**Universidad
de León**

**Aislamiento y caracterización de bacterias
de la rizosfera de banano (*Musa* sp.) en
República Dominicana y selección
de cepas para el desarrollo
de biofertilizantes**

Tesis Doctoral

Iris Esther Marcano González

2014

**Universidad
de León**

**Aislamiento y caracterización de bacterias de la rizosfera
de banano (*Musa* sp.) en República Dominicana y
selección de cepas para el desarrollo de biofertilizantes**

**Isolation and characterization of banana (*Musa* sp.)
rhizospheric bacteria in Dominican Republic and
selection of strains for the development of biofertilizers**

Iris Esther Marcano González

Universidad de León

Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad

León, 2014

Memoria presentada para optar al grado de
Doctora

Presenta:

Iris Esther Marcano González

Director:

Dr. Fernando González Andrés

León, España

2014

A mi familia.

A Bienvenido Marcano, *in memoriam*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la suficiente fortaleza para alcanzar este importante objetivo en mi vida.

Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad (IMARENABIO) de la Universidad de León, en León, España.

Iris Esther Marcano González fue becaria de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) con la beca MAEC-AECID, para la realización del Doctorado en Ingeniería de Biosistemas, de la Universidad de León.

La experimentación asociada a la presente tesis fue posible gracias a la financiación obtenida por los siguientes proyectos de investigación PCI-AECID: A/023132/09, A/030020/10 y A1/035364/11.

Al Dr. Fernando González Andrés, director de la presente tesis, por guiarme en el camino de la investigación, por ayudarme en momentos difíciles, por tener fe en mí y soportarme estos años, gracias.

A los Profesores de la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD) y en especial a Felipe Vicioso, Ángel Pimentel y César Díaz, por su apoyo, la confianza y por creer en mí para tan importante proyecto.

Al Ing. Agrónomo Henry Ricardo, por su apoyo en el ensayo de campo realizado en las instalaciones del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), en Azua, República Dominicana.

A Marcia, Judith, Guillermo, Carla, Daniel, Sara y Nuria, por tratarme como uno más de su familia, muchas gracias.

A todos los amigos que hice aquí en España, por ser tan buenos conmigo, muchas gracias no los olvidaré.

A mis amigos del IMARENABIO, por ayudarme y hacer que sea más llevadera la estancia en el laboratorio y en España.

A mis amigos en República Dominicana, por ser incondicionales y tener siempre una palabra de ánimo para mí, muchas gracias.

A mi familia: padres, hija, hermanos, abuela, sobrinos, tíos y primos.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aspectos generales del banano (<i>Musa</i> sp.)	3
1.1.1. Sistemática del género <i>Musa</i>	3
1.1.2. Morfología y biología	4
1.1.3. Biogeografía	6
1.1.4. Etnobotánica	7
1.2. El cultivo del banano	9
1.2.1. Material vegetal	9
1.2.2. Propagación del género <i>Musa</i>	9
1.2.3. Ecología del cultivo	10
1.2.4. Plagas y enfermedades que afectan al banano	11
1.3. Sistemas de producción del banano	19
1.3.1. Convencional	19
1.3.2. Ecológico u orgánico	19
1.3.3. Normativa reguladora de la producción ecológica y del uso de los productos químicos de síntesis en agricultura	20

1.4. Importancia socioeconómica del cultivo del banano en la República Dominicana.....	22
1.4.1. Producción de banano en la República Dominicana	22
1.4.2. Exportaciones de banano en República Dominicana	23
1.5. Interacción microorganismo-planta y su utilización agronómica	26
1.6. Modos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	28
1.6.1. Producción de reguladores de crecimiento	29
1.6.2. Actividad ACC desaminasa.....	29
1.6.3. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	30
1.6.4. Solubilización de diferentes formas de fósforo.....	31
1.6.5. Producción de sideróforos por bacterias PGPRs	31
1.6.6. Control biológico de patógenos	32
1.7. Biofertilizantes: concepto agronómico y diseño	33
1.8. El análisis de la diversidad bacteriana asociada a las raíces, clave en el desarrollo de biofertilizantes.....	35

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS **39**

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS **43**

3.1. Aislamiento de bacterias endofíticas y rizosféricas.....	45
3.1.1. Recolección de muestras	45
3.1.2. Aislamiento de bacterias endofíticas	46
3.1.3. Aislamiento de bacterias de suelo rizosférico con actividad ACC desaminasa	47
3.1.4. Aislamiento de bacterias de suelo rizosférico con capacidad para solubilizar de fosfato	48
3.2. Identificación filogenética de las cepas aisladas	49
3.3. Caracterización genotípica de los aislados	50
3.3.1. Extracción de ADN	50

3.3.2. Amplificación de ADN polimórfico al azar (<i>Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD</i>).....	51
3.3.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP</i>) amplificados por PCR (PCR-RFLP) del gen 16S rRNA	51
3.3.4. Electroforesis para los diferentes productos de las técnicas RAPD y PCR-RFLP	52
3.3.5. Análisis estadísticos de los RAPD y PCR-RFLP	53
3.4. Pruebas de Promoción del Crecimiento Vegetal por bacterias PGPR (<i>Plant Growth Promoting Rhizobacterias</i>) <i>in-vitro</i>	54
3.4.1. Producción de ácido indolacético (IAA).....	54
3.4.2. Actividad ACC desaminasa.....	55
3.4.3. Prueba de fijación de nitrógeno en bacterias endofíticas y rizosféricas	56
3.4.4. Solubilización de fosfato.....	57
3.4.5. Producción de sideróforos.....	57
3.4.6. Prueba de enfrentamiento bacterias PGPRs y el hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	58
3.4.7. Análisis estadístico de los resultados de las pruebas PGP <i>in vitro</i>	59
3.5. Ensayos en planta del efecto de bacterias endofíticas en la promoción del crecimiento vegetal y en la inducción de resistencia sistémica (RSI) contra sigatoka negra.....	60
3.5.1. Ensayo con PGPR en el proceso de producción de planta de banano en vivero	60
3.5.2. Ensayo sobre el uso de PGPR en campo.....	61
3.5.3. Selección en planta y en condiciones controladas de bacterias desencadenantes del proceso de RSI contra sigatoka negra	63

4.1. Aislamiento en dos fases de una colección de 262 cepas bacterianas asociadas a raíces de banano en República Dominicana	67
4.2. Identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA de 114 cepas aisladas en la primera fase	69
4.3. Validación de técnicas auxiliares para agrupar la biodiversidad de aislados en grupos taxonómicos reconocidos.....	75
4.3.1. Análisis de los perfiles de RAPD.....	76
4.3.2. Análisis de los perfiles RFLP del gen 16S rRNA.....	86
4.3.3. Análisis multicriterio para la selección de la técnica auxiliar más adecuada para la agrupación de aislados.....	94
4.4. Análisis de la biodiversidad de la colección de 262 cepas mediante los perfiles RFLP del gen 16S rRNA	96
4.5. Análisis <i>in vitro</i> de varias propiedades de promoción del crecimiento vegetal de la colección de 262 cepas	110
4.5.1. Producción de ácido indolacético (IAA).....	115
4.5.2. Actividad ACC desaminasa.....	117
4.5.3. Fijación de nitrógeno en vida libre	120
4.5.4. Solubilización de fosfato.....	122
4.5.5. Producción de sideróforos.....	123
4.5.6. Antagonismo sobre el crecimiento del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (sigatoka negra)	125
4.6. Análisis mediante ensayos en planta del efecto de bacterias endofíticas en la promoción del crecimiento vegetal y en la inducción de resistencia sistémica (RSI).....	127
4.6.1. Selección de cepas para los ensayos en planta	127
4.6.2. Estructura general de los ensayos en planta.....	131
4.6.3. Análisis del efecto de la inoculación con las bacterias en la producción de planta comercial de banano en vivero	131

4.6.4. Análisis en campo del efecto de la inoculación con las bacterias, en el desarrollo y rendimiento comercial del cultivo de banano	134
4.6.5. Selección de bacterias con capacidad para desencadenar el proceso de RSI contra sigatoka negra mediante ensayos en planta en condiciones controladas	142
4.7. Discusión general.....	145
<u>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES</u>	<u>151</u>
5.1. Conclusiones	153
<u>CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>155</u>
<u>CAPÍTULO 7. Anejos</u>	<u>195</u>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Contenido de nutrientes del Banano por cada 100 g de peso de Pulpa.	7
Tabla 2: Especies y cultivares de musáceas.....	9
Tabla 3: Procedencia y características de suelos de las parcelas de banano en régimen ecológico donde se recolectaron las muestras para el aislamiento de bacterias endofíticas y rizosféricas.	45
Tabla 4: Composición del medio DF sales.	48
Tabla 5: Reactivos, condiciones de tiempo y temperatura empleados en la técnica PCR-RAPD.	51
Tabla 6: Reactivos, condiciones de tiempo y temperatura empleados en la técnica PCR-RFLP.	52
Tabla 7: Medio de libre de nitrógeno “ <i>Norris Glucose</i> ”.	57
Tabla 8: Sistema de clasificación del ataque de sigatoka negra en hojas de banano según Stover, modificada por Gauhl (Orjeda, 1998; Morales Romero <i>et al.</i> , 2011).....	64
Tabla 9: Parámetros que intervienen en el cálculo del Índice de Severidad (IS) de Townsend y Heuberguer.	64
Tabla 10: Datos del número de cepas del primer y segundo aislamiento.	67
Tabla 11: Resumen cepas aisladas por provincias.	69
Tabla 12: Cepas de la primera fase identificadas a nivel de géneros y especies.	71
Tabla 13: Grupos RFLP obtenidos como combinación de los modelos generados al cortar con cinco enzimas de restricción el gen 16S rRNA tras su amplificación mediante PCR.....	90
Tabla 14: Análisis multicriterio para la elección de la técnica primaria de agrupación previa de cepas, comparando RAPD y RFLP. Valores de 1 a 10 y ponderación sobre 100.	95
Tabla 15: Análisis de la biodiversidad de la colección asociada a los modelos RFLP.	97
Tabla 16: Análisis de contingencia de grupos RFLP según su origen. Solamente se han considerado aquellos grupos de PCPR-RFLP constituidos por 4 o más cepas. Los valores indicados en la tabla corresponden al recuento de bacterias, mientras que los números entre paréntesis son los residuos tipificados y corregidos correspondientes a la diferencia entre el recuento de bacterias y el número de bacterias pronosticado por el modelo.....	99

Tabla 17: Especificidad de los diferentes géneros de la colección.....	104
Tabla 18: Índice de diversidad de Shannon (H) para cada una de las localidades donde se realizaron aislamientos de bacterias asociadas a las raíces de banano.	106
Tabla 19: Eigenvalores, porcentajes y varianza acumulada en el Análisis de Componentes Principales (ACP) de 11 localidades donde se aislaron bacterias endofíticas y rizosféricas en relación a 18 parámetros físico-químicos de suelo y el índice de diversidad de Shannon basado en la matriz de 0/1 del ARDRA.	107
Tabla 20. Valores de los eigenvectores para cada uno de los 18 parámetros físico-químicos de suelo y el índice de diversidad de Shannon basado en la matriz de 0/1 del ARDRA, sobre los cuatro primeros C.P. ACP de 11 localidades donde se aislaron las bacterias endofíticas y rizosféricas.....	107
Tabla 21: Análisis de contingencia con la relación entre diferentes parámetros indicadores de la actividad PGP <i>in vitro</i> y la procedencia de las cepas (endofíticas frente a rizosféricas).....	113
Tabla 22: Análisis de contingencia con la relación entre diferentes parámetros indicadores de la actividad PGP <i>in vitro</i> y el grupo RFLP del gen 16S rRNA al que pertenecen (según Tabla 13). Solos los grupos RFLP con cuatro o más cepas fueron incluidos en el análisis.	114
Tabla 23: Eigenvalores, porcentajes y varianza acumulada en el análisis de componentes principales (ACP) de las 77 cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase, en relación con cinco propiedades PGP, para seleccionar aquéllas destinadas a los ensayos en planta.	127
Tabla 24: Valores de los eigenvectores de cinco propiedades PGP, sobre los cuatro primeros C.P. ACP correspondiente a 77 cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase, para seleccionar aquéllas destinadas a los ensayos en planta.	128
Tabla 25: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP <i>in vitro</i> , sobre plantas de banano en vivero, frente a un control sin inocular.	131
Tabla 26: Valores medios de seis parámetros indicadores del crecimiento de plantas de banano en vivero, con el objeto de evaluar el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP <i>in vitro</i> , frente a un control sin inocular. Los tratamiento se han ordenado de menor a mayor por el valor del peso seco de la parte aérea.....	132
Tabla 27: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar en campo el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP <i>in vitro</i> , sobre la variable número de hojas a intervalos regulares de tiempo, frente a un control sin inocular.	134
Tabla 28: Valores medios del número de hojas por planta en el ensayo de inoculación de banano en campo. En ningún parámetros existen diferencias significativas para $p < 0,05$	135

Tabla 29: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar en campo el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP <i>in vitro</i> , sobre varios parámetros agronómicos en el momento de la floración y la cosecha, frente a un control sin inocular.	135
Tabla 30: Valores medios de varios parámetros agronómicos en el ensayo de inoculación de banano en campo. En ningún parámetros existen diferencias significativas para $p < 0,05$	136
Tabla 31: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar en campo el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP <i>in vitro</i> , sobre el rendimiento por planta y sus componentes, frente a un control sin inocular.	136
Tabla 32: Valores medios del rendimiento por planta y sus componentes en el ensayo de inoculación de banano en campo.....	137
Tabla 33: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos de primera hoja necrótica por efecto de la sigatoka negra en campo, a intervalos regulares de tiempo, en cinco tratamientos con bacterias seleccionadas en base a su capacidad PGPR <i>in vitro</i> frente a un control sin inocular.	139
Tabla 34: Prueba en cámara de cultivo sobre la inducción de resistencia contra sigatoka negra mediante bacterias PGPRs. Se presentan los valores medios alcanzados por diferentes parámetros indicadores de la incidencia de la enfermedad.	144
Tabla 35 Anejo 1A: Análisis de suelo de las diferentes localidades de recolección de muestras.	197
Tabla 36 Anejo 1B: Datos de los diferentes resultados obtenidos de las pruebas <i>in vitro</i> realizadas a las bacterias endofíticas y rizosféricas de la colección.....	199

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Flor masculina e inflorescencia fructificada de <i>Musa acuminata</i>	5
Figura 2: Diferentes frutos de <i>Musa acuminata</i> , exhibiendo una gama de colores que van desde verde-amarillo a rojo.....	6
Figura 3: <i>Musa textilis</i>	8
Figura 4: Ciclo de la Enfermedad de <i>M. fijiensis</i> Morelet.	12
Figura 5: CIRAD, Síntomas foliares causados por <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	13
Figura 6: CIRAD, Síntomas foliares causados por <i>Mycosphaerella Musicola</i>	14
Figura 7: Planta caída por lesiones en las raíces ocasionada por nematodo.....	15
Figura 8: Amarillamiento de las hojas y agrietamiento de la base del pseudotallo como consecuencia de la enfermedad del mal de Panamá.	16
Figura 9: Rayado de la hoja causado por BSV.	17
Figura 10: Síntomas a causa del BSV, el pseudotallo presenta necrosis interna y ruptura externa.....	17
Figura 11: Adulto de <i>Pentalonia nigronervosa</i>	18
Figura 12: Síntomas del virus BBTV en hojas e Inflorescencia.	19
Figura 13: producción y área cosechada de banano	22
Figura 14: Exportaciones brutas de bananos R.D.....	24
Figura 15: Exportaciones de banano R. D.....	24
Figura 16: Exportaciones en porcentaje de los años 2010, 2011 y 2012.....	26
Figura 17: Esquema de la secuencia seguida con los aislados para su utilización sobre plantas y la elaboración de biofertilizante.	37
Figura 18: Plan de trabajo para el desarrollo de los objetivos planteados.	42
Figura 19: Cuatro cultivos puros de cepas bacterianas endofíticas.	46
Figura 20: Amplificación gen 16S rRNA.	52
Figura 21: Homogeneizador de muestras BRAUN.....	59
Figura 22: Zonas de muestreos de las raíces asociadas al cultivo de banano en República Dominicana.	68

Figura 23: Árbol filogenético con las bacterias del grupo beta proteobacterias aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas. Este árbol y los demás hacen referencia a los grupos formados mediante técnica PCR-RFLP (4.3.2).	72
Figura 24: Árbol filogenético con las bacterias grupo Gram positivas aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas.	73
Figura 25: Árbol filogenético con las bacterias del grupo gamma proteobacterias aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas.	74
Figura 26: Árbol filogenético con las bacterias del grupo alfa proteobacterias aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas.	75
Figura 27: Perfiles RAPD de las cepas de la primera fase de aislamiento. MW marcador de peso molecular. Identidad de cada cepa de acuerdo al apartado 4.2. Entre paréntesis el grupo RFLP al que pertenecen (apartado 4.4).	77
Figura 28: Dendrograma resultante del análisis de la matriz de 0/1, del RAPD. Como coeficiente de similitud se ha utilizado la correlación de Pearson y el dendrograma se ha calculado con el método UPGMA. En color azul el nivel de similitud 100 % es decir idéntico patrón de bandas de RAPD.	82
Figura 29: Diferentes patrones de bandas obtenidos tras la digestión del gen 16S rRNA con las enzimas de restricción indicadas. MW marcador de peso molecular.	88
Figura 30: Dendrograma resultante del análisis ARDRA seleccionando un único representante por cada modelo RFLP del gen 16S rRNA, es decir un representante de cada grupo RFLP. Como coeficiente de similitud se ha utilizado la correlación de Pearson y el dendrograma se ha calculado con el método UPGMA.	92
Figura 31: Resumen sobre la viabilidad de las diferentes técnicas auxiliares para agrupar aislados como fase previa para la identificación de estos mediante secuenciación del gen 16S rRNA.	96
Figura 32: Proporción de los grupos de bacterias endofíticas y rizosférica.	98
Figura 33: <i>Biplot</i> obtenido tras el ACP de 11 localidades donde se aislaron bacterias endofíticas y rizosféricas en relación a 18 parámetros físico-químicos de suelo y el índice de diversidad de Shannon basado en la matriz de 0/1 del ARDRA. Se han representado sobre los dos primeros CP los valores de los eigenvectores de los 18 parámetros físico-químicos de suelo el índice H y las localidades.	108
Figura 34: Diferentes halos formados por cuatro cepas solubilizadoras de fosfato mineral.	122
Figura 35: Halo anaranjado formado alrededor de la cepa, lo cual es indicador de la producción de sideróforos.	124
Figura 36: Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> , se muestran tres cepas, a la izquierda no controladora (codificada como 0), en el centro controladora (codificada como 1) y a la derecha fuerte controladora (codificada como 2).	126

Figura 37: *Biplot* obtenido tras el ACP de cinco propiedades PGP de las cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase. Se han representado sobre los dos primeros CP los valores de los eigenvectores de las cinco propiedades PGP analizadas y las cepas, con el objetivo de seleccionar las cepas destinadas a los ensayos en planta..... 128

Figura 38: Valores medios de la primera hoja necrótica por efecto de la sigatoka negra en campo, midiendo desde el ápice hace la base, en cinco tratamientos con bacterias seleccionadas por su capacidad PGPR *in vitro*, frente a un control sin inocular. 141

Figura 39: *Biplot* obtenido tras el ACP de cinco propiedades PGP de las cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase. Se han representado sobre los dos primeros CP los valores de los eigenvectores de las cinco propiedades PGP analizadas y las cepas, con el objetivo de elegir las cepas destinadas a los ensayos de selección de cepas potencialmente útiles como inductoras de resistencia frente a sigatoka negra. 143

RESUMEN

El banano es un rubro importante en la economía de la República Dominicana, tanto como cultivo de subsistencia como para la exportación. En este último caso una parte importante se produce en régimen ecológico, cuya producción se dedica en un 85 % a la exportación. Las exigencias en la disminución del uso de insumos de síntesis en la agricultura ecológica, han llevado a buscar alternativas a la fertilización mineral y al uso de plaguicidas. Una de las principales estrategias propuestas y estudiadas es el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, PGPR).

El objetivo general del trabajo fue desarrollar biofertilizantes para banano (*Musa* sp.) en República Dominicana, utilizando bacterias autóctonas. Para ello se aislaron, caracterizaron y evaluaron en planta, bacterias asociadas a raíces de banano (*Musa acuminata* AAA) cv. Cavendish, procedentes de zonas productoras en régimen ecológico en República Dominicana. Se aislaron 262 cepas en dos fases, en una primera fase se aislaron 114 y en la segunda el resto.

Los 114 aislados de la primera fase fueron identificados mediante secuenciación del gen 16S rRNA. En 66 cepas se llegó a la identificación a nivel de especie, por presentar una similitud mayor o igual al 99,5 % en la secuencia de dicho gen con respecto a alguna cepa tipo. Veintinueve presentaron una similitud inferior a ese valor y no puede asegurarse su identidad a nivel de especie, y el resto pertenecieron a complejos de especies que no pueden identificarse solamente en base al mencionado gen. Los 114 aislados pertenecieron a 20 géneros diferentes, siendo los mayoritarios *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*.

En la colección completa se evaluaron *in vitro* diferentes parámetros indicadores de la capacidad para promover el crecimiento vegetal (*Plant Growth Promotion*, PGP) como son la producción de la hormona ácido indolacético (IAA), la producción de sideróforos, la actividad ACC (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano) desaminasa, la capacidad de solubilizar fosfato mineral, la fijación de nitrógeno atmosférico y la capacidad controlar por antagonismo el crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (sigatoka negra). Se observó que si bien existen ciertas tendencias a que determinados grupos taxonómicos presenten una mayor expresión de algunas de las propiedades PGP – como por ejemplo la producción de IAA en los géneros *Pseudomonas* o *Enterobacter* y la fijación de N en vida libre por parte de *Bacillus* – en la mayor parte de los casos se trata de caracteres dependientes de cepa.

Entre las cepas aisladas en la primera fase, se seleccionaron 5 endofíticas y pertenecientes a taxa seguros, para destinarlas a ensayos en planta, bajo dos sistemas de producción diferentes: i) Producción de planta destinada al trasplante (en vivero); ii) producción de fruta en campo. La selección se basó en los resultados de las pruebas PGP *in vitro*, mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP), priorizando la

producción de sideróforos. Las cepas seleccionadas pertenecieron al género *Pseudomonas*, de las cuales 2 de la especie *P. plecoglossicida* mejoraron significativamente el crecimiento de planta en vivero, y una de ellas también la producción de fruta en el campo. Dicha cepa además produjo un retraso significativo en el proceso infectivo del hongo sigatoka negra en campo, lo que se atribuyó a fenómenos de resistencia sistémica inducida.

Se realizó también un ensayo bajo ambiente controlado en cámara de cultivo con 26 cepas seleccionadas de acuerdo a las propiedades *in vitro* ya mencionadas, con el objetivo de evaluar la capacidad de inducir resistencia sistémica a las plantas de banano frente a sigatoka negra. Se observó que varias cepas del género *Bacillus* redujeron el índice de severidad de la infección del patógeno, incluso más que la cepa de *P. plecoglossicida* que dio buen resultado en campo.

Otro objetivo del trabajo fue seleccionar el marcador molecular más adecuado para realizar una agrupación previa de aislados, con el objeto de secuenciar el gen 16S rRNA en el mínimo número de éstos. Esta agrupación previa resulta útil cuando se trabaja con colecciones grandes y muy diversas. Se probó la técnica PCR-RFLP del gen 16S rRNA y la técnica RAPD. La primera proporcionó mejores resultados si bien no permite agrupar a nivel de especie o subespecie, sino a nivel de género, y en algunos casos de grupos de géneros afines. Por eso se ha propuesto como alternativa aplicar primero la técnica de PCR-RFLP y a continuación la técnica RAPD en los aislados con el mismo modelo PCR-RFLP, si bien en ocasiones diferentes cepas de la misma especie presentan patrones RAPD muy diferentes, lo que sobrestima el número de especies presentes.

Este trabajo permite concluir que las PGPRs como biofertilizantes, y biocontroladores de sigatoka negra, son una alternativa válida a los abonos minerales y a los fitosanitarios en banano, pues los mismos son capaces de aumentar el rendimiento y reducen la incidencia de dicho patógeno. También se han seleccionado genotipos bacterianos concretos, que por no existir diferencias importantes entre las poblaciones bacterianas de las diferentes localidades de muestreo – como demuestra el análisis matemático de los patrones PCR-RFLP – podrían ser eficaces en diferentes zonas del área del Caribe.

ABSTRACT

Banana is an important item in Dominican Republic economics as a subsistence crop as well as for its exportation. In the latter case, a major part is produced under organic conditions, which production is dedicated to exportation in an 85 %. The demands for a reduction in the use of synthesis inputs in organic farming have led to look for alternatives to the mineral fertilization and the use of pesticides. One of the main proposed and studied strategies is the use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

The overall objective of the work was the development of biofertilizers for banana (*Musa* sp.) in Dominican Republic by using native bacteria. In order to do so, bacteria associated to banana roots (*Musa acuminata* AAA) cv. Cavendish, coming from organic producing areas in Dominican Republic, were isolated, characterized and assessed in plant. Two hundred and sixty two strains were isolated in two phases, 114 being isolated in the first phase and the rest in the second one.

The 144 isolated in the first phase were identified by the sequentiation of the 16S rRNA gene. Sixty six strains were identified at species level, as they showed similarity level greater than or equal to 99.5 % in comparison to any strain type in the sequence of such gene. Twenty nine showed a similarity level below that figure and the identification at species level could not be claimed, whereas the rest belonged to species complexes that cannot be identified by only the aforementioned gene. The 114 isolates belonged to 20 different genera, being *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Enterobacter* the majority ones.

Different indicator parameters of Plant Growth Promotion (PGP), like production of the hormone indoleacetic acid (IAA), siderophores production, 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity, solubilization of mineral phosphate, atmospheric nitrogen fixation and the control of the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (black sigatoka) by antagonism, were *in vitro* assessed in the complete collection. It was observed that, although certain taxonomic groups show trends of greatest expression of some PGP properties – such as IAA production in *Pseudomonas* or *Enterobacter* genus and N fixation by free-living *Bacillus* – in most of the cases they are strain-dependent characteristics.

Among the first-phase isolated strains, 5 endophyte and belonging to safe taxa were selected for plant assays under two different production systems: i) production of plant intended for transplanting (plant nursery) and ii) field fruit production. The selection was based on the results of the *in vitro* PGP trials, by a Principal Component Analysis (PCA), where siderophores production was prioritized. The selected strains belonged to *Pseudomonas* genus. Two strains of *P. plecoglossicida* significantly improved the plant growth in the plant nursery and one of them, also increased the fruit production in the field assay. Such strain also produced a significant delay in the

infective process of black sigatoka fungus in the field, which was attributed to phenomena of induced systemic resistance.

An assay under controlled environment, in growth chamber, with 26 strains selected according to the aforementioned *in vitro* properties was also carried out, with the objective of evaluating the possible induction of systemic resistance in banana plants against black sigatoka. It was observed that some strains of the *Bacillus* genus reduced the severity index of the pathogen infection, even more than the *P. plecoglossicida* strain that produced good results in the field.

Another objective of the work was to select the most suitable molecular marker for a preliminary grouping of the isolates, in order to sequence the 16S rRNA gene in the minimum number of isolates. Such grouping is useful when working with large and diverse collections. PCR-RFLP of the 16S rRNA gene and RAPD techniques were tried. The first one gave better results, though it was not possible to group the isolates at the species or subspecies level. Instead, they were grouped at the genus level, and in some cases, some groups consisted of narrowly related genera. For this reason, it was proposed to use the PCR-RFLP technique first, following the RAPD technique within each single PCR-RFLP model. However, sometimes strains of the same species show very different RAPD patterns, which overestimates the real number of species in the collection.

This work allows us to conclude that the PGPRs are a valid alternative to mineral fertilizers and pesticides in banana, as they can increase the plant yield, and they reduce the effect of the pathogen black sigatoka. We have also selected specific strains to be used as biofertilizers in banana. Presumably they could be useful even in different Caribbean places, because there are not important variation between the bacterial populations among the sampling localities.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales del banano (*Musa* sp.)

1.1.1. Sistemática del género *Musa*

La sistemática del banano género *Musa* sp. según el sistema desarrollado por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas (The Angiosperm Phylogeny Group 2003) corresponde a:

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Liliopsida*
- Subclase: *Commelinidae*
- Orden: *Zingiberales*
- Familia: *Musaceae*
- Género: *Musa*

Este género contiene entre 30 y 40 especies diploides nativas del Sureste de Asia (Ortiz, 1997; Hakkinen & Wang, 2008). Según Roux *et al.*, (2008) el género *Musa* se compone de cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Eumusa* y *Rhodochlamys*. Otros autores incluyen además de estas, otra sección llamada *Ingentimusa* (Wong *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2010; Ortiz, 2011). Los **bananos** comestibles proceden de la especie botánica *Musa acuminata*, la mayoría de estos bananos comestibles se originaron a partir de dos especies diploides de la sección *Eumusa*: *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B) (Doležel *et al.*, 1994; Aert *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004; Villaverde *et al.*, 2013). Según el número de juegos cromosómicos que posean las especies de banano, pueden ser diploides, triploides (Ball *et al.*, 2006) y tetraploides (Ortiz, 1997).

Los bananos comestibles se sitúan en las secciones *Australimusa* y *Eumusa*. Dentro de *Australimusa* se encuentra *Musa textilis* Neé, endémica de Filipinas, conocida como abacá o cáñamo de Manila (Richter *et al.*, 2013), que es muy parecida a *Musa paradisiaca* Linn, con la diferencia que su fruto tiene semilla y no es adecuada para el consumo humano. Según Li *et al.* (2010), la sección *Australimusa* contiene 9 especies con $x=10$ cromosomas y está distribuida por Filipinas, Indonesia, Papúa Nueva Guinea y el Norte de Australia. *Eumusa* está compuesta de 21 especies distribuidas por India y Malasia y la zona comprendida entre el Sudeste Asiático y el Norte de Australia con un número cromosómico de $x=11$. *Ingentimusa* cuenta con la especie *Musa ingens* N.M.

Simmonds con un número cromosómico $x=7$ distribuida por Papúa Nueva Guinea (Wong *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2010).

Existen otras especies en las secciones *Callimusa* y *Rhodochlamys*, son sólo de interés ornamental y no producen frutos comestibles. *Callimusa* posee 22 especies siendo esta la mayor de las secciones con $x=10$ cromosomas, esta sección desde la India y Malasia hasta Indonesia, especialmente Borneo (Li *et al.*, 2010). La sección *Rhodochlamys* está constituida por 12 especies con el mismo número de cromosomas que la anterior (Li *et al.*, 2010).

1.1.2. Morfología y biología

Los bananos son monocotiledóneas herbáceas que carecen de verdadero tronco, en su lugar poseen un **pseudotallo** formado por hojas curvadas y comprimidas dispuestas en espiral, con un peciolo de 30 a 90 centímetros (Roux *et al.*, 2008). Las nuevas hojas van formándose y emergen por la parte superior de este pseudotallo (Fortescue & Turner, 2005a), presentando forma cilíndrica antes de extenderse. La altura del banano depende del número de hojas que produzca la planta (Crouch *et al.*, 2000), pudiendo producir a lo largo de su desarrollo entre 25 y 50 hojas, llegando alcanzar una altura que va desde 2 a 15 metros de altura según el genotipo (Roux *et al.*, 2008).

El **tallo verdadero** de las musáceas es un rizoma subterráneo (Fortescue & Turner, 2005a) que se considera como la parte perenne de la planta, ya que de su base, además de formarse numerosas raíces cortas y cilíndricas se desarrollan también varias yemas axilares de las cuáles nacen hijuelos que permiten su longevidad.

La **inflorescencia** que nace de la corona de las hojas durante la floración es botánicamente un tirso (Kirchoff, 1992), esta inflorescencia se desarrolla alrededor de un mes después de que se haya completado el desarrollo foliar de la planta (Roux *et al.*, 2008). Las flores en el género *Musa* son monoicas, y hermafroditas en las especies *Musa velutina* H. Wendl. & Drude (Nur, 1976; Kirchoff, 1992; Joe *et al.*, 2014), *Musa acuminata* Banksii F. Muell y *Musa schizocarpa* N.W. Simmonds (Kirchoff, 1992). Las flores son irregulares y sésiles con seis tépalos y seis estambres, uno de los cuales está reducido a un estaminodio petaloideo. El gineceo está compuesto por tres pistilos y el ovario es ínfero (Fortescue & Turner, 2005b).

En la inflorescencia, las flores están dispuestas en espiral al igual que las hojas en el pseudotallo. Se sitúan en grupos constituidos por 12 a 20 flores colocadas en dos filas y protegidas por una bráctea de color rojizo (Roux *et al.*, 2008). Las flores que producen frutos se encuentran en los grupos de la parte basal del raquis, mientras que las denominadas masculinas están en la parte distal de la inflorescencia (Fortescue & Turner, 2005c) (Figura 1).

Figura 1: Flor masculina e inflorescencia fructificada de *Musa acuminata*.

Cada grupo de flores correspondientes a cada bráctea forman un conjunto de **frutos** que se denomina mano, pudiendo contener de 3 a 20 frutos. La infrutescencia puede llevar entre 4 manos en las variedades menos productivas y hasta 12-14 en las comerciales. El epicarpio del fruto es de naturaleza coriácea y color verde en el ejemplar inmaduro, durante el proceso de madurez posterior a la cosecha cambia de color, exhibiendo una gama desde verde-amarillo a rojo, difiriendo entre cultivares (INIBAP & IPGRI, 1996) (Figura 2). Los frutos también difieren en cuanto a la forma, tamaño y sabor de la pulpa (Roux *et al.*, 2008).

El fruto del banano se produce mediante partenocarpia vegetativa y tarda entre 80 y 180 días en desarrollarse por completo. Por ser un fruto climatérico continúa madurando después de la cosecha, lo que está regulado por la concentración de etileno (Roux *et al.*, 2008; Anyasi *et al.*, 2013).

Figura 2: Diferentes frutos de *Musa acuminata*, exhibiendo una gama de colores que van desde verde-amarillo a rojo (Lim, 2012a, 2012c, 2012d; FAO, 2013, 2014a).

1.1.3. Biogeografía

El banano es una de las frutas más antigua conocida por la humanidad (Akila *et al.*, 2011). El proceso de domesticación del género *Musa* comenzó hace unos 7.000 años (D'Hont *et al.*, 2012). El centro de origen se sitúa entre India y el sudeste de Asia hasta la Polinesia (Zhang *et al.*, 2005; D'Hont *et al.*, 2012). El principal centro de diversidad parece encontrarse en Malasia (Daniells *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2001) o Indonesia (Horry *et al.*, 1997), existiendo un segundo centro de diversificación en África (Swennen *et al.*, 1995). Los proto-Polinesios extendieron cultivares comestibles desde Asia continental hacia las islas del Pacífico (Daniells *et al.*, 2001), y parece que ellos mismos los llevaron también hasta África (Ortiz, 2011). Langdon (1993) apunta a la posibilidad de que los bananos existieran en América del Sur en la época precolombina, y sugiere que podría estar ligada a la migración temprana de los polinesios hacia América.

Los **bananos** proceden de la especie botánica *Musa acuminata* y los **plátanos** surgieron por la hibridación natural entre *Musa acuminata*, que aportó el genoma A y *Musa balbisiana* que aportó el genoma B, los cuales son en su mayoría triploides comestibles del tipo AAB, ABB y BBB (Fortescue & Turner, 2005d; Anyasi *et al.*, 2013).

La influencia humana actuó sobre el mencionado germoplasma y contribuyó al desarrollo de nuevas subespecies (Perrier *et al.*, 2011). Se piensa que el desarrollo de dichas subespecies ha sido consecuencia de mutaciones somáticas, al no existir propagación por vía sexual (Daniells *et al.*, 2001), ya que se trata de frutos partenocárpicos, por lo tanto sin semillas.

1.1.4. Etnobotánica

El banano se cultiva en regiones tropicales y es fundamental para el desarrollo de la economía (De la Torre-Gutiérrez *et al.*, 2008). Constituyen el octavo cultivo alimentario más importante del mundo y el cuarto en los países menos desarrollados después del arroz, trigo y maíz (Arias *et al.*, 2004), además es un cultivo abundante en muchos países en desarrollo (Aurore *et al.*, 2009).

Las razones del uso de la fruta fresca del banano como alimento por las poblaciones humanas es su alto valor energético, aporte de sales minerales como potasio y magnesio (Harish *et al.*, 2008), aporte de vitaminas esenciales (C y B) (Bezerra *et al.*, 2013) y su bajo contenido en grasa (Tabla 1).

Tabla 1: Contenido de nutrientes del Banano por cada 100 g de peso de Pulpa.

Contenidos	Cantidad
Agua	75 g
Hidratos de carbono digestibles	20 g
Grasa bruta	0,3 g
Fibra bruta	0,3 g
Vitamina B6	0.3 mg
Vitamina C	11 mg
Potasio	400 mg
Magnesio	34 mg
Energía	460 kJ

Aparte del consumo como fruta fresca, de la pulpa del banano también se elabora puré, para ser consumido principalmente por niños como alimento sólido. La pulpa también se somete a fermentación para producir bebidas alcohólicas (Roux *et al.*, 2008). En algunas regiones se produce harina que se utiliza en refrescos, sopas, etc. La inflorescencia de *Musa sapientum* se utiliza como verdura en el sur de la India (Gomathy *et al.*, 1989; Jayamurthy *et al.*, 2013).

Además de ser una fuente de alimento, las plantas del género *Musa* se utilizan también como plantas medicinales (Borges *et al.*, 2005; Vlkova *et al.*, 2011). En el norte de América del Sur, es usado en farmacopeas por los indígenas (Bennett & Prance, 2000), por poseer propiedades terapéuticas. El banano contiene tanto en la pulpa como en la piel, agentes antioxidantes como la dopamina, que es una Catecolamina empleada para incrementar la frecuencia cardiaca y la presión arterial (Kanazawa & Sakakibara, 2000). También el jugo del tallo es usado por los que practican la medicina natural para la reducción de la obesidad y la diabetes (Gomathy *et al.*, 1989; Jayamurthy *et al.*, 2013).

La especie *Musa textilis* Neé (Figura 3) se cultiva para la producción de fibras con fines comerciales en Filipinas y Ecuador debido a la alta resistencia que poseen (Mante & Tepper, 1983). Con las fibras se elaboran cordeles, pastas y papeles especiales, tejidos no sintéticos de uso médico (Armecin & Gabon, 2008).

Figura 3: *Musa textilis* (INIBAP, 2001).

1.2. El cultivo del banano

1.2.1. Material vegetal

Los bananos silvestres son diploides, mientras que la mayoría de los cultivares comestibles son triploides procedentes de *Musa acuminata* (Fortescue & Turner, 2005c; D'Hont *et al.*, 2012). En la actualidad la producción comercial de banano en el mundo se basa en somaclones derivados de un solo genotipo denominado Cavendish, del grupo genómico AAA, pero la producción de musáceas comestibles a nivel mundial incluye también plátanos con el grupo genómico B, procedentes de *Musa balbisiana* (Fortescue & Turner, 2005c) (Tabla 2).

Tabla 2: Especies y cultivares de musáceas (Fortescue & Turner, 2005c).

Ploidía	Especie, cultivares y genoma
Diploides (AA)	<i>M. acuminata</i> y <i>Ensete</i> sp.
Triploides (AAA)	<i>M. acuminata</i> (derivadas del subgrupo Cavendish): Chínese Cavendish, Dwarf Cavendish, Grand Nain, Hsien Jen Chiao, New Guinea Cavendish, Williams y Valery
Triploides	Híbridos de <i>M. acuminata</i> (AA) x <i>M. balbisiana</i> (BB): Da Jaio (ABB), Bluggoe (ABB), Silver Bluggoe (ABB), Ducasse (ABB), Horn Plantain (AAB)
Tetraploide (AAAB)	Gold Finger

1.2.2. Propagación del género *Musa*

El cultivo de banano se propaga asexualmente mediante la extracción de vástagos que emergen desde el rizoma subterráneo de la planta madre denominados “cormos” (Arias *et al.*, 2004; Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007) que al dejarlos desarrollar constituirán nuevas plantas y servirán para ir sustituyendo a las que han completado su ciclo productivo. Este método de propagación, aunque transmite las características genéticas deseables del cultivo, es sin embargo el medio más común por el cual se diseminan las plagas y enfermedades dentro de las plantaciones, ya que no se produce el remplazo del material vegetativo ya infectado por otro sano, lo que hace que el cultivo pierda rentabilidad y calidad (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007). Otra forma de propagar el banano es de manera *in vitro*, proceso por el cual se pueden obtener una gran cantidad de plantas procedentes de meristemos con las mismas características genéticas en producción y tipo de racimo que la planta madre (Jalil *et*

al., 2008). Presenta la ventaja de que por proceder del meristemo, que es una parte de la planta libre de virus y otros patógenos, se obtienen plantas inicialmente sanas (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007).

En los países con climas tropicales y subtropicales donde se cultiva el banano, la plantación se puede realizar durante todo el año. Si se utilizan “cormos” como método de propagación, la mejor época es la comprendida entre los meses de agosto y octubre, ya que este es el momento en el que hay mayor abundancia de este material (FAO, 1999).

1.2.3. Ecología del cultivo

Como se mencionó anteriormente, los bananos se desarrollan mejor en regiones tropicales (Li *et al.*, 2010) y subtropicales (Carmona-García *et al.*, 2009). Las condiciones óptimas de **temperatura** oscilan entre 26 °C a 32 °C, mientras que las temperaturas inferiores a 18 °C y superiores a 36 °C inhiben el desarrollo (Lim, 2012b). La **humedad relativa** óptima debe ser elevada entre el 70 y 90 %. La **altitud** ideal es de 0 a 400 msnm, entre los 400 a 800 msnm la adaptación del cultivo es moderada y las alturas superiores de los 800 msnm no son aptas.

El **agua** es junto con los nutrientes, un factor limitante de primer orden en la agricultura (Durán *et al.*, 2013). Al igual que otros cultivos las necesidades de agua del banano son elevadas y el déficit hídrico se refleja en la pérdida del color verde de las hojas del cultivo y en una reducción de la producción (Shongwe *et al.*, 2008). En ausencia de riego puede cultivarse en zonas con precipitaciones anuales entre 1.500 y 4.000 mm, con la condición de que estén distribuidas a lo largo del ciclo del cultivo. Las necesidades de agua de riego para obtener rendimientos elevados oscilan entre 1.200 mm en el trópico húmedo y 2.200 mm en el trópico seco al año (FAO, 2014c).

El banano se desarrolla en un amplio rango de **suelos**, que van desde condiciones de bastante pobreza hasta suelos muy fértiles, precisando profundidades entre 1,20 y 1,50 metros, ya que los rendimientos pueden deprimirse si en el suelo hay una capa compacta o pedregosa entre 40 y 80 centímetros de profundidad. La topografía debe de ser plana o con pendientes no mayores al 2 %. En cuanto a la textura, el óptimo es el suelo franco, que puede oscilar entre franco-arenosa y ligeramente arcillosa, deprimiéndose la producción en suelos con alta concentración de arcilla. Es

fundamental un buen drenaje natural, y a su vez una buena capacidad de retención de agua, para que la producción sea económicamente rentable (Lim, 2012b).

El pH óptimo es ligeramente ácido, entre 5,5 y 6. Al ser el banano producido en sistemas de monocultivo y en condiciones intensivas, suele estar asociado a una pérdida continua de materia orgánica edáfica, que paradójicamente es necesaria para mantener las condiciones de buen drenaje y buena capacidad de retención de agua que requiere el cultivo. El empobrecimiento de los suelos como consecuencia del cultivo intensivo se suele compensar con fuertes cantidades de abono mineral, pudiéndose considerar al banano exigente en fertilizantes (Mia *et al.*, 2010a, 2010b), fundamentalmente nitrogenados y potásicos, para alcanzar una buena producción comercial. Sin duda la baja fertilidad del suelo es, a nivel mundial, una de las principales restricciones para obtener un crecimiento y rendimiento óptimo (Mia *et al.*, 2010b).

1.2.4. Plagas y enfermedades que afectan al banano

Junto con la baja fertilidad del suelo y las limitaciones hídricas, las plagas y enfermedades son el otro gran factor limitante de los rendimientos y la calidad de la producción, y responsables del aumento de los costos del cultivo. Los bananos que solo poseen características genómicas (A) son los más vulnerables, lo cual les hace más propensos a ser afectados por plagas y enfermedades, no siendo así en algunos genotipos tetraploides que poseen alguna característica del genoma (B), y se comportan resistentes frente al ataque de algunas de estas plagas y enfermedades (Rivas, 2001; Riveros & Arciniegas, 2003). A continuación se describen las plagas y enfermedades con mayor repercusión económica en el cultivo.

Sigatoka negra y sigatoka amarilla

Unas de las principales afecciones del banano son la Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Etebu *et al.*, 2003; Viveros Folleco & Castaño Zapata, 2006; Chuc-Uc *et al.*, 2011; Vishnevetsky *et al.*, 2011; Portal *et al.*, 2012) y sigatoka amarilla causada por el hongo *Mycosphaerella musicola* Leach (Ferreira *et al.*, 2004). Estos patógenos están presente en todos los países donde se cultivan las musáceas, reduciendo el área foliar funcional de la planta, lo que disminuye el rendimiento del cultivo (Lhomme & Franciso Jiménez, 1992; Viveros Folleco & Castaño

Zapata, 2006). Afectan también al desarrollo fisiológico de la planta, propiciando una maduración prematura de la fruta (Valerio *et al.*, 2002; Ceballos *et al.*, 2012).

Mycosphaerella es un hongo ascomycete que se reproduce de manera teleomorfa o sexual y anamorfa o asexual (Bennett & Arneson, 2003). Este hongo produce pseudotecios o ascostromas donde se producen las ascosporas en la reproducción sexual y conidióforos para la reproducción asexual, sobre la superficie de las hojas (Etebu *et al.*, 2003) (Figura 4). Las condiciones óptimas de alta humedad y lluvias, ayudan a una proliferación del hongo más efectiva y su diseminación en la plantaciones es por acción del viento, siendo las ascosporas las que más distancias recorren y proveen el medio más eficaz de propagación de esta enfermedad (Bennett & Arneson, 2003).

Figura 4: Ciclo de la Enfermedad de *M. fijiensis* Morelet (Bennett & Arneson, 2003).

Los síntomas de la sigatoka negra se presentan con rayas y manchas, que al inicio tienen el color negro (Figura 5), y carecen del halo amarillo característico de la sigatoka amarilla (Figura 6). Ambas lesiones al aparecer por primera vez pueden ser semejantes, pero se pueden distinguir examinando la forma de los conidióforos de la sigatoka negra, ya que estos se producen en grupos pequeños, no siendo así en la sigatoka amarilla (Bennett & Arneson, 2003).

Figura 5: CIRAD, Síntomas foliares causados por *Mycosphaerella fijiensis* (Carlier *et al.*, 2002).

La Sigatoka negra afecta primero a las hojas más viejas, de manera que se propaga desde la base del pseudotallo hasta el ápice. La hoja más joven en resultar afectada suele ser la tercera o cuarta hoja abierta contando desde el ápice (Bennett & Arneson, 2003). Los tratamientos contra la enfermedad o bien la tolerancia genética intrínseca, mantiene sanas un mayor número de hojas jóvenes. Esta enfermedad está considerada como el mayor problema del cultivo de bananos a nivel global, pudiendo reducir el rendimiento entre un 30-50 % durante el ciclo de producción (Mobambo *et al.*, 1993; Canto-Canché *et al.*, 2007; Guzmán Piedrahita, 2011; Cruz-Cruz *et al.*, 2011; Chuc-Uc *et al.*, 2011; Portal *et al.*, 2012).

Figura 6: CIRAD, Síntomas foliares causados por *Mycosphaerella Musicola* (Carlier *et al.*, 2002).

Lesiones ocasionadas por nematodos

En los cultivos de banano, después de las lesiones foliares ocasionadas por *Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola*, los nematodos son el siguiente factor biótico limitante que afectan el crecimiento y desarrollo del cultivo (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007), debido al daño ocasionado en raíces y cormos (Bellamy, 2013). En la mayoría de los países tropicales el nematodo barrenador *Radopholus similis* ((Cobb) (Thorne)), y los “nematodos lesionadores” de las raíces *Pratylenchus* sp., son los que causan mayores daños (Loranger-Merciris *et al.*, 2012). Estos nematodos se alimentan directamente de las raíces primarias y laterales, causando necrosis, afectando la nutrición y reduciendo el anclaje radicular del cultivo (Tixier *et al.*, 2006).

El nematodo barrenador causa lesiones negro-rojizas en la región externa de la raíz, penetrando a través del córtex, hasta producir una atrofia del tejido radical. Un alto nivel de incidencia de este nematodo puede causar lesiones múltiples del rizoma y necrosis hasta causar la caída de la planta (Figura 7).

Figura 7: Planta caída por lesiones en las raíces ocasionada por nematodo (ProMusa, 2014a).

Los bananos afectados por *Pratylenchus* sp. presentan síntomas que se manifiestan en la raíz en forma de nudos, agallas, ramificación excesiva de la raíz y puntas dañadas, además se producen extensas necrosis de color negro o violáceo en los tejidos epidérmicos y corticales de las raíces, que provocan lesiones y ruptura en las mismas, llevando a una reducción en la cosecha (Elsen *et al.*, 2002).

El mal de Panamá

La enfermedad del Mal de Panamá también afecta a la producción comercial del banano y es provocada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, existiendo desde la raza 1 a 4 siendo esta última la más virulenta (Ploetz, 2006; Li *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013). La raza 4 afecta a los principales cultivares, que en su conjunto constituyen más del 80 % de la producción total, incluyendo a la variedad Cavendish (Ploetz, 2005).

El hongo penetra en la planta a través de sus raíces (Sun *et al.*, 2013). Los síntomas externos se caracterizan por un amarillamiento de las hojas más viejas o una marchitez de las hojas aún verdes, en la unión del peciolo con el pseudotallo. Puede o no

manifestarse un agrietamiento en la base del pseudotallo de la planta (Ploetz, 2006) (Figura 8).

Figura 8: Amarillamiento de las hojas y agrietamiento de la base del pseudotallo como consecuencia de la enfermedad del mal de Panamá (ProMusa, 2014b).

El Mal de Panamá solamente puede ser controlado por cuarentena y eliminación del material infectado. No hay ningún otro método para reducir la población del patógeno que resulte económicamente rentable. Como consecuencia de un ataque de la raza 1 de este hongo sobre la variedad Gros Michel (*Musa* AAA), que era usada masivamente en plantaciones comerciales en la década de los 1950 (Hwang & Ko, 2004; Wu *et al.*, 2013), fue necesario sustituirlo por la variedad Cavendish (Ploetz, 2006).

Virus del rayado del banano (*Banana Streak Virus*, BSV)

Este patógeno pertenece al grupo de virus del género *Badnavirus* (Remans *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2013), de la familia *Caulimoviridae* (Iskra-Caruana *et al.*, 2014) y es causante de la enfermedad de la sigatoka viral en el género *Musa* (Harper *et al.*, 2004). Se manifiesta con un rayado clorótico en las hojas que al avanzar se transforma en necrótico (Figura 9). Un aspecto característico de esta enfermedad es que se propaga durante la producción *in vitro* de las plantas de banano y el posterior desplazamiento del material vegetal de este cultivo (Harper & Hull, 1998).

Figura 9: Rayado de la hoja causado por BSV (Vegas Rodríguez & Rojas Llanque 2011).

Las plantas infectadas por el BSV se caracterizan por tener un crecimiento reducido, poco vigor, racimos pequeños y frutos deformes, lo que lleva a un bajo rendimiento del cultivo (Harper & Hull, 1998) y las plantas severamente afectadas mueren. Otras características de esta enfermedad es que causa la muerte de la hoja naciente de la parte superior de la planta u hoja bandera, además de la necrosis interna del pseudotallo y la ruptura externa del mismo (Figura 10).

Figura 10: Síntomas a causa del BSV, el pseudotallo presenta necrosis interna y ruptura externa (Vegas Rodríguez & Rojas Llanque, 2011).

Virus del racimo de banano (*Banana Bunchy Top Virus, BBTV*)

Se trata de otro importante virus que afecta al cultivo del banano (Kavino *et al.*, 2008; Harish *et al.*, 2008; Chen & Hu, 2013), perteneciendo en este caso al género *Babuvirus* de la familia *Nanoviridae* (Oben *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2013). Es un virus sistémico que se establece en toda planta desde su infección. Es transmitido por el áfido del banano *Pentalonia nigronervosa* (Kumar *et al.*, 2011a) (Figura 11) y además se disemina a través de material vegetativo de reproducción infectado.

Figura 11: Adulto de *Pentalonia nigronervosa* (Scot, 2004).

Los síntomas iniciales de este virus se manifiestan con rayas verdes oscuras en las nervaduras de las hojas y a lo largo del pecíolo (Harish *et al.*, 2008). Las hojas más jóvenes al emerger son más rígidas y cortas, con bordes cloróticos (Chen & Hu, 2013) (Figura 12). La mayoría de las plantas infectadas a temprana edad con el BBTV tienen posibilidad de no florecer o fructificar, y de fructificar los frutos pueden ser deformes. Si el ataque se produce al inicio de la floración, los síntomas que se observan son un rayado clorótico a lo largo de las brácteas de la inflorescencia (Scot, 2004) (Figura 12).

Figura 12: Síntomas del virus BBTV en hojas e Inflorescencia (Scot, 2004).

1.3. Sistemas de producción del banano

1.3.1. Convencional

El banano es un cultivo extensivo de ciclo anual pero que se comporta como perenne debido al rebrote que se produce desde el rizoma, por lo que en las zonas de clima tropical donde se cultiva, puede cosecharse durante todo el año (Arias *et al.*, 2004). Los sistemas de producción convencional dependen de fertilizantes y plaguicidas sintéticos para alcanzar rendimientos económicamente viables, que suponen un riesgo ambiental y para la salud humana si no se utilizan adecuadamente y además constituyen un elevado costo de producción (Bellamy, 2013), lo que a la larga conduce a una agricultura insostenible (Barrera-Violeth *et al.*, 2011). Las variedades utilizadas para la exportación son exigentes en insumos para proporcionar un elevado rendimiento, lo que implica un alto consumo de insumos de síntesis (Mia *et al.*, 2009).

1.3.2. Ecológico u orgánico

La agricultura ecológica, orgánica o biológica enmarca todos los sistemas agrícolas que promueven la producción sin productos químicos de síntesis, abogando por la salud y seguridad de los alimentos, la sostenibilidad ambiental, social y económica del sistema agrario. En España se ha adoptado la denominación de “Agricultura Ecológica”, en otros países europeos la de “*Organic farming*” y en América Latina la de “Agricultura

Orgánica”. Estos sistemas parten de la potenciación de la fertilidad natural del suelo como la base para una buena producción, sin modificar de una manera severa las características naturales de las plantas, los animales y el paisaje, buscando optimizar la calidad de la agricultura y el medio ambiente en todos sus aspectos (Stockdale *et al.*, 2001). Otra faceta que está recibiendo cada vez más atención en los sistemas ecológicos es la mejora de la biodiversidad que tiene como consecuencia la reducción de plagas y enfermedades, y el cierre de los ciclos biogeoquímicos. (Altieri, 1999; Tilman *et al.*, 2002).

La producción de banano en sistemas ecológicos ha abierto grandes posibilidades para la exportación del producto a los mercados europeos y norteamericanos, que reducen mucho los límites máximos de residuos e imponen sistemas de garantía para los consumidores por medio de certificaciones. Sin embargo al limitar la utilización de insumos de síntesis, es necesario encontrar alternativas a los mismos, para mantener niveles de producción adecuados, priorizando la seguridad alimentaria (Barrera-Violeth *et al.*, 2011).

El banano ecológico en República Dominicana

Las ideas contemporáneas acerca de la producción ecológica se introdujeron en la República Dominicana a comienzos de los años ochenta del siglo XX por Mark Freedman con la instalación de una parcela demostrativa en Río Limpio, Loma de Cabrera, participando en este proyecto organizaciones pertenecientes a diferentes provincias de este país, aunque no fue hasta mediados del decenio del noventa cuando comenzó a expandirse la producción, que ahora es un componente importante del sector agrícola (FAO/CCI/CTA, 2001).

Según FAO (2014b), la República Dominicana es uno de los países del área geográfica del Caribe con mayor superficie dedicada a la producción ecológica, contando con unas 166.200 hectáreas y además es líder en áreas puestas en transición para ser dedicada a los cultivos ecológicos, las cuales son unas 16.420 hectáreas.

1.3.3. Normativa reguladora de la producción ecológica y del uso de los productos químicos de síntesis en agricultura

La producción ecológica restringe el uso de productos que afecten de algún modo el medio ambiente y a los consumidores. Por tal razón, para el año 1991 se elaboró el

Reglamento CEE no. 2092/91 (actualmente derogado y sustituido por el Reglamento CE nº 834/2007), el cual reguló las exportaciones de productos ecológicos hacia los países de la Unión Europea. Esta reglamentación fue elaborada para proteger al consumidor, por lo que involucra tanto a los países importadores como a los países exportadores. Este documento fue uno de los primeros de carácter internacional que ofrece una definición de la agricultura ecológica y sus reglas de funcionamiento. La Unión Europea se convirtió en el primer grupo de países del mundo que tuvo un sistema jurídico de este tipo, dando lugar este Reglamento a que los países exportadores de América Latina tuviesen una norma de exportación hacia esos mercados (CEI-RD, 2008).

La comercialización de productos ecológicos hacía los mercados de Estados Unidos empezó a tener restricciones a partir del año 2002. Todo producto con denominación ecológica a partir de este año debía estar certificado por las Normas Orgánicas Nacionales de los Estados Unidos (NOS). Las cuestiones relacionadas con la agricultura ecológica en la actualidad están reguladas por normativa federal (*Part 205-National Organic Program*). Los productos ecológicos destinados a este país deben llevar la etiqueta “*USDA ORGANIC*” del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Anteriormente no existía ni reglamentos ni supervisión de parte del Gobierno de los Estados Unidos sobre frutas y verduras declaradas como ecológicas, y las importaciones de productos ecológicos se realizaban a través de un importador de este país con la ayuda de un organismo de certificación perteneciente al mismo (FAO/CCI/CTA, 2001).

Sin embargo la reducción de insumos de síntesis en agricultura no solo afecta a la producción ecológica, sino en menor medida a la agricultura convencional, que debe adaptarse a este nuevo escenario. Tomando como ejemplo Europa, en el año 2009 la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo restringió el uso de productos fitosanitarios con carácter general, y después esta normativa ha sido traspuesta al ordenamiento jurídico de cada país miembro de la UE. Por ejemplo en España el Real Decreto 1311/2012, por el que se establece el marco de la actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, traspone dicha normativa.

1.4. Importancia socioeconómica del cultivo del banano en la República Dominicana

1.4.1. Producción de banano en la República Dominicana

Los países Latinoamericanos son los que producen la mayor cantidad de bananos destinados al comercio Internacional, figurando como mayores exportadores en el mundo Ecuador, Costa Rica, Colombia, Panamá, Guatemala, Honduras, Filipinas y México (Arias *et al.*, 2004).

Dentro de la región del Caribe, República Dominicana es un gran productor de banano, ya que este cultivo constituye un importante renglón de la economía agrícola dominicana (FAO, 2012). En el año 2010 la superficie dedicada a este cultivo fue de unas 26.000 ha y la producción de unas 735.000 t (Figura 13) con tendencia a aumentar durante los años siguientes. (Ministerio de Agricultura, 2013). De la superficie total de banano de República Dominicana, un 54 % es de producción ecológica y el otro 46 % convencional (FAO, 2013).

Figura 13: producción y área cosechada de banano (Ministerio de Agricultura, 2013).

1.4.2. Exportaciones de banano en República Dominicana

El banano presenta una dualidad como alimento básico y como producto de exportación. La producción para exportación se considera una actividad tecnológica y económica diferente a la producción como alimento de primera necesidad para consumo interno de un país (Arias *et al.*, 2004).

Para la exportación se utilizan variedades seleccionadas por su alto rendimiento y su durabilidad en el transporte de larga distancia (Arias *et al.*, 2004). Los cultivares del subgrupo Cavendish (AAA) dominan el comercio mundial debido a las cualidades de la fruta y los altos rendimientos (Fortescue & Turner, 2005c), pudiéndose conseguir hasta 60 toneladas por hectárea en plantaciones modernas. Los bananos de la variedad Cavendish destinados a los mercados de exportación se producen hoy día en casi todo el mundo, tanto en pequeñas como en grandes explotaciones (Arias *et al.*, 2004).

República Dominicana comenzó a tener participación en los mercados internacionales con productos ecológicos en el año 1989, realizando sus primeras exportaciones a través de la empresa “Plantaciones Tropicales” hacia los países de Europa y los Estados Unidos. Estas exportaciones incluían cultivos de banano, cacao, café, coco, mangos y aceite crudo de coco. En 1994, la empresa comercial SAVID S.A. comenzó a exportar a Europa bananos ecológicos producidos en una superficie de 350 hectáreas por pequeños agricultores de la provincia de Azua (FAO/CCI/CTA, 2001). En la actualidad la República Dominicana, además de banano exporta otros cultivos ecológicos como mango, limón persa, coco, aguacate, vegetales, yuca amarga, melón, cacao, fruta de la pasión, etc. (CEI-RD, 2008).

Las exportaciones de banano de la República Dominicana han ido creciendo hasta convertirse actualmente en uno de los mayores exportadores de esta fruta hacia los países de la Unión Europea y otras partes del mundo con 341.345 t en 2010, 304.985 t en 2011 y 295.912 t en 2012 (Figura 14). El crecimiento continuado en las exportaciones de banano registrada entre 2000 y 2010, que le ha llevado a dominar el mercado internacional entre los países exportadores del Caribe, se ha visto frenado en 2011 y 2012 con ligeros retrocesos (Figura 14) debido a un aumento de la producción de este cultivo en la Unión Europea, que ha pasado de 612.000 t y a 649.000 t (FAO, 2014d).

Figura 14: Exportaciones brutas de bananos R.D. (FAO, 2014d).

Aunque con altibajos notables (Figura 15), las exportaciones de banano ecológico fueron entre 2010 a 2012 un porcentaje muy importante de las exportaciones totales de esta fruta, debiendo tener en cuenta que República Dominicana destina alrededor del 85 % de su producción de banano ecológico a la exportación hacia mercados fundamentalmente de la Unión Europea. De hecho, es el primer producto agropecuario exportado de República Dominicana (CEI-RD, 2013).

Figura 15: Exportaciones de banano R. D. (CEI-RD, 2013).

Además de banano orgánico y ecológico, Dominicana exporta el banano como puré, el cual es elaborado a partir de bananos ecológicos. También exporta bananos congelados, pulpa de banano, bananos deshidratados y banano fresco procedente de agricultura biodinámica (CEI-RD, 2013).

Destinos de las exportaciones del banano Dominicano

El país que más bananos de República Dominicana ha demandado en el período 2010-2012, según las estadísticas de CEI-RD, ha sido el Reino Unido. Este país importó en el año 2010, 205.538 t, en 2011, 180.422 t y en 2012, 160.746 t, notándose considerablemente la bajada en la exportación hacia este país de un 61 % a 55 % en 2012 (Figura 16).

Bélgica es el segundo país en demanda de banano dominicano, con 73.072 t en 2010, que ocupaba un 22 % de las exportaciones. En 2011 bajó a 49.003 t (17 %) y en 2012 se redujo de nuevo hasta 26.669 t, que supusieron el 9 % del total de las exportaciones dominicanas, relegándolo al tercer destino por detrás de España (Figura 16).

Por otro lado, España, que se mantuvo siempre entre los países que menos bananos importó desde Dominicana, en 2012 fue el segundo destino de los bananos dominicanos con 38.075 t, un 13 % de las exportaciones totales (Figura 16). La demanda del banano extranjero ha aumentado considerablemente en España en 2012, a pesar de ser éste un país que cuenta con las Islas Canarias, principal región productora de bananos en Europa, donde además la producción de banano aumentó en unos 24.000 t en 2012 (FAO, 2014a).

Figura 16: Exportaciones en porcentaje de los años 2010, 2011 y 2012 (CEI-RD, 2013).

1.5. Interacción microorganismo-planta y su utilización agronómica

El uso de productos químicos de síntesis es necesario para mantener los actuales rendimientos de los cultivos en los sistemas agrícolas convencionales. Entre dichos insumos destacan por su influencia crucial los abonos minerales, en especial los que aportan nitrógeno como elemento esencial, que es el fertilizante más utilizado por los agricultores (Miransari, 2011). Sin embargo el uso de los fertilizantes minerales es

excesivo a nivel global, lo que origina problemas ambientales de diversa índole, y trae como consecuencia otros problemas de tipo social (Good & Beatty, 2011). Entre estos problemas puede destacarse el elevado consumo energético del proceso de síntesis de los abonos nitrogenados. Además, los nitratos que no son absorbidos por las plantas se incorporan a las masas de agua superficiales por erosión y lixiviación, provocando el fenómeno denominado eutrofización. Otro inconveniente del uso y fabricación de abonos nitrogenados es sanitario, ya que la existencia de cantidades excesivas de nitratos, nitritos y de sus derivados (nitrosaminas, ácido nítrico, alquil nitratos, etc.) en el agua provoca diversas enfermedades respiratorias, sanguíneas y cáncer (De Felipe, 2006).

El fósforo es otro nutriente esencial de los cultivos, altamente reactivo con Fe, Al y Ca, lo que conduce a la precipitación y consiguiente inmovilización de grandes cantidades de este elemento, lo que supone una ineficacia del fertilizante (Abreu *et al.*, 2013), por lo que se añade en exceso como fertilizante, para contrarrestar dicho fenómeno (Baróg & Grzebisz, 2004). Los fenómenos de erosión pueden provocar la llegada de este fósforo a las aguas superficiales, generando procesos de eutrofización (Adesemoye *et al.*, 2008).

El exceso en la utilización de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de los cultivos, y las dudas surgidas sobre la inocuidad de estos productos para el medio ambiente y el ser humano, ha llevado a la elaboración de normativas que promueven la agricultura basada en un uso reducido de pesticidas, creando las condiciones para la implementación del denominado control integrado de plagas (*Integrated Pest Management, IPM*) (Hillocks, 2012).

Para reducir el uso de insumos de síntesis, y en el caso de los fertilizantes mejorar la eficiencia en el uso de los mismos, la mejor alternativa es la comprensión de los mecanismos de interacción y cooperación entre los microorganismos beneficiosos para las plantas y éstas, para una vez comprendidos, utilizarlos en agricultura en beneficio de los cultivos (Barea *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Rana *et al.*, 2011; Piromyou *et al.*, 2011). Es decir, se trata de sacar provecho agronómico de las interacciones beneficiosas entre microorganismos, suelo y planta (Hayat *et al.*, 2010). Algunos autores han denominado a estos microorganismos beneficiosos “microorganismos probióticos de las plantas” (*Plant-Probiotic Microorganisms, PPM*), (Haas & Keel, 2003; Picard & Bosco, 2007; Lugtenberg & Kamilova, 2009). En estos momentos la

comunidad científica y una parte importante de los empresarios no dudan de que el uso de los PPM para mejorar la fertilidad en los agrosistemas y controlar las enfermedades, es la vía alternativa y complementaria para reducir el uso de agroquímicos en agricultura (Barea *et al.*, 2004; Lucy *et al.*, 2004; Picard & Bosco, 2007). Estos microorganismos capaces de ejercer una acción beneficiosa sobre el crecimiento de las plantas pueden ser bacterias endofíticas de las raíces, o estar presentes en la rizosfera, razón por la que recibieron en 1989 el nombre de *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1989), algunos autores también la llaman *Plant Growth Promoting* (PGP) acrónimo de PGPR (Cabello-Conejo *et al.*, 2014) por su capacidad para inducir mejoras en el crecimiento y el desarrollo de las plantas mediante diferentes modos de acción (Vessey, 2003; Spaepen *et al.*, 2008; Hayat *et al.*, 2010). También los hongos micorrícicos tienen un efecto como PPM, tanto las endomicorrizas arbusculares (AM) como las ectomicorrizas (Barea *et al.*, 2005). Los productos formulados a base de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en agricultura reciben el nombre genérico de biofertilizantes y contribuyen al desarrollo de la agricultura sostenible (González-Andrés *et al.*, 2007; Singh, 2013).

1.6. Modos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Las PGPRS actúan mediante diferentes mecanismos promotores del crecimiento vegetal (Singh, 2013). Los más estudiados son la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la actividad enzimática ACC (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano) desaminasa y el control directo o indirecto de patógenos (Bhattacharyya & Jha, 2012). También sintetizan hormonas que las plantas pueden utilizar en su propio beneficio (Herman *et al.*, 2008), como auxinas, citoquininas y giberelinas (Dobbelaere *et al.*, 2003). Como respuesta a estos mecanismos, las plantas mejoran su desarrollo, la toma de nutrientes, la tolerancia al estrés ambiental, el contenido de clorofila en el área foliar y en general mantienen una buena salud radicular (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). Por otra parte las PGPRS pueden tener un efecto directo de biocontrol de ciertos microorganismos patógenos (Dobbelaere *et al.*, 2003) y además pueden inducir resistencia frente al ataque de patógenos (Herman *et al.*, 2008; Beneduzi *et al.*, 2012).

A continuación se describen algunos de los modos de acción más estudiados en las rizobacterias.

1.6.1. Producción de reguladores de crecimiento

Como se menciona en el apartado anterior las PGPRS tienen la capacidad de producir o cambiar la concentración de reguladores de crecimiento como giberelinas, citoquininas y auxinas, que son hormonas vegetales que controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la senescencia, la floración, la formación del fruto y la germinación (Arun *et al.*, 2012).

De las hormonas vegetales sintetizadas por los microorganismos, el ácido-3-indolacético (IAA) es la más común y mejor caracterizada, habiéndose estimado que más del 80 % de las bacterias endofíticas y rizosféricas pueden producirlo en mayor o menor cantidad, regulando de esta manera el crecimiento de las plantas (Patten & Glick, 1996; León Barrios *et al.*, 2006). El IAA es una auxina que proviene del aminoácido L-triptófano (León Barrios *et al.*, 2006).

Entre las acciones reguladas por el IAA destacan la estimulación del crecimiento del tallo principal, raíces laterales y adventicias (Woodward & Bartel, 2005), por lo que la aportación de esta hormona se refleja en una mayor producción de biomasa aérea y radicular. Al mejorar el sistema radicular también se mejora la toma de nutrientes, y se reducen las pérdidas por lixiviación de los elementos móviles en el suelo como los nitratos. Por esta razón los microorganismos del suelo que sintetizan la hormona IAA son usados como inoculantes para mejorar el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Asghar *et al.*, 2004).

Además el IAA es capaz de estimular de la actividad ACC desaminasa, la cual reduce la concentración de etileno en las plantas (Glick *et al.*, 2007; Nadeem *et al.*, 2014), tal como se explica en el siguiente apartado.

1.6.2. Actividad ACC desaminasa

Otra forma de acción de las PGPRS es la actividad enzimática desaminasa (Glick 2005; Jacobson *et al.*, 1994), que tiene como consecuencia la reducción de la concentración de etileno, que producen las plantas bajo condiciones de estrés (Glick, 2004; Glick, 2005; Saleem *et al.*, 2007; Glick, *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2012; Barnawal *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Bal *et al.*, 2013). Las bacterias con actividad ACC desaminasa tienen efectos sobre la germinación de las semillas y el desarrollo de las raíces, y además se han encontrado en las hojas y flores (Glick *et al.*, 2007).

El etileno es precursor de la germinación de semillas (Esashi *et al.*, 1996), pero después de la germinación, un alto nivel inhibe la elongación de las raicillas y a su vez el crecimiento de las plantas (Saleem *et al.*, 2007). El etileno es esencial como regulador del crecimiento y desarrollo normal en las plantas. De hecho las raíces de los cultivos tienen un buen desarrollo a bajas concentraciones de etileno (Shaharoon *et al.*, 2006), pero concentraciones altas son perjudiciales, ya que inducen la defoliación, detención del crecimiento, y como consecuencia una baja productividad de los cultivos (Deikman, 1997; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Ante una situación de estrés biótico o abiótico, se produce un aumento de los niveles de etileno en la planta, lo que provoca los efectos antes descritos. La presencia de bacterias con actividad ACC desaminasa provoca el descenso de los niveles de etileno incrementando el crecimiento de las plantas a pesar de estar sufriendo una situación de estrés, y es uno de los aspectos más estudiados (Dobbelaere *et al.*, 2003; Glick *et al.*, 2007; Contesto *et al.*, 2008; Govindasamy *et al.*, 2008). La concentración de etileno además de regularse por la producción de ACC desaminasa, se ve afectado por numerosos factores como temperatura, luz, gravedad, nutrición y otras hormonas de las plantas (Glick, 2005).

1.6.3. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Dado el papel esencial del nitrógeno en la nutrición de las plantas, la fijación del nitrógeno molecular (N_2) hasta amonio, por medio de los microorganismos simbióticos y de vida libre mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa (Ahemad & Kibret, 2014), es de gran relevancia para los agrosistemas, al permitir la reducción o incluso supresión de los abonos minerales nitrogenados (Durán *et al.*, 2013).

Dentro de las bacterias fijadoras de nitrógeno, hay que distinguir por un lado las que forman simbiosis nodular, y por otro las que lo hacen en vida libre. También algunas de las bacterias que forman simbiosis asociativas con las raíces de las plantas fijan nitrógeno, aunque no está claramente cuantificado el beneficio de esta fijación sobre la planta, porque es difícil desagregarlo de otros efectos de las PGPRS sobre la misma (Dobbelaere *et al.*, 2003). En cuanto a la simbiosis nodular, la más estudiada es sin duda la que tiene lugar entre las bacterias del género *Rhizobium* y afines y las plantas de la familia de las leguminosas (Vessey, 2003; Velázquez *et al.*, 2011), de tanta importancia en agricultura que en los cultivos de leguminosas puede reemplazar

totalmente al abonado nitrogenado (Mulas *et al.*, 2011, 2013). También las leguminosas al completar su ciclo dejan en el suelo una cantidad importante de nitrógeno que puede ser utilizado por otros cultivos de la rotación (Durán *et al.*, 2013), lo que permite reducir las necesidades de abono mineral nitrogenado, e incluso también hasta suprimirlo en agrosistemas oligotróficos como la rotación cereal/leguminosa en años alternos típica de la agricultura mediterránea (De Torres *et al.*, 2013).

1.6.4. Solubilización de diferentes formas de fósforo

El fósforo, después del nitrógeno, es el nutriente requerido en mayor cantidad por las plantas y a pesar de su abundancia tanto en su forma orgánica como inorgánica, su disponibilidad es baja en el suelo y es un factor limitante en el desarrollo vegetal (Babana & Antoun, 2007; Vassilev *et al.*, 2007; Trujillo Toledo *et al.*, 2011; Kihara & Njoroge, 2013). El fósforo orgánico representa aproximadamente de un 30 a 65 % del fósforo total del suelo y el mismo no es asimilable por las plantas y por tal razón este fósforo debe ser transformado en asimilable por la actividad microbiana para poder ser absorbido por los cultivos (Adesemoye & Kloepper, 2009).

La asimilabilidad del fosfato mineral presente en los suelos depende del pH, la concentración de calcio y de otros factores como el equilibrio entre éste y otros nutrientes, fundamentalmente el N (Kihara & Njoroge, 2013). La deficiencia de fósforo o la falta de asimilabilidad del mismo afecta tanto a plantas como microorganismos. Por tal razón estos últimos han desarrollado mecanismos para solubilizar el fosfato mineral insoluble presente en el suelo (Abreu *et al.*, 2013). El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato como inoculantes, aumenta la absorción de este nutriente en los cultivos (Rodríguez & Fraga, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2003; Richardson, 2007; Trujillo Toledo *et al.*, 2011).

1.6.5. Producción de sideróforos por bacterias PGPRs

El hierro es esencial en el desarrollo de las plantas, pero a pesar de ser el cuarto elemento más abundante en el suelo (Radzki *et al.*, 2013), puede estar en gran proporción de formas no asimilables. Las dos formas iónicas más frecuentes son, ion ferroso o forma reducida (Fe^{2+}) y el ion férrico o forma oxidada (Fe^{3+}), este último no

es asimilable por las plantas, lo que puede originar deficiencias para las mismas y afectar sus rendimientos (Zuo & Zhang, 2011).

Algunas bacterias promotoras del crecimiento producen sideróforos, que son compuestos orgánicos de bajo peso molecular excretados por los microorganismos que se unen a iones de hierro (Trujillo Toledo *et al.*, 2011), transformándolos de formas no bioasimilables a formas bioasimilables. La presencia de estos microorganismos productores de sideróforos aumentan la biodisponibilidad de Fe^{3+} , siendo éste otro modo en que las PGPRS favorecen el desarrollo de las plantas y el rendimiento de los cultivos (Neilands, 1995; Singh, 2013).

Otra acción benéfica por parte de las PGPRS sintetizadoras de sideróforos es que, al transformar el hierro a bioasimilable para su propio metabolismo, éste se torna deficiente para otros microorganismos patógenos presentes en el suelo, y de esta manera se inhibe la actividad de los mismos por competencia por este nutriente (Singh, 2013).

1.6.6. Control biológico de patógenos

Las PGPRs promueven el crecimiento de las plantas mediante el control de otros microorganismos patógenos (Kloepper *et al.*, 1989; Mantelin & Touraine, 2004; Saravanakumar *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2011). Los mecanismos de acción contra los patógenos son diversos. En primer lugar pueden actuar mediante la producción de agentes antimicrobianos, lo que es un antagonismo directo sobre el patógeno. También mediante fenómenos de competencia por los nutrientes y el nicho ecológico, y finalmente mediante el desencadenamiento de la “resistencia sistémica inducida (RSI)” (*Induced Systemic Resistance, ISR*) en la propia planta (Dobbelaere *et al.*, 2003; Andersen & Winding, 2004; Van Loon, 2007; Singh *et al.*, 2011; Bhattacharyya & Jha, 2012; Singh, 2013). La RSI se activa por la colonización de la superficie de las raíces por parte de las bacterias (Akila *et al.*, 2011).

Una forma indirecta de protección de las plantas frente a patógenos que no debe de ser olvidada es la mejora de su estado nutricional, mediante los mecanismos ya mencionados con anterioridad (Rodríguez & Fraga, 1999).

1.7. Biofertilizantes: concepto agronómico y diseño

Los biofertilizantes son productos formulados a base de microorganismos seleccionados, que se utilizan para la inoculación de los cultivos, con objeto de obtener beneficio agronómico y medioambiental de las interacciones beneficiosas planta-microorganismo ya descritas (Rodríguez-Navarro & Ruíz-Sainz 2010). Hay dos tipos de biofertilizantes (Mulas *et al.*, 2013), los de “primera generación” que son los inoculantes a base de rizobios para leguminosas, que tienen como finalidad la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en simbiosis nodulares, y los de “segunda generación” consistentes en productos formulados con bacterias del género *Rhizobium* y afines para plantas no leguminosas (García-Fraile *et al.*, 2012), o también formulados con otras bacterias diferentes a los rizobios para plantas leguminosas y no leguminosas, como las PGPRS ya descritos, incluyendo también los hongos micorrícicos arbusculares (AM) (Mulas *et al.*, 2013).

La eficiencia en agricultura de los biofertilizantes formulados con PGPR ha sido demostrada en numerosas ocasiones. Se ha comprobado que benefician de manera directa o indirecta al crecimiento, toma de nutrientes y productividad de las plantas (Mishra *et al.*, 2011). Se observa un aumento de la actividad de la fotosíntesis, un mejor uso del agua, un aumento del contenido de clorofila, y una mejor defensa frente al ataque de patógenos (Stefan *et al.*, 2013), razón por la que en ocasiones en vez de biofertilizantes se les ha denominado “biofortificantes” (Rana *et al.*, 2012a, 2012b; Acuña *et al.*, 2013). Como consecuencia con su aplicación es posible una agricultura más respetuosa con el medio ambiente, ya que el uso de los biofertilizantes puede combinarse con una disminución en la fertilización química al mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes (García-Fraile *et al.*, 2012; Pešaković *et al.*, 2013). También permiten una reducción en el uso de productos fitosanitarios.

Sin embargo los microorganismos son solo eficaces cuando se les proporciona condiciones adecuadas para su metabolismo, incluyendo la disponibilidad de agua, oxígeno, un pH adecuado y la temperatura del medio ambiente adecuada (Singh *et al.*, 2011), de donde se deduce la importancia de una buena formulación por su influencia en algunas de estas condiciones (Herrmann & Lesueur, 2013).

En algunos casos se ha declarado que los biofertilizantes son eficaces en la promoción del crecimiento vegetal solamente en cantidades limitantes de nutrientes (Rosas *et al.*,

2009; Mäder *et al.*, 2011). Sin embargo incluso en condiciones óptimas, los cultivos aprovechan solo un determinado porcentaje de los nutrientes aportados con el abonado o disponibles en el suelo, por lo que varios autores consideran que bajo condiciones de nutrición óptima del cultivo, el uso de las PGPRS permitiría reducciones notables en el uso de fertilizantes químicos al mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes (Zhuang *et al.*, 2007; Mäder *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2013).

Un aspecto primordial del diseño de los biofertilizantes es usar taxa seguros que no afecten al medio ambiente y que ofrezcan seguridad al consumo humano (García-Fraile *et al.*, 2012).

Uso de biofertilizantes en banano

El cultivo del banano es muy exigente en cuanto al consumo de insumos de síntesis (Mia *et al.*, 2010a; 2010b), como el nitrógeno, potasio y otros nutrientes, para mantener un alto rendimiento (Mia *et al.*, 2010c; Anyasi *et al.*, 2013).

El banano no ha quedado fuera de programas de investigación con biofertilizantes, aunque la intensidad de la misma no ha sido tan elevada como por ejemplo en el arroz (De Souza *et al.*, 2013; Habibi *et al.*, 2014). Entre los autores que han investigado los biofertilizantes en banano destacan Mia *et al.* (2010b, 2010c) y Kavino *et al.* (2010), quienes han demostrado que la inoculación con bacterias PGPRS estimula el crecimiento de la raíz, la absorción de nutrientes e incluso mejora el rendimiento. Además el uso de PGPR aumenta la concentración de N-P-K en las hojas (Kavino *et al.*, 2010). Otra línea de investigación con biofertilizantes en banano ha ido dirigida a las plantas propagadas por cultivo *in vitro*. Madaan *et al.* (2013) han comprobado que la inoculación de las plántulas en la fase de aclimatación, aumenta la supervivencia de las mismas.

Por último otra línea de investigación con las PGPRS en el género *Musa* ha sido el control de patógenos que afectan a este cultivo, como por ejemplo la acción que ejerce *Pseudomonas fluorescens* sobre el virus BBTV (Singh, 2013). Por otra parte bacterias aisladas de plantas de bananos y usadas como inoculantes sobre este cultivo, han reducido la población del nematodo *Meloidogyne javanica*, y la incidencia de la enfermedad del mal de panamá (Ribeiro *et al.*, 2012).

1.8. El análisis de la diversidad bacteriana asociada a las raíces, clave en el desarrollo de biofertilizantes

El suelo posee una gran biodiversidad de bacterias de las cuales según Prashar *et al.* (2014), más del 99 % no son cultivables y por tanto no pueden ser utilizadas para la fabricación de biofertilizantes. Los géneros bacterianos cultivables pueden ser caracterizados por diferentes técnicas, en primer lugar de tipo fenotípico tales como la morfología, fisiología, bioquímica y ecología (García-Fraile, 2008). Sin embargo estas técnicas no son suficientes para identificar las bacterias a niveles de especie o subespecie, lo que es necesario para que puedan ser usadas de forma segura como inoculantes a nivel agronómico, ya que debido a la gran biodiversidad de microorganismos algunos aislados son patógenos. Por tal motivo se han desarrollado otras técnicas de identificación basadas en marcadores moleculares, de las cuales la secuenciación del gen ribosómico 16S, por su valor filogenético, puede considerarse la técnica universal para identificar bacterias (Woese, 2000).

A pesar de la gran versatilidad del gen 16S rRNA para la identificación de las bacterias, no en todos los casos permite diferenciar entre especies muy próximas. Este es el caso por ejemplo del género *Rhizobium* y afines (Valverde *et al.*, 2006), o de algunas especies del género *Bacillus* (Anderson *et al.*, 2005; Rasko *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013a). En estos casos es necesario secuenciar otras regiones del genoma cuya secuencia tenga relación con la filogenia, como por ejemplos los genes *housekeeping*, dando lugar al denominado *Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA)* o *Multi-Locus Sequence Typing (MLST)* (Curran *et al.*, 2004; Maatallah *et al.*, 2011). En el caso del género *Rhizobium* los genes *housekeeping* más utilizados han sido los *recA* y *atpD*. (Gaunt *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2006). Otros métodos usados para el estudio de la biodiversidad en bacterias son la hibridación de ácidos nucleicos y el análisis de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) (Prashar *et al.*, 2014).

Para fabricar biofertilizantes deben usarse bacterias cultivables, sin embargo antes de elaborar productos a base de microorganismos, deben identificarse, en general mediante secuenciación del gen 16S rRNA, para usar taxa seguros (Figura 17). Por otro lado el conocimiento y estudio de las bacterias no cultivables es importante a la hora de comprender la ecología microbiana y las interacciones que tienen lugar en la rizosfera del cultivo, ya que determinan en último término la efectividad del biofertilizante. La biología molecular ha desarrollado técnicas de análisis de la

comunidad microbiana en su conjunto, no dependientes del aislamiento y cultivo de los microorganismos, consistentes en analizar el ADN extraído directamente del suelo (metagenómica), los transcritos de ARN (transcriptómica), las proteínas (proteómica) o los metabolitos (metabolómica) (Ranjar *et al.*, 2003). Las técnicas de metagenómica permiten secuenciar el gen 16S rRNA en aislados de ADN procedentes del suelo. Dichas metodologías se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pueden incluir la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Smalla *et al.*, 2001), la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (T-RFLP), el polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP) y la pirosecuenciación (Micallef *et al.*, 2009; Berlec, 2012). Otra técnica de identificación de bacterias y hongos basada en el análisis del rRNA es la técnica *Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis (ARISA)* o (*RISA*). Esta técnica se basa en la amplificación y secuenciación directa, o bien en la clonación, del fragmento intergénico situado entre los genes 16S y 23S en bacterias y entre los genes 18S y 28S en hongos, separando estos fragmentos mediante electroforesis ya que presentan gran variabilidad de tamaños, lo que está correlacionado con los niveles taxonómicos de especies y géneros (Ranjard *et al.*, 2001, 2003; Micallef *et al.*, 2009).

La Figura 17 presenta la secuencia en el desarrollo de biofertilizantes. El conocimiento de los mecanismos de acción de las bacterias y su interacción con la planta a nivel molecular puede ayudar a la mejora del efecto agronómico de los biofertilizantes, aunque por encontrarse en fase incipiente de desarrollo, se suele prescindir de este como nutriente y trabajar de forma empírica, tal como en el presente trabajo.

Figura 17: Esquema de la secuencia seguida con los aislados para su utilización sobre plantas y la elaboración de biofertilizante.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

El **objetivo general** es desarrollar biofertilizantes para banano (*Musa* sp.) en República Dominicana, utilizando bacterias autóctonas. Para llevar a cabo este objetivo se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Crear una colección de bacterias rizosféricas y endofíticas de raíces de banano, procedentes de fincas agrarias de República Dominicana con sistema ecológico (orgánico según terminología americana).
2. Caracterizar las bacterias aisladas, identificándolas a niveles taxonómicos admitidos mediante secuenciación del gen 16S rRNA y analizando *in vitro* diversas propiedades de promoción del crecimiento vegetal: producción de IAA, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, actividad ACC desaminasa, fijación de nitrógeno atmosférico, biocontrol de sigatoka negra.
3. Seleccionar la técnica de caracterización molecular auxiliar más adecuada para agrupar los aislados procedentes de las raíces, por afinidad taxonómica. La finalidad es reducir el número de cepas que es necesario secuenciar a un único representante de cada grupo.
4. Seleccionar en base a propiedades de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, cinco aislados y probar su capacidad de promover el desarrollo del banano variedad Cavendish en dos condiciones diferentes: producción de planta en vivero y rendimiento en condiciones de producción en campo.
5. Seleccionar en base a ciertas propiedades *in vitro*, 26 cepas y probar su capacidad para inducir resistencia a las plantas de banano frente al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la enfermedad sigatoka negra, en ambiente controlado.
6. Elegir uno o varios aislados de la colección con capacidad para desarrollar futuros biofertilizantes.

A continuación se presenta en la Figura 18, el plan de trabajo para los objetivos planteados. El segmento de color rojo indica la interrupción de los ensayos de campo, debido al cese de la financiación por la supresión de todos los programas de investigación PCI por parte de AECID. Por esta razón los aislados de la Fase 2 no se analizaron sobre planta (vivero y campo).

Figura 18: Plan de trabajo para el desarrollo de los objetivos planteados.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento de bacterias endofíticas y rizosféricas

3.1.1. Recolección de muestras

El muestreo de raíces de banano (*Musa acuminata* AAA) cv. Cavendish se realizó en República Dominicana, en plantaciones ecológicas de las provincias de Azua, Mao, Montecristi y Dajabón (Tabla 3). Las raíces muestreadas fueron las más finas y sanas procurando que no estuvieran afectadas por nematodos, plaga de gran incidencia en Dominicana. Las raíces fueron introducidas en frascos de plástico con la tapa perforada para mantener las condiciones aerobias. Además de bacterias endofíticas se aislaron bacterias rizosféricas, las mismas fueron extraídas a partir de suelo rizosférico.

Tabla 3: Procedencia y características de suelos de las parcelas de banano en régimen ecológico donde se recolectaron las muestras para el aislamiento de bacterias endofíticas y rizosféricas.

Provincia	Localidad o paraje	Latitud	Longitud	Características edáficas					
				Textura	pH	MO (%)	Fósforo Olsen mg·kg	Potasio (cmol(+)·kg)	Conductividad (dS·m)
Azua	Parcela del IDIAF	N18° 23,405'	W70° 50,375'	Franca	8,58	1,81	<5,44	1,34	0,14
Azua	Proyecto 2C	N18° 22,357'	W70° 50,410'	-	8,30	3,89	42,49	6,02	0,41
Azua	Proyecto Isura	N18° 5,233'	W70° 50,254'	Arcillosa	8,00	3,01	12,27	2,51	0,61
Azua	Pueblo Viejo	N18° 24,006'	W70° 46,001'	-	8,27	8,83	12,42	1,66	0,22
Azua	Los Tramojos	N18° 25,397'	W70° 44,290'	-	8,40	2,02	19,24	3,58	0,23
Mao	Amina 1	N19° 33,440'	W71° 00,400'	Franco limosa	8,15	2,32	<5,44	0,51	0,21
Mao	Amina 2	N19° 32,409'	W70° 59,467'	Franco arcillo arenoso	7,88	1,79	<5,44	0,24	0,10
Mao	Tierra Fría 1	N19° 33,048'	W70° 58,129'	Franco arenosa	7,90	1,15	<5,44	0,44	0,16
Mao	Tierra Fría 2	N19° 33,130'	W70° 58,229'	Franca	8,10	1,40	5,73	0,46	0,11
Mao	El Charco	N19° 36,081'	W71° 04,779'	Franco arcillo limoso	8,12	2,16	5,97	0,98	0,18
Montecristi	La Pinta	N19° 39,085'	W71° 33,300'	Franca	6,95	2,35	<5,44	0,22	0,89
Montecristi	Pepillo Salcedo	N19° 39,964'	W71° 36,669'	-	7,56	4,10	45,90	2,44	0,21
Montecristi	Gozuela	N19° 40,261'	W71° 36,862'	Franco arcillosa	7,97	2,85	25,94	2,95	0,20
Montecristi	Santa María 1	N19° 39,878'	W71° 36,243'	Franco arcillo arenoso	8,29	1,64	<5,44	0,52	0,12
Montecristi	Santa María 2	N19° 39,270'	W71° 35,002'	Franco arcillosa	7,96	3,09	<5,44	0,18	0,12
Montecristi	Clavellina	N19° 39,864'	W71° 33,642'	Franco arcillosa	7,36	2,96	8,16	0,64	0,24
Dajabón	Carrizal	N19° 20,887'	W71° 37,056'	Franco arcillosa	5,08	9,64	<5,44	0,19	0,05
Dajabón	Rabisal	N19° 16,404'	W71° 33,583'	Limosa	7,51	0,79	16,44	0,14	0,09
Dajabón	La Rosa	N19° 16,897'	W71° 33,990'	Limosa	6,47	2,98	<5,44	0,34	0,04

3.1.2. Aislamiento de bacterias endofíticas

Los aislamientos de bacterias en raíces se llevaron a cabo en los laboratorios del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad (IMARENABIO) de la Universidad de León, España.

Las raíces fueron lavadas con agua corriente para eliminar el suelo que pudieran llevar adherido, posteriormente se desinfectaron superficialmente para aislar únicamente bacterias alojadas en el interior de la raíz. La esterilización se realizó con etanol al 70 % por un minuto y 5 minutos en hipoclorito de sodio (NaClO) al 7 %, transcurrido este tiempo se eliminó el NaClO mediante varios lavados con agua estéril. En una placa Petri estéril con la ayuda de un bisturí y pinzas se trocearon las raíces, se machacaron un poco para facilitar el crecimiento de las bacterias que estuviesen en el interior de las raíces y se colocaron sobre una placa de medio sólido *Tryptic Soy Agar (TSA)* (15 g/L de agar-agar, 15 g/L de peptona de caseína, 5 g/L NaCl, 5 g/L de peptona de soja, pH 7,3, de Fluka) con cicloheximida (CH) 1 mg/L, para evitar el crecimiento de hongos.

Las bacterias que presentaron diferencias morfológicas a simple vista se transfirieron individualmente a placas con medio TSA, en este caso ya sin CH. Se realizó el número necesario de repicados hasta obtener colonias aisladas y puras. A partir de estas colonias puras (Figura 19) se tomó masa bacteriana de cada aislado y se depositaron en una mezcla de glicerol al 30 %, para la conservación de las bacterias a una temperatura de -81 °C.

Figura 19: Cuatro cultivos puros de cepas bacterianas endofíticas.

3.1.3. Aislamiento de bacterias de suelo rizosférico con actividad ACC desaminasa

Para el aislamiento de bacterias rizosféricas, el suelo adherido a la propia raíz, fue colectado mediante arrastre por cepillado con un pincel plano del número 4. El suelo fue conservado en tubos Eppendorf a 4 °C durante el menor tiempo posible hasta la extracción de las bacterias. Se eligió como entorno primero la actividad ACC (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano) desaminasa. Para realizar la extracción de estas bacterias se pesó 1 g de suelo rizosférico obtenido según se indicó en el apartado 3.1.1 y se añadió a matraces con capacidad de 250 mL conteniendo 50 mL de medio *Pseudomonas Fluorescein* (PF) (peptona proteasa 10 g/L, caseína hidrolizada 10 g/L, MgSO₄ 1,5 g/L, K₂HPO₄ 1,5 g/L, Glicerol 1 % v:v) incubando la suspensión a 28 °C durante 24 h en agitación continua en un agitador orbital termostatzado INNOVA_4330 (New Brunswick Scientific).

De cada matraz se tomó un 1 mL del crecimiento bacteriano en medio PF y se transfirió a otro nuevo matraz conteniendo 50 mL del mismo medio, incubándolo de nuevo en las mismas condiciones. Estas dos incubaciones se hicieron para mejorar el crecimiento de bacterias *Pseudomonas* y bacterias similares a éstas, además con la segunda incubación se redujo el crecimiento de hongos.

Transcurrido el tiempo de la segunda incubación, se tomó 1 mL de la suspensión de bacterias crecidas en PF y se transfirió a otro nuevo matraz conteniendo 50 mL de medio mínimo de Dworkin-Foster (DF) sales (DF sales) (Dworkin & Foster, 1958) (Tabla 4), con 300 µL de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄, como fuente de nitrógeno para activar el crecimiento de las bacterias, incubando a 28 °C durante 24 h en agitación. Una vez pasado el tiempo se tomó 1 mL del crecimiento bacteriano en DF sales y se transfirió a un matraz con 50 mL de DF sales con de 300 µL de ACC 0,5 M como fuente de Nitrógeno en lugar del (NH₄)₂SO₄ incubando en las mismas condiciones que la anterior.

Tabla 4: Composición del medio DF sales.

Reactivo	Cantidad
Na ₂ HPO ₄	6,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
Glucosa	2,0 g
Ácido gluconico	2,0 g
Ácido cítrico	2,0 g
Elementos traza	0,1 mL
FeSO ₄ ·7H ₂ O Solución	0,1 mL
Agua destilada	1000 mL
Elementos traza	
MnSO ₄ ·H ₂ O	11,19 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	124,6 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	78,22 mg
MoO ₃	10 mg
Agua destilada	100 mL

Del crecimiento de las bacterias en medio de DF sales con ACC al 0,5 M se tomaron 50 µL por muestra y se extendieron en placas de DF sales con agar grado A al 1,8 %, a las que se le agregaron previamente 300 µL de ACC 0,5 M y 600 µL de H₂O estéril. Estas bacterias se incubaron a 28 °C durante 5 días, se observó su crecimiento diario y las bacterias que mostraron un fuerte crecimiento en estas placas y morfología diferente, se aislaron y se cultivaron en placas con medio *Nutrient Agar (NA)* (5 g/L de pectona, 3 g/L extracto de levadura, 5 g/L de cloruro de sodio y 15 g/L de agar, pH 6,8, de Fluka) y se repicaron hasta obtener colonias puras, y al igual que las bacterias endofíticas se conservaron en glicerol al 30 %.

3.1.4. Aislamiento de bacterias de suelo rizosférico con capacidad para solubilizar de fosfato

Simultáneamente al aislamiento de bacterias rizosféricas con actividad ACC desaminasa, se aislaron también bacterias con capacidad para solubilizar fosfato mineral insoluble. En un momento del proceso de aislamiento de bacterias con actividad ACC desaminasa, concretamente al finalizar la incubación de las bacterias en medio DF sales con sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄, se tomaron 100 µL del crecimiento bacteriano y se transfirieron a 10 mL de solución salina, realizando diluciones seriadas hasta llegar a la concentración de 10⁻⁷. De cada una de estas diluciones se tomó una alícuota de 100 µL y se extendió con ayuda de 500 µL de agua estéril sobre una placa de 9 cm Ø conteniendo medio YED-P (extracto de levadura 2 g/L, glucosa 10 g/L, agar 12 g/L, suplementado con fosfato tricálcico Ca₃(PO₄)₂ 4 g/L).

El medio YED-P con fosforo insoluble, origina una turbidez blanquecina en las placas, esta turbidez es característica del medio. Las bacterias que solubilizaron el fosfato formaron un halo transparente a su alrededor, estas bacterias fueron aisladas y purificadas por agotamiento en medio NA. Una vez que se obtuvieron colonias de cepas puras, al igual que las demás bacterias se conservaron en glicerol al 30 %. Las bacterias ya purificadas fueron probadas nuevamente en medio de solubilización de fosfato.

3.2. Identificación filogenética de las cepas aisladas

Para la identificación filogenética de las cepas aisladas se secuenció el gen 16S rRNA. La secuenciación fue realizada por MACROGEN EUROPE (Ámsterdam, Holanda). Los aislados crecidos en placas con medios TSA y NA se sometieron a extracción del gen, amplificación por PCR del gen 16S rRNA y secuenciación automática. Para la amplificación del gen 16S rRNA se usaron las parejas de cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') y para la secuenciación los cebadores 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'), 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Las secuencias recibidas fueron limpiadas y editadas con los programas CHROMAS (Technelysium Pty Ltd) y BioEdit (Hall, 1999), una vez editadas se utilizó el programa SeqMan (DNASTAR, Inc.), para alinear las cadenas de las secuencias y obtener el correspondiente *contig*, cuya longitud osciló ente 1200 y 1500 pares de bases, con un valor medio de 1440 para el conjunto de la colección. Las secuencias obtenidas para cada cepa, fueron comparadas con las cepas tipo depositadas en la base de datos EZ-BioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>), para su identificación taxonómica. Con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), se realizaron alineamientos múltiples entre todas las cepas aisladas y las bacterias tipo más próximas a ellas, lo que se efectuó por grandes grupos taxonómicos (alfa proteobacterias, beta proteobacterias, gamma proteobacterias y Gram positivas). A continuación se construyeron los árboles filogenéticos, empleando el método de construcción de árboles *Neighbour-Joining* con un "*bootstrap*" de 1000 (Saitou & Nei, 1987), y el coeficiente de similitud de Kimura 2 (Kimura, 1980).

3.3. Caracterización genotípica de los aislados

3.3.1. Extracción de ADN

El ADN bacteriano se extrajo a partir de masa bacteriana crecida sobre medios TSA y NA, tras su incubación por 48 h a 28 °C. La masa bacteriana de cada cepa fue recogida en un tubo Eppendorf, se suspendió en 200 µL de agua Mili-Q estéril y se sometió a una centrifugación a 12.000 rpm durante 30 seg, en una centrífuga SIGMA 1-14 (Sartorius, Alemania). Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de la masa se resuspendió en una solución acuosa al 0,1 % de N-laurilsarcosina y se centrifugó por 4 min a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

Para romper las células el sedimento bacteriano se resuspendió en 100 µL de NaOH 0,05 M y fue sometido a una temperatura de 100 °C durante 4 minutos, pasado este tiempo se añadieron 200 µL de agua y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos. Del sobrenadante obtenido, se transfirieron 200 µL a un nuevo Eppendorf. Para realizar la purificación y eliminar las proteínas presentes en el medio, se procedió a añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), esta mezcla se agito y se centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos.

La fase superior que quedo después de la centrifugación se pasó a Eppendorf nuevos y se le adicionó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó por agitación y se centrifugó de igual manera. El sobrenadante de la fase superior se transfirió a Eppendorf nuevos para realizar la precipitación del ADN mediante la adición de 0,07 µL de acetato de sodio a pH 5,2 (Fluka, Alemania) y 4 µL de etanol absoluto a -20 °C (Merck, Alemania), por cada 100 µL de la solución de ADN rescatada del sobrenadante. La mezcla se agitó suavemente y se mantuvo a -20 °C durante al menos 12 horas. Pasado este tiempo, se sometió a una centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 12000 rpm, pasado el tiempo se retiró el sobrenadante, quedando el ADN sedimentado en las paredes del Eppendorf. Para quitar el exceso de humedad del etanol de las muestras se secaron a 37 °C durante 2 h en estufa y posteriormente se disolvió cada pellet en 200 µL de agua Mili-Q estéril. Finalmente se hicieron varias alícuotas de la dilución de ADN para su conservación a -20 °C.

3.3.2. Amplificación de ADN polimórfico al azar (*Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD*).

La técnica RAPD se aplicó según el protocolo propuesto por Rivas *et al.* (2006) con un único cebador M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') lo que origina mucha variabilidad en los patrones de bandas obtenidos. El RAPD se amplificó mediante la PCR (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) usando el kit “*Dream Taq Green PCR Master Mix*” de Thermo Scientific, EE.UU, Fermentas. La composición de la mezcla y las condiciones de la PCR figuran en la Tabla 5.

Tabla 5: Reactivos, condiciones de tiempo y temperatura empleados en la técnica PCR-RAPD.

Compuesto	Concentración	Volumen (μL)	Fase PCR	Tiempo	Temperatura
Dream Taq Green PCR Master Mix	2 X	12,5	Predesnaturalización	9'	95 °C
Agua libre de nucleasas (incluida)		8	Ciclos → 35		
ADN molde		2	Desnaturalización	1'	95 °C
Primer M13	20 mM	2,5	Anillamiento	1'	45 °C
			Extensión	2'	72 °C
			Ciclos → 2		
			Extensión final	7'	72 °C
			Conservación	∞	4 °C

3.3.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) amplificados por PCR (PCR-RFLP) del gen 16S rRNA

La técnica PCR-RFLP (Osborn *et al.*, 2000; Igual *et al.*, 2006), se aplicó a la colección de aislados con el propósito de agrupar cepas que obtengan igual patrón de bandas. La amplificación del gen 16S rRNA (Figura 20), se llevó a cabo utilizando la técnica PCR, con los cebadores 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3' y 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'). El kit usado para la amplificación de las bandas del 16S rRNA fue la “*Go Taq Flexi DNA Polymerase*” de Promega Corporation (EE.UU). Se utilizaron los dNTPs de Pharmacia (EE.UU) y la seroalbúmina bovina (BSA) de Sigma (EE.UU). La composición de la mezcla y las condiciones para la PCR-RFLP se detallan en la Tabla 6.

Figura 20: Amplificación gen 16S rRNA.

Tabla 6: Reactivos, condiciones de tiempo y temperatura empleados en la técnica PCR-RFLP.

Reactivos PCR	Volumen (μL)	Fase PCR	Tiempo	Temperatura
Buffer green 5 x	10	Predesnaturalización	5'	95 °C
Cloruro de magnesio CIMg 25 mM	4	Ciclos → 35		
dNTPs 20 mM	0,5	Desnaturalización	1'	94 °C
Primer 1522R 2 mM	3	Anillamiento	30''	45 °C
Primer 8F 2 mM	3	Extensión	1:30'	72 °C
Taq	0,17	Extensión final	7'	72 °C
Agua miliQ	23,3	Conservación	∞	4 °C
ADN molde	4			
BSA 0,1 %	2			

El producto de la PCR del gen 16S rRNA para cada aislado fue tratado con diferentes enzimas de restricción para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Se usaron cinco enzimas para la digestión enzimática, de las cuales cuatro (*BanI*, *EcoRI*, *HinfI*, *StuI*) procedieron de “*Thermo Scientific* EE.UU, Fermentas”. La mezcla entre la enzima, el tampón incluido y el producto de la PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, en Eppendorf para PCR con 0,5 μL de enzima, 0,5 μL de buffer y 6 μL del producto de PCR; esta reacción se incubó a 37 °C toda la noche y se separó mediante electroforesis. La quinta enzima (*Sau3AI*) fue de “*New England BioLabs Inc.*”. En este caso la mezcla para la digestión consistió en 0,125 μL de enzima, 1,25 μL de buffer, 3,625 μL de H₂O y 5 μL del producto de PCR, esta mezcla se incubó una hora a 37 °C posteriormente el producto se separó por electroforesis.

3.3.4. Electroforesis para los diferentes productos de las técnicas RAPD y PCR-RFLP

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa (SeaKem LE, Lonza, EE.UU). Los geles de agarosa para los RAPD y para visualizar la banda correspondiente al 16S rRNA

(RFLP), se prepararon a una concentración de 1,5 %; para los geles de la digestión enzimática la concentración fue del 2 %. En la electroforesis se usó como tampón único TBE (Tris-borato-EDTA) (tris 12,11 g/L, ácido bórico 5,13 g/L, EDTA 0,37 g/L, de Fluka) con un pH 8,5. El marcador molecular utilizado fue el “*DNA Molecular Weight Marker VI*” (Roche, Alemania) en una dilución 1:4. Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm y utilizando una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad, EE.UU). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (BrEt) (Sigma, EE.UU) a 0,5 µg/mL por un periodo de 30 min y se fotografiaron con luz ultravioleta utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad, EE.UU).

3.3.5. Análisis estadísticos de los RAPD y PCR-RFLP

Los patrones RAPD se analizaron mediante análisis de agrupamientos o *cluster*. A partir de los patrones de bandas se obtuvo una matriz de presencia/ausencia para cada banda en cada cepa. A partir de ella se determinó una matriz de similitud entre todas las parejas de cepas, mediante al coeficiente de correlación de Pearson. Se utilizó este coeficiente de acuerdo al trabajo de Mulas *et al.* (2011) con objeto de seguir la metodología más habitual en trabajos de biodiversidad bacteriana de suelo, si bien en otro tipo de trabajos con RAPD como los de germoplasma vegetal, se suele utilizar el coeficiente de Dice. El dendrograma se construyó a partir de la matriz de similitud mediante el método de grupos de pares no ponderados con la media aritmética (UPGMA). Todos estos análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS Statistics 21 (SPSS Inc. EE.UU.).

El resultado de los RFLP se analizó mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) transformando los patrones de bandas en una matriz de presencia/ausencia para cada una de las bandas en cada una de las cepas. Esta matriz se analizó mediante análisis de agrupamiento siguiendo la metodología ya descrita para RAPD. Además con el objetivo de evaluar la biodiversidad bacteriana que existe en cada una de las localidades muestreadas, a partir de la matriz de 0/1 del ARDRA se determinó el Índice de diversidad de Shannon (índice H) (Shannon & Weaver, 1949) con el programa PopGene (Yeh *et al.*, 1999). Para investigar la relación entre el índice H y los caracteres físico-químicos del suelo, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de las localidades estudiadas en relación al índice H y otros 18 parámetros físico-químicos de suelo procedentes del análisis del mismo (Tabla 35 anejo 1A). Para la realización del ACP la matriz básica de datos se estandarizó

mediante transformación logarítmica decimal y se determinó la matriz de varianzas y covarianzas entre variables. Se obtuvieron los valores propios y la matriz de estructura factorial, rotando los nuevos ejes mediante el método Varimax. Se proyectaron sobre un *biplot* bidimensional formado por los dos primeros componentes principales, tanto las localidades de muestreo como las diferentes variables, con objeto de analizar las correlaciones entre las localidades y las variables, y también la correlación entre el índice H y los demás caracteres. Los análisis se realizaron con el programa NTSYSpC ver. 2.2 (Rohlf, 2006).

3.4. Pruebas de Promoción del Crecimiento Vegetal por bacterias PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacterias*) *in-vitro*

3.4.1. Producción de ácido indolacético (IAA)

Los aislados fueron analizados por su capacidad de producir IAA *in vitro*. Para realizar esta prueba se crecieron los aislados endofíticos en medio TSA y los rizosféricos en medio NA, incubándolos durante 48 h a 28 °C. A continuación con la masa bacteriana de cada aislado se preparó una suspensión en cloruro de sodio (NaCl) al 0,90 %, a una concentración aproximada de $3 \cdot 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro, de esta suspensión se tomaron 500 μ L y se transfirieron a un vial conteniendo 4 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) (17 g/L de caseína, 5 g/L NaCl, 3 g/L de peptona de soja, 2,5 g/L fosfato dipotásico y 2,5 g/L de dextrosa, pH 7,3, de Fluka) incubando por tres días a 28 °C, en agitación continua. El siguiente paso fue la preparación del medio de cultivo JMM (O'Hara *et al.*, 1989) (D-(+)-galactosa 1,8 g, L-(+)-arabinosa 1,5 g, K₂HPO₄ 26,1 mg, FeSO₄·7H₂O 5,5 mg, CaCl₂·2H₂O 147 mg en un volumen total de 1 L) con L-triptófano a una concentración final de 0,167 g/L. Una vez preparado el medio JMM se transfirieron 4 mL a un vial inoculando con 500 μ L de la suspensión bacteriana crecida en TSB, e incubando durante cuatro días a 28 °C en agitación continua.

Al finalizar la incubación en medio JMM, para evaluar el crecimiento bacteriano se hizo una lectura de la densidad óptica (DO) a 600 nm. A continuación de esta lectura se tomaron 1,5 mL del crecimiento bacteriano centrifugando a 5.000 g por 10 min; se recuperó 1 mL del sobrenadante, al que se le agregó 1 mL del agente Salkowski (FeCl₃ 0,01 M y ácido perclórico al 34,3 %), y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo se midió la DO a 535 nm, cuantificando la producción de IAA por comparación con una curva patrón.

3.4.2. Actividad ACC desaminasa

Preparación previa

A las cepas de la colección se les realizó la prueba de la actividad ACC desaminasa *in vitro*. A partir de la masa bacteriana obtenida como se describe en el apartado anterior, cada cepa se pasó a una placa con medio sólido DF sales (completamente libre de nitrógeno) a la que justo antes de la siembra se le adicionaron 300 μL de ACC 0,5 M y 600 μL de H_2O estéril, seguido de un secado en cabina de flujo laminar, previo a la siembra de la cepa correspondiente. La incubación se realizó durante 3 días a 28 °C. Con aquellas cepas que presentaron crecimiento en el medio de DF sales suplementado con ACC, se prepararon suspensiones de NaCl al 0,90 % hasta llegar a una concentración de $6 \cdot 10^8$ UFC. Con 20 μL de esta suspensión bacteriana se inoculó un tubo Falcón por cepa, conteniendo 15 mL de TSB, incubando durante toda la noche a 200 rpm a una temperatura de 28 °C.

Una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugaron los falcón a 8.000 g por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 mL de DF sales; los Falcón se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones anteriores y eliminando el sobrenadante. Terminado el proceso de centrifugado se resuspendió cada pellet en 7,5 mL de DF sales con 45 μL de ACC 0,5 M y se incubó durante toda la noche a 200 rpm a una temperatura de 28 °C. Al día siguiente se centrifugó cada Falcón a 8.000 g por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 y se centrifugó de igual manera, este paso se repitió cuatro veces y al finalizar se guardó cada pellet a -20 °C para la posterior determinación de la actividad ACC desaminasa.

Determinación de la actividad ACC desaminasa

La determinación de la capacidad de la actividad ACC desaminasa se realizó a partir de los pellets guardados a -20 °C. Se resuspendió cada pellet en 1 mL Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 y se transfirió a un Eppendorf, se centrifugó a 16.000 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a resuspender cada pellet en 600 μL de Tris-HCl 0,1 M; pH 8,5 y se añadieron 30 μL de tolueno, agitando por 30 seg en vórtex. Se pasó un volumen de 200 μL a un nuevo Eppendorf y se agregaron 20 μL de ACC a 0,5 M, agitando de nuevo en el vórtex, seguido de una incubación a 30 °C durante 15 min. Pasado este tiempo se

añadió 1 mL de HCl 0,56 M, se homogeneizó y se centrifugó a 16.000 g por 5 min, a continuación se pasó 1 mL del sobrenadante a un vial y se añadieron 800 µL de HCl 0,56 M; se homogeneizó y se agregaron 300 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina, incubando a 30 °C durante 30 min. Pasado este tiempo se añadieron 2 mL de NaOH 2 N, se homogeneizó y se midió la DO a 540 nm (Penrose & Glick, 2003). El resto de las células toluenizadas se guardaron a 6 °C para medir concentración de proteína.

Determinación de la concentración de proteína a partir de células toluenizadas

La concentración de proteína contenida en las células toluenizadas guardadas a 6 °C se determinó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Bradford, 1976) tomando 26,5 µL de las células toluenizadas que fueron transferidas a Eppendorfs, donde se agregaron a cada tubo 173,5 µL de Tris-HCl 0,1 M pH 8 y 200 µL de NaOH 0,1 M; acto seguido se sometieron a un baño de agua a una temperatura de 100 °C por 10 min, pasado este tiempo las muestras se dejaron enfriar y se tomaron 40 µL de esta mezcla colocándolos en un vial, donde se adicionaron 2 mL *Bio-rad protein assay* (Nº de catálogo 55-0006) diluido (1:4) con agua destilada y filtrado por papel *Whatman* # 1, se homogeneizó y se midió la DO a 595 nm.

3.4.3. Prueba de fijación de nitrógeno en bacterias endofíticas y rizosféricas

Para comprobar si las bacterias de la colección son capaces de fijar nitrógeno (N), se realizó una prueba en medio "*Norris Glucose*" libre de N (E. Velázquez, USAL, com. personal), (Tabla 7). Las bacterias crecidas según se describe en el apartado 3.4.1, se transfirieron por una parte al medio "*Norris Glucose*" y por otra al mismo medio suplementado con 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como control positivo. La inoculación de ambos medio se realizó a partir de una suspensión bacteriana en NaCl al 0,90 % a una concentración de $3 \cdot 10^8$ UFC/mL. El volumen de medio fue en los dos casos 4 mL y el de inóculo 100 µL de la suspensión bacteriana. Se incubó durante 3 días a 28 °C en agitación continua, posteriormente se midió el crecimiento a una DO de 600 nm.

Tabla 7: Medio de libre de nitrógeno “Norris Glucose”.

Reactivos	Cantidad
Glucosa	10 g
Fosfato dipotásico	1 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Carbonato de calcio	1 g
Cloruro de sodio	0,20 g
Molibdato de sodio	0,005 g
Sulfato ferroso	0,10 g
Agua destilada	1000 mL

3.4.4. Solubilización de fosfato

Para comprobar cuáles de aislados obtenidos en la colección poseían la capacidad se solubilizar fosfato insoluble se realizó una prueba *in vitro* (Nautiyal, 1999) consistente en visualizar la formación de un halo transparente en un medio sólido con fosfato mineral precipitado que le confiere turbidez. Dicho medio fue YED-P. Cada placa se dividió en cuatro, porque era suficiente con un cuadrante de la misma para evidenciar el halo formado por cada bacteria que solubilizan el fósforo insoluble. Cada bacteria producida como se indicó en el apartado 3.4.1, se sembró con ayuda de un mondadientes estéril en el centro de un cuadrante de la placa YED-P, incubándolas durante siete días a 28 °C. Al cabo de este tiempo se realizó el recuento de las bacterias que produjeron halo de transparencia, codificándolo como 1 si había presencia del halo y 0 en caso de ausencia.

3.4.5. Producción de sideróforos

La producción de sideróforos por parte de las diferentes cepas se analizó desde el punto de vista cualitativo por el método descrito por Alexander & Zuberer (1991) utilizando el medio *Chrome Azurol S Agar* (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987) que presenta un color azul marino. Los sideróforos quelan el Fe, cambiando la morfología del complejo con CAS, con lo que su típico color cambia a anaranjado. Las bacterias que crecen en dicho medio y son capaces de secretar sideróforos, generan un halo del mencionado color anaranjado alrededor de la colonia. Cada placa se dividió en cuadrantes para probar cuatro bacterias diferentes, porque era suficiente con un cuadrante para evidenciar la formación de correspondiente halo en caso de que se forme. Cada cepa, procedente de un cultivo puro obtenida tal como se indicó en el apartado 3.4.1, se sembró con ayuda de un mondadientes estéril en el centro de cada cuadrante y se incubó durante 7 días a 28 °C. La codificación de los resultados se

realizó otorgando una valoración cualitativa de 3 si la anchura de la corona circular del halo era ≥ 10 mm, 2 si estaba entre 5 y 10 mm, 1 si media 4 mm o menos, y 0 si no hubo presencia de halo.

3.4.6. Prueba de enfrentamiento bacterias PGPRs y el hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Se trata de una prueba *in vitro* de biocontrol del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet por parte de las bacterias PGPRs. Se utilizó la cepa CBS_121358 del hongo, procedente de Costa Rica, adquirido del *Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW)*, Países Bajos.

Para producir suficiente cantidad de inóculo del hongo se utilizó el procedimiento descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010). El hongo se creció en el medio *Malt Extrac Agar (MEA)* (30 g/L de extracto de malta, 5 g/L de peptona micológica y 15 g/L, pH 5,4, de Fluka) durante 14 días a 28 °C. Pasado este tiempo se preparó una suspensión micelial en agua estéril a una concentración en orden de 10^5 fragmentos de micelio por mL. Con 5 mL de esta suspensión micelial se inocularon Erlenmeyer con capacidad de 250 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo *Potato Dextrosa Broth (PDB)* (4 g/L de extracto de patata y 20 g/L de dextrosa, pH 5,1, de Fluka). Esto se realizó para obtener la mayor cantidad de micelio posible, ya que este hongo es de crecimiento lento. Los matraces inoculados se incubaron en un agitador orbital a una temperatura de 28 °C a una velocidad de 120 rpm durante 14 días. Pasado este tiempo se homogeneizó el crecimiento fúngico en el propio caldo de cultivo con un homogeneizador de muestras BRAUN (Figura 21), obteniendo una mayor cantidad de inóculo de una concentración de aproximadamente 10^5 fragmentos de micelio por mL.

Figura 21: Homogeneizador de muestras BRAUN.

Por otra parte las cepas bacterias se crecieron por el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1 y una vez crecidas cada una de ellas se resembró en el centro de una placa conteniendo el medio MEA. Las bacterias se dejaron crecer por 24 horas a 28 °C y una vez que se hubieron establecido en la placa se asperjó toda la superficie con el inóculo fúngico a razón de 1,5 mL por placa. Tras el secado del agua por evaporación en cabina de flujo laminar, las placas se incubaron a 28 °C por 14 días tomando datos sobre el desarrollo del hongo los días 6, 10 y 14. Si existía un halo de inhibición del crecimiento del hongo en torno a la bacteria se codificaba con 1, si el halo de inhibición era grande la codificación fue de 2 y si no había inhibición se codificó como 0.

3.4.7. Análisis estadístico de los resultados de las pruebas PGP *in vitro*

Con los datos obtenidos de las diferentes pruebas *in vitro* se realizaron en primer lugar varios análisis de contingencia, con el objetivo de analizar la relación entre: (a) diferentes parámetros indicadores de la actividad PGP *in vitro* y la procedencia de las cepas (endofíticas frente a rizosféricas); (b) diferentes parámetros indicadores de la actividad PGP *in vitro* y el grupo taxonómico al que pertenecen según la agrupación obtenida con el marcador RFLP del gen 16S rRNA. Como prueba de significación de las diferencias entre la distribución observada y la esperada se utilizó la prueba chi-cuadrado. Además se presentaron los residuos tipificados y corregidos.

Por otra parte se realizó un análisis de componentes principales (ACP), con la finalidad de seleccionar las bacterias destinadas a los ensayos en planta, tanto en vivero como en campo (apartado 4.6.1). También sirvió para seleccionar las bacterias destinadas al ensayo en planta sobre inducción de resistencia contra sigatoka negra (apartado 4.6.5). El ACP se realizó para cinco caracteres correspondientes a propiedades PGP (producción de IAA, actividad ACC desaminasa, producción de sideróforos, solubilización de fosfato mineral y fijación de nitrógeno) de las cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase. La matriz básica de datos se estandarizó obteniendo las puntuaciones Z, y se determinó la matriz de correlación entre caracteres. Se obtuvieron los valores propios y la matriz de estructura factorial, rotando los nuevos ejes mediante el método Varimax. Se proyectaron sobre un *biplot* bidimensional formado por los dos primeros componentes principales, tanto las cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase, como los diferentes caracteres, con objeto de analizar las relaciones entre cepas y caracteres, y en base a ellos seleccionar las cepas para ensayos en planta. Los análisis se realizaron con el programa NTSYSpc ver. 2.2 (Rohlf, 2006).

3.5. Ensayos en planta del efecto de bacterias endofíticas en la promoción del crecimiento vegetal y en la inducción de resistencia sistémica (RSI) contra sigatoka negra

3.5.1. Ensayo con PGPR en el proceso de producción de planta de banano en vivero

Los ensayos de producción de planta en vivero fueron llevados a cabo en los invernaderos del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad (IMARENABIO) de la Universidad de León. La variedad de banano utilizada fue Cavendish (*Musa acuminata* grupo AAA) con tres-cuatro hojas abiertas, procedentes de cultivo *in vitro* producidas por el Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI), República Dominicana. En ese estado de desarrollo en los viveros se considera finalizada la fase de aclimatación de las vitroplantas, y se inicia la última fase de cultivo en contenedores destinada a obtener planta de calidad comercial. El sustrato utilizado fue Sustrato Profesional (turba rubia 70 %, turba negra 30 %, NPK 12-14-24 y micro elementos, pH 6) producido por PINDSTRUP, Dinamarca.

En este ensayo se utilizó un **diseño experimental** de bloques al azar, con tres repeticiones o bloques. Los **tratamientos** fueron la inoculación con cinco cepas bacterianas del género *Pseudomonas*: RD_AZPVI_05 (*P. plecoglossicida*); RD_MAAMIA_05 (*P. plecoglossicida*); RD_DARAB_12 (*P. taiwanensis*); RD_MOPEP_07 (*P. mosselii*); RD_MAAMIB_01 (*P. taiwanensis*) y un control sin inocular. Estas cepas fueron seleccionadas por su capacidad de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* (ver apartado 4.6.1) y por criterios de bioseguridad, además se adiciono un testigo sin ningún tratamiento.

Cada unidad experimental estuvo compuesta por tres contenedores de una capacidad de 10 L, con una planta cada una. La inoculación de las plantas se realizó al momento del trasplante al contenedor. Cada planta se inoculó con 10 mL de una suspensión bacteriana a una concentración de $6 \cdot 10^8$ UFC/mL obtenida tras el cultivo puro del microorganismo en medio TSB durante cinco días a 28 °C.

La duración del ensayo fue de 90 días, durante la permanencia del cultivo se tomaron datos indicadores del crecimiento de las plantas: número de hojas por planta y la altura, aunque por ser escasamente informativos no se presentan en el trabajo. Al finalizar el ensayo se tomaron los datos de peso fresco y peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz, que fueron sometidos a ANOVA con el programa SPSS.

3.5.2. Ensayo sobre el uso de PGPR en campo

Este ensayo se realizó en el período 2012-2013 en la República Dominicana concretamente en la provincia de Azua, en un área de producción de banano. El ensayo se estableció en los terrenos de la estación experimental del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) (18° 23' 38" N y 70° 50' 47" W, altitud sobre el nivel del mar de 31 m).

Las plantas utilizadas fueron obtenidas del Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI), República Dominicana. La variedad utilizada fue Cavendish (*Musa acuminata* grupo AAA). Las plantas fueron obtenidas por métodos de cultivo *in vitro* y en el momento del trasplante tenían seis-siete hojas completamente desarrolladas.

El **diseño experimental** fue de bloques completamente al azar con tres bloques. Los **tratamientos** consistieron en las cinco cepas indicadas en el apartado anterior y un control sin inocular. La separación entre bloques fue de 4 m. Dentro de cada bloque se

dispusieron las seis unidades experimentales, consistentes cada una de ellas en tres filas de cuatro plantas separadas por 2 m entre si dentro de la fila, y la separación entre filas fue de 3 m. Dentro de cada unidad experimental, las dos filas externas y la dos plantas extremas de cada fila se consideraron bordes, por lo que las mediciones se realizaron en las dos que ocupaban posiciones centrales.

La inoculación se realizó en el momento de trasplante, con 20 mL por planta del inóculo producido en medio TSB durante cinco días a 28 °C con una concentración de $6 \cdot 10^8$ UFC/mL obtenida del cultivo puro de los microorganismos seleccionados. La fecha de trasplante fue el 6 de junio 2012.

Al mes de ser trasplantadas se le aplicó un abonado a razón de 3 kg de humus de lombriz por planta. Durante el cultivo se realizaron las siguientes operaciones: riegos periódicos para mantener el contenido de agua en el suelo entre el 80 y el 100% del agua útil, y deshierbado que se realizó manualmente con de azada en períodos de cada 30 días. Las hojas muertas o seriamente dañadas fueron eliminadas manualmente y extraídas de la parcela.

El inicio de la floración se produjo en enero de 2013. Al momento de la floración se realizaron las labores de despeje (eliminar hojas que interfieren en el desarrollo del racimo), desflore (eliminación de resto de flores de cada uno de los dedos que conforman el racimo), desdede (eliminar frutos de cada mano en el racimo que estén deformes) y descole (eliminación de la parte final de la inflorescencia), toda estas prácticas se realizan para obtener un racimo con frutos de buena calidad para la exportación. La producción frutos comenzó en el mes de marzo del 2013.

Periódicamente durante el cultivo se tomaron indicadores del crecimiento de las plantas, con el objeto de detectar posibles efectos del tratamiento: número total de hojas y posición de la primera hoja completamente extendida en la que aparecen signos necróticos como consecuencia de la incidencia de la sigatoka negra, contando desde el extremo apical.

En el momento de la floración se determinaron: número de hojas, altura de la planta, altura del hijo y perímetro del pseudotallo. En la cosecha: número de hojas; rendimiento por planta y sus componentes (número de manos por racimo, número de frutos por racimo, peso medio de un fruto).

Los datos fueron sometidos al ANOVA más adecuado a cada ensayo, utilizando el paquete estadístico SPSS.

3.5.3. Selección en planta y en condiciones controladas de bacterias desencadenantes del proceso de RSI contra sigatoka negra

Para realizar dicha selección, las cepas pre-seleccionadas por ciertas capacidades PGP *in vitro* relacionadas con la inducción de resistencia sistémica (apartado 4.6.5) se ensayaron en plantas de banano en un ambiente controlado para reproducir las condiciones de elevada humedad y temperatura que necesita el hongo para desarrollarse. Las condiciones de temperatura e iluminación fueron 28 °C durante 16 horas de luz y 22 °C durante 8 horas de oscuridad, a una humedad relativa entre 80 y 100 % (Leiva-Mora *et al.* 2010). El ensayo duró 140 días y se realizó en cámara de cultivo ubicada en los invernaderos del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad (IMARENABIO) de la Universidad de León.

El **diseño experimental** fue completamente aleatorio, con tres repeticiones. Los **tratamientos** consistieron en las 26 cepas de endófitos seleccionados por criterios de bioseguridad y capacidades PGP *in vitro* (ver apartado (4.6.5) tal como se ha indicado anteriormente. Además se emplearon dos testigos ambos sin inocular con bacterias, uno de ellos inoculado con el patógeno y el otro sin el hongo. Las plantas utilizadas tuvieron las mismas características que las del apartado 3.5.1.

Cada unidad experimental estuvo compuesta por un contenedor de una capacidad de 10 L, con una única planta. Cada tratamiento se inoculó al momento del trasplante a los contenedores con un volumen de 10 mL de la correspondiente suspensión bacteriana en NaCl al 0,90 % a una concentración aproximada de $9 \cdot 10^8$ UFC/mL. Dos semanas después del trasplante, los bananos se volvieron a inocular con 10 mL de solución bacteriana a la misma concentración y a la vez se inocularon con el hongo siguiendo el procedimiento descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010). La preparación del inóculo del hongo se realizó según la metodología descrita en el apartado 3.4.6. Para la inoculación del patógeno se mezcló el inóculo producido como se describe en dicho apartado con gelatina al 1 %, para que se adhiriera con mayor facilidad a la hoja. Este inóculo se aplicó sobre el envés de las hojas con la ayuda de un pincel. Se inocularon todas las hojas abiertas, una vez aplicado el inóculo del hongo las hojas se dejaron secar por dos horas y posteriormente fueron sometidas durante 72 horas a una

humedad relativa entre el 90-100 % mediante nebulización continua. Transcurrido este tiempo las condiciones de temperatura y humedad pasaron a ser las ya descritas

Para determinar la severidad de la sigatoka negra sobre las hojas de banano se usó el sistema de clasificación de Stover, modificada por Gauhl (Orjeda, 1998; Morales Romero *et al.*, 2011). Se tuvieron en cuenta los estadios de la enfermedad asignando un valor a cada hoja, el cual corresponde al porcentaje del área necrótica de acuerdo a la Tabla 8.

Tabla 8: Sistema de clasificación del ataque de sigatoka negra en hojas de banano según Stover, modificada por Gauhl (Orjeda, 1998; Morales Romero *et al.*, 2011).

Estado	Descripción
Estado 0	Sin síntomas
Estado 1	Menos de un 1 % de la lámina con síntomas (únicamente líneas y/o hasta 10 manchas)
Estado 2	1 a 5 % de la lámina con síntomas
Estado 3	6 a 15 % de la lámina con síntomas
Estado 4	16 a 33 % de la lámina con síntomas
Estado 5	34 a 50 % de la lámina con síntomas
Estado 6	51 a 100 % de la lámina con síntomas

Se determinó el índice de severidad (IS) para todas las plantas, siguiendo la fórmula de Townsend y Heuberguer (Orjeda, 1998; Morales Romero *et al.*, 2011).

$$IS = \sum nb / [(N-1) T] \text{ (Tabla 9).}$$

Tabla 9: Parámetros que intervienen en el cálculo del Índice de Severidad (IS) de Townsend y Heuberguer (Orjeda, 1998; Morales Romero *et al.*, 2011).

Código	Significado
IS	Índice de severidad
n	Número de hojas en cada estado (Tabla 8)
b	valor del estado correspondiente
N	Número de estados empleados (7)
T	Número total de hojas evaluadas

Al finalizar el período de 140 días se determinó además del IS, el peso fresco y seco de la parte aérea y la altura de la planta. Todos los datos fueron analizados mediante ANOVA con el software SPSS.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento en dos fases de una colección de 262 cepas bacterianas asociadas a raíces de banano en República Dominicana

Los datos del primer y segundo aislamiento se encuentran reflejados en la Tabla 10. Dichos resultados provienen de bacterias rizosféricas y endofíticas asociadas a las raíces del cultivo de banano, obtenidas en cuatro provincias de República Dominicana (R.D.): Montecristi, Dajabón, Azua y Mao (Figura 22), siendo estas dos últimas las más importantes en producción de bananos en ese país. En Montecristi es significativa la producción de este cultivo aunque en Dajabón es minoritaria, pero se consideró importante incluir los municipios de esta provincia porque se trata de agrosistemas de subsistencia en zonas de montaña, en las que la utilización de agroquímicos es muy escasa, con objeto de analizar si la baja utilización de insumos modifica la composición bacteriana de la rizosfera. En la primera fase se obtuvo una colección de 114 cepas puras, de las cuales 84 (73,68 %) fueron bacterias endofíticas y 30 (26,32 %) rizosféricas.

Tabla 10: Datos del número de cepas del primer y segundo aislamiento.

Provincias	Localidades	Códigos utilizados	1 ^{ra} . Fase de aislamiento		2 ^{da} . Fase de aislamiento		Total de aislados
			Endofítico	Rizosférico	Endofítico	Rizosférico	
Azua	Parcela del IDIAF	RD_AZIDI	7	4	5	4	20
Azua	Proyecto 2C	RD_AZPRC	3	6	13	4	26
Azua	Proyecto Isura	RD_AZPIS	2	1	7	2	12
Azua	Pueblo Viejo	RD_AZPVI	7	0	5	3	15
Azua	Los Tramojos	RD_AZLTR	5	1	6	3	15
Dajabón	Carrizal	RD_DACAR	4	2	1	3	10
Dajabón	Rabisal	RD_DARAB	6	3	8	2	19
Dajabón	La Rosa	RD_DAROS	5	0	4	3	12
Mao	Amina 1	RD_MAAMIA	12	3	8	3	26
Mao	Amina 2	RD_MAAMIB	2	2	3	1	8
Mao	Tierra Fría 1	RD_MATFA	3	2	6	0	11
Mao	Tierra Fría 2	RD_MATFB	0	2	4	0	6
Mao	El Charco	RD_MAELC	1	1	6	2	10
Montecristi	La Pinta	RD_MOLAP	4	1	2	4	11
Montecristi	Pepillo Salcedo	RD_MOPEP	5	2	7	4	18
Montecristi	Gozuela	RD_MOGOZ	3	0	7	2	12
Montecristi	Santa María 1	RD_MOSAA	6	0	3	5	14
Montecristi	Santa María 2	RD_MOSAB	2	0	2	0	4
Montecristi	Clavellina	RD_MOCLA	6	1	6	0	13
Total			83	31	103	45	262

Figura 22: Zonas de muestreos de las raíces asociadas al cultivo de banano en República Dominicana.

En La segunda fase de aislamiento se incrementó la colección de cepas de 114 a 262 (Tabla 10 y Tabla 11), manteniendo en esta segunda fase aproximadamente las mismas proporciones entre endofíticas (68,9 %) y rizosféricas (31,1 %), por consiguiente el total de aislados en la colección completa fue de 186 cepas endofíticas (71 %) y 76 cepas rizosféricas (29 %). El mayor número de aislados es procedente de la provincia de Azua, con 33,6 %, Montecristi 27,5 %, Mao 23,3 % y Dajabón 15,6 % (Tabla 11).

Tabla 11: Resumen cepas aisladas por provincias.

Provincia	Primer aislamiento		Segundo aislamiento		Nº Total de cepas aisladas	Porcentaje
	Endofítico	Rizosférico	Endofítico	Rizosférico		
Azua	24	12	36	16	88	33,59 %
Dajabón	15	5	13	8	41	15,65 %
Mao	18	10	27	6	61	23,28 %
Montecristi	26	4	27	15	72	27,48 %
Total	83	31	103	45	262	100 %

El aislamiento de bacterias rizosféricas (de la ectorrizosfera) se realizó utilizando como criterio para la selección una alta expresión de ciertas actividades PGP (Cabello-Conejo *et al.*, 2014) *in vitro*. En concreto se seleccionaron la actividad ACC desaminasa (Glick, 2014), y la capacidad de solubilizar fosfatos minerales insolubles (Vassileva *et al.*, 2010), características ambas que son poco comunes entre las bacterias rizosféricas y endofíticas, si se compara con otras propiedades como la producción de sideróforos o IAA. Para alcanzar este fin se utilizó un medio selectivo para el género *Pseudomonas*, basándose en los trabajos de Dworkin & Foster (1958).

4.2. Identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA de 114 cepas aisladas en la primera fase

En la Tabla 12 y en las Figura 24 a 26 se observa la identificación de las cepas, así como los arboles filogenéticos de las 114 bacterias colectadas en la primera fase. Se secuenció el gen 16S rRNA de dichas bacterias y las secuencias se compararon con las de las cepas tipo depositadas en la base de datos EZ-BioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) para identificar las cepas aisladas. Con carácter general, el criterio utilizado para atribuir una cepa aislada a una especie concreta, fue que la similitud con la cepa tipo más parecida fuera mayor o igual al 99,5 %. Para cada uno de los grandes grupos taxonómicos, alfa proteobacterias, beta proteobacterias, gamma proteobacterias y Gram positivas, las secuencias del gen 16S rRNA de cada cepa, junto

con las secuencias de la cepa tipo más similar, fueron sometidas a alineamiento múltiple, con el objetivo de elaborar un árbol filogenético para cada grupo.

Las 114 cepas pertenecieron a 20 géneros con 35 especies diferentes (Tabla 12). Sesenta y seis cepas fueron identificadas a nivel de especie, ya que presentaron una similitud en el gen 16S rRNA mayor o igual al 99,5 % con alguna cepa tipo (Tabla 36 Anejo 1B). Las 48 cepas restantes fueron identificadas a nivel de género (Tabla 12 y Figura 24 a 26), aunque por diferentes razones que se explican a continuación, no es posible llegar a la identificación específica. Veintinueve de las 48 cepas presentaron una similitud menor al 99,5 % y por tanto según el criterio establecido no puede asegurarse su identidad a nivel de especie y sería necesario recurrir a otras técnicas para saber si se trata de nuevas especies, subespecies o que por el contrario se trata de algunas de las ya conocidas

Dieciséis cepas pertenecientes al “grupo *Bacillus cereus*” (Figura 24), que incluye además *B. anthracis* y *B. thuringiensis*, no pudieron identificarse a nivel específico, pese a presentar una similitud mayor al 99,5 % con alguna de las especies tipo del grupo, ya que la compleja taxonomía del mismo impiden su identificación solamente en base a este gen (Anderson *et al.*, 2005; Rasko *et al.*, 2005). Por último otras 3 cepas del grupo de *Bacillus pumilus* (Figura 24), que incluye *B. safensis*, *B. altitudinis* y *B. aerophilus*, tampoco pudieron identificarse a nivel de especie, ya que en este grupo tampoco es posible tal identificación solo en base al gen 16S rRNA (Liu *et al.*, 2013a).

Tabla 12: Cepas de la primera fase identificadas a nivel de géneros y especies.

Gran grupo	Género	Nº cepas	Especie	Nº cepas	Origen*
Alfa proteobacterias	<i>Brevundimonas</i>	3	<i>B. olei</i>	3	R
	<i>Ochrobactrum</i>	3	<i>O. intermedium</i>	1	R
			<i>O. pseudogrignonense</i>	2	R
	<i>Pseudochrobactrum</i>	5	<i>P. asaccharolyticum</i>	3	R
			<i>P. saccharolyticum</i>	2	R
	<i>Rhizobium</i>	6	<i>R. massiliae</i>	1	E
			<i>R. radiobacter</i>	5	E
Gamma proteobacterias	<i>Acinetobacter</i>	4	<i>Acinetobacter</i> sp.	2	R
			<i>A. pittii</i>	2	R
	<i>Citrobacter</i>	2	<i>Citrobacter</i> sp.	1	R
			<i>C. youngae</i>	1	R
			<i>E. asburiae</i>	1	E
	<i>Enterobacter</i>	8	<i>E. cancerogenus</i>	1	E
			<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	1	R
			<i>Enterobacter</i> sp.	5	4E+1R
	<i>Leclercia</i>	1	<i>Leclercia</i> sp.	1	E
	<i>Luteimonas</i>	1	<i>Luteimonas</i> sp.	1	E
	<i>Pantoea</i>	3	<i>Pantoea</i> sp.	2	R
			<i>P. dispersa</i>	1	E
			<i>P. aeruginosa</i>	1	R
			<i>P. beteli</i>	3	2E+1R
			<i>P. koreensis</i>	1	E
	<i>Pseudomonas</i>	19	<i>P. mosselii</i>	1	E
			<i>P. otitidis</i>	1	E
			<i>P. plecoglossicida</i>	5	4E+1R
			<i>P. taiwanensis</i>	4	3E+1R
			<i>Pseudomonas</i> sp.	3	E
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	1	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	1	E
	<i>Serratia</i>	1	<i>S. nematodiphila</i>	1	R
	<i>Stenotrophomonas</i>	4	<i>S. maltophilia</i>	4	2E+2R
Beta proteobacterias	<i>Achromobacter</i>	1	<i>Achromobacter</i> sp.	1	R
	<i>Burkholderia</i>	2	<i>B. diffusa</i>	1	R
			<i>Burkholderia</i> sp.	1	E
	<i>Comamonas</i>	3	<i>C. aquatica</i>	1	E
			<i>C. testosteroni</i>	2	1E+1R
Gram positivas	<i>Cupriavidus</i>	1	<i>C. necator</i>	1	E
	<i>Bacillus</i>	43	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i>	2	E
			<i>B. aryabhattai</i>	2	E
			<i>B. circulans</i>	1	E
			<i>B. kochii</i>	1	E
			<i>B. marisflavi</i>	2	E
			<i>B. safensis</i>	1	E
			<i>B. siamensis</i>	2	E
			<i>B. subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i>	3	E
			<i>Bacillus</i> sp.	29	E
			<i>L. xylanilyticus</i>	2	E
	<i>Lysinibacillus</i>	3	<i>Lysinibacillus</i> sp.	1	E

* E, significa origen endofítico y R, origen rizosférico.

En el trabajo podrían haberse hallado nuevas especies o subespecies, correspondientes a todas aquellas que tuvieron una similitud menor al 99,5 % con las cepas tipo aceptadas. No obstante el proceso de descripción de nuevas especies requiere la secuenciación de un mayor número de genes. Por tanto con la información disponible en este momento no es posible afirmar si se trata de nuevas especies o subespecies, por lo que el esclarecimiento de este punto sería objeto de posteriores trabajos.

A pesar de que la secuenciación del gen 16S rRNA no permita identificar con certeza el 100 % de los aislados, desde el punto de vista tecnológico la secuenciación de dicho gen permite descartar con seguridad las especies que por su patogenicidad o por algún efecto negativo conocido en el medio ambiente, no puedan ser utilizadas en el desarrollo de nuevos biofertilizantes o biocontroladores. Es decir, que aunque esta técnica no sea suficientemente resolutoria como para describir una nueva especie, para un trabajo de desarrollo de biofertilizantes permite descartar las cepas muy próximas filogenéticamente a las especies patógenas o potencialmente peligrosas.

La discusión sobre la abundancia relativa de los diferentes géneros y especies encontrados en el trabajo se realiza en el apartado 4.4 destinado al análisis de la biodiversidad de la colección completa formada por 262 aislados.

Figura 23: Árbol filogenético con las bacterias del grupo beta proteobacterias aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas. Este árbol y los demás hacen referencia a los grupos formados mediante técnica PCR-RFLP (4.3.2).

Figura 24: Árbol filogenético con las bacterias grupo Gram positivas aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas.

Figura 25: Arbol filogenético con las bacterias del grupo gamma proteobacterias aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas.

Figura 26: Árbol filogenético con las bacterias del grupo alfa proteobacterias aisladas, junto con las bacterias tipo más próximas.

4.3. Validación de técnicas auxiliares para agrupar la biodiversidad de aislados en grupos taxonómicos reconocidos

Las bacterias son los organismos que presentan la mayor biodiversidad en el planeta (Prashar *et al.*, 2014), lo que junto con la naturaleza microscópica complica su caracterización y sistemática. Parte de esta complicación deriva del reducido número de descriptores morfológicos disponibles, razón por la que los marcadores moleculares han ayudado mucho a esta tarea (Shen & Young, 2005; Bracci *et al.*, 2011). Se han desarrollado ciertas técnicas moleculares sencillas y rápidas que permiten realizar una agrupación previa de los siempre numerosos aislados que se obtienen en un trabajo de aislamiento de bacterias en ecosistemas tan complejos como el suelo, biorreactores, compost, etc. El objetivo de esta agrupación previa es reducir la aplicación de otras técnicas más costosas y laboriosas a un menor número de cepas compuesto por representantes de cada uno de los grupos obtenidos (Gaunt *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2006).

En cuanto a las técnicas preliminares, las más utilizadas en la caracterización de bacterias son TP-RAPD, RAPD y PCR-RFLP entre otras.

Los perfiles de **TP-RAPD** se describieron en el año 2001 y se basan en la obtención de perfiles de ADN por electroforesis directa del producto de PCR obtenido tras la amplificación con dos cebadores universales diseñados a partir del gen ribosómico 16S de *Escherichia coli*, con un alto contenido en Guanina (G)+Citoquinina (C), lo que hace que junto con una temperatura de anillamiento relativamente alta, se produzca una amplificación parcial del gen ribosómico 16S, pero además la aparición de una serie de bandas de ADN por la inespecificidad de su anillamiento en otras regiones (Rivas *et al.*, 2001). La principal característica de los perfiles obtenidos con los TP-RAPD es que permiten diferenciar especies y/o subespecies, dos niveles aceptados taxonómicamente (Rivas *et al.*, 2002). Esta técnica ha sido probada fundamentalmente en bacterias del género *Rhizobium*, pero también puede ser usada en *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, entre otros (Rivas *et al.*, 2006; Velázquez *et al.* 2008). Sin embargo si se realizara un análisis multivariante tipo dendrograma o *cluster* de los patrones de bandas obtenidos mediante TP-RAPD, la agrupación no presentaría una buena correlación con la taxonomía, por lo que la interpretación debe hacerse relacionando directamente cada modelo con una especie o subespecie como en García-Fraile *et al.* (2010). Esta técnica no fue utilizada en el presente trabajo.

4.3.1. Análisis de los perfiles de RAPD

El análisis de perfiles de bandas obtenidos por medio de la técnica RAPD se ha utilizado en estudios de biodiversidad bacteriana (Ruiz *et al.*, 2008), ya que se ha demostrado que es un buen estimador de dicha diversidad, puesto que dentro de una misma especie las diferentes cepas pueden presentar diferentes perfiles de RAPD (Valverde *et al.*, 2006, 2011a, 2011b). A los 114 aislados se les analizó el perfil RAPD (Figura 27), utilizando el primer M13 (Rivas *et al.*, 2006), para comprobar si el resultado obtenido produce una agrupación coherente con la identidad taxonómica de las cepas, ya que para todas ellas se había secuenciado el gen 16S rRNA y por tanto estaban identificadas. De esta manera se puede valorar la utilidad de la técnica para realizar el agrupamiento previo a una secuenciación selectiva.

Figura 27: Perfiles RAPD de las cepas de la primera fase de aislamiento. MW marcador de peso molecular. Identidad de cada cepa de acuerdo al apartado 4.2. Entre paréntesis el grupo RFLP al que pertenecen (apartado 4.4).

Figura 27: Continuación 1.

Figura 27: Continuación 2.

La Figura 27 presenta las fotos de los patrones de bandas obtenidos para 104 de los 114 aislados de la primera fase, ya que para los 10 restantes no se obtuvo amplificación de bandas. Todas las cepas que no amplificaron pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Lysinibacillus*.

Existen seis parejas de cepas con patrones RAPD idénticos (Figura 27 y Figura 28. Continuación 2). Las cepas RD_DACAR_02 y RD_DACAR_06 con idéntico patrón RAPD pertenecen a diferentes especies del mismo género y también a diferentes grupos de RFLP, la primera identificada como *Burkholderia* sp. (grupo RFLP XXV) y la segunda como *Burkholderia diffusa* (grupo RFLP XXX). Este resultado va en contra de la lógica; analizando los patrones de bandas (Figura 27) se observa que solo se resolvieron con claridad 2 bandas, por lo que probablemente la aparente identidad de patrones no hubiera sido tal, si se hubiera visualizado un mayor número de bandas. En las cinco

parejas restantes de cepas con el mismo patrón RAPD, los dos miembros fueron de la misma especie tal como cabía esperar, aunque no necesariamente de la misma cepa. Por ejemplo RD_AZLTR_11 y RD_MAAMIA_20 (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) (Figura 27. Continuación 3) presentaron patrones idénticos pero la primera cepa procedió de la provincia de Azua en el Sur de Dominicana y la otra de Mao en el Norte, por lo que la probabilidad de que sean clones es muy reducida. Otras cuatro parejas de cepas tuvieron el mismo patrón de RAPD, y en estos casos si podría tratarse de clones por proceder de la misma finca, aunque a tenor del resultado obtenido con RD_AZLTR_11 y RD_MAAMIA_20 no puede asegurarse este extremo utilizando únicamente un cebador RAPD.

Por la gran variabilidad que se obtiene con la técnica RAPD cuando se parte de un importante número de aislados *a priori* muy heterogéneos taxonómicamente, la interpretación no puede hacerse definiendo modelos y analizando el número de cepas que se identifican con cada uno de ellos, ya que el número de modelos es siempre excesivamente elevado, como para poder proceder de esta manera. Por tanto como alternativa se ha propuesto realizar agrupaciones de los aislados mediante un dendrograma, obtenido a partir de la matriz de 0/1 correspondiente a los patrones de RAPD, lo que supuestamente conduciría a la obtención de grupos formados por cepas de la misma especie o subespecie, o muy afines. Esta estrategia ha dado buenos resultados en colecciones pequeñas de endófitos nodulares del género *Rhizobium* como en los trabajos de Mulas *et al.* (2011) y Díaz-Alcántara *et al.* (2014a), o en colecciones pequeñas de otros géneros como *Pseudomonas* (Bisht *et al.*, 2013). Sin embargo en colecciones muy vastas y con una diversidad de géneros y especies muy amplias, como sucede en los aislamientos de microorganismos endófitos y rizosféricos en medios muy generalistas como el TSA y el NA, la agrupación obtenida no suele estar relacionada con niveles taxonómicos comúnmente aceptados, tal como ha sucedido en nuestro caso (Figura 28).

Efectivamente, si se corta el dendrograma a una distancia relativa (o re-escalada) de 20 sobre 25, se forman 21 ramas en las que se distribuyen las 104 bacterias, de las cuales 18 están formadas por dos o más bacterias. Las tres ramas restantes (10, 17 y 21) tienen una sola cepa perteneciente a *Comamonas testoteroni*, *Citrobacter* sp. y *Pseudomonas plecoglossicida* respectivamente, mientras que otras cepas de esos mismos géneros y especies se agruparon en otras ramas. (Figura 28).

La rama 1 está formada por varios *Bacillus* de los grupos RFLP XXI y XXVI, que en el árbol filogenético se encuentran situados en la misma rama (Figura 24), si bien otras cepas del grupo XXVI aparecen agrupadas en otras ramas del dendrograma (Figura 28).

Las demás ramas del dendrograma incluyeron una mezcla de grupos taxonómicos (géneros y/o especies). En el caso del género *Bacillus*, el más numeroso de la colección, las especies de este género se situaron en 14 de las 18 ramas formadas por dos o más cepas. Algo similar sucedió con el género *Pseudomonas*, el segundo más numeroso, que se encuentra repartido en 13 de las 18 ramas.

Figura 28: Dendrograma resultante del análisis de la matriz de 0/1, del RAPD. Como coeficiente de similitud se ha utilizado la correlación de Pearson y el dendrograma se ha calculado con el método UPGMA. En color azul el nivel de similitud 100 % es decir idéntico patrón de bandas de RAPD.

Figura 28: Continuación 1.

Figura 28: Continuación 2.

Si el corte del dendrograma se realiza a una distancia de 10 sobre 25, se forman 21 ramas compuestas por dos o más cepas y 58 ramas que contienen una sola cepa. De las 21 ramas con dos o más cepas, 11 fueron coherentes (1A, 1B, 4A, 4B, 5A, 6B, 9A, 11A, 14B, 15A, 18A), en el sentido de que agruparon a cepas de la misma especie o especies próximas, mientras que las 10 restantes (2A, 2B, 2C, 4C, 5B, 6A, 8A, 8B, 13A, 14A) agruparon a cepas de diferentes géneros.

A la vista de estos resultados se descartaron los RAPD como técnica preliminar primaria para la agrupación de los aislados procedentes de la rizosfera (endorrizosfera

y ectorrizarosfera), aunque puede ser útil como técnica secundaria (ver explicación más adelante). Pueden existir al menos dos explicaciones posibles para las aparentes incoherencias. Por una parte la resolución de bandas RAPD es con frecuencia errática, lo que ha llegado a albergar dudas sobre la validez de esta técnica desde hace mucho tiempo (Micheli *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1999; Zhivotovsky, 1999), aunque continúe utilizándose porque en determinados casos es útil. En nuestro caso hubo muchas bandas débiles (Figura 27), lo que hace pensar que otras aún más débiles no se visualizaron en la foto del gel. Se podrían haber manifestado las bandas más generalistas en el sentido de estar presentes en un gran número de géneros, y por el contrario no haberse visualizado bandas más débiles específicas de determinados géneros, lo que podría justificar la localización conjunta en el dendrograma de géneros diferentes.

La segunda explicación para las aparentes incoherencias, es a nuestro entender mucho más sólida argumentalmente que la anterior. Debido a la propia naturaleza de los RAPD, que amplifican zonas del genoma al azar (Williams *et al.*, 1990), se ha demostrado que la técnica es útil para analizar la biodiversidad de grupos de individuos próximos a nivel de grupos taxonómicos aceptados, pero sin embargo en individuos alejados filogenéticamente las bandas del mismo tamaño no tienen por qué tener el mismo origen, y por eso las agrupaciones obtenidas llevan a situaciones incoherentes. De esta manera se explicaría los buenos resultados obtenidos dentro del mismo género como por ejemplo en colecciones de *Pseudomonas* (Bisht *et al.*, 2013) o de rizobios (Mulas *et al.*, 2011; Díaz-Alcántara *et al.*, 2014a), y las incoherencias obtenidas con colecciones muy amplias y diversas taxonómicamente.

Se ha analizado la posible utilidad de los RAPD como técnica preliminar secundaria, es decir para discriminar entre diferentes niveles taxonómicos dentro de cada grupo RFLP (ver apartado 4.3.2), ya que como se indica en dicho apartado los grupos RFLP engloban con frecuencia diferentes especies del mismo género o incluso géneros diferentes aunque afines. El uso de los RAPD presenta en ocasiones el problema de sobreestimar la diversidad de especies dentro de cada grupo RFLP, ya que se obtienen con frecuencia modelos muy diferentes entre cepas de la misma especie, con lo que si se secuenciara un representante de cada modelo RAPD, se secuenciaría mayor número de cepas que las estrictamente necesarias, si el objetivo es identificar a niveles taxonómicos aceptados. Esto sucede por ejemplo con las cuatro cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* (RD_MATFA_10; RD_MAAMIA_22; RD_DARAB_05 y

RD_AZPRC_06) (Figura 27. Continuación 2) que presentaron modelos RAPD muy diferentes (excepto RD_MAAMIA_22; RD_DARAB_05 que fueron más similares) y por tanto al menos tres cepas hubieran sido sometidas a secuenciación resultando que pertenecen a la misma especie.

Sin embargo en otras ocasiones los patrones RAPD obtenidos en diferentes cepas de la misma especie son relativamente similares entre si y diferentes a los obtenidos en cepas de otra especie, dentro del mismo grupo RFLP. Por ejemplo los patrones de *Pseudomonas taiwanensis* (RD_DARAB_16; RD_DARAB_12; RD_MAAMIB_01 y RD_AZLTR_05) presentan ciertas diferencias entre ellos, pero con un aspecto común que les diferencia claramente de los patrones de *P. plecoglossicida* (RD_DAROS_01; RD_MOSAA_03; RD_MAAMIA_05; RD_AZPVI_05 y RD_AZLTR_04) (Figura 27. Continuación 1). Lo mismo sucede en el caso del grupo RFLP XXVI (Figura 27. Continuación 2) del género *Bacillus*, donde el RAPD permite diferenciar especies, por ejemplo tres cepas diferentes no clónales de *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (RD_MOSAB_04; RD_AZPVI_11 y RD_MAELE_05) presentaron un modelo muy similar entre ellas, pero claramente diferente de las dos cepas de *B. siamensis* (RD_AZPIS_04 y RD_MATFA_04) que también presentaron entre si un patrón similar. A su vez ambos grupos se diferenciaron en base al patrón RAPD, de otro formado por tres *Bacillus* sp. muy próximos entre sí en el árbol filogenético (Figura 24) (RD_MOLAP_04, RD_AZPRC_15 y RD_AZPVI_10). El género *Ochrobactrum* es un ejemplo más de la utilidad de los RAPD para diferenciar entre especies (Figura 27), aunque en este caso las dos especies pertenecen a diferentes grupos RFLP y por tanto no es necesario utilizar el RAPD como técnica secundaria para diferenciarlas.

4.3.2. Análisis de los perfiles RFLP del gen 16S rRNA

La técnica PCR-RFLP se suele aplicar al gen 16S rRNA (Souza *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2003; De Souza *et al.*, 2013; Beneduzi *et al.*, 2013; Arruda *et al.*, 2013) pero también aunque con menos frecuencia a otros genes, como por ejemplo el *nifH* (Beneduzi *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013), y en otras ocasiones a los denominados *housekeeping* (Martínez *et al.*, 2003). La técnica PCR-RFLP por su relativa sencillez y economía se utiliza como técnica previa de agrupamiento de aislados, con el objeto de evitar el uso de técnicas más costosas como la secuenciación, en amplias colecciones de microorganismos. La técnica consiste en amplificar mediante PCR el gen correspondiente, en nuestro caso se amplificó el 16S rRNA con los cebadores 1522R y

8F, digiriendo posteriormente distintas alícuotas de los productos de PCR con diferentes enzimas de restricción, sometiendo a electroforesis el producto resultante de la digestión y analizando el patrón de bandas. Las enzimas utilizadas para el corte varían mucho en cada investigación, Ambrosini *et al.* (2012) usaron las enzimas *HaeIII* y *TaqI*; Saïdi *et al.* (2013) *MspI* y *NdeI*; Arruda *et al.* (2013) *HaeIII* y *TaqI*; De Souza *et al.* (2013) *HaeIII* y *MspI*. En todos estos estudios se utilizaron solo dos enzimas mientras que Lawongsa *et al.* (2008) utilizaron *AluI*, *HinfI*, *MspI* y *RsaI*; Xu *et al.* (2014), *HinfI*, *HhaI*, *HaeIII* y *MspI*. La razón para la elección de unas u otras enzimas es puramente empírica, aunque en algunas ocasiones se puede dirigir la selección mediante ensayos *in silico*.

En el presente trabajo se utilizaron cinco enzimas diferentes, *BanI*, *EcoRI*, *HinfI*, *Sau3AI* y *StuI*. Los 114 aislados de la primera fase fueron analizados mediante la técnica PCR-RFLP, y posteriormente el resto de la colección. Los patrones de bandas obtenidos tras el corte enzimático, se presentan en la Figura 29.

El número total de bandas obtenido tras el corte y el número de patrones de bandas, difieren según la enzima utilizada. El menor número de bandas se obtuvo con la enzima *EcoRI*, el mismo fue de cuatro lo que generó dos patrones diferentes. En el otro extremo se sitúa la enzima *Sau3AI* con 63 bandas y 13 patrones. La enzima *HinfI* generó 50 bandas y 11 patrones, la *BanI* 13 bandas y cinco patrones y la *StuI* 10 bandas y cinco patrones (Figura 29).

Enzimas de restricción *BanI* y *EcoRI* Enzima de restricción *HinfI* Enzima de restricción *Sau3AI* Enzima de restricción *StuI*

Figura 29: Diferentes patrones de bandas obtenidos tras la digestión del gen 16S rRNA con las enzimas de restricción indicadas. MW marcador de peso molecular.

Análisis de grupos RFLP en base al modelo conjunto con las cinco enzimas

Los 114 aislados de la primera fase, que habían sido previamente secuenciados, se distribuyeron en 40 grupos diferentes, obtenidos como combinación de los modelos generados con cada una de las cinco enzimas utilizadas (Tabla 13).

Dado que todas las cepas habían sido previamente secuenciadas, fue posible analizar la relación entre grupos RFLP, y los géneros y especies o conjuntos de especies que incluye cada uno de ellos.

De los 20 géneros de bacterias de la colección, solamente ocho formaron parte de un único grupo RFLP, que concretamente fueron los siguientes: *Achromobacter* estuvo representado por un *Achromobacter* sp. próximo a *A. insolitus* y formó parte exclusivamente del grupo IX; *Brevundimonas* estuvo representada por *B. olei* y formó parte exclusivamente del grupo XIII; *Cupriavidus* estuvo representado por *C. necator* y formó parte exclusivamente del grupo XXXIII; *Pseudoxanthomonas* estuvo representada por *Pseudoxanthomonas* sp. cercana a *P. indica* y formó parte exclusivamente del grupo XL; *Serratia* estuvo representada por *S. nematodiphila* y formó parte exclusivamente del grupo VIII; *Stenotrophomonas* estuvo representada por *S. maltophilia* y formó parte del grupo XXXII. Por otra parte *Leclercia* estuvo representado por una *Leclercia* sp. próxima a *L. adecarboxylata* y formó parte del grupo VII, aunque en este grupo también hubo especies del género *Enterobacter*; *Luteimonas* estuvo representada por *L. aestuarii* y perteneció al grupo XXXI al que también pertenecieron especies de *Pseudomonas*.

Los restantes géneros estuvieron distribuidos entre varios grupos. El más numeroso fue el género *Bacillus* que estuvo repartido entre ocho grupos, siendo el XVII el más extenso que incluye a la especie *B. marisflavi* y al “grupo *Bacillus cereus*”. Además el género *Bacillus* formó otros grupos con diferentes especies, que fueron los siguientes: XIV (*B. kochii*); XXI (*B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*); XXIII (*B. safensis*); XXVI (*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* y *B. siamensis*); XXVII (*Bacillus* sp., próximo a *B. gottheilii*); XXVIII (*B. circulans*); XXIX creado con el grupo de los *Bacillus pumilus*.

Tabla 13: Grupos RFLP obtenidos como combinación de los modelos generados al cortar con cinco enzimas de restricción el gen 16S rRNA tras su amplificación mediante PCR.

Modelo generado para cada enzima					Grupo RFLP	Géneros incluidos en el grupo
<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>		
A	A	A	A	A	I	<i>Pseudomonas</i>
A	A	A	A	D	II	<i>Pseudomonas</i>
A	A	I	E	A	III	<i>Pseudomonas</i>
A	A	I	E	C	IV	<i>Pseudomonas</i>
A	B	A	K	D	V	<i>Acinetobacter</i>
A	B	B	B	A	VI	<i>Enterobacter; Pantoea</i>
A	B	B	B	B	VII	<i>Enterobacter; Leclercia</i>
A	B	B	B	E	VIII	<i>Serratia</i>
A	B	D	D	B	IX	<i>Achromobacter</i>
A	B	F	K	D	X	<i>Acinetobacter</i>
A	B	H	B	B	XI	<i>Citrobacter</i>
B	A	A	E	C	XII	<i>Pseudomonas</i>
B	A	D	I	A	XIII	<i>Brevundimonas</i>
B	B	A	I	A	XIV	<i>Bacillus</i>
B	B	B	B	B	XV	<i>Enterobacter</i>
B	B	C	D	B	XVI	<i>Comamonas</i>
B	B	D	C	A	XVII	<i>Bacillus</i>
B	B	D	H	A	XVIII	<i>Lysinibacillus</i>
B	B	D	M	A	XIX	<i>Lysinibacillus</i>
B	B	E	L	B	XX	<i>Pantoea</i>
B	B	J	B	A	XXI	<i>Bacillus</i>
B	B	J	B	B	XXII	<i>Citrobacter</i>
B	B	J	C	A	XXIII	<i>Bacillus</i>
B	B	J	D	A	XXIV	<i>Comamonas</i>
B	B	J	D	D	XXV	<i>Burkholderia</i>
B	B	J	F	A	XXVI	<i>Bacillus</i>
B	B	J	G	A	XXVII	<i>Bacillus</i>
B	B	J	H	A	XXVIII	<i>Bacillus</i>
B	B	J	I	A	XXIX	<i>Bacillus</i>
B	B	K	D	D	XXX	<i>Burkholderia</i>
C	B	A	G	B	XXXI	<i>Luteimonas; Pseudomonas</i>
C	B	A	K	B	XXXII	<i>Stenotrophomonas</i>
C	B	J	J	D	XXXIII	<i>Cupriavidus</i>
D	A	A	J	D	XXXIV	<i>Pseudochrobactrum</i>
D	A	J	J	D	XXXV	<i>Pseudochrobactrum</i>
D	B	A	J	A	XXXVI	<i>Ochrobactrum</i>
D	B	D	K	D	XXXVII	<i>Ochrobactrum</i>
D	B	G	C	D	XXXVIII	<i>Rhizobium</i>
D	B	G	J	D	XXIX	<i>Rhizobium</i>
E	A	A	G	D	XL	<i>Pseudoxanthomonas</i>

También el género *Pseudomonas* estuvo repartido entre varios grupos, en concreto seis, cinco de ellos formados solamente por especies de dicho género y uno más por especies de *Pseudomonas* y *Luteimonas*: El grupo I estuvo formado por las especies *P. otitidis* y *P. resinovorans*; el II por *P. aeruginosa*; el III por *Pseudomonas* sp. próxima a *P. toyotomiensis*; el IV por *P. taiwanensis*, *P. plecoglossicida* y *P. mosselii*, el XII por *P. koreensis*; el XXXI por *P. beteli*, aunque también por una especie del género *Luteimonas*, concretamente *L. aestuarii*.

El género *Enterobacter* estuvo repartido en tres grupos, dos de los cuales también estuvieron integrados por especies de los géneros *Leclercia* y *Pantoea* respectivamente, por lo que estos tres géneros no pueden diferenciarse bien basándose exclusivamente el análisis RFLP realizado. El grupo XV estuvo integrado por *E. cloacae* subsp. *dissolvens*; el grupo VI por *Enterobacter* sp. próxima a *E. cancerogenus* y por *Pantoea dispersa*; el grupo VII por *E. asburiae* y *Enterobacter* sp. próxima a *E. ludwigii* y por el género *Leclercia*.

Obtención de dendrograma a partir del ARDRA

Los modelos de RFLP obtenidos se tradujeron a una matriz de presencia y ausencia de bandas. Este tipo de análisis recibe el nombre de ARDRA, la matriz de 0/1 obtenida fue analizada mediante el análisis multivariante de agrupamientos, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para elaborar la matriz de similitud. En la Figura 30 se presenta el dendrograma obtenido para un representante de cada grupo RFLP.

Cortando el dendrograma a una distancia relativa (o re-escalada) de 20 sobre 25 se forman seis ramas en total (Figura 30), tres de las cuales son coherentes con la filogenia (Figura 23 a 26). La rama 7 (Figura 30) está formada por los grupos I, II, III, IV y XII constituidos por diferentes especies del género *Pseudomonas*. En el árbol filogenético estos grupos están también en la misma rama (Figura 25).

Figura 30: Dendrograma resultante del análisis ARDRA seleccionando un único representante por cada modelo RFLP del gen 16S rRNA, es decir un representante de cada grupo RFLP. Como coeficiente de similitud se ha utilizado la correlación de Pearson y el dendrograma se ha calculado con el método UPGMA.

La rama 5 está constituida por el grupo XXXI de *Luteimonas* y *Pseudomonas*, el XXXII por *Stenotrophomonas* y el XL por *Pseudoxanthomonas*, lo que también es coherente con la agrupación obtenida en el árbol filogenético.

La rama 1 está formada por los grupos VI, VII, VIII, XI y XV, que comprende los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Leclercia*, *Serratia* y *Citrobacter*, que también se encuentran agrupados en el árbol filogenético (Figura 25). Sin embargo el grupo XX constituido por *Pantoea*, que en el árbol filogenético forma parte de la misma rama que los géneros anteriores, en el dendrograma (Figura 30) queda fuera, y aparece en la rama 3 asociada a beta proteobacterias, habiéndose descartado la posibilidad de que se tratara de algún tipo de error. Lo mismo sucede con el grupo XXII (*Citrobacter*) que queda fuera de la rama 1.

Para el nivel de corte indicado, es decir una distancia de 20 sobre 25, el género *Bacillus* está repartido entre las ramas 2 y 4. Concretamente la rama 2 incluye al género *Bacillus* y *Lysinibacillus* (grupos XIV, XVII, XVIII y XIX), pero también al grupo XIII de *Brevundimonas*. La rama 4 incluye además de los grupos XXI, XXIII, XXVI, XXVIII, XXIX todos ellos del género *Bacillus*, otras beta proteobacterias, y además a *Citrobacter* (grupo XXII) que filogenéticamente pertenece al mismo grupo que *Enterobacter*. También incluye al grupo XXXV de *Pseudochrobactrum assaccharolyticum*, que queda alejado del resto de los *Pseudochrobactrum* y *Ochrobactrum*, que se sitúan en la rama 6.

Si el corte del dendrograma se realizara a una distancia de 5 sobre 25, es decir para una similitud muy alta, también quedarían en la misma rama grupos RFLP que filogenéticamente son dispares, como por ejemplo *Bacillus* (grupo XXI) y *Citrobacter* (grupo XXII), ambos en la rama 4, y también *Comamonas* (grupo XXIV) y *Burkholderia* (grupo XXV), en la misma rama.

Otros trabajos de caracterización de bacterias rizosféricas y endofíticas, han obtenido dendrogramas basados en las matrices del ARDRA, obteniendo también como en nuestro caso diferentes géneros en la misma rama del dendrograma, y el mismo género en diferentes ramas, como en Ambrosini *et al.* (2012) y en Souza *et al.* (2013). Beneduzi *et al.* (2013) llegaron a resultados similares con un estudio PCR-RFLP de un gen diferente, concretamente el *nifH*. Por tanto debe concluirse que aunque la secuencia del gen 16S rRNA tenga valor filogenético, el dendrograma derivado del

ARDRA tiene limitaciones en este aspecto. Esto puede deberse a las distorsiones inherentes al cálculo matemático y a que los dendrogramas utilizan criterios relativamente arbitrarios a la hora de elaborar grupos (Ortiz *et al.*, 2010), lo que conduce a situaciones aparentemente incoherentes de elevada similitud entre géneros dispares.

Por todas las razones discutidas, cuando se trabaja con una amplia colección de aislados endofíticos y rizosféricos, los grupos formados con la técnica PCR-RFLP del gen 16S rRNA son útiles para agrupar aislados con objeto de reducir el número de cepas a secuenciar, pero solo diferencian a nivel de género y en algunos casos distinguen grupos afines de especies. Aun así no permiten discriminar géneros en todos los casos, pues a veces géneros afines taxonómicamente quedan en el mismo grupo RFLP (por ejemplo *Enterobacter*, *Pantoea* y *Leclercia* por un lado y *Pseudomonas* y *Luteimonas* por otro). Para evitar esta limitación se ha propuesto realizar RAPD como técnica secundaria dentro de los grupos RFLP, lo que permitiría resolver parcialmente el inconveniente de la imposibilidad de diferenciar especies o subespecies, aunque los RAPD con frecuencia sobreestiman el número de especies.

4.3.3. Análisis multicriterio para la selección de la técnica auxiliar más adecuada para la agrupación de aislados

La Tabla 14 presenta el análisis multicriterio para la selección de la técnica auxiliar **primaria** más adecuada para la agrupación de los aislados, cuando se tiene una colección muy amplia y *a priori* muy diversa taxonómicamente, por haber utilizado un medio de cultivo muy generalista para el aislamiento. La valoración está basada en los resultados y discusión presentados en los apartados 4.3.1 y 4.3.2.

Para el análisis multicriterio (Tabla 14) se parte de una interpretación de los RAPD basado en el dendrograma, por la inviabilidad de analizarlos en términos de “modelos de bandas” y número de aislados correspondientes a cada uno de los modelos. Sin embargo los RFLP se interpretan en términos de “grupos conjuntos”, correspondientes a la combinación de los modelos obtenidos con las cinco enzimas.

Tabla 14: Análisis multicriterio para la elección de la técnica **primaria** de agrupación previa de cepas, comparando RAPD y RFLP. Valores de 1 a 10 y ponderación sobre 100.

Criterios de valor para la selección	Ponderación	RAPD (dendrograma)	RFLP (grupos)
Coherencia de agrupación acorde con la taxonomía	35	2	10
Posibilidad de discriminar a niveles taxonómicos inferiores a género	15	4*	2
Reproducibilidad de los resultados	15	3	10
Facilidad en la interpretación de bandas (coherencia entre diferentes usuarios)	15	2	8
Tiempo (se valora más la técnica que consume menos tiempo)	12	9	3
Coste (se valora con más puntuación la técnica con menor coste)	8	9	2
Valoración total	100	3,9	7,0

*En teoría la técnica es adecuada para discriminar a niveles taxonómicos inferiores al género, pero cuando se parte de géneros muy alejados taxonómicamente como en este caso, la discriminación entre especies no es buena, de ahí la baja calificación.

En cuanto a los criterios de valor para la selección de la técnica y la ponderación de los mismos, se ha priorizado la coherencia de la agrupación desde el punto de vista taxonómico, y por esa razón ha recibido el valor más elevado en la ponderación (35 sobre 100). La posibilidad de discriminar a niveles taxonómicos inferiores género, la reproducibilidad de los resultados, y la facilidad de interpretación de las bandas (lo que posibilita un fácil intercambio de información entre diferentes usuarios), han sido valorados con 15 puntos sobre 100 cada uno de ellos.

Especial mención merece la posibilidad de discriminar a niveles taxonómicos inferiores al género, lo que definitivamente es el punto débil de la técnica PCR-RFLP, ya que no permite dicha discriminación. Por tanto la aceptación o no de esta técnica va a depender de los objetivos planteados en el trabajo, es decir del grado de discriminación que se busque. En todo caso es necesario insistir en que agrupa a especies afines filogenéticamente, por ejemplo todas las especies del grupo de *Bacillus cereus* aparecen en el mismo grupo (XVII), y se diferencian por ejemplo de las subespecies de *Bacillus subtilis* aisladas en nuestro estudio, que aparece en otro grupo (XXVI). *B. cereus* es patógeno, y *B. subtilis* es considerado un buen PGPR. Sin embargo *B. aryabhattai*, que es también una buena PGPR, cae en el mismo grupo XVII que *B. cereus*.

En teoría la técnica RAPD permite discriminar a nivel de especie, pero cuando se trata de aislados muy dispares taxonómicamente esta discriminación no es buena, y por esa razón la puntuación recibida es baja, ya que existe tal discriminación, pero no es útil para los objetivos buscados.

La evaluación global otorga 3,9 puntos a los RAPD y 7,0 a los RFLP sobre 10, lo que pone en evidencia que no es posible agrupar la biodiversidad bacteriana utilizando una única técnica. Por esta razón se ha propuesto la combinación de ambas, utilizando como primaria los RFLP y como secundaria los RAPD (Figura 31). La combinación de ambas técnicas no resuelve completamente el problema, ya que de una subestimación de especies con la técnica RFLP, se pasa a una sobreestimación de las mismas con la combinación de ambas técnicas. En nuestro estudio, la colección global se ha analizado solamente en base a los RFLP, pues hemos juzgado que la agrupación obtenida es suficiente para el análisis de biodiversidad abordado (apartado 4.4).

Técnicas auxiliares o preliminares		Viabilidad	Limitaciones
Primaria	Secundaria		
RAPD (dendrograma)	-	NO	-
RFLP 16S rRNA (grupos)	-	SI	No es posible discriminar entre especies y en algún caso tampoco entre géneros. Sin embargo los grupos de géneros y especies que se forman son siempre afines
RFLP 16S rRNA (grupos)	RAPD	SI	Baja reproducibilidad de los RAPD Diferentes cepas de la misma especie pueden presentar patrones de bandas muy dispares y esto conduce a secuenciar más cepas de las necesarias

Figura 31: Resumen sobre la viabilidad de las diferentes técnicas auxiliares para agrupar aislados como fase previa para la identificación de estos mediante secuenciación del gen 16S rRNA.

4.4. Análisis de la biodiversidad de la colección de 262 cepas mediante los perfiles RFLP del gen 16S rRNA

La colección global está compuesta por 114 cepas de la primera fase y 148 de la segunda que en total suman 262. Las 262 cepas se agruparon en base a los RFLP del gen 16S rRNA obtenidos con las cinco enzimas de restricción (Tabla 15).

Tabla 15: Análisis de la biodiversidad de la colección asociada a los modelos RFLP.

Gran grupo	Géneros	Grupo RFLP	Primera fase		Segunda fase		Total
			Nº	%	Nº	%	Nº
Alfa proteobacterias	<i>Brevundimonas</i>	XIII	3	2,6	0	0,0	3
Alfa proteobacterias	<i>Ochrobactrum</i>	XXXVI	2	1,8	3	2,0	5
Alfa proteobacterias	<i>Ochrobactrum</i>	XXXVII	1	0,9	0	0,0	1
Alfa proteobacterias	<i>Pseudochrobactrum</i>	XXXIV	2	1,8	1	0,7	3
Alfa proteobacterias	<i>Pseudochrobactrum</i>	XXXV	3	2,6	0	0,0	3
Alfa proteobacterias	<i>Rhizobium</i>	XXXVIII	5	4,4	1	0,7	6
Alfa proteobacterias	<i>Rhizobium</i>	XXIX	1	0,9	2	1,4	3
Beta proteobacterias	<i>Achromobacter</i>	IX	1	0,9	0	0,0	1
Beta proteobacterias	<i>Burkholderia</i>	XXV	1	0,9	0	0,0	1
Beta proteobacterias	<i>Burkholderia</i>	XXX	1	0,9	0	0,0	1
Beta proteobacterias	<i>Comamonas</i>	XVI	1	0,9	0	0,0	1
Beta proteobacterias	<i>Comamonas</i>	XXIV	2	1,8	3	2,0	5
Beta proteobacterias	<i>Cupriavidus</i>	XXXIII	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Acinetobacter</i>	V	2	1,8	2	1,4	4
Gamma proteobacterias	<i>Acinetobacter</i>	X	2	1,8	4	2,7	6
Gamma proteobacterias	<i>Citrobacter</i>	XI	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Citrobacter</i>	XXII	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Enterobacter; Pantoea</i>	VI	3	2,6	0	0,0	3
Gamma proteobacterias	<i>Enterobacter; Leclercia</i>	VII	4	3,5	9	6,1	13
Gamma proteobacterias	<i>Enterobacter</i>	XV	3	2,6	0	0,0	3
Gamma proteobacterias	<i>Pantoea</i>	XX	2	1,8	1	0,7	3
Gamma proteobacterias	<i>Pseudomonas</i>	I	2	1,8	2	1,4	4
Gamma proteobacterias	<i>Pseudomonas</i>	II	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Pseudomonas</i>	III	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Pseudomonas</i>	IV	11	9,6	22	14,9	33
Gamma proteobacterias	<i>Pseudomonas</i>	XII	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Pseudomonas; Luteimonas</i>	XXXI	4	3,5	9	6,1	13
Gamma proteobacterias	<i>Pseudoxanthomonas</i>	XL	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Serratia</i>	VIII	1	0,9	0	0,0	1
Gamma proteobacterias	<i>Stenotrophomonas</i>	XXXII	4	3,5	11	7,4	15
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XIV	1	0,9	0	0,0	1
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XVII	23	20,2	57	38,5	80
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XXI	2	1,8	2	1,4	4
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XXIII	1	0,9	0	0,0	1
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XXVI	10	8,8	13	8,8	23
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XXVII	1	0,9	0	0,0	1
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XXVIII	1	0,9	0	0,0	1
Gram positivas	<i>Bacillus</i>	XXIX	4	3,5	3	2,0	7
Gram positivas	<i>Lysinibacillus</i>	XVIII	2	1,8	2	1,4	4
Gram positivas	<i>Lysinibacillus</i>	XIX	1	0,9	0	0,0	1
-	Sin identificar	XI BIS	0	0	1	0,7	1
Total de cepas			114	100	148	100	262

Para las cepas aisladas en la primera fase se obtuvieron un total de 40 modelos diferentes de RFLP que correspondieron a los 20 géneros ya secuenciados. Para las aisladas en la segunda fase se repitieron 18 de los modelos anteriores que incluyeron en total 13 géneros diferentes, y además se obtuvo un nuevo modelo (XI BIS) (Tabla 15) con un único representante, la cepa RD_MOSAA_14, cuyo gen 16S rRNA no fue secuenciado y en consecuencia se desconoce su identidad taxonómica. Hay que destacar que en la primera fase se obtuvieron 22 modelos RFLP minoritarios

(representados por una única cepa o un número muy reducido de éstas) que fueron exclusivos de esta fase ya que no se repitieron en la segunda (Tabla 15). La explicación podría estar en el mayor tiempo y peores condiciones de conservación de las muestras entre el momento de la recolección en campo y el de extracción de las bacterias, que podría haber afectado más a las especies de las que había menos individuos.

Grupos taxonómicos de microorganismos según la procedencia endofítica o rizosférica: Comparación

En cuanto a las 186 cepas de endófitos en la colección completa, el 66 % fueron Gram positivas, el 26 % gamma proteobacterias, el 5 % alfa proteobacterias y el 3 % restante beta proteobacterias (Figura 32). Entre las bacterias rizosféricas no hubo Gram positivas debido a que el medio empleado fue selectivo para bacterias del género *Pseudomonas*, aunque este medio también permite el crecimiento de otras Gram negativas. El 73 % de las bacterias rizosféricas pertenecieron al grupo de las gamma proteobacterias, el 20 % a las alfa proteobacterias y el 7 % restante a las beta proteobacterias (Figura 32).

Figura 32: Proporción de los grupos de bacterias endofíticas y rizosférica.

La Tabla 16 es un análisis de contingencia entre la procedencia de las cepas, endofíticas frente a rizosféricas y los grupos RFLP del gen 16S rRNA a los que pertenece cada cepa, con el objeto de analizar si existen grupos RFLP que presenten mayor predominio en una de las dos procedencias.

Tabla 16: Análisis de contingencia de grupos RFLP según su origen. Solamente se han considerado aquellos grupos de PCPR-RFLP constituidos por 4 o más cepas. Los valores indicados en la tabla corresponden al recuento de bacterias, mientras que los números entre paréntesis son los residuos tipificados y corregidos correspondientes a la diferencia entre el recuento de bacterias y el número de bacterias pronosticado por el modelo. (Nivel de significación de la relación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Grupos Gram	Grupos PCR-RFLP	Recuento y residuos tipificados corregidos		χ^2 (p)
		Bacterias endofíticas	Bacterias rizosféricas	
Gamma proteobacterias	I	4 (1,2)	0 (-1,2)	138,290***
	IV	25 (0,1)	8 (-0,1)	
	V	0 (-3,5)	4 (3,5)	
	VII	6 (-2,5)	7 (2,5)	
	X	0 (-4,0)	5 (4,0)	
	XXXI	4 (-3,8)	9 (3,8)	
	XXXII	2 (-5,8)	13 (5,8)	
Gram-positivas	XVII	79 (6,4)	0 (-6,4)	
	XVIII	4 (1,2)	0 (-1,2)	
	XXI	4 (1,2)	0 (-1,2)	
	XXVI	22 (2,8)	0 (-2,8)	
	XXIX	7 (1,5)	0 (-1,5)	
Beta proteobacterias	XXIV	2 (-1,9)	3 (1,9)	
Alfa proteobacterias	XXXVI	0 (-4,0)	5 (4,0)	
	XXXVIII	6 (1,4)	0 (-1,4)	

En el caso de las gamma proteobacterias el análisis de contingencia demuestra que los grupos de RFLP I y IV del género *Pseudomonas*, los cuales se encuentran filogenéticamente situados en la misma rama (Figura 25), presentan mayor proporción de aislados endofíticos y menor de rizosféricos que lo que correspondería en una distribución aleatoria (Tabla 16). Por el contrario los grupos de RFLP XXI y XXXII, situados también en una misma rama diferente a la anterior (Figura 25) y compuesta por aislados de los géneros *Luteimonas*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, presentan mayor proporción de aislados rizosféricos y menor de endofíticos que en una distribución aleatoria. Los aislados del género *Acinetobacter* pertenecientes a los grupos RFLP V y X, que presentan una posición filogenética intermedia entre los dos anteriores, presentan también una mayor proporción de bacterias rizosféricas y menor de endofíticas que lo que correspondería por azar.

En cuanto a las Gram positivas, como ya se ha indicado todos fueron endofíticos, ya que el medio empleado para el aislamiento de los rizosféricos excluye a este tipo de microorganismos.

Las bacterias beta proteobacterias del género *Comamonas* presentaron cepas endofíticas y rizosféricas, con una mayor proporción de estas últimas con respecto a lo que cabría esperar en una distribución aleatoria.

Por último en las alfa proteobacterias todos los aislados pertenecientes al género *Rhizobium* fueron endofíticos, y los del género *Ochrobactrum* rizosféricos.

Grupos taxonómicos de microorganismo asociados a las raíces de banano y factores determinantes

La abundancia relativa de cepas de los grupos RFLP mayoritarios, fue similar en las dos fases, aunque lógicamente al haber en la segunda fase menos cepas en grupos RFLP minoritarios, los valores numéricos de los porcentajes en los grupos mayoritarios fueron superiores en dicha fase (Tabla 15). De todos los grupos RFLP el que mayor número de cepas contuvo fue el XVII con 80 cepas, de las cuales 23 proceden de la primera fase lo que constituye el 20,2 % del total de las cepas aisladas en esta fase y 57 de la segunda (38,5 % del total de cepas aisladas en dicha fase). Este grupo está formado por diferentes especies del género *Bacillus*, que incluyen a *B. marisflavi* y al "grupo *Bacillus cereus*". El segundo grupo más grande es el IV con 33 cepas de las cuales 11 proceden de la primera fase (9,6 % del total de cepas aisladas en esta fase) y 22 de la segunda (14,9 % del total de esta fase). Este grupo está integrado por especies del género *Pseudomonas*, que incluye *P. taiwanensis*, *P. plecoglossicida* y *P. mosselii*. El siguiente grupo mayoritario fue el XXVI con 23 cepas, 10 de la primera fase (8,8 % del total de esa fase) y 13 de la segunda (también 8,8 %), que corresponde al género *Bacillus*, concretamente la especies relacionadas filogenéticamente con *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. siamensis*.

Los restantes grupos RFLP con más de 10 cepas pertenecieron a las gamma proteobacterias, concretamente el grupo VII compuesto por especies de *Enterobacter* y *Leclercia*, el grupo XXXI compuesto por especies de los géneros *Pseudomonas* y *Luteimonas* y el XXXII compuesto por especies del género *Stenotrophomonas*.

Las alfa proteobacterias y beta proteobacterias fueron minoritarias, en lo que también ha influido el medio utilizado para el aislamiento de las endofíticas, pues el medio TSA es desfavorable para muchas alfa proteobacterias.

En el suelo habitan un gran número de bacterias que forman asociación con las raíces de las plantas (Arruda *et al.*, 2013). La interacción bacterias-raíces tiene lugar en la rizosfera entendida en sentido amplio, y que consta de tres espacios diferenciados topológicamente, que son la endorrizosfera formada por la endodermis y capas corticales de la raíz, el rizoplaneo o superficie de la raíz, y la ectorrizosfera o capas de suelo en contacto con la raíz (Pinton *et al.*, 2001). Los factores que determinan y regulan esta interacción no están aun suficientemente desentrañados y son muy complejos, pero hay evidencias que demuestran que los grupos taxonómicos de bacterias que crecen en la rizosfera están asociadas al tipo de cultivo y a la etapa de desarrollo del mismo (Andreote *et al.*, 2010). La planta tiene un efecto primordial en la determinación del tipo de bacterias que se asocian a su rizosfera debido al importante papel que juegan los exudados radiculares en el establecimiento de las poblaciones bacterianas (Prashar *et al.*, 2014). Otros factores también relacionados con la planta como el cultivar, la edad de la planta y otras características de las raíces también influyen en la biodiversidad bacteriana y en las especies predominantes (Smalla *et al.*, 2001; Macdonald *et al.*, 2004). Los parámetros físicos y químicos del suelo como el pH, la salinidad, la textura, el contenido de materia orgánica, la concentración de nutrientes, etc., las condiciones climáticas de la estación del año y prácticas culturales como el riego, el laboreo o la fertilización, afectan también a la composición de las poblaciones bacterianas (Fang *et al.*, 2005; Ibekwe *et al.*, 2010).

En consecuencia la composición de las poblaciones microbianas de la rizosfera está influenciada por factores intrínsecos a la propia planta, factores ambientales y por la interacción entre ambos, lo que complica la interpretación de la biodiversidad microbiana y su relación con los agrosistemas. Además es necesario considerar otro factor, que es el medio de cultivo utilizado para el aislamiento, puesto que tiene una influencia decisiva en el tipo de taxa bacterianos que se aíslan, lo que dificulta aún más realizar comparaciones entre los taxa obtenidos en diferentes trabajos si utilizan, como es lo habitual, diferentes medios para el aislamiento. Por ejemplo Ambrosini *et al.* (2012) aislaron bacterias asociadas al cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) utilizando un medio libre de nitrógeno, y en estas condiciones encontraron bacterias de 24 géneros, de los cuales 15 no fueron aislados en el presente estudio, como por

ejemplo los típicamente fijadores de nitrógeno *Azospirillum* o *Herbaspirillum*. Por el contrario 11 de los géneros aislados en nuestro estudio no fueron aislados en el trabajo de Ambrosini *et al.* (2012), destacando *Bacillus*, muy numeroso en el interior de las raíces de banano, que se aísla con mucha facilidad en el medio TSA. Sin embargo por las razones antes mencionadas no se pueden establecer comparaciones entre el microbioma asociado al banano y el asociado al girasol en base a los resultados de estos dos trabajos.

Utilizando el mismo medio de crecimiento de microorganismos para el aislamiento de éstos en diferentes cultivos, algunos autores han encontrado diferencias en la composición de las poblaciones microbianas, entre cultivos tan diferentes por el sistema de explotación como el arroz (De Souza *et al.*, 2013) y el girasol (Ambrosini *et al.*, 2012), aunque la localización geográfica fue también diferente así como el tipo de suelo, por lo que es imposible desagregar el efecto del cultivo y el de otros factores agroecológicos.

No obstante y sin perder de vista todos los factores que influyen en la determinación de las poblaciones microbianas, y el efecto del medio de cultivo utilizado para el aislamiento, existen determinados géneros de los cultivables que son claramente mayoritarios en la rizosfera de las plantas, entendiendo rizosfera en el sentido amplio incluyendo, endorrizosfera, rizoplasma y ectorrizosfera. Por ejemplo en el presente trabajo los géneros mayoritarios fueron *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*. Ambrosini *et al.* (2012) en girasol encontraron como géneros mayoritarios *Enterobacter*, *Burkholderia*, y *Klebsiella*. De Souza *et al.* (2013) en arroz encontraron como mayoritarias *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Burkholderia*. Ninguno de estos dos autores aislaron *Bacillus* debido a que la composición del medio utilizado no permitía su crecimiento. Mirzajani *et al.* (2013) también en el cultivo de arroz encontraron como mayoritarios los género *Serratia*, *Pantoea*, *Ochrobactrum*, *Brevundimonas* y *Enterobacter*. Farina *et al.* (2012) aisló los géneros *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* de raíces y suelo rizosférico en cultivo de colza. De estos cinco trabajos, el género *Enterobacter* se ha repartido en los cinco como mayoritario y *Pseudomonas* en tres, *Burkholderia* y *Agrobacterium* fueron mayoritarios en dos trabajos y minoritario en el nuestro.

Se puede afirmar que para el cultivo del banano, el presente trabajo es uno de los más extensos en aislamiento y caracterización de bacterias asociadas a las raíces. En total

hemos aislado bacterias pertenecientes a los 20 géneros mencionados con anterioridad. Souza *et al.* (2013) aislaron en raíces de banano bacterias pertenecientes a 9 géneros, de los cuales 4 fueron comunes con los nuestros (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus* y *Rhizobium*) y otros 5 diferentes: *Aneurinibacillus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Paenibacillus* y *Sporolactobacillus*. Martínez *et al.* (2003) obtuvieron 1453 aislados, pero posteriormente seleccionaron aquellos fijadores de nitrógeno, y como consecuencia restringieron la colección final a tan solo cuatro géneros: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Rhizobium* y *Klebsiella*, de los cuales los tres primeros fueron hallados también en nuestro trabajo, pero el cuarto no. Thomas & Soly (2009) aislaron bacterias asociadas al meristemo de plantas de banano pertenecientes a 12 géneros repartidos entre firmicutes, actinobacterias, alfa proteobacterias y gamma proteobacterias. Jimtha *et al.* (2014) aislaron los géneros *Ralstonia* y *Bacillus*, en cultivo de células embriogénicas en banano. Por lo diferente del ecosistema (microecosistema) en los que se realizó el aislamiento en este caso y en el nuestro los resultados no son comparables, si bien por su abundancia en la naturaleza en ambos casos se aislaron *Bacillus* y *Pseudomonas*. Otro género en común fue *Acinetobacter*. Andrade *et al.* (2014) aislaron de raíces de banano seis géneros correspondientes a *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Sporolactobacillus* y *Enterobacter*.

Biodiversidad bacteriana y su variación en las distintas localidades muestreadas

En el presente estudio los aislamientos se han realizado en parcelas agrícolas en cuatro zonas diferentes de República Dominicana, siempre sobre el mismo cultivo de banano y la misma variedad Cavendish en sistema ecológico. Por tanto la estructura muestral permite analizar la diversidad de las poblaciones bacterianas, en las diferentes localidades. Este análisis se ha abordado desde dos puntos de vista: En primer lugar se ha analizado la especificidad de los modelos de RFLP por zonas de muestreo (Tabla 17). En segundo lugar se ha determinado el índice de diversidad de Shannon-Weaver (Shannon & Weaver, 1949) en cada una de las localidades de muestreo.

En cuanto a la especificidad de los modelos se han definido tres niveles: Alta, Media o Baja. El nivel alto se atribuye a los modelos que están presentes solo en una zona de muestreo, medio a los que están presentes en dos, y bajo a los que están presentes en tres. Por último aquellos modelos que estuvieron presentes en las cuatro localidades se consideraron no específicos. Veintiuno de los 40 grupos RFLP presentaron una especificidad alta, pero solo incluyeron 29 cepas de 261 (Tabla 17).

En la provincia de Azua, de donde procedían el 31 % de las cepas, siete grupos RFLP fueron altamente específicos de dicha localidad (I, II, III, V, XII, XVI y XX). Estos grupos incluyeron 15 cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, y *Comamonas*, lo que supone el 52 % del total de cepas con especificidad alta. Esta provincia con mayor tradición en el cultivo del banano, lo que puede estar relacionado con esta mayor presencia de genotipos únicos.

Tabla 17: Especificidad de los diferentes géneros de la colección.

Grupo	Género	Azua	Dajabón	Mao	Montecristi	Especificidad
I	<i>Pseudomonas</i>	4				Alta
II	<i>Pseudomonas</i>	1				Alta
III	<i>Pseudomonas</i>	1				Alta
IV	<i>Pseudomonas</i>	18	5	5	5	no específico
V	<i>Acinetobacter</i>	4				Alta
VI	<i>Enterobacter; Pantoea</i>		1		2	Media
VII	<i>Enterobacter; Leclercia</i>	2	3	4	4	no específico
VIII	<i>Serratia</i>		1			Alta
IX	<i>Achromobacter</i>			1		Alta
X	<i>Acinetobacter</i>	2		3	1	Baja
XI	<i>Citrobacter</i>		1			Alta
XII	<i>Pseudomonas</i>	1				Alta
XIII	<i>Brevundimonas</i>	1		1	1	Baja
XIV	<i>Bacillus</i>			1		Alta
XV	<i>Enterobacter</i>	2			1	Media
XVI	<i>Comamonas</i>	1				Alta
XVII	<i>Bacillus</i>	23	13	17	27	no específico
XVIII	<i>Lysinibacillus</i>	1	1	2		Baja
XIX	<i>Lysinibacillus</i>				1	Alta
XX	<i>Pantoea</i>	3				Alta
XXI	<i>Bacillus</i>	1	2	1		Baja
XXII	<i>Citrobacter</i>				1	Alta
XXIII	<i>Bacillus</i>			1		Alta
XXIV	<i>Comamonas</i>			2	3	Media
XXV	<i>Burkholderia</i>		1			Alta
XXVI	<i>Bacillus</i>	8	2	5	8	no específico
XXVII	<i>Bacillus</i>				1	Alta
XXVIII	<i>Bacillus</i>				1	Alta
XXIX	<i>Bacillus</i>		1	4	2	Baja
XXX	<i>Burkholderia</i>		1			Alta
XXXI	<i>Luteimonas; Pseudomonas</i>	5	3	2	3	no específico
XXXII	<i>Stenotrophomonas</i>	5	4	4	2	no específico
XXXIII	<i>Cupriavidus</i>				1	Alta
XXXIV	<i>Pseudochrobactrum</i>	1		2		Media
XXXV	<i>Pseudochrobactrum</i>	2		1		Media
XXXVI	<i>Ochrobactrum</i>	1	1	2	1	no específico
XXXVII	<i>Ochrobactrum</i>		1			Alta
XXXVIII	<i>Rhizobium</i>	1		1	4	Baja
XXXIX	<i>Rhizobium</i>			1	2	Media
XL	<i>Pseudoxanthomonas</i>			1		Alta
Total de cepas		88	41	61	71	

Por otro lado la provincia de Dajabón, de donde procedían el 16 % de las cepas, cinco grupos RFLP fueron altamente específicos de esta localidad (VIII, XI, XXV, XXX, y XXXVII). Estos grupos en total incluyeron cinco cepas pertenecientes a los géneros, *Serratia*, *Citrobacter*, *Burkholderia* y *Ochrobactrum*, lo que supone el 17 % del total de cepas con especificidad alta. Los géneros *Serratia* y *Burkholderia* fueron exclusivos de esta provincia.

La provincia de Mao aportó el 23 % de las cepas, y presentó cuatro grupos RFLP altamente específicos (IX, XIV, XXIII y XL) que incluyen cuatro cepas de los géneros *Achromobacter*, *Bacillus* y *Pseudoxanthomonas*, lo que constituye el 14 % de las cepas con especificidad alta. *Achromobacter* y *Pseudoxanthomonas* fueron géneros exclusivos de esta provincia, y también los grupos RFLP XIV y XXIII del género *Bacillus* (*B. kochii* y *B. safensis* respectivamente) fueron exclusivos de ella, si bien el género es el más ampliamente distribuido.

La provincia de Montecristi aportó el 27 % del total de cepas de la colección, con cinco grupos RFLP altamente específicos (XIX, XXII, XXVII, XXVIII y XXXIII), que incluyen cinco cepas de los géneros *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cupriavidus*, por lo que el 17 % de las cepas con especificidad alta son de Montecristi. El género *Cupriavidus* fue exclusivo de esta provincia. Seis grupos RFLP (VI, XV, XXIV, XXXIV, XXXV y XXXIX) presentaron especificidad media, incluyendo 20 cepas de los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Comamonas*, *Pseudochrobactrum* y *Rhizobium*.

Seis grupos RFLP (X, XIII, XVIII, XXI, XXIX y XXXVIII) presentaron baja especificidad incluyendo a 30 cepas de los géneros *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Rhizobium*.

Los siete grupos RFLP restantes (IV, VII, XVII, XXVI, XXXI, XXXII y XXXVI) fueron no específicos e incluyeron a 182 cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Bacillus* (tanto el grupo de *B. cereus* como los más próximos a *B. subtilis*), *Luteimonas*, *Stenotrophomonas* y *Ochrobactrum*.

En cuanto al índice de diversidad de Shannon-Weaver (Índice H) para cada una de las localidades de muestreo (Tabla 18), éste se calculó a partir de la matriz de 0/1 del ARDRA. El índice H alcanzó valores relativamente bajos, que oscilaron entre 0,19 en la localidad de Clavellina en la provincia de Montecristi y 0,34 en la localidad de Amina 1

en la provincia de Mao. Se realizó un análisis de varianza para averiguar si existen diferencias significativas entre las cuatro provincias, en el valor medio del índice H para cada una de ellas, obteniendo un valor de F de 0,565 y un valor de $p=0,65$, por lo que se puede afirmar que no hay diferencias significativas en la diversidad de las poblaciones de bacterias entre las provincias.

El valor del índice H para el total de cepas aisladas fue 0,3253 y la media del índice H dentro de las localidades fue 0,2798, de donde se deduce que la mayor parte de la diversidad total, un 86 %, es intrapoblacional (Tabla 18) y tan solo un 14 % se encuentra entre las localidades.

Tabla 18: Índice de diversidad de Shannon (H) para cada una de las localidades donde se realizaron aislamientos de bacterias asociadas a las raíces de banano.

Provincias y localidades	H
Azua-IDIAF	0,2869
Azua-Isura	0,2480
Azua-Los Tramosjos	0,2518
Azua-Proyecto 2C	0,3297
Azua-Pueblo Viejo	0,3219
Dajabón-carrizal	0,2885
Dajabón-La Rosa	0,3184
Mao-Amina 1	0,3360
Mao-El Charco	0,2855
Mao-Tierra Fría 1	0,2369
Montecristi-Clavellina	0,1909
Montecristi-Gozuela	0,2425
Montecristi-La Pinta	0,3076
Montecristi-Pepillo Salcedo	0,2383
Montecristi-Santa María 1	0,3143
Media intrapoblacional (dentro de las localidades)	0,2798
Total	0,3253
Porcentaje intrapoblacional de la diversidad total	86 %

Con objeto de analizar la posible influencia de los parámetros físico-químicos del suelo en la diversidad bacteriana, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para 11 de las 15 localidades, en relación a todos los parámetros físico-químicos y el índice de diversidad H. Las cuatro localidades restantes fueron eliminadas del ACP por no estar completo el análisis del suelo. El ACP se realizó a partir de la matriz de varianzas-covarianzas previa transformación logarítmica decimal de los valores para su estandarización. Los ejes se rotaron por el método Varimax. Los dos primeros componentes principales recogieron conjuntamente el 71,3 % de la variabilidad total y con los tres primeros se alcanzó el 84,5 %. (Tabla 19).

Tabla 19: Eigenvalores, porcentajes y varianza acumulada en el Análisis de Componentes Principales (ACP) de 11 localidades donde se aislaron bacterias endofíticas y rizosféricas en relación a 18 parámetros físico-químicos de suelo y el índice de diversidad de Shannon basado en la matriz de 0/1 del ARDRA.

Componente principal	Eigenvalue	Por ciento	Por ciento acumulativo
1	0,382	50,727	50,727
2	0,155	20,603	71,330
3	0,099	13,131	84,461
4	0,067	8,955	93,416
5	0,018	2,383	95,799
6	0,013	1,790	97,589
7	0,010	1,370	98,959
8	0,004	0,588	99,546
9	0,003	0,372	99,918
10	0,001	0,082	100
11	0	0	
12	0	0	
13	0	0	
14	0	0	
15	0	0	
16	0	0	
17	0	0	
18	0	0	
19	0	0	

Los parámetros que más influyeron en el primer componente principal fueron la caliza, el contenido de Fe, Ca, y K. En el segundo componente principal fueron el contenido en Ca, Mg, Fe y la materia orgánica. En el tercer componente principal fueron el contenido en P Olsen, arcilla, K y Mg (Tabla 20).

Tabla 20. Valores de los eigenvectores para cada uno de los 18 parámetros físico-químicos de suelo y el índice de diversidad de Shannon basado en la matriz de 0/1 del ARDRA, sobre los cuatro primeros C.P. ACP de 11 localidades donde se aislaron las bacterias endofíticas y rizosféricas.

Parámetros de ACP	C. P. 1	C. P. 2	C. P. 3	C. P. 4
H	-0,0001	-0,0034	-0,0068	0,0041
Limo %	0,0908	0,0384	0,0186	0,1527
Arcilla %	0,0215	0,0065	0,1263	0,0332
pH	0,0323	0,0410	-0,0048	-0,0143
Caliza %	0,4528	0,0472	0,0032	-0,0028
MO %	-0,0490	-0,1239	0,0825	0,0571
N _{total} %	-0,0049	-0,0077	0,0109	0,0062
Relación C/N	-0,0248	-0,0989	0,0254	0,0255
P Olsen mg/kg	0,0187	0,0519	0,1794	-0,0279
Ca cmol(+)/kg	0,1225	0,3250	-0,0171	-0,0012
K cmol(+)/kg	0,1038	0,0478	0,1246	-0,0286
Mg cmol(+)/kg	-0,0086	0,2375	0,0862	0,0240
Na cmol(+)/kg	0,0671	0,0236	0,0416	-0,0025
ClC cmol(+)/kg	0,0052	0,0445	0,0057	0,0202
Cu mg/kg	0,0884	0,0225	0,0376	0,1157
Fe mg/kg	-0,1354	-0,2020	-0,0419	0,1837
Zn mg/kg	-0,0605	0,0215	0,0809	0,0880
B mg/kg	0,0446	0,0236	0,0344	-0,0086
CE dS/m	0,0052	0,0445	0,0057	0,0202

El primer componente principal (Figura 33) permite diferenciar entre las muestras de la provincia de Azua por una parte y las de Montecristi y Dajabón por otra. Las diferencias se deben al contenido de caliza, siendo los suelos de Azua calizos y los de Montecristi y Dajabón con bajo contenido de caliza. El segundo componente principal (Figura 33) permite diferenciar entre la localidad de Carrizal en Dajabón por una parte y las de Mao, Montecristi y Azua por otra. El suelo de Carrizal tiene muy bajo contenido de calcio y alto de hierro y materia orgánica. La otra población de la provincia de Dajabón queda en una posición intermedia entre Carrizal y el resto de las poblaciones.

Figura 33: *Biplot* obtenido tras el ACP de 11 localidades donde se aislaron bacterias endofíticas y rizosféricas en relación a 18 parámetros físico-químicos de suelo y el índice de diversidad de Shannon basado en la matriz de 0/1 del ARDRA. Se han representado sobre los dos primeros CP los valores de los eigenvectores de los 18 parámetros físico-químicos de suelo el índice H y las localidades.

El índice de diversidad H presentó poca variabilidad entre poblaciones microbianas, por eso quedó muy cerca del origen de coordenadas, lo que quiere decir que prácticamente no hay diferencias entre las localidades (Figura 33). Esto es coherente con el escaso porcentaje de la variabilidad del índice H que se encuentra entre las poblaciones, que es tan solo un 14 % del total (Tabla 18), encontrándose el resto

dentro de las poblaciones microbianas. También es coherente con que no existieran diferencias significativas en el valor del índice H entre las cuatro provincias. Por último también es coherente con el hecho de que solamente el 11 % de las cepas pertenecieran a grupos RFLP que fueron exclusivos de una sola provincia, es decir altamente específicas.

Puede concluirse por tanto que las diferencias entre las condiciones agroecológicas a las que están sometidas las poblaciones microbianas analizadas, tuvieron poca influencia en la diversidad bacteriana. A pesar de las diferencias físico-químicas de los suelos, la condición insular de República Dominicana, y el sistema de explotación ecológica del banano, que por estar regulado es similar en los diferentes lugares, determina características agroecológicas generales parecidas. Debe señalarse que los transectos en los que se ha encontrado variación en la diversidad entre poblaciones microbianas, como el de Marasco *et al.* (2013) en el cultivo del viñedo, se han realizado a mayor escala, concretamente en este caso abarcó miles de kilómetros dentro de la cuenca Mediterránea, entre el norte de Italia y el Norte de África, y el nuestro abarcó solo algo más de 150 km, que es la distancia norte-sur de la Isla Española. En dichas condiciones Marasco y colaboradores encontraron variación en las poblaciones bacterianas asociadas al cultivo del viñedo, como ya se ha indicado, atribuyendo dichas diferencias a gradientes ligados al cultivar, la latitud y la aridez, como causas secundarias y como causas primarias la humedad del suelo y la temperatura, pero no consideraron prioritarias las características físico-químicas del suelo. Nogueira *et al.* (2006) también consideró importante la humedad del suelo para la determinación de las poblaciones microbianas. La influencia de este factor puede ser muy importante en cultivos de secano en clima Mediterráneo, donde es limitante en agricultura, pero no en suelos de regadío como en nuestro caso.

Debido a la escasa variabilidad del índice H entre poblaciones, no es posible vincular dicho índice H a ninguno de los parámetros físico-químicos del suelo. Varios trabajos han encontrado mayores diferencias del índice H entre lugares de muestreo que el nuestro y han tratado de vincularlo a los parámetros físico-químicos del suelo. Para ello han utilizado la misma metodología que en el presente trabajo, pero los resultados son muy variables. En algunos estudios se observó que tampoco hay vinculación entre el índice H y ningún parámetro de suelo, como en los de Ambrosini *et al.* (2012) y De Souza *et al.* (2013), lo que les llevó a deducir que lo más probable es que otros parámetros de suelo no analizados en un análisis estándar, estuvieran interviniendo en

la determinación del valor de H, lo que es bastante probable debido a la complejidad del ecosistema suelo, al elevado número de parámetros que influyen en él y las innumerables interacciones entre los mismos.

Otros estudios observaron que el pH y la arcilla (Beneduzi *et al.*, 2013), o el contenido en arcilla y materia orgánica (Arruda *et al.*, 2013) son los que mejor correlacionan positivamente con el índice H. La arcilla sí parece tener una influencia en las poblaciones bacterianas, pero de manera indirecta, por su relación con la retención de humedad en el suelo. Existe amplio consenso en la comunidad científica sobre la decisiva influencia del pH en la composición y riqueza de microorganismos en el suelo (Fierer & Jackson 2006), pero en nuestro estudio la variación de pH entre localidades no es elevada como se desprende de la situación del pH cerca del origen de coordenadas en el ACP (Figura 33), con solo un valor ácido, próximo a 5 y el resto moderadamente básicos.

La homogeneidad de las poblaciones bacterianas entre diferentes localidades productoras de banano ecológico en República Dominicana, es un resultado de gran trascendencia tecnológica, puesto que permitirá desarrollar un único producto microbiano con alta probabilidad de que se adapte a los diferentes agrosistemas productores de banano en Dominicana. En el futuro habría que extender este tipo de estudios a otros lugares de América Latina y El Caribe (ALC) con objeto de que los biofertilizantes o biofortificantes desarrollados puedan ser comercializados en este ámbito geográfico.

4.5. Análisis *in vitro* de varias propiedades de promoción del crecimiento vegetal de la colección de 262 cepas

Las bacterias endofíticas y rizosféricas con capacidad para promover el crecimiento vegetal, actúan de diferentes maneras. En algunos casos el propio metabolismo de la bacteria es el que promueve el crecimiento de las plantas: solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, destrucción del precursor del etileno que es la hormona de estrés, o fijación de nitrógeno. En otras ocasiones las bacterias actúan sobre el metabolismo de la propia planta, por ejemplo mejorando el desarrollo de las raíces, lo que incrementa la absorción de agua y nutrientes minerales; también pueden incrementar determinadas actividades enzimáticas de las plantas. Por otra parte interactúan sobre otros microorganismos beneficiosos de las plantas mejorando su

acción, por lo que se denominan “*helper*”. Por último la mejora en el desarrollo de las plantas también proviene de la supresión de patógenos, bien por antagonismo, competencia por el hierro, inducción de resistencia sistémica, o interacción con el sistema de *Quorum Sensing* que es el sistema de comunicación entre las células mediante pequeñas moléculas denominadas autoinductores (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

Para desarrollar insumos agrícolas basados en microorganismos, la estrategia habitual es realizar una preselección de microorganismos cultivables por ciertas propiedades PGP fácilmente detectables *in vitro* (Mulas *et al.*, 2013; Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Sin embargo esta estrategia es controvertida, ya que se ha demostrado que no siempre es efectiva, porque se ha observado falta de correlación entre las actividades PGP *in vitro* y la mejora del crecimiento y rendimiento del cultivo (Smyth *et al.*, 2011; Barret *et al.*, 2011). No obstante en otras ocasiones se ha demostrado explícitamente que los ensayos *in vitro* son de utilidad para la selección de cepas para el desarrollo de inoculantes, siempre que vayan acompañados de los correspondientes estudios en condiciones de campo (Naveed *et al.*, 2013). Que no exista una correlación total entre la actividad PGP *in vitro* y los efectos en campo, cabe dentro de la lógica, pues por una parte el análisis *in vitro* no tiene en cuenta que la cepa debe establecerse en un ambiente altamente competitivo, y por otra tampoco considera su capacidad de colonizar la planta (Naveed *et al.*, 2013). Por otra parte algunos de los mecanismos PGP que se observan en laboratorio no siempre se expresan en campo, ya que solo lo hacen en condiciones específicas (Bashan & de-Bashan, 2010).

Un problema importante a la hora de seleccionar microorganismos es la enorme biodiversidad de la flora edáfica, ya que en un solo gramo de suelo puede haber hasta 10¹⁰ células bacterianas y una diversidad de especies entre 4·10³ y 5·10⁴ (Roesch *et al.*, 2013; Raynaud & Nunan, 2014), de las cuales hasta el 99 % de las cuales son no cultivables (Prashar *et al.*, 2014), lo que complica enormemente la tarea de aislar las bacterias más efectivas, para proporcionárselas a las plantas en concentraciones suficiente para que puedan ejercer su acción promotora del crecimiento. Aunque las plantas tienen la capacidad de seleccionar ciertos taxa microbianos entre toda biodiversidad existente en el suelo (Prashar *et al.*, 2014), a la diversidad de especies hay que añadir la diversidad de cepas dentro de cada especie, las cuales pueden presentar grandes diferencias en cuanto a su comportamiento fisiológico, por lo que la tarea de encontrar las cepas más efectivas sigue teniendo muchas incertidumbres. A

estas incertidumbres hay que añadir que los modos de acción de las PGPRs no están completamente desentrañados, y por tanto no es posible diseñar un método eficiente y efectivo de selección de cepas basado solo en ensayos de laboratorio (Smyth *et al.*, 2011). A pesar de todas las circunstancias expuestas, es necesario utilizar alguna técnica para restringir el número de aislados, siempre muy numeroso, que pasa a los ensayos en planta, ya que de otra manera éstos serían inmanejables por su dimensión, y la opción más utilizada a pesar de sus limitaciones, es la intensidad en la expresión de ciertas actividades PGP de manera *in vitro*. En esta investigación se han analizado *in vitro* las cinco actividades que se describen a continuación (Tabla 21) que son las más habitualmente estudiadas (Ambrosini *et al.*, 2013; Farina *et al.*, 2012; Beneduzi *et al.*, 2013; Arruda *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013), más el antagonismo *in vitro* sobre el crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad de la sigatoka negra. Los resultados de estas propiedades PGP *in vitro* se han utilizado como criterio para preseleccionar las cepas que pasaron a los ensayos en planta. Los valores obtenidos para cada uno de los análisis *in vitro* y cada una de las cepas figuran en la Tabla 36 Anejo 1B.

En la Tabla 21 se presenta el análisis de contingencia entre las actividades PGP analizadas y la procedencia de las bacterias, entendiendo como tal endofíticas frente a rizosféricas, con el objeto de analizar si existe una tendencia estadísticamente significativa hacia una mayor expresión de algunas propiedades PGP en las especies rizosféricas o en las endofíticas. En el caso de la producción de IAA, de α -cetobutirato (indicador de la actividad ACC desaminasa) y en el crecimiento en ausencia de nitrógeno (como tanto por ciento de crecimiento en ausencia total de nitrógeno en el medio con respecto al crecimiento con N mineral), se indica el número de cepas que pertenecen a cada cuartil, y por tanto el primer y segundo cuartil corresponden a producciones o crecimientos menores a la mediana, y el tercero y el cuarto superiores a la misma. A la hora de interpretar esta tabla hay que tener en cuenta que para el aislamiento de bacterias rizosféricas se utilizó un medio selectivo de *Pseudomonas* y que además se seleccionaron aquéllas productoras de α -cetobutirato y solubilizadoras de fosfato, por lo que debe haber un sesgo hacia una mayor expresión de estas propiedades PGP en las bacterias rizosféricas.

Tabla 21: Análisis de contingencia con la relación entre diferentes parámetros indicadores de la actividad PGP *in vitro* y la procedencia de las cepas (endofíticas frente a rizosféricas). (Nivel de significación de la relación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Actividad PGP	Recuento y residuos tipificados corregidos		χ^2 (p)
	Bacterias endofíticas	Bacterias rizosféricas	
Producción de IAA			
Primer cuartil	57 (3,4)	8 (-3,4)	31,398***
Segundo cuartil	54 (2,2)	12 (-2,2)	
Tercer cuartil	44 (-0,7)	21 (0,7)	
Cuarto cuartil	31 (-5,0)	35 (5,0)	
Producción de α -cetobutirato			
Primer cuartil	51 (4,2)	2 (-4,2)	21,537***
Segundo cuartil	38 (0,1)	13 (-0,1)	
Tercer cuartil	31 (-3,0)	22 (3,0)	
Cuarto cuartil	35 (-1,3)	17 (1,3)	
Crecimiento en ausencia de N			
Primer cuartil	37 (-2,9)	28 (2,9)	8,791*
Segundo cuartil	52 (1,6)	14 (-1,6)	
Tercer cuartil	49 (0,7)	17 (-0,7)	
Cuarto cuartil	48 (0,6)	17 (-0,6)	
Solubilización de P mineral insoluble			
Si	21 (-3,7)	23 (3,7)	13,899***
No	165 (3,7)	53 (-3,7)	
Producción de sideróforos			
No	79(-1,7)	41 (1,9)	11,280**
1: halo ≤ 4 mm	65 (-0,9)	31 (0,9)	
2: halo entre 5 y 10 mm	33 (2,9)	3 (-2,9)	
3: halo ≥ 10 mm	9 (1,4)	1 (-1,4)	
Control con sigatoka 14 días			
Control fuerte	7 (-2,8)	10 (2,8)	8,367*
Control débil	107 (1,5)	36 (-1,4)	
No controla	72 (-1)	30 (1)	

La Tabla 22 presenta el análisis de contingencia entre las actividades PGP analizadas y los grupos RFLP formados del análisis del gen 16S rRNA. En este caso solamente se han considerado los grupos de RFLP que contienen cuatro o más cepas, ya que para los grupos con menor número de cepas el análisis estadístico no resultaría representativo. Dado que todas las cepas pertenecientes a un mismo grupo RFLP se encuentran próximas filogenéticamente, el análisis de contingencia permite averiguar si existe una tendencia significativa a que determinados taxa presenten una mayor expresión de determinadas propiedades PGP.

Tabla 22: Análisis de contingencia con la relación entre diferentes parámetros indicadores de la actividad PGP *in vitro* y el grupo RFLP del gen 16S rRNA al que pertenecen (según Tabla 13). Solos los grupos RFLP con cuatro o más cepas fueron incluidos en el análisis (Nivel de significación de la relación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Actividad PGPR	Recuento y residuos tipificados corregidos por grupos RFLP															χ 2 (p)
	Gamma proteobacterias							Gram-positivas					Beta	Alfa		
Producción de IAA	I	IV	V	VII	X	XXXI	XXXII	XVII	XVIII	XXI	XXVI	XXIX	XXIV	XXXVI	XXXVIII	
Primer cuartil	0 (-1,2)	3 (-2,3)	1 (0)	0 (-2,1)	1 (-0,2)	4 (0,5)	1 (-1,7)	27 (2,5)	0 (-1,2)	2 (1,2)	11 (2,9)	2 (0,2)	0 (-1,3)	0 (-1,3)	2 (0,5)	82,345 ***
Segundo cuartil	1 (0)	7 (-0,6)	1 (0)	2 (-0,8)	1 (-0,3)	1 (-1,5)	6 (1,4)	22 (0,7)	0 (-1,2)	2 (1,2)	7 (0,8)	2 (0,2)	2 (0,8)	1 (-0,3)	0 (-1,4)	
Tercer cuartil	2 (1,2)	10 (0,7)	1 (0)	4 (0,5)	2 (0,8)	2 (-8)	1 (-1,7)	25 (1,7)	2 (1,2)	0 (-1,2)	4 (-0,8)	1 (-0,7)	0 (-1,3)	1 (-0,3)	0 (-1,4)	
Cuarto cuartil	1 (0)	13 (2,1)	1 (0)	7 (2,5)	1 (-0,3)	6 (1,8)	7 (2,0)	5 (-4,8)	2 (1,2)	0 (-1,2)	0 (-2,9)	2 (0,2)	3 (1,8)	3 (1,8)	4 (2,4)	
Producción de α - cetobutirato																
Primer cuartil	0 (-1,0)	4 (-1,7)	0 (-1,2)	0 (-2,1)	0 (-1,3)	1 (-1,5)	1 (-1,7)	28 (3,0)	2 (1,1)	2 (1,1)	10 (2,5)	1 (-0,7)	0 (-1,3)	2 (0,8)	2 (0,8)	68,560 **
Segundo cuartil	2 (1,7)	14 (2,9)	3 (2,4)	4 (0,7)	2 (0,8)	5 (1,2)	1 (-1,7)	13 (-1,8)	0 (-1,1)	0 (-1,1)	2 (-1,7)	3 (1,2)	2 (0,8)	0 (-1,3)	0 (-1,3)	
Tercer cuartil	0 (-1,0)	6 (-0,8)	1 (0)	6 (2,0)	3 (1,8)	4 (0,5)	5 (0,7)	17 (-0,7)	0 (-1,2)	1 (0)	4 (-0,7)	1 (-0,7)	2 (0,8)	2 (0,8)	1 (-0,3)	
Cuarto cuartil	1 (0,3)	7 (-0,3)	0 (-1,2)	2 (-0,7)	0 (-1,3)	3 (-0,2)	8 (2,6)	17 (-0,6)	2 (1,2)	1 (0)	5 (-0,1)	2 (0,2)	1 (-0,3)	1 (-0,3)	2 (0,8)	
Crecimiento en ausencia de N																
Primer cuartil	2 (1,5)	5 (-0,7)	2 (1,5)	5 (1,8)	3 (2,3)	3 (0,3)	2 (-0,6)	11 (-1,6)	0 (-1,0)	0 (-1,0)	4 (-0,2)	1 (-0,4)	2 (1,2)	3 (2,3)	0 (-1,2)	149,560 ***
Segundo cuartil	1 (0,2)	12 (2,5)	0 (-1,0)	5 (1,7)	0 (-1,1)	1 (-1,2)	1 (-1,3)	5 (-3,8)	2 (1,5)	0 (-1,0)	10 (3,1)	1 (-0,4)	2 (1,1)	0 (-1,1)	4 (2,9)	
Tercer cuartil	1 (0,2)	11 (2,1)	1 (0,2)	2 (-0,4)	0 (-1,1)	2 (-0,4)	1 (-1,3)	6 (-3,5)	1 (0,2)	3 (2,8)	7 (1,4)	5 (3,4)	1 (0)	2 (1,1)	1 (-0,2)	
Cuarto cuartil	0 (-1,0)	5 (-0,8)	1 (0,2)	1 (-1,2)	2 (1,1)	1 (-1,2)	4 (0,7)	27 (3,9)	1 (0,2)	1 (0,2)	0 (-2,5)	0 (-1,3)	0 (-1,1)	0 (-1,1)	1 (-0,2)	
Solubilización de P mineral insoluble																
Si	1 (0,6)	20 (7,9)	4 (4,8)	0 (-1,6)	5 (5,4)	0 (-1,6)	0 (-1,7)	2 (-3,9)	0 (-0,9)	0 (-0,9)	0 (-2,1)	0 (-1,1)	1 (0,3)	0 (-1,0)	0 (-1,0)	130,094 ***
No	3 (-0,6)	13 (-7,9)	0 (-4,8)	13 (1,6)	0 (-5,4)	13 (1,6)	15 (1,7)	77 (3,9)	4 (0,9)	4 (0,9)	22 (2,1)	7 (1,1)	4 (-0,3)	5 (1,0)	6 (1,0)	
Producción de sideróforos																
No	3 (1,2)	5 (-3,9)	4 (2,2)	0 (-3,4)	5 (2,4)	10 (2,3)	12 (2,7)	44 (2,1)	3 (1,2)	1 (-0,9)	5 (-2,3)	4 (0,6)	3 (0,6)	2 (-0,3)	0 (-2,3)	132,514 ***
1: halo ≤ 4 mm	0 (-1,5)	13 (0,6)	0 (-1,5)	10 (3,3)	0 (-1,7)	3 (-0,9)	3 (-1,3)	30 (0,7)	1 (-0,4)	3 (1,7)	8 (0,1)	2 (-0,4)	1 (-0,7)	3 (1,2)	0 (-1,8)	
2: halo entre 5 y 10 mm	1 (0,6)	14 (4,8)	0 (-0,9)	3 (0,8)	0 (-1,0)	0 (-1,6)	0 (-1,7)	3 (-3,5)	0 (-0,9)	0 (-0,9)	5 (1,1)	0 (-1,1)	1 (0,3)	0 (-1,0)	6 (5,9)	
3: halo ≥ 10 mm	0 (-0,4)	1 (-0,2)	0 (-0,4)	0 (-0,7)	0 (-0,4)	0 (-0,7)	0 (-0,8)	2 (-0,7)	0 (-0,4)	0 (-0,4)	4 (3,8)	1 (1,5)	0 (-0,4)	0 (-0,4)	0 (-0,5)	
Control con sigatoka 14 días																
Control fuerte	1 (1,5)	6 (2,8)	0 (-0,5)	2 (1,3)	0 (-6)	0 (-1,0)	2 (1,0)	3 (-1,3)	0 (-0,5)	0 (-0,5)	0 (-1,3)	0 (-0,7)	1 (1,2)	0 (-0,6)	0 (-0,7)	101,702 ***
Control débil	3 (0,8)	24 (2,3)	0 (-2,2)	10 (1,7)	0 (-2,5)	11 (2,3)	8 (-0,1)	24 (-5,3)	0 (-2,2)	3 (0,8)	22 (4,5)	6 (1,7)	3 (0,3)	2 (-0,7)	3 (-0,2)	
No controla	0 (-1,6)	3 (-3,8)	4 (2,5)	1 (-2,4)	5 (2,8)	2 (-1,8)	5 (-0,5)	52 (6,2)	4 (2,5)	1 (-0,6)	0 (-3,9)	1 (-1,4)	1 (-9)	3 (1,0)	3 (0,6)	

4.5.1. Producción de ácido indolacético (IAA)

La producción de IAA *in vitro* se analizó en presencia de L-triptófano ya que la producción de IAA depende de la presencia en el medio de este compuesto (Barazani & Friedman, 2000), puesto que los microorganismos utilizan parte de la molécula de L-triptófano para producir el IAA (Ahmad *et al.*, 2008; Lawongsa *et al.*, 2008).

Los resultados de la producción de IAA están presentados en $\mu\text{g/mL}$ tal como hicieron otros autores (Ghosh & Basu, 2006; Ghosh *et al.*, 2013, Dawwam *et al.*, 2013; Gururani *et al.*, 2013; Nabti *et al.*, 2014; Gumiere *et al.*, 2014). Las producciones de IAA en este trabajo oscilaron entre 0,66 y 17,94 $\mu\text{g/mL}$. Las cepas incluidas en el primer cuartil produjeron entre 0,66 y 1,65 $\mu\text{g/mL}$; las del segundo llegaron hasta 2,23 $\mu\text{g/mL}$, las del tercero hasta 3,24 $\mu\text{g/mL}$, y las del cuarto produjeron entre este valor y 17,94 $\mu\text{g/mL}$. Los rangos de variación de producción de IAA obtenidos por otros autores son también muy amplios. Por ejemplo Naveed *et al.* (2013) obtuvieron producciones de IAA en presencia de L-triptófano que oscilaron entre 7,26 y 95,34 $\mu\text{g/mL}$, en cepas aisladas de raíces en el cultivo de Maíz. En plantas de *Elymus tsukushiensis*, Son *et al.* (2014) aislaron bacterias con producciones entre 10 y 192 $\mu\text{g/mL}$. Arruda *et al.* (2013), aisló bacterias del cultivo de maíz, y citó valores de IAA entre 17,37 y 130,27 $\mu\text{g/mL}$. Ji *et al.* (2014) aislaron del cultivo de arroz bacterias que producían IAA en concentraciones entre 3,1 y 24,6 $\mu\text{g/mL}$. En general los valores obtenidos en este trabajo son menores que en algunos casos de los citados en la bibliografía, y semejantes a los de Ji *et al.* (2014), aunque es difícil realizar comparaciones entre diferentes trabajos, por la influencia que en los resultados finales pueden tener pequeñas modificaciones en el procedimiento analítico.

Existe una tendencia altamente significativa ($p < 0,001$ en Tabla 21) a que las bacterias endofíticas sean menos productoras de IAA y las rizosféricas más productoras, ya que existe un mayor número de cepas endofíticas en los cuartiles 1 y 2 (los de valores más bajos de IAA) y un mayor número de cepas rizosféricas en los cuartiles 3 y 4 (los de valores más elevados de IAA), que los que corresponderían a una distribución completamente aleatoria.

La cepa más productora de IAA fue RD_AZPRC_07 perteneciente a *Pseudomonas otitidis*. Esta especie se encuentra ligada a la enfermedad de la otitis en los humanos (Motoshima *et al.*, 2007; Lee, 2012). Sin embargo Lu *et al.* (2014) han realizado un

estudio donde describen *P. otitidis*, junto a otras especies, como posibles productoras de agentes volátiles contra nematodos y apunta a la posibilidad de desarrollar productos basados en estos microorganismos para realizar controles biológicos de los nematodos fitopatógenos, pero no hace ninguna referencia a los niveles de producción de IAA.

Otras cepas con una producción de IAA superior a 10 µg/mL fueron RD_AZPRC_25 y RD_AZIDI_13, pertenecientes respectivamente a las especies *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* y *P. saccharolyticum* que produjeron entre 10,23 y 12,69 µg/mL. La primera de las dos especies muestra buen crecimiento en medios libres de azúcares, ya que no es capaz de metabolizarlos, mientras que la segunda crece en varios medios con la diferencia que es buena metabolizadora de azúcares (Kämpfer *et al.*, 2006). *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* fue estudiada como un biorremediador de entornos contaminados con cromo (Long *et al.*, 2013). No se han encontrado referencias previas sobre la actividad de estas especies como PGPR. La cepa RD_MOSAA_01 perteneciente a *Enterobacter cancerogenus* también tiene una producción de IAA ligeramente superior a 10 µg/mL. Jha *et al.* (2012) habían descrito previamente que esta especie es buena productora de IAA además de presentar elevada actividad ACC desaminasa, ser solubilizadora de fosfato y productora de sideróforos. En el grupo de cepas más productoras de IAA está la cepa RD_MOSAA_14 (10,23 µg/mL) del grupo RFLP XI BIS no identificada a nivel de género ni especie, ya que fue aislada en la segunda fase y presentó un grupo de RFLP diferente a los hallados en las cepas de la primera fase.

En cuanto a la relación entre la producción de IAA y los grupos taxonómicos basados en los grupos RFLP del gen 16S rRNA (Tabla 22), dentro de las gamma proteobacterias, existe una tendencia significativa a que el grupo IV (que incluye a las *Pseudomonas* más próximas a *P. taiwanensis*, *P. mosselii* y *P. nitroreducens*) y el VII, que incluye a *Enterobacter* y *Leclercia*, tengan cepas con elevada producción de IAA, por tener una proporción significativamente más elevada en los cuartiles tercero y cuarto. Lo mismo sucede para las cepas Gram positivas próximas a la especie *Lysinibacillus xylanilyticus* (grupo XVIII), *L. xylanilyticus* fue descrita por Esmaeili *et al.* (2013) como degradadora de polietileno de baja densidad, además Wang *et al.* (2013a) dicen que *L. xylanilyticus* es una especie controladora de la aflatoxina. En la misma situación se encuentran las alfa proteobacterias de grupo XXXVI, pertenecientes a la especie *Ochrobactrum pseudogrignonense* especie asociada a la producción de electricidad a partir de

estiércol de ganado (Zhao *et al.*, 2012). Por el contrario las cepas del género *Bacillus* tienden a ser en general peores productores de IAA ya que existe una proporción significativamente más elevada de cepas situadas en los dos primeros cuartiles, que lo que correspondería a una distribución al azar.

Los resultados que hemos obtenido al analizar la producción de IAA concuerdan con los de otros autores como Hayat *et al.* (2013), que también indican que los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter*, son bacterias que producen elevada cantidad de IAA en presencia de L-triptófano, y por otro lado estos autores observaron en su investigación que bacterias del género *Bacillus* no son buenas productoras de IAA en presencia de L-triptófano, resultados similares a los reflejados en este trabajo. Los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, fueron también presentados por Nadeem *et al.* (2014), como buenos productores de esta hormona. Naveed *et al.* (2013) aislaron los géneros *Caulobacter*, *Pantoea*, *Sphingobium*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*; Son *et al.* (2014) consiguieron aislar los géneros *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, etc; Arruda *et al.* (2013), presento los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Herbaspirillum*, etc; Ji *et al.* (2014) aislaron los géneros *Microbacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Paenibacillus*, todos ellos fueron citados por los indicados autores como buenos productores de IAA.

4.5.2. Actividad ACC desaminasa

La actividad ACC desaminasa se analizó mediante la cuantificación de la producción de α -cetobutirato en micromoles sobre miligramos de proteína y por hora ($\mu\text{M } \alpha\text{-cb/mg}\cdot\text{h}$) (Belimov *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2014; Sarma & Saikia, 2014). El α -cetobutirato resulta de la degradación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que es precursor inmediato para la síntesis del etileno por parte de las plantas ante situaciones de estrés (Nadeem *et al.*, 2012; Nadeem *et al.*, 2014). Algunas PGPRs actúan desaminando el ACC, lo que impide la síntesis del etileno por las plantas. Por consiguiente se puede establecer una correlación entre la producción de α -cetobutirato por mg de proteína y por hora, y la actividad ACC desaminasa de las bacterias (Penrose & Glick, 2003; Glick, 2005; Glick *et al.*, 2007). La producción de α -cetobutirato en la colección de cepas osciló entre 0,01 y 165,69 $\mu\text{M } \alpha\text{-cb/mg}\cdot\text{h}$. Las cepas incluidas en el primer cuartil produjeron entre 0,01 y 1,01 $\mu\text{M } \alpha\text{-cb/mg}\cdot\text{h}$; las del segundo llegaron hasta 2,94 $\mu\text{M } \alpha\text{-cb/mg}\cdot\text{h}$, las del tercero hasta 10,74 $\mu\text{M } \alpha\text{-cb/mg}\cdot\text{h}$ y las del cuarto produjeron entre este valor y el máximo indicado. Nadeem *et al.*

(2012) aislaron bacterias con actividad ACC desaminasa, con concentraciones de α -cetobutirato entre 4,91 y 185,51 μM α -cb/mg·h. Qin *et al.* (2014), obtuvieron concentraciones desde 6,62 μM α -cb/mg·h hasta 177,22 μM α -cb/mg·h, las más bajas algo superiores a las nuestras, y las más elevadas con valores muy similares.

Existe una tendencia altamente significativa ($p < 0,001$ en Tabla 21) a que las bacterias rizosféricas tengan mayor actividad ACC desaminasa, por tener una mayor proporción de cepas en los cuartiles 3 y 4, que las endofíticas. Este resultado es lógico y responde al hecho de que uno de los criterios para la selección de bacterias rizosféricas fue la capacidad para metabolizar el ACC.

En el estudio se encontraron siete cepas que superan los 100 μM α -cb/mg·h. La cepa más productora fue RD_MOLAP_06 que corresponde a *Rhizobium radiobacter* con una producción próxima a 170 μM α -cb/mg·h, que es un patógeno vegetal que causa la enfermedad de agalla en la corona de muchas plantas dicotiledóneas (Sharma *et al.*, 2008; Jha *et al.*, 2012). La siguiente cepa en producción fue RD_DAROS_05 perteneciente a la especie *Enterobacter asburiae*, especie que es descrita por varios autores como solubilizadora de fosfato (Sharma *et al.*, 2005, 2011; Kumar *et al.*, 2013) pero su actividad ACC desaminasa no ha sido descrita hasta el momento. A continuación RD_AZPVI_10 produjo 133,70 μM α -cb/mg·h, tratándose de *Bacillus* sp., filogenéticamente próxima a *B. sonorensis*, usada para producir plásticos biodegradables (polihidroxialcanoatos) (Shrivastava *et al.*, 2010). RD_MAAMIA_18 es *Bacillus* sp., próxima a *B. aerophilus*, del grupo de *B. pumilus*. (Liu *et al.*, 2013a). *B. aerophilus*, fue reportada por Gowdhaman *et al.* (2014) y la misma fue usada para producir la enzima xilanasa. Ninguna de estas especies del género *Bacillus* han sido previamente descritas por su acción PGP. RD_DARAB_04 es también *Bacillus* sp., próxima a *B. thuringiensis*, perteneciente al grupo de *B. cereus*. A pesar de que las bacterias del “grupo *Bacillus cereus*” son patógenos oportunistas en humanos, poseen propiedades PGP. *B. cereus* (Kadyan *et al.*, 2013) y *Bacillus thuringiensis* (Raddadi *et al.*, 2008), presentan actividad ACC desaminasa, y *B. thuringiensis* ha estimulado la elongación de raíces de colza en condiciones gnotobióticas (Raddadi *et al.*, 2007). *B. thuringiensis*, también fue estudiado como controlador de insectos, sin embargo *B. anthracis*, y *B. cereus* no poseen dicha propiedad (Lee *et al.*, 2014). RD_AZLTR_05 pertenece a la especie *Pseudomonas taiwanensis*, investigaciones realizadas han demostrado que esta especie podría usarse como fuente para la elaboración de bioplaguicidas (Liu *et al.*, 2010), en base a unos de sus genes que codifica para la

síntesis de una toxina insecticida, pero no se cita su actividad ACC desaminasa. Por último RD_DARAB_17 pertenece a *Serratia nematodiphila*, aislada por Chen *et al.* (2010) y considerada PGPR. Los autores la describen junto con otras bacterias de su investigación como bacterias con actividad ACC desaminasa, con capacidad de sintetizar la hormona IAA, de producir sideróforos y de solubilizar fosfato, y fue usada como promotora del crecimiento en plantas sobre suelos contaminados con metales pesados.

En cuanto a la relación entre la actividad ACC desaminasa y los grupos taxonómicos basados en los grupos RFLP del gen 16S rRNA (Tabla 22), en las gamma proteobacterias (grupos I, IV, V, VII, X y XXXI) y las beta proteobacterias (grupo XXIV), se observa una tendencia significativa a que las cepas de estos grupos presenten valores intermedios en la actividad ACC desaminasa, por existir mayor proporción de cepas en los cuartiles 2 y 3, que la que correspondería a una distribución aleatoria. Tan solo el grupo XXXII de las gamma proteobacterias (*Stenotrophomonas maltophilia*) presentó una tendencia significativa a incluir cepas con elevada actividad ACC desaminasa. Hassan *et al.* (2010) describieron *S. maltophilia* como una especie biocontroladora de patógenos productora de IAA y solubilizadora de fosfato, aunque estos autores no analizaron la actividad ACC desaminasa. Por el contrario el género *Bacillus*, en especial los grupos XVII (grupo *B. cereus*) y XXVI, presentaron una tendencia significativa a una actividad ACC desaminasa muy baja, por tener una proporción mayor a la esperada de cepas en el primer cuartil, y menor en los demás cuartiles. Por consiguiente existe una gran variabilidad en la actividad ACC desaminasa dentro del género *Bacillus* puesto que aunque la mayoría presentan una baja actividad de este tipo, algunas cepas como las ya mencionadas RD_DARAB_04 y RD_AZPVI_10 se cuentan entre las más productoras α -cetobutirato.

Del análisis de la actividad ACC desaminasa en esta investigación, puede concluirse que algunas cepas de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* y *Rhizobium* (entre ellas *R. radiobacter* antes *Agrobacterium tumefaciens*), poseen una elevada expresión de esta propiedad PGP, lo cual coincide con otros autores. Por ejemplo Qin *et al.* (2014) y Nadeem *et al.* (2012) aislaron cepas con actividad ACC desaminasa, algunas de las cuales pertenecían a géneros comunes con los de la presente investigación, como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* en el caso de Qin *et al.* (2014), y *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rhizobium radiobacter* en el caso de Nadeem *et al.* (2012). Sin embargo ambos autores aislaron otros géneros

diferentes también con actividad ACC desaminasa, como por ejemplo, *Chryseobacterium*, *Variovorax*, *Burkholderia*, etc, el primero de los autores trabajando en una planta halófila sin interés agronómico y el segundo en aguacate.

4.5.3. Fijación de nitrógeno en vida libre

El aprovechamiento agronómico de la fijación de nitrógeno en vida libre es controvertido, ya que en muchos de los experimentos de inoculación realizados con este tipo de microorganismos, no se observó una contribución sustancial de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) al crecimiento de las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003). A pesar de esto se ha realizado una estimación preliminar de la capacidad de fijación de nitrógeno de la colección de cepas, si bien este criterio no ha sido utilizado a la hora de tomar decisiones sobre la selección de cepas para los ensayos en planta.

La prueba de fijación de nitrógeno en vida libre se realizó mediante el cultivo de las cepas bacterianas en el medio líquido libre de nitrógeno. Como control para cada cepa se utilizó el mismo medio suplementado con nitrógeno mineral. Los resultados finales se expresaron en porcentaje de crecimiento en el medio libre de nitrógeno, con respecto al crecimiento en el medio suplementado con este elemento, de tal manera que valores próximos a 0 % significa que las bacterias no crecieron o tuvieron un crecimiento despreciable en el medio libre de nitrógeno, por no ser capaces de fijar nitrógeno atmosférico, mientras que un valor claramente mayor que cero significa que hubo fijación de nitrógeno, y como consecuencia crecimiento en el medio libre de nitrógeno. Un valor del 100 % significa que las cepas alcanzaron el mismo crecimiento en ausencia de nitrógeno mineral que en presencia del mismo, lo que supone una elevada eficiencia de fijación de nitrógeno. Es necesario indicar que el método utilizado en este trabajo para estimar la fijación de nitrógeno es de tipo preliminar, ya que lo más habitual es estimarlo mediante el ensayo de reducción del acetileno, en un medio semisólido (Habibi *et al.*, 2014).

El crecimiento de las cepas en medio libre de nitrógeno osciló entre 0 % y 100 % del crecimiento observado en el medio con nitrógeno. Veinticinco de las 262 bacterias presentaron valores del 100 %, incluso en algunos casos se llegó a superar este valor, indicando mayor crecimiento sin nitrógeno que con nitrógeno mineral en el medio. Las cepas incluidas en el primer cuartil crecieron entre el 0 % y un 1,24 %, que puede considerarse un crecimiento despreciable. El segundo cuartil abarcó hasta el 3,65 %,

un valor también muy bajo y que indica una fijación muy pobre o incluso nula de nitrógeno atmosférico. El tercer cuartil abarcó hasta un 16,35 %, lo que puede considerarse una fijación débil. El último cuartil presenta una dispersión muy amplia, desde el 16,35 % hasta el 100 %. Analizando con mayor profundidad este último cuartil, se puede deducir que solamente 38 cepas crecieron más de un 50 %, de las cuales 25 como ya se indicó presentaron el mismo crecimiento en ausencia y en presencia de nitrógeno mineral en el medio.

Las cepas que presentaron un 100 % de crecimiento en medio libre de nitrógeno mineral en este estudio fueron en su mayoría bacterias del género *Bacillus*: RD_DAROS_09, RD_MAAMIA_14 que corresponden a *B. anthracis* que pertenece al “grupo *Bacillus cereus*” y que es un patógeno que causa en ántrax en los humanos y animales (Greenfield & Bronze, 2003). RD_MOSAA_08 que es *B. circulans* fue descrita como PGPR fijadora de nitrógeno (Coelho *et al.*, 2003) y además solubilizadora de fosfato (Mehta *et al.*, 2010) y de potasio (Meena *et al.*, 2014). RD_MOLAP_05, *Bacillus* sp. próximo a *B. gottheilii* de la que no hay ninguna referencia salvo su descripción tras ser aislada en una industria farmacéutica (Seiler *et al.*, 2013). RD_MAAMIA_19 correspondiente a *B. kochii* está en la misma situación que el anterior (Seiler *et al.*, 2012). RD_DARAB_04, RD_MOGOZ_09, RD_DACAR_05 pertenecen a *B. thuringiensis*. Por otra parte también algunas gamma proteobacterias estuvieron entre las mayores fijadoras de nitrógeno concretamente RD_AZPVI_01, *Pseudomonas beteli*, especie que ha sido descrita como controladora de nematodos (Lu *et al.*, 2014), pero no como fijadora de nitrógeno. Por ultimo RD_MAAMIA_15 *Pseudoxanthomonas* sp. próxima a *Pseudoxanthomonas indica* también tuvo una fijación de nitrógeno significativamente elevada. Dicha especie ha sido reportada como aislada de un vertedero y no hay ninguna referencia a sus propiedades PGPRs (Kumari *et al.*, 2011).

En cuanto a la relación entre la fijación de nitrógeno y los grupos taxonómicos basados en los grupos RFLP del gen 16S rRNA (Tabla 22), lo más destacable es que se confirma el resultado ya adelantado en el párrafo anterior, de que las cepas del “grupo *Bacillus cereus*” (grupo XVII) presentan una tendencia estadísticamente significativa a ser muy fijadoras de nitrógeno, ya que existe un porcentaje de cepas en el cuartil superior que lo que correspondería a una distribución aleatoria.

4.5.4. Solubilización de fosfato

De la colección de 262 aislados 44 cepas solubilizan fosfato *in vitro*. Los resultados se analizaron de forma cualitativa sin cuantificar la anchura de la corona circular del halo transparente (Figura 34). La solubilización de fósforo es un modo de acción de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, aunque la eficiencia en campo es muy discutida porque puede variar según las condiciones climáticas, el suelo y el cultivos (Beneduzi *et al.*, 2013).

Figura 34: Diferentes halos formados por cuatro cepas solubilizadoras de fosfato mineral.

Existe una tendencia altamente significativa ($p < 0,001$ en Tabla 21) a que entre las bacterias rizosféricas haya una mayor proporción de solubilizadoras de fosfato que entre las endofíticas. Este resultado es lógico y es una consecuencia de que uno de los criterios para la selección de bacterias rizosféricas fue la capacidad de solubilizar fosfatos.

En cuanto a la relación entre la solubilización de fosfatos minerales y los grupos taxonómicos basados en los grupos RFLP del gen 16S rRNA (Tabla 22), las gamma proteobacterias de los grupos I, IV, V y X, que en el árbol filogenético (Figura 25) corresponden a la rama donde se sitúan *Pseudomonas plecoglossicida*, *P. taiwanensis*, *P. resinovorans*, *P. otitidis*, *P. mosselii*, etc. y *Acinetobacter pittii*, más las beta proteobacterias, presentaron una proporción significativamente mayor de cepas

solubilizadoras de fosfatos que lo que correspondería a una distribución aleatoria. Otras cepas solubilizadoras de fosfatos, fuera de los grupos mencionados pertenecieron a los géneros *Enterobacter* (dos cepas), *Pantoea* (tres cepas), *Citrobacter* (una cepa), *Burkholderia* (una cepa), y *Pseudochrobactrum* (una cepa). Por el contrario las Gram positivas y las alfa proteobacterias presentaron una proporción muy baja de solubilizadores de fosfatos. El predominio de cepas solubilizadoras de fosfatos en el género *Pseudomonas* y afines ha sido descrito por Oves *et al.* (2013), Lavakush *et al.* (2014), Sarma & Saikia (2014) y Habibi *et al.* (2014) y para el caso de *Pantoea* y *Acinetobacter* por Farina *et al.* (2012). Otro género que en el presente trabajo solubilizó fosfato, fue *Citrobacter*, lo que concuerda con los resultados de otros autores como Patel *et al.* (2008), y Ghosh *et al.* (2012). Sin embargo en el caso de *Bacillus* nuestros resultados no concuerdan con los de otros autores que consideran al género como uno de los más representativos en la solubilización de fosfatos (Wani *et al.*, 2007; Bhattacharyya & Jha, 2012; Ahemad & Kibret, 2014).

4.5.5. Producción de sideróforos

La producción de sideróforos es otro mecanismo que juega un rol importante en la promoción del crecimiento vegetal y muchas bacterias PGPRs son productoras de sideróforos en condiciones limitantes de hierro (Gaonkar & Bhosle, 2013; Wang *et al.*, 2013b). La producción de sideróforos *in vitro* se analizó de forma semicuantitativa midiendo el halo de color naranja que se formó alrededor de la bacteria, y valorándolo entre el 1 y 3 en función del diámetro del trapecio circular. El valor cero se le atribuyó a las bacterias que no produjeron halo (Tabla 21 y Tabla 22 y Figura 35).

De los 262 aislados de la colección, 142 cepas presentan esta propiedad PGPR, y estas cepas pertenecen a diferentes especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Serratia*, *Brevundimonas*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus*, *Pseudochrobactrum*, *Ochrobactrum*, *Comamonas* y *Rhizobium*.

Figura 35: Halo anaranjado formado alrededor de la cepa, lo cual es indicador de la producción de sideróforos.

Diez de las 142 cepas productoras de sideróforos, produjeron después de una semana de crecimiento *in vitro* una anchura de la corona circular del halo superior a 10 mm y fueron valoradas con un 3, como las mayores productoras de la colección. Dichas cepas fueron: RD_MAAMIA_18 (*Bacillus aerophilus*) especie no reportada previamente por su capacidad PGPR como ya se indicó; RD_MOPEP_02 y RD_MOPEP_06 (*Bacillus anthracis*), fue citada por Koppisch *et al.* (2005) y Lee *et al.* (2007) como especie productora de sideróforos; RD_MOSAA_06 (*Bacillus* sp.) próxima filogenéticamente a *B. licheniformis*, reportada como productora de sideróforos y además solubilizadora de fosfato, productora de IAA y con actividad contra el hongo *Fusarium oxysporum* (Goswami *et al.*, 2014); RD_AZPRC_15 y RD_MOLAP_04 (*Bacillus* sp.) próximas a *B. sonorensis*, que fue aislada por Nerurkar *et al.* (2013) a partir de un origen marino, existiendo una cita (Chopra *et al.*, 2014) que se refiere a la producción de péptidos antimicrobianos, pero no existe referencia alguna a su producción de sideróforos; RD_MAELC_05 (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*), especie de la que no hay referencias como PGPR, solamente se ha descrito como presente en poscosecha en papa en mal estado, pero su presencia no está necesariamente relacionada de manera directa con la podredumbre (Ramya *et al.*, 2014); RD_DACAR_06 y RD_DACAR_02 (*Burkholderia* sp.) próximas a *B. diffusa*, y *B. metallica* respectivamente, *B. diffusa* ha sido descrita por Vanlaere *et al.* (2008) y Ali *et al.* (2013), procedente de suelos contaminados con abamectina, pero no ha sido reportada como PGPR; por ultimo RD_MAAMIA_09 (*Pseudomonas* sp.) próxima a *P. nitroreducens*, especie aislada por

Huang *et al.* (2014) en las aguas de drenaje del cultivo de arroz, no habiéndose descrito capacidad PGPR, pero si la propiedad de utilizar surfactantes no iónicos y compuestos similares al estrógeno, como única fuente de carbono.

Existe una tendencia significativa ($p < 0,01$ en Tabla 21) a que entre las bacterias endofíticas haya una mayor abundancia de productoras de sideróforos que en las rizosféricas.

En cuanto a la relación entre la producción de sideróforos y los grupos taxonómicos basados en los grupos RFLP del gen 16S rRNA, si bien el análisis de contingencia resulta significativo estadísticamente, las diferencias de niveles de producción hallados, parecen más bien deberse a características dependientes de la cepa, no vinculadas a grupos taxonómicos, ya que la distribución grupos RFLP-producción de sideróforos no sigue una tendencia definida (Tabla 22).

4.5.6 Antagonismo sobre el crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis* (sigatoka negra)

El antagonismo directo sobre hongos, insectos, bacterias y nematodos patógenos y la inducción de resistencia en las plantas, es otra propiedad que poseen las bacterias PGPRs que promueven el crecimiento (Beneduzi & Passaglia, 2011). A la colección de aislados se les analizó de manera *in vitro* su efecto antagónico sobre el crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, diferenciando entre las cepas que no ejercen ningún tipo de control, las que ejercen control débil y las que ejercen control fuerte, entre estas dos últimas por el diámetro del trapecio circular en el halo de inhibición.

De las 262 cepas, 160 controlaron *in vitro* el crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis* a los 14 días de la inoculación del hongo. De todas ellas, 18 realizaron un control fuerte y las demás un control débil (Figura 36).

Figura 36: Prueba de antagonismo *in vitro*, se muestran tres cepas, a la izquierda no controladora (codificada como 0), en el centro controladora (codificada como 1) y a la derecha fuerte controladora (codificada como 2).

Las cepas que presentaron un control fuerte sobre la sigatoka pertenecieron a los siguientes grupos RFLP del gen 16S rRNA: I (RD_AZIDI_03) y IV (RD_AZIDI_04, RD_AZPRC_03, RD_DARAB_16, RD_AZPIS_09, RD_AZLTR_14 y RD_AZLTR_15), todas de diferentes especies del género *Pseudomonas*; VII (RD_MAAMIB_08 y RD_MOLAP_10) y XV (RD_AZPRC_19) compuestos por especies de los géneros *Enterobacter* y *Leclercia*; RD_DARAB_15 que corresponde a *Citrobacter youngae*; RD_AZIDI_08, RD_AZPRC_10 y RD_AZPVI_03 del “grupo *Bacillus cereus*”; RD_MOSAA_11 que corresponde a *Comamonas testosteroni*; RD_DACAR_06 (*Burkholderia diffusa*); y por ultimo RD_DAROS_10 y RD_DAROS_12 que corresponde a *Stenotrophomonas maltophilia*.

En cuanto a la relación entre el biocontrol de sigatoka y los grupos taxonómicos basados en los grupos RFLP del gen 16S rRNA (Tabla 22), en las gamma proteobacterias existe una tendencia general a que sean buenas biocontroladoras de sigatoka, en especial los grupos I, IV y XXXII (*Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*) y VII (*Enterobacter*), ya que en todos estos casos existe una proporción significativamente mayor ($p < 0,001$) de cepas controladoras tanto débiles como fuertes, que lo que correspondería en una distribución al azar. También el grupo XXXI (*Luteimonas* y *Pseudomonas*) presenta una mayor proporción de biocontroladores, pero en este caso el biocontrol es débil. La misma situación del grupo XXXI se repite para las cepas Gram positivas del grupo XXI (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*), XXVI (*Bacillus* sp. pertenecientes a la rama filogenética de *B. subtilis*) y XXIX que incluye el grupo de *B. pumilus*. Por otra parte los grupos XVII (grupo de *Bacillus cereus*), XVIII (*Lysinibacillus xylanilyticus*) y las alfa proteobacterias presentan una mayor proporción de cepas que no controlan sigatoka.

De la presente investigación, puede concluirse que algunas cepas de los géneros *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Leclercia* y *Pseudomonas* poseen el potencial de inducir antagonismo sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, en condiciones *in vitro*. Existen otros trabajos que han analizado también el efecto biocontrolador de bacterias, destacando entre ellos el trabajo de Ceballos *et al.* (2012) que aislaron en hoja de banano, diferentes especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y otro no identificado a nivel específico) y una especie del género *Paenibacillus* (*P. pasadenensis*) con capacidad antagónica *in vitro* sobre dicho hongo causante de la sigatoka negra.

4.6 Análisis mediante ensayos en planta del efecto de bacterias endofíticas en la promoción del crecimiento vegetal y en la inducción de resistencia sistémica (RSI)

4.6.1. Selección de cepas para los ensayos en planta

La selección de las cepas a utilizar en los ensayos con plantas, se realizó entre las bacterias endofíticas del primer aislamiento, basándose en un análisis multivariante de componentes principales (ACP), de las propiedades PGP analizadas (Tabla 23 y Tabla 24 y Figura 37). Los dos primeros componentes principales recogieron el 52 % de la variabilidad total, mientras que con tres la variabilidad explicada se aproximó al 75 %.

Tabla 23: Eigenvalores, porcentajes y varianza acumulada en el análisis de componentes principales (ACP) de las 77 cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase, en relación con cinco propiedades PGP, para seleccionar aquellas destinadas a los ensayos en planta.

Componente principal	Eigenvalores	Porcentaje (%)	Varianza acumulada (%)
1	1,466	29,3	29,3
2	1,155	23,1	52,4
3	0,947	18,9	71,4
4	0,915	18,3	89,7
5	0,517	10,3	100,0

En el primer componente principal, los parámetros que más contribuyeron a la diferenciación entre cepas fueron la producción de sideróforos y la fijación de nitrógeno atmosférico en vida libre, estando ambos correlacionados negativamente (Tabla 24 y Figura 37). Por su parte respecto del segundo componente principal, los parámetros que más influyeron fueron la producción de IAA y la actividad ACC desaminasa, que también estuvieron negativamente correlacionados (Tabla 24 y Figura 37).

Tabla 24: Valores de los eigenvectores de cinco propiedades PGP, sobre los cuatro primeros C.P. ACP correspondiente a 77 cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase, para seleccionar aquéllas destinadas a los ensayos en planta.

Propiedades PGP analizadas	C.P. 1	C.P. 2	C.P. 3	C.P. 4
Producción de IAA ($\mu\text{g/mL}$)	0,122	0,814	0,449	0,189
Solubilización de fosfato	0,461	-0,186	0,619	-0,592
Producción de sideróforos	0,787	-0,323	0,231	-0,033
Actividad ACC desaminasa ($\mu\text{M } \alpha\text{-cetobutirato/mg proteína h}$)	-0,171	-0,563	0,549	0,592
Fijación de N ¹	-0,769	-0,188	0,085	-0,422

¹ % de crecimiento en medio líquido en ausencia de N mineral frente al crecimiento con N mineral.

Figura 37: Billo obtenido tras el ACP de cinco propiedades PGP de las cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase. Se han representado sobre los dos primeros CP los valores de los eigenvectores de las cinco propiedades PGP analizadas y las cepas, con el objetivo de seleccionar las cepas destinadas a los ensayos en planta.

El ACP se realizó para todas las cepas que cumplieron la triple condición de su carácter endofítico, de proceder del primer aislamiento y de haber obtenido resultados en las cinco propiedades PGP indicadas en la Tabla 24, en total 77 de 114 cepas fueron evaluadas para el análisis. Para la proyección de las cepas sobre los dos primeros CP se descartaron las especies patógenas o próximas a patógenos humanos y de las plantas. De esta forma se descartaron 14 cepas próximas a *Bacillus anthracis* y a *B. cereus*. Por la misma razón se descartaron otras cuatro cepas próximas a *Burkholderia metallica*,

Pseudomonas otitidis y *Stenotrophomonas maltophilia* (este último por estar descrito como un patógeno oportunista pero resistente a múltiples antibióticos (Brooke, 2012). Por otra parte también se prescindió de cinco cepas por ser patógenos vegetales, filogenéticamente muy próximas a la cepa tipo de *Rhizobium radiobacter*. Finalmente se descartaron cuatro cepas de *Bacillus thuringiensis*, ya que por su conocido efecto de biocontrol contra diferentes insectos, está considerado como un biocontrolador (Castillo-López *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), lo que puede originar problemas a la hora de registrarlo como producto biofertilizante.

Las 50 cepas restantes se proyectaron en el espacio bidimensional definido por los dos primeros componentes principales (Figura 37), con el fin de poder realizar la elección de las que presentan mayor expresión en determinados mecanismos PGP. De los cinco mecanismos analizados, la producción de IAA y la actividad ACC desaminasa por una parte y la producción de sideróforos y la fijación de N atmosférico por otra están negativamente correlacionadas. Por tanto en las cepas de la colección las propiedades negativamente correlacionadas no se encuentran conjuntamente, lo que obliga a seleccionar como criterio una sola de las parejas de propiedades negativamente correlacionadas. En base al estado actual de los conocimientos y a la revisión bibliográfica presentada a lo largo de este trabajo, no existen evidencias claras que justifiquen la elección de un criterio frente a otro, ya que los modos de acción de los microorganismos *in vivo* no están completamente desentrañados y además tampoco está aclarada completamente la relación entre actividad PGP *in vitro* y efectos sobre la planta. Por tanto la elección de uno u otro criterio para elegir bacterias destinadas a los ensayos en planta es un asunto discutible.

En nuestro caso se priorizó la producción de sideróforos, ya que está comprobado que las bacterias con esta propiedad compiten con los patógenos por los iones de hierro, inhibiendo su desarrollo pero sin tener un efecto biocida directo, lo que confiere a las bacterias con esta propiedad características muy interesantes a la hora de desarrollar un bioforticante. En segundo lugar, para la selección de las cepas bacterianas los criterios utilizados fueron una elevada actividad ACC desaminasa y alta producción de IAA, aunque como ya se ha indicado estas dos capacidades PGP estuvieron negativamente correlacionadas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Qin *et al.* (2014), que obtuvieron cepas con elevada actividad ACC desaminasa pero con muy bajos niveles de producción de IAA. Por esta razón la selección se realizó entre las

bacterias que quedan colocadas a la derecha de la zona delimitada por las dos líneas rojas, en la Figura 37.

Inicialmente se eligieron las tres cepas situadas en la parte más positiva del primer componente principal que es el que está principalmente vinculado al mecanismo de producción de sideróforos. Dos de ellas, RD_AZPVI_05 (*Pseudomonas plecoglossicida*) y RD_MAAMIA_05 (*Pseudomonas plecoglossicida*), pese a presentar valores elevados en el primer componente, los presentaron muy bajos en el segundo, lo que quiere decir que tuvieron niveles significativamente elevados de producción de sideróforos, pero bajos con respecto a los mecanismos ligados al segundo componente principal, es decir la producción de IAA y la actividad ACC desaminasa. La cepa RD_MAAMIB_01 (*Pseudomonas taiwanensis*) (Figura 37), además de presentar valores elevados respecto de la producción de sideróforos, presentó también valores más altos que la mayoría de las especies con respecto a la actividad ACC desaminasa. La cuarta cepa elegida RD_DARAB_12 (*Pseudomonas taiwanensis*) (Figura 37) presenta valores similares de actividad ACC desaminasa con respecto a la anterior, aunque menor producción de sideróforos, pero procede de una provincia diferente. Se eligió una quinta cepa la RD_MOPEP_07 (*Pseudomonas mosselii*) (Figura 37) cuya característica es que fue la mayor productora de IAA entre las que produjeron sideróforos.

La fijación de nitrógeno en vida libre fue una propiedad que en este trabajo no se consideró a la hora de seleccionar las bacterias para los ensayos en planta, a pesar de ser el nitrógeno un nutriente esencial para su nutrición. La fijación de nitrógeno más estudiada y de probada utilidad en agronomía es la que tiene lugar en simbiosis nodular, entre bacterias del género *Rhizobium* y plantas leguminosas (Kumar *et al.*, 2011b; Ribeiro *et al.*, 2013; Abd-Alla *et al.*, 2014). Sin embargo el aprovechamiento agronómico de la fijación de nitrógeno en vida libre no es tan importante cuantitativamente como el derivado de las simbiosis entre rizobios y leguminosas ya mencionado, o entre actinobacterias y cianobacterias y diversas plantas (Santi *et al.*, 2013). Aunque existen estudios sobre endófitos diazotrofos en banana (Martínez *et al.*, 2003, Andrade *et al.*, 2014), los ensayos en planta son escasos. Mia *et al.* (2010d), trabajaron en planta de banano con bacterias diazotrofas encontrando valores significativos de fijación de nitrógeno, pero no se han descrito ensayos en campo.

4.6.2. Estructura general de los ensayos en planta

Para analizar el efecto en planta de las cepas preseleccionadas por su capacidad PGP *in vitro* se plantearon dos tipos de ensayos: El primero fue un ensayo en vivero, para evaluar el posible efecto de mejora en el proceso de producción de plantas de banano procedentes de cultivo *in vitro*, con destino al establecimiento de plantaciones comerciales. El segundo fue un ensayo de campo propiamente dicho. En ambos casos se realizó una inoculación con las cepas preseleccionadas frente a controles sin inocular. En el ensayo en vivero la inoculación final fue al momento del trasplante en el estado de tres-cuatro hojas, y el período de crecimiento entre la inoculación y la toma de datos final fue de 90 días. En el ensayo en campo la inoculación se llevó a cabo en el momento del trasplante al terreno de asiento definitivo.

4.6.3. Análisis del efecto de la inoculación con las bacterias en la producción de planta comercial de banano en vivero

En el ensayo de vivero los datos analizados para evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal fueron el número de hojas, la altura, el peso fresco y seco de la parte aérea, el peso seco de las raíces y el número de hijos (Tabla 25 y Tabla 26).

Tabla 25: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP *in vitro*, sobre plantas de banano en vivero, frente a un control sin inocular (Nivel de significación:

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns no significativo).

Fuente de variación	GL	Nº de hojas		Altura (cm)		Peso fresco parte aérea (g)		Peso seco parte aérea (g)		Peso seco raíces (g)		Nº hijos	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Tratamiento	5	0,785	0,815 ns	0,732	0,108 ns	1811,6	4,807 **	41,237	5,315 ***	11,905	5,215 ***	0,241	0,929 ns
Bloque	2	1,796	1,865 ns	0,054	0,008 ns	860,6	2,284 ns	45,316	5,840 **	2,202	0,964 ns	0,519	2,000 ns
Tratamiento * Bloque	10	1,130	1,173 ns	3,238	0,476 ns	227,7	0,604 ns	3,943	0,508 ns	1,876	0,822 ns	0,319	1,229 ns

GL: Grados de libertad. CM: Cuadrados medios.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento tuvo un efecto significativo en el peso fresco de la parte aérea y altamente significativo sobre el peso seco de la parte aérea y de la raíz (Tabla 25). El bloque tuvo un efecto significativo en el peso seco de la parte aérea y no existieron interacciones significativas entre tratamiento y bloque.

La inoculación con algunas de las cepas bacterianas indujo un incremento significativo en el crecimiento de las plantas, reflejándose en un aumento de la biomasa aérea y radicular. En concreto las cepas RD_AZPVI_05 y RD_MAAMIA_05 (ambas *Pseudomonas plecoglossicida*) produjeron un aumento significativo de peso fresco y seco de la parte aérea frente al control sin inocular. Las demás bacterias no produjeron diferencias frente al control, incluso RD_MOPEP_07 (*Pseudomonas mosselii*) produjo valores numéricos ligeramente inferiores a los del control. En cuanto al peso seco de raíces ninguna bacteria produjo mayor biomasa que el control sin inocular. Sin embargo con la cepa RD_AZPVI_05 se observó mayor peso seco de raíces que con las cepas RD_MOPEP_07 y RD_DARAB_12 (*Pseudomonas taiwanensis*) y con RD_MAAMIA_05 mayor que con RD_MOPEP_07. En cuanto al número de hojas y la altura de la planta, las exiguas diferencias no llegaron a ser significativas, y tampoco lo fueron las diferencias en el número de hijos (Tabla 26).

Tabla 26: Valores medios de seis parámetros indicadores del crecimiento de plantas de banano en vivero, con el objeto de evaluar el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP *in vitro*, frente a un control sin inocular. Los tratamientos se han ordenado de menor a mayor por el valor del peso seco de la parte aérea (Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas para $p < 0,05$ en la prueba de Tukey. La ausencia de letras en un parámetro indica la ausencia de diferencias significativas).

Tratamiento	Nº de hojas	Altura (cm)	Peso fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raíces (g)	Nº hijos
RD_MOPEP_07	13,11	24,41	119,61 a	15,58 a	9,11 a	0,22
Control	13,78	23,83	120,20 a	16,04 a	11,08 abc	0,11
RD_DARAB_12	13,67	23,69	118,58 a	16,70 ab	9,94 ab	0,00
RD_MAAMIB_01	13,33	24,28	132,63 ab	18,32 ab	10,51 abc	0,11
RD_MAAMIA_05	13,22	23,83	147,75 b	20,35 b	11,84 bc	0,44
RD_AZPVI_05	13,78	24,11	148,98 b	20,44 b	12,14 c	0,33

A pesar de la extensa bibliografía sobre PGPRs, son pocos los trabajos que llegan a realizar ensayos a nivel de campo tanto a pequeña como a gran escala. Varios estudios trabajan a nivel de microcosmos o mesocosmos, es decir sobre contenedores en suelo real en condiciones de invernadero, siendo la diferencia entre ambos el tamaño de las contenedores. En el presente estudio se ha trabajado en contenedores y en invernadero, pero no se ha utilizado suelo sino substrato comercial para la producción de planta, de manera que nuestra experimentación no es un ensayo de micro o mesocosmos, que es una investigación preliminar, sino un ensayo finalista que trata de averiguar la utilidad de un biofertilizante en la producción de plantas con fines comerciales.

Existe poca bibliografía científica sobre el uso de PGPR para la producción de plantas de banano para el trasplante. Sin embargo Rodríguez-Romero *et al.* (2008) realizaron estudios sobre plantas de banano inoculadas con dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* obteniendo que las mismas inducían un aumento en el peso fresco aéreo, en la longitud del tallo y el área de la hoja de la planta, así como un aumento del contenido de nitrógeno. Además la inoculación de estas cepas como biocontroladoras redujeron la incidencia de nematodo *Meloidogyne javanica*. La utilización de PGPR en producción de planta en vivero con resultados positivos también ha sido mencionada por otros autores en otros cultivos. Por ejemplo Sabir (2013), utilizó con éxito PGPR para mejorar la unión patrón-variedad en injertos de vid sobre patrones híbridos basados en *Vitis berlandieri*, apuntando la posibilidad de sustituir las hormonas de síntesis tipo auxinas por bacterias de las especies *Pseudomonas putida* y *Bacillus simplex* que son las que utilizaron en la investigación. También gracias a su acción hormonal, las PGPRS se han utilizado con éxito en vivero para mejorar el enraizamiento de esquejes de olivo (Montero-Calasanz *et al.*, 2013).

También hay trabajos que al igual que el nuestro han demostrado la utilidad de las PGPRs para mejorar el crecimiento de las plantas en el vivero, con lo que se obtienen en períodos de tiempo más cortos plantas con mayor desarrollo, lo que por una parte mejora la utilización de los nutrientes y por otra produce plantas más robustas, con mejor capacidad para establecerse en el terreno definitivo. Por ejemplo Liu *et al.* (2013b), trabajaron en viveros de *Fraxinus americana*, que el uso de microorganismos no solamente es útil en condiciones deficitarias de nutrientes, sino también en condiciones eutróficas, como es el caso de los viveros, donde no se suele someter a las plantas a falta de nutrientes. Por tanto el biofertilizante basado en PGPR se utilizaría en vivero como un complemento a la aplicación de fertilizantes, es decir no se utilizarían sustratos más pobres en nutrientes, sino que el uso complementario de los sustratos habituales y el biofertilizante producirían un mejor aprovechamiento de los nutrientes y desarrollo de las plantas. En la misma línea Câmara-Leite *et al.* (2013) observaron que la altura, número de hojas y materia seca producida por las plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el semillero para la producción de estas plantas aumentó, utilizando como inoculante *Enterobacter cloacae* y *Bacillus subtilis*.

Por tanto como resultado de esta investigación, se propone la utilización de *Pseudomonas plecoglossicida* como biofertilizante para mejorar la producción de planta de banano en vivero, ya que las cepas que mejores resultados proporcionaron

pertenecen ambas a la misma especie. La optimización de las formulaciones sería el siguiente paso en la investigación. La especie *Pseudomonas plecoglossicida* no ha sido descrita como patógeno humano o vegetal. Ha sido aislada en un pez *Plecoglossus altivelis* endémico de la zona de Asia-Pacífico (Nishimori *et al.*, 2000).

4.6.4. Análisis en campo del efecto de la inoculación con las bacterias, en el desarrollo y rendimiento comercial del cultivo de banano

Las cinco cepas que fueron probadas como inoculantes en vivero fueron también utilizadas para inocular plantas en el momento del trasplante a campo (6 junio 2012). En este caso se observó y se anotó el número de hojas por planta a intervalos regulares de tiempo durante el período entre el 30 de octubre de 2012 y el inicio de la floración en Enero de 2013 (Tabla 27 y Tabla 28). Para estimar el efecto promotor del crecimiento vegetal de las bacterias sobre las plantas, durante la fase vegetativa de ésta en el momento de la floración se determinaron los siguientes parámetros: número de hojas, altura de la planta, altura del hijo y perímetro del pseudotallo (Tabla 29 y 30). En el momento de la cosecha se tomó el dato del número de hojas, así como el rendimiento por planta y los componentes del mismo (Tabla 31 y Tabla 32).

Tabla 27: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar en campo el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP *in vitro*, sobre la variable número de hojas a intervalos regulares de tiempo, frente a un control sin inocular (Nivel de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns no significativo).

Fuentes de variación	GL	30-oct		15-nov		30-nov		15-dic		30-dic	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Tratamiento	5	0,874	1,248 ns	0,378	0,234 ns	0,494	1,047 ns	0,178	0,356 ns	0,628	0,779 ns
Bloque	2	1,774	2,535 ns	0,778	0,483 ns	0,111	0,235 ns	3,444	6,889**	1,361	1,690 ns
Tratamiento * Bloque	10	1,229	1,756 ns	1,944	1,207 ns	0,378	0,800 ns	0,444	0,889 ns	0,594	0,738 ns

GL: Grados de libertad. CM: Cuadrados medios.

En cuanto al número de hojas durante la fase vegetativa no hubo diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los momentos de muestro. Solamente hubo diferencias significativas entre bloques para el muestro del 15 de diciembre de 2012. Tampoco hubo interacción entre tratamiento y bloque (Tabla 27). En cuanto a los valores medios (Tabla 28) puede observarse que son muy similares entre tratamiento para un mismo muestreo como cabía esperar por la falta de significación. El aspecto más destacable es la evolución del número de hojas a lo largo del tiempo, con un acusado descenso en el muestreo del 30 de noviembre de 2012,

debido al importante ataque de sigatoka negra sufrido durante la segunda quincena de noviembre, que redujo el número de hojas a la mitad en un breve espacio de tiempo. A pesar de la falta de significación en las diferencias, para algunos de los tratamientos el número de hojas destruidas por la enfermedad fue menor, lo que dio pie a tomar también mediciones sobre el efecto biofortificante de los tratamientos y su efecto sobre la incidencia de la enfermedad (ver más adelante en este mismo apartado).

Tabla 28: Valores medios del número de hojas por planta en el ensayo de inoculación de banano en campo. En ningún parámetros existen diferencias significativas para $p < 0,05$.

Tratamiento	30-oct	15-nov	30-nov	15-dic	30-dic
RD_AZPVI_05	9,8	10,7	5,5	8,1	9,8
Control	10,3	10,8	5,4	8,4	9,9
RD_MAAMIA_05	10,5	10,8	6,8	8,8	10,2
RD_MOPEP_07	10,6	10,8	6,6	8,7	9,8
RD_DARAB_12	10,6	11,3	8,2	8,8	10,7
RD_MAAMIB_01	10,9	11,2	8,7	9,4	10,7

En cuanto a los parámetros medidos en el estado fenológico de floración y en la cosecha (Tabla 29 y 30) no existieron diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de ellos, por lo que se deduce que los tratamientos no afectaron a ninguno de estos parámetros.

Tabla 29: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar en campo el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP in vitro, sobre varios parámetros agronómicos en el momento de la floración y la cosecha, frente a un control sin inocular, (ns no significativo para $p < 0,05$).

Fuentes de variación	GL	Estado fenológico de floración								Estado cosecha	
		Nº de hojas		Altura de la planta (cm)		Altura del hijo (cm)		Perímetro pseudotallo (cm)		Nº de hojas	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Tratamiento	5	5,694	2,20 ns	1425,7	0,807 ns	810,8	0,824 ns	58,117	1,072 ns	1,80	0,67
Bloque	2	0,694	0,2 ns	329,3	0,186 ns	418,8	0,426 ns	16,000	0,295 ns	4,00	1,50
Tratamiento *	10	1,661	0,643 ns	1636,9	0,927 ns	1015,	1,033 ns	73,067	1,348 ns	2,00	0,75
Bloque						6				0	0 ns

GL: Grados de libertad. CM: Cuadrados medios.

Tabla 30: Valores medios de varios parámetros agronómicos en el ensayo de inoculación de banano en campo. En ningún parámetro existen diferencias significativas para $p < 0,05$.

Tratamiento	Estado fenológico de floración				Estado cosecha
	Nº hojas	Altura planta (cm)	Altura hijo (cm)	Perímetro pseudotallo (cm)	Nº de hojas
Control	13,2	162,7	98,8	43,3	11,5
RD_DARAB_12	15,2	206,0	92,8	44,7	11,2
RD_AZPVI_05	13,7	201,7	120,5	43,3	12,5
RD_MAAMIA_05	13,3	187,7	90,2	43,3	11,0
RD_MAAMIB_01	13,7	183,3	112,2	41,8	11,7
RD_MOPEP_07	12,2	184,2	103,0	36,0	11,2

En cuanto al rendimiento y sus componentes, los tratamientos produjeron diferencias significativas ($p < 0,01$) en el peso medio del fruto (Tabla 31), lo que tuvo su reflejo en diferencias significativas ($p < 0,05$) en el rendimiento por planta. No existieron diferencias entre bloque, ni interacción entre tratamiento y bloque.

Tabla 31: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar en campo el efecto de cinco bacterias seleccionadas por su capacidad PGP *in vitro*, sobre el rendimiento por planta y sus componentes, frente a un control sin inocular (Nivel de significación de la relación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns no significativo).

Fuentes de variación	GL	Nº de manos por racimo		Nº de frutos por racimo		Peso medio fruto (g)		Peso del racimo (rendimiento por planta) (kg)	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Tratamiento	5	0,178	0,800 ns	120,2	1,771 ns	1671,8	5,767* *	14,093	3,324*
Bloque	2	0,028	0,125 ns	42,5	0,626 ns	33,1	0,114 ns	3,058	0,721 ns
Tratamiento * Bloque	10	0,228	1,025 ns	133,4	1,965 ns	141,8	0,489 ns	6,202	1,463 ns

GL: Grados de libertad. CM: Cuadrados medios.

Los valores medios de peso del fruto y del racimo (que corresponde al rendimiento por planta) fueron menores en el control y más elevados en todos los tratamientos. Sin embargo solamente la inoculación con la cepa RD_MAAMIA_05 (*Pseudomonas plecoglossicida*) produjo valores de peso medio del fruto y del racimo significativamente más elevados con respecto al control (Tabla 32).

Tabla 32: Valores medios del rendimiento por planta y sus componentes en el ensayo de inoculación de banano en campo. (Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas para $p < 0,05$ en la prueba de Tukey. La ausencia de letras en un parámetro indica la ausencia de diferencias significativas).

Tratamiento	Nº de manos por racimo	Nº de frutos por racimo	Peso medio fruto (g)	Peso del racimo (rendimiento por planta) (kg)
Control	7,2	100,50	151,29 a	15,22 a
RD_AZPVI_05	7,0	96,00	169,28 ab	16,04 ab
RD_DARAB_12	7,3	101,20	160,28 a	16,18 ab
RD_MOPEP_07	7,3	109,20	152,39 a	16,70 ab
RD_MAAMIB_01	7,3	103,70	167,34 ab	17,40 ab
RD_MAAMIA_05	7,5	99,20	196,77 b	19,62 b

El peso medio del fruto fue un 30 % superior en el tratamiento con la cepa RD_MAAMIA_05 con respecto al control, y el peso del racimo fue un 29 % superior. Por otra parte la cepa RD_MAAMIB_01 (*Pseudomonas taiwanensis*) produjo un peso del racimo un 14,3 % superior al del control, aunque en este caso las diferencias no fueron significativas.

Existen pocos antecedentes bibliográficos que analicen el efecto de la inoculación con PGPR en el rendimiento en campo del banano (Kavino *et al.*, 2010), y ninguna en el área geográfica de América Latina y el Caribe, por lo que el presente trabajo es una innovación en ese aspecto, y los resultados indican que es posible desarrollar biofertilizantes basados en bacterias autóctonas. La cepa RD_MAAMIA_05 produjo también buenos resultados en vivero, ligeramente inferiores a los de otra cepa de la misma especie, RD_AZPVI_05, que sin embargo en campo no fue de las mejores. Por tanto la recomendación que puede hacerse es la elección de RD_MAAMIA_05 tanto para vivero como para producción en campo. De los resultados obtenidos parece confirmarse la hipótesis de partida de que la producción de sideróforos está ligada de alguna manera indirecta al efecto PGP en planta, ya que las cepas que mejores resultados han proporcionado, se encuentran ligadas a los valores más positivos del primer componente principal (Figura 37). Es destacable que la cepa que mejores resultados ha proporcionado en el ensayo de campo realizado en la provincia de Azua procede de Mao, lo que es un aspecto positivo respecto a la capacidad de adaptación de la cepa a diferentes condiciones agroecológicas, dentro la relativa homogeneidad propia de una isla tal como se analizó en el apartado 4.4 (Figura 33).

Kavino *et al.* (2010) observaron un incremento de rendimiento entre el 36 y el 39 % en cultivo de banano inoculando con las cepas quitinolíticas CHA0 y Pf1 de *Pseudomonas*

fluorescens. En su investigación añadieron quitina para favorecer la supervivencia y eficacia de estas cepas. Estos incrementos de rendimientos son ligeramente superiores a los nuestros. Comparando el efecto de la inoculación con PGPR sobre el rendimiento del banano frente a otros cultivos, Esitken *et al.* (2010) con fresa obtuvieron incrementos del 33,2 % cuando utilizaron un inoculante mixto compuesto por un *Bacillus* y una *Pseudomonas*, valores que están en el mismo orden de magnitud que los indicados para el banano. De Souza *et al.* (2013) trabajando con arroz, obtuvieron un incremento de rendimiento de hasta el 13 % cuando utilizaron una cepa de *Azospirillum* sp. y un 50 % de la fertilización habitual, frente al rendimiento obtenido con la misma cantidad de abono mineral y sin inocular, si bien estas diferencias no fueron significativas.

Inducción de resistencia por parte de las cepas inoculadas frente a sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en condiciones de campo (Resistencia Sistémica Inducida, RSI)

La inoculación de bacterias rizosféricas y endofíticas puede desencadenar en las plantas mecanismos de RSI (Dobbelaere *et al.*, 2003; De Vleesschauwer *et al.*, 2008; Bhattacharyya & Jha, 2012; Singh, 2013). En el presente estudio se halló que la inoculación con ciertas cepas reducía la incidencia de la sigatoka negra, y se atribuyó a fenómenos de RSI. En cada uno de los muestreos realizados entre el 30 de octubre de 2012 y la floración, se estimó la incidencia de la enfermedad. El método estándar de estimación de la incidencia de la enfermedad en campo consiste en determinar la primera hoja con síntomas de necrosis, contando desde la zona apical hasta la basal. En consecuencia valores bajos de la primera hoja necrótica indican una mayor incidencia de la enfermedad, ya que el número de hojas sanas es también menor, por tanto lo que se busca es que la primera hoja necrótica tenga el valor más elevado posible, lo que indica un retraso en la manifestación de la enfermedad. Este parámetro se evaluó mediante un ANOVA (Tabla 33 y Figura 38).

En la mayoría de los muestreos hubo diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en el del 30 de noviembre de 2012 que corresponde al ataque intensivo de la enfermedad, anteriormente comentado. El bloque resultó altamente significativo en el muestreo del 15 de diciembre, mientras que la interacción entre tratamiento y bloque solo fue débilmente significativa para el muestreo del 30 de noviembre.

Tabla 33: Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos de primera hoja necrótica por efecto de la sigatoka negra en campo, a intervalos regulares de tiempo, en cinco tratamientos con bacterias seleccionadas en base a su capacidad PGPR *in vitro* frente a un control sin inocular (Nivel de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns no significativo).

Fuentes de variación	GL	30-oct		15-nov		30-nov		15-dic		30-dic	
		CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Tratamiento	5	0,800	3,600*	2,717	2,964*	11,911	2,821 ns	1,244	4,480**	8,561	4,109*
Bloque	2	0,083	0,375 ns	0,333	0,364 ns	3,694	0,875 ns	26,361	94,900 ***	1,778	0,853 ns
Tratamiento *Bloque	10	0,183	0,825 ns	1,200	1,309 ns	10,628	2,517*	0,328	1,180 ns	2,244	1,077 ns

GL: Grados de libertad. CM: Cuadrados medios.

Las diferencias entre tratamientos en la incidencia de la enfermedad (Figura 38), indican que alguno de los aislados posee la capacidad de inducir resistencia. Concretamente la cepa RD_MAAMIA_05 (*Pseudomonas plecoglossicida*) retrasó el ataque de la enfermedad frente al control en todos los muestreos, en 1, 3 y 4 hojas dependiendo de la fecha, si bien las diferencias con el control solamente fueron significativas en el segundo (15 de noviembre) y cuarto (15 de diciembre) muestreos. La posición de la primera hoja necrótica en las plantas inoculadas con la cepa RD_DARAB_12 (*Pseudomonas taiwanensis*) no difirió estadísticamente con los resultados obtenidos con la cepa RD_MAAMIA_05. Por tanto se le puede atribuir también una inducción de resistencia pero más débil que la anterior, ya que los valores obtenidos con RD_DARAB_12 tampoco difirieron de los del control sin inocular, excepto para el quinto muestreo (30 de diciembre).

La cepa RD_AZPVI_05 (*Pseudomonas plecoglossicida*) no tuvo ningún efecto de control de la enfermedad, incluso en el primer (30 de octubre) y quinto (30 de diciembre) muestreos, la primera hoja necrótica tuvo un valor ligeramente más bajo que el control, aunque esta diferencia no fue significativa.

El número de hojas al momento de la floración y fructificación del banano es relevante, puesto que las plantas deben tener al menos seis hojas en buen estado fisiológico y libres de la incidencia del ataque del hongo causante de la sigatoka negra (Barrera *et al.*, 2009). En el presente estudio las plantas inoculadas con RD_MAAMIA_05 presentaron de media a lo largo del período muestreado, dos hojas más sin síntomas de necrosis que el control sin inocular, y es de esperar que esta diferencia se haya mantenido durante el período de formación del fruto, y de esta manera se justificaría el rendimiento significativamente más elevado de las plantas tratadas con dicha cepa, respecto del control. Lamentablemente durante el período comprendido entre

floración y cosecha no se siguieron tomando medidas de la primera hoja necrótica, ya que el hallazgo del efecto de control de la sigatoka fue inesperado. Por consiguiente es necesario continuar investigando sobre la inducción de resistencia sistémica en banano, para dilucidar si la mejora del rendimiento se debe a la reducción de la incidencia de la sigatoka negra o a otras propiedades PGPRs de los inoculantes. En general los efectos de las PGPRs son siempre una combinación de diferentes modos de acción (Spaepen *et al.*, 2008; Hayat *et al.*, 2010). Es interesante comprobar que la cepa que no produjo ningún aumento de rendimiento (RD_AZIPVI_05) tampoco controló en absoluto la enfermedad de la sigatoka negra. Por eso para posteriores estudios se establecerá como hipótesis de partida que la principal causa de mejora del rendimiento es el control de esta enfermedad. No obstante Ji *et al.* (2014) trabajando con arroz y el hongo *Fusarium oxysporum* var. *cubense* y *Rhizoctonia solani* encontraron que el efecto promotor del crecimiento vegetal no necesariamente es una consecuencia de la inducción de RSI por parte de las rizobacterias.

Aunque existen numerosas referencias sobre el control de enfermedades mediante la RSI en diversos cultivos (Dobbelaere *et al.*, 2003; Andersen & Winding, 2004; Van Loon, 2007; Singh *et al.*, 2011; Bhattacharyya & Jha, 2012; Singh, 2013; Ji *et al.*, 2014), las referentes al banano son escasas y ninguna sobre el control de sigatoka negra, excepto los trabajos realizados en el marco del proyecto que ha financiado este estudio (Mulas *et al.*, 2013). Fishal *et al.* (2010) analizaron el efecto de dos cepas de *Pseudomonas* sp. y *Burkholderia* sp. respectivamente en la inducción de resistencia contra una de las principales enfermedades del banano a nivel mundial, causada por *Fusarium oxysporum*. Estudiaron el efecto de la inoculación con estas bacterias en la producción de enzimas relacionadas con la resistencia contra la enfermedad, y también realizaron algunos ensayos en planta. Lian *et al.* (2008) inocularon plántulas de banano con bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* previamente aisladas en el propio cultivo. Observaron que la inoculación con el hongo causante de la fusariosis, desencadenaba un aumento de la presencia de dichas bacterias si se compara con las plantas control no inoculadas con el patógeno. El incremento lo relacionaron con la selección por parte de la planta de las bacterias que controlaban la enfermedad, pero este control lo atribuyeron a un demostrado efecto antagónico y no a los fenómenos de RSI. Los restantes trabajos sobre inducción de resistencia en banano son contra virus, concretamente el virus del racimo de banano (*Banana Bunchy Top Virus*) BBTV (Harish *et al.*, 2008, 2009). *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* spp. endofíticos fueron

eficaces en la reducción de la incidencia de este virus en condiciones de invernadero y también en campo, aunque la eficacia fue mayor en el primero.

Figura 38: Valores medios de la primera hoja necrótica por efecto de la sigatoka negra en campo, midiendo desde el ápice hace la base, en cinco tratamientos con bacterias seleccionadas por su capacidad PGPR *in vitro*, frente a un control sin inocular (Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas para $p < 0,05$ en la prueba de Tukey. La ausencia de letras en un parámetro indica la ausencia de diferencias significativas).

4.6.5. Selección de bacterias con capacidad para desencadenar el proceso de RSI contra sigatoka negra mediante ensayos en planta en condiciones controladas

Dado que la inducción de resistencia frente a sigatoka negra fue un resultado positivo e inesperado hallado en el ensayo de campo, el siguiente paso consistió en analizar un mayor número de cepas de la colección, con el objeto de encontrar otras potencialmente útiles para la inducción de resistencia sistémica. Este ensayo se realizó en cámara de cultivo sobre plántulas de banano procedentes de cultivo *in vitro*, inoculando el patógeno y una selección de bacterias de la colección.

Para seleccionar las cepas a incluir en el ensayo, el criterio primario fue también la producción de sideróforos, ya que según García-Gutiérrez *et al.* (2012) y Djavaheri *et al.* (2012) la asimilación de sideróforos está ligada a la RSI. En consecuencia se seleccionaron las bacterias con valores más elevados y de signo positivo en el primer componente principal, el que más variabilidad recoge con respecto al parámetro de producción de sideróforos (Tabla 24). Dichas cepas, que son en total 17, están señaladas con un fondo de color beige en la Figura 39. Además se incluyeron otras cuatro cepas con baja expresión del carácter producción de sideróforos, dos de ellas con elevada producción de IAA, situadas por tanto en la parte más positiva del segundo componente principal, y otras dos con elevada actividad ACC desaminasa, y por tanto situadas en la parte más negativa del segundo componente principal. Por otra parte se eligieron otras cinco bacterias muy próximas al origen de coordenadas del diagrama bidimensional de componentes principales, y por tanto con una baja expresión de todas las capacidades PGP analizadas en el ACP. La razón de incluir en el estudio, además de las cepas con elevada producción de sideróforos, algunas con alta producción de IAA, otras con elevada actividad ACC desaminasa y también varias con bajos niveles de todas las propiedades PGP, fue obtener información sobre la relación entre las propiedades PGP *in vitro* y la inducción de resistencia sistémica contra sigatoka negra (Figura 39).

Figura 39: *Biplot* obtenido tras el ACP de cinco propiedades PGP de las cepas endofíticas no patógenas aisladas en la primera fase. Se han representado sobre los dos primeros CP los valores de los eigenvectores de las cinco propiedades PGP analizadas y las cepas, con el objetivo de elegir las cepas destinadas a los ensayos de selección de cepas potencialmente útiles como inductoras de resistencia frente a sigatoka negra.

Se encontraron seis cepas (RD_DARAB_07 *Bacillus* sp. cercana a *B. licheniformis*; RD_AZPIS_04 *Bacillus siamensis*, RD_MOSAB_04 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*; RD_MOSAB_02 *Rhizobium massiliae*; RD_AZPVI_11 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*; RD_MAELC_05 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) para las que el índice de severidad (IS) de la enfermedad no difirió del control negativo (sin inocular con el patógeno ni con bacterias), y por tanto puede afirmarse que inducen resistencia frente a sigatoka (Tabla 34). La cepa que mejor resultado proporcionó en el ensayo de campo (RD_MAAMIA_05, *Pseudomonas plecoglossicida*), presentó en cámara un IS de 0,46, significativamente más elevado que el del control negativo (0,18). El IS del control inoculado solamente con el patógeno fue 0,64 muy superior al del tratamiento con RD_MAAMIA_05 (0,46) pero a pesar de la diferencia numérica entre ambos valores, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. De este resultado se deduce que en condiciones de cámara de cultivo hay bacterias mejores que la RD_MAAMIA_05 en la inducción de resistencia frente al patógeno.

En el ensayo de cámara los resultados obtenidos con las bacterias del género *Bacillus*, concretamente del grupo RFLP XXVI y también con un *Rhizobium massiliae* (grupo RFLP XXXIX) superaron claramente a los obtenidos con *Pseudomonas*. Otros autores que han trabajado con RSI en banano, aunque no contra sigatoka (Rodríguez-Romero *et al.* 2008; Harish *et al.*, 2008, 2009; Fishal *et al.*, 2010) han encontrado como inductores de resistencia cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*. Hay que indicar que en el ensayo de campo no se incluyeron especies de *Bacillus*, sino solo *Pseudomonas*. Por tanto en futuras investigaciones se probarán en ensayos de campo las cepas que mejor resultado dieron en el ensayo de cámara, ya que existe potencial para mejorar los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 34: Prueba en cámara de cultivo sobre la inducción de resistencia contra sigatoka negra mediante bacterias PGPRs. Se presentan los valores medios alcanzados por diferentes parámetros indicadores de la incidencia de la enfermedad (Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas para $p < 0,05$ en la prueba de Tukey. inocular (Nivel de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns no significativo).

Tratamiento	Índice de severidad (IS)	Peso fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)	Altura (cm)
Control negativo (sin inocular)	0,18 a	152,12	19,43	23,90 abcde
RD_DARAB_07	0,31 ab	135,93	15,50	27,63 e
RD_AZPIS_04	0,32 ab	114,82	13,17	25,51 cde
RD_MOSAB_04	0,34 abc	85,95	9,86	23,40 abcde
RD_MOSAB_02	0,34 abc	102,75	14,51	22,43 abcde
RD_AZPVI_11	0,38 abcd	101,91	11,03	23,40 abcde
RD_MAE LC_05	0,38 abcd	99,89	11,95	23,20 abcde
RD_AZIDI_11	0,42 bcde	141,93	16,52	24,90 bcde
RD_MOSAA_03	0,42 bcde	133,07	15,77	25,50 cde
RD_MAAMIB_01	0,46 bcdef	141,15	16,69	26,40 de
RD_MAAMIA_05	0,46 bcdef	152,39	19,69	27,60 e
RD_MOCLA_09	0,49 bcdefg	92,20	10,07	22,00 abcde
RD_MAAMIA_01	0,49 bcdefg	114,65	14,31	25,20 cde
RD_MATFA_01	0,53 cdefgh	70,12	7,94	18,88 abcde
RD_MOSAA_06	0,53 cdefgh	113,91	18,44	25,85 cde
RD_DARAB_12	0,53 cdefgh	111,98	13,86	22,18 abcde
RD_MAAMIA_20	0,57 defgh	112,05	13,70	22,83 abcde
RD_AZPVI_10	0,57 defgh	121,64	14,68	23,16 abcde
RD_MAAMIA_18	0,57 defgh	92,13	10,63	20,72 abcde
RD_AZLTR_11	0,60 efgh	142,74	17,37	25,30 cde
RD_MOPEP_07	0,61 efgh	109,31	13,44	22,00 abcde
Control inoculado sigatoka	0,64 fgh	75,77	9,31	16,15 ab
RD_AZPVI_05	0,66 fgh	104,14	12,70	18,06 abcd
RD_MOPEP_05	0,66 fgh	69,94	8,44	17,21 abc
RD_MOLAP_04	0,68 gh	78,98	10,21	15,51 a
RD_MAAMIA_09	0,69 gh	61,13	7,57	15,73 a
RD_AZPRC_15	0,70 gh	86,09	11,85	18,06 abcd
RD_AZLTR_05	0,73 h	71,10	8,31	15,17 a
GL	27	27	27	27
Cuadrados medios	0,060	2113,522	36,923	43,329
F	13,760***	2,087 ns	2,383 ns	5,550***

Debido a la gran variabilidad interna de los resultados en cada uno de los tratamientos y para todos los parámetros analizados, el análisis de varianza no define grupos bien diferenciados (Tabla 34), de hecho 18 de las 26 cepas no difirieron estadísticamente del control inoculado con el hongo, en cuanto al IS, aunque sin embargo la dispersión de los valores medios es elevada, oscilando entre 0,31 y 0,72 en los tratamientos inoculados con bacterias.

En cuanto a los demás parámetros analizados, el peso de la parte aérea no presentó diferencias significativas entre tratamientos, ni entre éstos y los controles. En el caso de la altura si hubo diferencias significativas. En todos los casos la correlación entre IS y los demás parámetros fue negativa y significativa. En el caso de la altura la correlación fue altamente significativa ($p < 0,001$) y el índice de correlación de Pearson fue $-0,722$. En el caso del peso fresco y peso seco los valores fueron respectivamente $-0,572$ ($p = 0,001$) y $-0,488$ ($p < 0,01$). De estos resultados se desprende que la enfermedad no solamente reduce la biomasa de las plantas, sino también el crecimiento en altura de la misma.

De los resultados obtenidos se desprende que no hay una correlación entre las propiedades PGP *in vitro* y la RSI contra sigatoka negra. Por ejemplo la segunda mejor bacteria en inducción de resistencia sistémica (RD_AZPIS_04 *Bacillus siamensis*) no presenta ninguna propiedad PGP destacable, ya que se sitúa en la parte central del gráfico (Figura 39). Sin embargo otras cepas situadas en el gráfico en la misma zona no presentan inducción de resistencia frente a la enfermedad, como por ejemplo RD_AZLTR_11 (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) y RD_MOPEP_05 (*Bacillus aryabhattai*).

4.7. Discusión general

El uso de los microorganismos en agricultura como biofertilizantes no acaba de generalizarse a nivel mundial, pese a las buenas perspectivas que desde hace años se vienen vertiendo (Rodelas-González & González-López, 2013; Prashar *et al.*, 2014). En parte se debe a la inercia heredada de la Revolución Verde (RV) (1940-1970), que basó el desarrollo agrícola en la utilización de grandes cantidades de fertilizantes minerales y plaguicidas químicos de síntesis, aunque también en la obtención de variedades mejoradas, acelerando el desarrollo de la agricultura industrializada (Ortiz *et al.*, 2007; Stanger & Lauer, 2008). Por otra parte al estar los biofertilizantes y biocontroladores

basados en organismos vivos, éstos presentan adaptación diferencial a distintos hábitats, de manera que aquéllos que se adaptan bien a un determinado hábitat pueden no hacerlo en otros, lo que dificulta el diseño de un producto microbiano de validez universal y limita la generalización de su uso (Mulas *et al.*, 2013; Lucero *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha evidenciado gracias al desarrollo de las técnicas de metagenómica, que la RV ha supuesto la pérdida de la diversidad microbiana asociada a los agrosistemas, característica inherente a la agricultura industrializada. Esta circunstancia supone una pérdida de sostenibilidad del sistema agrario, ya que ha quedado demostrada la interdependencia entre plantas y microbiomas, lo que implica la necesidad de restaurar la diversidad microbiana de los agrosistemas para alcanzar su sostenibilidad (Lucero *et al.*, 2014).

Existen dos planteamientos fundamentales para restaurar el microbioma en agricultura. El primero consiste en adoptar aquellas prácticas de manejo que incrementen la abundancia y diversidad de microorganismos, como la optimización de las rotaciones de cultivo, la agricultura de precisión, la agricultura ecológica, el laboreo reducido o el control integrado (Stanger & Lauer, 2008; Dubey & Lal, 2009; Swaminathan, 2010). El segundo planteamiento, que es compatible con el primero, consiste en la introducción de microorganismos seleccionados, con efectos concretos y bien conocidos sobre el agrosistema, como por ejemplo la introducción de fijadores de nitrógeno o solubilizadores de fosfato, que mejoran la disponibilidad de nutrientes (Rodríguez & Fraga, 1999; Stanger & Lauer, 2008), los supresores del precursor del etileno (Glick, 2005; Glick *et al.*, 2007; Glick, 2014), o los biocontroladores e inductores de resistencia (Singh *et al.*, 2011; Bhattacharyya & Jha, 2012; Singh, 2013).

El presente trabajo estuvo destinado a realizar la investigación básica y aplicada que proporcione el fundamento necesario para la mejora del microbioma en el cultivo del banano en República Dominicana, con intención de extender las conclusiones a otros países del Caribe. Por esta razón se ha abordado en **primer lugar la caracterización de la diversidad microbiana cultivable asociada a plantaciones ecológicas de banano**. No se ha abordado la caracterización de la biodiversidad total mediante técnicas de metagenómica, porque el fin último es el de desarrollar biofertilizantes y biocontroladores, lo que debe realizarse con bacterias cultivables. Al haber trabajado en plantaciones de banano que llevan más de una década en sistema de explotación

ecológica, la biodiversidad ha de ser teóricamente más elevada que la que se podría encontrar en plantaciones convencionales, ya que este último sistema suele conducir a la pérdida de la diversidad del microbioma (Couch *et al.*, 2005; Doebley *et al.*, 2006; Eyre-Walker *et al.*, 1998). No obstante hemos aceptado que existe mayor biodiversidad de los microorganismos en el sistema ecológico, sin realizar una comparativa entre ecológico y convencional, ya que excedía los objetivos del trabajo.

La investigación realizada no se ha quedado en la caracterización de la biodiversidad microbiana cultivable, sino que también ha abordado en **segundo lugar el desarrollo de biofertilizantes, y biocontroladores de sigatoka negra**, para lo que se han seleccionado y probado en planta, y en condiciones de campo, varias de las cepas aisladas.

En cuanto al **aislamiento y caracterización del microbioma del cultivo del banano**, se aislaron 262 cepas bacterianas asociadas a la raíz de dicho cultivo, incluyendo endofíticas y rizosféricas. El trabajo ha tenido también entre sus objetivos seleccionar el procedimiento molecular más adecuado para la identificación de los aislados con el menor número posible de secuenciaciones, en los casos en los que como en el presente, el número de aislados es elevado. Para ello de las 262 cepas, a 114 se les secuenció el gen 16S rRNA, con el objeto de comprobar qué técnica molecular preliminar era más adecuada para agrupar los aislados a niveles taxonómicos admitidos (especie o subespecie). De esta manera en nuevos trabajos de esta naturaleza se aplicaría dicha técnica preliminar, secuenciando posteriormente el gen 16S rRNA solo en un representante de cada grupo. De las diversas técnicas preliminares, en esta investigación se trabajó con los RAPD (Igual *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2011a, 2011b; Koeck *et al.*, 2014) y los RFLP del gen 16S rRNA amplificado mediante PCR (PCR-RFLP) (Osborn *et al.*, 2000; Igual *et al.*, 2006), obteniendo los mejores resultados con la técnica PCR-RFLP, si bien no permite agrupar a nivel de especie o subespecie, sino a nivel de género, y en algunos casos de grupos de géneros afines. Por eso se ha propuesto como alternativa aplicar primero la técnica de PCR-RFLP y a continuación la técnica RAPD en los aislados con el mismo modelo PCR-RFLP, si bien en ocasiones diferentes cepas de la misma especie presentan patrones RAPD muy diferentes.

Se encontraron bacterias pertenecientes a 20 géneros diferentes, lo que convierte a este trabajo en el que más biodiversidad genérica ha encontrado en cultivos de

banano. En nuestro trabajo los géneros mayoritarios en número de aislados fueron *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*. Es destacable que hubo pocas diferencias en la biodiversidad microbiana de las cuatro provincias analizadas pese a estar situadas en lugares distantes, teniendo en cuenta que las distancias al tratarse de una isla como la Española no son grandes.

La caracterización continuó con el análisis *in vitro* de varias propiedades que poseen las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y que son las más estudiadas en este tipo de trabajos (Pandey *et al.*, 2013; Gururani *et al.*, 2013) como la producción de IAA, la solubilización de fosfato mineral, la producción de sideróforos, la actividad ACC desaminasa, la fijación biológica de nitrógeno y la inducción de resistencia frente al ataque de patógenos.

Los **análisis sobre planta en invernadero y en campo** se realizaron con los aislados de la primera fase (114 sobre 262), ya que por cuestiones de limitación de tiempo y económicos no se pudo realizar con los de la segunda. La selección de bacterias para ensayos en planta se realizó en base al análisis de sus propiedades PGP *in vitro*, priorizando la producción de sideróforos, y en segundo lugar la producción de IAA y la actividad ACC desaminasa. Como consecuencia de la aplicación de estos criterios se seleccionaron bacterias del género *Pseudomonas*. Existen numerosas referencias bibliográficas sobre las propiedades PGP de este género, lo que le convierte en uno de los más utilizados en el desarrollo de biofertilizantes y biocontroladores de diversos cultivos: Habibi *et al.* (2014) aislaron especies del género *Pseudomonas* con capacidad para producir IAA, fijar nitrógeno y solubilizar fosfato; Zafar-ul-Hye *et al.* (2014) aislaron especies con actividad ACC desaminasa; García-Gutiérrez *et al.*, (2012) obtuvieron especies productoras de IAA, sideróforos y con actividad anitfúngica; Arruda *et al.* (2014) aislaron especies de *Pseudomonas* productoras de IAA, solubilizadoras de fosfato y productoras de sideróforos; Prasanna Kumar *et al.* (2014) encontraron especies productoras de IAA, solubilizadoras de fosfato y productoras de sideróforos.

Los resultados obtenidos al inocular en **vivero** plántulas de banano, con el objeto de producir planta comercial para trasplante, indican que con dos cepas de *P. plecoglossicida* se produjo un aumento de la biomasa tanto aérea como radicular frente a un testigo sin inocular, lo que concuerda con los resultados de Rodríguez-Romero *et al.* (2008) con otra especie de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*). En el ensayo de **producción de fruta en campo**, una cepa de *P. taiwanensis* y una de las de *P.*

plecoglossicida que mejor resultado dieron en vivero, produjeron un mayor rendimiento del cultivo frente a un testigo sin inocular, resultados comparables a los de Kavino *et al.* (2010) con *P. fluorescens*.

En este trabajo además se observó que algunos aislados mayoritariamente pertenecientes al género *Bacillus* fueron capaces de reducir la incidencia de *Mycosphaerella fijiensis* (sigatoka negra) en condiciones de cámara de cultivo, superando a *Pseudomonas plecoglossicida*, que en campo dio buenos resultados de biocontrol. Estos resultados son innovadores puesto que los trabajos de control biológico en banano se han realizado sobre otros patógenos, como por ejemplo nematodos (Rodríguez-Romero *et al.*, 2008) y *Fusarium oxysporum* (Fishal *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2014).

En conclusiva el presente estudio muestra los beneficios de la utilización de bacterias PGPRs en el cultivo de banano. La tecnología de las PGPR es de gran utilidad en los países con menos desarrollo tecnológico como es el caso de República Dominicana, por tratarse de tecnología de bajo coste de desarrollo y producción, que puede implementarse con los recursos locales (Mulas *et al.*, 2013; Díaz-Alcántara *et al.*, 2014b). El presente trabajo ha formado parte de un programa financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) que tuvo como objetivo dotar a este país con tecnología agraria de bajo coste alternativa a los productos químicos de síntesis. Dentro de este programa se han formado tres doctores, y se ha dotado un laboratorio de investigación en la Universidad Autónoma de Santo Domingo (Díaz-Alcántara *et al.*, 2013, 2014b). La siguiente fase de la investigación de biofertilizantes y biocontroladores en banano está relacionada con la formulación de los productos, consistente en el ingrediente activo que es el microorganismo, junto con un soporte adecuado y ciertos aditivos, con la finalidad de estabilizar y proteger las células microbianas frente a agentes ambientales perjudiciales, manteniendo o mejorando de este modo la actividad de los microorganismos en el suelo (Deaker *et al.*, 2004; Herrmann & Lesuer, 2013). Esta fase está ya avanzada y por el momento el grupo se encuentra a la espera de que se resuelva la concesión de una financiación ya solicitada a AECID para el escalado de la producción de los productos seleccionados en este proyecto. Sin embargo paralelamente deben abordarse las pruebas en planta en vivero y en campo de una selección de los 148 aislados de la segunda fase, tanto para biofertilización como biocontrol de sigatoka negra.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones

A continuación se presentan las conclusiones según el orden de los resultados obtenidos en la presente tesis:

1. Los 262 aislados fueron caracterizados respecto a 5 propiedades *in vitro* relacionadas con el efecto promotor del crecimiento vegetal (producción de IAA y sideróforos, actividad ACC desaminasa, solubilización de fosfato, y fijación de N en vida libre), observando que en la mayor parte de los casos se trata de caracteres dependientes de cepa y no ligados a determinados grupos taxonómicos, si bien existen ciertas tendencias a que algunas propiedades se expresen con mayor intensidad en ciertos grupos, como por ejemplo la producción de IAA en los géneros *Pseudomonas* o *Enterobacter* y la fijación de N en vida libre en *Bacillus*.
2. Ciento catorce aislados de origen rizosférico y endofítico fueron sometidos a secuenciación del gen 16S rRNA, de los cuales 66 fueron identificados a nivel de especie, perteneciendo a 35 especies de 20 géneros diferentes, indicando que la biodiversidad asociada a la raíces de banano es superior a la que se había descrito hasta el momento. Los géneros mayoritarios fueron *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*.
3. Como técnica previa de agrupación de aislados, la técnica PCR-RFLP del gen 16S rRNA agrupa a éstos de manera más coherente que los RAPD. No obstante, la utilización de PCR-RFLP como única técnica de agrupamiento previo no permite discernir a nivel de especie, sino de género y a veces de grupos de géneros afines taxonómicamente, por lo que podrían utilizarse los RAPD como técnica secundaria de agrupación dentro de los grupos PCR-RFLP, aunque con frecuencia los RAPD sobrestiman el número de especies, al ser dependientes de cepa, y presentar distintas cepas patrones muy diferentes.
4. El análisis matemático de los modelos PCR-RFLP para el conjunto de aislados, revela que la mayor parte de la diversidad se encuentra dentro de las localidades de muestreo (86 %) y tan solo un 14 % entre las mismas, no existiendo prácticamente diferencias en el índice H de diversidad genética entre localidades, lo que indica que las diferentes condiciones agroecológicas tuvieron poca influencia en la diversidad bacteriana. Esto se explica porque a

- pesar de la distancia física entre localidades dentro de la isla, el carácter insular reduce las diferencias en las condiciones agroecológicas.
5. En este trabajo se han aislado algunas cepas asociadas a las raíces del banano que presentan una elevada expresión de alguna propiedad PGP *in vitro*, y que por tanto son potenciales PGPRs, aunque no habían sido citadas como tales previamente. Entre otras destacan las especies *Pseudochrobactrum asaccharolyticum*, *P. saccharolyticum*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, y *Ochrobactrum pseudogrignonense*; también se han hallado cepas filogenéticamente muy próximas a las especies *Bacillus sonorensis*, *B. aerophilus*, *B. gottheilii*, *B. sonorensis*, *B. subtilis* subsp. *Inaquosorum*; *Pseudoxanthomonas indica* y *Burkholderia diffusa*.
  6. Diferentes especies de los géneros *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Leclercia* y *Pseudomonas* ejercen una fuerte acción antagónica *in vitro* sobre el crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis*.
  7. Las cepas RD_MAAMIA_05 y RD_AZPVI_05 identificadas como *Pseudomonas plecoglossicida* presentaron los mejores resultados como PGPR en los ensayos de producción de planta para trasplante (vivero) y de producción de fruta en campo, por lo que se propone su utilización para la elaboración de un biofertilizante. Además RD_MAAMIA_05 redujo el ataque de sigatoka negra en campo, lo que se atribuyó a fenómenos de resistencia sistémica inducida.
  8. Algunas cepas con bajos niveles de expresión *in vitro* de las propiedades PGP, indujeron resistencia sistémica a las plantas de banano frente a *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones contraladas, por lo que podría decirse que no existe una correlación entre las propiedades PGP y la resistencia sistémica inducida contra este patógeno.
  9. La homogeneidad de las poblaciones bacterianas entre diferentes localidades productoras de banano ecológico en República Dominicana, permitirá desarrollar productos microbianos basados en las cepas seleccionadas, con una alta probabilidad de adaptación a los diferentes agrosistemas productores de banano en Dominicana, y probablemente en otras zonas del Caribe.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.E., Nafady, N.A., Khalaf, D.M. & Morsy, m. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*. 169: 49-58.
- Abreu, I., Reguera, M., Bonilla, A. & Bolaños, L. & Bonilla, I. (2013). Mineral nutrition in the legume-rhizobia nitrogen fixing symbiosis. In: *Beneficial plant-microbial Interactions*, pp 122-140. Rodelas González, M. B., González-López, J. (eds).
- Acuña, J.J., Jorquera, M.A., Barra, P.J., Crowley, D.E. & Mora, M.L. (2013). Selenobacteria selected from the rhizosphere as a potential tool for Se biofortification of wheat crops. *Biology and Fertility of Soils*. 49: 175-185.
- Adesemoye, A. & Kloepper, J. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1-12.
- Adesemoye, A.O., Torbert, H.A. & Kloepper, J.W. (2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 876-886.
- Aert, R., Sagi, L. & Volckaert, G. (2004). Gene content and density in banana (*Musa acuminata*) as revealed by genomic sequencing of BAC clones. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 129-139.
- Ahemad, M. & Mulugeta, K. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*. 26: 1-20.
- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan M.S. (2008). Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 263: 173-181.
- Akila, R., Rajendran, L. Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*. 57: 175-183.
- Alexander D.B. & Zuberer D.A. (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 12: 39-45.
- Ali, S.W., Yu, F.B. & Haider, M.S. (2013). Phenotypic and phylogenetic characterization of an abamectin-degrading bacterial strain isolated from a citrus orchard. *Journal of General and Applied Microbiology*. 59: 215-225.

- Altieri, M.A. (1999). The Ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74: 19-31.
- Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F., Vargas, L. & Passaglia, L. P. (2012). Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and Soil*. 356: 245-264.
- Andersen, K. & Winding, A. (2004). Non-target effects of bacterial biological control agents on soil protozoa. *Biology and Fertility of Soils*. 40: 230-236.
- Anderson, I., Sorokin, A., Kapatral, V., Reznik, G., Bhattacharya, A., Mikhailova, N. ... Ivanova, N. (2005). Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 250: 175-184.
- Andrade, L.F., de Souza, G.L., Nietzsche, S., Xavier, A.A., Costa, M.R., Cardoso, A., Toledo, M.C. & Pereira, D.F. (2014). Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*. 52: 27-34.
- Andreote, F.D., Nunes da Rocha, U., Luiz Araújo, W., Azevedo, J.L. & van Overbeek, L.S. (2010). Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek*. 97: 389-399.
- Anyasi, T A., Jideani, A.I.O. & Mchau, G.R.A. (2013). Functional properties and postharvest utilization of commercial and noncommercial banana cultivars. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 509-522.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P. & Pilkauskas, P. (2004). La economía mundial del banano 1985-2002. pp 1-91.
- Armecin, R.B. & Gabon, F.M. (2008). Biomass, organic carbon and mineral matter contents of abaca (*Musa textilis* Neé) at different stages of growth. *Industrial Crops and Products*. 28: 340-345.
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., Passaglia, L.M.P. & Vargas, L.K. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*. 63: 15-22.

- Arun, B., Gopinath, B. & Sharma, S. (2012). Plant growth promoting potential of bacteria isolated on n free media from rhizosphere of *Cassia occidentalis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 2849-2857.
- Asghar, H.N., Zahir, Z.A. & Arshad, M. (2004). Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*. 55: 187-194.
- Aurore, G., Parfait, B. & Fahrasmane, L. (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends in Food Science and Technology*. 20: 78-91.
- Babana, A.H. & Antoun, H. (2007). Effects of tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in mali. *Developments in Plant and Soil Sciences*. 102: 51-58.
- Bal, H., Nayak, L., Das, S. & Adhya, T. (2013). Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and Soil*. 366: 93-105.
- Ball, T., Vrydaghs, L., Van Den Hauwe, I., Manwaring, J. & De Langhe, E. (2006). Differentiating banana phytoliths: wild and edible *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Journal of Archaeological Science*. 33: 1228-1236.
- Barazani, O. & Friedman, J. (2000). Effect of exogenously applied l-tryptophan on allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Chemical Ecology*. 26: 343-349.
- Barea, J.M., Azcón, R. & Azcón-Aguilar C. (2004). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. In: *Plant Surface Microbiology*, pp 351-371. Heidelberg, Germany. Varma, A, abbott, L., Werner, D, Hampp, R. (eds).
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1761-1778.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S. & Kalra, A. (2012). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 58: 227-235.

- Baróg, P. & Grzebisz, W. (2004). Effect of timing and nitrogen fertilizer application on winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). I. Growth dynamics and seed yield. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 190: 305-313.
- Barrera, J.L., Cayón, G. & Robles, J. (2009). Influencia de la exposición de las hojas y el epicarpio de frutos sobre el desarrollo y la calidad del racimo de plátano "Hartón" (*Musa* AAB Simmonds). *Agronomía Colombiana*. 27: 6.
- Barrera-Violeth, J.L., Guerra-Hernández, K.J. & Mizger-Pacheco, M.L. (2011). Efectos de dos sistemas de producción en el contenido de minerales en el fruto de *Musa* AAB Simmonds. *Acta Agronómica*. 60: 355-360.
- Barret, M., Morrissey, J.P. & O'Gara, F. (2011). Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biol Fertil Soils* 47:729-743.
- Bashan, Y. & de-Bashan, L.E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Advances in Agronomy*. 108: 77-136.
- Belimov, A.A., Dodd, I.C., Safronova, V.I., Dumova, V.A., Shaposhnikov, A.I., Ladatko, A.G. & Davies, W.J. (2014). Absciscic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in plant and alter plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*. 74: 84-91.
- Bellamy, A. (2013). Banana production systems: identification of alternative systems for more sustainable production. *Ambio*. 42: 334-343.
- Beneduzi, A. & Passaglia, L.M.P. (2011). Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting bacilli. In: *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses*, pp 1-20. Maheshwari, D.K. (ed).
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L.M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. 35: 1044-1051.
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P.B., Vargas, L.K., Lisboa, B.B., Favreto, R., Baldani, J.I. & Passaglia, L.M.P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied soil Ecology*. 63: 94-104.

- Bennett, B. & Prance, G. (2000). Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of northern south America. *Economic Botany*. 54: 90-102.
- Bennett, R.S. & Arneson, P.A. (2003). *Sigatoka negra*. Spanish translation by Robert J. Knight, Jr. 2005. *The Plant Health Instructor*.
- Berlec, A. (2012). Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics. *Plant Science*. 193-194: 96-102
- Bezerra, C.V., Amante, E.R., de Oliveira, D.C., Rodrigues, A.M.C. & Da Silva, L.H.M. (2013). Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed-effect of drying on physico-chemical, functional and morphological characteristics of the starch. *Industrial Crops and Products*. 41: 241-249.
- Bhattacharyya, P.N. & Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 1327-1350.
- Bisht, S.C., Mishra, P.K & Joshi, G.K. (2013). Genetic and functional diversity among root-associated psychrotrophic *Pseudomonad*'s isolated from the Himalayan plants. *Archives of Microbiology*. 195: 605-615.
- Borges, M.H., Alves, D.L., Raslan, D.S., Piló-Veloso D., Rodrigues, V.M., Homsí-Brandeburgo M.I. & de Lima, M.E. (2005). Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (*Musaceae*) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology*. 8-98: 21-9.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C. & Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*. 30: 449-462.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brooke, J.S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 25: 2-41.
- Cabello-Conejo, M.I., Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Monterroso, C., Saavedra-Ferro, A., Mench, M. & Kidd, P.S. (2014). Rhizobacterial inoculants can improve nickel

- phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. *Plant Soil*. 379: 35-50.
- Câmara Leite, H.A., Barbosa Silva, A., Pinto Gomes, F., Peres Gramacho, K., Cláudio Faria, J., Teodoro de Souza, J. & Lopes Loguercio, L. (2013). *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 2639-2651.
- Canto-Canché, B., Guillén-Maldonado, D.K., Peraza-Echeverría, L., Conde-Ferráez, L. & James-Kay, A. (2007). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of the causal agent of black sigatoka fungal leaf spot disease of banana and plantain, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Biotechnology*. 36: 64-70.
- Carlier J., De Waele, D. & Escalant, J.V. (2002). Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos: evaluación de comportamiento. En: *Guías técnicas INIBAP 6. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano*, pp 1-68. Vézina, A., Picq, C. (eds).
- Carmona-García, R., Sánchez-Rivera, M.M., Méndez-Montealvo, G., Garza-Montoya, B. & Bello-Pérez, L. A. (2009). Effect of the cross-linked reagent type on some morphological, physicochemical and functional characteristics of banana starch (*Musa paradisiaca*). *Carbohydrate polymers*. 76: 117-122.
- Castillo-López, E., Clark, K.J., Paz, H.A., Ramírez Ramirez, H.A., Klusmeyer, T.H., Hartnell, G.F. & Kononoff, P.J. (2014). Performance of dairy cows fed silage and grain produced from second-generation insect-protected (*Bacillus thuringiensis*) corn (MON 89034), compared with parental line corn or reference corn. *Journal of Dairy Science*. 97: 3832-3837.
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J., Argel, L., Uribe-Velez, D. ... Villegas, V. (2012). Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology*. 64: 641-653.
- CEI-RD. (2008). Centro de Exportación e Inversión de la República Dominicana. Perfil económico de productos orgánicos en República Dominicana.

- CEI-RD. (2013). Centro de Exportación e Inversión de la República Dominicana. Visita a las instalaciones 16/12/2013.
- Chen, L., Dodd, I.C., Theobald, J.C., Belimov, A.A. & Davies, W.J. (2013). The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *Journal of Experimental Botany*. 64: 1565-1573.
- Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y. ... & Zeng, G. (2010). Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology*. 46: 383-389.
- Chen, Y. & Hu, X. (2013). High-throughput detection of Banana Bunchy Top Virus in banana plants and aphids using real-time Taqman (R) PCR. *Journal of Virological Methods*. 193: 177-83.
- Chopra, L., Singh, G., Choudhary, V. & Sahoo, D.K. (2014). Sonorensin: An antimicrobial peptide, belonging to heterocycloanthracin subfamily of bacteriocins, from a new marine isolate *Bacillus sonorensis* MT93. *Applied and Environmental Microbiology*. 80: 2981-2990.
- Chuc-Uc, J., Brito-Argáez, L., Canto-Canché, B., Tzec-Simá, M., Rodríguez-García, C., Peraza-Echeverría, L. ... Islas-Flores, I. (2011). The In vitro secretome of *Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49: 572-578.
- Coelho, M.R.R., von der Weid, I., Zahner, V. & Seldin, L. (2003) Characterization of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of part of genes encoding 16S rRNA and 23S rRNA and by multilocus enzyme electrophoresis. *FEMS Microbiol Letters* 222:243-250
- Contesto, C., Desbrosses, G., Lefoulon, C., Béna, G., Borel, F., Galland, M. ... Touraine, B. (2008). Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Science*, 175: 178-189.
- Couch, B.C., Fudal, I., Lebrun, M.H., Tharreau, D., Valent, B., Van Kim, P., Notteghem, J.L. & Kohn, L.M. (2005). Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics*. 170: 613-630.

- Crouch, H.K., Crouch, J.H., Madsen, S., Vuylsteke, D.R. & Ortiz, R. (2000). Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., AAB group). *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 1056-1065.
- Cruz-Cruz, C. A., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F. & Peña-Rodríguez, L.M. (2011). Physiological effects of the hydrophilic phytotoxins produced by *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black sigatoka in banana plants. *Journal of General Plant Pathology*. 77: 93-100.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. & Dowson, C.G. (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 5644-5649.
- D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J., Baurens, F., Carreel, F., Garsmeur, O. ... Wincker, P. (2012). The Banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*. 488: 213-217.
- Daniells, J., Jenny, C., Karamura D. & K. Tomekpe. (2001). Musalogue: A catalogue of *Musa* germplasm. In: *Diversity in the genus Musa*, pp 1-201. Compil International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. Arnaud., Sharrock, S. (eds)
- Dawwam, G.E., Elbeltagy, A., Emara, H.M., Abbas, I.H. & Hassan, M.M. (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science*. 58: 195-201.
- De Felipe, M.R. (2006). Fijación de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En: *Fijación de nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones*, pp 9-16. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Bedmar, E.J., González, J., Luch, C., Rodelas, B. (eds).
- De la Torre-Gutiérrez, L., Chel-Guerrero, L.A. & Betancur-Ancona, D. (2008). Functional properties of square banana (*Musa balbisiana*) starch. *Food Chemistry*. 106: 1138-1144.
- De Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Costa, P., Meyer, J., Vargas, L.K., Schoenfeld, R. & Passaglia, L. P. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in Southern Brazilian fields. *Plant and Soil*. 366: 585-603.

- De Torres, J., Garzón, E., Ryan, J. & González-Andrés, F. (2013). Organic cereal/forage legume rotation in a Mediterranean calcareous soil: Implications for Soil Parameters. *Agroecology and Sustainable Food Systems*. 37-2: 215 - 230.
- De Vleeschauwer, D., Djavaheri, M., Bakker, P.A.H.M. & Hofte, M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiology*. 148: 1996-2012.
- Deaker, R., Roughley, R.J. & Kennedy, I.R. (2004). Legume seed inoculation technology: a review. *Soil Biology and Biochemistry*. 36, 1275-1288.
- Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum*. 100: 561-566.
- Díaz-Alcántara, C.A., Ramírez-Bahena, M.H., Mulas, D., García-Fraile, P., Gómez-Moriano, A., Peix, A., Velázquez, E. & González-Andrés, F. (2014a). Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. *Systematic and Applied Microbiology*. 37: 149-156.
- Díaz-Alcántara, C.A., Vicioso-Alcalá, A.F. Pimentel-Pujols, A., Marcano, I.E., Rivas, R., González, Urbano López de Meneses, B., Velázquez Pérez, E. & González-Andrés, F. (2013). Experiencia de cooperación interuniversitaria para la formación de personal investigador en el desarrollo de biofertilizantes agrícolas en República Dominicana. *VI Congreso Universidad y Cooperación al Desarrollo. Línea Temática I: Desarrollo Humano*.
- Díaz-Alcántara, C.A., Vicioso-Alcalá, A.F., Urbano López de Meneses, B., Rivas, R., Velázquez, E., Terrón, A. & González-Andrés, F. (2014b). Programa de generación de capacidades para el diseño y aplicación de Tecnología Apropriada en la agricultura de República Dominicana: Biofertilizantes y productos de biocontrol basados en microorganismos. En: *Investigación agraria para un desarrollo sostenible: análisis de casos internacionales*, pp 37-65. González-Andrés, F., Urbano López de Meneses, B. (eds).
- Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009.
- Djavaheri, M., Mercado-Blanco, J., Versluis, C., Meyer, J.M., Van Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M. (2012). Iron-regulated metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* WCS374r

- are not required for eliciting induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Arabidopsis. *Microbiology Open*. 1: 311-325.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22: 107-149.
- Doebley, J., Gaut, B. & Smith, B., (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1321.
- Doležel, J., Doleželová, M. & Novák, F.J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*. 36: 351-357.
- Dubey, A. & Lal, R. (2009). Carbon footprint and sustainability of agricultural production systems in Punjab, India, and Ohio, USA. *Journal of Crop Improvement*. 23: 332-350.
- Durán, D., Rey, L., Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Imperial, J. & Ruiz-Argüeso, T. (2013). Biodiversity of slow-growing rhizobia: the genus *Bradyrhizobium*. In: *Beneficial plant-microbial Interactions: Ecology and Applications*, pp 20-46. Rodelas González, M.B., González-López, J. (eds).
- Dworkin, M., & Foster, J.W. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*. 75: 592-603.
- Elsen, A., Stoffelen, R., Thi Tuyet, N., Baimey, H., Dupré de Boulois, H. & De Waele, D. (2002). In vitro screening for resistance to *Radopholus Similis* in *Musa* spp. *Plant Science*. 163: 407-416.
- Esashi, Y., Maruyama, A., Sasaki, S., Tani, A. & Yoshiyama, M. (1996). Involvement of cyanogens in the promotion of germination of cocklebur seeds in response to various nitrogenous compounds, inhibitors of respiratory and ethylene. *Plant and Cell Physiology*. 37: 545-549.
- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M. & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*. 124: 62-66.
- Esmaili, A., Pourbabaee, A.A., Alikhani, H.A., Shabani, F. & Esmaili, E. (2013). Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil. *Plos One*. 8: 1-10.

- Etebu, E., Pasberg-Gauhl, C., Gauhl, F. & Daniel-Kalio, L. (2003). Preliminary studies of in vitro stimulation of sexual mating among isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black sigatoka disease in bananas and plantains. *Phytoparasitica*. 31: 69-75.
- Eyre-Walker, A., Gaut, R.L., Hilton, H., Feldman, D.L. & Gaut, B.S., (1998). Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95: 4441-4446.
- Fang, M, Kreme, R.J., Motavalli, P.P. & Davis, G. (2005). Bacterial diversity of rhizospheres of non-transgenic and transgenic corn. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 4132-4136.
- FAO. (1999). Cultivos tropicales: Banano, piña, tembe para palmito, cítricos. <http://www.fao.org/docrep/009/ah646s/ah646s06.htm>. Consultada el 20/03/2014.
- FAO. (2012). Crece la producción y la exportación de banano en la República Dominicana. <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/127976/>. Consultada el 08/02/2014.
- FAO. (2013). República Dominicana y la Unión Europea firman convenio para fortalecer industria bananera. <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/179989/>. Consultada el 10/02/2013.
- FAO. (2014a). México y Centroamérica incrementaron sus exportaciones de banana. <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/213692/>. Consultada el 18/02/2014.
- FAO. (2014b). Centroamérica y República Dominicana aumentan la superficie de cultivos orgánicos. <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/213908/>. Consultada el 14/02/2014.
- FAO. (2014c). Crop water information: Banana. http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_banana.html. Consultada el 01/04/2014.
- FAO. (2014d). Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Market and Policy Analyses of Raw Materials, Horticulture and Tropical (RAMHOT) Products Team, Roma. 33 pp. Acceso: <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>. Consultada el 18/02/2014.
- FAO/CCI/CTA. (2001). Los mercados mundiales de frutas y verduras orgánicas. Centro de Comercio Internacional, Centro Técnico para la Cooperación Agrícola y Rural,

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/docrep/004/y1669s/y1669s00.htm#Contents>. Consultada el 03/04/2014.
- Farina, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., De Campos, S.B., Brito Lisboa, B., Wendisch, V., Vargas, L.K. & Passaglia, L.M.P. (2012). Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Applied Soil Ecology*. 55: 44-52.
- Ferreira, C.F., Oliveira Silva, S., Damasco Sobrinho, N.P., Santana, Damascena, S.C.S., Alves, F.S. de A.A.O. & Pereira Da Paz, O. (2004). Molecular characterization of banana (AA) diploids with contrasting levels of black and yellow sigatoka resistance. *American Journal of Applied Sciences*. 1: 276-278.
- Fierer, N. & Jackson, R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Current Issue*. 103: 626-631.
- Fishal, E.M.M., Meon, S. & Yun, W.M. (2010). Induction of tolerance to *Fusarium* wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible berangan banana pre-inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). 9: 1140-1149.
- Fortescue, J.A. & Turner, D.W. (2005a). The Association between low temperatures and anatomical changes in preanthetic ovules of *Musa* (Musaceae). *Scientia Horticulturae*. 104: 433-444.
- Fortescue, J.A. & Turner, D.W. (2005b). Growth and development of ovules of banana, plantain and enset (Musaceae). *Scientia Horticulturae*. 104: 463-478.
- Fortescue, J.A. & Turner, D.W. (2005c). The Occurrence of a micropylar exudate in *Musa* and *Enset* (Musaceae). *Scientia Horticulturae*. 104: 445-461.
- Fortescue, J.A. & Turner, D.W. (2005d). The anatomy of ovule ontogeny of banana, plantain and enset (Musaceae). *Scientia Horticulturae*. 104: 479-492.
- Gaonkar, T. & Bhosle, S. (2013). Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. *Chemosphere*. 93: 1835-1843
- García-Fraile, P. (2008). Identificación y caracterización de bacterias que nodulan *Phaseolus* en diferentes regiones de España. Tesis Doctoral.

- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M.H., Flores-Félix, J.D., Fernández, M.T. ... Velázquez, E. (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *Plos One*. 7: 1-7.
- García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, a., Rivas, R., González Andrés, F. & Velázquez, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* is nodulated in Northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two nodC alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeography and evolutionary implications. *Canadian Journal of Microbiology*. 56: 657-66.
- García-Gutiérrez, L., Romero, D., Zerrouh, H., Cazorla, F., Torés, J., de Vicente, A. & Pérez-García, A. (2012). Isolation and selection of plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. *Plant and Soil*. 358: 201-212.
- Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A. & Young, J.P.W. (2001). Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 2037-2058.
- Ghosh, P.K., Saha, P., Mayilraj, S. & Maiti, T.K. (2013). Role of IAA metabolizing enzymes on production of IAA in root, nodule of *Cajanus cajan* and its PGP *Rhizobium* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2: 234-239.
- Ghosh, S. & Basu, P.S. (2006). Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Microbiological Research*. 161: 362-366.
- Ghosh, U., Subhashini, P., Dilipan, E., Raja, S., Thangaradjou, T. & Kannan, L. (2012). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from seagrass rhizosphere soil. *Journal of Ocean University of China*. 11: 86-92.
- Glick, B.R. (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 56: 291-312.
- Glick, B.R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 251: 1-7.
- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 169: 30-39.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In: *New Perspectives and Approaches in Plant*

- Growth-promoting Rhizobacteria Research*, pp. 329-339. Bakker, P.A.H. M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M., Lemanceau, P., Cooke, B.M. (eds).
- Gomathy, R., Vijayalekshmi, N.R. & Kurup, P.A. (1989). Hypolipidemic principle of the inflorescence stalk of plantain (*Musa sapientum*). *Journal of Biosciences*. 14: 301-309.
- González-Andrés, F., Mulas, D., Morán, A., Menacho, S., Garcia, P. & Velázquez, E. (2007). Fertilizantes alternativos adaptados a las nuevas tendencias de la agricultura. *Tierras de Castilla y León. Agricultura*. 139: 26-32.
- Good, A.G. & Beatty, P.H. (2011). Fertilizing nature: A tragedy of excess in the commons. *PLoS Biology*. 9: 1-9.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P. & Thakker, J.N. (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*. 169: 66-75.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Gaikwad, K. & Annapurna, K. (2008). Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. *Current Microbiology*. 57: 312-317.
- Gowdhaman, D., Manaswini, V.S., Jayanthi, V., Dhanasri, M., Jeyalakshmi, G., Gunasekar, V., Sugumaran, K.R. & Ponnusami V. (2014). Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 64: 90-98.
- Greenfield, R.A & Bronze, M.S. (2003). Prevention and treatment of bacterial diseases caused by bacterial bioterrorism threat agents. *Drug Discovery Today*. 8: 881-888.
- Gumiere, T., Ribeiro, C.M., Figueiredo Vasconcellos, R.L. & Nogueira Cardoso, E.J.B. (2014). Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) and Slash Pine (*Pinus elliottii*). *Antonie van Leeuwenhoek*. 105: 663-669.
- Gururani, M., Upadhyaya, C., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A. & Park, S. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 32: 245-258.

- Gururani, M., Upadhyaya, C., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A. & Park, S. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 32: 245-258.
- Guzmán Piedrahita, O.A. (2011). El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne) del banano y plátano. *Luna Azul*. 33: 137-153.
- Haas, D. & Keel, C. (2003). Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing *Pseudomonas* spp. and Relevance for Biological Control of Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology*. 41: 117-153.
- Habibi, S., Djedidi, S., Prongjunthuek, K., Mortuza, M.F., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto H. & Yokoyoma, T. (2014). Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant and Soil*. 379: 51-66.
- Hakkinen, M., & Wang, H. (2008). *Musa zaifui* sp nov (*Musaceae*) from Yunnan, China. *Nordic Journal of Botany*. 26: 42-46.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Harish, S. Kavino, M., Kumar, N. Balasubramanian, P. & Samiyappan, R. (2009). Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*. *Biological Control*. 51: 16-25.
- Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianathasundaram, K. & Samiyappan, R. (2008). Biohardening with Plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana Bunchy Top Virus. *Applied Soil Ecology*. 39: 187-200.
- Harper, G. & Hull, R. (1998). Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. *Virus Genes*. 17: 271-278.
- Harper, G., Hart, D., Moulton, S. & Hull, R. (2004). Banana streak virus is very diverse in Uganda. *Virus Research*. 100: 51-56.
- Hassan, M.N., Afghan, S. & Hafeez, F.Y. (2010). Suppression of red rot caused by *Colletotrichum falcatum* on sugarcane plants using plant growth-promoting rhizobacteria. *BioControl*. 55: 531-542.

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*. 60: 579-598.
- Hayat, R., Sheirdil, R.A., Iftikhar-ul-Hassan, M. & Ahmed, I. (2013). Characterization and identification of compost bacteria based on 16S rRNA gene sequencing. *Annals of Microbiology*. 63: 905-912.
- Herman, M.A. B., Nault, B.A. & Smart, C.D. (2008). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection*. 27: 996-1002.
- Herrmann, L. & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 8859-8873.
- Heslop-Harrison, J.S. & Schwarzacher, T. (2007). Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*. 100: 1073-1084.
- Hillocks, R.J. (2012). Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection*. 31: 85-93.
- Horry, J.P., Ortiz, R., Arnaud, E., Crouch, J.H., Ferris, R.S.B., Jones, D.R., Mateo, N., Picq, C. & Vuylsteke, D. (1997). Banana and Plantain. In: *Biodiversity in Trust. Conservation and use of plant genetic resources in CGIAR centers*, pp. 67-81. Cambridge University Press. Fuccillo, D., Sears, L. Stapleton, P. (eds).
- Huang, S.L., Chen, H., Hu, A., Tuan, N.N. & Yu, C.P. (2014). Draft genome sequence of *Pseudomonas nitroreducens* strain TX1, which degrades nonionic surfactants and estrogen-like alkylphenols. *Genome Announcements*. 2: 1-2.
- Hwang, S. & Ko, W. (2004). Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease*. 88: 580-588.
- Ibekwe, A.M., Poss, J.A., Grattan, S.R., Grieve, C.M. & Suarez, D. (2010). Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 567-575.
- Igual, J.M, Valverde, A., Velázquez, E., Regina, I., & Rodríguez-Barrueco, C. (2006). Natural diversity of nodular microsymbionts of *Alnus glutinosa* in the tormes river basin. *Plant and Soil*. 280: 373-383.
- Igual, J.M., Valverde, A., Rivas, R., Mateos, P., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Cervantes, E. & Velázquez, E. (2003). Genomic fingerprinting of Frankia strains by PCR-

- based techniques. assessment of a primer based on the sequence of 16S rRNA gene of *Escherichia coli*. *Plant and Soil*. 254: 115-123.
- INIBAP & IPGRI. (1996). Descriptors for banana (*Musa* spp.). The international network for the improvement of banana and plantain (INIBAP). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI).
- INIBAP. (2001). Networking banana and Plantain: Annual Report 2000. International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Montpellier, France.
- Iskra-Caruana, M.L., Chabannes, M., Duroy, P. & Muller, E. (2014). A possible scenario for the evolution of *Banana streak virus* in banana. *Virus Research*. 186: 155-162.
- Jacobson, C.B., Pasternak, J.J. & Glick, B.R. (1994). Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 40: 1019-1025.
- Jalil, M., Chee, W.W., Othman, R.Y. & Khalid, N. (2008). Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Scientia Horticulturae*. 117: 335-340.
- Jayamurthy, p., Aparna, B., Bayathri, G. & Nisha, P. (2013). Evaluation of antioxidant potential of inflorescence and stalk of plantain (*Musa sapientum*). *Journal of Food Biochemistry*. 37: 2-7.
- Jha, C.K., Patel, B. & Saraf, M. (2012). Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 891-899.
- Ji, S.H., Gururani, M.A. & Chun, S.C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. 169: 83-98.
- Jimtha, J.C., Smitha, P.V. Anisha, C. Deepthi, T., Meekha, G., Radhakrishnan, E.k. Gayatri G. P. & Remakanthan, A. (2014). Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 118: 57-66.
- Joe, A., Sabu, M. & Sreejith, P.E. (2014). A new variety of *Musa velutina* H. Wendl. & Drude (*Musaceae*) from Assam, North-East India. *Plant Systematics and Evolution*. 300: 13-17.

- Kadyan, S., Panghal, M., Kumar, S., Singh, K. & Yadav, J.P. (2013). Assessment of functional and genetic diversity of aerobic endospore forming Bacilli from rhizospheric soil of *Phyllanthus amarus* L. *World J Microbiol Biotechnol.* 29: 1597-1610.
- Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R., Scholz, H.C., Welinder-Olsson, C., Falsen, E. & Busse, H.J. (2006). Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum saccharolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56: 1823-1829.
- Kanazawa, K. & Sakakibara, H. (2000). High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48: 844-8.
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D. & Samiyappan, R. (2008). Induction of systemic resistance in banana (*Musa* spp.) against *Banana bunchy top virus* (BBTV) by combining chitin with root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. *European Journal of Plant Pathology.* 120: 353-362.
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D. & Samiyappan, R. (2010). Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa* spp.) under field conditions. *Applied Soil Ecology.* 45: 71-77.
- Kihara, J. & Njoroge, S. (2013). Phosphorus agronomic efficiency in maize-based cropping systems: A focus on Western Kenya. *Field Crops Research.* 150: 1-8.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 16: 111-120.
- Kirchoff, B.K. (1992). Ovary structure and anatomy in the *Heliconiaceae* and *Musaceae* (zingiberales). *Canadian Journal of Botany.* 70: 2490-2508.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. & Zablotowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology.* 7: 39-44.
- Koeck, D.E., Zverlov, V.V., Liebl, W. & Schwarz, W.H. (2014). Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: Genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Systematic and Applied Microbiology.* 37: 311-319.

- Koppisch, A.T., Browde, C.C., Moe, A.L., Shelley, J.T., Kinkel, B.A., Hersman, L.E., Iyer, S. & Ruggiero, C.E. (2005). Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation. *BioMetals*. 18: 577-585.
- Kumar, C., Yadav, K., Archana, G. & Naresh Kumar G. (2013). 2-Ketogluconic acid secretion by incorporation of *Pseudomonas putida* KT 2440 gluconate dehydrogenase (*gad*) operon in *Enterobacter asburiae* PSI3 improves mineral phosphate solubilization. *Current Microbiology*. 67: 388-394.
- Kumar, H., Dubey, R.C. & Maheshwari, D.K. (2011b). Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of *Fusarium* wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Crop Protection*. 30: 1396-1403.
- Kumar, P.L., Hanna, R., Alabi, O.J., Soko, M.M., Oben, T.T., Vangu, G.H.P. & Naidu, R.A. (2011a). *Banana bunchy top virus* in sub-saharan Africa: Investigations on virus distribution and diversity. *Virus Research*. 159: 171-182.
- Kumari, K., Sharma, P., Tyagi, K. & Lal, R. (2011). *Pseudoxanthomonas indica* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dumpsite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61: 2107-2111.
- Langdon R. (1993). The banana as a key to early American and Polynesian history. *Journal of Pacific History*. 28:13-35.
- Lavakush, Yadav, J., Verma, J.P., Jaiswal, D.K. & Kumar, A. (2014). Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological Engineering*. 62: 123-128.
- Lawongsa, P., Boonkerd, N., Wongkaew, S., O'Gara, F. & Teaumroong, N. (2008). Molecular and phenotypic characterization of potential plant growth-promoting *Pseudomonas* from rice and maize rhizospheres. *World J Microbiol Biotechnol*. 24: 1877-1884.
- Lee, J., Shin, H. & Ryu, S. (2014). Characterization and comparative genomic analysis of bacteriophages infecting members of the *Bacillus cereus* group. *Archives of Virology*. 159: 871-884.
- Lee, J.Y., Janes, B.K., Passalacqua, K.D., Pflieger, B.F., Bergman, N.H., Liu, H. ... & Sherman, D.H. (2007). Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*. 169: 1698-1710.

- Lee, K. (2012). POM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas otitidis* isolate from a patient with chronic otitis media. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 72: 295-296.
- Leiva-Mora, M., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Sánchez-García, C. & Roque, B. (2010). Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotecnología Vegetal*. 10: 79-88.
- León Barrios, M., Vega Hernández, M. C. & Pérez Galdona, R. (2006). El ácido indol-3-acético, una hormona vegetal sintetizada por los rizobios. In: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*, pp 64-78. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Bedmar, E.J., González, J., Luch, C., Rodelas, B. (eds).
- Lhomme, J. & Francisco Jiménez, O. (1992). Estimating dew duration on banana and plantain leaves from standard meteorological observations. *Agricultural and Forest Meteorology*. 62: 263-274.
- Li, C., Zuo, C., Deng, G., Kuang, R., Yang, Q., Hu, C. ... Yi, G. (2013). Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Plos One*. 8: e70226.
- Li, L., Häkkinen, M., Yuan, Y., Hao, G. & Ge, X. (2010). Molecular phylogeny and systematics of the banana family (*Musaceae*) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus *Musa*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57: 1-10.
- Lian, J., Wang, Z. & Zhou, S. (2008). Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection. *Journal of General and Applied Microbiology*. 54: 83-92.
- Lim, J., An, C., Kim, Y., Jung, B. & Kim, S. (2012). Isolation of auxin- and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing bacterium and its effect on pepper growth under saline stress. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 55: 607-612.
- Lim, T. K. (2012a). *Musa acuminata* (AAA group) "Red". *Springer Netherlands*. 531-534.
- Lim, T. K. (2012b). *Musa acuminata* x *balbisiana* (AAB group) "Horn Plantain". *Springer Netherlands*. 535-543.

- Lim, T. K. (2012c). *Musa acuminata* Colla (AA group) "Lakatan". *Springer Netherlands*. 495-497.
- Lim, T. K. (2012d). *Musa acuminata* Colla (AA group) "sucrier". *Springer Netherlands*. 498-501.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z. & Ma, B. (2013b). Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 4617-4625.
- Liu, J.R., Lin, Y.D., Chang, S.T., Zeng, Y.F. & Wang, S.L. (2010). Molecular cloning and characterization of an insecticidal toxin from *Pseudomonas taiwanensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 12343-12349.
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G. & Shao, Z. (2013a). Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *Plos One*. 8: 1-11.
- Long, D., Tang, X., Cai, K., Chen, G., Shen, C., Shi, J., Chen, L. & Chen, Y. (2013). Cr(VI) resistance and removal by indigenous bacteria isolated from chromium-contaminated soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 1123-1132.
- Loranger-Merciris, G., Cabidoche, Y., Deloné, B., Quénéhervé, P. & Ozier-Lafontaine, H. (2012). How earthworm activities affect banana plant response to nematodes parasitism. *Applied Soil Ecology*. 52: 1-8.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*. 193: 265-275
- Lu, H., Wang, X., Zhang, K., Xu, Y., Zhou, L. & Li, G. (2014). Identification and nematicidal activity of bacteria isolated from cow dung. *Annals of Microbiology*. 64: 407-411.
- Lucero, M.E., DeBolt, S., Unc, A., Ruiz-Font, A., Reyes, L.V., McCulley, R.L., Alderman, S.C., Dinkins, R.D., Barrow, J.R. & Samac, D.A. (2014). Using microbial community interactions within plant microbiomes to advance an evergreen agricultural revolution. *In Sustainable agroecosystems in climate change mitigation*, pp 183-202, Oelbermann, M. (ed).
- Lucy, M., Reed, E. & Glick, B. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 86: 1-25.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541-56.

- Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Doet, T. ... Giske, C.G. (2011) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *Plos One*. 6: 1-11.
- Macdonald, L.M., Paterson, E., Dawsonm, L.A. & McDonald, A.J.S. (2004). Short-term effects of defoliation on the soil microbial community associated with two contrasting *Lolium perenne* cultivars. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 489-498.
- Madaan, G., Gosal, S.K., Gosal, S.S., Saroa G.S. & Gill, M.I.S. (2013). Effect of microbial inoculants on the growth and yield of micropropagated banana (*Musa indica*) cv. Grand Naine. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 88: 643-649.
- Mäder, P., Kaiser, F., Adholeya, A., Singh, R., Uppal, H.S., Sharma, N.K. ... Fried, P.M. (2011). Inoculation of root microorganisms for sustainable wheaterice and wheateblack gram rotations in India. *Soil Biology and Biochemistry*. 43: 609-619.
- Mante, S. & Tepper, H. (1983). Propagation of *Musa textilis* Neé plants from apical meristem slices *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2: 151-159.
- Mantelin, S. & Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: Impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*. 55: 27-34.
- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-Hadid, A., El-Bahairy, U., Borin, S., Sorlini, C. & Daffonchio, D. (2013). Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic Environments. *BioMed Research International*. 2013: 1-17.
- Martínez, L., Caballero-Mellado, J., Orozco, J. & Martínez-Romero, E. (2003). Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant and Soil*. 257: 35-47.
- Meena, V.S., Maurya, B.R. & Verma, J.P. (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*. 169: 337-347.
- Mehta, P., Chauhan, A., Mahajan, R., Mahajan, P.K. & Shirkot, C.K. (2010). Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. *Current Science*. 98: 538-542.

- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H. & Mahmood, M. (2010c). Use of plant growth promoting bacteria in banana: A new insight for sustainable banana production. *International Journal of Agriculture and Biology*. 12: 459-467.
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z. & Marziah, M. (2009). The effect of rhizobacterial inoculation on growth and nutrient accumulation of tissue-cultured banana plantlets under low N-fertilizer regime. *African Journal of Biotechnology*. 8: 5855-5866.
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z. & Marziah, M. (2010a). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Australian Journal of Crop Science*. 4: 85-90.
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z. & Marziah, M. (2010b). Rhizobacteria as bioenhancer and biofertilizer for growth and yield of banana (*Musa* spp. cv. 'Berangan'). *Scientia Horticulturae*. 126: 80-87.
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z. & Marziah, M. (2010d). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Australian Journal of crop Science*. 4: 85-90.
- Micallef, S.A., Shiaris, M.P. & Colon-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany*. 60: 1729-1742.
- Micheli, M.R., Bova, R., Pascale, E. & D'Ambrosio, E. (1994). Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research*. 22: 1921-1922.
- Ministerio de Agricultura de la República Dominicana. (2013). Tendencias en la producción Dominicana de banano. pp 1-4.
- Miransari, M. (2011). Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92: 875-885.
- Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M. & Ghassempour, A. (2013). Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 88: 48-54.

- Mishra, P.K., Bisht, S.C., Ruwari, P., Joshi, G.K., Singh, G., Bisht, J.K. & Bhatt, J.C. (2011). Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *European Journal of Soil Biology*. 47: 35-43.
- Mobambo, K.N., Gauhl, F., Vuylsteke, D., Ortiz, R., Pasberg-Gauhl, C. & Swennen, R. (1993). Yield loss in plantain from black sigatoka leaf spot and field performance of resistant hybrids. *Field Crops Research*. 35: 35-42.
- Montero-Calasanz, M.C., Santamaría, C., Albareda, M., Daza, A., Duan, J., Glick, B.R. & Camacho, M. (2013). Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 11: 146-154.
- Morales Romero, L., Ullauri Espinoza, M.A., Dávila Martínez, A. & Folgueras Montiel, M. (2011). Respuesta de genotipos mejorados de plátanos (*Musa* spp.) a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. 1-20.
- Motoshima, M., Yanagihara, K., Fukushima, K., Matsuda, J., Sugahara, K., Hirakataa, Y., Yamada, Y., Kohno, S. & Kamihira, S. (2007). Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58: 53-58.
- Mulas, D., Díaz-Alcántara, C.A., Mulas, R., Marcano, I., Barquero, M., Serrano, P. & González-Andrés, F. (2013). Inoculants bases in autochthonous microorganisms, a strategy to optimize agronomic performance of biofertilizers. In: *Beneficial Plant-microbial Interactions: Ecology and Applications*, pp 300-328. Rodelas González, M.B. González-López, J. (eds).
- Mulas, D., García-Fraile, P., Carro, L., Ramírez-Bahena, M.H., Casquero, P., Velázquez, E. & González-Andrés, F. (2011). Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 43: 2283-2293.
- Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M. & Hartmann, A. (2014). Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology*. 61: 20-26.

- Nadeem, S.M., Ahmad, M., Ahmad Zahir, Z., Javaid, A. & Ashrafe, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*. 32: 429-448.
- Nadeem, S.M., Shaharoona, B., Arshad, M. & Crowleyc, D.E. (2012). Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado trees in saline soils. *Applied Soil Ecology*. 62: 147-154.
- Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Letters*. 170: 265-70.
- Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M. & Sessitsch, A. (2013). The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biology and Fertility of Soils*. 50: 249-262.
- Neilands, J.B. (1995). Siderophore: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal Biological Chemistry*. 270: 26723-26726.
- Nerurkar, M., Joshi, M., Pariti, S. & Adivarekar, R. (2013). Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. *Journal of Surfactants and Detergents*. 16:435-443.
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. & Wakabayashi, H. (2000). *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 83-89.
- Nogueira, M.A., Albino, U.B., Brandão-Junior, O., Braun, G., Cruz, M.F., Diasa, B.A. ... Andrade, G. (2006). Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 115: 237-247.
- Nur, N. (1976). Studies on pollination in *Musaceae*. *Annals of Botany*. 40: 167-177.
- O'Hara, G.W., Goss, T.J., Dilworth, M.J. & Glenn, A.R. (1989). Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Microbiol Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1870-1876.
- Oben, T.T., Hanna, R., Ngeve, J., Alabi, O.J., Naid, R.A. & Lava Kumar, P.L. (2009). Occurrence of banana bunchy top disease caused by the *Banana bunchy top virus* on banana and plantain (*Musa* sp.) in Cameroon. *Plant Disease*. 93: 1076-1076.

- Orjeda, G. (1998). Evaluación de la resistencia de los bananos a las enfermedades de Sigatoka negra y marchitamiento por *Fusarium*. *Guías técnicas INIBAP 3*. IPGRI, Roma, Italia; Red Internacional para el mejoramiento del banano y el plátano, Montpellier, Francia
- Ortiz, J.M., González-Andrés, F. & Draper, D. (2010). Tendencias actuales en la organización de los recursos fitogenéticos. En: *Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: "Nuevos Avances en la Conservación y en la Utilización de los Recursos Fitogenéticos"*, PP.: 479-511. Sociedad Española de Genética. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Carrillo, J.M., Díez, M.J., Pérez de la Vega, M., Nuez, F. (eds).
- Ortiz, R. (1997). Morphological variation in *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 44: 393-404.
- Ortiz, R. (2011). *Musa*. In: *Wild Crop Relatives: genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits*, pp 97-128: Kole, C. (ed).
- Ortiz, R., Crouch, J.H., Crossa, J., Crouch, J.H., Crossa, J., Braun, H.J., Dodds, J.H., Trethowan, R., Ferrara, G.O. & Iwanaga, M. (2007). High yield potential, shuttle breeding, genetic diversity, and a new international wheat improvement strategy. *Euphytica* 157: 365-384.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B. & Timmis, K.N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*. 2: 39-50.
- Oves, M., Khan, M.S. & Zaidi, A. (2013). Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. *European Journal of Soil Biology*. 56: 72-83.
- Pandey, S., Ghosh, P., Ghosh, S., De, T. & Maiti, T. (2013). Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *Journal of Microbiology*. 51: 11-17.
- Patel D.K., Archana, G. & Kumar, G.N. (2008). Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. dhrss in the presence of different sugars. *Current Microbiology*. 56: 168-174.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42: 207-220.

- Penrose, D.M. & Glick, B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*. 118: 10-15.
- Pérez-Montano, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R. Jiménez-Guerrero, I. ... Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169: 325-336.
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F. ... Denham, T. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 11311-11318.
- Pešaković, M., Karaklajić-Stajić, Ž., Milenković, S. & Mitrović, O. (2013). Biofertilizer affecting yield related characteristics of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) and soil microorganisms. *Scientia Horticulturae*. 150: 238-243.
- Picard, C. & Bosco, M. (2007). Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic pseudomonas spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften*. 95: 1-16.
- Pinton, R., Varanini, Z. & Nannipieri, P. (2001). The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. In: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-plant Interface*, pp 1-17. Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. Marcel D. (eds).
- Piromy, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N. & Teaumroong, N. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*. 47: 44-54.
- Ploetz, R.C. (2005). Panama disease: An old nemesis rears its ugly head part 2: The Cavendish era and beyond. *APSnet Features*. 2005-1005
- Ploetz, R.C. (2006). Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Phytopathology*. 96: 653-656.
- Portal, O., Acosta-Suárez, M., Ocaña, B., Schäfer, W., Jiménez, E. & Höfte, M. (2012). A green fluorescent protein-transformed *Mycosphaerella fijiensis* strain shows increased aggressiveness on banana. *Australasian Plant Pathology*. 41: 645-647.
- Prasanna Kumar, S.P., Hariprasad, P., Brijesh Singh, S., Gowtham, H.G. & Niranjana, S.R. (2014). Structural and functional diversity of rhizobacteria associated with *Rauwolfia* spp.

- across the western ghat regions of karnataka, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30: 163-173.
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 13: 63-77.
- ProMusa. (2014a). *Radopholus similis*. Mobilizing banana science for sustainable livelihoods. <http://www.promusa.org/Radopholus+similis>. Consultada 06/04/2014
- ProMusa. (2014b). Fusarium wilt. Mobilizing banana science for sustainable livelihoods. <http://www.promusa.org/Fusarium+wilt>. Consultada 06/04/2014
- Qin, S., Zhang, Y.J., Yuan, B., Xu, P.Y., Xing, K., Wang, J. & Jiang, J.H. (2014). Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant Soil*. 374: 753-766.
- Raddadi, N., Cherif, A., Boudabous, A. & Daffonchio, D. (2008). Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Annals of Microbiology*. 58: 47-52.
- Raddadi, N., Cherif, A., Ouzari, H., Marzorati, M., Brusetti, L., Boudabous, A. & Daffonchio, D. (2007). *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. *Annals of Microbiology*. 57: 481-494.
- Radzki, W., Gutiérrez Mañero, F.J., Algar, E., Lucas García, J.A., García-Villaraco, A. & Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 104: 321-330.
- Ramya, P.V., Gunasekaran, S. & Kumar, S.M. (2014). Genetic diversity of soft rot pathogens in potato of South Indian origin. *Research Journal of Biotechnology*. 9: 47-58.
- Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y.S. & Nain, L. (2012a). Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *European Journal of Soil Biology*. 50: 118-126.
- Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar, K. & Nain, L. (2011). Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology*. 61: 893-900.

- Rana, A., Saharan, B., Nain, L., Prasanna, R. & Shivay, Y.S. (2012b). Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. *Soil Science and Plant Nutrition*. 58: 573-582.
- Ranjard, L., Lejon, D.P., Mougel, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*. 5: 1111-1120.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.C., Mouge, C., Thioulouse, J. & Nazaret, S. (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: Biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4479-87
- Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S. & Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 303-329.
- Raynaud, X. & Nunan, N. (2014). Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *Plos One*. 9: 1-9.
- Remans, T., Grof, L., Christopher, P., Ebert, P.R. & Schenk, P.M. (2005). Identification of functional sequences in the pregenomic RNA promoter of the banana streak virus Cavendish strain (BSV-cav). *Virus Research*. 108: 177-186.
- Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Fuzinatto Dall'Agnol, R., Graham, P.H., Martinez-Romero, E. & Hungria, M. (2013). Novel *Rhizobium lineages* isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in Microbiology*. 164: 740-748.
- Ribeiro, R.C.F., Campos V.P., Xavier, A.A., Rocha, L.S., Ribeiro, H.B., Aguilar F.M. ... Dias-Arieira, C.R. (2012). Control of *Meloidogyne javanica* and Panama disease with rhizobacteria. *Nematropica*. 42: 218-226.
- Richardson, A.E. (2007). Making microorganisms mobilize soil phosphorus. *Developments in Plant and Soil Sciences*. 102: 85-90.
- Richter, S., Stromann, K. & Müssig, J. (2013). Abacá (*Musa textilis*) grades and their properties—A study of reproducible fibre characterization and a critical evaluation of existing grading systems. *Industrial Crops and Products*. 42: 601-612.

- Rivas R., Velázquez, E., Valverde A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*. 22: 1086-1089.
- Rivas, J. (2001). Micropropagación de las variedades de plátano FHIA-20 (*Musa* AAAB), FHIA-21 (*Musa* AAAB) y plátano Falso Cuerno (*Musa* AAB) en diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP). En: *Programa de banano y plátano. Informe técnico 2000*, pp 16-19. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA).
- Rivas, R., Peix, A., Mateos, P.F., Trujillo, M.E, Martínez-Molina, E. & Velázquez E. (2006). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils *Plant and Soil*. 287: 23-33.
- Rivas, R., Velázquez, E., Palomo, J.L., Mateos, P.F., García-Benavides, P. & Martínez-Molina, E. (2002). Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *European Journal of Plant Pathology*. 108: 179-184.
- Riveros, A.S. & Arciniegas, A.M. (2003). Productos naturales como biofungicidas e inductores de resistencia para el manejo de la Sigatoka negra. En: *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos*, pp 31-32. Rivas, G., y Rosales, F.E. (eds).
- Rodelas-González, M. B. & González-López, J. (2013). Beneficial plant-microbial Interactions: Ecology and Applications, pp 460.
- Rodríguez, H. & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17: 319-339.
- Rodríguez-Navarro, D.N. & Ruíz-Sainz, J.E. (2010). Biofertilizers. In: *Agricultural sciences topics in modern agriculture*, pp 79-102. González-Fontes, A., Gárate, A., Bonilla, I. (eds).
- Rodríguez-Romero, A.S., Badosa, E., Montesinos, E. & Jaizme-Vega, M.C. (2008). Growth promotion and biological control of root-knot nematodes in micropropagated banana during the nursery stage by treatment with specific bacterial strains. *Annals of Applied Biology*. 152: 41-48.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D. ... Triplett, E.W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology*. 1: 283-290.

- Rohlf, F.J. (2006). NTSYSpc 2.20f. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Setauket (NY): Exeter Software*.
- Rosas, S.B., Avanzini, G., Carlier, E., Pasluosta, C., Pastor, N. & Rovera, M. (2009). Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1 *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 1802-1806.
- Roux, N., Baurens, F., Doležel, J., Hřibová, E., Heslop-Harrison, P., Town, C. ... Lagoda, P. (2008). Genomics of banana and plantain (*Musa* spp.), major staple crops. in the tropics. In: *Genomics of Tropical Crop Plants*, pp 83-111. Moore, P., Ming, R. (eds).
- Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. & Palop, M.L. (2008). Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiology*. 25: 942-948.
- Sabir, A. (2013). Improvement of grafting efficiency in hard grafting grape *Berlandieri* hybrid rootstocks by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Scientia Horticulturae*. 164: 24-29.
- Saïdi, S., Chebil, S., Gtari, M. & Mhamdi, R. (2013). Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. *World J Microbiol Biotechnol*. 29: 1099-1106.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology. Evolution*. 4: 406-425.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. & Bhatti, A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 34: 635-648.
- Santi, C., Bogusz, D. & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*. 111: 743-767.
- Saravanakumar, D., Vijayakumar, C., Kumar, N. & Samiyappan, R. (2007). PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protection*. 26: 556-565.
- Sarma, R.K. & Saikia, R. (2014). Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil*. 377: 111-126.

- Schwyn, B. & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160: 47-56.
- Scot, N. (2004). *Banana bunchy top*: Detailed signs and symptoms. *Cooperative Extension Service*. 1-22.
- Seiler, H., Schmidt, V., Wenning, M. & Scherer, S. (2012). *Bacillus kochii* sp. nov., isolated from foods and a pharmaceuticals manufacturing site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 1092-1097.
- Seiler, H., Wenning, M., Schmidt, V. & Scherer, S. (2013). *Bacillus gottheilii* sp nov., isolated from a pharmaceutical manufacturing site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 867-872.
- Shaharoona, B., Arshad, M., Zahir, Z.A. & Khalid, A. (2006). Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 2971-2975.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication. *University of Illinois Press, Urbana*.
- Sharma, M., Schmid, M., Rothballer, M., Hause, G., Zuccaro, A., Imani, J., Schäfer, P., Hartmann, A. & Kogel, K.H. (2008). Detection and identification of mycorrhiza helper bacteria intimately associated with representatives of the order *Sebacinales*. *Cellular Microbiology*. 10: 2235-2246.
- Sharma, V., Archana, G. & Naresh Kumar, G. (2011). Plasmid load adversely affects growth and gluconic acid secretion ability of mineral phosphate-solubilizing rhizospheric bacterium *Enterobacter asburiae* PSI3 under P limited conditions. *Microbiological Research*. 166: 36-46.
- Sharma, V., Kumar, V., Archana, G. & Naresh Kumar, G. (2005). Substrate specificity of glucose dehydrogenase (GDH) of *Enterobacter asburiae* PSI3 and rock phosphate solubilization with GDH substrates as C sources. *Canadian Journal of Microbiology*. 51: 477-482.
- Shen, F.T. & Young, C.C. (2005). Rapid detection and identification of the metabolically diverse genus *Gordonia* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*. 250: 221-227.

- Shen, Z., Wang, D., Ruan, Y., Xue, C., Zhang, J., Li, R. & Shen, Q. (2014). Deep 16S rRNA pyrosequencing reveals a bacterial community associated with banana Fusarium wilt disease suppression induced by bio-organic fertilizer application. *PLoS One*. 9: 1-10.
- Shongwe, V.D., Tumber, R., Masarirambi, M.T. & Mutukumira, A.N. (2008). Soil water requirements of tissue-cultured dwarf Cavendish banana (*Musa* spp. L). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*. 33: 768-774.
- Shrivastava, A., Mishraa, S.K., Shethia, B., Pancha, I., Jaina, D. & Mishraa, S. (2010). Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47 283-287.
- Singh, J. (2013). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Resonance*. 18: 275-281.
- Singh, J.S., Pandey, V.C. & Singh, D.P. (2011). Efficient Soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 140: 339-353.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. & Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4742-4751.
- Smyth, E.M., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M.R., Dow, J.M., O'Gara, F. & Doohan F.M. (2011). In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 683-92.
- Son, J.S., Sumayo, M., Hwang, Y.J., Kim, B.S. & Ghim, S.Y. (2014). Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. *Applied Soil Ecology*. 73: 1-8.
- Souza, S.A. Xavier, A.A, Costa, M.R., Cardoso, A.M.S., Pereira, M.C.T. & Nietzsche, S. (2013). Endophytic bacterial diversity in banana "Prata Anã" (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*. 36: 252-264.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S. & Croonenborghs, A. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*. 312: 15-23.

- Stanger, T.F. & Lauer, J.G. (2008). Corn grain yield response to crop rotation and nitrogen over 35 years. *Agronomy Journal*. 100: 643-650.
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M. & Hritcu, L. (2013). Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae*. 151: 22-29.
- Stockdale, E.A., Lampkin, N.H., Hovi, M., Keatinge, R., Lennartsson, E.K.M., Macdonald, D.W. ... Watson, C.A. (2001). Agronomic and environmental implications of organic farming systems. *Advances in Agronomy*. 70: 261-262.
- Sun, D., Lu, X., Hu, Y., Li, W., Hong, K., Mo, Y. Cahill, D.M. & Xie, J. (2013). Methyl jasmonate induced defense responses increase resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4 in banana. *Scientia Horticulturae*. 164: 484-491.
- Swaminathan, M.S. (2010). From green to an evergreen revolution, In: Science and sustainable food security: selected papers of MS Swaminathan. *World Scientific Publishing Company Pte. Ltd.* pp. 27-40.Singapore.
- Swennen, R., Vuylsteke, D. & Ortiz, R. (1995). Phenotypic diversity and patterns of variation in west and central African plantains (*Musa* spp., AAB group *musaceae*). *Economic Botany*. 49: 320-327.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141: 399-436.
- Thomas, P. & Soly, T.A. (2009). Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine and the affinity of endophytes to the host. *Microbial Ecology*. 58: 952-964.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P. A., Naylor, R. & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 418: 671-677.

- Tixier, P., Risède, J.M., Dorel, M. & Malézieux, E. (2006). Modelling population dynamics of banana plant-parasitic nematodes: A contribution to the design of sustainable cropping systems. *Ecological Modelling*. 198: 321-331.
- Trujillo Toledo, M.E., De La Vega, P.A., Carro García, L., Martínez Hidalgo, P. & Martínez Molina, E. (2011). Actinobacterias endófitas de raíces y nódulos fijadores de nitrógeno: Papel ecológico y potencial biotecnológico. En: *Fundamentos y Aplicaciones Agroambientales de las Interacciones Beneficiosas Plantas-microorganismos*, pp 297-312. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Mejía Guijo, M., Rivilla Palma, R., Soto Misffut, M.J., Delgado Igeño, M.J., González García, E., Mateos González, P.F., León Barrios, M., Rodelas González, B., Bedmar Gómez, E.J. (eds).
- Valerio, R., Lindorf, H. & García de García, E. (2002). Anatomía foliar comparada de ocho cultivares de banano con relación a la resistencia o susceptibilidad a la sigatoka (amarilla y negra). *Agronomía Tropical*. 52: 507-521.
- Valverde, A., González-Tirante, M., Medina-Sierra, M., Santa-Regina, I., García-Sánchez, A., & Igual, J.M. (2011a). Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten-tin mining area. *Chemosphere*. 85: 129-134.
- Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E. & Velázquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 2631-2637.
- Valverde, A., Velázquez, E., Cervantes, E., Igual, J.M., van Berkum, P. (2011b) Evidence of an American origin for symbiosis-related genes in *Rhizobium lusitanum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 5665-5670.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria *European Journal of Plant Pathology*. 119: 243-254.
- Vanlaere, E., Lipuma, J.J., Baldwin, A., Henry, D., De Brandt, E., Mahenthiralingam, E., Speert, D., Dowson, C. & Vandamme, P. (2008). *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 1580-1590.
- Vassilev, N., Medina, A., Azcon, R. & Vassileva, M. (2007). Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting

- products on plant growth and P uptake. *Developments in Plant and Soil Sciences*. 102: 77-84.
- Vassileva, M., Serrano, M., Bravo, V., Jurado, E., Nikolaeva, I., Martos, V. & Vassilev, N. (2010). Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1287-1299.
- Vegas Rodríguez, U. & Rojas Llanque, J.C. (2011). Fertilización y manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de banano orgánico. En: *Guía Técnica Curso–Taller*. 1-36.
- Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A. & Rivas, R. (2011). Proteobacteria forming nitrogen fixing symbiosis with higher plants. In: *Proteobacteria: Phylogeny, Metabolic Diversity and Ecological Effects*, pp. 37-56. New York, USA: Nova Science Publishers Inc. (first edition). Sezenna, M.L. (ed).
- Velázquez, E., Rojas, M., Lorite, M.J., Rivas, R., Zurdo-Piñeiro, J.L., Heydrich, M. & Bedmar, E.J. (2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology*. 48: 118-124.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Vidal, J.R., Moreno, S., Gogorcena, Y., Masa, A., & Ortiz, J.M. (1999). On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. *American Journal of Enology and Viticulture*. 50: 69-75.
- Villaverde, J.J., Oliveira, L., Vilela, C., Dominguez, R.M., Freitas, N., Cordeiro, N. ... Silvestre, A.J.D. (2013). High valuable compounds from the unripe peel of several *Musa* species cultivated in Madeira island (Portugal). *Industrial Crops and Products*. 42: 507-512.
- Vishnevetsky, J., White, T. Jr., Palmateer, A., Flaishman, M., Cohen, Y., Elad, Y. ... Perl, A. (2011). Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. grand nain. *Transgenic Research*. 20: 61-72.
- Viveros Folleco, J. & Castaño Zapata, J. (2006). Evaluación in vitro de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Agronomia*. 14: 37-50.
- Vlkova, M., Polesny, Z., Verner, V., Banout, J., Dvorak, M., Havlik, J. ... Krausova, J. (2011). Ethnobotanical knowledge and agrobiodiversity in subsistence farming: Case study of

- home gardens in Phong My commune, central Vietnam. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 58: 629-644.
- Wang, K., Yan, P.S., Ding, Q.L., Wu Q.X., Wang Z.B. & Peng, J. (2013a). Diversity of culturable root-associated/endophytic bacteria and their chitinolytic and aflatoxin inhibition activity of peanut plant in China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29: 1-10.
- Wang, X., Xue, Y., Han, M., Bu, Y. & Liu, C. (2014). The ecological roles of bacillus thuringiensis within phyllosphere environments. *Chemosphere*. 108: 258-264.
- Wang, Z., Liu, Z., Yu, F., Zhu, J., Chen, Y. & Tao T. (2013b). Siderophore-modified fenton-like system for the degradation of propranolol in aqueous solutions at near neutral pH values. *Chemical Engineering Journal*. 229: 177-182.
- Wani, P.A., Khan, M.S. & Zaidi, A. (2007). Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde*. 170: 283-287.
- Watanabe, S., Borthakur, D. & Bressan, A. (2013). Lack of evidence for an interaction between buchnera GroEL and Banana bunchy top virus (*Nanoviridae*). *Virus Research*. 177: 98-102.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Woese, C.R. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings National Academy Sciences USA*. 97: 8392-6
- Wong, C., Kiew, R., Argent, G., Set, O., Lee, S. K. & Gan, Y.Y. (2002). Assessment of the validity of the sections in *Musa* (*Musaceae*) using AFLP. *Annals Botany*. 90: 231-238.
- Wong, C., Kiew, R., Argent, Loh, J.P., Gan, L.H., Set, O., Lee, S.k., Lum, S. & Gan, Y.Y.(2001) Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* colla in malaysia as evidenced by AFLP. *Annals of Botany*. 88: 1017-1025.
- Woodward, A. W. & Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. 95: 707-735.

- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. & Wong, M.H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. *Geoderma*. 125: 155-166.
- Wu, Y., Yi, G., Peng, X., Huang, B., Liu, E. & Zhang, J. (2013). Systemic acquired resistance in Cavendish banana induced by infection with an incompatible strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Journal of Plant Physiology*. 170: 1039-1046.
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S. & Shen, L. (2014). Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30: 835-845.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Rongcai, Y., Ye, Z. & Xiyan, J. M. (1999). POPGENE VERSION 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. *University of Alberta, Canada*.
- Zafar-ul-Hye, M., Farooq, H.M., Zahir, Z.A., Hussain, M. & Hussain, A. (2014). Application of ACC-deaminase containing rhizobacteria with fertilizer improves maize production under drought and salinity stress. *International Journal of Agriculture and Biology*. 16: 591-596.
- Zhang, P., Whistler, R.L., BeMiller, J.N. & Hamaker, B.R. (2005). Banana starch: Production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydrate Polymers*. 59: 443-458.
- Zhao, G., Ma, F., Wei, L., Chua, H., Chang, C.C. & Zhang, X.J. (2012). Electricity generation from cattle dung using microbial fuel cell technology during anaerobic acidogenesis and the development of microbial populations. *Waste Management*. 32: 1651-1658.
- Zhivotovsky, L.A. (1999). Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*. 8: 907-913.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H. & Bai, Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*. 33: 406-413.
- Zuo, Y. & Zhang, F. (2011). Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant and Soil*. 339: 83-95.

CAPÍTULO 7. Anejos

Tabla 35 Anejo 1A: Análisis de suelo de las diferentes localidades de recolección de muestras.

Provincias y localidades	Características edáficas										
	textura	Arena	Limo %	Arcilla %	pH	Caliza %	MO (%)	N total %	Relación C_N	P Olsen mg/kg	Ca (cmol(+)/kg)
Azua parcela del IDIAF	Franca	42	38	20	8,58	13,21	1,81	0,11	9,55	<5,44	24,41
Azua Isura	Arcillosa	22	36	42	8	16,92	3,01	0,17	10,3	12,27	30,01
Azua Los Tramojos	-	-	-	-	8,4	24,29	2,02	0,12	9,77	19,24	22,99
Azua Proyecto 2C	-	-	-	-	8,3	11,76	3,89	0,24	9,41	42,49	25,83
Azua Pueblo Viejo	-	-	-	-	8,27	31,27	8,83	0,23	9,68	12,42	27,99
Dajabón Carrizal	Franco arcillosa	38	30	32	5,08	0	9,64	0,25	22,42	<5,44	1,32
Dajabón La Rosa	Limosa	68	16	16	6,47	0	2,98	0,14	12,36	<5,44	6,39
Mao Amina 1	Franco limosa	22	54	24	8,15	3,19	2,32	0,14	9,62	<5,44	24,02
Mao El Charco	Franco arcillo limoso	16	56	28	8,12	3,57	2,16	0,13	9,66	<5,97	27,12
Mao Tierra Fría 1	Franco arenosa	60	26	14	7,9	1,75	1,15	0,08	8,35	<5,44	19,78
Montecristi Clavellina	Franco arcillosa	42	26	32	7,36	0	2,96	0,16	0,58	8,16	21,53
Montecristi Gozuela	Franco arcillosa	32	30	38	7,97	0,87	2,85	0,18	9,21	25,94	23,53
Montecristi La Pinta	Franca	44	34	22	6,95	0	2,35	0,16	8,55	<5,44	38,27
Montecristi Pepillo Salcedo	-	-	-	-	7,56	0,87	4,1	0,25	9,53	45,9	25,07
Montecristi Santa María	Franco arcillo arenoso	66	12	22	8,29	0,87	1,64	0,11	0,69	<5,44	17,91

Tabla 35 Anejo 1A: Continuación 1.

Provincias y localidades	Características edáficas								
	K (cmol(+)/kg)	Mg (cmol(+)/kg)	Na (cmol(+)/kg)	CIC (cmol(+)/kg)	Cu (cmol(+)/kg)	Fe (cmol(+)/kg)	Zn (cmol(+)/kg)	B (cmol(+)/kg)	CE (dS/m)
Azua parcela del IDIAF	1,34	3,25	0,46	0,14	0,67	6,83	0,2	1,81	0,14
Azua isura	2,51	4,95	0,95	0,61	2,04	5,84	0,81	0,71	0,61
Azua Los Tramojos	3,58	3,46	0,43	0,23	1,06	5,79	0,38	1,61	0,23
Azua Proyecto 2C	6,02	4,88	0,42	0,41	0,87	6,14	0,63	2,28	0,41
Azua Pueblo Viejo	1,66	5,42	0,38	0,22	2,04	6,07	0,61	1,54	0,22
Dajabón Carrizal	0,19	0,63	0,04	0,05	1,04	63,17	1,71	0,54	0,05
Dajabón La Rosa	0,34	1,89	0,01	0,04	0,38	30,05	0,54	0,39	0,04
Mao Amina 1	0,51	6,63	0,29	0,21	2,59	13,75	1,07	0,94	0,21
Mao El Charco	0,98	6,1	0,33	0,18	3,65	20,57	1,82	0,67	0,18
Mao Tierra Fría 1	0,44	2,27	0,12	0,16	1,36	9,13	0,45	0,48	0,16
Montecristi Clavellina	0,64	10,57	0,13	0,24	0,63	6,32	1,03	0,64	0,24
Montecristi Gozuela	2,95	9,47	0,51	0,2	1,49	8,44	2,35	1,55	0,2
Montecristi La Pinta	0,22	7,71	0,12	0,89	0,53	19,84	1,87	0,64	0,89
Montecristi Pepillo Salcedo	2,44	10,75	0,58	0,21	2,56	21,62	6,3	1,35	0,21
Montecristi Santa María	0,52	4,19	0,2	0,12	0,39	6,43	0,71	0,65	0,12

Tabla 36 Anejo 1B: Datos de los diferentes resultados obtenidos de las pruebas *in vitro* realizadas a las bacterias endofíticas y rizosféricas de la colección.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)	Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
							<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_01	2	A	A	A	A	I
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_02	3	A	B	B	B	VII
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_03	4	A	A	A	A	I
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_04	5	A	A	I	E	IV
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_05	6	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_06	7	B	B	C	D	XVI
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_07	8	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_08	9	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_09	11	A	A	I	E	III
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_10	229	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_11	231	B	A	A	E	XII
Endof.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_12	232	B	B	D	H	XVIII
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_13	301	D	A	A	J	XXXIV
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_14	302	A	B	F	K	X
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_15	303	C	B	A	G	XXXI
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_16	327	A	A	I	E	IV
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_17	328	A	B	A	K	V
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_18	329	A	B	A	K	V
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_19	330	A	B	A	K	V
Rizos.	Azua	Parcela del IDIAF	N18 23,405	W70 50,375	Banano	RD_AZIDI_20	331	A	B	A	K	V
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_01	40	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_02	41	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_03	42	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_04	43	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_05	44	A	A	I	E	IV
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_06	45	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_07	46	B	B	B	B	XV
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_08	220	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_09	221	A	A	I	E	IV
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_10	223	B	B	D	C	XVII
Endof.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_11	224	B	B	J	B	XXI

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 1.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Accesión EZ-BioCloud
RD_AZIDI_01	Gamma proteobacterias	1420	<i>Pseudomonas resinovorans</i> LMG 2274(T)	97,94	97,33	Z76668
RD_AZIDI_02		0		0	0	
RD_AZIDI_03		0		0	0	
RD_AZIDI_04		0		0	0	
RD_AZIDI_05	Gram positivas	1489	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,46	99,8	AB190217
RD_AZIDI_06	Beta proteobacterias	1438	<i>Comamonas aquatica</i> LMG 2370(T)	99,7	99,1	AJ430344
RD_AZIDI_07		0		0	0	
RD_AZIDI_08	Gram positivas	1490	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	99,8	100	AE016877
RD_AZIDI_09	Gamma proteobacterias	1444	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i> HT-3(T)	99,17	98,7	AB453701
RD_AZIDI_10		0		0	0	
RD_AZIDI_11	Gamma proteobacterias S	1468	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T)	99,79	100	AF468452
RD_AZIDI_12	Gram positivas	1452	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9(T)	99,85	98,11	FJ477040
RD_AZIDI_13	Alfa proteobacterias	1391	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> CCUG 33852(T)	100	98,86	AM180484
RD_AZIDI_14	Gamma proteobacterias	1447	<i>Acinetobacter parvus</i> DSM 16617(T)	97,92	98,84	AIEB01000124
RD_AZIDI_15		0		0	0	
RD_AZIDI_16		0		0	0	
RD_AZIDI_17	Gamma proteobacterias	1469	<i>Acinetobacter pittii</i> CIP 70.29(T)	99,86	100	APQP01000001
RD_AZIDI_18	Gamma proteobacterias	1459	<i>Acinetobacter pittii</i> CIP 70.29(T)	99,86	99,59	APQP01000001
RD_AZIDI_19		0		0	0	
RD_AZIDI_20		0		0	0	
RD_AZLTR_01		0		0	0	
RD_AZLTR_02		0		0	0	
RD_AZLTR_03		0		0	0	
RD_AZLTR_04	Gram positivas	1187	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	99,92	80,49	AE016877
RD_AZLTR_05	Gamma proteobacterias	1467	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751(T)	99,86	100	EU103629
RD_AZLTR_06		0	0	0	0	
RD_AZLTR_07	Gamma proteobacterias	1456	<i>Enterobacter soli</i> LF7a(T)	99,11	99,39	CP003026
RD_AZLTR_08		0		0	0	
RD_AZLTR_09		0		0	0	
RD_AZLTR_10	Gram positivas	1495	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,46	100	AB190217
RD_AZLTR_11	Gram positivas	1437	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42(T)	99,79	97,29	CP000560

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 2.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_AZIDI_01	0,33355	0,05025	32708175	1,982884262	6,06235E-08	6,062350656
RD_AZIDI_02	0,54525	0,0877	53878175	3,0506707	5,66216E-08	5,662164132
RD_AZIDI_03	0,2635	0,06945	25703175	2,530320834	9,84439E-08	9,844390172
RD_AZIDI_04	0,447	0,0968	44053175	3,310132825	7,51395E-08	7,513948371
RD_AZIDI_05	0,2253	0,0352	21883175	1,553773824	7,10031E-08	7,100312564
RD_AZIDI_06	0,1899	0,294	18343175	8,932762615	4,8698E-07	48,69801774
RD_AZIDI_07	0,49665	0,05015	49018175	1,98003303	4,03939E-08	4,039385452
RD_AZIDI_08	0,2042	0,18475	19773175	5,817791496	2,94226E-07	29,42264708
RD_AZIDI_09	0,3563	0,15705	34983175	5,028000192	1,43726E-07	14,37262396
RD_AZIDI_10	0,1658	0,1758	15933175	5,56260622	3,49121E-07	34,91210145
RD_AZIDI_11	0,1214	0,1597	11493175	5,103557844	4,44051E-07	44,40511733
RD_AZIDI_12	0,10945	0,0917	10298175	3,164719986	3,07309E-07	30,73088179
RD_AZIDI_13	0,60465	0,42585	59818175	12,6921122	2,12178E-07	21,21781916
RD_AZIDI_14	0,63245	0,29005	62598175	8,820138945	1,40901E-07	14,0900896
RD_AZIDI_15	0,46025	0,1994	45378175	6,235497006	1,37412E-07	13,74118066
RD_AZIDI_16	0,89615	0,06785	88968175	2,484701119	2,7928E-08	2,792797671
RD_AZIDI_17	0,6134	0,02645	60693175	1,304291011	2,14899E-08	2,148991236
RD_AZIDI_18	0,5474	0,0795	54093175	2,816869664	5,20744E-08	5,207440059
RD_AZIDI_19	0,478	0,106	47153175	3,572446182	7,57626E-08	7,576257977
RD_AZIDI_20	0,53375	0,0566	52728175	2,163937503	4,10395E-08	4,103949175
RD_AZLTR_01	0,2473	0,0374	24083175	1,616500931	6,71216E-08	6,712158721
RD_AZLTR_02	0,3731	0,0613	36663175	2,297945414	6,26772E-08	6,267720714
RD_AZLTR_03	0,2182	0,03585	21173175	1,572306833	7,42594E-08	7,425937928
RD_AZLTR_04	0,3244	0,04065	31793175	1,709165976	5,37589E-08	5,375889561
RD_AZLTR_05	0,3408	0,04835	33433175	1,928710851	5,76885E-08	5,768853395
RD_AZLTR_06	0,32825	0,051	32178175	2,004268503	6,22866E-08	6,228658098
RD_AZLTR_07	0,35375	0,1832	34728175	5,773597398	1,66251E-07	16,6251103
RD_AZLTR_08	0,12345	0,0506	11698175	1,992863574	1,70357E-07	17,03567928
RD_AZLTR_09	0,18885	0,15225	18238175	4,891141049	2,68181E-07	26,81814957
RD_AZLTR_10	0,0405	0,03925	3403175	1,669248726	4,90497E-07	49,04974695
RD_AZLTR_11	0,0727	0,04745	6623175	1,903049762	2,87332E-07	28,7331946

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 3.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_AZIDI_01	0	0	0,053	17,18578	0,138516805	0,0109	0,0066054	83,88
RD_AZIDI_02	0	2	0,009	2,91834	0,023521722	0,2778	0,1683468	0,56
RD_AZIDI_03	0	0	0,001	0,32426	0,002613525	0,1811	0,1097466	0,10
RD_AZIDI_04	1	2	0,0011	0,356686	0,002874877	0,3533	0,2140998	0,05
RD_AZIDI_05	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZIDI_06	0	0	0,0012	0,389112	0,00313623	0,0003	0,0001818	69,00
RD_AZIDI_07	0	0	0,0063	2,042838	0,016465205	0,0739	0,0447834	1,47
RD_AZIDI_08	0	0	0,0007	0,226982	0,001829467	0,1627	0,0985962	0,07
RD_AZIDI_09	0	1	0,0041	1,329466	0,010715451	0,2557	0,1549542	0,28
RD_AZIDI_10	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZIDI_11	1	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZIDI_12	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_AZIDI_13	0	0	0,0223	7,230998	0,058281599	0,2813	0,1704678	1,37
RD_AZIDI_14	1	0	0,0015	0,48639	0,003920287	0,0664	0,0402384	0,39
RD_AZIDI_15	0	0	0,0064	2,075264	0,016726558	0,6809	0,4126254	0,16
RD_AZIDI_16	1	2	0,0207	6,712182	0,05409996	0,2943	0,1783458	1,21
RD_AZIDI_17	1	0	0,0133	4,312658	0,034759877	0,1335	0,080901	1,72
RD_AZIDI_18	1	0	0,002	0,64852	0,005227049	0,2098	0,1271388	0,16
RD_AZIDI_19	1	0	0,015	4,8639	0,039202869	0,1762	0,1067772	1,47
RD_AZIDI_20	1	0	0,0073	2,367098	0,01907873	0,2241	0,1358046	0,56
RD_AZLTR_01	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZLTR_02	0	0	0,0031	1,005206	0,008101926	0,1162	0,0704172	0,46
RD_AZLTR_03	0	0	0,0001	0,032426	0,000261352	0,0179	0,0108474	0,10
RD_AZLTR_04	0	0	0,0018	0,583668	0,004704344	0,0007	0,0004242	44,36
RD_AZLTR_05	0	2	2,356	763,95656	6,157464012	0,3718	0,2253108	109,32
RD_AZLTR_06	0	0	0,0021	0,680946	0,005488402	0,0178	0,0107868	2,04
RD_AZLTR_07	0	1	0,0252	8,171352	0,065860821	0,4396	0,2663976	0,99
RD_AZLTR_08	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_AZLTR_09	1	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZLTR_10	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZLTR_11	0	1	0	0	0	0	0	0

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 4.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_AZIDI_01	0,0092	1,5177	0,61	1	1	1
RD_AZIDI_02	0,1547	1,6264	9,51	1	1	1
RD_AZIDI_03	0,0147	1,1885	1,24	2	2	2
RD_AZIDI_04	0,0221	1,5864	1,39	2	2	2
RD_AZIDI_05	0,023	0,0408	56,37	1	1	0
RD_AZIDI_06	0,0175	0,558	3,14	1	1	1
RD_AZIDI_07	0,0321	0,1747	18,37	1	1	1
RD_AZIDI_08	0,0501	0,3598	13,92	2	2	2
RD_AZIDI_09	0,0369	1,1427	3,23	1	1	1
RD_AZIDI_10	0,0124	0,0497	24,95	0	0	0
RD_AZIDI_11	0,0327	1,3663	2,39	1	1	1
RD_AZIDI_12	0,1233	1,1415	10,80	0	0	0
RD_AZIDI_13	0,0386	0,5113	7,55	1	0	0
RD_AZIDI_14	0,0001	0,5302	0,02	0	0	0
RD_AZIDI_15	0,0152	1,3727	1,11	1	1	1
RD_AZIDI_16	0,0349	1,7379	2,01	1	1	1
RD_AZIDI_17	0,0132	0,4097	3,22	1	0	0
RD_AZIDI_18	0,0259	0,3631	7,13	1	0	0
RD_AZIDI_19	0,0018	0,4598	0,39	1	0	0
RD_AZIDI_20	0,0004	0,2564	0,16	1	0	0
RD_AZLTR_01	0,0001	0,0305	0,33	1	1	0
RD_AZLTR_02	0,0181	0,2841	6,37	1	1	1
RD_AZLTR_03	0,0675	0,7625	8,85	1	1	0
RD_AZLTR_04	0,0683	0,3442	19,84	1	1	1
RD_AZLTR_05	0,1024	1,6134	6,35	1	1	1
RD_AZLTR_06	0,0424	0,2516	16,85	1	0	0
RD_AZLTR_07	0,0285	0,5294	5,38	1	1	1
RD_AZLTR_08	0,048	0,0028	100,00	1	0	0
RD_AZLTR_09	0,0179	0,5165	3,47	1	1	1
RD_AZLTR_10	0,0013	0,0365	3,56	0	0	0
RD_AZLTR_11	0,0313	0,8843	3,54	1	1	1

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 5.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)		Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
								<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Rizos.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_12	317	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_13	318	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_14	319	A	A	I	E	C	IV
Rizos.	Azua	Los Tramojos	N18 25,397	W70 44,290	Banano	RD_AZLTR_15	320	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_01	225	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_02	226	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_03	227	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_04	228	B	B	J	F	A	XXVI
Rizos.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_05	336	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_06	23	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_07	24	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_08	26	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_09	28	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_10	30	A	A	I	E	C	IV
Rizos.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_11	310	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Azua	Proyecto Isura	N18 25,233	W70 50,254	Banano	RD_AZPIS_12	312	B	A	D	I	A	XIII
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_01	12	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_02	13	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_03	14	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_04	15	A	B	F	K	D	X
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_05	16	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_06	17	C	B	A	K	B	XXXII
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_07	18	A	A	A	A	A	I
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_08	19	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_09	20	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_10	21	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_11	22	A	A	A	A	A	I
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_12	233	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_13	234	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_14	235	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_15	236	B	B	J	F	A	XXVI

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 6.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_AZLTR_12		0		0	0	
RD_AZLTR_13		0		0	0	
RD_AZLTR_14	Gamma proteobacterias	1480	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951(T)	99,93	100	AB009457
RD_AZLTR_15		0		0	0	
RD_AZPIS_01	Gram positivas	1483	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,62	100	AB190217
RD_AZPIS_02		0		0	0	
RD_AZPIS_03		0		0	0	
RD_AZPIS_04	Gram positivas	1437	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613(T)	99,85	91,45	AJVF01000043
RD_AZPIS_05		0		0	0	
RD_AZPIS_06		0		0	0	
RD_AZPIS_07		0		0	0	
RD_AZPIS_08		0		0	0	
RD_AZPIS_09		0		0	0	
RD_AZPIS_10		0		0	0	
RD_AZPIS_11		0		0	0	
RD_AZPIS_12	Alfa proteobacterias	1409	<i>Brevundimonas olei</i> MJ15(T)	99,57	100	GQ250440
RD_AZPRC_01		0		0	0	
RD_AZPRC_02		0		0	0	
RD_AZPRC_03		0		0	0	
RD_AZPRC_04		0		0	0	
RD_AZPRC_05		0		0	0	
RD_AZPRC_06	Gamma proteobacterias	1433	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637(T)	99,79	97,28	AB008509
RD_AZPRC_07	Gamma proteobacterias	1424	<i>Pseudomonas otitidis</i> MCC10330(T)	99,86	97,33	AY953147
RD_AZPRC_08		0		0	0	
RD_AZPRC_09		0		0	0	
RD_AZPRC_10		0		0	0	
RD_AZPRC_11		0		0	0	
RD_AZPRC_12		0		0	0	
RD_AZPRC_13		0		0	0	
RD_AZPRC_14		0		0	0	
RD_AZPRC_15	Gram positivas	1491	<i>Bacillus sonorensis</i> NRRL B-23154(T)	99,06	100	AF302118

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 7.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_AZLTR_12	0,86405	0,0921	85758175	3,176124914	3,70358E-08	3,703582678
RD_AZLTR_13	0,63495	0,06755	62848175	2,476147423	3,93989E-08	3,939887551
RD_AZLTR_14	0,3755	0,05655	36903175	2,162511887	5,85996E-08	5,859961607
RD_AZLTR_15	0,69375	0,084	68728175	2,945175111	4,28525E-08	4,285251443
RD_AZPIS_01	0,02545	0,0483	1898175	1,927285235	1,01534E-06	101,5335907
RD_AZPIS_02	0,08545	0,0581	7898175	2,206705985	2,79394E-07	27,93944152
RD_AZPIS_03	0,0831	0,07625	7663175	2,724204619	3,55493E-07	35,54929412
RD_AZPIS_04	0,02825	0,06005	2178175	2,262305012	1,03862E-06	103,8624083
RD_AZPIS_05	0,712	0,0692	70553175	2,523192753	3,5763E-08	3,57629937
RD_AZPIS_06	0,4904	0,08705	48393175	3,032137691	6,26563E-08	6,265630827
RD_AZPIS_07	0,37025	0,136	36378175	4,427815826	1,21716E-07	12,17162715
RD_AZPIS_08	0,4025	0,079	39603175	2,802613503	7,07674E-08	7,076739437
RD_AZPIS_09	0,0357	0,05025	2923175	1,982884262	6,78332E-07	67,83323823
RD_AZPIS_10	0,37255	0,08805	36608175	3,060650012	8,36056E-08	8,360564307
RD_AZPIS_11	0,49265	0,0259	48618175	1,288609235	2,65047E-08	2,650468132
RD_AZPIS_12	0,65	0,04355	64353175	1,791851708	2,7844E-08	2,784402958
RD_AZPRC_01	0,2741	0,05345	26763175	2,07412369	7,74992E-08	7,749916407
RD_AZPRC_02	0,2287	0,02115	22223175	1,153175708	5,18907E-08	5,189068203
RD_AZPRC_03	0,42855	0,0547	42208175	2,109764092	4,99847E-08	4,998472671
RD_AZPRC_04	0,4276	0,04575	42113175	1,854578815	4,4038E-08	4,403797185
RD_AZPRC_05	0,3047	0,1003	29823175	3,40992595	1,14338E-07	11,43381263
RD_AZPRC_06	0,3261	0,05395	31963175	2,088379851	6,53371E-08	6,533705901
RD_AZPRC_07	0,4061	0,60995	39963175	17,94	4,48944E-07	44,89440735
RD_AZPRC_08	0,3623	0,0377	35583175	1,625054628	4,56692E-08	4,566918572
RD_AZPRC_09	0,55645	0,105	54998175	3,543933861	6,44373E-08	6,443729926
RD_AZPRC_10	0,414	0,0637	40753175	2,366374985	5,8066E-08	5,806602762
RD_AZPRC_11	0,2893	0,06365	28283175	2,364949369	8,36168E-08	8,361682764
RD_AZPRC_12	0,0705	0,01395	6403175	0,947886993	1,48034E-07	14,8033904
RD_AZPRC_13	0,029	0,0132	2253175	0,926502752	4,11199E-07	41,11987538
RD_AZPRC_14	0,0807	0,0833	7423175	2,925216486	3,94065E-07	39,40654081
RD_AZPRC_15	0,0346	0,0396	2813175	1,679228038	5,96916E-07	59,69155983

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 8.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_AZLTR_12	0	0	0,0544	17,639744	0,14217574	0,0551	0,0333906	17,03
RD_AZLTR_13	0	0	0,0113	3,664138	0,029532828	0,0066	0,0039996	29,54
RD_AZLTR_14	1	1	0,0387	12,548862	0,101143403	0,0227	0,0137562	29,41
RD_AZLTR_15	1	2	0,1971	63,911646	0,515125703	0,2341	0,1418646	14,52
RD_AZPIS_01	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZPIS_02	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_AZPIS_03	0	1	0,0013	0,421538	0,003397582	0,0199	0,0120594	0
RD_AZPIS_04	0	1	0,0011	0,356686	0,002874877	0,0009	0,0005454	21,08
RD_AZPIS_05	1	1	0,0648	21,012048	0,169356396	0,3514	0,2129484	3,18
RD_AZPIS_06	1	2	0,0021	0,680946	0,005488402	0,2046	0,1239876	0,18
RD_AZPIS_07	1	0	0,0013	0,421538	0,003397582	0,4294	0,2602164	0,05
RD_AZPIS_08	0	1	0,0042	1,361892	0,010976803	0,1276	0,0773256	0,57
RD_AZPIS_09	0	2	0	0	0	0	0	0
RD_AZPIS_10	1	1	0,0011	0,356686	0,002874877	0,1082	0,0655692	0,18
RD_AZPIS_11	0	1	0,0302	9,792652	0,078928444	0,2235	0,135441	2,33
RD_AZPIS_12	0	1	0,0232	7,522832	0,060633771	0,0164	0,0099384	24,40
RD_AZPRC_01	0	0	0,0009	0,291834	0,002352172	0,0021	0,0012726	7,39
RD_AZPRC_02	1	0	0,0069	2,237394	0,01803332	0,0234	0,0141804	5,09
RD_AZPRC_03	0	2	0,0035	1,13491	0,009147336	0,0998	0,0604788	0,60
RD_AZPRC_04	1	0	0,0012	0,389112	0,00313623	0,1733	0,1050198	0,12
RD_AZPRC_05	0	1	0,0022	0,713372	0,005749754	0,2456	0,1488336	0,15
RD_AZPRC_06	0	1	0,021	6,80946	0,054884017	0,0507	0,0307242	7,15
RD_AZPRC_07	0	0	0,0148	4,799048	0,038680164	0,0367	0,0222402	6,96
RD_AZPRC_08	0	1	0,0081	2,626506	0,021169549	0,0787	0,0476922	1,78
RD_AZPRC_09	0	1	0,001	0,32426	0,002613525	0,0284	0,0172104	0,61
RD_AZPRC_10	0	0	0,0025	0,81065	0,006533812	0,012	0,007272	3,59
RD_AZPRC_11	1	2	0,0018	0,583668	0,004704344	0,1654	0,1002324	0,19
RD_AZPRC_12	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZPRC_13	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_AZPRC_14	0	2	0	0	0	0	0	0
RD_AZPRC_15	0	3	0	0	0	0	0	0

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 9.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_AZLTR_12	0,0029	0,8704	0,33	1	1	1
RD_AZLTR_13	0,0126	0,913	1,38	1	1	1
RD_AZLTR_14	0,0149	1,3828	1,08	2	2	2
RD_AZLTR_15	0,1089	1,4471	7,53	2	2	2
RD_AZPIS_01	0,0147	0,0344	42,73	0	0	0
RD_AZPIS_02	0,0184	0,5077	3,62	1	0	0
RD_AZPIS_03	0,0303	0,0939	32,27	1	0	0
RD_AZPIS_04	0,0372	1,0785	3,45	1	1	1
RD_AZPIS_05	0,0403	1,4241	2,83	1	1	1
RD_AZPIS_06	0,0216	1,8003	1,20	1	1	1
RD_AZPIS_07	0,0449	1,5648	2,87	1	1	0
RD_AZPIS_08	0,0521	1,7595	2,96	1	1	1
RD_AZPIS_09	0,0152	1,4103	1,08	2	2	2
RD_AZPIS_10	0,0385	1,8069	2,13	1	1	1
RD_AZPIS_11	0,0564	0,8532	6,61	1	1	1
RD_AZPIS_12	0,0041	0,6398	0,64	1	0	0
RD_AZPRC_01	0,1487	0,0782	100,00	1	1	1
RD_AZPRC_02	0,0191	0,1232	15,50	1	1	1
RD_AZPRC_03	0,0282	1,383	2,04	2	2	2
RD_AZPRC_04	0,0136	0,0885	15,37	0	0	0
RD_AZPRC_05	0,0147	1,5317	0,96	1	1	1
RD_AZPRC_06	0,0125	0,1773	7,05	1	1	1
RD_AZPRC_07	0,0012	1,3188	0,09	1	1	1
RD_AZPRC_08	0,0508	0,1237	41,07	1	1	1
RD_AZPRC_09	0,0699	1,3768	5,08	1	1	1
RD_AZPRC_10	0,055	0,1949	28,22	2	2	2
RD_AZPRC_11	0,0187	0,5955	3,14	1	1	1
RD_AZPRC_12	0,0208	0,0528	39,39	0	0	0
RD_AZPRC_13	0,0355	1,3085	2,71	1	1	1
RD_AZPRC_14	0,0227	0,9858	2,30	1	1	1
RD_AZPRC_15	0,0171	1,3541	1,26	1	1	1

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 10.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)	Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA						
							BanI	EcoRI	HinfI	Sau3AI	StuI	Grupo	
Endof.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_16	241	B	B	J	F	A	XXVI
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_17	332	B	B	E	L	B	XX
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_18	333	B	B	E	L	B	XX
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_19	334	B	B	B	B	B	XV
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_20	335	B	B	E	L	B	XX
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_21	337	A	A	I	E	C	IV
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_22	305	A	A	A	A	D	II
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_23	306	D	B	A	J	A	XXXVI
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_24	307	C	B	A	G	B	XXXI
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_25	308	D	A	J	J	D	XXXV
Rizos.	Azua	Proyecto 2C	N18 22,357	W70 50,410	Banano	RD_AZPRC_26	309	D	A	J	J	D	XXXV
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_01	31	C	B	A	G	B	XXXI
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_02	32	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_03	33	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_04	34	C	B	A	G	B	XXXI
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_05	35	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_06	37	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_07	38	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_08	183	D	B	G	C	D	XXXVIII
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_09	184	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_10	185	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_11	186	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_12	187	B	B	D	C	A	XVII
Rizos.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_13	313	C	B	A	G	B	XXXI
Rizos.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_14	315	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Azua	Pueblo Viejo	N18 24,006	W70 46,001	Banano	RD_AZPVI_15	316	A	B	B	B	B	VII
Endof.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_01	138	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_02	139	B	B	J	D	D	XXV
Endof.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_03	140	A	B	B	B	A	VI
Endof.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_04	141	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_05	206	B	B	D	C	A	XVII

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 11.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_AZPRC_16		0		0	0	
RD_AZPRC_17	Gamma proteobacterias	1437	<i>Pantoea cyripedii</i> ATCC 29267(T)	98,61	98,16	U80201
RD_AZPRC_18		0		0	0	
RD_AZPRC_19	Gamma proteobacterias	1448	<i>Enterobacter soli</i> LF7a(T)	99,17	99,05	CP003026
RD_AZPRC_20	Gamma proteobacterias	1393	<i>Pantoea cyripedii</i> ATCC 29267(T)	98,55	95,36	U80201
RD_AZPRC_21		0		0	0	
RD_AZPRC_22	Gamma proteobacterias	1462	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LMG 1242(T)	99,93	99,8	Z76651
RD_AZPRC_23		0		0	0	
RD_AZPRC_24		0		0	0	
RD_AZPRC_25	Alfa proteobacterias	1405	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> CCUG 46016(T)	99,79	99,72	AM180485
RD_AZPRC_26	Alfa proteobacterias	1413	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> CCUG 46016(T)	99,86	100	AM180485
RD_AZPVI_01	Gamma proteobacterias	1434	<i>Pseudomonas beteli</i> ATCC 19861(T)	99,71	97,35	AB021406
RD_AZPVI_02		0		0	0	
RD_AZPVI_03	Gram positivas	1479	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,62	99,73	AB190217
RD_AZPVI_04	Gamma proteobacterias	1463	<i>Pseudomonas beteli</i> ATCC 19861(T)	99,72	98,99	AB021406
RD_AZPVI_05	Gamma proteobacterias	1462	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951(T)	99,93	99,66	AB009457
RD_AZPVI_06		0		0	0	
RD_AZPVI_07		0		0	0	
RD_AZPVI_08	Alfa proteobacterias	1403	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,71	99,57	AJ389904
RD_AZPVI_09		0		0	0	
RD_AZPVI_10	Gram positivas	1481	<i>Bacillus sonorensis</i> NRRL B-23154(T)	99,19	100	AF302118
RD_AZPVI_11	Gram positivas	1481	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429(T)	99,8	100	AMXN01000021
RD_AZPVI_12		0		0	0	
RD_AZPVI_13		0		0	0	
RD_AZPVI_14		0		0	0	
RD_AZPVI_15		0		0	0	
RD_DACAR_01	Gram positivas	1451	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22(T)	99,58	97,98	EF114313
RD_DACAR_02	Beta proteobacterias	1468	<i>Burkholderia metallica</i> R-16017(T)	99,45	100	AM747632
RD_DACAR_03	Gamma proteobacterias	1465	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603(T)	100	99,73	DQ504305
RD_DACAR_04		0		0	0	
RD_DACAR_05	Gram positivas	1487	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792(T)	99,6	100	ACNF01000156

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 12.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_AZPRC_16	0,06555	0,1178	5908175	3,908891576	6,61607E-07	66,16072773
RD_AZPRC_17	0,4038	0,08045	39733175	2,843956369	7,15764E-08	7,157636835
RD_AZPRC_18	0,43	0,0854	42353175	2,985092361	7,0481E-08	7,048095829
RD_AZPRC_19	0,3339	0,04805	32743175	1,920157155	5,8643E-08	5,864297383
RD_AZPRC_20	0,56875	0,10865	56228175	3,648003834	6,48786E-08	6,487857439
RD_AZPRC_21	0,7162	0,0924	70973175	3,184678611	4,48716E-08	4,487158156
RD_AZPRC_22	1,0008	0,186	99433175	5,853431898	5,8868E-08	5,886799751
RD_AZPRC_23	0,32555	0,2202	31908175	6,828553292	2,14006E-07	21,40063884
RD_AZPRC_24	0,7189	0,1711	71243175	5,428598309	7,61982E-08	7,619815244
RD_AZPRC_25	0,66745	0,33965	66098175	10,23435009	1,54836E-07	15,48355925
RD_AZPRC_26	0,7624	0,28785	75593175	8,757411838	1,15849E-07	11,58492395
RD_AZPVI_01	0,29955	0,06685	29308175	2,456188798	8,38056E-08	8,380558659
RD_AZPVI_02	0,24925	0,0551	24278175	2,121169021	8,73694E-08	8,736937685
RD_AZPVI_03	0,3065	0,05725	30003175	2,182470512	7,27413E-08	7,274131861
RD_AZPVI_04	0,312	0,0754	30553175	2,699969146	8,83695E-08	8,836951139
RD_AZPVI_05	0,31345	0,13715	30698175	4,460604996	1,45305E-07	14,53052175
RD_AZPVI_06	0,2513	0,0354	24483175	1,559476288	6,36958E-08	6,369583554
RD_AZPVI_07	0,3042	0,0547	29773175	2,109764092	7,08612E-08	7,086123976
RD_AZPVI_08	0,527	0,1082	52053175	3,63517329	6,98358E-08	6,983576486
RD_AZPVI_09	0,298	0,04425	29153175	1,811810333	6,2148E-08	6,214795929
RD_AZPVI_10	0,4064	0,0141	39993175	0,952163841	2,38082E-08	2,38081583
RD_AZPVI_11	0,10185	0,02675	9538175	1,312844708	1,37641E-07	13,76410799
RD_AZPVI_12	0,5079	0,03665	50143175	1,59511669	3,18112E-08	3,181124231
RD_AZPVI_13	0,53855	0,0213	53208175	1,157452556	2,17533E-08	2,175328426
RD_AZPVI_14	0,92305	0,04135	91658175	1,729124601	1,88649E-08	1,886492504
RD_AZPVI_15	0,92715	0,03745	92068175	1,617926547	1,75731E-08	1,757313586
RD_DACAR_01	0,34255	0,03815	33608175	1,637885172	4,87347E-08	4,873472517
RD_DACAR_02	0,11125	0,05595	10478175	1,254394449	2,0475E-07	20,47498247
RD_DACAR_03	0,04765	0,0464	4118175	1,873111824	4,5484E-07	45,48402689
RD_DACAR_04	0,3236	0,0581	31713175	2,206705985	6,95833E-08	6,958325633
RD_DACAR_05	0,07565	0,08095	6918175	2,85821253	4,13145E-07	41,3145451

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 13.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_AZPRC_16	0	1	0,0309	10,019634	0,080757911	0,0199	0,0120594	26,79
RD_AZPRC_17	1	0	0,0046	1,491596	0,012022213	0,2019	0,1223514	0,39
RD_AZPRC_18	1	0	0,4509	146,208834	1,178438253	0,269	0,163014	28,92
RD_AZPRC_19	1	0	0,6296	204,154096	1,645475103	0,2318	0,1404708	46,86
RD_AZPRC_20	1	1	0,6143	199,192918	1,605488176	0,2109	0,1278054	50,25
RD_AZPRC_21	1	1	0,039	12,64614	0,10192746	0,0832	0,0504192	8,09
RD_AZPRC_22	1	0	0,0198	6,420348	0,051747788	0,2685	0,162711	1,27
RD_AZPRC_23	0	1	0	0	0	0	0	
RD_AZPRC_24	0	0	0,0049	1,588874	0,012806271	0,0519	0,0314514	1,63
RD_AZPRC_25	0	1	0,0004	0,129704	0,00104541	0,3186	0,1930716	0,02
RD_AZPRC_26	0	1	0,0107	3,469582	0,027964713	0,2938	0,1780428	0,63
RD_AZPVI_01	0	0	0,0029	0,940354	0,007579221	0,0732	0,0443592	0,68
RD_AZPVI_02	0	0	0,0218	7,068868	0,056974837	0,0072	0,0043632	52,23
RD_AZPVI_03	0	0	0,0049	1,588874	0,012806271	0,0041	0,0024846	20,62
RD_AZPVI_04	0	0	0,0053	1,718578	0,013851681	0,0593	0,0359358	1,54
RD_AZPVI_05	1	2	0,0223	7,230998	0,058281599	0,2171	0,1315626	1,77
RD_AZPVI_06	0	2	0,0015	0,48639	0,003920287	0,0255	0,015453	1,01
RD_AZPVI_07	1	1	0,0011	0,356686	0,002874877	0,0405	0,024543	0,47
RD_AZPVI_08	0	2	0,0481	15,596906	0,125710534	0,0675	0,040905	12,29
RD_AZPVI_09	0	1	0	0	0	0	0	
RD_AZPVI_10	0	1 B	0,0062	2,010412	0,016203853	0,0008	0,0004848	133,70
RD_AZPVI_11	0	2 B	0,0218	7,068868	0,056974837	0,0442	0,0267852	8,51
RD_AZPVI_12	0	0	0,0038	1,232188	0,009931394	0,0715	0,043329	0,92
RD_AZPVI_13	0	1	0,0804	26,070504	0,21012738	0,3488	0,2113728	3,98
RD_AZPVI_14	0	0	0,0659	21,368734	0,172231273	0,1518	0,0919908	7,49
RD_AZPVI_15	0	1	0,0308	9,987208	0,080496558	0,3245	0,196647	1,64
RD_DACAR_01	0	1	0,1804	58,496504	0,471479842	0,0781	0,0473286	39,85
RD_DACAR_02	1	3	0,1852	60,052952	0,48402476	0,1973	0,1195638	1,14
RD_DACAR_03	0	0	0,0111	3,599286	0,029010123	0,3863	0,2340978	0,50
RD_DACAR_04	0	0	0,071	23,02246	0,185560248	0,0534	0,0323604	22,94
RD_DACAR_05	0	2	0,0387	12,548862	0,101143403	0,0558	0,0338148	11,96

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 14.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_AZPRC_16	0,0718	0,9432	7,61	1	1	1
RD_AZPRC_17	0,0527	0,2887	18,25	1	1	1
RD_AZPRC_18	0,0402	0,2746	14,64	1	1	1
RD_AZPRC_19	0,0339	0,5626	6,03	2	2	2
RD_AZPRC_20	0,0373	0,2208	16,89	1	1	1
RD_AZPRC_21	0,0001	1,5628	0,01	1	1	1
RD_AZPRC_22	0,0112	1,9986	0,56	1	1	1
RD_AZPRC_23	0,0134	1,67	0,80	1	1	1
RD_AZPRC_24	0,0014	1,5805	0,09	1	1	1
RD_AZPRC_25	0,0637	1,563	4,08	1	1	1
RD_AZPRC_26	0,0109	1,2864	0,85	1	1	0
RD_AZPVI_01	0,0413	0,0148	100,00	1	1	1
RD_AZPVI_02	0,0326	1,6177	2,02	1	1	1
RD_AZPVI_03	0,034	0,0635	53,54	2	2	2
RD_AZPVI_04	0,0168	0,0194	86,60	1	1	1
RD_AZPVI_05	0,023	1,5629	1,47	1	1	1
RD_AZPVI_06	0,0252	0,223	11,30	1	0	0
RD_AZPVI_07	0,0192	0,5022	3,82	1	1	1
RD_AZPVI_08	0,0937	1,378	6,80	1	1	1
RD_AZPVI_09	0,0251	0,0006	100,00	0	0	0
RD_AZPVI_10	0,0067	0,8918	0,75	1	1	1
RD_AZPVI_11	0,0424	1,0298	4,12	1	1	1
RD_AZPVI_12	0,0712	0,0008	100,00	1	0	0
RD_AZPVI_13	0,0487	1,4996	3,25	1	1	0
RD_AZPVI_14	0,0276	0,6072	4,55	1	1	1
RD_AZPVI_15	0,0001	1,6313	0,01	1	1	1
RD_DACAR_01	0,0169	0,8747	1,93	1	0	0
RD_DACAR_02	0,0005	0,0743	0,67	1	1	1
RD_DACAR_03	0,0129	1,4336	0,90	1	1	1
RD_DACAR_04	0,0412	0,4555	9,05	1	0	0
RD_DACAR_05	0,0236	0,0085	100,00	1	1	1

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 15.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)		Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
								<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Rizos.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_06	286	B	B	K	D	D	XXX
Rizos.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_07	288	A	B	B	B	B	VII
Rizos.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_08	290	D	B	D	K	D	XXXVII
Rizos.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_09	291	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Dajabón	Carrizal	N19 20.887	W71 37.056	Banano	RD_DACAR_10	292	C	B	A	G	B	XXXI
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_01	143	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_02	144	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_03	145	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_04	146	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_05	147	C	B	A	K	B	XXXII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_06	148	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_07	150	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_08	151	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_09	152	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_10	153	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_11	154	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_12	155	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_13	212	B	B	J	B	A	XXI
Endof.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_14	213	B	B	J	B	A	XXI
Rizos.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_15	293	A	B	H	B	B	XI
Rizos.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_16	294	A	A	I	E	C	IV
Rizos.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_17	295	A	B	B	B	E	VIII
Rizos.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_18	296	C	B	A	G	B	XXXI
Rizos.	Dajabón	Rabisal	N19 16.404	W71 33.583	Banano	RD_DARAB_19	297	D	B	A	J	A	XXXVI
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_01	156	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_02	157	C	B	A	G	B	XXXI
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_03	159	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_04	160	A	B	B	B	B	VII
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_05	162	A	B	B	B	B	VII
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_06	202	B	B	D	H	A	XVIII
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_07	203	B	B	J	I	A	XXIX

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 16.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_DACAR_06	Beta proteobacterias	1457	<i>Burkholderia diffusa</i> R-15930(T)	99,86	100	AM747629
RD_DACAR_07		0		0	0	
RD_DACAR_08	Alfa proteobacterias	1426	<i>Ochrobactrum intermedium</i> LMG 3301(T)	99,72	99,93	ACQA01000003
RD_DACAR_09		0		0	0	
RD_DACAR_10		0		0	0	
RD_DARAB_01	Gram positivas	1491	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792(T)	99,6	100	ACNF01000156
RD_DARAB_02	Gram positivas	1477	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,69	99,73	EF114313
RD_DARAB_03		0		0	0	
RD_DARAB_04	Gram positivas	1466	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792(T)	99,66	99,19	ACNF01000156
RD_DARAB_05	Gamma proteobacterias	1430	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637(T)	99,51	97,35	AB008509
RD_DARAB_06		0		0	0	
RD_DARAB_07	Gram positivas	1457	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(T)	99,03	98,12	AE017333
RD_DARAB_08		0		0	0	
RD_DARAB_09		0		0	0	
RD_DARAB_10		0		0	0	
RD_DARAB_11		0		0	0	
RD_DARAB_12	Gamma proteobacterias	1455	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751(T)	99,93	99,59	
RD_DARAB_13		0		0	0	
RD_DARAB_14		0		0	0	
RD_DARAB_15	Gamma proteobacterias	1471	<i>Citrobacter youngae</i> CECT 5335(T)	99,68	100	AJ564736
RD_DARAB_16	Gamma proteobacterias	1473	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751(T)	99,52	100	EU103629
RD_DARAB_17	Gamma proteobacterias	1450	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1(T)	99,72	98,98	EU036987
RD_DARAB_18	0	0		0	0	
RD_DARAB_19	0	0		0	0	
RD_DAROS_01	Gamma proteobacterias	1466	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951(T)	99,93	100	AB009457
RD_DAROS_02	0	0		0	0	
RD_DAROS_03	0	0		0	0	
RD_DAROS_04	Gamma proteobacterias	1386	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSM 16688(T)	99,28	94,54	AJ853891
RD_DAROS_05	Gamma proteobacterias	1385	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM 6051(T)	99,71	94,81	AB004744
RD_DAROS_06	Gram positivas	1485	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9(T)	99,55	100	FJ477040
RD_DAROS_07	0	0		0	0	

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 17.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_DACAR_06	1,19395	0,1372	118748175	4,462030612	3,75756E-08	3,75755721
RD_DACAR_07	1,27005	0,126	126358175	4,142692611	3,27853E-08	3,278531533
RD_DACAR_08	0,63665	0,0733	63018175	2,640093271	4,18942E-08	4,189415627
RD_DACAR_09	0,53325	0,15705	52678175	5,028000192	9,54475E-08	9,54475016
RD_DACAR_10	0,64735	0,0327	64088175	1,48249302	2,31321E-08	2,313208358
RD_DARAB_01	0,28295	0,044	27648175	1,804682253	6,52731E-08	6,527310583
RD_DARAB_02	0,3515	0,05445	34503175	2,102636012	6,09404E-08	6,094036308
RD_DARAB_03	0,28365	0,04835	27718175	1,928710851	6,95829E-08	6,958289465
RD_DARAB_04	0,4296	0,06025	42313175	2,268007476	5,36005E-08	5,36005033
RD_DARAB_05	0,223	0,0477	21653175	1,910177842	8,8217E-08	8,821698629
RD_DARAB_06	0,30585	0,05825	29938175	2,210982833	7,38516E-08	7,385162367
RD_DARAB_07	0,28485	0,0513	27838175	2,012822199	7,23044E-08	7,230438774
RD_DARAB_08	0,1479	0,0302	14143175	1,411212217	9,97804E-08	9,978043945
RD_DARAB_09	0,22045	0,05885	21398175	2,228090226	1,04125E-07	10,41252456
RD_DARAB_10	0,307	0,06235	30053175	2,327883351	7,74588E-08	7,745881596
RD_DARAB_11	0,4707	0,105	46423175	3,543933861	7,63398E-08	7,633975619
RD_DARAB_12	0,3737	0,0719	36723175	0,81102785	7,08048E-08	7,080477168
RD_DARAB_13	0,04325	0,0414	3678175	1,730550217	4,70492E-07	47,04915391
RD_DARAB_14	0,07295	0,03575	6648175	1,569455601	2,36073E-07	23,6073148
RD_DARAB_15	0,5503	0,1133	54383175	3,780586129	6,95176E-08	6,951756916
RD_DARAB_16	0,3718	0,0562	36533175	2,152532574	5,89199E-08	5,891994261
RD_DARAB_17	0,9893	0,02615	98283175	1,295737315	1,31837E-08	1,318371445
RD_DARAB_18	0,3467	0,0152	34023175	0,983527395	2,89076E-08	2,890757241
RD_DARAB_19	0,42455	0,10385	41808175	3,511144691	8,39823E-08	8,398225207
RD_DAROS_01	0,35065	0,1737	34418175	5,502730345	1,59879E-07	15,98786207
RD_DAROS_02	0,3134	0,0461	30693175	1,864558128	6,07483E-08	6,074829755
RD_DAROS_03	0,23185	0,0484	22538175	1,930136467	8,56385E-08	8,563854292
RD_DAROS_04	0,617	0,24835	61053175	2,028503976	1,24992E-07	12,49922734
RD_DAROS_05	0,4851	0,205	47863175	6,395166006	1,33613E-07	13,36134932
RD_DAROS_06	0,09835	0,1199	9188175	3,968767451	4,31943E-07	43,19429539
RD_DAROS_07	0,06975	0,0604	6328175	2,272284324	3,59074E-07	35,90741919

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 18.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_DACAR_06	0	3	0,0561	18,190986	0,146618731	0,1797	0,1088982	5,39
RD_DACAR_07	0	1	0,0311	10,084486	0,081280616	0,1672	0,1013232	3,21
RD_DACAR_08	0	0	0,0094	3,048044	0,024567131	0,1587	0,0961722	1,02
RD_DACAR_09	0	1	0,0405	13,13253	0,105847747	0,2064	0,1250784	3,39
RD_DACAR_10	0	0	0,0404	13,100104	0,105586395	0,3142	0,1904052	2,22
RD_DARAB_01	0	0	0,0446	14,461996	0,116563198	0,0444	0,0269064	17,33
RD_DARAB_02	0	0	0,0176	5,706976	0,045998033	0,0185	0,011211	16,41
RD_DARAB_03	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_DARAB_04	0	0	0,1332	43,191432	0,34812148	0,0203	0,0123018	113,19
RD_DARAB_05	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_DARAB_06	0	0	0,0967	31,355942	0,252727831	0,0008	0,0004848	0
RD_DARAB_07	0	2	0	0	0	0	0	0
RD_DARAB_08	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_DARAB_09	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_DARAB_10	0	0	0,0209	6,777034	0,054622665	0,1286	0,0779316	2,80
RD_DARAB_11	0	2	0,0327	10,603302	0,085462255	0,194	0,117564	2,91
RD_DARAB_12	1	1	0,8845	286,80797	2,311662529	0,12	0,07272	0
RD_DARAB_13	0	1 B	0,0349	11,316674	0,091212009	0,1153	0,0698718	5,22
RD_DARAB_14	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_DARAB_15	0	0	0,0645	20,91477	0,168572338	0,0638	0,0386628	17,44
RD_DARAB_16	1	1	0,1661	53,859586	0,43410644	0,1125	0,068175	25,47
RD_DARAB_17	0	1	0,0969	31,420794	0,253250536	0,0156	0,0094536	107,16
RD_DARAB_18	0	0	0,0058	1,880708	0,015158443	0,1295	0,078477	0,77
RD_DARAB_19	0	0	0,0174	5,642124	0,045475328	0,0878	0,0532068	3,42
RD_DAROS_01	0	0	0,073	23,67098	0,190787297	0,1737	0,1052622	7,25
RD_DAROS_02	0	0	0,1281	41,537706	0,334792504	0,2692	0,1631352	8,21
RD_DAROS_03	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_DAROS_04	0	2	0,0475	15,40235	0,12414242	0,1979	0,1199274	6,35
RD_DAROS_05	0	1	0,0486	15,759036	0,127017297	0,003	0,001818	150,01
RD_DAROS_06	0	0	0,1306	42,348356	0,341326316	0,2098	0,1271388	10,74
RD_DAROS_07	0	0	0,0052	1,686152	0,013590328	0,0596	0,0361176	1,51

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 19.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_DACAR_06	0,0754	0,3859	19,54	2	2	2
RD_DACAR_07	0,0006	1,3274	0,05	1	1	1
RD_DACAR_08	0,0229	1,2554	1,82	1	1	1
RD_DACAR_09	0,0001	0,0008	12,50	1	1	1
RD_DACAR_10	0,0142	0,0246	57,72	1	1	1
RD_DARAB_01	0,0256	1,1627	2,20	0	0	0
RD_DARAB_02	0,247	0,7838	31,51	1	1	0
RD_DARAB_03	0,1295	1,5909	8,14	0	0	0
RD_DARAB_04	0,1315	0,1216	100,00	1	0	0
RD_DARAB_05	0,0002	1,5919	0,01	1	1	1
RD_DARAB_06	0,0058	1,1975	0,48	1	1	1
RD_DARAB_07	0,0087	1,1909	0,73	1	1	1
RD_DARAB_08	0,0138	0,0473	29,18	1	1	0
RD_DARAB_09	0,0006	0,2225	0,27	1	1	1
RD_DARAB_10	0,0132	1,1551	1,14	1	1	1
RD_DARAB_11	0,0578	1,8189	3,18	1	1	1
RD_DARAB_12	0,0105	0,4587	2,29	1	1	1
RD_DARAB_13	0,1244	1,479	8,41	1	1	1
RD_DARAB_14	0,0479	0,9741	4,92	1	0	0
RD_DARAB_15	0,0261	0,5307	4,92	2	2	2
RD_DARAB_16	0,0372	0,7365	5,05	2	2	2
RD_DARAB_17	0,0004	1,7615	0,02	1	1	1
RD_DARAB_18	0,0009	1,3512	0,07	1	1	1
RD_DARAB_19	0,0072	1,5864	0,45	1	1	1
RD_DAROS_01	0,0757	1,7262	4,39	1	0	0
RD_DAROS_02	0,0466	1,4539	3,21	1	0	0
RD_DAROS_03	0,0011	0,8658	0,13	1	1	1
RD_DAROS_04	0,0119	1,7152	0,69	1	1	1
RD_DAROS_05	0,0432	1,5286	2,83	1	1	1
RD_DAROS_06	0,0231	0,6962	3,32	0	0	0
RD_DAROS_07	0,0459	0,8176	5,61	1	1	1

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 20.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)		Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
								<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_08	218	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_09	219	B	B	D	C	A	XVII
Rizos.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_10	298	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_11	299	A	A	I	E	C	IV
Rizos.	Dajabón	La Rosa	N19 16.897	W71 33.990	Banano	RD_DAROS_12	300	C	B	A	K	B	XXXII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_01	47	A	B	B	B	B	VII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_02	48	C	B	A	G	B	XXXI
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_03	49	B	B	J	D	A	XXIV
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_04	50	B	B	J	D	A	XXIV
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_05	51	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_06	54	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_07	55	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_08	56	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_09	57	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_10	58	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_11	59	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_12	60	B	B	D	H	A	XVIII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_13	163	B	B	J	I	A	XXIX
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_14	164	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_15	166	E	A	A	G	D	XL
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_16	188	B	B	J	I	A	XXIX
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_17	189	D	B	G	J	D	XXXIX
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_18	191	B	B	J	I	A	XXIX
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_19	192	B	B	A	I	A	XIV
Endof.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_20	193	B	B	J	B	A	XXI
Rizos.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_21	244	D	A	J	J	D	XXXV
Rizos.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_22	246	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_23	248	D	A	A	J	D	XXXIV
Rizos.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_24	321	A	B	F	K	D	X
Rizos.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_25	322	A	B	F	K	D	X
Rizos.	Mao	Amina 1	N19 33.440	W71 00.400	Banano	RD_MAAMIA_26	323	A	B	F	K	D	X

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 21.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_DAROS_08		0		0	0	
RD_DAROS_09	Gram positivas	1468	<i>Bacillus anthracis</i> Ames	99,86	99,93	AE016879
RD_DAROS_10		0		0	0	
RD_DAROS_11		0		0	0	
RD_DAROS_12		0		0	0	
RD_MAAMIA_01	Gamma proteobacterias	1464	<i>Leclercia adecarboxylata</i> GTC 1267(T)	99,18	99,86	AB273740
RD_MAAMIA_02	Gamma proteobacterias	1437	<i>Luteimonas aestuarii</i> B9(T)	98,29	97,56	EF660758
RD_MAAMIA_03	Beta proteobacterias	1420	<i>Comamonas testosteroni</i> ATCC 11996(T)	99,93	97,19	AHIL01000001
RD_MAAMIA_04		0		0	0	
RD_MAAMIA_05	Gamma proteobacterias	1462	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951(T)	99,86	100	AB009457
RD_MAAMIA_06		0		0	0	
RD_MAAMIA_07		0		0	0	
RD_MAAMIA_08		0		0	0	
RD_MAAMIA_09	Gamma proteobacterias	1440	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> DSM 14399(T)	99,44	98,63	AM088474
RD_MAAMIA_10		0		0	0	
RD_MAAMIA_11		0		0	0	
RD_MAAMIA_12		0		0	0	
RD_MAAMIA_13	Gram positivas	1350	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b(T)	99,93	91,41	AJ831842
RD_MAAMIA_14	Gram positivas	1484	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,62	100	AB190217
RD_MAAMIA_15	Gamma proteobacterias	1453	<i>Pseudoxanthomonas indica</i> P15(T)	99,21	98,51	EF424397
RD_MAAMIA_16	Gram positivas	1444	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K(T)	99,38	98,1	AJ831844
RD_MAAMIA_17		0		0	0	
RD_MAAMIA_18	Gram positivas	1470	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K(T)	99,52	99,46	AJ831844
RD_MAAMIA_19	Gram positivas	1348	<i>Bacillus kochii</i> WCC 4582(T)	99,93	91,3	FN995265
RD_MAAMIA_20	Gram positivas	1477	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42(T)	99,8	100	CP000560
RD_MAAMIA_21	Alfa proteobacterias	1410	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> CCUG 46016(T)	99,93	99,79	AM180485
RD_MAAMIA_22	Gamma proteobacterias	1474	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637(T)	99,8	100	
RD_MAAMIA_23		0		0	0	
RD_MAAMIA_24	Gamma proteobacterias	1477	<i>Acinetobacter parvus</i> DSM 16617(T)	97,97	100	AIEB01000124
RD_MAAMIA_25		0		0	0	
RD_MAAMIA_26		0		0	0	

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 22.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_DAROS_08	0,0663	0,0383	5983175	1,64216202	2,74463E-07	27,44633109
RD_DAROS_09	0,02285	0,0911	1638175	3,147612593	1,92141E-06	192,141413
RD_DAROS_10	0,56445	0,0437	55798175	1,796128556	3,21897E-08	3,21897366
RD_DAROS_11	0,60265	0,07355	59618175	2,647221351	4,44029E-08	4,440292497
RD_DAROS_12	0,5698	0,03965	56333175	1,680653654	2,98342E-08	2,983417239
RD_MAAMIA_01	0,56415	0,1854	55768175	5,836324505	1,04653E-07	10,46533172
RD_MAAMIA_02	0,25915	0,0045	25268175	0,678445556	2,68498E-08	2,684980437
RD_MAAMIA_03	0,30745	0,03885	30098175	1,657843797	5,50812E-08	5,508120666
RD_MAAMIA_04	0,2946	0,04135	28813175	1,729124601	6,00116E-08	6,001159542
RD_MAAMIA_05	0,2259	0,0891	21943175	3,09058795	1,40845E-07	14,08450669
RD_MAAMIA_06	0,4379	0,05675	43143175	2,168214351	5,02563E-08	5,025625377
RD_MAAMIA_07	0,2083	0,06845	20183175	2,501808512	1,23955E-07	12,39551514
RD_MAAMIA_08	0,30745	0,05785	30098175	2,199577905	7,30801E-08	7,308010884
RD_MAAMIA_09	0,1087	0,02625	10223175	1,298588547	1,27024E-07	12,70239967
RD_MAAMIA_10	0,1948	0,0599	18833175	2,258028164	1,19896E-07	11,98963087
RD_MAAMIA_11	0,17335	0,057	16688175	2,175342432	1,30352E-07	13,03523262
RD_MAAMIA_12	0,2108	0,0601	20433175	2,263730628	1,10787E-07	11,0787023
RD_MAAMIA_13	0,03895	0,05665	3248175	2,165363119	6,6664E-07	66,6639919
RD_MAAMIA_14	0,1638	0,0322	15733175	1,46823686	9,33211E-08	9,332107852
RD_MAAMIA_15	0,1319	0,0495	12543175	1,961500021	1,5638E-07	15,63798656
RD_MAAMIA_16	0,46415	0,02555	45768175	1,278629922	2,79371E-08	2,793709651
RD_MAAMIA_17	0,23455	0,00475	22808175	0,685573636	3,00582E-08	3,005824166
RD_MAAMIA_18	0,1078	0,00915	10133175	2,600176021	8,00369E-08	8,003689369
RD_MAAMIA_19	0,3765	0,0753	37003175	2,697117914	7,28888E-08	7,288882411
RD_MAAMIA_20	0,00725	0,03045	78175	1,418340297	1,81431E-05	1814,314419
RD_MAAMIA_21	0,66415	0,08475	65768175	2,966559352	4,51063E-08	4,510630486
RD_MAAMIA_22	0,3825	0,0416	37603175	1,736252681	4,6173E-08	4,617303409
RD_MAAMIA_23	0,6466	0,1805	64013175	5,69661413	8,89913E-08	8,89912761
RD_MAAMIA_24	0,6821	0,0659	67563175	2,429102092	3,5953E-08	3,595304828
RD_MAAMIA_25	0,71865	0,05505	71218175	2,119743405	2,97641E-08	2,976407925
RD_MAAMIA_26	0,63915	0,03185	63268175	1,458257547	2,30488E-08	2,304883217

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 23.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_DAROS_08	0	2	0	0	0	0	0	0
RD_DAROS_09	0	0	0,0829	26,881154	0,216661191	0,1271	0,0770226	11,25
RD_DAROS_10	0	0	0,0113	3,664138	0,029532828	0,1138	0,0689628	1,71
RD_DAROS_11	0	0	0,043	13,94318	0,112381559	0,3906	0,2367036	1,90
RD_DAROS_12	0	0	0,0399	12,937974	0,104279632	0,1443	0,0874458	4,77
RD_MAAMIA_01	0	1	0,0351	11,381526	0,091734714	0,2067	0,1252602	2,93
RD_MAAMIA_02	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MAAMIA_03	0	0	0,0091	2,950766	0,023783074	0,1894	0,1147764	0,83
RD_MAAMIA_04	0	0	0,0083	2,691358	0,021692254	0,1229	0,0744774	1,17
RD_MAAMIA_05	1	2	0,0026	0,843076	0,006795164	0,2894	0,1753764	0,15
RD_MAAMIA_06	0	0	0,0069	2,237394	0,01803332	0,0479	0,0290274	2,49
RD_MAAMIA_07	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MAAMIA_08	1	2	0,0215	6,97159	0,056190779	0,0778	0,0471468	4,77
RD_MAAMIA_09	0	3	0,0047	1,524022	0,012283566	0,1303	0,0789618	0,62
RD_MAAMIA_10	0	1	0,0287	9,306262	0,075008157	0,119	0,072114	4,16
RD_MAAMIA_11	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MAAMIA_12	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MAAMIA_13	0	0	0,0021	0,680946	0,005488402	0,0064	0,0038784	5,66
RD_MAAMIA_14	0	0	0,0075	2,43195	0,019601435	0,0015	0,000909	86,25
RD_MAAMIA_15	0	0	0,0061	1,977986	0,0159425	0,0504	0,0305424	2,09
RD_MAAMIA_16	0	0	0,0831	26,946006	0,217183896	0,1959	0,1187154	7,32
RD_MAAMIA_17	0	2	0,0083	2,691358	0,021692254	0,0778	0,0471468	1,84
RD_MAAMIA_18	0	3	0	0	0	0	0	127,15
RD_MAAMIA_19	0	0	0,012	3,89112	0,031362295	0,019	0,011514	10,90
RD_MAAMIA_20	0	1	0,0103	3,339878	0,026919304	0,0224	0,0135744	7,93
RD_MAAMIA_21	0	1	0,0754	24,449204	0,197059757	0,1017	0,0616302	12,79
RD_MAAMIA_22	0	0	0,0243	7,879518	0,063508648	0,0709	0,0429654	5,91
RD_MAAMIA_23	0	1	0,0006	0,194556	0,001568115	0,1197	0,0725382	0,09
RD_MAAMIA_24	1	0	0,0287	9,306262	0,075008157	0,2354	0,1426524	2,10
RD_MAAMIA_25	1	0	0,0081	2,626506	0,021169549	0,248	0,150288	0,56
RD_MAAMIA_26	1	0	0,0173	5,609698	0,045213976	0,179	0,108474	1,67

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 24.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_DAROS_08	0,0242	1,2958	1,87	1	1	1
RD_DAROS_09	0,0216	0,0001	100,00	1	0	0
RD_DAROS_10	0,0071	0,0192	36,98	2	2	2
RD_DAROS_11	0,0555	0,7877	7,05	1	0	0
RD_DAROS_12	0,0392	0,0563	69,63	2	2	2
RD_MAAMIA_01	0,0426	1,7333	2,46	1	1	1
RD_MAAMIA_02	0,0131	0,1434	9,14	1	1	1
RD_MAAMIA_03	0,0224	1,0684	2,10	1	1	1
RD_MAAMIA_04	0,0385	1,1478	3,35	1	1	1
RD_MAAMIA_05	0,0173	1,6537	1,05	1	1	1
RD_MAAMIA_06	0,0144	0,0513	28,07	1	0	0
RD_MAAMIA_07	0,0002	0,0028	7,14	1	0	0
RD_MAAMIA_08	0,4427	1,5267	29,00	1	1	1
RD_MAAMIA_09	0,0439	1,2022	3,65	1	1	1
RD_MAAMIA_10	0,0044	0,0506	8,70	1	1	1
RD_MAAMIA_11	0,0015	1,5956	0,09	1	0	0
RD_MAAMIA_12	0,002	0,1435	1,39	1	0	0
RD_MAAMIA_13	0,0558	1,1599	4,81	1	1	1
RD_MAAMIA_14	0,0439	0,0001	100,00	1	0	0
RD_MAAMIA_15	0,0362	0,0011	100,00	1	0	0
RD_MAAMIA_16	0,0297	0,7832	3,79	1	1	0
RD_MAAMIA_17	0,0097	1,3754	0,71	1	1	0
RD_MAAMIA_18	0,01432	1,3913	1,03	1	1	1
RD_MAAMIA_19	0,0409	0,0019	100,00	0	0	0
RD_MAAMIA_20	0,0375	0,9017	4,16	1	1	1
RD_MAAMIA_21	0,0028	0,6915	0,40	0	0	0
RD_MAAMIA_22	0,0254	0,1099	23,11	0	0	0
RD_MAAMIA_23	0,0006	0,0114	5,26	0	0	0
RD_MAAMIA_24	0,0008	0,1416	0,56	0	0	0
RD_MAAMIA_25	0,0232	0,1832	12,66	0	0	0
RD_MAAMIA_26	0,0275	0,2224	12,37	1	0	0

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 25.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)		Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
								<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Endof.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_01	63	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_02	64	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_03	65	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_04	66	A	B	B	B	B	VII
Endof.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_05	67	B	B	D	C	A	XVII
Rizos.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_06	251	C	B	A	G	B	XXXI
Rizos.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_07	252	B	A	D	I	A	XIII
Rizos.	Mao	Amina 2	N19 32.409	W70 59.467	Banano	RD_MAAMIB_08	253	A	B	B	B	B	VII
Endof.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_01	84	D	B	G	C	D	XXXVIII
Endof.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_02	85	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_03	86	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_04	87	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_05	88	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_06	196	B	B	J	I	A	XXIX
Endof.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_07	197	A	A	I	E	C	IV
Rizos.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_08	261	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_09	262	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Mao	El Charco	N19 36.081	W71 04.779	Banano	RD_MAELC_10	263	D	B	A	J	A	XXXVI
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_01	69	B	B	J	C	A	XXIII
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_02	70	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_03	71	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_04	72	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_05	73	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_06	171	A	B	B	B	B	VII
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_07	174	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_08	199	B	B	D	C	A	XVII
Rizos.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_09	254	A	B	D	D	B	IX
Rizos.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_10	256	C	B	A	K	B	XXXII
Endof.	Mao	Tierra Fría 1	N19 33.048	W70 58.129	Banano	RD_MATFA_11	68	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Mao	Tierra Fría 2	N19 33.130	W70 58.229	Banano	RD_MATFB_01	77	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Mao	Tierra Fría 2	N19 33.130	W70 58.229	Banano	RD_MATFB_02	78	B	B	D	H	A	XVIII

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 26.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_MAAMIB_01	Gamma proteobacterias	1421	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751(T)	100	97,33	EU103629
RD_MAAMIB_02		0		0	0	
RD_MAAMIB_03		0		0	0	
RD_MAAMIB_04		0		0	0	
RD_MAAMIB_05	Gram positivas	1354	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	99,85	91,8	AE016877
RD_MAAMIB_06	Gamma proteobacterias	1464	<i>Pseudomonas beteli</i> ATCC 19861(T)	99,58	99,46	AB021406
RD_MAAMIB_07	Alfa proteobacterias	1390	<i>Brevundimonas olei</i> MJ15(T)	99,78	100	GQ250440
RD_MAAMIB_08		0		0	0	
RD_MAELC_01		0		0	0	
RD_MAELC_02		0		0	0	
RD_MAELC_03		0		0	0	
RD_MAELC_04		0		0	0	
RD_MAELC_05	Gram positivas	1339	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429(T)	99,93	90,96	AMXN01000021
RD_MAELC_06		0		0	0	
RD_MAELC_07		0		0	0	
RD_MAELC_08		0		0	0	
RD_MAELC_09		0		0	0	
RD_MAELC_10	Alfa proteobacterias	1420	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> CCUG 30717(T)	100	100	AM422371
RD_MATFA_01	Gram positivas	1491	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b(T)	99,79	100	AF234854
RD_MATFA_02		0		0	0	
RD_MATFA_03		0		0	0	
RD_MATFA_04	Gram positivas	1469	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613(T)	99,8	99,59	AJVF01000043
RD_MATFA_05	0	0		0	0	0
RD_MATFA_06	Gamma proteobacterias	1464	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM 6051(T)	99,16	99,8	AB004744
RD_MATFA_07		0		0	0	
RD_MATFA_08		0		0	0	
RD_MATFA_09	Beta proteobacterias	1429	<i>Achromobacter insolitus</i> LMG 6003(T)	98,37	97,14	AY170847
RD_MATFA_10	Gamma proteobacterias	1460	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637(T)	99,73	99,25	AB008509
RD_MATFA_11		0		0	0	
RD_MATFB_01		0		0	0	
RD_MATFB_02		0		0	0	

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 27.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_MAAMIB_01	0,3445	0,0247	33803175	2,145404494	3,71088E-08	3,710877599
RD_MAAMIB_02	0,1674	0,07175	16093175	2,595899173	1,61304E-07	16,13043525
RD_MAAMIB_03	0,1254	0,01835	11893175	1,073341208	9,02485E-08	9,02485003
RD_MAAMIB_04	0,46595	0,0756	45948175	2,70567161	5,88853E-08	5,888529001
RD_MAAMIB_05	0,1579	0,06265	15143175	2,336437048	1,5429E-07	15,4289774
RD_MAAMIB_06	0,4631	0,1254	45663175	4,125585219	9,03482E-08	9,034819017
RD_MAAMIB_07	0,633	0,1493	62653175	4,807029701	7,67244E-08	7,672443896
RD_MAAMIB_08	0,72265	0,1721	71618175	5,45711063	7,61973E-08	7,619728693
RD_MAELC_01	0,194	0,1128	18753175	3,766329968	2,00837E-07	20,08369233
RD_MAELC_02	0,23255	0,0559	22608175	2,143978878	9,4832E-08	9,483201886
RD_MAELC_03	0,2322	0,02335	22573175	1,215902815	5,38649E-08	5,386494433
RD_MAELC_04	0,11215	0,06515	10568175	2,407717851	2,27827E-07	22,78272125
RD_MAELC_05	0,10845	0,0478	10198175	1,913029074	1,87585E-07	18,75854331
RD_MAELC_06	0,161	0,1075	15453175	3,615214665	2,33946E-07	23,39464003
RD_MAELC_07	0,32245	0,15275	31598175	4,90539721	1,55243E-07	15,52430547
RD_MAELC_08	0,48245	0,13725	47598175	4,463456228	9,37737E-08	9,377368413
RD_MAELC_09	0,24615	0,09375	23968175	3,223170245	1,34477E-07	13,44770824
RD_MAELC_10	0,88695	0,0644	88048175	2,38633361	2,71026E-08	2,710259026
RD_MATFA_01	0,25245	0,0575	24598175	2,189598592	8,90147E-08	8,901467659
RD_MATFA_02	0,18265	0,04575	17618175	1,854578815	1,05265E-07	10,52650922
RD_MATFA_03	0,2044	0,0509	19793175	2,001417271	1,01117E-07	10,11165349
RD_MATFA_04	0,12115	0,0267	11468175	1,311419092	1,14353E-07	11,4352902
RD_MATFA_05	0,31745	0,0292	31098175	1,382699895	4,44624E-08	4,446241284
RD_MATFA_06	0,44885	0,1928	44238175	6,047315684	1,36699E-07	13,66990316
RD_MATFA_07	0,1356	0,029	12913175	1,376997431	1,06635E-07	10,66350786
RD_MATFA_08	0,0765	0,08675	7003175	3,023583995	4,31745E-07	43,17447436
RD_MATFA_09	0,66325	0,09865	65678175	3,36288062	5,12024E-08	5,120240658
RD_MATFA_10	0,6403	0,13625	63383175	4,434943906	6,99704E-08	6,997036526
RD_MATFA_11	0,25415	0,05895	24768175	2,230941458	9,00729E-08	9,007290438
RD_MATFB_01	0,2475	0,01665	24103175	1,024870261	4,25201E-08	4,252013526
RD_MATFB_02	0,14185	0,07725	13538175	2,752716941	2,0333E-07	20,33299866

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 28.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_MAAMIB_01	1	2	0,0122	3,955972	0,031885	0,1845	0,111807	16,19
RD_MAAMIB_02	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MAAMIB_03	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MAAMIB_04	0	1	0,0266	8,625316	0,069519755	0,1027	0,0622362	4,47
RD_MAAMIB_05	0	0	0,0225	7,29585	0,058804304	0,2154	0,1305324	1,80
RD_MAAMIB_06	0	0	0,0939	30,448014	0,245409962	0,1014	0,0614484	15,98
RD_MAAMIB_07	0	1	0,0667	21,628142	0,174322092	0,0048	0,0029088	0
RD_MAAMIB_08	0	1	0,0395	12,80827	0,103234223	0,4668	0,2828808	1,46
RD_MAELC_01	0	2	0,0078	2,529228	0,020385492	0,0466	0,0282396	2,89
RD_MAELC_02	0	1	0,0181	5,869106	0,047304796	0,2422	0,1467732	1,29
RD_MAELC_03	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MAELC_04	0	0	0,0306	9,922356	0,079973853	0,2642	0,1601052	2,00
RD_MAELC_05	0	3	0,0294	9,533244	0,076837624	0,0317	0,0192102	15,34
RD_MAELC_06	0	1	0,0065	2,10769	0,01698791	0,0889	0,0538734	1,26
RD_MAELC_07	0	1	0,0176	5,706976	0,045998033	0,2171	0,1315626	1,40
RD_MAELC_08	0	0	0,0532	17,250632	0,13903951	0,1747	0,1058682	5,25
RD_MAELC_09	0	0	0,0903	29,280678	0,236001273	0,0537	0,0325422	29,01
RD_MAELC_10	0	1	0,066	21,40116	0,172492625	0,1566	0,0948996	7,27
RD_MATFA_01	0	1	0,0051	1,653726	0,013328976	0,1224	0,0741744	0,72
RD_MATFA_02	0	1	0,0047	1,524022	0,012283566	0,252	0,152712	0,32
RD_MATFA_03	0	1	0,0132	4,280232	0,034498525	0,1428	0,0865368	1,59
RD_MATFA_04	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MATFA_05	0	0	0,0026	0,843076	0,006795164	0,2026	0,1227756	0,22
RD_MATFA_06	0	2	0,0474	15,369924	0,123881067	0,3391	0,2054946	2,41
RD_MATFA_07	0	0	0,0616	19,974416	0,160993117	0,2431	0,1473186	4,37
RD_MATFA_08	0	0	0,0062	2,010412	0,016203853	0,0748	0,0453288	1,43
RD_MATFA_09	0	0	0,4573	148,284098	1,19516481	0,1363	0,0825978	57,88
RD_MATFA_10	0	0	0,0047	1,524022	0,012283566	0,2868	0,1738008	0,28
RD_MATFA_11	0	1	0,0149	4,831474	0,038941517	0,1269	0,0769014	2,03
RD_MATFB_01	0	0	0,0092	2,983192	0,024044427	0,0581	0,0352086	2,73
RD_MATFB_02	0	1	0,0416	13,489216	0,108722624	0,0826	0,0500556	8,69

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 29.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_MAAMIB_01	0,0351	1,4763	2,38	1	1	1
RD_MAAMIB_02	0,0129	0,0222	58,11	1	0	0
RD_MAAMIB_03	0,0006	0,0045	13,33	1	0	0
RD_MAAMIB_04	0,0058	1,3506	0,43	1	1	1
RD_MAAMIB_05	0,0506	0,3179	15,92	1	1	1
RD_MAAMIB_06	0,0409	0,0626	65,34	1	1	1
RD_MAAMIB_07	0,0371	0,1663	22,31	0	0	0
RD_MAAMIB_08	0,0438	1,713	2,56	2	2	2
RD_MAELC_01	0,0165	1,441	1,15	1	1	1
RD_MAELC_02	0,0129	0,0871	14,81	1	1	1
RD_MAELC_03	0,0011	0,6325	0,17	1	0	0
RD_MAELC_04	0,0388	0,0993	39,07	1	0	0
RD_MAELC_05	0,0296	1,1478	2,58	1	1	1
RD_MAELC_06	0,0182	0,5802	3,14	1	1	1
RD_MAELC_07	0,0733	1,0971	6,68	1	1	1
RD_MAELC_08	0,0268	0,0153	100,00	0	0	0
RD_MAELC_09	0,0124	0,0168	73,81	0	0	0
RD_MAELC_10	0,0549	1,8563	2,96	1	1	0
RD_MATFA_01	0,1004	1,3282	7,56	1	1	1
RD_MATFA_02	0,0095	0,0595	15,97	1	1	1
RD_MATFA_03	0,0009	1,3622	0,07	1	1	1
RD_MATFA_04	0,0018	0,8403	0,21	1	1	1
RD_MATFA_05	0,0346	0,0801	43,20	1	1	1
RD_MATFA_06	0,0587	1,758	3,34	1	1	1
RD_MATFA_07	0,0443	0,0021	100,00	1	0	0
RD_MATFA_08	0,0399	0,0089	100,00	0	0	0
RD_MATFA_09	0,042	1,4133	2,97	0	0	0
RD_MATFA_10	0,0152	0,0245	62,04	1	0	0
RD_MATFA_11	0,0014	0,029	4,83	1	1	1
RD_MATFB_01	0,0233	1,58776	1,47	1	1	1
RD_MATFB_02	0,0027	0,1319	2,05	1	0	0

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 30.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)	Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
							<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Endof.	Mao	Tierra Fría 2	N19 33.130	W70 58.229	Banano	RD_MATFB_03	80	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Mao	Tierra Fría 2	N19 33.130	W70 58.229	Banano	RD_MATFB_04	81	B	B	D	C	A XVII
Rizos.	Mao	Tierra Fría 2	N19 33.130	W70 58.229	Banano	RD_MATFB_05	257	D	B	A	J	A XXXVI
Rizos.	Mao	Tierra Fría 2	N19 33.130	W70 58.229	Banano	RD_MATFB_06	258	D	A	A	J	D XXXIV
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_01	125	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_02	126	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_03	127	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_04	128	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_05	129	D	B	G	C	D XXXVIII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_06	131	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_07	133	C	B	J	J	D XXXIII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_08	134	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_09	207	B	B	J	I	A XXIX
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_10	208	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_11	209	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_12	210	D	B	G	C	D XXXVIII
Rizos.	Montecristi	Clavellina	N19 39.864	W71 33.642	Banano	RD_MOCLA_13	285	B	B	B	B	B XV
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_01	111	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_02	112	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_03	113	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_04	114	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_05	115	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_06	116	B	B	J	F	A XXVI
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_07	175	D	B	G	C	D XXXVIII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_08	176	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_09	177	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_10	178	B	B	J	I	A XXIX
Rizos.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_11	275	A	B	B	B	B VII
Rizos.	Montecristi	Gozuela	N19 40.261	W71 36.862	Banano	RD_MOGOZ_12	276	A	A	I	E	C IV
Endof.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_01	90	B	B	J	F	A XXVI
Endof.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_02	91	B	B	D	C	A XVII

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 31.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_MATFB_03		0		0	0	
RD_MATFB_04		0		0	0	
RD_MATFB_05	Alfa proteobacterias	1366	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> CCUG 30717(T)	99,85	97,09	AM422371
RD_MATFB_06	Alfa proteobacterias	1404	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> CCUG 33852(T)	99,93	99,57	AM180484
RD_MOCLA_01		0		0	0	
RD_MOCLA_02	Gram positivas	1480	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11(T)	99,52	100	AF483624
RD_MOCLA_03	Gram positivas	1500	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,62	100	AB190217
RD_MOCLA_04		0		0	0	
RD_MOCLA_05	Alfa proteobacterias	1396	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,71	99,01	AJ389904
RD_MOCLA_06		0		0	0	
RD_MOCLA_07	Beta proteobacterias	1340	<i>Cupriavidus necator</i> N-1(T)	99,63	91,47	CP002878
RD_MOCLA_08		0		0	0	
RD_MOCLA_09	Gram positivas	1477	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K(T)	99,53	100	AJ831844
RD_MOCLA_10		0		0	0	
RD_MOCLA_11		0		0	0	
RD_MOCLA_12	Alfa proteobacterias	1364	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,63	96,81	AJ389904
RD_MOCLA_13	Gamma proteobacterias	1439	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> LMG 2683(T)	100	98,43	Z96079
RD_MOGOZ_01		0		0	0	
RD_MOGOZ_02		0		0	0	
RD_MOGOZ_03	Gram positivas	1470	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11(T)	99,59	99,32	AF483624
RD_MOGOZ_04		0		0	0	
RD_MOGOZ_05		0		0	0	
RD_MOGOZ_06		0		0	0	
RD_MOGOZ_07	Alfa proteobacterias	1399	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,71	99,08	AJ389904
RD_MOGOZ_08		0		0	0	
RD_MOGOZ_09	Gram positivas	1467	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792(T)	99,73	99,53	ACNF01000156
RD_MOGOZ_10		0		0	0	
RD_MOGOZ_11		0		0	0	
RD_MOGOZ_12		0		0	0	
RD_MOLAP_01		0		0	0	
RD_MOLAP_02	Gram positivas	1489	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22(T)	99,05	100	EF114313

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 32.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_MATFB_03	0,15015	0,0119	14368175	0,889436734	6,19033E-08	6,190325036
RD_MATFB_04	0,14105	0,07165	13458175	2,593047941	1,92675E-07	19,26745596
RD_MATFB_05	0,4088	0,0506	40233175	1,992863574	4,95328E-08	4,953284384
RD_MATFB_06	0,7624	0,1221	75593175	4,031494558	5,33315E-08	5,333146224
RD_MOCLA_01	0,1335	0,0097	12703175	0,826709627	6,5079E-08	6,507897648
RD_MOCLA_02	0,06455	0,0322	5808175	1,46823686	2,52788E-07	25,27879858
RD_MOCLA_03	0,21225	0,0945	20578175	3,244554486	1,5767E-07	15,76696906
RD_MOCLA_04	0,2667	0,05665	26023175	2,165363119	8,3209E-08	8,320902884
RD_MOCLA_05	0,078	0,0914	7153175	3,156166289	4,41226E-07	44,12259297
RD_MOCLA_06	0,2948	0,026	28833175	1,291460467	4,47908E-08	4,479078238
RD_MOCLA_07	0,5888	0,0039	58233175	0,661338163	1,13567E-08	1,135672514
RD_MOCLA_08	0,124	0,0736	11753175	2,648646968	2,25356E-07	22,53558692
RD_MOCLA_09	0,04425	0,16055	3778175	5,127793317	1,35721E-06	135,7214348
RD_MOCLA_10	0,2546	0,0837	24813175	2,936621414	1,18349E-07	11,83492807
RD_MOCLA_11	0,0912	0,07665	8473175	2,735609548	3,22855E-07	32,28553108
RD_MOCLA_12	0,0627	0,12395	5623175	4,084242352	7,26323E-07	72,63231808
RD_MOCLA_13	0,6436	0,13495	63713175	4,397877888	6,90262E-08	6,90261926
RD_MOGOZ_01	0,1636	0,01815	15713175	1,067638743	6,79454E-08	6,794544981
RD_MOGOZ_02	0,2653	0,01615	25883175	1,0106141	3,90452E-08	3,904521375
RD_MOGOZ_03	0,01855	0,02705	1208175	1,321398404	1,09371E-06	109,3714407
RD_MOGOZ_04	0,24225	0,02845	23578175	1,361315654	5,77363E-08	5,773626051
RD_MOGOZ_05	0,0537	0,01595	4723175	1,004911636	2,12762E-07	21,27618892
RD_MOGOZ_06	0,26955	0,02895	26308175	1,375571815	5,22869E-08	5,228685817
RD_MOGOZ_07	0,14345	0,00805	13698175	0,779664297	5,69174E-08	5,691738474
RD_MOGOZ_08	0,1307	0,0535	12423175	2,075549306	1,67071E-07	16,70707614
RD_MOGOZ_09	0,1796	0,0152	17313175	0,983527395	5,6808E-08	5,680803175
RD_MOGOZ_10	0,50305	0,0413	49658175	1,727698985	3,47918E-08	3,479183407
RD_MOGOZ_11	0,8426	0,06795	83613175	2,487552351	2,97507E-08	2,975072232
RD_MOGOZ_12	1,23585	0,08755	122938175	3,046393852	2,47799E-08	2,477988511
RD_MOLAP_01	0,1985	0,02715	19203175	1,324249636	6,89599E-08	6,895993169
RD_MOLAP_02	0,21115	0,066	20468175	2,431953325	1,18816E-07	11,88163246

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 33.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_MATFB_03	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MATFB_04	0	1	0,0122	3,955972	0,031885	0,374	0,226644	0,56
RD_MATFB_05	0	1	0,0018	0,583668	0,004704344	0,0119	0,0072114	2,61
RD_MATFB_06	0	1	0,0002	0,064852	0,000522705	0,321	0,194526	0,01
RD_MOCLA_01	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MOCLA_02	0	0	0,031	10,05206	0,081019263	0,0992	0,0601152	5,39
RD_MOCLA_03	0	2	0,0563	18,255838	0,147141436	0,4665	0,282699	2,08
RD_MOCLA_04	0	0	0,0304	9,857504	0,079451149	0,2308	0,1398648	2,27
RD_MOCLA_05	0	2	0,0713	23,119738	0,186344306	0,0295	0,017877	41,69
RD_MOCLA_06	0	0	0,1399	45,363974	0,365632095	0,1356	0,0821736	17,80
RD_MOCLA_07	0	1	0,0006	0,194556	0,001568115	0,0011	0,0006666	9,41
RD_MOCLA_08	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MOCLA_09	0	0	0,0021	0,680946	0,005488402	0,1975	0,119685	0,18
RD_MOCLA_10	0	1	0,0483	15,661758	0,126233239	0,035	0,02121	23,81
RD_MOCLA_11	0	0	0,0392	12,710992	0,102450165	0,1077	0,0652662	6,28
RD_MOCLA_12	0	2	0	0	0	0	0	0
RD_MOCLA_13	0	1	0,1117	36,219842	0,2919307	0,1591	0,0964146	12,11
RD_MOGOZ_01	0	0	0,0326	10,570876	0,085200903	0,1045	0,063327	5,38
RD_MOGOZ_02	0	0	0,0411	13,327086	0,107415862	0,3976	0,2409456	1,78
RD_MOGOZ_03	0	1	0,0644	20,882344	0,168310986	0,0379	0,0229674	29,31
RD_MOGOZ_04	0	0	0,0235	7,62011	0,061417829	0,3954	0,2396124	1,03
RD_MOGOZ_05	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MOGOZ_06	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MOGOZ_07	0	2	0	0	0	0	0	0
RD_MOGOZ_08	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MOGOZ_09	1	1	0,2225	72,14785	0,581509229	0,0551	0,0333906	69,66
RD_MOGOZ_10	0	1	0,021	6,80946	0,054884017	0,1018	0,0616908	3,56
RD_MOGOZ_11	0	1	0,0418	13,554068	0,109245329	0,0839	0,0508434	8,59
RD_MOGOZ_12	0	0	0,0841	27,270266	0,219797421	0,426	0,258156	3,41
RD_MOLAP_01	0	1	0,0097	3,145322	0,025351189	0,0569	0,0344814	2,94
RD_MOLAP_02	0	1	0,0093	3,015618	0,024305779	0,1154	0,0699324	1,39

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 34.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_MATFB_03	0,0003	0,0077	3,90	1	0	0
RD_MATFB_04	0,0665	0,0787	84,50	1	1	1
RD_MATFB_05	0,0695	1,7781	3,91	1	0	0
RD_MATFB_06	0,0234	1,5278	1,53	1	1	0
RD_MOCLA_01	0,0622	0,0407	100,00	1	0	0
RD_MOCLA_02	0,0065	0,0491	13,24	1	0	0
RD_MOCLA_03	0,0174	1,7288	1,01	1	1	1
RD_MOCLA_04	0,0174	0,0982	17,72	0	0	0
RD_MOCLA_05	0,0325	1,4183	2,29	0	0	0
RD_MOCLA_06	0,0246	0,0006	100,00	1	1	0
RD_MOCLA_07	0,0155	2,1789	0,71	1	1	1
RD_MOCLA_08	0,0001	0,0009	11,11	0	0	0
RD_MOCLA_09	0,0491	1,2006	4,09	1	1	1
RD_MOCLA_10	0,0402	0,0018	100,00	0	0	0
RD_MOCLA_11	0,0509	0,0012	100,00	1	1	0
RD_MOCLA_12	0,0622	1,236	5,03	1	1	1
RD_MOCLA_13	0,0091	1,6749	0,54	1	1	1
RD_MOGOZ_01	0,0572	0,3929	14,56	1	0	0
RD_MOGOZ_02	0,0002	0,0851	0,24	1	1	1
RD_MOGOZ_03	0,0068	0,1206	5,64	1	1	1
RD_MOGOZ_04	0,0495	0,0182	100,00	1	0	0
RD_MOGOZ_05	0,0001	0,0074	1,35	1	0	0
RD_MOGOZ_06	0,0274	1,5712	1,74	1	1	1
RD_MOGOZ_07	0,0203	1,5194	1,34	1	1	0
RD_MOGOZ_08	0,0088	0,0538	16,36	0	0	0
RD_MOGOZ_09	0,0376	0,0007	100,00	0	0	0
RD_MOGOZ_10	0,0277	1,3638	2,03	1	1	1
RD_MOGOZ_11	0,0229	1,8123	1,26	1	0	0
RD_MOGOZ_12	0,0008	0,6391	0,13	1	1	1
RD_MOLAP_01	0,0646	1,3611	4,75	1	1	1
RD_MOLAP_02	0,0688	0,4002	17,19	0	0	0

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 35.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)		Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
								<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Endof.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_03	92	D	B	G	J	D	XXXIX
Endof.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_04	93	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_05	167	B	B	J	G	A	XXVII
Endof.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_06	168	D	B	G	C	D	XXXVIII
Rizos.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_07	264	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_08	266	B	B	J	D	A	XXIV
Rizos.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_09	268	C	B	A	G	B	XXXI
Rizos.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_10	269	A	B	B	B	B	VII
Rizos.	Montecristi	La Pinta	N19 39.085	W71 33.300	Banano	RD_MOLAP_11	324	A	B	F	K	D	X
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_01	97	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_02	98	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_03	99	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_04	100	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_05	101	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_06	102	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_07	103	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_08	104	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_09	105	B	B	J	F	A	XXVI
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_10	106	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_11	237	B	B	D	C	A	XVII
Endof.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_12	240	B	B	D	M	A	XIX
Rizos.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_13	270	C	B	A	K	B	XXXII
Rizos.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_14	271	D	B	A	J	A	XXXVI
Rizos.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_15	272	B	A	D	I	A	XIII
Rizos.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_16	273	A	B	B	B	B	VII
Rizos.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_17	274	A	B	B	B	B	VII
Rizos.	Montecristi	Pepillo Salcedo	N19 39.964	W71 36.669	Banano	RD_MOPEP_18	325	B	B	J	B	B	XXII
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_01	117	A	B	B	B	A	VI
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_02	118	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_03	119	A	A	I	E	C	IV
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_04	120	A	B	B	B	B	VI

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 36.

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_MOLAP_03		0		0	0	
RD_MOLAP_04	Gram positivas	1483	<i>Bacillus sonorensis</i> NRRL B-23154(T)	98,92	100	AF302118
RD_MOLAP_05	Gram positivas	1485	<i>Bacillus gottheilii</i> WCC 4585(T)	97,7	100	FN995266
RD_MOLAP_06	Alfa proteobacterias	1407	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,57	99,86	AJ389904
RD_MOLAP_07		0		0	0	
RD_MOLAP_08	Beta proteobacterias	1453	<i>Comamonas testosteroni</i> ATCC 11996(T)	100	99,8	AHIL01000001
RD_MOLAP_09		0		0	0	
RD_MOLAP_10		0		0	0	
RD_MOLAP_11		0		0	0	
RD_MOPEP_01		0		0	0	
RD_MOPEP_02	Gram positivas	1478	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,54	99,93	AB190217
RD_MOPEP_03		0		0	0	
RD_MOPEP_04		0		0	0	
RD_MOPEP_05	Gram positivas	1456	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22(T)	99,66	98,51	EF114313
RD_MOPEP_06	Gram positivas	1484	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,62	100	AB190217
RD_MOPEP_07	Gamma proteobacterias	1455	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259	100	99,66	AF072688
RD_MOPEP_08		0		0	0	
RD_MOPEP_09		0		0	0	
RD_MOPEP_10		0		0	0	
RD_MOPEP_11		0		0	0	
RD_MOPEP_12	Gram positivas	1489	<i>Lysinibacillus odysseyi</i> 34hs-1(T)	98,92	100	AF526913
RD_MOPEP_13		0		0	0	
RD_MOPEP_14		0		0	0	
RD_MOPEP_15	Alfa proteobacterias	1395	<i>Brevundimonas olei</i> MJ15(T)	99,78	100	GQ250440
RD_MOPEP_16		0		0	0	
RD_MOPEP_17		0		0	0	
RD_MOPEP_18	Gamma proteobacterias	1471	<i>Citrobacter koseri</i> CDC 3613-63	98,78	100	AF025372
RD_MOSAA_01	Gamma proteobacterias	1426	<i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693(T)	99,79	97,21	Z96078
RD_MOSAA_02		0		0	0	
RD_MOSAA_03	Gamma proteobacterias	1458	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951(T)	100	99,73	AB009457
RD_MOSAA_04	Gamma proteobacterias	1455	<i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693(T)	99,38	99,45	Z96078

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 37.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_MOLAP_03	0,2192	0,0279	21273175	1,345633877	6,3255E-08	6,325496205
RD_MOLAP_04	0,1279	0,0219	12143175	1,174559949	9,67259E-08	9,672593442
RD_MOLAP_05	0,10145	0,01935	9498175	1,101853529	1,16007E-07	11,60068675
RD_MOLAP_06	0,1777	0,0319	17123175	1,459683163	8,52461E-08	8,524605765
RD_MOLAP_07	0,62245	0,1807	61598175	5,702316595	9,25728E-08	9,257281721
RD_MOLAP_08	0,42025	0,11605	41378175	3,858995013	9,32616E-08	9,326160501
RD_MOLAP_09	0,71925	0,17715	71278175	5,601097853	7,85808E-08	7,858082581
RD_MOLAP_10	1,2816	0,0518	127513175	2,02707836	1,5897E-08	1,589701111
RD_MOLAP_11	0,8835	0,06115	87703175	2,293668566	2,61526E-08	2,615262863
RD_MOPEP_01	0,20765	0,0687	20118175	2,508936592	1,2471E-07	12,47099497
RD_MOPEP_02	0,1075	0,06015	10103175	2,265156244	2,24202E-07	22,4202416
RD_MOPEP_03	0,24505	0,0201	23858175	1,12323777	4,70798E-08	4,707978586
RD_MOPEP_04	0,21715	0,0323	21068175	1,471088092	6,98251E-08	6,982513159
RD_MOPEP_05	0,0089	0,024	243175	1,234435824	5,07633E-06	507,6327023
RD_MOPEP_06	0,1987	0,04885	19223175	1,942967012	1,01074E-07	10,10741988
RD_MOPEP_07	0,2847	0,05185	27823175	7,631175141	7,2907E-08	7,290699124
RD_MOPEP_08	0,1541	0,0104	14763175	0,846668252	5,735E-08	5,735001123
RD_MOPEP_09	0,29235	0,02665	28588175	1,309993476	4,58229E-08	4,582291369
RD_MOPEP_10	0,04015	0,0418	3368175	1,741955146	5,17181E-07	51,71807123
RD_MOPEP_11	0,1141	0,1178	10763175	3,908891576	3,63173E-07	36,31727232
RD_MOPEP_12	0,04115	0,08475	3468175	2,966559352	8,55366E-07	85,5366108
RD_MOPEP_13	0,37395	0,1219	36748175	4,025792093	1,09551E-07	10,95508034
RD_MOPEP_14	0,54745	0,08785	54098175	3,054947548	5,64704E-08	5,647043635
RD_MOPEP_15	0,6611	0,1164	65463175	3,868974326	5,91015E-08	5,910153801
RD_MOPEP_16	1,2816	0,0779	127513175	2,77124995	2,1733E-08	2,173304798
RD_MOPEP_17	1,25155	0,0726	124508175	2,620134646	2,10439E-08	2,104387641
RD_MOPEP_18	0,6695	0,1681	66303175	5,343061344	8,05853E-08	8,058530145
RD_MOSAA_01	0,186	0,4226	17953175	10,65	7,01795E-07	70,17949278
RD_MOSAA_02	0,43665	0,07705	43018175	2,747014477	6,38571E-08	6,385706685
RD_MOSAA_03	0,4095	0,06435	40303175	2,384907994	5,91742E-08	5,917419643
RD_MOSAA_04	0,17675	0,19585	17028175	6,134278265	3,60243E-07	36,02428484

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 38.

Código	Sol. fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 nm	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 nm	mg/mL	micromoles α _cetobutirato/mg prot h
RD_MOLAP_03	0	2	0,005	1,6213	0,013067623	0,0196	0,0118776	4,40
RD_MOLAP_04	0	3	0	0	0	0	0	0
RD_MOLAP_05	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MOLAP_06	0	2	0,0739	23,962814	0,19313947	0,0034	0,0020604	165,69
RD_MOLAP_07	0	0	0,0175	5,67455	0,045736681	0,0174	0,0105444	17,35
RD_MOLAP_08	0	2	0,2597	84,210322	0,678732345	0,123	0,074538	36,42
RD_MOLAP_09	0	0	0,0148	4,799048	0,038680164	0,067	0,040602	3,81
RD_MOLAP_10	0	1	0,0141	4,572066	0,036850697	0,2524	0,1529544	0,96
RD_MOLAP_11	1	0	0,0497	16,115722	0,129892174	0,192	0,116352	4,47
RD_MOPEP_01	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MOPEP_02	0	3	0,0392	12,710992	0,102450165	0,2599	0,1574994	2,60
RD_MOPEP_03	0	0	0,0022	0,713372	0,005749754	0,0434	0,0263004	0,87
RD_MOPEP_04	0	0	0,0345	11,18697	0,0901666	0,1933	0,1171398	3,08
RD_MOPEP_05	0	1	0,1133	36,738658	0,29611234	0,0959	0,0581154	20,38
RD_MOPEP_06	0	3	0,0566	18,353116	0,147925494	0,1785	0,108171	5,47
RD_MOPEP_07	1	2	0,0641	20,785066	0,167526928	0,1741	0,1055046	4,14
RD_MOPEP_08	0	1	0,0719	23,314294	0,18791242	0,4976	0,3015456	2,49
RD_MOPEP_09	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MOPEP_10	0	0	0,056	18,15856	0,146357379	0,3075	0,186345	3,14
RD_MOPEP_11	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MOPEP_12	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MOPEP_13	0	0	0,0723	23,443998	0,18895783	0,4622	0,2800932	2,70
RD_MOPEP_14	0	0	0,0005	0,16213	0,001306762	0,2524	0,1529544	0,03
RD_MOPEP_15	0	1	0,0084	2,723784	0,021953607	0,323	0,195738	0,45
RD_MOPEP_16	0	1	0,1456	47,212256	0,380529185	0,4963	0,3007578	5,06
RD_MOPEP_17	0	1	0,0438	14,202588	0,114472378	0,0671	0,0406626	11,26
RD_MOPEP_18	1	0	0,0554	17,964004	0,144789264	0,6378	0,3865068	1,50
RD_MOSAA_01	0	1	0,0867	28,113342	0,226592585	0,5878	0,3562068	2,54
RD_MOSAA_02	0	2	0,001	0,32426	0,002613525	0,1993	0,1207758	0,09
RD_MOSAA_03	1	1	0,0995	32,26387	0,2600457	0,2824	0,1711344	6,08
RD_MOSAA_04	1	1	0,0072	2,334672	0,018817377	0,2671	0,1618626	0,47

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 39.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_MOLAP_03	0,0782	1,4122	5,54	1	1	1
RD_MOLAP_04	0,0158	0,5391	2,93	1	1	1
RD_MOLAP_05	0,0208	0,0015	100,00	0	0	0
RD_MOLAP_06	0,0145	1,143	1,27	0	0	0
RD_MOLAP_07	0,0299	0,0024	100,00	1	1	1
RD_MOLAP_08	0,0229	1,3714	1,67	0	0	0
RD_MOLAP_09	0,0168	0,0553	30,38	1	1	1
RD_MOLAP_10	0,0056	1,5864	0,35	2	2	2
RD_MOLAP_11	0,0006	0,1002	0,60	1	0	0
RD_MOPEP_01	0,0006	0,0056	10,71	1	1	1
RD_MOPEP_02	0,0015	0,8016	0,19	1	1	1
RD_MOPEP_03	0,0263	1,6314	1,61	1	1	1
RD_MOPEP_04	0,0278	0,034	81,76	0	0	0
RD_MOPEP_05	0,0295	0,9554	3,09	1	0	0
RD_MOPEP_06	0,001	0,3309	0,30	1	1	0
RD_MOPEP_07	0,0258	1,0842	2,38	1	1	1
RD_MOPEP_08	0,0005	0,0935	0,53	1	0	0
RD_MOPEP_09	0,0313	0,0662	47,28	1	1	1
RD_MOPEP_10	0,0608	0,4276	14,22	1	1	1
RD_MOPEP_11	0,0124	0,7593	1,63	0	0	0
RD_MOPEP_12	0,0003	0,6048	0,05	1	1	1
RD_MOPEP_13	0,0382	0,0055	100,00	0	0	0
RD_MOPEP_14	0,0113	1,6487	0,69	0	0	0
RD_MOPEP_15	0,0157	0,0162	96,91	0	0	0
RD_MOPEP_16	0,0245	1,2371	1,98	1	1	1
RD_MOPEP_17	0,0236	1,2784	1,85	1	1	1
RD_MOPEP_18	0,0602	0,4728	12,73	1	1	1
RD_MOSAA_01	0,0088	1,7899	0,49	1	1	1
RD_MOSAA_02	0,0086	1,5984	0,54	1	1	1
RD_MOSAA_03	0,0147	1,5196	0,97	1	1	1
RD_MOSAA_04	0,0769	1,8915	4,07	1	1	1

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 40.

Origen	Provincia	Localidad	Coordenadas (grados minutos)	Cultivo	Código	ADN	PCR-RFLP DEL 16s rRNA					
							<i>BanI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>	Grupo
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_05	121	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_06	214	B	B	J	F	A XXVI
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_07	215	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_08	216	B	B	J	H	A XXVIII
Endof.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_09	217	B	B	J	F	A XXVI
Rizos.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_10	277	C	B	A	G	B XXXI
Rizos.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_11	278	B	B	J	D	A XXIV
Rizos.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_12	279	C	B	A	G	B XXXI
Rizos.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_13	281	B	B	J	D	A XXIV
Rizos.	Montecristi	Santa María 1	N19 39.878	W71 36.243	Banano	RD_MOSAA_14	326	A	B	J	B	B XI BIS
Endof.	Montecristi	Santa María 2	N19 39.270	W71 35.002	Banano	RD_MOSAB_01	123	B	B	D	C	A XVII
Endof.	Montecristi	Santa María 2	N19 39.270	W71 35.002	Banano	RD_MOSAB_02	124	D	B	G	J	D XXXIX
Endof.	Montecristi	Santa María 2	N19 39.270	W71 35.002	Banano	RD_MOSAB_03	179	A	A	I	E	C IV
Endof.	Montecristi	Santa María 2	N19 39.270	W71 35.002	Banano	RD_MOSAB_04	180	B	B	J	F	A XXVI

Código	Gran-grupo	Secuenciación del gen 16S rRNA				
		Pares de bases	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	Complemento (%)	Acceso EZ-BioCloud
RD_MOSAA_05	Gram positivas	1493	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	99,62	100	AB190217
RD_MOSAA_06	Gram positivas	1285	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(T)	97,42	87,14	AE017333
RD_MOSAA_07		0		0	0	0
RD_MOSAA_08	Gram positivas	1494	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513(T)	99,73	100	AY724690
RD_MOSAA_09		0		0	0	0
RD_MOSAA_10		0		0	0	0
RD_MOSAA_11		0		0	0	0
RD_MOSAA_12		0		0	0	0
RD_MOSAA_13		0		0	0	0
RD_MOSAA_14		0		0	0	0
RD_MOSAB_01		0		0	0	0
RD_MOSAB_02	Alfa proteobacterias	1402	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A	100	99,29	AF531767
RD_MOSAB_03		0		0	0	0
RD_MOSAB_04	Gram positivas	1477	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429(T)	99,93	99,8	ABQL01000001

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 41.

Código	Producción de IAA					
	OD 600 nm	OD 535 nm	UFC por mL	µg IAA/mL	µg/UFC	µg IAA/10 ⁸ UFC
RD_MOSAA_05	0,18995	0,0191	18348175	1,094725449	5,9664E-08	5,966399648
RD_MOSAA_06	0,0218	0,0591	1533175	2,235218307	1,4579E-06	145,7901614
RD_MOSAA_07	0,0627	0,05235	5623175	2,042760137	3,63275E-07	36,32752203
RD_MOSAA_08	0,0309	0,0658	2443175	2,42625086	9,93073E-07	99,30728909
RD_MOSAA_09	0,0425	0,05235	3603175	2,042760137	5,66933E-07	56,69333676
RD_MOSAA_10	0,96825	0,12045	96178175	3,984449227	4,14278E-08	4,142778991
RD_MOSAA_11	1,3664	0,1431	135993175	4,630253308	3,40477E-08	3,404768885
RD_MOSAA_12	0,91205	0,13345	90558175	4,355109406	4,80918E-08	4,809184158
RD_MOSAA_13	1,28885	0,1681	128238175	5,343061344	4,16651E-08	4,166513867
RD_MOSAA_14	0,71895	0,3906	71248175	11,68705287	1,64033E-07	16,40330137
RD_MOSAB_01	0,30855	0,00585	30208175	0,716937189	2,37332E-08	2,373321756
RD_MOSAB_02	0,0285	0,1034	2203175	3,498314147	1,58785E-06	158,7851236
RD_MOSAB_03	0,1958	0,01325	18933175	0,927928368	4,90107E-08	4,9010711
RD_MOSAB_04	0,1248	0,0341	11833175	1,52241027	1,28656E-07	12,86561105

Código	Sol. Fosfato	Sideróforos	Actividad ACC desaminasa					
			OD 540 NM	microg/mL	micromol/mL	Proteína 595 NM	mg/mL	Micromoles α_cetobutirato/mg prot h
RD_MOSAA_05	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MOSAA_06	0	3	0,0126	4,085676	0,03293041	0,0478	0,0289668	4,55
RD_MOSAA_07	0	1	0	0	0	0	0	0
RD_MOSAA_08	0	0	0,0119	3,858694	0,031100943	0,2686	0,1627716	0,76
RD_MOSAA_09	0	0	0	0	0	0	0	0
RD_MOSAA_10	0	1	0,2199	71,304774	0,574714065	0,069	0,041814	54,98
RD_MOSAA_11	1	1	0,0442	14,332292	0,115517788	0,419	0,253914	1,82
RD_MOSAA_12	0	1	0,1174	38,068124	0,306827791	0,4707	0,2852442	4,30
RD_MOSAA_13	0	0	0,0182	5,901532	0,047566148	0,0665	0,040299	4,72
RD_MOSAA_14	1	0	0,0122	3,955972	0,031885	0,8783	0,5322498	0,24
RD_MOSAB_01	0	0	0,0922	29,896772	0,24096697	0,172	0,104232	9,25
RD_MOSAB_02	0	2	0	0	0	0	0	0
RD_MOSAB_03	1	0	0,0007	0,226982	0,001829467	0,1119	0,0678114	0,11
RD_MOSAB_04	0	2 B	0,0472	15,305072	0,123358362	0,1236	0,0749016	6,59

Tabla 36 Anejo 1B: Continuación 42.

Código	Fijación de nitrógeno (N)			Control <i>in vitro</i> de sigatoka negra		
	OD 600 nm sin N	OD 600 nm con N	(%) crecimiento sin N	6 días	10 días	14 días
RD_MOSAA_05	0,0006	0,0023	26,09	1	1	1
RD_MOSAA_06	0,0179	1,0944	1,64	1	1	1
RD_MOSAA_07	0,0137	0,0003	100,00	0	0	0
RD_MOSAA_08	0,031	0,0009	100,00	0	0	0
RD_MOSAA_09	0,0187	1,1412	1,64	1	1	1
RD_MOSAA_10	0,0045	0,0052	86,54	1	1	1
RD_MOSAA_11	0,001	1,6628	0,06	2	2	2
RD_MOSAA_12	0,01	1,5355	0,65	1	1	1
RD_MOSAA_13	0,0043	1,0302	0,42	1	1	1
RD_MOSAA_14	0,0222	1,7833	1,24	1	1	1
RD_MOSAB_01	0,0652	0,2981	21,87	1	1	0
RD_MOSAB_02	0,0161	1,5246	1,06	1	0	0
RD_MOSAB_03	0,0976	1,39	7,02	1	1	1
RD_MOSAB_04	0,0315	1,8528	1,70	1	1	1