

2

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: filogenia, microbioma, y perspectivas

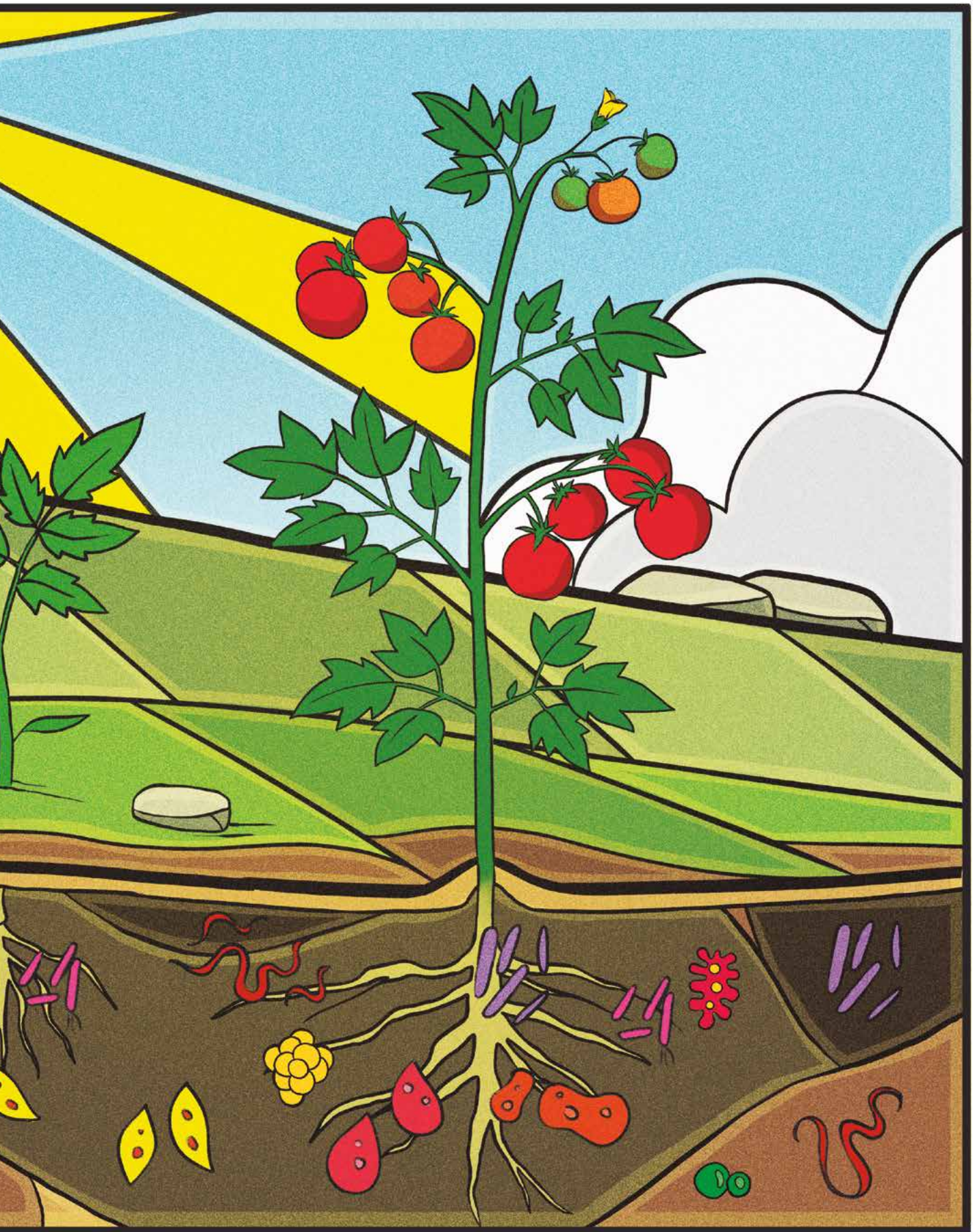
Sergio Pardo Díaz¹

Diana Carolina Mazo Molina²

Daniel Fernando Rojas Tapias¹

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.
2. Instituto Boyce Thompson asociado a la Universidad de Cornell en Ithaca, Nueva York.





Introducción

Los microorganismos del dominio Bacteria son seres vivos cosmopolitas y pueden vivir de manera libre o asociados a otros organismos. Debido a su importancia en los procesos biogeoquímicos, estos representan una pieza esencial de la vida en nuestro planeta.

Las bacterias son extremadamente versátiles metabólicamente, pues pueden tomar diversas fuentes de carbono para su multiplicación, respirar anaeróbicamente y usar múltiples donadores orgánicos e inorgánicos de electrones, entre otras capacidades. También son capaces de interactuar con especies mayores, como hongos, animales o plantas, y estas interacciones pueden ser positivas, neutras o negativas. En el caso específico de la interacción planta-bacteria, mucha investigación se ha dedicado al estudio de la interacción negativa o al estudio de fitopatógenos o microorganismos que causan enfermedades en las plantas, y hoy muchos de los mecanismos moleculares asociados son conocidos en detalle. No obstante, muchos otros microorganismos ejercen un efecto positivo en esta interacción, ya sea mediante acción directa sobre la planta, incrementando la disponibilidad de nutrientes en el suelo, por ejemplo, o de manera indirecta, previniendo la proliferación de ciertos fitopatógenos (Heredia-Acuña et al., 2018). Un análisis de este último grupo de microorganismos (los que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas) es el objetivo de este capítulo.

Las bacterias que ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento o desarrollo de las plantas se conocen de manera global como *bacterias promotoras del crecimiento vegetal* (PGPB, por sus siglas en inglés). El efecto positivo de estas bacterias se ha otorgado tradicionalmente a su capacidad para incrementar la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y para sintetizar hormonas vegetales (ácido indolacético, giberelinas, etc.) (Compant et al., 2010; Glick, 2012). No obstante, en años recientes, el papel clave de estos microorganismos en la prevención y el alivio de condiciones de estrés como sequía, salinidad sódica o presencia de metales pesados sugiere que más mecanismos están en juego.

Como se discutirá en breve, de forma general, las PGPB no se encuentran agrupadas filogenéticamente. No existe un filo o una clase de bacterias con cualidades de PGPB, salvo una excepción: los rizobios. No obstante, sí existen algunas especies de las cuales múltiples cepas se han asociado con un efecto positivo sobre el crecimiento vegetal. Algunas de estas especies que contienen miembros con cualidades de PGPB son *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum* y *Pseudomonas fluorescens*, las cuales, con diversos mecanismos, pueden afectar el crecimiento vegetal. *P. fluorescens* representa un caso particular, dado que algunas cepas de esta especie también pueden ser patógenas de plantas (Dominguez-Nuñez et al., 2014; Santoyo et al., 2016; Tsavkelova et al., 2006).

Debido a la importancia de este grupo de microorganismos en la ecología del suelo y en la promoción de cultivos de importancia económica y social, muchos esfuerzos están siendo realizados para la selección de organismos con potencial agrícola. La disminución en la aplicación de agroquímicos mediante el uso de estas tecnologías limpias puede contribuir significativamente al manejo responsable de los cultivos desde el punto de vista del calentamiento global y de la explosión demográfica. Adicionalmente,



el advenimiento de nuevas tecnologías en biología molecular abre la puerta a la generación de organismos modificados genéticamente, los cuales pueden presentar mayor potencial como insumo agrícola (Erturk et al., 2010; Ferreira et al., 2019). El uso de herramientas de biología molecular, no obstante, requiere un conocimiento profundo de los mecanismos moleculares asociados y de la ecología de los organismos en el suelo (Afzal et al., 2019). Por ejemplo, el descubrimiento de genes específicos asociados a la solubilización de fosfato podría permitir la generación de organismos que

promuevan el crecimiento de las plantas en suelos con baja disponibilidad de fósforo. Adicionalmente, un mayor conocimiento de la composición y de las interacciones del microbioma de la planta puede permitir la generación de cocteles de microorganismos que impacten en mayor medida el crecimiento de las plantas en comparación con el uso tradicional de especies individuales (Fadiji & Babalola, 2020). Los avances tecnológicos en biología molecular de los organismos y en el entendimiento de la ecología de la rizósfera prometen un cambio rentable y limpio en las técnicas de manejo de los cultivos.



Definición: bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)

Las PGPB se refieren a las bacterias de vida libre en el suelo y a las que colonizan la rizósfera o el tejido de las plantas (PGPR: véase el capítulo 1); estas bacterias, al ser usadas como inoculante biológico, tienen un efecto positivo y medible sobre las plantas. Este efecto puede ser directo, a través del incremento en la disponibilidad de nutrientes o a través de la síntesis de moléculas que influyen benéficamente el desarrollo de la planta, o indirecto, mediante amensalismo o competencia con organismos potencialmente patógenos o mediante la prevención de estreses abióticos (Rojas-Tapias et al., 2012). El uso de PGPB en la agricultura sostenible se ha vuelto más importante en las últimas décadas, debido a sus efectos benéficos sobre el suelo y sobre la productividad de los cultivos, así como por su impacto en la reducción del uso de fertilizantes químicos, para cuya producción se emplean vastas cantidades de combustibles fósiles (Ramakrishna et al., 2019), por lo que la reducción en su uso está alineada con las políticas de conservación del medio ambiente y la desaceleración del cambio climático.

Dentro de la diversidad filogenética de microorganismos pertenecientes al grupo de las PGPB, los principales miembros están asociados a los filos Firmicutes y Proteobacteria (Chen et al., 2010; Dong et al., 2008; Rojas-Tapias et al., 2012). En el filo Firmicutes, por ejemplo, el género *Bacillus* cuenta con algunas especies con actividad promotora del crecimiento vegetal. En el filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, los

géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Psychrobacter*, *Enterobacter* y *Rahnella* han mostrado tener potencial, al igual que los géneros *Burkholderia* y *Achromobacter*, de la clase Betaproteobacteria (Batista et al., 2018).

Estos géneros bacterianos han sido ampliamente reportados en la literatura científica, ya que poseen diferentes actividades asociadas al desarrollo y crecimiento de distintas especies vegetales. Algunos de los mecanismos conocidos por los cuales las PGPB podrían ser benéficas para las plantas incluyen estrategias directas e indirectas; entre las primeras, encontramos: 1) fijación biológica de nitrógeno: proceso en el cual las bacterias reducen el nitrógeno atmosférico a amoníaco para su posterior asimilación por parte de las plantas; 2) solubilización y mineralización de fósforo: las bacterias pueden mineralizar fósforo orgánico o solubilizar sales insolubles de fosfato, y el fosfato liberado puede ser fácilmente asimilado por las plantas; 3) producción de sustancias estimuladoras: algunas bacterias pueden sintetizar moléculas que se asemejan a hormonas vegetales, las cuales pueden modular procesos de desarrollo en la planta, y algunos ejemplos incluyen ácido abscísico, ácido giberélico o ácido indolacético; 4) modulación de hormonas vegetales: mediante la acción de la enzima Acc (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa, las bacterias pueden disminuir los niveles de etileno y, por tanto, permitir un mayor crecimiento de la planta. Con respecto a las estrategias indirectas para estimular el crecimiento de las plantas, se encuentran las siguientes: 1) producción de sideróforos: estos compuestos se unen al hierro con alta afinidad, por lo que pueden ser empleados para aumentar la disponibilidad de hierro o para reducir el crecimiento de organismos patógenos; 2) producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos: esta estrategia les permite a las bacterias prevenir o contrarrestar la actividad y efecto de organismos patógenos mediante la inhibición de su crecimiento; 3) producción de biopelículas: la producción de biopelículas sobre el tejido radicular puede disminuir el efecto negativo de una alta salinidad y sequía (Ahemad & Kibret, 2014; Etesami & Maheshwari, 2018).

El microbioma de la rizósfera

El advenimiento de las tecnologías de secuenciación masiva de ADN nos ha dado un mayor conocimiento de la distribución filogenética de las bacterias del suelo asociadas con plantas de interés agrícola. El análisis metagenómico de la rizósfera del maíz fue una de las primeras observaciones de la riqueza y abundancia relativa de las especies microbianas que habitan la rizósfera de las plantas. Al analizar la secuencia del gen 16S rARN y hacer su pirosecuenciación, Peiffer et al. (2014) observaron una variación significativa en términos de riqueza, diversidad y abundancia relativa de taxas bacterianas entre el suelo y la rizósfera del maíz, así como entre diferentes campos (Peiffer et al., 2014). Usando cuatro pares de cebadores de ADN, los autores encontraron una mayor abundancia de proteobacterias, seguidas por actinobacterias, bacteroidetes, acidobacterias y cianobacterias, entre otras. Estos resultados son, en cierta medida, consistentes con la identidad genética de los microorganismos comúnmente aislados de la rizósfera de plantas mediante técnicas convencionales de laboratorio.

Otro estudio, liderado por el mismo grupo, analizó la asociación entre plantas de maíz y su microbioma. Los resultados mostraron un efecto significativo entre el genotipo de las plantas y la diversidad microbiana asociada; igualmente, encontraron que la edad de la planta y los cambios en el clima tienen un efecto significativo sobre su composición. No obstante, esta variación contrastó con la asociación específica de ciertas especies con el genotipo de las plantas. En este estudio, en el cual se empleó la tecnología MiSeq, de Illumina, se analizó la región V4 del gen 16S rARN; el objetivo fue determinar el microbioma central asociado a las plantas de maíz, es decir, esas especies bacterianas que se encontraron asociadas en más del 80 % de las muestras de la rizósfera.





Los resultados mostraron aproximadamente 150 especies asociadas — independientemente de las variaciones ambientales—, las cuales resultaron ser filogenéticamente diversas.

La mayor parte de estas especies pertenecían a los filos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria y Verrucomicrobia. En cuanto al filo Proteobacteria, la mayor parte de los organismos pertenecían a la clase Alphaproteobacteria, seguida por Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Deltaproteobacteria. Asimismo, miembros de Archaea también se encontraron asociados a la rizósfera de la planta (Walters et al., 2018).

Este estudio expone la asociación existente que se ha forjado durante el curso de la evolución entre ciertas especies microbianas y vegetales. Estas asociaciones, en algunos casos, se dan de manera neutral, es decir, sin beneficio para ambas partes, pero, en el caso de las PGPB, este efecto es benéfico para la planta y, presumiblemente, para la bacteria. Mientras la estrecha asociación entre algunos miembros de Proteobacteria y plantas de importancia agrícola ha sido claramente demostrada, poca información se tiene acerca de la interacción entre otros filos y la planta. Este hecho es explicado por el sesgo de la selección en medios de cultivo, que hace que algunas especies no se encuentren suficientemente representadas. Algunas especies anaerobias, por ejemplo, podrían desempeñar un papel importante en la nutrición de la planta, pero los métodos convencionales de aislamiento se hacen en condiciones aerobias o, a lo máximo, en condiciones de microaerofilia. Estos métodos de selección, por tanto, excluyen microorganismos anaerobios obligados, como aquellos pertenecientes a *Clostridium* spp., por ejemplo. La selección de otros microorganismos con potencial para la promoción del crecimiento vegetal, por tanto, debería realizarse en más medios de cultivo, en otras condiciones y con otras técnicas que permitan la selección de microorganismos con requerimientos nutricionales específicos o de aquellos que se encuentran en poca abundancia.



Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (canónicas)

La diversidad filogenética y funcional de las bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas es extremadamente compleja, y su estudio nos proporciona un entendimiento más amplio de los procesos ecológicos que se dan en el suelo y de las especies que los están realizando (Compant et al., 2019; Ferreira et al., 2020), además de que provee una explicación sobre la discrepancia ocasionalmente observada entre las caracterizaciones *in vitro* del potencial de las bacterias como PGPB y los resultados en campo o invernadero. No obstante, ciertos géneros y especies microbianos tradicionalmente se han asociado a un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, y estos son el tema de esta sección. Un caso particularmente relevante es el de las bacterias con capacidad para formar nódulos con plantas leguminosas, bacterias que se encuentran principalmente, pero no de manera exclusiva, en el orden Rhizobiales del filo Proteobacteria y se conocen globalmente como *rizobios*. Estos rizobios, al poseer los mecanismos moleculares requeridos para el establecimiento de una relación simbiótica con leguminosas, en la mayoría de los casos van a tener un efecto benéfico sobre el crecimiento vegetal. De todas maneras, este grupo de organismos interactúa únicamente con un grupo definido de plantas, y por ello la investigación de otros grupos microbianos es necesaria para mejorar el crecimiento de otras especies vegetales de importancia agrícola.



Microorganismos de vida libre

Los microorganismos de vida libre son aquellos que viven en la rizósfera pero son incapaces de colonizar el tejido vegetal. Los microorganismos de vida libre, por lo tanto, exhiben un bajo grado de intimidad con la planta en comparación con los otros dos tipos de interacciones previamente mencionados: simbiosis y endofitismo mutualista. La asociación entre las bacterias de vida libre y la planta se mantiene porque los microorganismos pueden explotar las fuentes de carbono y otros nutrientes presentes en los exudados radiculares, y, en contraprestación, algunos de estos organismos pueden producir moléculas que afectan positivamente el crecimiento de la planta. Algunas de estas PGPB, por ejemplo, son capaces de producir exopolisacáridos y, por lo tanto, pueden adherirse firmemente a la raíz. La síntesis microbiana de este tipo de macromoléculas, por ejemplo, puede tener efectos positivos puesto que incrementa la intimidad de la interacción y, así, el efecto de las moléculas benéficas, además de que también puede ayudar a prevenir o aliviar estreses abióticos, como la presencia de metales pesados, la salinidad sódica o la sequía (Ahemad & Kibret, 2014; Etesami & Maheshwari, 2018; Rojas-Tapias et al., 2012).

Aunque muchas especies bacterianas caen en la categoría de *organismo de vida libre*, un enfoque especial se hará sobre dos géneros: *Azotobacter* y *Bacillus*. Este enfoque se fundamenta en la importancia de estos dos géneros como inoculantes biológicos, así como en los resultados del grupo de investigación Sistemas Agropecuarios Sostenibles, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), que ponen en evidencia su potencial.

Azotobacter

El género *Azotobacter* está conformado por siete especies, dentro de las cuales *A. vinelandii* y *A. chroococcum* revisten una particular importancia (Figura 2.1) multifactorial: 1) *A. vinelandii* ha sido ampliamente empleado como un organismo modelo en la fijación biológica de nitrógeno, debido a que exhibe altas tasas de fijación en condiciones aeróbicas y a que codifica en su genoma tres diferentes nitrogenasas; 2) ambas especies han mostrado ser importantes para promover el crecimiento de cultivos de interés agrícola (Rojas-Tapias et al., 2012), y 3) *A. vinelandii* tiene importancia industrial y académica, debido a su capacidad para sintetizar el polímero alginato.

- **Figura 2.1.** Descripción macroscópica de una colonia de *Azotobacter* sp. en medio de cultivo LG con azul de bromotimol.

Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



El género *Azotobacter* está conformado por bacterias Gram-negativas con capacidad para formar una estructura de resistencia denominada *quiste*, la cual es estructuralmente diferente a las endosporas de *Bacillus* y otros Firmicutes y que le permite soportar condiciones adversas, como la desecación. Condiciones naturales como la limitación de nutrientes inducen el proceso de diferenciación de células vegetativas en quistes, los cuales poseen una morfología única y diferente a la de las células vegetativas. Esta estructura de resistencia está conformada por un cuerpo central y una cápsula que rodea las células: el cuerpo central se caracteriza por contener gránulos de polihidroxibutirato (PHB), mientras que la cápsula está compuesta por dos capas, llamadas *exina* e *intina* (Garrity et al., 2005).

*Otra particularidad del género *Azotobacter* es la producción de pigmentos. Aquí, es importante resaltar que la naturaleza y función de estos varía entre especies.*

A. vinelandii, por ejemplo, produce un pigmento verde y fluorescente (bajo exposición a luz ultravioleta) en medio de cultivo Ashby (Garrity et al., 2005). Este pigmento, de naturaleza proteica, es producido únicamente bajo condiciones de limitación de hierro. Debido a que se produce en respuesta a la falta de hierro y que se une a este metal con alta afinidad, se dice que actúa como sideróforo. *A. chroococcum*, por su parte, produce un pigmento de color café oscuro, el cual se identifica químicamente como una melanina. Debido a que su síntesis es inhibida bajo condiciones de limitación de oxígeno o de sus especies reactivas, se considera que la función principal de este pigmento es mediar la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*), que se generan como subproducto de la respiración. En ambos casos, la producción de estos pigmentos (en ausencia de nitrógeno) permite el aislamiento y la identificación de estos organismos a partir de suelo rizosférico (Becking, 1981).



Filogenética y cromosoma

Azotobacter pertenece al subfilo γ -Proteobacteria y se encuentra relacionado con el género *Pseudomonas*. Como se mencionó anteriormente, este género consta de siete especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. nigricans*, *A. salinestris*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii* y *A. paspali*.

En la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), del National Center for Biotechnology Information (NCBI), actualmente se encuentra el genoma de cuatro especies de *Azotobacter*: *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii* y *A. salinestris*. Los cromosomas de estas especies son circulares, tienen un tamaño de ~5 Mb y cuentan con un contenido de GC del ~65%. Estas cepas, además, contienen entre 0 y 6 plásmidos. En *A. vinelandii* ha sido descrita la existencia de poliploidía, es decir, múltiples copias de un solo cromosoma en un organismo (Garrity et al., 2005).



Metabolismo

Azotobacter es un organismo organotrofo que usa azúcares o polioles como fuente de carbono. No requiere nitrógeno para crecer, dado que puede obtenerlo a través de la actividad de sus enzimas nitrogenasas. De hecho, altos niveles de nitrógeno en el medio regulan negativamente

la fijación de nitrógeno. El aislamiento de *Azotobacter*, por tanto, se hace en un medio con pocos nutrientes y que contenga manitol como fuente de carbono, fosfato y magnesio, además de altos niveles de carbonato de calcio, el cual afecta la producción de pigmentos, lo que permite hacer fácilmente la distinción de bacterias de este género en el proceso de selección (Camelo-Rusique et al., 2017).



Potencial para su uso en agricultura sostenible

El género *Azotobacter* se caracteriza por tener especies no patógenas y fijadoras de nitrógeno de vida libre; algunos aislamientos también tienen la capacidad de producir ácido indolacético, solubilizar fósforo inorgánico y producir sideróforos, por lo que este género representa una opción atractiva para el diseño de inoculantes biológicos y su aplicación en diferentes cultivos. Las especies más ampliamente usadas en inoculantes son *A. vinelandii* y *A. chroococcum*, pues son de crecimiento rápido y no tienen requerimientos metabólicos exigentes, lo que hace fácil su producción masiva. Aún más, su capacidad para formar quistes permite la generación de inoculantes de larga vida de almacenamiento.

En AGROSAVIA se ha demostrado el potencial de las cepas de *A. chroococcum* para influenciar positivamente el crecimiento de varios cultivos de interés agronómico, como el algodón, el ají y el tomate. De igual manera, se ha mostrado que algunas cepas de *A. chroococcum* disminuyen el efecto negativo de altos niveles de salinidad sódica sobre el crecimiento de las plantas, lo que tiene importancia en varios ecosistemas colombianos (Rojas-Tapias et al., 2012). Varios medios de cultivo han sido diseñados para la producción masiva de bacterias de *Azotobacter* a base de medios ya definidos o empleando residuos agroindustriales. Diferentes formulaciones con polímeros, arcillas, entre otros elementos, así como la inducción del proceso de enquistamiento para la generación de inoculantes de tiempo de almacenamiento extendido también han sido estudiadas (Camelo-Rusique et al., 2017; Moreno et al., 2011; Rojas-Tapias et al., 2012; Rojas-Tapias et al., 2013; Rojas-Tapias et al., 2015; Romero-Perdomo et al., 2015; Romero-Perdomo et al., 2017).

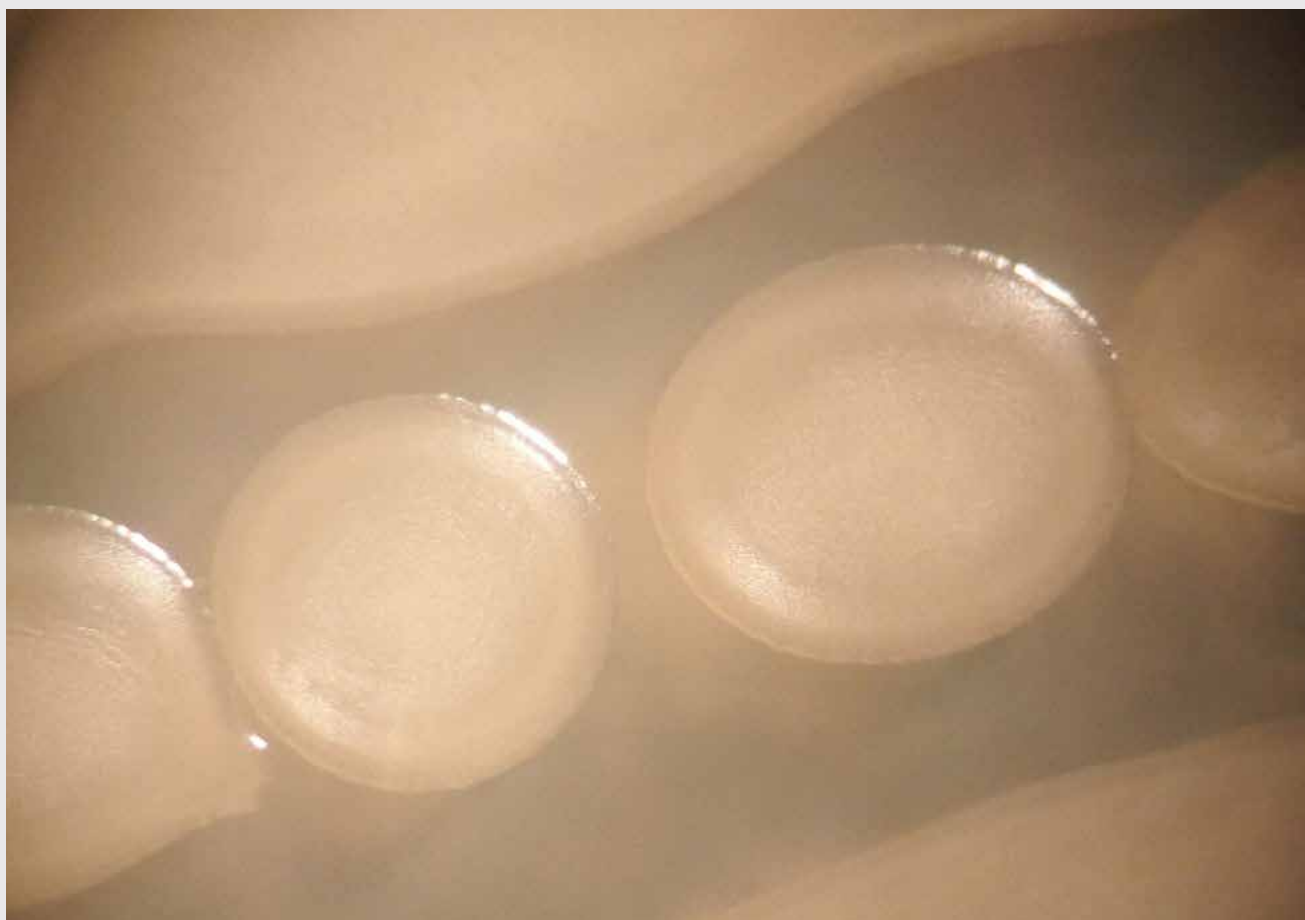
Bacillus

Este género forma parte del filo Firmicutes y consta de bacterias que tiñen positivo en la coloración de Gram. Además, es fenotípicamente diverso, pues sus células pueden ser bastones o filamentos esféricos, rectos, curvos o helicoidales, con o sin flagelos y con o sin endosporas resistentes al calor. Igualmente, son

aerobios, anaerobios facultativos o estrictos. Algunos miembros del género *Bacillus* son termófilos o halófilos (Figura 2.2). La mayoría son aislados del suelo, donde su diversidad es muy amplia, pero también se encuentran en aguas, alimentos y ambientes clínicos, y la mayoría se consideran no fitopatógenos, pues solo algunos están asociados a enfermedades humanas o animales (De Vos et al., 2009).

■ **Figura 2.2.** Descripción macroscópica de una colonia de *Bacillus* sp. en medio de cultivo CASO.

Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



Filogenética y cromosoma

El género *Bacillus* pertenece a la clase Bacilli del filo Firmicutes. Este género incluye más de 200 diferentes especies, y por ello una descripción global de las propiedades de sus genomas no es conveniente. Aquí nos enfocaremos en dos de las especies del género *Bacillus* que han mostrado potencial como inoculantes biológicos: *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. *B. subtilis* tiene un genoma de

~4,1 Mb y ~4.000 proteínas, y su contenido de GC es del 43,5%. *B. thuringiensis*, por su parte, tiene un genoma más grande, pues su tamaño promedio es de ~6,0 Mb y ~5.800 proteínas, y su contenido de GC es del 34,9%. A pesar de las considerables diferencias a nivel cromosomal, estas especies comparten ciertos determinantes moleculares, como los genes asociados al proceso de esporulación (Dworkin et al., 2006).

B. subtilis ha sido ampliamente empleado en estudios de biología molecular, y representa el modelo bacteriano por excelencia de bacterias Gram-positivas. Algunos procesos, como esporulación, formación de biopelículas, resistencia a metales y estrés oxidativo, han sido descritos en sorprendente detalle. Una de las cualidades que han permitido su clasificación como un organismo modelo es la facilidad con la que se puede manipular genéticamente (Wang et al., 2017). Recientes estudios de biología molecular de *B. subtilis* han mostrado que la formación de biopelículas por efecto del ácido málico es fundamental para el proceso de promoción del crecimiento vegetal.

Por su parte, *B. thuringiensis* ha sido ampliamente usado como agente insecticida biológico, y aunque no es clasificado como una rizobacteria, su uso está asociado a una mejora en el rendimiento de los cultivos. Este efecto positivo se debe a su capacidad para sintetizar inclusiones cristalinas o deltaendotoxinas, las cuales tienen actividad insecticida. Estas proteínas, que son producidas durante la parte tardía de la fase exponencial, son conocidas como las toxinas Cry y son codificadas por los genes cry, los cuales no residen en el cromosoma sino, normalmente, en plásmidos. La familia de genes cry es una gran familia de genes homólogos que codifica proteínas con actividad específica en contra de solo algunas especies de insectos. Cuando las proteínas son ingeridas por los insectos, son solubilizadas y modificadas, para convertirse, luego, en toxinas activas (Tabashnik, 1994).



Metabolismo

La mayoría de las bacterias del género *Bacillus* crecen de manera óptima en medios de cultivo rutinarios, como agar nutritivo, agar tripticasa de soya o agar sangre. Sin embargo, se han desarrollado medios químicamente definidos para facilitar su aislamiento específico o para optimizar procesos industriales. La mayoría de las especies utilizan glucosa como fuente de

carbono, aunque existen otras que tienen la versatilidad de utilizar otras fuentes de carbono, como ácidos orgánicos y aminoácidos. Asimismo, las bacterias del género *Bacillus* pueden usar fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno. Los rangos de temperatura para un crecimiento óptimo varían en este género, aunque la mayoría crece a 30 °C; sin embargo, también se han encontrado bacterias del género en ambientes con temperaturas extremas (entre 5 °C y 75 °C) (De Vos et al., 2009), y, de hecho, las termófilas son importantes en los procesos de compostaje.

Muchas especies del género *Bacillus* pueden usar nitrato como aceptor de electrones en ausencia de oxígeno, pero algunas otras, como *B. megaterium* y *B. pumilus*, no lo pueden hacer. *B. subtilis*, por ejemplo, puede usar amonio, nitrato, aminoácidos, algunas purinas, urea, ácido úrico, alantoina y péptidos como fuentes de nitrógeno.



Potencial para su uso en agricultura sostenible

El género *Bacillus* es sistemáticamente muy amplio, y por ello la selección de especies promotoras se basa en su identidad filogenética. Para su aislamiento selectivo, se suele aprovechar la termorresistencia de sus esporas. En particular, se buscan miembros de las especies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* o *B. megaterium* para la formulación de inoculantes debido a su potencial demostrado para promover el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos, su aplicación segura, su rápido crecimiento y su fácil producción a gran escala, además de que forman una estructura de resistencia denominada *espora*. En AGROSAVIA se ha demostrado el potencial de consorcios de *Bacillus* en la disminución del estrés hídrico en ambientes secos en pasto guinea y en maíz (Moreno-Galván, Romero-Perdomo et al., 2020; Moreno-Galván, Cortés-Patiño et al., 2020). Asimismo, actualmente se estudia la bacteria *B. thuringiensis* para el control de insectos en varios cultivos.



Microorganismos endófitos

Se define como *microorganismo endófito benéfico* a aquel capaz de colonizar los tejidos de la planta y establecer una relación mutualista con esta. A diferencia de la interacción entre rizobios y leguminosas, la interacción entre endófitos y plantas no requiere mecanismos moleculares sofisticados y, más bien, se basa en la capacidad del microorganismo para invadir los tejidos vegetales sin causar enfermedad. La colonización endofítica del huésped por la bacteria está determinada por una combinación de diferentes rasgos bacterianos referidos colectivamente como *rasgos de colonización*, los cuales regulan todo el proceso de colonización de las plantas. Este proceso, que implica una comunicación compleja entre los dos socios, generalmente comienza desde las raíces y requiere el reconocimiento de compuestos específicos en los exudados de la raíz por parte de las bacterias endofíticas (Afzal et al., 2019; Elmerich & Newton, 2007; Hallmann et al., 1997).

*En este grupo se han clasificado varios microorganismos, entre los cuales *Azospirillum* y *Herbaspirillum* ocupan un lugar principal, por lo que serán descritos a continuación.*

Azospirillum

El género *Azospirillum* es una de las PGPB más ampliamente estudiadas y utilizadas comercialmente en la agricultura. Pertenece a la clase Alphaproteobacteria y es una bacteria fijadora de nitrógeno que ejerce un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas y el rendimiento de muchos cultivos (Figura 2.3). El efecto de su inoculación sobre pastos, cereales y legumbres ha sido mostrado en gran

nivel de detalle. Por ejemplo, se ha evidenciado que su uso causa efectos morfológicos pronunciados en las raíces de las plantas, cambios principalmente asociados a la proliferación de los pelos radiculares, los cuales se asocian, a su vez, a la síntesis de hormonas de tipo vegetal por parte del microorganismo. La extensión del área radicular tiene un efecto directo sobre el crecimiento de las plantas, puesto que influye positivamente en la adquisición de nutrientes del suelo (Cassán & Diaz-Zorita, 2016).

- **Figura 2.3.** Descripción macroscópica de una colonia de *Azospirillum* sp. en medio de cultivo DYGS.
Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



El género *Azospirillum* se caracteriza por tener forma de bacilo, ligeramente curvado y recto, y por teñir negativo en la coloración de Gram. Estas bacterias suelen contener gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato y son móviles tanto en medios de cultivo líquidos, mediante un único flagelo polar, como en medios sólidos, mediante flagelos laterales de longitud de onda más corta (Baldani et al., 2015).



Filogenética y cromosoma

El género *Azospirillum* consta de 15 especies fijadoras de nitrógeno y una no fijadora. Su estudio filogenético se ha basado primariamente en el análisis del gen 16S rARN. Los análisis iniciales, que incluyeron las primeras 5 especies descritas, indicaron que *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A.*

halopraeferens forman un linaje sólido, mientras que *A. amazonense* y *A. irakense* se segregan en un clado independiente. Con la adición de más especies a través de los años, los grupos *A. brasilense* y *A. lipoferum* crecieron en complejidad (Domingues Duarte et al., 2020), por lo que, como consecuencia, comúnmente se obtiene una baja confianza al definir las interrelaciones filogenéticas entre especies cercanas, particularmente dentro del grupo *A. lipoferum*, por medio de secuencias de 16S rARN. También se han encontrado inconsistencias al identificar nuevos aislamientos (Baldani et al., 2015).

Actualmente, en las bases del GenBank, del NCBI, se encuentran registrados 77 genomas asociados a *Azospirillum*, de los cuales *A. brasilense* es el más reportado. Este genoma presenta una longitud aproximada de 7 Mb y un contenido de gc del 64%-71% (Maroniche et al., 2017).



Metabolismo

Azospirillum puede metabolizar diversas fuentes de carbono, incluyendo ácidos orgánicos, carbohidratos, polioles, y aminoácidos. Esta versatilidad es crítica ya que le permite adaptarse fácilmente a diferentes nichos, incluyendo la rizósfera y el suelo.

Azospirillum es capaz de tomar el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio gracias a la presencia del complejo nitrogenasa. A diferencia de *Azotobacter*, aquí la fijación biológica de nitrógeno únicamente ocurre bajo condiciones de microaerofilia, es decir, en presencia de bajas tensiones de oxígeno, pues altas concentraciones de este elemento afectan directamente el complejo nitrogenasa y suprimen su actividad. En el género *Azospirillum*, la fijación de nitrógeno también es afectada por la concentración de amonio en el ambiente: el mecanismo asociado es fascinante, puesto que involucra una ADP-ribosil transferasa, la cual, en presencia de altos niveles de amonio, modifica covalentemente la dinitrogenasa reductasa y la hace inactiva. Cuando la concentración de amonio disminuye, una enzima glucohidrolasa (específica para una de las subunidades de la dinitrogenasa reductasa) remueve el grupo inactivante y restaura la actividad de fijación biológica de nitrógeno (Baldani et al., 2015; Cassán & Diaz-Zorita, 2016; Pedrosa et al., 2019).

Azospirillum crece bien en sales de ácidos orgánicos, como malato, succinato, lactato y

piruvato, y azúcares, aminoácidos y alcoholes de azúcar también pueden funcionar como fuentes de carbono. Debido a su versatilidad para tomar diferentes fuentes de carbono y a su metabolismo asociado al nitrógeno, se adapta fácilmente a varias condiciones del suelo y es competente para colonizar la rizósfera y, en algunos casos, los tejidos vegetales internos, como se describió anteriormente. La fijación biológica de nitrógeno depende de condiciones microaerófilas, pero *Azospirillum* crece bien bajo una atmósfera de aire en presencia de una fuente de nitrógeno fijo, como amonio o sales de glutamato. Células previamente cultivadas en presencia de una fuente de nitrógeno inorgánico pueden fijar nitrógeno en aire siempre que se agote todo el nitrógeno agregado y la nitrogenasa se active (Cassán & Diaz-Zorita, 2016).

Para su aislamiento, se emplea un medio semisólido sin nitrógeno, el cual contiene ácido málico como fuente de carbono y pH neutro. Esta condición semisólida es importante para producir el ambiente microaerófilo que le permite al organismo sintetizar el complejo nitrogenasa e iniciar la fijación biológica de nitrógeno. El ácido málico, por su parte, es importante puesto que se encuentra asociado al exudado radicular de varias plantas, lo que ha mostrado ser determinante en la interacción entre el microorganismo y la planta (Baldani et al., 2015). Esta fuente de carbono ha mostrado influir sobre la composición microbiana de la rizósfera, y su importancia en la interacción planta-microorganismo es evidente por los mecanismos quimiotácticos empleados por las bacterias para detectar este compuesto.



Potencial para su uso en agricultura sostenible

Azospirillum representa un grupo de microorganismos con alto potencial para su uso como inoculante biológico, principalmente en gramíneas. Las especies de *Azospirillum* son usualmente ávidas productoras de ácido indolacético, y se caracterizan por ser endófitas. *Azospirillum* no tiene requisitos nutricionales exigentes, y por tanto su producción masiva se puede hacer con relativa facilidad. En AGROSAVIA se cuenta con una colección importante de bacterias de este género, recuperadas de diferentes pastos, maíz, caña de azúcar y otras gramíneas. Su potencial promotor se ha mostrado en diversos suelos y en diferentes condiciones climáticas (Cassán et al., 2020).

Herbaspirillum

Herbaspirillum es un género clasificado como PGPB que tiene la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y producir sideróforos, además de que modula el desarrollo radicular por medio de la producción de diferentes reguladores del crecimiento vegetal (Alves et al., 2015). *Herbaspirillum* pertenece a la clase Betaproteobacteria y normalmente se encuentra asociado a especies vegetales de gramíneas, incluyendo sorgo, arroz y pasturas (Figura 2.4). Algunos géneros se han aislado de nódulos en frijol, y también se han encontrado en plantas de musáceas y algunos frutales, como piña. Se han estudiado como inoculantes en cultivos de maíz, caña de azúcar, arroz y pasturas

asociadas a sistemas silvopastoriles en modo de interseembra. Adicionalmente, se han estudiado en procesos de fitorremediación, estimulando la fitoextracción de metales pesados por medio de la producción de compuestos asociados a la promoción del crecimiento vegetal (Govarthanan et al., 2016; Gu & Mitchell, 2006; Praburaman et al., 2017).

Herbaspirillum es un bacilo Gram-negativo de forma generalmente vibrioide, aunque algunas veces se puede observar en forma de espirilo; es un microorganismo con característica motil debido a sus flagelos polares. En presencia de azúcares como glucosa, galactosa, arabinosa, manitol o glicerol como única fuente de carbono, las células tienden a alargarse (Garrity et al., 2005).

- **Figura 2.4.** Descripción macroscópica de una colonia de *Herbaspirillum* sp. en medio de cultivo DYGS.
Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA





Filogenética y cromosoma

El género *Herbaspirillum* consta de 14 especies descritas hasta la fecha, algunas de las cuales son conocidas por colonizar tejidos de las plantas, y otras pueden ser patógenas humanas al producir fibrosis quística y leucemia linfoblástica, aunque la forma como se desarrollan estas enfermedades aún no es del todo clara (Monteiro et al., 2012).

El genoma de *Herbaspirillum seropedicae* Z67 tiene un tamaño de ~5,5 Mb y 4.804 genes, y su contenido de gc está entre el 60 % y el 65 %. Los genes estructurales que codifican para el complejo nitrogenasa se encuentran localizados en el operón *nifHDKENXHsero_2847Hsero_2846fdxA*. Dentro de los genes codificantes para la proteína estructural de la nitrogenasa se identificaron *nifHDK* y *nifDK*. Adicionalmente, se identificaron los genes *nifN*, asociados a la actividad de la nitrogenasa bajo crecimiento limitado por oxígeno. Por otra parte, se evidenciaron 27 genes asociados al transporte y metabolismo del hierro, el cual puede ser ventajoso en el momento de competir en suelos con limitaciones de este elemento, y se identificaron genes asociados a la biosíntesis de auxinas que ayudan a la producción de ácido indolacético a partir del precursor triptófano (Chubatsu et al., 2012; Garrity et al., 2005; Pedrosa et al., 2011).



Metabolismo

El cultivo *in vitro* de *Herbaspirillum* se realiza en un medio semisólido libre de nitrógeno y con bajas tensiones de oxígeno. Los medios más reportados para su aislamiento son JNFB y NFB, los cuales contienen, como única fuente de carbono, ácido málico; no obstante, *Herbaspirillum* tiene la versatilidad de utilizar varias fuentes de carbono, incluyendo ácidos orgánicos como el pirúvico, el succínico y el fumárico. La fijación de nitrógeno de *Herbaspirillum* ocurre bajo condiciones microaerobias y es estrechamente regulada por compuestos de nitrógeno, tanto a nivel de síntesis como de actividad. *Herbaspirillum seropedicae* puede asimilar o desasimilar nitrato a nitrito bajo limitación de oxígeno, pero sin crecimiento anaeróbico dependiente de nitrato (Gu & Mitchell, 2006).



Potencial para su uso en agricultura sostenible

Herbaspirillum sp. es un microorganismo muy versátil metabólicamente, y posee varios mecanismos asociados a la promoción del crecimiento vegetal, lo que lo hace un gran candidato para su uso en cultivos agrícolas. Estudios en diferentes especies vegetales, particularmente gramíneas, han demostrado resultados relevantes.

En AGROSAVIA se han llevado a cabo varios estudios con pasturas en sistemas silvopastoriles, utilizando Herbaspirillum sp. como un potencial microorganismo promotor de crecimiento asociado a la actividad de solubilización de fósforo, y se ha evidenciado una mejora en la calidad del forraje.



Microorganismos que forman estructuras especializadas: rizobios

La mayor parte de las especies de rizobios se encuentran agrupadas en la clase Alphaproteobacteria, y algunas otras especies no canónicas se encuentran en la clase Betaproteobacteria.

Debido a su importancia agrícola, este grupo de microorganismos ha sido ampliamente estudiado, y hoy en día provee uno de los mejores ejemplos a nivel molecular de los mecanismos que involucran una relación de simbiosis en la naturaleza. Esta simbiosis se basa en la formación de una estructura vegetal especializada denominada *nódulo*, la cual se localiza en las raíces de las plantas, aunque en algunas ocasiones se ha hallado asociada también a sus tallos. Esta estructura proporciona un ambiente privilegiado para el crecimiento de las bacterias, puesto que provee protección en condiciones medioambientales adversas y un suministro ilimitado de nutrientes provenientes de la planta; en contraprestación, la bacteria provee una fuente ininterrumpida de nitrógeno, el cual se adquiere mediante la fijación biológica de nitrógeno molecular (N_2) (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995).

Rizobios

Los *rizobios* son microorganismos fijadores de nitrógeno capaces de formar una estructura especializada denominada *nódulo* con plantas leguminosas. La fijación de nitrógeno, no obstante, solamente puede ocurrir con el establecimiento de la simbiosis, cuando las células bacterianas se diferencian en bacteroides (Compant et al., 2010). El aislamiento de rizobios en laboratorio, por lo tanto, debe hacerse a partir de nódulos en un medio de cultivo que contenga nitrógeno en forma de sulfato de amonio, por ejemplo (Figura 2.5).

- **Figura 2.5.** Descripción macroscópica de rizobios. *a.* Colonias de *Bradyrhizobium* sp. en medio YMA con rojo Congo; *b.* Colonia de *Rhizobium* sp. en medio YMA con rojo Congo.

Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



El proceso de establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa ha sido estudiado en detalle, e involucra complejos procesos de quimiotaxis, señalización y diferenciación celular.

Primero, la planta atrae a los rizobios por medio de los exudados radiculares, los cuales contienen fuentes de carbono que los rizobios pueden utilizar. Después, la planta secreta compuestos flavonoides, los cuales son específicamente detectados por la bacteria e inducen la formación del factor *Nod* por los rizobios. El factor *Nod* es un lipopolisacárido formado por subunidades de N-acetilglucosamina modificadas con cadenas lipídicas y que se encuentra codificado por los genes *nod*. La percepción del factor *Nod* por la planta conlleva a cambios en los pelos radiculares, los cuales permiten la invasión del rizobio. En algunos casos, la invasión también se puede dar a través de lesiones en la epidermis vegetal. Una vez que los rizobios han entrado a la planta, empiezan a dividirse e invadir el tubo de infección. Al mismo tiempo, el proceso de desarrollo del nódulo inicia en el córtex de la raíz, y eventualmente los rizobios son capaces de invadir el citoplasma de las células del nódulo, donde ocurre la diferenciación en bacteroides. Los rizobios diferenciados en bacteroides son capaces de fijar nitrógeno molecular, como se describió anteriormente. La interacción entre rizobios y leguminosas, que resulta en la formación del nódulo, es estrictamente mutualista. La bacteria le provee a la planta una fuente directa de nitrógeno, y, en contraprestación, la planta le provee carbono y energía en forma de ácidos dicarboxílicos (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995).

La mayor parte de los rizobios se encuentra dentro de la clase Alphaproteobacteria y el orden Rhizobiales. Un total de seis géneros de rizobios se han descrito dentro de Alphaproteobacteria: *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Alorhizobium*, *Azorhizobium* y *Rhizobium*, los cuales poseen propiedades metabólicas diferentes, pero comparten su capacidad simbiótica. En los últimos años, no obstante, se han encontrado ejemplos de rizobios que no caben dentro del orden Rhizobiales o dentro de la descripción convencional de este grupo; algunos de ellos, por ejemplo, se han encontrado dentro de los géneros *Burkholderia* y *Pantoea*. Se cree que esto se debe a la transferencia horizontal de genes entre Rhizobiales y bacterias de otros géneros. En estas especies, los módulos de genes requeridos para el establecimiento de simbiosis se pueden encontrar alojados en plásmidos conjugativos (Brenner et al., 2005).



Filogenética y cromosoma

Los rizobios, como grupo, exhiben genomas de gran tamaño (5-10 Mb) en comparación con otras bacterias, lo que puede estar asociado con la amplia variedad de nichos en los que los rizobios son encontrados y con los procesos de infección del huésped y de diferenciación dentro del nódulo. Como se discutirá más adelante, los rizobios suelen ser capaces de usar una amplia diversidad metabólica, lo que les permite usar varias fuentes de carbono y nitrógeno, incluso en condiciones de baja disponibilidad. Dentro de sus genomas, muchos de los genes están dedicados al transporte, la regulación y el metabolismo; por ejemplo, algunos rizobios pueden contener más de 150 transportadores dependientes de ATP (en comparación con los cerca de 50 en *Escherichia coli*), lo que les permite usar un amplio rango de nutrientes en ambientes oligotróficos (Wang et al., 2019).

Adicionalmente, pueden contener uno o varios plásmidos, los cuales oscilan dramáticamente en tamaño, y pueden contener (o no) genes *core* (comunes entre un conjunto de genomas). *Sinorhizobium meliloti*, por ejemplo, contiene dos plásmidos: pSymA y pSymB, los cuales se conocen como megaplásmidos, con tamaños de 1,4 Mb y 1,7 Mb, respectivamente. El plásmido pSymA contiene los genes requeridos para la fijación biológica de nitrógeno y para la elaboración del factor *Nod*, mientras que pSymB contiene los genes requeridos para la infección del huésped y otros esenciales para el crecimiento de *S. meliloti* (Jiménez-Zurdo et al., 2020). En contraste, en los rizobios del género *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*, los genes de simbiosis se encuentran alojados en el cromosoma.

Los plásmidos que codifican proteínas de simbiosis son transferibles y, por tanto, pueden ser movilizados a otros microorganismos mediante conjugación. De la misma manera, los genes cromosomales de simbiosis y fijación de nitrógeno en algunas bacterias, como *Mesorhizobium*, pueden ser transferidos horizontalmente debido a que se encuentran localizados dentro de *elementos integrativos-conjugativos*. Estos elementos genéticos se consideran elementos movilizables puesto que se pueden escindir del cromosoma, circularizar y transferir a recipientes apropiados. Esta movilización es posible debido a que estos elementos contienen genes que codifican para

el sistema de secreción tipo IV, el cual permite la transferencia horizontal por conjugación. Además de genes de transferencia, estos elementos integrativos-conjugativos contienen otros genes (como los de simbiosis) que pueden proporcionar una ventaja competitiva tanto a la cepa donadora como a la receptora. En algunas especies, el proceso de transferencia puede ser inducido por señales específicas en los exudados radiculares o por *quorum sensing* (Wakimoto et al., 2020).



Metabolismo

El metabolismo en rizobios puede estudiarse desde dos diferentes ángulos. Primero, cuando se encuentran en la rizósfera, como microorganismos de vida libre, y segundo, cuando residen dentro del nódulo y están diferenciados en bacteroides. Este paralelo es posible porque los programas celulares de los rizobios en ambos estadios son remarcablemente diferentes. En el suelo, los rizobios habitan un ambiente oligotrófico, con gradientes de oxígeno y pH, y son biológicamente diversos. Además, allí la lucha por un nicho que provea las condiciones adecuadas para su proliferación es feroz, por lo que una capacidad metabólica amplia resulta ser una ventaja competitiva. Eso hacen los rizobios: son capaces de emplear una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, lo que les permite proliferar y eventualmente alcanzar la raíz para iniciar el complejo proceso de infección y simbiosis. En contraste, la vida dentro del nódulo es altamente privilegiada. La planta les provee a las bacterias una fuente casi ilimitada de carbono en forma de ácidos orgánicos, y la bacteria, ahora diferenciada, tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo que le provee una fuente ilimitada de este elemento; además, tanto los gradientes químicos y físicos, tan comunes en el suelo, como la competencia con otros microorganismos desaparecen.

En general, los rizobios tienen la capacidad de metabolizar un amplio espectro de fuentes de carbono y nitrógeno, pero, como categoría, tienen representantes en al menos ocho diferentes géneros bacterianos. Como se mencionó antes, seis géneros se encuentran en la clase Alphaproteobacteria, y dos, en la clase Betaproteobacteria. La capacidad metabólica, por tanto, difiere significativamente entre los miembros de los rizobios. Uno de los ejemplos más relevantes de esta diversidad es dado por

algunos miembros de *Bradyrhizobium* que pueden realizar fotosíntesis, y otro ejemplo está en *Azorhizobium*, el cual puede fijar nitrógeno como organismo de vida libre (Brenner et al., 2005).

Tradicionalmente, los rizobios se han clasificado, con base en su velocidad de crecimiento, como rizobios de crecimiento rápido, intermedio y lento (Wang et al., 2019). Si bien estas diferencias en la velocidad de crecimiento no se asocian con su potencial para establecer simbiosis, sí tienen implicaciones importantes en la producción biotecnológica de productos a base de estos microorganismos. En general, el aislamiento de los rizobios se realiza en un medio de cultivo que contiene manitol como fuente de carbono, aunque estos organismos son generalmente versátiles y pueden crecer a expensas de otras fuentes de carbono. En la producción de inoculantes, incluso subproductos industriales pueden ser usados para promover el crecimiento de estos microorganismos. Los rizobios son generalmente aerobios, pero el hecho de que la tensión de oxígeno en el nódulo sea baja parece sugerir que condiciones de microaerofilia también permiten el crecimiento de este grupo (Wang et al., 2019). Adicionalmente, algunas especies pueden emplear nitrato como aceptor final de electrones, y, por lo tanto, algunos rizobios son anaerobios facultativos.



Potencial para su uso en agricultura sostenible

Entre todos los géneros de PGPB, los rizobios ocupan una posición prominente, debido a su indiscutible potencial como biofertilizantes, pues no solamente son capaces de formar una estructura especializada que provee a las plantas una fuente ilimitada de nitrógeno, sino que también pueden ser usados en otros cultivos debido a sus cualidades de promoción del crecimiento, incluyendo la solubilización de fosfatos y la producción de ácido indolacético, entre otras, y al hecho de que no son patógenos de humanos. Dado que su asociación con leguminosas es específica, la inoculación temprana de las plantas garantiza casi completamente el éxito de la infección y, por tanto, sus efectos benéficos. Adicionalmente, el grupo de las leguminosas incluye una vasta variedad de plantas de alta importancia económica y nutricional, lo que



hace a este grupo de plantas y a su interacción con rizobios particularmente relevantes. Como se mencionó anteriormente, los requerimientos nutricionales de los rizobios son simples, por lo que, de forma general, este grupo de bacterias es fácil de producir a gran escala. Una de las limitaciones, no obstante, es la velocidad de crecimiento de algunas especies, pues, en cultivo líquido, puede tomar cerca de una semana; sin embargo, la continua búsqueda de nuevas especies, así como la evaluación de nuevas técnicas de crecimiento y aditivos, prometen reducir estos tiempos.

En la Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes de AGROSAVIA se almacena una amplia colección de rizobios con diferentes especificidades de asociación. Estos han sido empleados para la fertilización de cultivos de consumo humano, como frijol, lenteja o arveja, entre otros; para cultivos de consumo animal, como alfalfa o trébol, y para la implementación de los elementos arbóreos en sistemas silvopastoriles, como leucaena o acacia. También se han logrado algunos avances en su producción masiva, incluyendo su producción a gran escala y su almacenaje a largo plazo. Por muchos años, AGROSAVIA ha comercializado productos a base de rizobios para su aplicación en diferentes cultivos (Rhizobiol Arveja); sin embargo, la investigación técnica continúa para su expansión a otros cultivos y una producción más eficiente (Rojas T. et al., 2009). Así, recientemente, el uso de rizobios ha sido expandido a cultivos de gramíneas en los que, a pesar de no establecerse una relación simbiótica como la previamente descrita, el efecto positivo de su aplicación es también indudable.

Mecanismos de interacción planta-microbio: lecciones desde el patosistema modelo de tomate-*Pseudomonas syringae*

En el curso de la evolución, las plantas han desarrollado y usado distintas formas de defensa ante el ataque de los microorganismos. Por ejemplo, la presencia de paredes celulares gruesas, de una capa cerosa de cutícula o de una capa externa de corteza que cubre el exterior del tallo es una estrategia de protección física que previene la entrada de microorganismos al interior de las células vegetales. No obstante, cuando un microorganismo atraviesa dichas barreras físicas, se activan, por parte de la planta, mecanismos de defensa adicionales llamados PTI (*pattern-triggered immunity*) y ETI (*effector-triggered immunity*) (Dangl & Jones, 2001; Jones & Dangl, 2006).

El proceso de reconocimiento inicial de los microorganismos por parte de las plantas, en general, se da por la presencia de ciertas características moleculares de las bacterias que las plantas pueden detectar mediante proteínas receptoras localizadas en la superficie de las células vegetales. La proteína flagelina (una subunidad del flagelo en organismos con motilidad flagelar) (Felix et al., 1999), el factor de elongación EF-Tu (una proteína abundante requerida para el proceso de traducción) (Kunze et al., 2004), el peptidoglicano (un componente esencial de la pared celular bacteriana en la mayor parte de las bacterias) (Büttner, 2016) o la quitina fúngica (componente de la pared en hongos) (Ito et al., 1997) son solo algunos ejemplos de estos patrones moleculares asociados a microbios, que se conocen como MAMP (*microbe-associated molecular patterns*). Debido al alto nivel de conservación de dichas características, tanto en bacterias patógenas como en PGPB, su reconocimiento produce la activación de una respuesta basal o PTI, la cual se describe a continuación. Como resultado de la inducción de esta primera capa de defensa, se incrementa la producción de ROS y se activan las cascadas de señalización tipo quinasa, entre otras respuestas, que logran restringir el crecimiento de los microorganismos (Zipfel, 2014).

La PTI es un mecanismo de resistencia basal que provee una respuesta inmune robusta ante el ataque

de muchos microorganismos; no obstante, algunos microorganismos patógenos han evolucionado para reprimir la PTI. Su estrategia consiste en producir y secretar proteínas de virulencia llamadas *efectores* en el interior de la célula vegetal, a través del inyectosoma o sistema de secreción tipo III (Büttner, 2016). En respuesta, las plantas han desarrollado una segunda capa de defensa incorporando proteínas receptoras intracelulares, las cuales detectan la actividad de los efectores una vez que son translocados al interior de la célula huésped durante el proceso de infección. El reconocimiento del efector por parte del receptor intracelular lleva a la activación de la ETI, la cual se asocia con la muerte celular del tejido vegetal infectado, lo que impide la multiplicación del patógeno y la colonización del huésped (Jones & Dangl, 2006).

Gracias al descubrimiento del sistema de secreción tipo III en bacterias patógenas de plantas y animales, se ha podido determinar su importancia en la interacción bacteria-huésped. Un ejemplo ampliamente estudiado es la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) (Roine et al., 1997). *Pst* DC3000 es una de las cepas mejor caracterizadas debido a su capacidad para infectar a la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, así como al tomate (*Solanum lycopersicum*) (Preston, 2000). *Pst* DC3000 cuenta con un total de 36 efectores, dentro de los cuales AvrPto es uno de los más estudiados (Buell et al., 2003; Ronald et al., 1992). En el momento de la infección, el sistema de secreción tipo III moviliza el efector AvrPto desde el citoplasma de la bacteria hacia el citoplasma de la célula vegetal huésped, donde el efector es detectado por el receptor intracelular Pto (Martin et al., 1993). La interacción proteína-proteína entre AvrPto y Pto recluta la proteína Prf, la cual reconoce este complejo de proteínas y cuya presencia confiere resistencia ante cepas de *Pst* que expresen el efector AvrPto (Pedley & Martin, 2003; Salmeron et al., 1996). Es así como *Pst* y *S. lycopersicum* conforman un patosistema que ha permitido el estudio de la especificidad huésped-patógeno.



Al igual que *Pst*, las PGPB, como *Rhizobium*, emplean el sistema de secreción tipo III para infectar a su planta hospedera (Schmeisser et al., 2009). Sin embargo, a diferencia de la actividad parasítica de *Pst* sobre el tomate, las PGPB interactúan de manera mutualista con el huésped, lo que indica la presencia de mecanismos de supresión de la respuesta inmune de la planta, y esto les permite a las PGPB evadir el reconocimiento por parte de la PTI e infectar exitosamente a su huésped. Por esta razón, la interacción planta-rizobio se ha establecido como un modelo para estudiar las estrategias empleadas por este endosimbionte para colonizar plantas leguminosas.

Las bacterias PGPB poseen ciertos patrones moleculares, como la presencia de flagelina y la secreción de exopolisacáridos (EPS) o lipoquitooligosacáridos (LCO), los cuales están asociados con la evasión de la detección de la bacteria por parte de la planta (Liang et al., 2013; Poole et al., 2018). Por ejemplo, la PGPB *Burkholderia phytofirmans*, cuya flagelina contiene el patrón molecular flg22, reconocido por la proteína receptora del huésped FLS2, provoca una respuesta inmune débil en comparación con la respuesta de otras bacterias fitopatógenas en plantas de mora (Trdá et al., 2014). Por otro lado, la percepción de *Rhizobium* por parte de las plantas leguminosas está asociada a la presencia de EPS. Con la identificación de la proteína receptora Epr3 en la planta leguminosa silvestre *Lotus japonicus*, se ha podido establecer que la unión de las moléculas de EPS con el receptor Epr3 contribuye a la supresión de la reacción inmune (Kawaharada et al., 2015). Por último, los LCO o factores *Nod* sintetizados por *Rhizobium* han demostrado tener la capacidad de bloquear la activación

de PTI en plantas como *Arabidopsis thaliana*, tomate, maíz y soya (Liang et al., 2013). En conclusión, las PGPB han desarrollado estrategias efectivas para modular la amplitud de la respuesta inmune en el nivel de la PTI, con el fin de asegurar un proceso de infección exitoso en las plantas.

El análisis de genomas y estudios de mutagénesis en rizobios han revelado la presencia de genes codificantes para el sistema de secreción tipo III. Si bien esta maquinaria es considerada exclusiva para patógenos de plantas y animales, su presencia en PGPB como *Rhizobium* sugiere una función en la interacción simbiótica entre la bacteria y la planta leguminosa (Marie et al., 2001; Tampakaki, 2014). Algunas otras bacterias en las que también se han reportado sistemas de secreción son *Sinorhizobium fredii* NGR234 (Viprey et al., 1998), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Krause et al., 2002) y *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Okazaki et al., 2010). En *Rhizobium*, los genes codificantes del sistema de secreción se encuentran presentes en el plásmido pSym y se expresan en respuesta a la percepción de flavonoides liberados por la raíz de la planta (Tampakaki, 2014). No obstante, la presencia del sistema de secreción tipo III en algunos rizobios no indica que esta maquinaria sea ubicua entre ellos. Adicionalmente, la presencia de este sistema de secreción no se correlaciona con el rango hospedero de la bacteria simbiótica o con que dicha maquinaria sea funcional y secrete proteínas de virulencia durante el proceso simbiótico (Marie et al., 2001), de manera que aún se desconoce con exactitud cuál es la contribución del sistema de secreción tipo III en la simbiosis *Rhizobium*-planta.

Avances en el estudio de las proteínas efectoras, el sistema de secreción tipo III y su papel en la simbiosis han sido ampliamente reportados en las cepas *S. fredii* y *M. loti* NGR234. Las proteínas translocadas por el sistema de secreción tipo III en *Rhizobium* se han denominado *nops* (*nodulation outer proteins*), siguiendo el modelo de nomenclatura utilizado en *Yersinia* (Marie et al., 2001). Dichas proteínas han mostrado tener un efecto benéfico e inducir genes relevantes en la simbiosis con el objetivo de suprimir la respuesta inmune de la planta y de incrementar la eficiencia de nodulación. Además del transporte de las *nops* por parte del sistema de secreción tipo III de *Rhizobium*, se ha reportado la presencia de proteínas efectoras pertenecientes a las familias YopT y YopJ, las cuales tienen ortólogos en las bacterias *Erwinia* y *Pst* (Hotson & Mudgett, 2004; Marie et al., 2001). No obstante, a diferencia del caso de las bacterias fitopatógenas, el sistema de secreción tipo III en *Rhizobium* no es esencial para infectar la célula hospedera, ya que existen cepas capaces de formar nódulos en raíces de plantas leguminosas en ausencia de dicho sistema, aunque estudios con cepas de *Rhizobium* que sí expresan este sistema han demostrado que su presencia tiene un efecto benéfico en la formación de nódulos en distintas especies de plantas leguminosas (Tampakaki, 2014).

La secuenciación de genomas de bacterias simbióticas ha detectado la presencia de sistemas de secreción, así como de proteínas efectoras ortólogas, para bacterias patógenas (Nelson & Sadowsky, 2015), en otros modelos de simbiosis, como la interacción entre *Sinorhizobium* spp. y *Medicago* spp. A diferencia de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* posee un sistema de secreción tipo IV, el cual es usado por las bacterias patógenas para translocar moléculas de ADN, toxinas y proteínas efectoras (Berger & Christie, 1994). La secreción de estas moléculas hacia las células vegetales es clave para iniciar el proceso de infección en el hospedero.

Estudios de genética inversa han identificado genes putativos codificantes para proteínas efectoras en cepas de *Sinorhizobium meliloti* y *Sinorhizobium medicae*; un ejemplo es la proteína efectora TfeA, inyectada por el sistema de secreción tipo IV de *Sinorhizobium* spp. Análisis del impacto de un mutante en TfeA en la cepa de *Sinorhizobium* spp. establecieron una relación directamente proporcional entre la ausencia de esta proteína efectora y la disminución en el número de nódulos formados durante la simbiosis

con *Medicago truncatula* (Nelson et al., 2017). Por otro lado, estudios del efecto de la delección del sistema de secreción tipo IV en *Sinorhizobium* spp. establecieron una alta correlación entre su ausencia y la baja competitividad en la formación de nódulos con respecto a la cepa silvestre. Similarmente, este fenotipo ha sido observado en otros modelos de interacción planta-bacteria. Por ejemplo, la mutación del sistema de secreción tipo IV en *M. loti* o alguno de sus efectores ocasionó una reducción en el número de nódulos formados por su planta simbiótica *Lotus corniculatus* (Hubber et al., 2004). Así pues, en conjunto, estos resultados muestran cómo el sistema de secreción tipo IV o las proteínas efectoras translocadas a través de este modulan la interacción planta-bacteria durante la simbiosis.

En resumen, hay muchos factores que contribuyen en la interacción planta-bacteria. A lo largo de este capítulo hemos mostrado distintos escenarios en los que la presencia de proteínas efectoras o del sistema de secreción es requerida para la colonización de la planta huésped. No obstante, hay excepciones en las que, aun en ausencia de estos, la bacteria logra colonizar la planta e incluso generar un mayor número de nódulos. Estas diferencias en la respuesta presentada se deben a la presencia de genes de resistencia en las plantas, los cuales, al reconocer los MAMP o las proteínas efectoras translocadas por el sistema de secreción, inducen una respuesta inmune tipo PTI o ETI, respectivamente, con la que previenen la formación de nódulos en la planta (Hubber et al., 2004; Yasuda et al., 2016).

Finalmente, el estudio de la función de las proteínas efectoras transportadas por los sistemas de secreción en PGPB proporcionará más información sobre cómo las rizobacterias se comunican con el huésped para alterar la función de las células vegetales e incrementar la formación de nódulos. Aún quedan muchos interrogantes por resolver en la intersección de la microbiología de suelos y la fitopatología molecular. Preguntas enfocadas en conocer cómo las plantas pueden atraer microorganismos benéficos y al mismo tiempo evitar ser colonizadas por microorganismos patógenos presentes en el suelo, o cómo las interacciones microbio-microbio afectan las interacciones planta-microbio, abarcan áreas de investigación de interés actual en el campo de la biología molecular de plantas y microbios.



Perspectivas

El avance en las técnicas de secuenciación y edición génica prometen revolucionar diferentes campos de la biología, incluyendo la salud humana y la producción vegetal, ya sea mediante la modificación genética de las especies o mediante el mejoramiento de sus interacciones con sus microbiomas.

La composición de estos microbiomas puede desempeñar un papel determinante en la salud del hospedero, humano y vegetal, y por tanto el entendimiento de sus funciones e interacciones es clave para su uso racional. A continuación se presentan algunas de las perspectivas en el uso e implementación de tecnologías basadas en PGPB.

Biología mecanística en PGPB e ingeniería biomolecular

Aunque muchos de los mecanismos asociados a la promoción del crecimiento vegetal han sido descifrados, todavía muchas preguntas quedan por ser respondidas, algunas de las cuales están enfocadas en las bases moleculares de la interacción entre la planta y los microorganismos. Por ejemplo, ¿cómo la planta y los microorganismos se comunican?, ¿cómo la composición de los exudados conlleva cambios particulares en el perfil de expresión génica de las bacterias?, ¿cómo se da el proceso de colonización radicular en especies endófitas?, ¿cómo el microorganismo previene la acción del sistema inmune de la planta? En realidad, muchas de estas lecciones pueden ser extraídas del conocimiento existente de la interacción entre planta y fitopatógenos, como se describió previamente, pero más investigación es requerida para descifrar estas vías moleculares en organismos benéficos.

El conocimiento de los detalles moleculares que gobiernan la interacción entre PGPB y la planta es esencial. Primero, es crítico conocer las señales que emite la planta y la bacteria sensa para lograr la primera interacción. Estos mecanismos, por ejemplo, son bien entendidos en los rizobios, en los que los flavonoides exudados por la planta llevan a la síntesis bacteriana del factor *Nod*; la secreción de *Nod*, posteriormente, resulta en la modificación del perfil génico de la planta y en la formación de la estructura especializada conocida como *nódulo*. Si otros mecanismos asociados están involucrados en el establecimiento de otras interacciones planta-microorganismo, aún deben ser investigados con más detalle. Segundo, en el caso de que estos organismos sean capaces de invadir el tejido radicular, la identificación de las señales moleculares que le permiten al microorganismo ocultarse del sistema inmune de la planta es clave. Por ejemplo, las plantas pueden identificar la presencia de la proteína flagelina *flg22*; la existencia de variaciones en esta proteína, la cual es altamente conservada, o la sustitución de esta por otra proteína homóloga podrían evitar el reconocimiento por parte del huésped y, por tanto, favorecer el establecimiento de la interacción. Un conocimiento más profundo de estos detalles moleculares podría favorecer la selección de variantes microbianas con mayor potencial y, por tanto, el diseño de inoculantes más eficientes.

Adicionalmente, es importante entender los mecanismos que regulan algunas de las capacidades de promoción de crecimiento vegetal. Si bien algunos mecanismos, como la fijación de nitrógeno —simbiótica y asimbiótica—, son entendidos en alto detalle, otros, como la solubilización de fósforo —inorgánico u orgánico—, la producción de moléculas tipo fitohormona o los mecanismos a través de los cuales las bacterias protegen a las plantas de algunos estreses abióticos, como salinidad o sequía, son entendidos en menor grado. Con respecto a la solubilización de fósforo, es importante entender si en algunas especies el proceso se da de forma inducible, lo que se puede lograr mediante 1) el análisis de transcriptomas bacterianos en diferentes condiciones, 2) el uso de *screenings* insesgados de mutantes bacterianos generados con transposones o la tecnología CRISPR-Cas, 3) y el uso de herramientas tradicionales de biología molecular. El entendimiento de las vías moleculares asociadas puede permitir la selección de mejores cepas o el mejoramiento de las ya existentes. En el caso de la síntesis de compuestos tipo fitohormona, es importante identificar los genes asociados y su regulación, por medio de una estrategia similar a la

descrita para la solubilización de fósforo. Finalmente, es necesario entender la forma como las bacterias influyen positivamente sobre plantas que crecen en presencia de estreses abióticos debido a la disminución en el tamaño de las áreas cultivables por deforestación o cambio climático, y aunque los resultados de AGROSAVIA y otros grupos de investigación sugieren un papel fundamental de las bacterias en la prevención del estrés hídrico, los mecanismos involucrados aún no son entendidos completamente.

En resumen, un mayor conocimiento de la biología básica nos permitirá seleccionar mejores microorganismos y diseñar inoculantes más eficientes para diferentes cultivos, lo cual, junto al uso de herramientas integradas de manejo de los cultivos, puede impactar en los costos económicos de producción y, por tanto, en la competitividad del sector agrícola.

Diseño de comunidades bacterianas sintéticas

En el suelo, al igual que en otros ecosistemas, la competencia por nutrientes y nichos ecológicos es feroz. Para ganar acceso a recursos y colonizar un nicho, algunos microorganismos sintetizan antibióticos, catabolizan fuentes inusuales de carbono y otros nutrientes, respiran aceptores de electrones alternativos, usan estrategias sofisticadas para la colonización del hospedero, etc., y por ello no solo sus propiedades como PGPB pueden ser consideradas en el proceso de selección de inoculantes biológicos. Es por ello por lo que, en ocasiones, el efecto benéfico de estos organismos debe ser evaluado primero *in vivo*, para tomar decisiones más informadas acerca de su potencial para promover el crecimiento de especies vegetales.

Diversos estudios del microbioma de las plantas han revelado una diversidad de especies asociadas a la rizósfera más grande de lo que se estimaba, lo cual no solo refleja la complejidad de las interacciones que ocurren en este ecosistema, sino que también evidencia los retos que una bacteria con potencial demostrado para la promoción del crecimiento tiene que sobrellevar para ejercer un efecto sobre la planta. Adicionalmente, este contexto ilustra que la modulación de comunidades naturales o el diseño de comunidades sintéticas pueden garantizar una mayor probabilidad de éxito, puesto que suponen una mayor capacidad de colonización del nicho y, por tanto, de



efecto sobre la planta. Los aspectos técnicos para la elaboración de un inoculante biológico basado en el manejo de la comunidad microbiana de la rizósfera requieren, no obstante, de mucha investigación, puesto que el número de posibles interacciones bipartitas (en el caso mínimo) de un número n de microorganismos crece exponencialmente. Alternativamente, el uso de modelos estadísticos puede poner en evidencia el número mínimo de microorganismos de una colección de microorganismos que se requieren para afectar positivamente el crecimiento de las plantas. En todo caso, el entendimiento y la modelación de las complejas relaciones que ocurren en estos ambientes complejos permitirán diseñar inoculantes con precisión y, así, reducir los costos económicos y ambientales asociados al uso indiscriminado de agroquímicos.

El diseño de comunidades sintéticas puede ser elaborado de forma racional y podría involucrar la evaluación de las combinaciones factoriales de microorganismos con capacidad comprobada para la promoción de crecimiento vegetal con mecanismos complementarios. Es decir, se podría evaluar el uso de microorganismos capaces de modular los niveles de nitrógeno o fósforo disponibles en el suelo, sintetizar hormonas o proteger a la planta de patógenos, por ejemplo. La evaluación de estas capacidades requiere de herramientas en biología molecular que permitan aislar los mecanismos asociados y así poder seleccionar combinaciones sinérgicas.

Aún más, el conocimiento generado relacionado con el microbioma de las plantas sugiere que más géneros microbianos deben ser considerados en el proceso de aislamiento, de modo que el inoculante pueda representar de manera más cercana la composición original del microbioma de la planta. Futuras investigaciones permitirán determinar la importancia del microbioma inexplorado.

Referencias

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alves, G. C., Videira, S. S., Urquiaga, S., & Reis, V. M. (2015). Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. *Plant and Soil*, 387(1-2), 307-321. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>
- Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A., & Döbereiner, J. (2015). *Azospirillum*. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00891>
- Batista, B. D., Lacava, P. T., Ferrari, A., Teixeira-Silva, N. S., Bonatelli, M. L., Tsui, S., Mondin, M., Kitajima, E. W., Pereira, J. O., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2018). Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological Research*, 206, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>
- Becking, J.-H. (1981). The family *Azotobacteraceae*. En M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, & H. G. Schlegel (eds.), *The prokaryotes* (pp. 795-817). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_66
- Berger, B. R., & Christie, P. J. (1994). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *Journal of Bacteriology*, 176(12), 3.646-3.660. <https://doi.org/10.1128/JB.176.12.3646-3660.1994>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (eds.). (2005). *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (vol. 2, parte B). Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., ... Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10.181-10.186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731982100>
- Büttner, D. (2016). Behind the lines – actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), 894-937. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw026>
- Camelo-Rusique, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F., & Bonilla-Buitrago, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nieves, S., de Carlan, C. L. N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., de Souza, E., Díaz Zorita, M., de-Bashan, L., & Mora, V. (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, 56, 461-479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Cassán, F., & Díaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>
- Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y., Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C., & Zeng, G. (2010). Application of plant growth-promoting endophytes (PGE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology*, 46(3), 383-389. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.003>
- Chubatsu, L. S., Monteiro, R. A., de Souza, E. M., de Oliveira, M. A. S., Yates, M. G., Wasseem, R., Bonatto, A. C., Huergo, L. F., Steffens, M. B. R., Rigo, L. U., & Pedrosa, F. de O. (2012). Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, 356(1-2), 197-207. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0819-6>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6.839), 826-833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (vol. 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Domingues Duarte, C. F., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
- Dominguez-Núñez, J. A., Delgado-Alvez, D., Berrocal-Lobo, M., Anriquez, A., & Albanesi, A. (2014). Controlled-release fertilizers combined with *Pseudomonas fluorescens* rhizobacteria inoculum improve growth in *Pinus halepensis* seedlings. *IForest*, 8, 12-18. <https://doi.org/10.3832/ifer1110-007>
- Dong, X., Hong, Q., He, L., Jiang, X., & Li, S. (2008). Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(3), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.011>

- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (eds.). (2006). *The prokaryotes* (vol. 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5>
- Elmerich, C., & Newton, W. E. (eds.). (2007). *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3546-2>
- Erturk, Y., Ercisli, S., Haznedar, A., & Cakmakci, R. (2010). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research*, 43(1), 91-98. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602010000100011>
- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 170, artículo 105860. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860>
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18(3), 265-276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x>
- Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment*, 682, 779-799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>
- Ferreira, D. A., da Silva, T. F., Pylro, V. S., Salles, J. F., Andreote, F. D., & Dini-Andreote, F. (2020). Soil microbial diversity affects the plant-root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01502-z>
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). Class I. Alphaproteobacteria class. nov. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (eds.), *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (vol. 2, parte C, pp. 1-574). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5_1
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, artículo 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Govarthanan, M., Kamala-Kannan, S., Kim, S. A., Seo, Y.-S., Park, J.-H., & Oh, B.-T. (2016). Synergistic effect of chelators and *Herbaspirillum* sp. GW103 on lead phytoextraction and its induced oxidative stress in *Zea mays*. *Archives of Microbiology*, 198(8), 737-742. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1231-7>
- Gu, J.-d., & Mitchell, R. (2006). *The Prokaryotes*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9>
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Klopper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914. <https://doi.org/10.1139/m97-131>
- Heredia-Acuña, C., Almaraz-Suarez, J. J., Arteaga-Garibay, R., Ferrera-Cerrato, R., & Pineda-Mendoza, D. Y. (2018). Isolation, characterization and effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on pine seedlings (*Pinus pseudostrubus* Lindl.). *Journal of Forestry Research*, 30, 1.727-1.734. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0723-5>
- Hotson, A., & Mudgett, M. B. (2004). Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: Identification of plant targets and activation of innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 384-390. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.003>
- Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. T., Hooykaas, P. J. J., & Ronson, C. W. (2004). Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, 54(2), 561-574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04292.x>
- Ito, Y., Kaku, H., & Shibuya, N. (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *The Plant Journal*, 12(2), 347-356. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12020347.x>
- Jiménez-Zurdo, J. I., Martínez-Abarca, F., Cobo-Díaz, J. F., López-Contreras, J. A., Fernández-López, M., & Toro, N. (2020). Complete genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* strain AK21, a salt-tolerant isolate from the Aral sea Region. *Microbiology Resource Announcements*, 9(2), 18-19. <https://doi.org/10.1128/mra.01432-19>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7.117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszyński, A., Carlson, R. W., Thygesen, M. B., Sandal, N., Asmussen, M. H., Vinther, M., Andersen, S. U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K. J., Ronson, C. W., Blaise, M., Radutoiu, S., & Stougaard, J. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*, 523(7.560), 308-312. <https://doi.org/10.1038/nature14611>
- Krause, A., Doerfel, A., & Göttfert, M. (2002). Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(12), 1.228-1.235. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.12.1228>
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3.496-3.507. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>
- Liang, Y., Cao, Y., Tanaka, K., Thibivilliers, S., Wan, J., Choi, J., Kang, C. H., Qiu, J., & Stacey, G. (2013). Nonlegumes respond to rhizobial *Nod* factors by suppressing the innate immune response. *Science*, 341(6.152), 1.384-1.387. <https://doi.org/10.1126/science.1242736>
- Marie, C., Broughton, W. J., & Deakin, W. J. (2001). Rhizobium type III secretion systems: Legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 336-342. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00182-5)

- Maroniche, G. A., García, J. E., Salcedo, F., & Creus, C. M. (2017). Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers. *Microbiological Research*, 195, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.009>
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., & Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262(5.138), 1.432-1.436. <https://doi.org/10.1126/science.7902614>
- Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Wasseem, R., Marin, A. M., Brusamarello-Santos, L. C. C., Schmidt, M. A., Tadra-Sfeir, M. Z., Pankievicz, V. C. S., Cruz, L. M., Chubatsu, L. S., Pedrosa, F. O., & Souza, E. M. (2012). *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, 356(1-2), 175-196. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>
- Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F. A., Estrada-Bonilla, G., Meneses, C. H. S. G., & Bonilla, R. R. (2020). Dry-Caribbean *Bacillus* spp. strains ameliorate drought stress in maize by a strain-specific antioxidant response modulation. *Microorganisms*, 8(6), artículo 823. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060823>
- Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Applied Soil Ecology*, 147, artículo 103367. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Nelson, M. S., Chun, C. L., & Sadowsky, M. J. (2017). Type IV effector proteins involved in the *Medicago-Sinorhizobium* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 28-34. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-16-0211-R>
- Nelson, M. S., & Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00491>
- Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Hashiguchi, M., Akashi, R., Göttfert, M., & Saeki, K. (2010). Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(2), 223-234. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-2-0223>
- Pedley, K. F., & Martin, G. B. (2003). Molecular basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 215-243. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.121602.143032>
- Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wasseem, R., Cruz, L. M., Ayub, R. A., Colauto, N. B., Fernandez, M. A., Fungaro, M. H. P., Grisard, E. C., Hungria, M., Madeira, H. M. F., Nodari, R. O., Osaku, C. A., Petzl-Erler, M. L., Terenzi, H., Vieira, L. G. E., Steffens, M. B. R., Weiss, V. A., Pereira, L. F. P., ... Souza, E. M. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, 7(5), artículo e1002064. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>
- Pedrosa, F. O., Oliveira, A. L. M., Guimarães, V. F., Etto, R. M., Souza, E. M., Furmam, F. G., Gonçalves, D. R. P., Santos, O. J. A. P., Gonçalves, L. S. A., Battistus, A. G., & Galvão, C. W. (2019). The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: A new alternative inoculant for maize. *Plant and Soil*, 451, 45-56. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>
- Peiffer, J. A., Romay, M. C., Gore, M. A., Flint-Garcia, S. A., Zhang, Z., Millard, M. J., Gardner, C. A. C., McMullen, M. D., Holland, J. B., Bradbury, P. J., & Buckler, E. S. (2014). The genetic architecture of maize height. *Genetics*, 196(4), 1.337-1.356. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159152>
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291-303. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- Praburaman, L., Park, S.-H., Cho, M., Lee, K.-J., Ko, J.-A., Han, S.-S., Lee, S.-H., Kamala-Kannan, S., & Oh, B.-T. (2017). Significance of diazotrophic plant growth-promoting *Herbaspirillum* sp. GW103 on phytoextraction of Pb and Zn by *Zea mays* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 3.172-3.180. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8066-2>
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: The right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263-275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., & He, S. Y. (1997). Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3.459-3.464. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3459>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Rojas-Tapias, D., Ortega Sierra, O., Rivera Botía, D., & Bonilla, R. (2015). Preservation of *Azotobacter chroococcum* vegetative cells in dry polymers. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 201-207. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-2.pacv>
- Rojas T., D. F., Garrido R., M. F., & Bonilla B., R. R. (2009). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(1), 70-80. https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num1_art:131

- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 129-139. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.etmp>
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Romero-Perdomo, F. A., Moreno-Galván, A., Camelo-Rusínque, M., & Bonilla, R. (2015). Efecto de la carragenina sobre *Azotobacter chroococcum* en semillas de algodón peletizadas con un fungicida. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 35(1), 29-32. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ranar/v35n1/v35n1a03.pdf>
- Ronald, P. C., Salmeron, J. M., Carland, F. M., & Staskawicz, B. J. (1992). The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *Journal of Bacteriology*, 174(5), 1.604-1.611. <https://doi.org/10.1128/JB.174.5.1604-1611.1992>
- Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E. D., Rommens, C. M. T., Scofield, S. R., Kim, H.-S., Lavelle, D. T., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (1996). Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell*, 86(1), 123-133. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80083-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80083-5)
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysiak, D., Bakkou, N., Le Quéré, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Röser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottschalk, G., Schmitz, R. A., Broughton, W. J., Perret, X., Strittmatter, A. W., & Streit, W. R. (2009). *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4.035-4.045. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-09>
- Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 47-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.39.1.47>
- Tampakaki, A. P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00114>
- Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S., & Poinssot, B. (2014). The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytologist*, 201(4), 1.371-1.384. <https://doi.org/10.1111/nph.12592>
- Tsavelkova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>
- Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124-142.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J., & Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1.381-1.389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00920.x>
- Wakimoto, T., Nakagishi, S., Matsukawa, N., Tani, S., & Kai, K. (2020). A unique combination of two different quorum sensing systems in the *-Rhizobium Cupriavidus taiwanensis*. *Journal of Natural Products*, 83(6), 1.876-1.884. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00054>
- Walters, W. A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J. G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., Shi, Q., Knight, R., del Rio, T. J., Tringe, S. G., Buckler, E. S., Dangl, J. L., & Ley, R. E. (2018). Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(28), 7.368-7.373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800918115>
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C., & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME Journal*, 11(7), 1.602-1.613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
- Wang, E. T., Tian, C. F., Chen, W. F., Young, J. P. W., & Chen, W. X. (eds.). (2019). *Ecology and evolution of rhizobia*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9555-1>
- Yasuda, M., Miwa, H., Masuda, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., & Okazaki, S. (2016). Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant and Cell Physiology*, 57(8), 1.791-1.800. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw104>
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345-351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>