interactions: modification of DNA methylation induced by plant growth-promoting bacteria mediates promotion process', *Microbiome*, vol. 10, no. 1, p. 36, Feb. 2022, doi: 10.1186/s40168-022-01236-9.
- [371] V. Walker, C. Bertrand, F. Bellvert, Y. Moënné-Loccoz, R. Bally, and G. Comte, 'Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*', *New Phytologist*, vol. 189, no. 2, pp. 494–506, Jan. 2011, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03484.x.
- [372] P. C. A. Wintermans, P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse, 'Natural genetic variation in Arabidopsis for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria', *Plant Mol Biol*, vol. 90, no. 6, pp. 623–634, Apr. 2016, doi: 10.1007/s11103-016-0442-2.
- [373] M. L. Pacheco da Silva, F. S. Moen, M. R. Liles, Y. Feng, and A. Sanz-Saez, 'The Response to Inoculation with PGPR Plus Orange Peel Amendment on Soybean Is Cultivar and Environment Dependent', *Plants*, vol. 11, no. 9, p. 1138, Apr. 2022, doi: 10.3390/plants11091138.
- [374] M. Y. Khan *et al.*, 'Potential of plant growth promoting bacterial consortium for improving the growth and yield of wheat under saline conditions', *Front Microbiol*, vol. 13, Sep. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.958522.
- [375] W. Zhang, G. Mao, J. Zhuang, and H. Yang, 'The co-inoculation of *Pseudomonas chlororaphis* H1 and *Bacillus altitudinis* Y1 promoted soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] growth and increased the relative abundance of beneficial microorganisms in rhizosphere and root', *Front Microbiol*, vol. 13, Jan. 2023, doi: 10.3389/fmicb.2022.1079348.
- [376] P. R. Díaz, F. Merlo, L. Carrozzi, C. Valverde, C. M. Creus, and G. A. Maroniche, 'Lettuce growth improvement by *Azospirillum argentinense* and fluorescent *Pseudomonas* co-inoculation depends on strain compatibility', *Applied Soil Ecology*, vol. 189, p. 104969, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.apsoil.2023.104969.