

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE
PLANTAS DE YUCA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) SOMETIDAS A
ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO.**

**Diana marcela galindo espinal
Tatiana zapata gualtero**

**Director (a)
Alba Rocío Corrales Ducuara, Ph.D
Director (a)
Iván Darío Ocampo Ibáñez, Ph.D.**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2019**

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) SOMETIDAS A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO.

**Diana Marcela Galindo Espinal
Tatiana Zapata Gualtero**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de:
Microbióloga**

**Director (a):
Alba Rocío Corrales Ducuara, Ph.D.
Director (a):
Iván Darío Ocampo Ibáñez, Ph.D.**

**Línea de Investigación
Microbiología ambiental
Grupo de Investigación
(GIMIA)**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2019**

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	Producción de nuevo conocimiento	Diana M. Galindo Tatiana Zapata
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental	Apropiación social del conocimiento	USC
Social		
Cultural		

*Incluir los productos obtenidos derivados de la investigación como: apropiación social del conocimiento, generación de nuevo conocimiento entre otros.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) SOMETIDAS A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO.

Diana Marcela Galindo¹, Tatiana Zapata Gualtero¹, Iván Darío Ocampo¹, Alba Rocío Corrales¹.

¹Grupo de investigación en Microbiología, Industria y Medio Ambiente (GIMIA), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali, Colombia.

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una de las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Durante los últimos años su producción está siendo afectada debido a condiciones ambientales extremas. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son un tipo de bacteria que colonizan las raíces y establecen una relación simbiótica con la planta, favoreciendo su crecimiento y resistencia aún bajo condiciones de estrés abiótico. En el presente estudio se caracterizaron 124 aislados bacterianos procedentes de plantas de yuca *M. esculenta*, de los cuales se identificaron 26 rizobacterias aisladas en plantas sometidas a estrés por déficit hídrico por un periodo de 20 días. Los análisis de abundancia mostraron que los géneros que más predominan fueron: *Bacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Streptomyces*. Estos resultados son importantes para conocer las comunidades bacterianas asociadas al cultivo de yuca y su relación con la respuesta de las plantas sometidas a condiciones de estrés abiótico.

Palabras clave: *Manihot esculenta*; yuca; PGPR; Rizobacterias; déficit hídrico.

CHARACTERIZATION OF BACTERIA ASSOCIATED TO THE CURL OF YUCA PLANTS (*Manihot esculenta* Crantz) STRESSED SUBJECTS FOR WATER DEFICIT.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most important energy sources in the tropical and subtropical regions of the world. During the last years, its production has resulted in extreme environmental conditions. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are a type of bacteria that colonize the roots and a symbiotic relationship with the plant, favoring their growth and resistance even in conditions of abiotic stress. In the present study, 124 bacterial components of cassava plants *M. esculenta* are characterized, of which 26 rhizobacteria are identified in plants over a period of 20 days. The analyzes of the abundance of the most predominant genera are: *Bacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Streptomyces*. These results are important for bacterial communities such as cassava cultivation and its relationship with the response of plants to abiotic stress conditions.

Keywords: *Manihot esculenta*; cassava; PGPR; Rhizobacteria; water deficit.



1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*M. esculenta* Crantz), es una de las fuentes de energías más importantes en el mundo [1], especialmente en países tropicales y subtropicales de África, Asia y América Latina [2], [3]. Además, es considerada el cuarto producto básico más importante después del arroz, el trigo y el maíz, convirtiéndose en un alimento fundamental en la dieta de miles de personas en el mundo [3]. Este cultivo presenta alto rendimiento en comparación a otros cultivos de importancia económica, cuya producción puede estar afectada por condiciones ambientales adversas [4], estableciéndolo como un cultivo elite para la seguridad alimentaria [5].

El cultivo de la yuca presenta una gran adaptación a diferentes ambientes [1]. Entre los factores que afectan este cultivo, el déficit hídrico y la salinidad son los que causan pérdidas de alrededor de un 80% en producción [6], [7]. A nivel fisiológico el estrés por déficit hídrico afecta el cultivo de yuca disminuyendo la disponibilidad y transporte de nutrientes solubles como: nitrato, sulfato, Ca, Mg y Si [8]–[10], la producción de biomasa, nodulación y reducción en el desarrollo vegetativo [11]. Para mitigar el efecto a causa de la sequía en este cultivo, en los últimos años se han evaluado con base a parámetros fisiológicos, diferentes variedades de yuca que logran desarrollarse en ambientes extremos, lo que ha permitido establecer cultivares elite con gran capacidad de tolerar el déficit hídrico [4]. Estas variedades pueden modificar mecanismos fisiológicos como: retraso en el tiempo de floración, reducción de la tasa de transpiración, aumento de metabolitos primarios, secundarios, sistemas radiculares, regulación del desarrollo vegetativo mediado por hormonas y ajuste osmótico [12], [13]. Sin embargo, no se han podido implementar estas variedades en los programas de mejora en Colombia [14].

Además del desarrollo de variedades resistentes a ambientes extremos, en la naturaleza existen microorganismos que habitan la rizosfera y que pueden afectar positivamente a las plantas aun en condiciones de estrés abiótico [15]. Estos microorganismos pueden ser, entre otros, bacterias que tienen la capacidad de colonizar activamente el sistema radicular para favorecer y/o mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas en los cultivos, incluso bajo condiciones de estrés abiótico [15]. Estas bacterias son conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), que pueden formar comunidades ecológicas complejas para aumentar la productividad de cultivos, puesto que son capaces de mejorar el crecimiento de las plantas a través de uno o más mecanismos [15]–[17]. En este sentido, las rizobacterias pueden beneficiar a las plantas incrementando la disponibilidad de nutrientes, crecimiento, nutrición, fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo, producción de sideróforos, producción de enzimas como ACC-desaminasa, quitinasa y glucanasa [16], [17]. Además, pueden generar estímulos químicos que confieren tolerancia al estrés abiótico, por ejemplo, la fitoestimulación por la producción de hormonas como; ácido indol 3- acético (IAA) [18], ácido abscísico (ABA), ácido giberélico y citocinas que aumenta la biomasa de la planta e incrementa la elongación de la raíz [9]. Por lo tanto, las PGPR pueden trascender la barrera de la endodermis, cruzando desde la corteza de la raíz al sistema vascular, y posteriormente prosperan como endófitos en tallos, hojas, tubérculos y otros órganos [19]–[21]. La extensión de la colonización endofítica de los órganos y tejidos de la planta huésped refleja la capacidad de la PGPR para adaptarse selectivamente a estos nichos ecológicos específicos [22]. Estudios previos, han mostrado que algunos géneros como: *Achromobacter* [9], [23], *Arthrobacter* [24] y *Azotobacter* [25] estimulan mecanismos de respuesta para tolerar la sequía y predominan principalmente en el cultivo de *Solanaceas*. Otros estudios han mostrado que en trigo abundan los géneros *Azospirillum* [26], *Klebsiella* [27] y *Pantoea* [28], *Enterobacter* y *Burkholderia* en maíz [29], *Streptomyces* en sorgo [30], *Microbacterium* en pimiento [31], *Serratia* en pepino [32], *Rhizobium* [33] y *Bacillus* en *Platycladus orientali* [34], *Pseudomonas* [35] y *Paenibacillus* en especies modelo como; *Arabidopsis thaliana* [36].

Por otra parte, análisis metagenómicos en suelo bajo condiciones de estrés por déficit hídrico han mostrado cambios significativos en la diversidad y abundancia relativa de algunos grupos taxonómicos



[30]. Estudios recientes, han mostrado que algunos microorganismos Gram positivos y Gram negativos del suelo bajo condiciones de estrés abiótico, presentan mayor abundancia de los filos Proteobacterias, Verrucomicrobia, Bacteroidetes [37], [38], Firmicutes y Actinobacteria [39]–[42]. Asimismo, nuevas investigaciones a partir de la amplificación del gen conservado 16S han mostrado que el cultivo de yuca está enriquecido con rizobacterias que tienen funciones específicas en el suelo [43]. En este sentido, el presente estudio buscó caracterizar las comunidades bacterianas asociadas a plantas de yuca (*M. esculenta*) del cultivar MCOL1734 sometidas a estrés por déficit hídrico, para identificar especies de rizobacterias relacionadas con la resistencia al estrés abiótico e implementar nuevas estrategias en programas de mejora para aumentar su tolerancia en cultivos de importancia económica.

2. MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y ensayo de estrés por déficit hídrico en yuca *Manihot esculenta*.

Plantas de yuca (*M. esculenta*), cultivar MCOL1734 proporcionadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Palmira-Colombia, de cuatro semanas de crecimiento en condiciones de invernadero (28 °C, 12 Luz/Oscuridad), fueron colectadas entre noviembre y diciembre del año 2018, para evaluar el efecto a estrés por déficit hídrico. Un total de seis plantas fueron privadas de riego por un periodo de 20 días y cinco plantas permanecieron con riego continuo como control.

Aislamiento y purificación de rizobacterias asociadas al cultivo de yuca.

Para el aislamiento y purificación de rizobacterias asociadas al cultivo de yuca, muestras de la raíz principal y raíces adventicias fueron colectadas al inicio (T0) y final (T20) del tratamiento. 10 g de tejido de raíz fue empleado para realizar diluciones 1/10 en solución tween 80 al 0,1 %. Posterior, se realizó diluciones seriadas en agua peptonada hasta obtener una dilución final a 10^{-4} g/mL. De cada dilución fueron sembrados 0,1 mL en agar nutritivo (SCHARLAU) a 37 °C durante 24 horas [44]. Después del tiempo de incubación, 6 colonias diferenciales fueron seleccionadas de la dilución 10^{-4} g/mL siendo purificadas en agar nutritivo (SCHARLAU) y transferidas a agar king B (MERCK), ashby (HIMEDIA), manitol (BD) y EMB (CRITERION) a 37 °C durante 24 horas.

Identificación macroscópica y microscópica de rizobacterias.

Para el estudio macroscópico se observaron características de crecimiento de cada una de las colonias purificadas en los diferentes medios de cultivo. Teniendo en cuenta forma, elevación, margen, textura, color y producción de pigmentos difusibles al medio [45]. La observación microscópica se realizó por tinción de Gram según Rodríguez y Arenas (2018) [46], evaluando criterios como: forma, coloración de Gram y presencia de esporas.

Caracterización bioquímica de rizobacterias.

La identificación bioquímica se realizó según el método descrito por Bergey *et al.*,(2005) [45], para pruebas primarias: catalasa (JGB), oxidasa (BIOMERIEUX) y TSI (OXOID). Para la identificación bioquímica de bacterias Gram positivas y Gram negativas se empleó un kit de diagnóstico rápido BD BBL CrystalTM y una prueba automatizada (VITEK ®2), respectivamente.

Amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

La identificación molecular de 41 cepas bacterianas se les realizó a partir de la amplificación de la región conservada de ARNr 16S, empleando los cebadores universales U1 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3', y U2 5'-ATCGG (C / T) TACCTTGTTACGACTTC-3' que amplifican un fragmento de 900 pb [47]. Las colonias purificadas en agar nutritivo fueron suspendidas en 10 µL de



H₂O y sometidas a un choque de temperatura de -20 °C durante 5 min. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, conteniendo 1X buffer B, 0,2 µM de los cebadores, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0.05 U/µL Taq ADN polimerasa (Solis Byodine) [48], como control negativo se empleó H₂O en cada una de las reacciones. La amplificación por PCR se realizó en el sistema (Bio-Rad Ptc-100 Peltier Thermal Cycler 96 Well), con un programa que consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min (1 ciclo), seguido por 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineación a 55 °C por 30 s y extensión por 2 min a 72 °C (30 ciclos) y una extensión final a 72 °C por 10 min. El producto de amplificación fue visualizado en geles de agarosa al 1 % teñido con GelRed (Thomas Scientific). La purificación de los productos de PCR se realizó con el Kit de purificación (GE Healthcare). Los productos fueron verificados en geles de agarosa al 1%. Posteriormente, 20 µL del producto purificado fue enviado a MAGROGEN (Corea del Sur) para su secuenciación con el cebador universal U1. Las secuencias obtenidas fueron editadas por el programa Bioedit [49] y confirmándolas con las bases de datos SeqMatch de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) [50] y DNA Data Bank of Japan (DDJB) [51].

Para el análisis filogenético se realizó un alineamiento múltiple con el programa Geneious Pro 4.8.5 [52], utilizando el algoritmo MUSCLE [53]. El árbol filogenético se construyó con el programa MEGAX [54]–[56] mediante al algoritmo Neighbor-Joining [54].

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de especies bacterianas fueron analizados en un diagrama de Venn mediante el complemento Jvenn [57].

3. RESULTADOS

Aislamiento e identificación de rizobacterias asociadas a la raíz de yuca (*M. esculenta*).

Un total de 124 cepas bacterianas fueron aisladas de raíces de yuca, 42 aislamientos procedentes de plantas control corresponden a bacterias Gram positivas (Tabla 1). De las cuales ocho y 38 reaccionaron positivo a la prueba de oxidasa y catalasa, respectivamente. El análisis bioquímico por (Crystal™) mostró un total de 13 rizobacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* y *Oerskovia*. Por otra parte, la identificación mediante la prueba de (VITEK®2) para bacterias Gram negativas mostró un total de 11 rizobacterias que pertenecen a los géneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Sphingomonas* y *Rhizobium*.

En contraste, nueve bacterias identificadas como Gram positivas bajo condiciones de estrés hídrico, reaccionaron positivo a la prueba de catalasa (Tabla 2). Por otra parte, 26 aislamientos procedentes de plantas sometidas a estrés por déficit hídrico fueron identificados como bacterias Gram negativas (Tabla 2), dentro de estas 22 y 19 cepas reaccionaron positivo a la prueba de oxidasa y catalasa, respectivamente. Análisis de bacterias Gram negativas a partir de la prueba bioquímica (VITEK®2) indicó un total de 20 rizobacterias identificadas, pertenecientes a los géneros: *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas* y *Rhizobium*.



Tabla 1. Identificación de rizobacterias asociadas a la raíz de yuca (*M. esculenta*) cultivar MCOL1734. Tinción de Gram, pruebas bioquímicas e identificación molecular por gen ARNr 16S de colonias aisladas al inicio del tratamiento.

Control / Tratamiento	Numero de colonia	Gram	Observación microscópica	Oxidasa	Catalasa	TSI	Secuenciación (gen ARNr 16S)	Vitek ^b	Crystal
Control # 1	1	+	Cocos (estafilococos)	+	+		N.A	N.A	<i>Micrococcus luteus</i>
	2	-	Bacilos	-	+	K/A	<i>Pantoea vagans</i>	N.A	N.A
	3	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Cupriavidus gilardii</i>	N.A	N.A
	4	+	Bacilos	-	-		<i>Clostridium bifermentans</i>	N.A	N.A
Control # 2	7	+	Bacilos	-	-		<i>Clostridium bifermentans</i>	N.A	N.A
	8	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
	9	+	Bacilos	-	-		<i>Clostridium bifermentans</i>	N.A	N.A
	10	-	Bacilo	+	+	K/K	<i>Achromobacter xylosoxidans subsp. null</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	N.A
Control # 3	12	+	Cocos (diplococos)		+		No identificada	No identificada	No identificada
	13	+	Bacilos con esporas central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	14	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>
	15	+	Bacilos con esporas central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	16	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomonas mendocina</i>	N.A
	17	+	Bacilos con esporas central		+		No identificada	No identificada	No identificada
Control # 4	18	+	Bacilos con esporas central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	19	+	Bacilos con esporas central	+	+		<i>Bacillus subtilis</i>	N.A	N.A
	21	+	Bacilos con esporas central	+	+		<i>Bacillus mojavensis</i>	N.A	N.A
	22	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Pseudomonas montellii</i>	N.A	N.A
	23	+	Bacilos con esporas central	+	+		N.A	N.A	<i>Bacillus subtilis</i>
	24	+	Bacilos con esporas central		+		No identificada	No identificada	No identificada
Control # 5	25	+	Bacilos	-	+		<i>Exiguobacterium sp.</i>	N.A	N.A
	26	+	Cocos y diplococos		-		No identificada	No identificada	No identificada
	27	+	Cocos y diplococos		+		No identificada	No identificada	No identificada
	28	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Achromobacter spanius</i>	N.A	N.A
	29	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Achromobacter spanius</i>	N.A	N.A
Tratamiento # 1	30	+	Bacilos con espora central	+	+		<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	N.A	N.A
	31	+	Bacilos	-	+		<i>Bacillus firmus</i>	N.A	N.A
	32	-	Bacilos	-	+	K/A	<i>Pantoea sp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
	33	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
	34	+	Bacilos con esporas central	+	+		<i>Bacillus mojavensis</i>	N.A	N.A
	35	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
Tratamiento # 2	36	+	Bacilos con espora central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	37	+	Streptomices		+		No identificada	No identificada	No identificada
	38	-	Bacilos (diplobacilos)	+	+	K/K	N.A	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	N.A
	39	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
	40	+	Bacilos con esporas central	+	+		N.A	N.A	<i>Bacillus subtilis</i>
Tratamiento # 3	41	+	Bacilos con espora central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	43	+	Bacilos con espora central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	44	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium genitalium</i>
	45	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
	46	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
Tratamiento # 4	47	+	Bacilos con espora central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	48	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	N.A	N.A
	49	+	Bacilos con espora central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	50	+	Bacilo con espora central y lateral		+		No identificada	No identificada	No identificada
	51	+	Bacilos	-	+		<i>Bacillus licheniformis</i>	N.A	N.A
Tratamiento # 5	52	+	Bacilos con espora central	+	+		N.A	N.A	<i>Bacillus sphaericus</i>
	53	+	Bacilos con espora central		+		No identificada	No identificada	No identificada
	54	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
	55	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	57	+	Bacilos con espora central		+		No identificada	No identificada	No identificada
Tratamiento # 6	58	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
	59	+	Cocos		+		No identificada	No identificada	No identificada
	60	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	61	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	62	+	Bacilos	-	+		<i>Bacillus firmus</i>	N.A	N.A
Tratamiento # 6	63	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
	64	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	65	-	Bacilos	+	+	K/K ^a	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	N.A	N.A
	66	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Oerskovia species</i>

a TSI K/K con crecimiento.

b Valor de probabilidad mayor al 90%.

N.A: No Aplica (no se realizó identificación)



Tabla 2. Identificación de rizobacterias asociadas a la raíz de yuca (*M. esculenta*) cultivar MCOL1734. Tinción de Gram, pruebas bioquímicas e identificación molecular por gen ARNr 16S de colonias aisladas al final del tratamiento.

Control / Tratamiento	Numero de colonia	Gram	Observaciones	Oxidasa	Catalasa	TSI	Secuenciación (gen ARNr 16S)	Vitek ^b	Crystal
Control # 1	67	-	Bacilos	+	+	K/K	<i>Achromobacter sp</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	68	-	Bacilos	-	+	K/K	<i>Pantoea sp</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	69	-	Bacilos	-	+	K/A	<i>Pantoea sp</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	70	-	Bacilos	-	+	K/K	N.A	<i>Cronobacter sakazakii</i>	N.A
	71	-	Bacilos	-	+	K/K	<i>Pantoea sp.</i>	N.A	N.A
	72	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+	+	K/K ^a	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
Control # 2	73	-	Bacilos	+	+	K/K ^a	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	N.A
	74	-	Bacilos (diplobacilos)	-	+	K/K ^a	N.A	<i>Serratia marcescens</i>	N.A
	75	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+		K/K	No identificada	No identificada	No identificada
	77	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>
	78	-	bacilos	+	+	K/K ^a	N.A	<i>Pseudomona putida</i>	N.A
	79	+	Cocobacilos	+	+		<i>Bacillus subtilis</i>	N.A	N.A
Control # 3	80	-	Bacilos cortos	-	+	K/K	N.A	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	N.A
	81	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	N.A
	82	-	Cocobacilos (estreptobacilos)	+	+	K/K	No identificada	No identificada	No identificada
	83	-	Cocos (estreptococos)	+		K/K ^a	No identificada	No identificada	No identificada
	84	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	N.A
	85	-	Cocobacilos	+	+	K/K ^a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	N.A
Control # 4	86	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+	+	K/K ^a	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	87	-	Bacilos	-	+	K/K ^a	<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	N.A
	88	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+		K/K	No identificada	No identificada	No identificada
	89	-	Cocos (diplococos)	-	+	K/K	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	90	+	Bacilos	+	+		<i>Bacillus subtilis</i>	N.A	N.A
	91	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+	+	K/K ^a	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
Control # 5	92	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	93	+	Bacilos	-	+		N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
	94	+	Cocos	-	+		<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	N.A	N.A
	95	-	Cocobacilos (diplobacilos)	-	+	K/K	N.A	<i>Buttiauxella agrestis</i>	N.A
	96	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Aeromonas salmonicida</i>	N.A
	97	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomona putida</i>	N.A
Tratamiento # 1	98	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomona putida</i>	N.A
	99	+	Cocobacilos (diplobacilos)	-	+		<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	N.A	N.A
	100	-	Cocobacilos (diplobacilos)	-		K/K	No identificada	No identificada	No identificada
	101	-	Cocos (diplococos)	+		K/K	No identificada	No identificada	No identificada
	102	-	Bacilos (diplobacilos)	-		K/K	No identificada	No identificada	No identificada
	103	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+		K/K	No identificada	No identificada	No identificada
Tratamiento # 2	104	+	Cocos	-	+		<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	N.A	N.A
	105	+	Diplobacilos	-	+		<i>Streptomyces aureus</i>	N.A	N.A
	106	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
	107	+	Cocos (diplobacilos)	-	+		<i>Streptomyces paucisporeus</i>	N.A	N.A
	108	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+	+	K/K	<i>Pseudomonas Pseudoalcaligenes</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	N.A
	109	-	Cocobacilos	+	+	K/K	No identificada	No identificada	No identificada
Tratamiento # 3	110	-	Cocos	+	+		N.A	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	N.A
	111	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	112	+	Bacilos	-	+		No identificada	No identificada	No identificada
	113	-	Cocos (diplococos)	+	+	K/K	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	114	+	Cocos (diplococos)	-	+		<i>Arthrobacter ramosus</i>	N.A	N.A
	115	+	Bacilos	-	+		<i>Streptomyces viridodiatisticus</i>	N.A	N.A
Tratamiento # 4	116	+	Bacilos	-	+		<i>Streptomyces albogriseolus</i>	N.A	N.A
	117	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	118	+	Cocobacilos (diplobacilos)	-	+		N.A	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	N.A
	119	-	Filamentos	+	-	K/K	N.A	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	N.A
	120	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+	+	K/K ^a	No identificada	No identificada	No identificada
	121	-	Bacilos	+	+	K/K ^a	N.A	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
Tratamiento # 5	122	-	Cocos (diplococos)	-	+	K/K	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	123	-	Bacilos	+	+	K/K ^a	N.A	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
	125	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+	+	K/K ^a	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	126	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	127	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
	128	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Pseudomonas luteola</i>	N.A
Tratamiento # 6	129	-	Cocobacilos (diplobacilos)	-	+	K/K	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	130	-	Bacilos	+	+	K/K	N.A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	N.A
	131	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+	+	K/K	N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
	132	-	Cocobacilos (diplobacilos)	+		K/K	No identificada	No identificada	No identificada

a TSI K/K con crecimiento.

b Valor de probabilidad mayor al 90%.


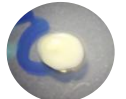

























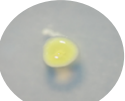

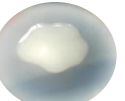






N.A: No Aplica (no se realizó identificación)

Comparación macroscópica de rizobacterias.



Entre todas las rizobacterias identificadas, procedentes de plantas sometidas a estrés hídrico y control. *Pseudomonas putida*, *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis* y *Corynebacterium aquaticum*, presentaron diferencias macroscópicas cuando fueron sembradas en medios selectivos como; ashby, king B, manitol y EMB (Tabla 3). *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* y *Corynebacterium aquaticum* tuvieron la capacidad de crecer y adaptarse en todos los medios selectivos en condiciones de sequía, mostrando su potencial en sintetizar los compuestos específicos de cada medio. Por otra parte, *Rhizobium radiobacter* no creció en agar manitol.

Tabla 3. Comparación macroscópica de bacterias asociadas a la raíz de yuca (*M. esculenta*) cultivar MCOL1734. Morfología de rizobacterias sembradas en: agar nutritivo, ashby, king B, manitol y EMB.

Número de colonia	Agar Nutritivo	Agar Ashby	Agar King B	Agar Manitol	Agar EMB	Secuenciación (gen ARNr 16S)	Vitek ^a	Crystal
35 (T0)				No creció la colonia en este medio		<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
98 (T20)						N.A	<i>Pseudomonas putida</i>	N.A
64 (T0)						N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
129 (T20)				No creció la colonia en este medio		N.A	<i>Rhizobium radiobacter</i>	N.A
19 (T0)					No creció la colonia en este medio	<i>Bacillus subtilis</i>	N.A	N.A
79 (T20)						<i>Bacillus subtilis</i>	N.A	N.A
58 (T0)				No creció la colonia en este medio		N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
93 (T20)						N.A	N.A	<i>Corynebacterium aquaticum</i>

^a Valor de probabilidad mayor al 90%.
N.A: No Aplica (no se realizó identificación)

Diversidad y abundancia de comunidades microbianas.



La diversidad de las bacterias identificadas al inicio y final del tratamiento fue evaluada a partir de un diagrama de Venn. De las 48 especies identificadas, solo cuatro especies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Rhizobium radiobacter* fueron caracterizadas en los grupos de tratamiento (T0), control y tratamiento (T20). Estas especies son comunes en suelos áridos y semiáridos, contribuyendo al desarrollo vegetativo y reproductivo de cultivos de ciclo corto [18], [33], [58], [59].

En contraste, las especies *Streptomyces paucisporeus*, *Brachy bacterium rhamnosum*, *Streptomyces albogriseolus*, *Streptomyces viridodiastaticus*, *Pseudomonas luteola*, *Ochrobactrum anthropi*, *Streptomyces aureus*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Arthrobacter ramosus*, corresponden a un grupo de nueve rizobacterias aisladas de plantas sometidas a estrés hídrico (Figura 1). La mayoría de estas especies han sido reportadas como PGPR, que influyen en el crecimiento y desarrollo de la planta a través de la activación de rutas metabólicas e interacciones con microorganismos[60]–[62].

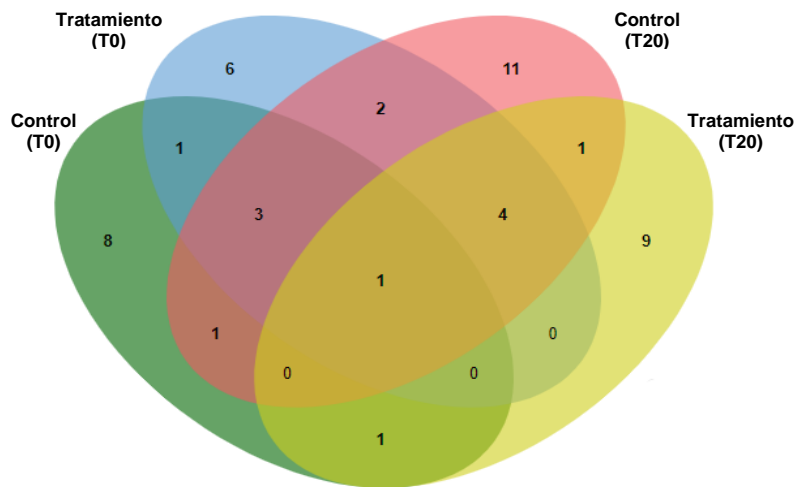


Figura 1. Diagrama de Venn de especies bacterianas aisladas de raíces laterales y adventicias de plantas de yuca *M. esculenta*, cultivar MCOL1734 de cuatro semanas al inicio (T0) y al final de tratamiento (T20). Los valores se presentan como número absoluto de aislamientos por condición [48], [57].

Loa análisis de abundancia relativa, mostraron un total de 23 géneros de los cuales 30 aislados fueron no identificados (otros). Dentro de los géneros encontrados asociados a la raíz de yuca en plantas control (T0) y sometidas a estrés hídrico (T20) predominó el género *Pseudomonas* (Figura 2). Al inicio del tratamiento se observó abundancia de los géneros; *Bacillus* (15 %), *Achromobacter* (11 %), *Clostridium* (11 %) y *Pseudomonas* (11 %) en plantas control. A diferencia, al final del tratamiento fueron identificados otros géneros de importancia ambiental como: *Pseudomonas* (28 %), *Sphingomonas* (14 %) y *Streptomyces* (11 %) (Figura 2). Estos géneros están implicados en la producción de la hormona IAA involucrada en el crecimiento y desarrollo vegetativo, procesos fisiológicos que incluyen alargamiento, división celular, diferenciación de tejido, formación del xilema, tejido radicular, fototropismo, gravitropismo y respuesta a factores bióticos y abióticos [63]–[66].





Figura 2. Abundancia relativa de géneros bacterianos aislados de raíz de yuca al inicio del tratamiento (T0) y final del tratamiento (T20).

Análisis filogenético de rizobacterias en yuca.

El análisis filogenético de las secuencias parciales de 20 aislamientos, fue realizado usando el algoritmo Neighbor-Joining [54]. El árbol filogenético se agrupó en tres filos Proteobacterias, Actinobacteria y Firmicutes. Este estudio revela que el 50% de los microorganismos aislados se agrupan al filo Proteobacterias correspondientes a los géneros: *Pantoea*, *Achromobacter*, *Cupriavidus* y *Pseudomona*, este último género predomina en la mayoría de los aislados de este estudio, indicando que este género predomina en suelos de cultivos desarrollados bajos diferentes tipos de estrés. Por otra parte, el 20% corresponde al filo Actinobacteria y el porcentaje restante se agrupan al filo Firmicutes (Figura 3).

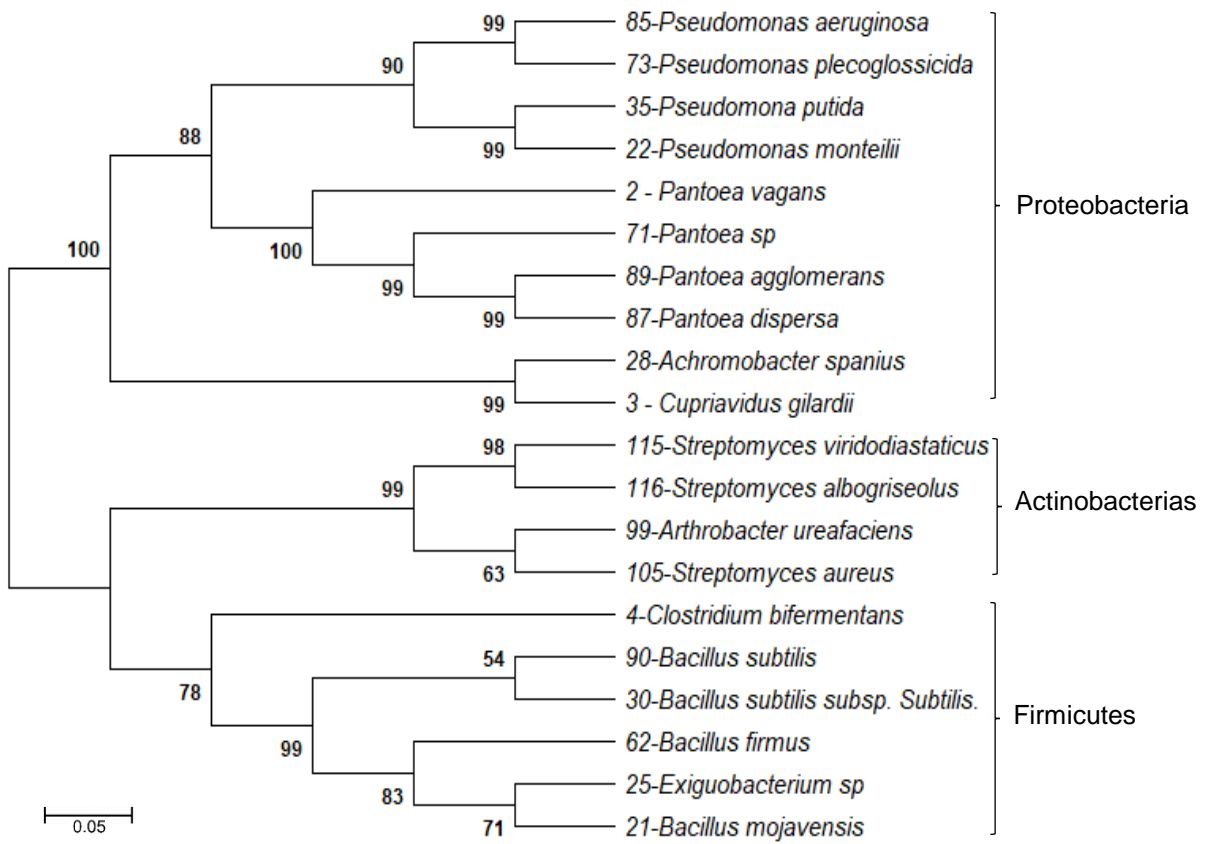




Figura 3. Árbol filogenético de rizobacterias aisladas por amplificación del gen ARNr 16S. Según el método Neighbor-Joining. Los valores Bootstrap son mostrados entre las ramas respectivamente.

4. DISCUSIÓN

Las comunidades bacterianas asociadas a la raíz juegan un papel importante para el desarrollo de la planta en relación con las propiedades del suelo [67]. En el presente estudio, se caracterizaron bacterias asociadas a la rizosfera de plantas de yuca (*M. esculenta*) cultivar MCOL1734, sometidas a estrés por déficit hídrico. Un total de 124 aislamientos, pertenecen al grupo de bacterias PGPR, de los cuales 42 cepas aisladas de plantas control corresponden a bacterias Gram positivas (Tabla 1), los géneros más predominantes fueron *Bacillus* y *Corynebacterium*. Dentro del género *Bacillus*, las especies *Bacillus subtilis* y *Bacillus mojavensis*, se han estudiado como microorganismos que incrementan la tolerancia al estrés, debido a que resisten potenciales osmóticos bajos, promueven el crecimiento vegetal y la concentración de osmolitos [9]. Asimismo, *Corynebacterium* sp se encuentra asociado directamente a la promoción del crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas como IAA y ABA [68]. Por otra parte, bacterias Gram negativas fueron encontradas en una menor proporción en plantas control, dentro de este grupo fueron identificadas *Achromobacter* y *Sphingomonas*, las cuales tienen la capacidad de crecer alrededor de la zona radicular y estimular el crecimiento vegetal a partir de la producción de metabolitos primarios. Trabajos realizados por Kumar y Dubey (2018) [69], han demostrado que miembros del género *Achromobacter* son empleados como biofertilizantes, para aumentar la productividad de cultivos donde las condiciones ambientales son un factor limitante. Además, *Sphingomonas* sp. favorece la absorción de iones minerales por parte de la planta [70] y sintetiza sideróforos, que promueven la absorción de iones de hierro [71], [72]. Estos hallazgos son importantes para comprender la composición bacteriana del suelo y como esta puede beneficiar el crecimiento y desarrollo de cultivos.

Dentro de los 26 aislados Gram negativos de este grupo, los géneros más relevantes fueron *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Streptomyces*. Según Ahemad y Kibret (2014) [73], estos géneros predominan bajo condiciones de estrés abiótico debido a un aumento en la producción de osmolitos. Especies como *Pseudomonas putida* aumentan la biomasa vegetal, el contenido relativo de agua y el potencial hídrico en cereales [9]. Asimismo, trabajos realizados en papa (*Solanum tuberosum*), han mostrado la importancia del suelo en la determinación de las comunidades rizosféricas y la afinidad que tienen algunos microorganismos en particular con ciertos genotipos de plantas [74], [75], demostrando que la interacción entre la planta y el microorganismo aumentan el fitnes y la productividad de cultivos [42]. Un fenómeno ampliamente observado en el presente estudio fue el aumento en la proporción de bacterias Gram negativas a Gram positivas en condiciones de sequía. Lo que indica, que las bacterias Gram negativas contribuyen al mecanismo de respuesta a estrés abiótico.

Por otra parte, fueron observados cambios morfológicos en diferentes géneros bacterianos. La morfología bacteriana es extremadamente diversa y las formas específicas son consecuencia de presiones adaptativas que optimizan la supervivencia bacteriana [76]. La forma afecta las funciones biológicas, como la adquisición de nutrientes, la motilidad, la dispersión, la resistencia al estrés y las interacciones con otros microorganismos [76]. En este sentido se evaluó la fracción cultivable de la microbiota de raíz en yuca utilizando diferentes medios de crecimiento selectivos (ashby, king B, manitol y EMB) en aislados tomados al inicio y final del tratamiento. Las bacterias *Pseudomonas putida*, *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis* y *Corynebacterium aquaticum*, presentaron diferencias macroscópicas cuando fueron sembradas en medios selectivos (Tabla 3). El aislamiento de microorganismos en medios libres en nitrógeno, como ashby, constituye un primer paso hacia la identificación de bacterias con potencial de fijación de nitrógeno [77]. Asimismo, bacterias aisladas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Rhizobium* tuvieron la facultad de crecer en este medio selectivo debido a que tienen características de fijación de nitrógeno y podrían ser potenciales para incluirlas en la recuperación de suelos afectados por condiciones ambientales adversas. De igual modo, estas bacterias lograron crecer en agar king B, debido a que una de sus composiciones químicas



es el fosfato dipotásico (K_2HPO_4 anhidro), este compuesto hace que las bacterias solubilicen iones, como el fósforo que, al ser hidrolizado con enzimas como las fitasas, facilitan la movilidad de este elemento en el suelo y lo transforman en un compuesto accesible para la planta [78]. Por otra parte, *Pseudomonas putida* fue capaz de crecer en agar manitol después de someter la planta a estrés hídrico, lo que indica que este microorganismo se adapta a altas concentraciones de cloruro de sodio. Sin embargo, otras especies como *Rhizobium radiobacter* después del tratamiento por sequía pasaron a ser susceptibles a la presencia de este compuesto. Todos los géneros bacterianos mencionados crecieron en agar EMB posterior al tratamiento, por lo cual, estos microorganismos son capaces de activar el metabolismo de degradación de azúcares.

En el este estudio *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Rhizobium radiobacter*, fueron especies que prevalecieron durante todo el tratamiento. *Pseudomonas* spp. produce fitoestimulación mediante la liberación ACC que reduce niveles de etileno [79], [80]. Algunas cepas de *Pseudomonas putida* producen IAA indispensable para el desarrollo vegetativo [81]–[83], fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo en plantas principales. Por otra parte, *Rhizobium* spp produce citoquinas que aumentan el desarrollo de raíces laterales y adventicias [81], [84]. Estudios realizados por Luo *et al.*,(2019) [85] inoculando *Shingomonas* spp. en *Arabidopsis thaliana* han mostrado que este género promueve el crecimiento de la raíz principal y raíces adventicias, brindando a la planta mayor captación de nutrientes, favoreciendo su desarrollo en respuesta a estrés [85], [86]. Por lo anterior, los aislamientos obtenidos en este estudio podrían presentar un gran potencial como bacterias PGPR y pueden implementarse en programas de mejora para aumentar la tolerancia a estrés abiótico.

En el presente estudio encontramos nueve especies únicas que tuvieron la capacidad de crecer en condiciones de estrés por deficiencia de agua en *M. esculenta*, las cuales fueron: *Streptomyces paucisporeus*, *Brachy bacterium rhamnosum*, *Streptomyces albogriseolus*, *Streptomyces viridodiastaticus*, *Pseudomonas luteola*, *Ochrobactrum anthropi*, *Streptomyces aureus*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Arthrobacter ramosus* considerando que algunas de estas especies están caracterizadas como PGPR (Figura 1). Estudios recientes realizados por Mishra *et al.*,(2017) [87] demuestran que los géneros *Pseudomonas* y *Ochrobactrum* tienen la capacidad de crecer en ambientes hostiles. Además, estas bacterias están implicadas en la liberación de ácidos orgánicos y el flujo de salida de peróxido de hidrogeno, el cual es un medio para tolerar la sequía en plantas [88]. Asimismo, en cultivos de trigo se ha observado que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* aumenta la concentración de glicina betaína, equilibrando el balance hídrico celular en las plantas. Igualmente, en cultivos de especies leñosas como; manzano (*Malus domestica*) se encontró que *Pseudomonas luteola* pueden incrementar la producción de IAA, sideróforos, biosurfactantes y la solubilización de fósforo orgánico e inorgánico [89]. Por otra parte, *Arthrobacter* es considerado una bacteria nutricionalmente versátil, que predomina en la zona radicular, estimulando el desarrollo de la raíz principal y adventicias en la planta [90], [91]. Otros géneros como *Streptomyces* están implicados en la respuesta a estrés en cultivos de trigo [92]. Por otra parte, el análisis filogenético permitió asociar, los filos Proteobacteria, Actinobacterias y Firmicutes, al cultivo de la yuca. Siendo, el filo Proteobacterias y el género *Pseudomonas* los más representativos en la rizosfera, debido a que tienen una alta tasa de crecimiento, capacidad de fijar nitrógeno y establecer una relación simbiótica con la planta [93].

Los resultados obtenidos en el presente estudio claramente demuestran que existen nuevas especies bacterianas como *Brachy bacterium rhamnosum*, *Streptomyces aureus* y *Spreptomyces albogriseolus* que pueden contribuir a la tolerancia de estrés abiótico en plantas. Además, se reporta a *Streptomyces paucisporeus* como una nueva especie PGPR que puede jugar un papel importante en la promoción de crecimiento vegetal, en cultivos desarrollados en regiones áridas y semiáridas y pueden implementarse como estrategia en programas de mejora para cultivos de interés agronómico.

5. CONCLUSIÓN



El presente estudio es un primer abordaje en la identificación de rizobacterias asociadas al cultivo de yuca bajo condiciones de estrés hídrico. Diversos géneros bacterianos predominan por encima de otros en condiciones de estrés, como fue el caso del género *Pseudomonas*, el cual se encontró en una mayor proporción. Además, después del tratamiento por sequía se aislaron más bacterias Gram negativas que Gram positivas, por lo que este grupo bacteriano presentó una mayor afinidad con las plantas de yuca sometidas a estrés. Asimismo, se identificaron nuevas especies que pueden estar implicadas en respuesta al estrés abiótico (*Brachybacterium rhamnosum*, *Streptomyces aureus* y *Spreptomyces albogriseolus*) y en la promoción de crecimiento vegetal (*Streptomyces paucisporeus*). Se sugiere realizar otros estudios inoculando las bacterias caracterizadas como potenciales microorganismos promotores de crecimiento vegetal; siendo una alternativa para el mejoramiento del cultivo de la yuca y, asimismo, poder establecer la asociación de los diferentes mecanismos que realizan estas rizobacterias en respuesta al estrés hídrico en la planta.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Santiago de Cali por la financiación de este trabajo (DGI COCEIN-N° 511-621116-C7), al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por proporcionar el material vegetal.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G. Sivakamur, C. Briccoli, E. Hahn, y K. Peak, "ICP-MS screening of mineral elements from cassava - An emerging industrial crop in South India", *Sixth Int. Sci. Meet. Cassava Biotechnol. Netw.*, vol. 6, p. 58, 2004.
- [2] FAO, "Ahorrar para crecer: la yuca. Documento de orientación Guía a la intensificación sostenible de su producción", pp. 1–24, 2013.
- [3] J. Aristizábal, T. S. Autoras, y D. M. Lorío, "Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca", 2007.
- [4] E. Okogbenin *et al.*, "Phenotypic approaches to drought in cassava: Review", *Front. Physiol.*, vol. 4, pp. 1–15, 2013.
- [5] M. A. El-Sharkawy, "Cassava biology and physiology", *Plant Mol. Biol.*, vol. 56, núm. 4, pp. 481–501, 2004.
- [6] P. P. Jauhar, "Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges", *Crop Sci.*, vol. 46, núm. 5, pp. 1841–1859, 2006.
- [7] A. Tofiño, H. Ceballos, y H. M. Romero, "Posibilidades de expansión del cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en el Caribe seco colombiano a partir de investigación multidisciplinaria", *Actual Biol*, vol. 30, núm. 88, pp. 15–27, 2008.
- [8] D. K. Maheshwari, "Bacteria in agrobiolgy: Stress management", *Bact. Agrobiol. Stress Manag.*, vol. 9783642234, pp. 1–333, 2012.
- [9] S. Vurukonda, S. Vardharajula, M. Shrivastava, y A. SkZ, "Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria", *Microbiol. Res.*, vol. 184, pp. 13–24, 2016.
- [10] D. T. Westermann, "Soil Nutrient Bioavailability: A mechanistic approach, 2nd Ed.", *Soil Sci.*, vol. 161, núm. 2, p. 140,141, 1996.
- [11] M. Chekwube Enebe y O. Oluranti Babalola, "The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, pp. 7821–7835, 2018.
- [12] M. Farooq, A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, y S. M. A. Basra, "Plant drought stress : effects,



- mechanisms and management”, *Agron. Sustain. Dev.*, vol. 29, pp. 185–212, 2009.
- [13] L. Turyagyenda *et al.*, “Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava”, *AoB Plants*, vol. 5, pp. 1–15, 2013.
- [14] J. Cuartero y R. Fernández, “Tomato and salinity”, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 78, pp. 83–125, 1999.
- [15] H. Etesami y G. Beattie, “Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions”, en *Probiotics and Plant Health*, Tehran: Springer Nature, 2017, pp. 163–185.
- [16] F. Moronta-Barrios, F. Gionechetti, A. Pallavicini, E. Marys, y V. Venturi, “Bacterial microbiota of rice roots: 16S-based taxonomic profiling of endophytic and rhizospheric diversity, endophytes isolation and simplified endophytic community”, *Microorganisms*, vol. 6, núm. 1, p. 14, 2018.
- [17] S. M. Nadeem, M. Naveed, Z. A. Zahair, y H. Naeem, *Plant microbe symbiosis: Fundamentals and advances*. p. 15, 2013.
- [18] H. Etesami, H. A. Alikhani, y H. M. Hosseini, *Indole-3-Acetic Acid and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase: Bacterial Traits Required in Rhizosphere, Rhizoplane and/or Endophytic Competence by Beneficial Bacteria*, vol. 12. 2015.
- [19] J. W. Kloepper, R. Rodríguez-Kábana, G. W. Zehnder, J. F. Murphy, E. Sikora, y C. Fernández, “Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases”, *Australas. Plant Pathol.*, vol. 28, núm. 1, pp. 21–26, 1999.
- [20] E. J. Gray y D. L. Smith, “Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes”, *Soil Biol. Biochem.*, vol. 37, núm. 3, pp. 395–412, 2005.
- [21] S. Campant, B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément, y E. Barka, “Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth- Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, núm. 4, pp. 1685–1691, 2005.
- [22] J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, y J. W. Kloepper, “Bacterial endophytes in agricultural crops”, *Can. J. Microbiol.*, vol. 43, núm. 10, pp. 895–914, 1997.
- [23] S. Mayak, T. Tirosh, y B. R. Glick, “Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers”, *Plant Sci.*, vol. 166, núm. 2, pp. 525–530, 2004.
- [24] J. I. Vilchez, C. García-Fontana, D. Román-Naranjo, J. González-López, y M. Manzanera, “Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms”, *Front. Microbiol.*, vol. 7, pp. 1–11, 2016.
- [25] S. Viscardi *et al.*, “Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture”, *J. soil Sci. plant Nutr.*, vol. 16, pp. 848–863, 2016.
- [26] M. H. Arzanesh, H. A. Alikhani, K. Khavazi, H. A. Rahimian, y M. Miransari, “Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, núm. 2, pp. 197–205, 2011.
- [27] I. Gontia-Mishra, S. Sapre, A. Sharma, y S. Tiwari, “Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria”, *Plant Biol.*, vol. 18, núm. 6, pp. 992–1000, 2016.
- [28] C. Chen *et al.*, “*Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat”, *Sci. Rep.*, vol. 7, pp. 1–14, 2017.
- [29] M. Naveed, B. Mitter, T. G. Reichenauer, K. Wiczorek, y A. Sessitsch, “Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17”, *Environ. Exp. Bot.*, vol. 97, pp. 30–39, 2014.
- [30] L. Xu *et al.*, “Drought delays development of the sorghum root microbiome and enriches for monoderm bacteria”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, núm. 18, pp. E4284–E4293, 2018.
- [31] J. Vilchez, “Mejora en la tolerancia a la sequía de plantas con interés biotecnológico en zonas de secano”, Universidad de Granada, 2016.
- [32] C. J. Wang *et al.*, “Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains”, *PLoS One*, vol. 7, núm. 12, pp. 1–10, 2012.
- [33] Y. Yanni *et al.*, “Enhanced symbiotic performance and productivity of drought stressed common bean after inoculation with tolerant native rhizobia in extensive fields”, *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 232, pp. 119–128, 2016.



- [34] F. Liu, S. Xing, H. Ma, Z. Du, y B. Ma, "Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platyclusus orientalis* container seedlings", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, núm. 20, pp. 9155–9164, 2013.
- [35] S. M. Cho, B. R. Kang, y Y. C. Kim, "Transcriptome analysis of induced systemic drought tolerance elicited by *Pseudomonas chlororaphis* O6 in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Pathol. J.*, vol. 29, núm. 2, pp. 209–220, 2013.
- [36] J. Sukweenadhi *et al.*, "*Paenibacillus yonginensis* DCY84 T induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought, and salt stress", *Microbiol. Res.*, vol. 172, pp. 7–15, 2015.
- [37] R. L. Barnard, C. A. Osborne, y M. K. Firestone, "Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting", *ISME J.*, vol. 7, núm. 11, pp. 2229–2241, 2013.
- [38] J. C. Yuste *et al.*, "Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to temperature", *Glob. Chang. Biol.*, vol. 17, núm. 3, pp. 1475–1486, 2011.
- [39] N. J. Bouskill *et al.*, "Pre-exposure to drought increases the resistance of tropical forest soil bacterial communities to extended drought", *ISME J.*, vol. 7, núm. 2, pp. 384–394, 2013.
- [40] M. Chodak, M. Gołębiewski, J. Morawska-Płoskonka, K. Kuduk, y M. Nikiłńska, "Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress", *Ann. Microbiol.*, vol. 65, núm. 3, pp. 1627–1637, 2015.
- [41] M. Hartmann *et al.*, "A decade of irrigation transforms the soil microbiome of a semi-arid pine forest", *Mol. Ecol.*, vol. 26, núm. 4, pp. 1190–1206, 2017.
- [42] D. Naylor y D. Coleman-Derr, "Drought stress and root-associated bacterial communities", *Front. Plant Sci.*, vol. 8, pp. 1–16, 2018.
- [43] P. S. Sarr, A. Sugiyama, A. D. B. Begoude, K. Yazaki, S. Araki, y E. Nawata, "Molecular assessment of the bacterial community associated with Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivation in Cameroon", *Microbiol. Res.*, vol. 197, pp. 22–28, 2017.
- [44] C. Venner y M. J. Martin, "Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchua (*Physalis peruviana* L.) Con capacidad antagonica frente a *Fusarium* sp.", Pontificia Universidad Javeriana, 2009.
- [45] D. Bergey, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2a ed. Michigan, 2005.
- [46] P. A. Rodríguez y R. Arenas, "Hans Christian Gram and His Staining", pp. 166–167, 2018.
- [47] J. J. Lu, C. L. Perng, S. Y. Lee, y C. C. Wan, "Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid", *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, núm. 6, pp. 2076–2080, 2000.
- [48] H. Etesami y D. K. Maheshwari, "Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 156, pp. 225–246, 2018.
- [49] T. Hall, "Bioedit: user, friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windowa 95/98/NT", *Nucleic Acids Symp.*, núm. 41, pp. 96–98, 1999.
- [50] "Sequence Match". [En línea]. Disponible en: https://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp;jsessionid=65344037758722D6807A2215277E9EF5.10.0.0.9. [Consultado: 19-jun-2019].
- [51] "Bioinformation and DDBJ Center". [En línea]. Disponible en: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>. [Consultado: 19-jun-2019].
- [52] M. Kearse *et al.*, "Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data", *Bioinformatics*, vol. 28, núm. 12, pp. 1647–1649, 2012.
- [53] R. C. Edgar, "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput", *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, núm. 5, pp. 1792–7, 2004.
- [54] N. Saitou y M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.", *Mol. Biol. Evol.*, vol. 4, núm. 4, pp. 406–25, 1987.
- [55] K. Tamura, M. Nei, y S. Kumar, "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, núm. 30, pp. 11030–11035, 2004.
- [56] J. Felsenstein, "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap", *Society*, vol. 39, núm. 4, pp. 783–791, 2012.



- [57] P. Bardou, J. Mariette, F. Escudié, C. Djemiel, y C. Klopp, "Jvenn: an interactive Venn diagram viewer", *BMC Bioinformatics*, vol. 15, núm. 1, p. 293, 2014.
- [58] V. Pham *et al.*, "The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15", *Arch. Microbiol.*, vol. 199, núm. 3, pp. 513–517, 2017.
- [59] U. Prasad, "Diversity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)", *Int. J. Res. Rev.*, vol. 2, núm. 3, pp. 56–64, 2016.
- [60] G. Berg, "Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 84, núm. 1, pp. 11–18, 2009.
- [61] B. Lugtendertg y F. Kamilova, "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria", *Annu. Rev. Microbiol.*, pp. 541–556, 2009.
- [62] R. Schmidt *et al.*, "Effects of bacterial inoculants on the indigenous microbiome and secondary metabolites of chamomile plants", *Front. Microbiol.*, vol. 5, pp. 1–11, 2014.
- [63] A. Santner, L. Calderon, y M. Estelle, "Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth", *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, núm. 5, pp. 301–307, 2009.
- [64] J. H. J. Leveau y S. E. Lindow, "Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290", *Am. Soc. Microbiol.*, vol. 71, núm. 5, pp. 2365–2371, 2005.
- [65] P. Vega, H. Canchignia, M. González, y M. Seeger, "Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria", *Cultiv. Trop.*, vol. 37, núm. especial, pp. 33–39, 2016.
- [66] A. Arévalo y T. Andrehina, "Evaluación y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y su capacidad de antagonismo frente *Rhizoctonia solani*", Universidad Católica de Loja, 2014.
- [67] A. Lareen, F. Burton, y P. Schäfer, "Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes", *Plant Mol. Biol.*, vol. 90, núm. 6, pp. 575–587, 2016.
- [68] R. Prasad, S. Gill, y N. Tuteja, *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: crop improvement through microbial biotechnology*, 1a ed., vol. 136, núm. 1. San Diego: Elsevier Science, 2016.
- [69] A. Kumar, P. Vyas, D. Kumar, y A. Dubey, "Screening and characterization of *Achromobacter xylosoxidans* isolated from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. (Energy Crop) for plant-growth-promoting traits", *J. Adv. Res. Biotechnol.*, vol. 3, núm. 1, pp. 1–8, 2018.
- [70] M. Takeuchi, T. Sakane, M. Yagani, K. Yamasato, K. Hamana, y A. Yokota, "Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov.", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 45, núm. 2, pp. 334–341, 1995.
- [71] A. Sessitsch, B. Reiter, y G. Berg, "Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities", *Can. J. Microbiol.*, vol. 50, núm. 4, pp. 239–249, 2004.
- [72] S. Yang *et al.*, "Growth-promoting *sphingomonas paucimobilis* ZJSH1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation", *Microb. Biotechnol.*, vol. 7, núm. 6, pp. 611–620, 2014.
- [73] M. Ahemad y M. Kibret, "Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective", *J. King Saud Univ. - Sci.*, vol. 26, núm. 1, pp. 1–20, 2014.
- [74] N. Weinert *et al.*, "PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa.", *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 75, núm. 3, pp. 497–506, 2011.
- [75] R. L. Berendsen, C. M. J. Pieterse, y P. A. H. M. Bakker, "The rhizosphere microbiome and plant health", *Trends Plant Sci.*, vol. 17, núm. 8, pp. 478–486, 2012.
- [76] M. Van, M. de Pedro, y F. Cava, "Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting", *Front. Microbiol.*, vol. 8, núm. JUL, pp. 1–18, 2017.
- [77] A. J. Mantilla-Paredes, G. I. Cardona, C. P. Peña-Venegas, U. Murcia, M. Rodríguez, y M. M. Zambrano, "Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana", *Rev. Biol. Trop.*, vol. 57, núm. 4, pp. 915–927, 2009.
- [78] L. Corrales, Z. Arévalo, y V. Moreno, "Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal", *Nova*, vol. 12, núm. 21, pp. 67–79, 2014.



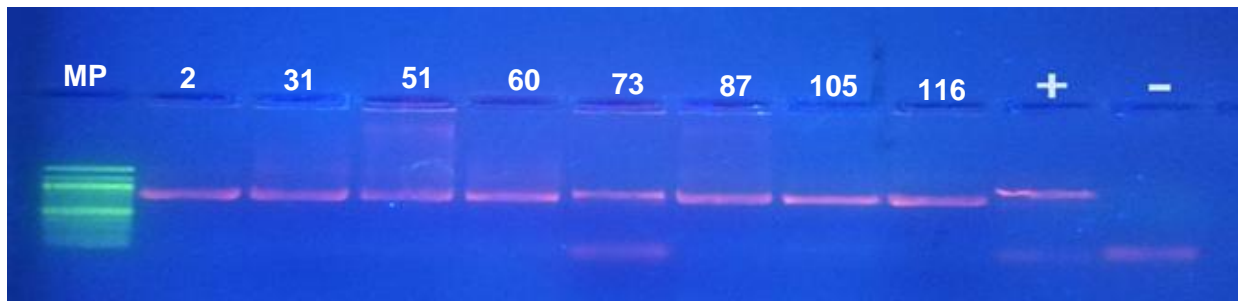
- [79] B. Glick, "Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world", *Microbiol. Res.*, vol. 169, núm. 1, pp. 1–10, 2014.
- [80] J. Gaiero, C. McCall, K. Thompson, N. Day, A. Best, y K. Dunfield, "Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion", *Am. J. Bot.*, vol. 100, núm. 9, pp. 1738–1750, 2013.
- [81] B. Glick, "Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications", *Scientifica (Cairo)*, 2012.
- [82] D. Sachdev, H. Chaudhari, V. Kasture, D. Dhavale, y B. Chopade, "Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth", *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 47, núm. 12, pp. 993–1000, 2009.
- [83] F. Pérez *et al.*, "Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production", *Microb. Biotechnol.*, vol. 169, núm. 5–6, pp. 325–336, 2014.
- [84] N. Rascovan *et al.*, "Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields", *Sci. Rep.*, vol. 6, núm. 1150, pp. 1–12, 2016.
- [85] Y. Luo *et al.*, "*Sphingomonas* sp. Cra20 increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of *Arabidopsis thaliana* under drought stress", *Front. Microbiol.*, vol. 10, pp. 1–19, 2019.
- [86] B. Touraine, T. Bontpart, J. Bresson, D. Vile, y F. Varoquaux, "The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*", *New Phytol.*, vol. 200, núm. 2, pp. 558–569, 2013.
- [87] S. K. Mishra *et al.*, "Characterisation of *Pseudomonas* spp. and *Ochrobactrum* sp. isolated from volcanic soil", *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 110, núm. 2, pp. 253–270, 2017.
- [88] Y. M. Huang, Y. N. Zou, y Q. S. Wu, "Alleviation of drought stress by mycorrhizas is related to increased root H₂O₂ efflux in trifoliolate orange", *Sci. Rep.*, vol. 7, pp. 1–9, 2017.
- [89] E. Kurek, E. Ozimek, P. Sobiczewski, A. Słomka, y J. Jaroszek-Ścisiel, "Effect of *Pseudomonas luteola* on mobilization of phosphorus and growth of young apple trees (Ligol)-Pot experiment", *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 164, núm. February 2018, pp. 270–276, 2013.
- [90] J. Zhang, Y. Ma, y H. Yu, "*Arthrobacter cupressi* sp. nov., an actinomycete isolated from the rhizosphere soil of *Cupressus sempervirens*", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 62, núm. 11, pp. 2731–2736, 2012.
- [91] J. A. Miranda-Ríos, J. A. Ramírez-Trujillo, B. Nova-Franco, L. F. Lozano-Aguirre Beltrán, G. Iturriaga, y R. Suárez-Rodríguez, "Draft Genome Sequence of *Arthrobacter chlorophenolicus* Strain Mor30.16, Isolated from the Bean Rhizosphere", *Genome Announc.*, vol. 3, núm. 3, pp. 7–8, 2015.
- [92] M. Yandigeri *et al.*, "Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions", *Plant Growth Regul.*, vol. 68, núm. 3, pp. 411–420, 2012.
- [93] D. Johnston-Monje, D. S. Lundberg, G. Lazarovits, V. M. Reis, y M. N. Raizada, "Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil", *Plant Soil*, vol. 405, núm. 1–2, pp. 337–355, 2016.



ANEXO 1: INFORMACION ADICIONAL DEL FORMATO

Anexo 1.

Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de colonias bacterianas de las diferentes muestras (T0 y T20).





La Santiago
transforma
tu mundo

