



Ministerio
de Educación
y Cultura



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesina para obtener el título de Licenciado en Ciencias Biológicas

**Respuesta de distintos cultivares de festuca
(*Festuca arundinacea*) a la inoculación con la cepa
Streptomyces albidoflavus UYFA156 e identificación
de la microbiota asociada a sus semillas**

Enzo Calzada Rodríguez

Tutora: Dra. Cecilia Taulé

Co-tutora: Dra. Patricia Vaz

Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo,
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, República Oriental del Uruguay

2024

Agradecimientos

A Cecilia, por ser mi guía desde el primer día. Por todo lo que me enseñaste y seguirás enseñando dentro y fuera del laboratorio. Por siempre darme para adelante y también saber frenarme cuando es necesario. Gracias por todo.

A Pati, por literalmente aparecer como un ser mágico una fría noche de invierno en los laboratorios de la facultad y contagiarme su pasión y amor por este bello mundo, las *Streptomyces*.

A Federico, por abrirme las puertas del laboratorio y darme la oportunidad de ser parte del grupo endófitos, por creer en mí y siempre estar dispuesto a ayudarme en lo que necesite.

Al tribunal, por sus correcciones, valiosos consejos para mejorar y por aceptar este trabajo en tan poco tiempo.

A Manuel, Angelo y sus familias, por tantos años de amistad y que a pesar de la distancia siempre están esperando mi regreso para juntarnos y reírnos una y otra vez de las mismas anécdotas pero cada vez más distorsionadas.

A toda la banda de Poblado Laura, la cual a pesar de la falta de tiempo, sigue encontrando la forma de juntarse para ver buen fútbol en el Gran Parque Central, pasar tardes de verano en la Playa Seré o simplemente charlar horas y horas durante las noches carmelitanas.

A Nico por siempre escucharme y ayudarme cuando más lo necesité.

A Ani, por ser mi compañera y además siempre estar para darme tu apoyo en esta última etapa de la carrera.

A mis amigas Cami, Mai y Dana, por acompañarme, ayudarme y escucharme siempre que lo necesité.

A todos mis compañeros de BIOGEM, por acompañarme y enseñarme tantas cosas durante el día a día en esta etapa de constante aprendizaje. Y en especial a el gran Diegotín, por su amistad y ayudarme a resolver hasta las dudas más existenciales en este mundo.

A mis abuelos, tía y primos, por siempre ayudarme, preocuparse por mi y estar esperando mi regreso al pueblo para llenarme de amor y cariño.

Para todos los que estuvieron y ya no están físicamente, en especial para vos abuelito, todas esas tardes después de la escuela mostrándote los dibujos de mi pesada enciclopedia están empezando a dar frutos.

A Naza, por ser la mejor hermana que se puede tener. Tu hermano siempre te va apoyar y estoy convencido que siempre vas a lograr lo que te propongas.

A mis padres, José y Lorena, les debo todo y se que no me alcanzarían nunca las palabras para agradecerles. Gracias por siempre dejarlo todo por mi educación, y por enseñarme a ser responsable y esforzarme para dar lo mejor de mi en la actividad que sea.

Y si bien sé que nunca vas a leer esto, también te quiero agradecer por haber sido una parte muy importante de mi vida, fuiste esencial para lograrlo, y te prometo que nunca te voy a olvidar, mi Canelita.

Gracias y perdón a todos los que sin ser nombrados en estas simples páginas saben que de alguna u otra forma fueron parte de esto. Si bien mi intención era intentar agradecer a todos, mientras escribía me di cuenta que por suerte la lista sería eterna.

Esto es de todos. Gracias.

Índice

Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas.....	5
Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
1.1 <i>Festuca arundinacea</i>	7
1.2 Festuca y su uso como forrajera en Uruguay.....	8
1.3 Holobionte planta.....	9
1.4 Bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal.....	9
1.5 Antecedentes e hipótesis de la línea de investigación.....	12
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Materiales y métodos.....	16
3.1 Ensayos de Promoción del Crecimiento Vegetal.....	16
3.1.1 Obtención de esporas de la cepa UYFA156.....	16
3.1.2 Desinfección de la superficie de las semillas.....	17
3.1.3 Montaje del ensayo de promoción del crecimiento vegetal.....	17
3.1.4 Análisis estadístico.....	18
3.2 Aislamiento e identificación de posibles bacterias endófitas de semilla.....	19
3.2.1 Aislamiento de los posibles endófitos.....	19
3.2.2 Lisado de células bacterianas.....	19
3.2.3 Amplificación del gen del <i>ARNr 16S</i> , secuenciación y análisis.....	20
4. Resultados.....	22
4.1 Ensayos de Promoción del Crecimiento Vegetal.....	22
4.1.1 Inoculación con la cepa UYFA156 en ausencia de nitrógeno.....	22

4.1.2 Inoculación con la cepa UYFA156 en presencia de nitrógeno.....	25
4.2 Aislamiento e identificación de probables endófitos de semilla de cultivares de festuca.....	28
4.2.1 Obtención de una colección de probables endófitos asociados a semillas de cultivares comerciales de festuca.....	28
4.2.2 Identificación de los aislamientos.....	30
5. Discusión.....	35
5.1 Ensayos de promoción de crecimiento vegetal.....	35
5.2 Aislamiento e identificación de probables endófitos bacterianos asociados a semillas de cultivares de festuca.....	37
5.3 Evaluación de la presencia de cepas endófitas del género <i>Streptomyces</i> en las semillas de los cultivares de festuca.....	41
6. Conclusiones y perspectivas.....	42
Anexo.....	43
Medios de cultivo para bacterias utilizados.....	43
Medio de cultivo para plantas utilizado.....	44
Soluciones utilizadas.....	45
Marcador de peso molecular utilizado.....	45
Bibliografía.....	46

Índice de Figuras

Figura 1.	Vistas de la morfología de la <i>Festuca arundinacea</i> .	7
Figura 2.	Representación de diferentes estadios de la comunidad bacteriana endofítica.	10
Figura 3.	Morfología de las colonias de la cepa <i>Streptomyces albidoflavus</i> UYFA156 creciendo en medio Tryptic Soy Agar (TSA) y efecto de su inoculación en plantas.	13
Figura 4.	Vista del ensayo de plantas de festuca creciendo en condiciones <i>in vitro</i> en la cámara de crecimiento de plantas.	22
Figura 5.	Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en el peso seco del cultivar de festuca Royal Q100 en ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.	24
Figura 6.	Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en el peso seco del cultivar de festuca Royal Q100 en presencia de nitrógeno en el medio de cultivo.	26
Figura 7.	Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en la altura aérea del cultivar de festuca Malma en presencia de nitrógeno en el medio.	27
Figura 8.	Vista de plantas de festuca cv. Malma fertilizadas con nitrógeno e inoculadas y sin inocular con la cepa UYFA156, al momento de la cosecha del ensayo.	27
Figura 9.	Vista del proceso empleado para el aislamiento de probables endófitos de semilla.	28

Figura 10.	Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación por PCR del gen <i>ARNr 16S</i> de los aislamientos UYFA364 y UYFA365.	30
Figura 11.	Identificación de los aislamientos a nivel de filos taxonómicos, diferenciados por cultivar de origen.	34
Figura 12.	Identificación taxonómica de los aislamientos a nivel de géneros, diferenciados por cultivar.	34

Índice de Tablas

Tabla 1.	Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en ausencia de nitrógeno sobre los parámetros altura aérea y peso seco comparados con el control sin inocular para cada cultivar de festuca.	23
Tabla 2.	Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en presencia de nitrógeno sobre los parámetros altura aérea y peso seco comparados con el control sin inocular para cada cultivar de festuca.	25
Tabla 3.	Número total de aislamientos obtenidos a partir de semillas de festuca, según el cultivar y el medio de cultivo original del cual fue aislado.	29
Tabla 4.	Resultado de la comparación de secuencias del gen <i>ARNr 16S</i> con respecto al mejor candidato de la base de datos brindada por EzBioCloud de los aislamientos de endófitos asociados a las semillas de cultivares de festuca.	31
Tabla 5.	Géneros identificados como probables endófitos de semillas de festuca que han sido reportados previamente como endófitos en otras plantas hospederas.	39

Resumen

La cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 es una bacteria endófito aislada de semillas del cultivar de *Festuca arundinacea* SFRO Don Tomás, para el cual demostró ser promotora de crecimiento vegetal (PCV). Asimismo, se demostró que la cepa UYFA156 es endófito también del cultivar Tacuabé pero no PCV. Mediante estudios de secuenciación masiva del gen *ARNr 16S* a partir de ADN endofítico de ambos cultivares, se observó que la inoculación con la cepa UYFA156 en el cultivar SFRO Don Tomás aumentó la diversidad de la microbiota bacteriana, mientras en el cultivar Tacuabé no cambió. Curiosamente, esta cepa no mostró mecanismos asociados a la PCV en evaluaciones *in vitro*, por lo que se postuló la hipótesis de que el efecto PCV puede estar asociado a la modulación de la microbiota.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la respuesta de cultivares comerciales de festuca a la inoculación bacteriana con la cepa UYFA156 e identificar la microbiota cultivable asociada a sus semillas.

Se evaluó *in vitro* la respuesta de 7 cultivares de festuca al mes de ser inoculadas con la cepa UYFA156, en presencia y ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Los resultados mostraron PCV en la altura de las plantas en el cultivar Malma y en el peso seco de la planta en el cultivar Royal Q100.

Por otra parte, se construyó una colección de 57 aislamientos a partir de las semillas de los 7 cultivares en estudio. Para cada aislamiento se realizó la extracción del ADN, amplificación y secuenciación del gen marcador *ARNr 16S*. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se logró identificar taxonómicamente 50 cepas, siendo *Kosakonia*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium*, *Staphylococcus* y *Pantoea* los géneros más representados.

En su conjunto los resultados aportan conocimiento sobre la microbiota endofítica asociada a semillas de los cultivares comercializados en Uruguay, generando una colección de aislamientos para futuros estudios. Asimismo, se identificaron cultivares que respondieron positivamente a la inoculación bacteriana por la cepa UYFA156, evidenciando la especificidad de la respuesta a la inoculación y la importancia de estudiar la microbiota asociada a cada cultivar y el genotipo de la planta en la interacción planta-endofito.

1. Introducción

1.1 *Festuca arundinacea*

La festuca (*Festuca arundinacea*) es una gramínea perenne originaria de la región mediterránea de Europa, la cual fue introducida en diversas partes del mundo como planta forrajera (Hoveland, 2009). La planta presenta tallos no ramificados y lisos que alcanzan una altura aérea de entre 45 y 120 cm, hojas color verde oscuro de 10 a 60 cm de largo e inflorescencias en forma de panícula de 15 a 50 cm de largo que generan semillas de 6 a 10 mm de longitud (Gibson y Newman, 2001) (Figura 1).

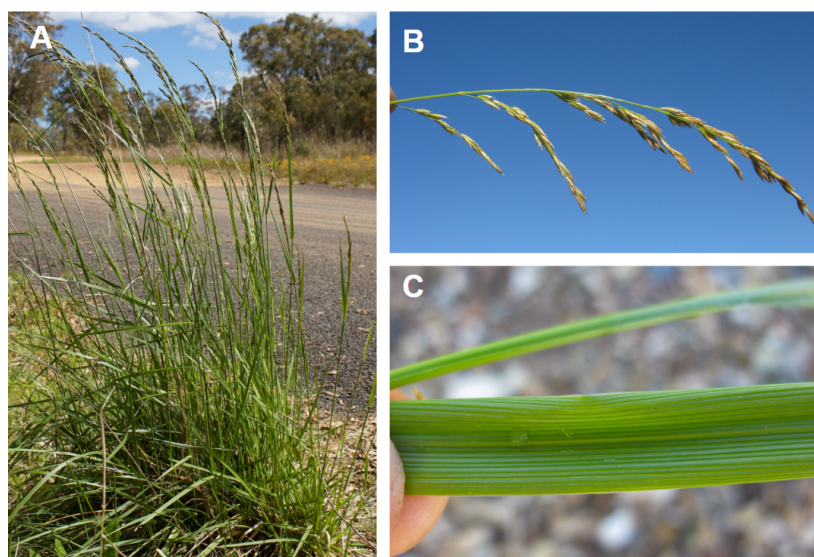


Figura 1: Vistas de la morfología de *Festuca arundinacea*. **A:** Aspecto general de la planta. **B:** Inflorescencias en forma de panículas. **C:** Detalle de las hojas. (Imágenes tomadas de Watling, 2022)

Durante el cultivo de festuca, para lograr una eficiente implantación de las plantas se utilizan elevadas cantidades de fertilizantes químicos (Roberts et al., 2009; Formoso, 2010). Esta práctica acarrea elevados costos de producción, y problemas ambientales asociados, ya que gran parte del fertilizante aplicado se pierde por escorrentía o lixiviación, depositándose en los cuerpos de agua y provocando su eutrofización (Garabet et al., 1998; Halvorson et al., 2002).

1.2 Festuca y su uso como forrajera en Uruguay

En el año 2021 el Producto Interno Bruto (PIB) de Uruguay fue de 59.000 millones de dólares americanos, siendo la ganadería la principal actividad primaria, representando el 4,7% del PIB del país (Uruguay XXI, 2022). Según los datos del último censo agropecuario realizado en el año 2011, las actividades pecuarias ocupan el 77,8% de la superficie del suelo explotado, de los cuales el 5,7% se corresponden a praderas artificiales para pastoreo directo o para la producción de forrajes de reserva (MGAP-DIEA, 2011).

Características propias de la festuca como su adaptabilidad a suelos relativamente arenosos o limosos, poseer una ligera tolerancia a la alcalinidad y/o salinidad, así como a distintos regímenes hídricos la convierten en una de las principales gramíneas forrajeras utilizadas en Uruguay, siendo la especie sembrada en más del 70% del área de praderas artificiales del país (Milne, 2009; Kent et al., 2019).

Actualmente en Uruguay se cuenta con 48 cultivares comerciales de festuca registrados (INASE, s. f.). Estos se clasifican en cultivares de tipo mediterráneo (ej. Flecha, Aprilia, Resolute II.) y los de tipo continental (ej. Tacuabé, LE 14-84, LE 14-86, Malma, Taita, Royal Q100, Rizar, Rizomat). Los primeros se caracterizan por poseer un buen potencial de crecimiento durante el invierno, mientras que los cultivares de tipo continental son los más utilizados por su capacidad de adaptarse y crecer en todas las estaciones del año (INIA, s. f.).

1.3 Holobionte planta

Actualmente se entiende que las plantas no viven solas, sino rodeadas e integradas por su propia comunidad de organismos en lo que se denomina un holobionte, término que se refiere a un organismo huésped junto a todos sus organismos asociados (Guerrero et al., 2013; Lyu et al., 2021; Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2016; Rosenberg et al., 2007). Se ha observado que muchos de los fenotipos observados en un organismo son el resultado de las interacciones entre los componentes del holobionte, por ejemplo el desarrollo de una enfermedad o el crecimiento vegetal (Friesen et al., 2011). Dichas interacciones entre ambos componentes se pueden clasificar como patógenas, neutrales o benéficas (Gray y Smith, 2005; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Entre las interacciones benéficas para las plantas se incluyen el biocontrol de fitopatógenos, la biofertilización y la fitoestimulación (Ryan et al., 2008).

1.4 Bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal

Entre los organismos presentes en el holobionte planta pueden existir arqueas, virus, hongos, protistas y bacterias (Hassani et al., 2018). Al igual que el resto de los organismos que integran el holobionte, las bacterias se pueden clasificar por su ubicación, siendo epifitas si viven en la superficie o endófitas si viven dentro dentro del mismo. En particular, las bacterias endófitas se definen como bacterias que colonizan activamente los tejidos internos de las plantas y que no provocan síntomas aparentes de enfermedad (Wilson, 1995). Para ser consideradas endófitos verdaderos las bacterias deben de ser aisladas de tejidos vegetales desinfectados en su superficie, confirmar su presencia dentro de la planta mediante microscopía y corroborar que tienen la capacidad de re-infectar al huésped, cumpliendo con los postulados de Koch (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998).

De acuerdo a su estrategia de vida, los endófitos bacterianos se pueden clasificar en obligatorios y facultativos. Los endófitos obligatorios dependen de la planta hospedera para su crecimiento, supervivencia y dispersión, la cual ocurre de manera vertical, desde la planta madre a sus descendientes a través de las semillas o esquejes (Hardoim et al., 2008). En cambio, los endófitos facultativos tienen la capacidad de llevar a cabo

un ciclo de vida bifásico, alternando entre una fase de vida en el entorno circundante, generalmente el suelo, y otra cuando logran ingresar a la planta. Esta colonización se logra principalmente de forma pasiva a través de heridas que se producen por el crecimiento de las raíces laterales, estomas y lenticelas, o activamente a través de la liberación de enzimas que provocan la hidrólisis de la pared celular de la planta (Chi et al., 2005; Hardoim et al., 2008; Malfanova et al., 2013). Este proceso de infección y colonización implica interacciones planta-microorganismo en las que existe un diálogo molecular entre ambos componentes para que se dé el reconocimiento necesario (Figura 2) (Pinski et al., 2019)

Una vez que las bacterias ingresan al tejido, colonizan los espacios intercelulares, pudiendo permanecer en las zonas cercanas al punto de ingreso o adentrarse hasta el sistema vascular, donde son transportadas y logran colonizar otros órganos de la planta como el tallo, hojas, frutas y semillas (Figura 2)(Gasser et al., 2011; Malfanova et al., 2013).

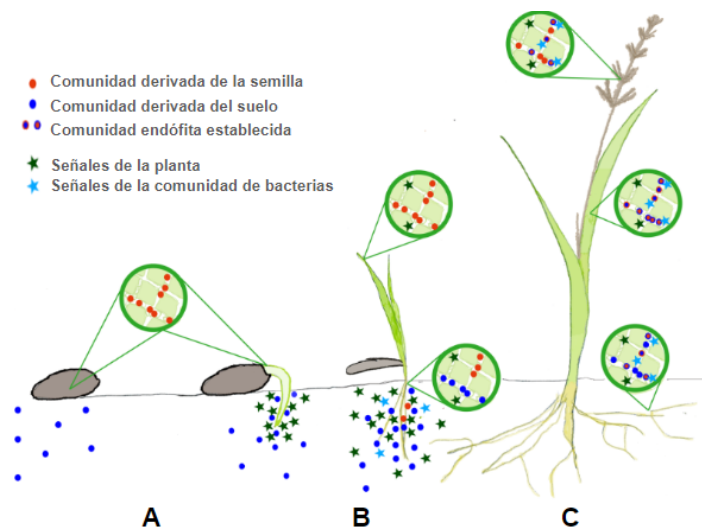


Figura 2: Representación de diferentes estadios de la comunidad bacteriana endofítica. **A:** Germinación de la semilla. En rojo se representa la comunidad de bacterias endófitas residentes dentro de la semilla y cómo las señales de la planta comienzan a atraer a la comunidad de bacterias del suelo. **B:** Estado de plántula. Comienza la infección y colonización de las bacterias endófitas facultativas, la comunidad bacteriana también emite señales. **C:** En plantas adultas, las bacterias endófitas establecidas logran colonizar diferentes órganos de la planta, distintos al sitio de ingreso. (Modificado de Taulé et al., 2021).

Las bacterias endófitas pueden establecer relaciones de mutualismo con el hospedero, donde la bacteria se beneficia de la disponibilidad de nutrientes presentes en la planta, mientras que ésta última se beneficia debido a la que la bacteria le confiere mediante diversos mecanismos, una promoción en el crecimiento vegetal (PCV) (Ryan et al., 2008; Hardoim et al., 2008; Taulé et al., 2021).

Los mecanismos de PCV mediados por bacterias se pueden clasificar en directos o indirectos. Los mecanismos directos incluyen la modulación del etileno, la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) o a través de la disponibilización de nutrientes, por ejemplo mediante la fijación biológica del nitrógeno atmosférico o un aumento de la capacidad de absorción de minerales del suelo como hierro, fósforo o potasio (Hardoim et al., 2008; Olanrewaju et al., 2017). Por otra parte, los mecanismos indirectos abarcan la activación de la respuesta inmune de la planta y el control biológico de fitopatógenos, ya sea por competencia o por interacciones amensalistas como la producción de antibióticos y toxinas (Hardoim et al., 2008). Estas características las convierten en una alternativa muy prometedora para su uso como bioinoculantes, pudiendo sustituir parcialmente la fertilización química o el uso de pesticidas, tendiendo a una producción agronómica sustentable (Compant et al., 2019).

1.5 Antecedentes e hipótesis de la línea de investigación

Una de las principales líneas de investigación del Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo, está dedicada al estudio y entendimiento de las interacciones entre la microbiota asociada a cultivos de interés agronómico. Dichas investigaciones se realizan con el objetivo de generar conocimiento aplicable en la producción de bioinsumos en el marco de la promoción de una agricultura sustentable. Entre los cultivos estudiados se encuentran el sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el cáñamo (*Cannabis sativa*), la canola (*Brassica napus*) y la festuca (*Festuca arundinacea*) (Taulé et al., 2012; Mareque et al., 2014; de los Santos et al., 2015; Taulé et al., 2016; Taulé et al., 2019).

El trabajo de esta tesis de grado se enmarca específicamente en el estudio de la microbiota asociada a la gramínea forrajera festuca. Dicha línea comenzó con la construcción de una colección de 342 aislamientos de probables bacterias endófitas obtenidas a partir de muestras de semillas, raíces y tallos del cultivar de festuca SFRO Don Tomás. Esta colección fue sometida a análisis bioquímicos, moleculares y fisiológicos con el objetivo de identificar mecanismos asociados a la PCV (de los Santos et al., 2015). Posteriormente, se evaluó la respuesta de los cultivares SFRO Don Tomás y Tacuabé a la inoculación con una selección de estas cepas (de los Santos et al., 2015, Vaz y Taulé et al., 2019). Dentro de las cepas que mostraron promover el crecimiento de la planta se encuentra la cepa aislada de semillas *Streptomyces sp.* UYFA156 (Figura 3A y 3B). A pesar de que no se observaron mecanismos de promoción de crecimiento *in vitro*, esta cepa promovió el crecimiento del cv. SFRO Don Tomás (Figura 3C), aunque no de del cv. Tacuabé (de los Santos et al., 2015; Vaz y Taulé et al., 2019).

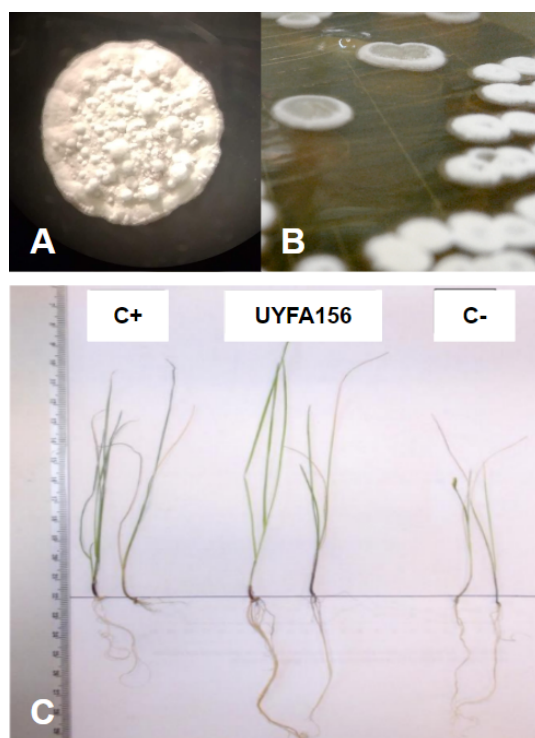


Figura 3: Morfología de las colonias de la cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 creciendo en medio Tryptic Soy Agar (TSA) y efecto de su inoculación en plantas. **A:** Vista bajo lupa. **B:** Colonias creciendo sobre medio TSA. **C:** Vista de plantas de festuca cv. SFRO Don Tomás inoculadas con la cepa UYFA156 en ausencia de nitrógeno comparadas con plantas fertilizadas con nitrógeno (C+) y sin fertilizar (C-) (Autoría de las fotos A y B: Patricia Vaz-Jauri, foto C: Cecilia de los Santos).

Si bien la inoculación con la cepa no promovió crecimiento vegetal en el cultivar comercial de festuca Tacuabé, se observó de forma interesante, la capacidad de la cepa de colonizar el interior de los tejidos de plantas de ambos cultivares, demostrando así ser un endófito verdadero tanto en la interacción compatible como en la incompatible (de los Santos et al., 2015; Vaz - Taulé et al., 2019). Posteriormente se secuenció el genoma de la cepa, identificándose como perteneciente a la especie *Streptomyces albidoflavus* (Vaz Jauri et al., 2019).

También se estudió el efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 sobre la microbiota endofítica bacteriana de plantas de festuca cv. SFRO Don Tomás y cv. Tacuabé, mediante secuenciación masiva del gen *ARNr 16S*. Los resultados mostraron que ambos cultivares tienen microbiotas diferentes (en semillas y plántulas) y que la

inoculación genera cambios en la diversidad y composición a lo largo del tiempo en la microbiota endofítica bacteriana (Vaz Jauri et al., 2023). A partir de este resultado, sumado a los resultados anteriores, se plantea la hipótesis de que la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 es capaz de modular la microbiota asociada al cv. SFRO Don Tomás provocando un fenotipo PCV del holobionte festuca. Por tratarse de una cepa PCV y proveniente de plantas de festuca cv. SFRO Don Tomás, resulta de gran interés conocer cuál es la respuesta de otros cultivares comerciales de nuestro país a la inoculación con la cepa UYFA156. A su vez, la cepa UYFA156 fue aislada a partir de semillas, siendo éstas una excelente vía de dispersión de la cepa y colonización de nuevos individuos. Por lo tanto es relevante conocer la microbiota endofítica de las semillas y en particular conocer si el género *Streptomyces* está presente en las semillas de los cultivares comerciales a ser evaluados.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar la interacción entre la cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 y cultivares de la planta forrajera *Festuca arundinacea* utilizados en Uruguay

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta de diferentes cultivares de Festuca a la inoculación con la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 con y sin el agregado de nitrógeno como fertilizante
- Aislar e identificar endófitos bacterianos presentes en las semillas de diferentes cultivares de Festuca
- Evaluar la presencia de cepas de *Streptomyces* en las semillas de diferentes cultivares de Festuca

3. Materiales y métodos

Se realizaron ensayos de promoción del crecimiento vegetal y aislamientos de bacterias endófitas de semillas en siete cultivares de festuca comercializados en Uruguay: LE 14-84, LE 14-86, Rizar, Rizomat, Malma, Royal Q100 y Taita (INASE, 2024).

3.1 Ensayos de Promoción del Crecimiento Vegetal

Con el objetivo de estudiar la respuesta *in vitro* de los cultivares a la inoculación con la cepa UYFA156 en presencia o ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, se plantearon y ensayaron los siguiente tratamientos: 1- plantas fertilizadas con nitrógeno e inoculadas con la cepa UYFA156, 2- plantas fertilizadas con nitrógeno sin inocular, 3- plantas sin fertilizar inoculadas con la cepa UYFA156 y 4- plantas sin fertilizar ni inocular.

3.1.1 Obtención de esporas de la cepa UYFA156

Para obtener las esporas de la cepa UYFA156 con las que se inocularon las plantas de festuca, se sembró una alícuota de 50 µl del stock (4×10^9 esporas/mL) en placas que contenían medio de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA) (ver Anexo) con rastrillo cubriendo toda la placa. La placa se incubó a 30 °C durante aproximadamente 10 días, tiempo suficiente para que la bacteria crezca y comience el proceso de esporulación. Luego, las esporas fueron recolectadas con un hisopo embebido en glicerol 25% (v/v) en condiciones de esterilidad. Una vez terminado el proceso de recolección, el glicerol con las esporas fue filtrado a través de algodón para eliminar el micelio que produce este género bacteriano. Para determinar la concentración de la cosecha se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonias mediante la siembra de alícuotas de 100 µl de diferentes diluciones seriadas en placas de TSA.

3.1.2 Desinfección de la superficie de las semillas

La desinfección de la superficie fue realizada sumergiendo 5 g de semillas en un matraz estéril con una solución de etanol 70% (v/v) durante 3 minutos y posteriormente en hipoclorito de sodio 5% durante 45 minutos en constante agitación. Una vez transcurrido el tiempo y descartado el hipoclorito de sodio, las semillas fueron lavadas 5 veces con agua destilada estéril (de los Santos et al., 2015).

Se realizó un control de la desinfección mediante la siembra de alícuotas de 100 µl del agua del último lavado en la superficie de placas de Petri conteniendo medio rico de cultivo TSA. Luego de 72 horas de incubación a una temperatura de 30 °C se verificó la ausencia de crecimiento.

Las semillas desinfectadas fueron colocadas en placas de Petri con agar-agua 0.8% (p/v) e incubadas a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 días hasta su germinación (de los Santos et al., 2015).

3.1.3 Montaje del ensayo de promoción del crecimiento vegetal

Se esterilizaron en autoclave tubos de vidrio con un tapón de algodón que contenían 20 mL de medio Jensen líquido sin nitrógeno (ver Anexo) (Vincent, 1970) y una capa de 2 cm de bolitas de polipropileno que brindan un soporte inerte para las plantas (de los Santos et al., 2015). Se traspasaron dos semillas recién germinadas por tubo. Los tratamientos que emulan una fertilización nitrogenada recibieron una concentración final de KNO_3 0.05 % (p/v) estéril en el medio de cultivo (de los Santos et al., 2015; Ferrari et al., 2023).

Luego de 24 horas de haber traspasado las semillas germinadas a los tubos con el medio Jensen, se inocularon los correspondientes tratamientos con la cepa UYFA156. Para esto, cada plántula se inoculó con 1×10^7 esporas de la cepa UYFA156 en un volumen final de 100 µl de una solución de NaCl 0,9% (p/v). El inóculo se aplicó en la base del tallo de cada una de las plantas. De la misma forma, a tubos control (sin

inoculación con la cepa) se les agregó una alícuota de 100 µl de NaCl 0,9% (p/v) estéril a cada planta. Cada uno de los tratamientos tuvo 10 réplicas independientes.

El ensayo se mantuvo en crecimiento por 30 días, durante los cuales los tubos con las plantas permanecieron a una temperatura estable de 26 °C expuestos a un fotoperiodo controlado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento, se registró la altura de la parte aérea de cada planta individualmente. A continuación se juntaron ambas plantas de cada tubo para su secado durante 7 días en una estufa a una temperatura de 60 °C. El registro de la masa se realizó con una balanza analítica con una sensibilidad de 0,001 gramos y el valor de peso seco obtenido para ambas plantas que compartían tubo originalmente fue considerado como una unidad.

3.1.4 Análisis estadístico

Utilizando el lenguaje de programación R en el programa RStudio se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Se consideraron como significativos los p-valor menores a 0.05 para comparar las medias de las variables altura aérea y peso seco total respectivamente, entre los tratamientos inoculados en comparación con el control sin inocular. La homogeneidad de varianzas y normalidad en la distribución de los residuales fueron comprobadas con la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Fligner-Killeen respectivamente.

3.2 Aislamiento e identificación de posibles bacterias endófitas de semilla

3.2.1 Aislamiento de los posibles endófitos

Con el objetivo de aislar las bacterias endófitas asociadas a las semillas de cada uno de los cultivares estudiados, se partió de un gramo de semillas de cada cultivar, las cuales fueron desinfectadas en su superficie siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.1.2. Las semillas fueron maceradas en un mortero estéril con 5 mL de NaCl 0,9% (p/v) en condiciones de esterilidad. El macerado y sus diluciones 1/10 y 1/100 fueron sembradas por triplicado en alícuotas de 100 µL sobre la superficie de placas de Petri con tres medios de cultivo sólidos distintos. El medio TSA fue utilizado para abarcar la mayor diversidad posible de posibles aislamientos, mientras que los medios Starch Casein Agar (SCA) y Agar-Avena (ver Anexo) fueron utilizados con fin de facilitar el aislamiento de cepas pertenecientes al género *Streptomyces*, dada su naturaleza selectiva para estos organismos (Küster y Williams, 1964; Shirling y Gottlieb, 1966)

Las placas fueron incubadas a una temperatura de 30 °C durante 72 horas. Una vez transcurrido ese tiempo y durante las siguientes 48 horas comenzaron a realizarse observaciones y repiques en medio de cultivo TSA para aislar y verificar la pureza de las colonias. Los aislamientos fueron conservados en freezer a -80°C utilizando como crioprotector glicerol 25% (v/v).

3.2.2 Lisado de células bacterianas

Con el objetivo de identificar los aislamientos, se amplificó, secuenció y comparó con una base de datos la secuencia del gen marcador *ARNr 16S*. Para esto se comenzó con un lisado celular de cada uno de los aislamientos. Con la ayuda de un Vortex se suspendió una ansada de varias colonias frescas provenientes de una placa con medio TSA, en 100 µL de agua ultrapura estéril. La suspensión se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet obtenido se suspendió en 100 µL de NaOH 0.05 M y se incubó a 100 °C durante 4 minutos para

luego ser enfriado en un baño de hielo por 2 minutos. A continuación, se añadieron 900 µl de agua ultrapura estéril a la suspensión, que se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se conservaron 700 µl del sobrenadante como suspensión de trabajo a una temperatura de -20 °C (Taulé et al., 2012).

3.2.3 Amplificación del gen del *ARNr 16S*, secuenciación y análisis

Para amplificar el gen *ARNr 16S* se utilizaron los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTGTTCAGACTT-3') (Lane, 1991) a partir de los cuales se obtiene un amplicón de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) una vez terminada la reacción.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, distribuidos en 32,6 µl de agua bidestilada estéril, 5 µl de buffer DFS-Taq DNA Polymerase 10X, 2 µl de una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a una concentración de 5 mM cada uno, 2 µl de seroalbúmina bovina (BSA) 0,1%, 2 µl de cada uno de los cebadores a una concentración de 20 µM, 0.4 µl de la polimerasa DFS-Taq DNA Polymerase (Bioron GmbH) y 4 µl del lisado obtenido con el protocolo descrito en la sección 3.2.2, como ADN molde. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de un minuto a 94 °C, un minuto a 55 °C, un minuto a 72 °C y para finalizar un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Se empleó como control positivo un lisado de la cepa *Kosakonia radicincitans* UYSO10 (Taulé et al., 2012), mientras que como control negativo se reemplazó el lisado con agua ultrapura estéril.

Los productos de la PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (ver Anexo) sometido a 90 V/cm durante 35 minutos. Para la visualización de las bandas bajo luz ultravioleta se utilizó como agente intercalante Good View (Beijing SBS. Genetech. Co. Ltd.) según indicación del fabricante. El marcador de peso molecular empleado como referencia fue HyperLadder™ 1 kb (Meridian Bioscience) (ver Anexo).

Los productos de amplificación de las reacciones de PCR fueron enviados a la empresa MacroGen Inc. (Corea del Sur) para su purificación y secuenciación. Para aumentar la fidelidad de las secuencias obtenidas, la secuenciación fue realizada desde ambos extremos del amplicón utilizando los cebadores 27F y 1492R. Una vez recibidas ambas secuencias para cada aislamiento, las mismas fueron emparejadas y editadas con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.

Para la asignación de un género taxonómico a los aislamientos se utilizó la herramienta bioinformática EzBioCloud 16S Database (www.ezbiocloud.net). Dicha herramienta compara las secuencias del gen *ARNr 16S* obtenidas por secuenciación con las secuencias depositadas en su base de datos curada, obteniendo como resultado la cepa tipo con mayor similitud (Yoon et al., 2017).

4. Resultados

4.1 Ensayos de Promoción del Crecimiento Vegetal

4.1.1 Inoculación con la cepa UYFA156 en ausencia de nitrógeno

A los 30 días post inoculación se cosechó el ensayo de PCV y se realizaron los registros de altura aérea y de peso seco (Figura 4). A continuación, se compararon las medias de las variables obtenidas para cada cultivar entre el tratamiento que recibió la inoculación de la cepa UYFA156 y el tratamiento control que no fue inoculado mediante un análisis de varianza.



Figura 4: Vista del ensayo de plantas de festuca creciendo en condiciones *in vitro* en la cámara de crecimiento de plantas.

Los resultados mostraron que el peso seco del cultivar Royal Q100 aumentó significativamente cuando fue inoculado con la cepa UYFA156 respecto al control sin inoculación en ausencia de nitrógeno en el medio (Tabla 1 y Figura 5). El resto de los cultivares no presentaron diferencias significativas tras la inoculación con la cepa UYFA156 en ninguno de los dos parámetros evaluados (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en ausencia de nitrógeno sobre los parámetros altura aérea y peso seco comparados con el control sin inocular para cada cultivar de festuca.

Cultivar de festuca	Altura aérea (cm)		Peso seco (mg)	
	Control	Inoculado con UYFA156	Control	Inoculado con UYFA156
Royal Q100	12,1	12,0	111	132 (**)
LE 14-86	10,7	9.9	111	114
Rizomat	13,5	12,7	148	130
Taita	11,0	10,5	123	123
Rizar	11,2	12,2	135	118
LE 14-84	11,2	10,8	140	123
Malma	9	9,4	106	106

En **negrita** se resaltan los parámetros donde hubo una diferencia significativa con el control sin inocular. Con **(**)** se indica que la variación de la media fue significativa con un p-valor < 0,01. No se consideraron significativas variaciones en la media con un p-valor > 0,05. Todos los tratamientos tuvieron 10 réplicas.

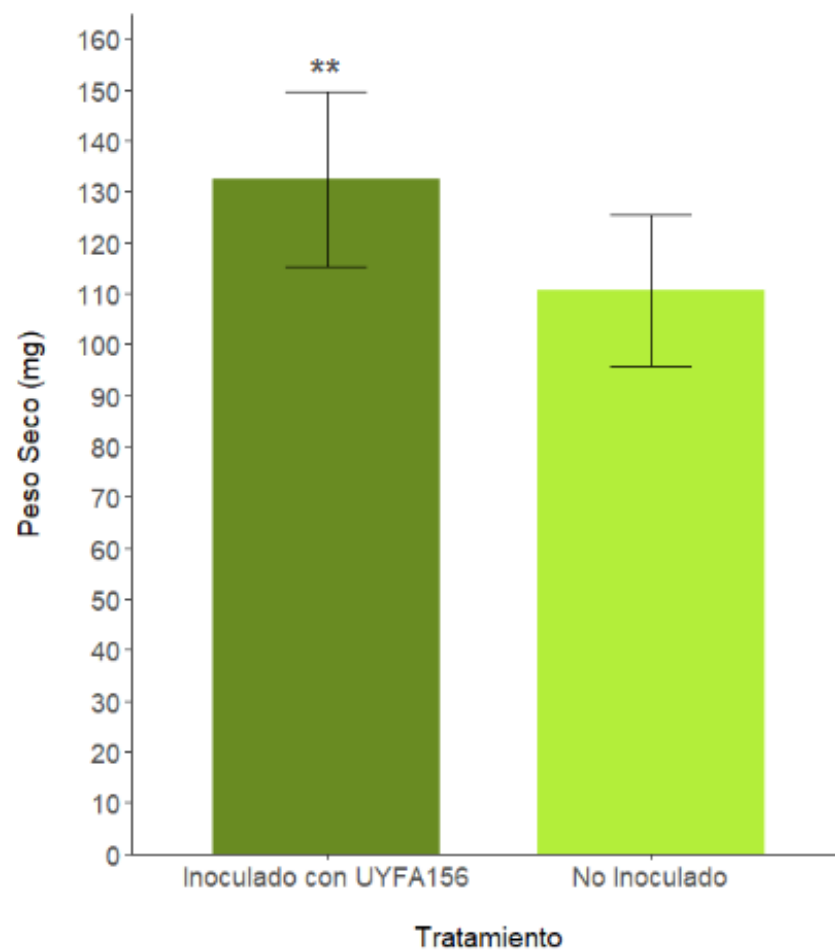


Figura 5: Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en el peso seco del cultivar de festuca Royal Q100 en ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Con '**' se indica que la variación de la media fue significativa con un p-valor < 0,01.

4.1.2 Inoculación con la cepa UYFA156 en presencia de nitrógeno

De manera similar a lo descrito en 4.1.1, se analizaron los ensayos de respuesta a la inoculación con la cepa UYFA156 en medio de cultivo con nitrógeno agregado (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en presencia de nitrógeno sobre los parámetros altura aérea y peso seco comparados con el control sin inocular para cada cultivar de festuca.

Cultivar de festuca	Altura aérea (cm)		Peso seco (mg)	
	Control	Inoculado con UYFA156	Control	Inoculado con UYFA156
Royal Q100	26,7	28,8	279	375 (*)
LE 14-86	23,6	21,0	281	228
Rizomat	22,3	20,7	230	234
Taita	17,6	16,9	180	176
Rizar	25,6	26,4	315	282
LE 14-84	25,0	24,0	360	350
Malma	26,2	28,5 (*)	312	339

En **negrita** se resaltan los parámetros donde hubo una diferencia significativa con el control sin inocular. Con (*) se indica que la variación de la media fue significativa con un p-valor < 0,05. No se consideraron significativas variaciones en la media con un p-valor > 0,05. Todos los tratamientos tuvieron 10 réplicas.

Como se observa en la Tabla 2 y en la Figura 6, el cultivar Royal Q100 tuvo un aumento significativo ($p\text{-valor} < 0,05$) en el peso seco cuando fue inoculado con la cepa UYFA156, de manera similar a lo ocurrido cuando fue inoculado en ausencia de nitrógeno.

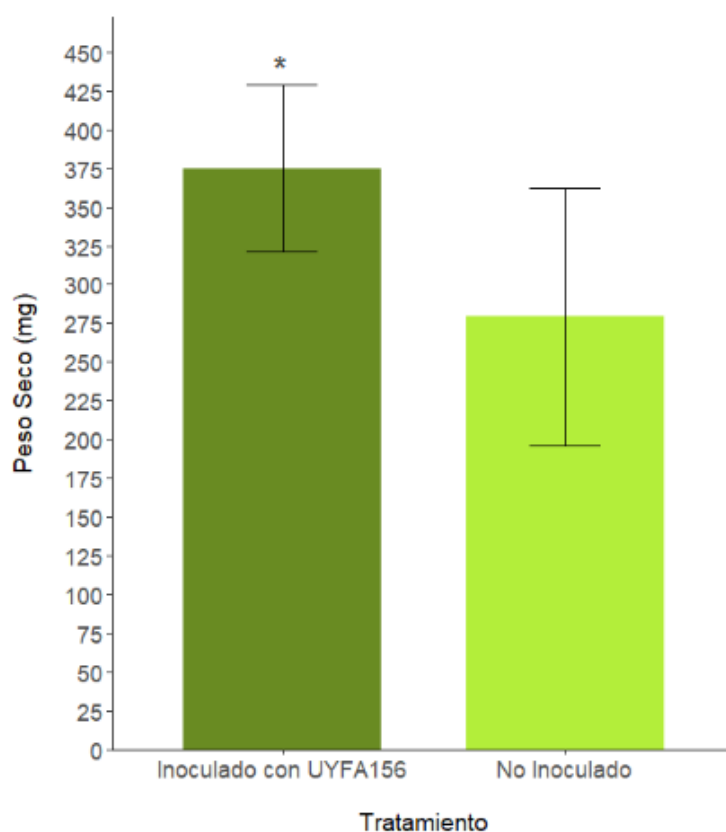


Figura 6: Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en el peso seco del cultivar de festuca Royal Q100 en presencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Con ‘*’ se indica que la variación de la media fue significativa con un $p\text{-valor} < 0,05$

A su vez, en presencia de nitrógeno en el medio hubo un aumento significativo en la altura del cultivar Malma en las plantas inoculadas respecto a las plantas control sin inocular ($p\text{-valor} < 0,05$) (Tabla 2, Figuras 7 y 8).

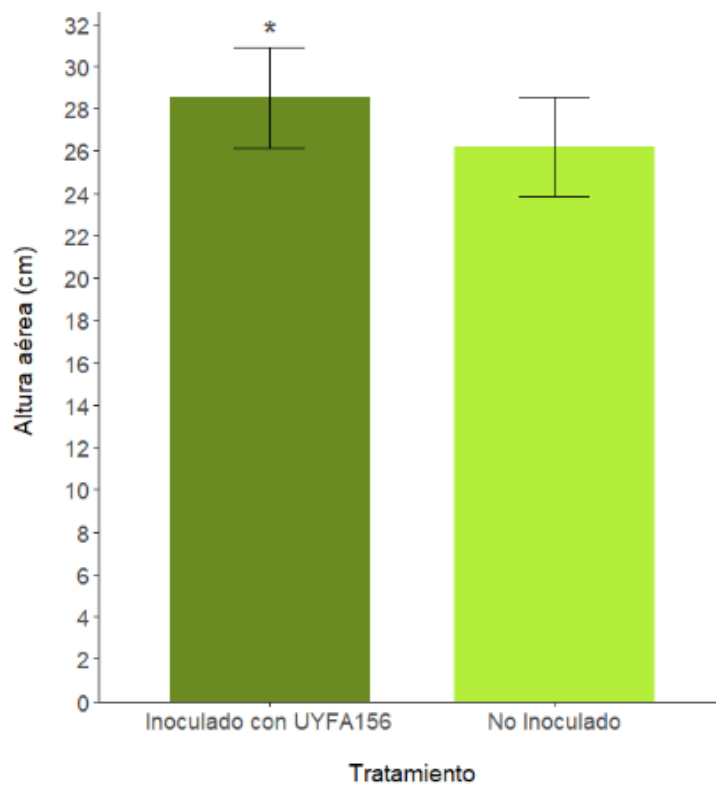


Figura 7: Efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 en la altura aérea del cultivar de festuca Malma en presencia de nitrógeno en el medio. Con “*” se indica que la variación de la media fue significativa con un p-valor < 0,05.



Figura 8: Vista de plantas de festuca cv. Malma fertilizadas con nitrógeno e inoculadas y sin inocular con la cepa UYFA156, al momento de la cosecha del ensayo. En la figura se muestran plantas pertenecientes a 5 de los 10 tubos para cada tratamiento.

4.2 Aislamiento e identificación de probables endófitos de semilla de cultivares de festuca

4.2.1 Obtención de una colección de probables endófitos asociados a semillas de cultivares comerciales de festuca

A partir de la metodología descrita para la obtención de aislamientos de semilla, se seleccionaron aquellas colonias que presentaban diferente morfología entre sí en cada medio de cultivo utilizado (Figura 9). Los aislamientos seleccionados fueron repicados a medio TSA para ser purificados y comparar las morfologías en un mismo medio. Para generar la colección se almacenaron en glicerol aquellas colonias con diferente morfología en TSA de cada cultivar.

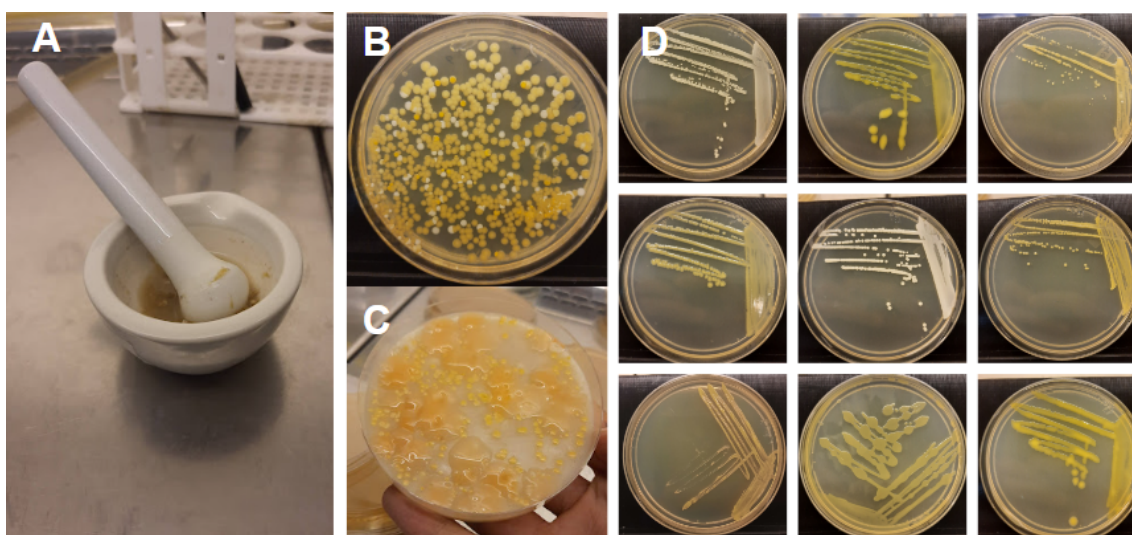


Figura 9: Vista del proceso empleado para el aislamiento de probables endófitos de semilla. **A:** Macerado de semillas desinfectadas en su superficie con una solución de NaCl 0,9% (p/v) en un mortero estéril. Vista de placas de siembra de la dilución 1/10 del macerado para el aislamiento de bacterias endófitas en los medios de cultivo TSA (**B**) y Agar-Avena (**C**). **D:** Probables endófitos con distinta morfología en placa de medio de cultivo TSA.

Utilizando este procedimiento se obtuvieron 57 aislamientos de probables endófitos asociados a las semillas de los 7 cultivares comerciales de festuca analizados. Como se muestra en la Tabla 3, 8 de los aislamientos fueron obtenidos de semillas del cv. Royal Q100, 4 del cv. LE 14-84, 12 del cv. Rizomat, 9 del cv. Taita, 7 del cv. Rizar, 10 del cv. LE 14-84 y 7 corresponden al cv. Malma. En la Tabla 3 también se indica el número de aislamientos obtenido según el medio de cultivo utilizado.

Tabla 3. Número total de aislamientos obtenidos a partir de semillas de festuca, según el cultivar y el medio de cultivo original del cual fue aislado.

Cultivar	Medio de cultivo			Total
	TSA	SCA	Agar-Avena	
Royal Q100	4	2	2	8
LE 14-86	2	1	1	4
Rizomat	5	3	4	12
Taita	5	2	2	9
Rizar	4	1	2	7
LE 14-84	8	0	2	10
Malma	6	0	1	7
Total	34	9	14	57

4.2.2 Identificación de los aislamientos

Para la identificación de los aislamientos obtenidos a nivel taxonómico de género se amplificó y secuenció el gen marcador *ARNr 16S*, junto con su posterior comparación con una base de datos. De los 57 aislamientos de probables endófitos obtenidos, en 56 casos se pudo amplificar con éxito dicho gen (Figura 10). Solamente a partir del aislamiento UYFA372 no se pudo realizar la amplificación del gen, a pesar de haber intentado la reacción a partir de 3 lisados independientes.

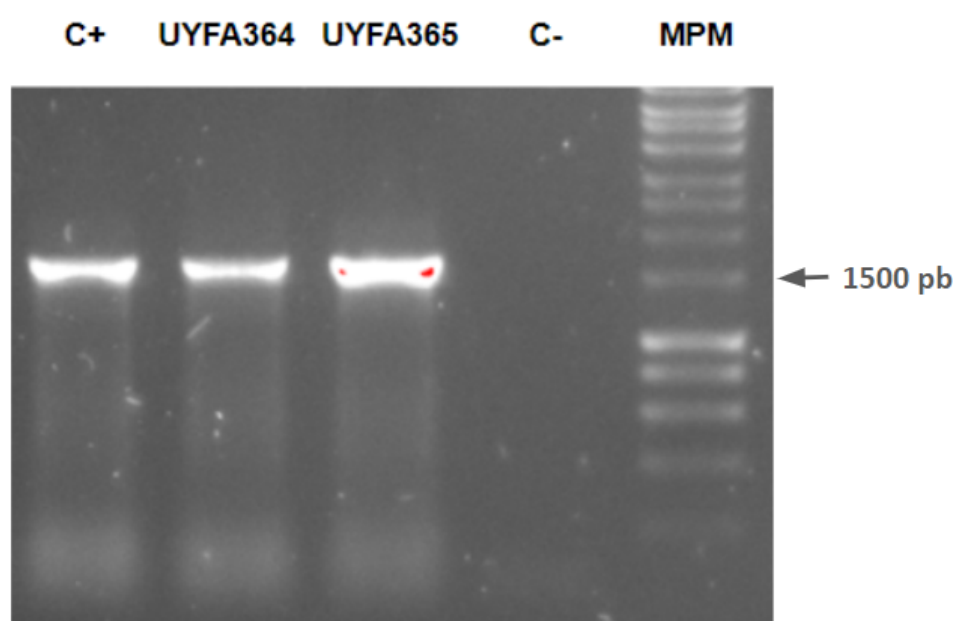


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación por PCR del gen *ARNr 16S* de los aislamientos UYFA364 y UYFA365. Los controles positivo y negativo se indican con C+ y C- respectivamente. La sigla MPM indica el carril correspondiente al marcador de peso molecular HyperLadder™ 1 kb.

Los productos de las PCR fueron enviados a un servicio de secuenciación externo (Macrogen Inc.) para ser secuenciados desde ambos extremos del amplicón utilizando los cebadores universales 27F y 1492R. Luego de ser emparejadas y editadas, las secuencias fueron comparadas con la base de datos de EzBioCloud, logrando identificar 50 de los aislamientos obtenidos (Tabla 4).

Seis aislamientos no pudieron ser identificados por obtener ambas secuencias de mala calidad (UYFA373, UYFA383, UYFA386, UYFA388, UYFA391 y UYFA392). A su vez 7 aislamientos se pudieron identificar utilizando una de las secuencias obtenidas, ya sea a partir del cebador 27F o el 1492R, ya que la otra secuencia también carecía de la calidad necesaria para generar un alineamiento con el software utilizado (Tabla 4).

Tabla 4: Resultado de la comparación de secuencias del gen *ARNr 16S* con respecto al mejor candidato de la base de datos brindada por EzBioCloud de los aislamientos de endófitos asociados a las semillas de cultivares de festuca.

Cultivar	Aislamiento	Mejor candidato ^(a)	Número de acceso ^(b)	Similaridad ^(c) (%)	Compleitud ^(d) (%)
Royal Q100	UYFA364	<i>Paenibacillus nuruki</i> TI45-13ar	KY419705	99.30	96.7
	UYFA365	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 11047	UHDF01000003	99.72	96.1
	UYFA366	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199	EF688012	99.27	96.1
	UYFA367	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	99.86	94.7
	UYFA368	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199	EF688012	99.27	95.9
	UYFA369	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	99.78	93.4
	UYFA370*	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	95.25	89.3
	UYFA371	<i>Paenibacillus nuruki</i> TI45-13ar	KY419705	99.44	96.2
LE 14-86	UYFA374	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	99.64	95.1
	UYFA375	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	99.64	94.9
Rizomat	UYFA376*	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	88.64	87.4
	UYFA377	<i>Pantoea pleuroti</i> JZB 2120015	KJ654341	98.67	87.6
	UYFA378	<i>Pigmentiphaga aceris</i> SAP-32	LT719155	99.40	92.4
	UYFA379	<i>Clavibacter michiganensis</i> VKM Ac-1403	jgi.1118350	99.71	96.0
	UYFA380	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	99.70	92.3
	UYFA381*	<i>Klebsiella huaxiensis</i> WCHKI090001	MH179329	96.38	88.5
	UYFA382	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> NBRC 102199	BBIT01000012	99.43	96.1
	UYFA384*	<i>Pantoea allii</i> LMG 24248	AY530795	98.37	83.1
	UYFA385	<i>Microbacterium testaceum</i> NBRC 12675	BJML01000022	99.93	95.6

	UYFA387*	<i>Paenibacillus nuruki</i> TI45-13ar	KY419705	92.64	88.3
	UYFA389*	<i>Pseudomonas nabeulensis</i> E10B	LR130177	71.84	93.8
	UYFA390	<i>Curtobacterium herbarum</i> P 420/07	AJ310413	99.64	96.0
Taita	UYFA393	<i>Kosakonia cowanii</i> JCM 10956	BBEU01000098	99.11	92.1
	UYFA394	<i>Erwinia persicina</i> NBRC 102418	BCTN01000053	99.79	95.6
	UYFA395	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> LMG 3645	AJ312209	99.78	95.5
	UYFA396	<i>Kosakonia cowanii</i> JCM 10956	BBEU01000098	99.19	92.3
	UYFA397	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> LMG 3645	AJ312209	99.78	95.7
	UYFA398	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199	EF688012	99.18	94.2
	UYFA399	<i>Erwinia persicina</i> NBRC 102418	BCTN01000053	99.79	95.8
Rizar	UYFA400	<i>Paenibacillus nuruki</i> TI45-13ar	KY419705	99.72	97.0
	UYFA401	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> LMG 3645	AJ312209	99.78	96.1
	UYFA402	<i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51	CP014007	99.64	94.2
	UYFA403	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2	MAOE01000087	99.79	96.3
	UYFA404	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> DSM 8801	AM747813	99.79	96.1
	UYFA405*	<i>Neobacillus drementensis</i> LMG 21831	AJ542506	96.91	85.8
	UYFA406	<i>Staphylococcus xylosus</i> CCM 2738	MRZO01000018	99.93	96.2
	UYFA407	<i>Brevibacillus halotolerans</i> LAM0312	KJ627768	99.85	93.6
LE 14-84	UYFA408	<i>Paenibacillus selenitireducens</i> ES3-24	KC815539	98.74	97.1
	UYFA409	<i>Cytobacillus depressus</i> BZ1	KP259553	98.65	95.8
	UYFA410	<i>Peribacillus simplex</i> NBRC 15720	BCVO01000086	92.29	96.9
	UYFA411	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 11047	UHDF01000003	99.65	96.7
	UYFA412	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129	AF041361	99.65	96.2
	UYFA413	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> B22a	EU558281	99.57	94.0
	UYFA414	<i>Paenibacillus piscarius</i> P121	JF892726	98.85	95.1
	UYFA415	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257	JRMB01000004	99.54	89.7
	UYFA416	<i>Ornithinibacillus contaminans</i> CCUG 53201	FN597064	95.84	96.0
Malma	UYFA417	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> LMG 3645	AJ312209	99.78	96.6
	UYFA418	<i>Ornithinibacillus contaminans</i> CCUG 53201	FN597064	95.79	97.1
	UYFA419	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 11047	UHDF01000003	99.93	96.1
	UYFA420	<i>Clavibacter michiganensis</i> VKM Ac-1403	jgi.1118350	99.78	96.2

El mejor candidato^(a) se refiere a la cepa tipo depositada en la base de datos con la cual la secuencia ingresada obtuvo un mayor porcentaje de similaridad^(c), siendo este el indicador de igualdad de la secuencia obtenida con la correspondiente a la cepa tipo. El porcentaje de completitud^(d) indica el grado de cobertura que tuvo dicha secuencia con respecto a la secuencia del mejor candidato almacenada en la base de datos. El número de acceso^(b) reportado corresponde a la secuencia de la cepa tipo seleccionada como mejor candidato. Se indican con un asterisco (*) los aislamientos que fueron identificados utilizando solo una de las secuencias para el gen marcador.

En la gráficas de barras de las Figuras 11 y 12 se muestra la distribución por cultivar de los aislamientos clasificados por filo y género taxonómico. Salvo en el cultivar LE 14-84, de todos los cultivos se aislaron bacterias del filo Proteobacteria. A su vez, en el cultivar LE 14-86 todos los aislamientos identificados pertenecen al filo Proteobacteria (Figura 11). Se encontraron aislamientos pertenecientes a un total de 17 géneros. A partir de cada cultivar se pudo aislar entre 1 y 8 géneros diferentes, siendo *Kosakonia* y *Paenibacillus* los géneros predominantes en cuanto al número de aislamientos y de mayor incidencia, encontrándose en 5 cultivos cada uno (Figura 12).

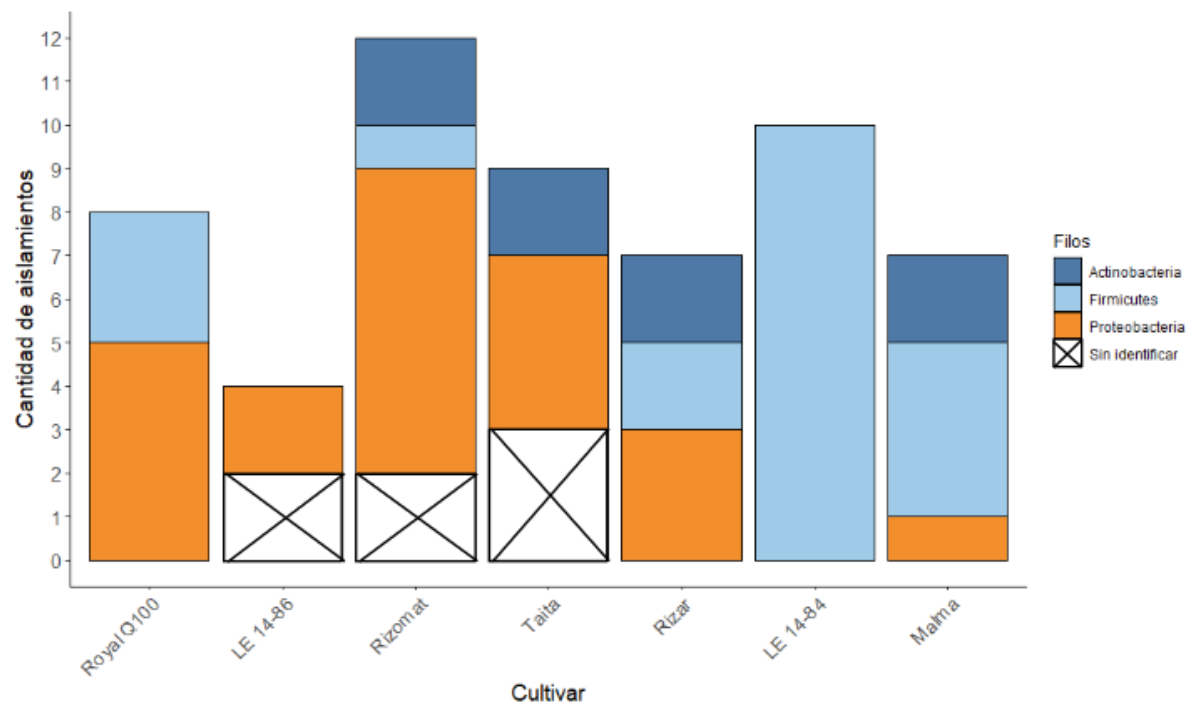


Figura 11: Identificación de los aislamientos a nivel de filos taxonómicos, diferenciados por cultivar de origen.

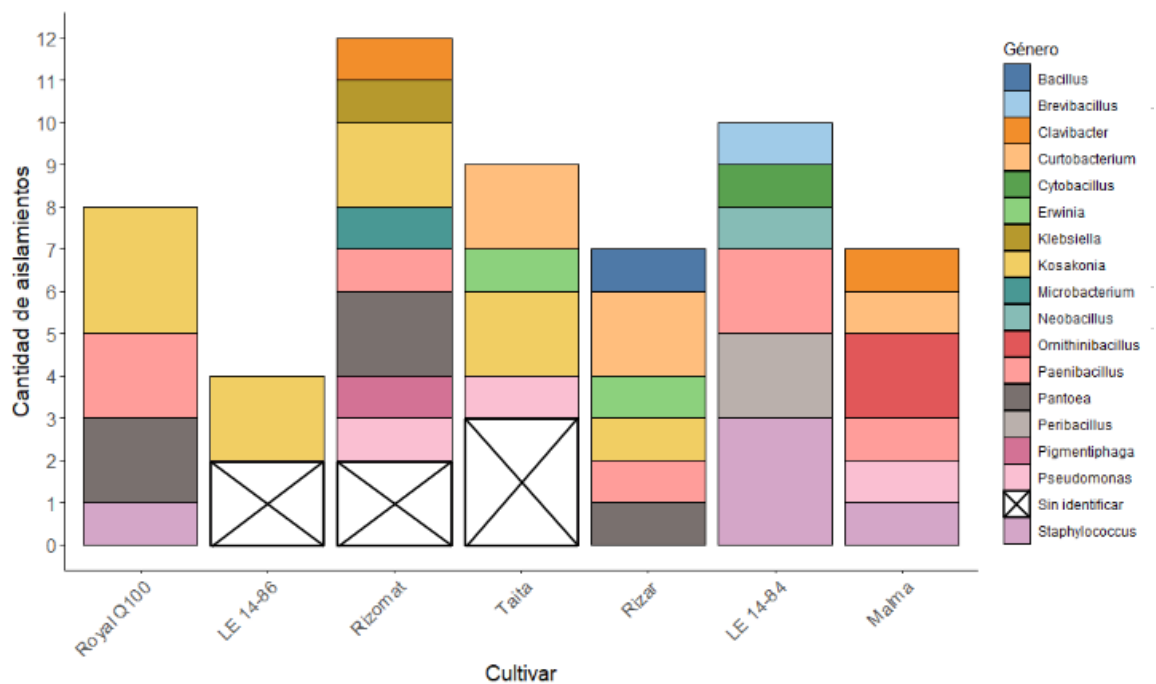


Figura 12: Identificación taxonómica de los aislamientos a nivel de géneros, diferenciados por cultivar.

5. Discusión

5.1 Ensayos de promoción de crecimiento vegetal

Los integrantes del género *Streptomyces* son bacterias gram positivas filamentosas, formadoras de esporas, con un elevado contenido G+C en su genoma compuesto por un gran cromosoma lineal y un número variable plásmidos lineales y/o circulares. En particular este género se caracteriza por poseer un complejo metabolismo secundario que puede producir diversas moléculas con propiedades antimicóticas, antiparasitarias, antitumorales y antibacteriales (Nikolaidis et al., 2023). Esta característica los convierte en microorganismos de interés biotecnológico en diversas áreas, incluida la producción de bioinoculantes para la agricultura, donde existen numerosos reportes de promoción de crecimiento vegetal mediada por cepas pertenecientes a este género (Olanreawaju y Babalola, 2019; Akbari et al., 2020; Nozari et al., 2021). La cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 es una bacteria endófito aislada de semillas de festuca cv. SFRO Don Tomás. A pesar de que no se han observado mecanismos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*, esta cepa es capaz de promover el crecimiento del cv. SFRO Don Tomás, pero no de del cv. Tacuabé, para el que se demostró tener la capacidad de colonizar (de los Santos et al., 2015). En análisis posteriores, Vaz Jauri et al. (2023) estudiaron mediante secuenciación masiva del gen *ARNr 16S* el efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 sobre la microbiota endofítica bacteriana de plantas de festuca cvs. SFRO Don Tomás y Tacuabé, reportando un aumento en la diversidad bacteriana en plantas donde sí hay PCV. A partir de estos resultados se plantea la hipótesis de que la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 logra provocar el fenotipo PCV del holobionte festuca modulando la microbiota asociada al cv. SFRO Don Tomás, siendo éste un nuevo mecanismo aún no reportado.

Teniendo en cuenta la especificidad observada al inocular con la cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 en la PCV en el cv SFRO Don Tomás y no en el cv Tacuabé (de los Santos et al., 2015), se planteó el objetivo de analizar la respuesta a la inoculación de otros cultivares de festuca comercializados en Uruguay. Los ensayos anteriores habían sido realizados en ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo, pero como la cepa

UYFA156 no es capaz de fijar nitrógeno, en este trabajo se planteó analizar la respuesta de los cultivares a la inoculación con la cepa UYFA156 en condiciones *in vitro* también en presencia de nitrógeno. Para ello se seleccionaron 7 cultivares de festuca comercializados en Uruguay, de los cuales se visualizó promoción de crecimiento vegetal en dos: Royal Q100 y Malma. En el cultivar Malma se observó un aumento del 10% en la media de altura aérea respecto al control, tras la inoculación solamente en presencia de nitrógeno. En cambio, el cultivar Royal Q100 también mostró PCV, pero evidenciada como un aumento en el peso seco de las plantas. Dicha variación se dio tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno, teniendo un aumento con respecto a la media de los controles sin inocular del 34% y 19% respectivamente.

A partir de estos resultados y de forma paralela a la realización de esta tesina, se seleccionaron los dos cultivares en los que hubo PCV (Royal Q100 y Malma) y dos en los que no se observó tal fenotipo (LE 14-84 y Rizomat) para realizar estudios de la microbiota asociada. Para ello, se montaron nuevos ensayos de inoculación de los cultivares a partir de los cuales se realizó una extracción de ADN de plántulas inoculadas y sin inocular a los 7 días post germinación. Luego se realizó la secuenciación masiva del gen *ARNr 16S* y se estudiaron las comunidades bacterianas. Los resultados mostraron que la inoculación con la cepa UYFA156 aumenta significativamente la diversidad de la microbiota endofítica en los cultivares donde hubo promoción de crecimiento (datos no publicados), concordando con lo anteriormente reportado para los cv. Don Tomás y Tacuabé por Vaz Jauri et al., (2023). En los cultivares donde no se observó PCV, no hubo cambios significativos en la diversidad de bacterias endófitas, al igual que lo reportado para el cultivar Tacuabé (Vaz Jauri et al., 2023). Estos resultados sugieren una relación entre la PCV mediada por UYFA156 y el aumento en la diversidad microbiana, fortaleciendo la hipótesis de que la cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 es capaz de promover el crecimiento vegetal mediante la modulación de la microbiota asociada al cultivar.

Con estos resultados se expande a 3 la lista de cultivares de festuca sobre los cuales la inoculación con la cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 provoca fenotipos PCV en condiciones *in vitro*, evidenciando la especificidad de estas interacciones planta-microorganismo y cómo estas pueden variar entre cultivares de una misma especie.

5.2 Aislamiento e identificación de probables endófitos bacterianos asociados a semillas de cultivares de festuca

Considerando que la hipótesis de esta investigación es que la cepa UYFA156 promueve el crecimiento mediante la modulación de la microbiota, y que las comunidades microbianas varían entre cultivares de una misma especie vegetal, se planteó el segundo objetivo del trabajo, que fué el aislamiento e identificación de probables endófitos bacterianos asociados a semillas de distintos cultivares de festuca comercializados en el país.

Mediante la estrategia planteada, utilizando 3 medios de cultivo distintos se buscó abarcar la mayor cantidad y diversidad de aislamientos. Dicha metodología dió como resultado el aislamiento de 57 probables endófitos. Casi el 60% de los aislamientos se obtuvieron en el medio rico TSA, mientras que el resto se obtuvo en los dos medios con fuentes de nutrientes más definidas. Se aislaron en promedio 8 cepas de diferente morfología por cultivar analizado, siendo los cv. LE 14-86 y cv. Rizomat con 4 y 12 cepas de los que menos y más aislamientos se obtuvieron, respectivamente. Este promedio se encuentra en concordancia con el número de aislamientos (6) que reportó previamente de los Santos et al., (2015) a partir de semillas del cv. Don Tomás.

Con respecto a la diversidad taxonómica, en los 50 aislamientos identificados en este trabajo se encontraron representantes de 17 géneros pertenecientes a 3 filos diferentes. Los géneros identificados fueron: *Clavibacter*, *Curtobacterium* y *Microbacterium* pertenecientes al filo Actinobacteria, *Bacillus*, *Brevibacillus*,

Cytobacillus, *Neobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Paenibacillus*, *Peribacillus* y *Staphylococcus* englobados dentro del filo Firmicutes, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Pantoea*, *Pigmentiphaga* y *Pseudomonas* pertenecientes al filo Proteobacterias. De éstos, los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Erwinia*, *Pantoea* y *Pseudomonas* fueron también identificados en elevadas abundancias relativas en los estudios de secuenciación masiva antes mencionados.

Si se realiza un análisis de la distribución a partir de los datos obtenidos se evidencia que *Kosakonia* y *Paenibacillus* fueron los géneros predominantes tanto en número de aislamientos, 10 y 7 respectivamente, como en el número de cultivos en los cuales se encuentran presentes, en ambos casos 5 de los 7 evaluados. Representantes del filo Proteobacteria fueron hallados en todos los cultivos, salvo en el cultivar LE 14-84, donde solo fueron aisladas bacterias pertenecientes al filo Firmicutes. Si bien estos resultados sirven como una primera aproximación al estudio de la microbiota existente dentro de las semillas, para realizar un análisis más exhaustivo se deberían considerar otras metodologías, como el uso de otros medios de cultivo con el fin de contemplar un mayor número de posibles endófitos.

La mayoría de los géneros identificados han sido reportados previamente como endófitos en plantas de interés agronómico, incluyendo festuca (Tabla 5). Siendo éste el primer reporte de probables endófitos en cultivos de interés agronómico para el género *Pigmentiphaga*, según la búsqueda bibliográfica realizada en este trabajo. En particular, cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Kosakonia*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Pantoea* ya habían sido aisladas como probables endófitos de semillas de festuca (de los Santos et al., 2015; Roberts et al., 2019; Roberts, 2022). Según la búsqueda bibliográfica realizada, este sería el primer reporte en el que se describen aislamientos de probables endófitos de festuca pertenecientes a los géneros *Clavibacter*, *Brevibacillus*, *Cytobacillus*, *Erwinia*, *Neobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Peribacillus*, *Klebsiella*, *Pigmentiphaga* y *Staphylococcus*.

Existen diversos reportes sobre la detección de mecanismos PCV *in vitro* o *in vivo* para los géneros *Curtobacterium*, *Kosakonia*, *Ornithinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Taulé et al., 2016, Mareque et al., 2014; Maheshwari et al., 2022; Vega et al., 2019; Suman et al., 2020; Chen et al., 2017; Romano et al., 2020; Schillaci et al., 2022). Sin embargo, también ha sido reportada la naturaleza patogénica sobre plantas de algunas cepas pertenecientes al género *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Kosakonia*, *Pantoea* y *Pseudomonas* (Eichenlaub y Gartemann, 2011; Coutinho y Venter, 2009; Krawczyk et al., 2020; Sarkar y Guttman, 2004; Chen et al., 2007; Krawczyk y Borodynko-Filas, 2020; Höfte y De Vos, 2007). Los mencionados géneros se corresponden a los de los aislamientos identificados como posibles endófitos de semilla de los cultivares en los cuales la inoculación con UYFA156 provocó un fenotipo PCV (Malma y Royal Q100). Una posible modulación por parte de la cepa UYFA156 podría provocar que los cambios en las comunidades de estas u otras endófitas presentes en la semilla sean las responsables directas de brindarle a las plantas los estímulos necesarios para promover su desarrollo. Estas interacciones deben ser estudiadas más en profundidad, por ejemplo, mediante ensayos *in vitro* de antagonismo frente a la cepa UYFA156.

Tabla 5. Géneros identificados como probables endófitos de semillas de festuca que han sido reportados previamente como endófitos en otras plantas hospederas.

Género	Plantas hospederas	Referencias
<i>Bacillus</i>	Festuca, sorgo dulce, garbanzos, trigo, tomate, canola, papa, café, arroz	Roberts et al., 2022; Mareque et al., 2014; Maheshwari, 2019; Coombs - Franco, 2003; Germida et al. 1998; Graner et al. 2003; Misko - Germida, 2002; Sturz, 1995; Vega et al., 2005; Hernández et al., 2023
<i>Brevibacillus</i>	Repollo	Ormskirk et al., 2019
<i>Clavibacter</i>	Café, tomate	Vega et al., 2005; Zaluga et al., 2013

<i>Curtobacterium</i>	Festuca, trigo, pepino, papa, café	de los Santos et al., 2015;; Robinson et al., 2016; Afzal et al., 2019; Vega et al., 2005
<i>Cytobacillus</i>	<i>Terminalia arjuna</i>	Sudarsan et al., 2021
<i>Erwinia</i>	Papa	Ramírez-Bahena et al., 2016
<i>Klebsiella</i>	Maíz, café	Chelius - Triplett, 2000; Vega et al., 2005
<i>Kosakonia</i>	Festuca, caña de azúcar	Roberts et al., 2019; Taulé et al., 2016
<i>Microbacterium</i>	Festuca, trigo, maíz, sorgo	de los Santos et al., 2015; Robinson et al., 2016; Zinniel et al., 2002;
<i>Neobacillus</i>	Canola	Martínez-Hidalgo et al., 2021
<i>Ornithinibacillus</i>	Arveja	Maheshwari, 2019
<i>Paenibacillus</i>	Café, arroz, canola	Sakiyama et al., 2001; Hernández et al., 2023; Martínez-Hidalgo et al., 2021
<i>Pantoea</i>	Festuca, garbanzo papa, sorgo dulce, caña de azúcar, arroz, frutilla, café	de los Santos et al., 2015; Maheshwari, 2019; Sturz et al., 1995; Mareque et al., 2014; Taulé et al., 2012; Loiret et al., 2004; Loaces et al., 2011; Zhang et al., 2020; Vega et al., 2005
<i>Peribacillus</i>	Canola	Martínez - Hidalgo et al., 2021
<i>Pseudomonas</i>	Sorgo dulce, arvejas, caña de azúcar, zanahoria, papa, canola, trigo, café, arroz	Mareque et al., 2014; Maheshwari, 2019; Taulé et al., 2012; Surette et al., 2003;; Sturz, 1995; Misko - Germida, 2002; Emami et al., 2020; Vega et al., 2005; Hernández et al., 2023
<i>Staphylococcus</i>	Arroz	Shahzad et al., 2017

5.3 Evaluación de la presencia de cepas endófitas del género *Streptomyces* en las semillas de los cultivares de festuca

Otro de los objetivos específicos de este trabajo fue evaluar la presencia de cepas endófitas pertenecientes al género *Streptomyces* residentes en las semillas de los cultivares de festuca analizados. Para cumplir el objetivo, además de un medio rico y con fuentes de carbono sencillas como el TSA, se utilizaron los medios de cultivo específicos, SCA y Agar-Avena, por los cuales este género bacteriano tiene más afinidad para su crecimiento que otras bacterias (Küster - Williams, 1964; Shirling - Gottlieb, 1966).

Bacterias del género *Streptomyces* han sido aisladas como endófitas en diversas especies vegetales de interés agronómico tales como cebada, puerro, alfalfa, centeno, trigo, frutilla, papa, festuca roja (*Festuca rubra*) y festuca (*F. arundinacea*) (Sardi et al., 1992; Sturz, 1995; Germida et al., 1998; Coombs - Franco, 2003; Colombo et al., 2019; Marian et al., 2020, de los Santos 2015). Sin embargo, a partir de la identificación de los aislamientos se puede concluir que a pesar de haberse detectado bacterias clasificadas taxonómicamente dentro del filo *Actinobacteria*, no se encontraron bacterias cultivables pertenecientes al género *Streptomyces* específicamente.

Es importante mencionar que a partir de los resultados obtenidos sobre la secuenciación masiva del gen *ARNr 16S* previamente mencionada, se lograron encontrar 7 ASVs (*amplicon sequence variants*) del género *Streptomyces* en los 4 cultivares analizados por esta metodología (Royal Q100, Malma, LE 14-84 y Rizomat). Este resultado sugiere la existencia de bacterias del género presentes dentro de las semillas las cuales no pudieron ser cultivadas (datos no publicados), probablemente por su baja abundancia, ya que el número de lecturas obtenido para los 7 ASVs del género fue relativamente bajo en comparación con otros grupos.

6. Conclusiones y perspectivas

El propósito de esta tesis fue estudiar la interacción entre la cepa *Streptomyces albidoflavus* UYFA156 y cultivares de la planta forrajera *Festuca arundinacea* utilizados en Uruguay. Según la metodología utilizada y los resultados obtenidos, se puede concluir que se han cumplido los objetivos establecidos, ya que se logró:

- Evaluar la respuesta de cultivares comerciales de festuca a la inoculación con la cepa UYFA156 en presencia y ausencia de nitrógeno en el medio en condiciones *in vitro*, dando como resultado que existió promoción de crecimiento vegetal en 2 de los 7 cultivares analizados. Este reporte, sumado al generado por de los Santos et al., (2015) en el que se detectaba PCV en el cultivar SFRO Don Tomás pero no el cultivar Tacuabé, aporta más evidencia de la especificidad de estas interacciones planta-microorganismo, la cual debe de ser tenida en cuenta en virtud del desarrollo de futuros bioinoculantes como alternativas a los métodos tradicionales de la agricultura. Además de evaluar la respuesta de otros cultivares comerciales, se plantean como objetivos a futuro estudiar la respuesta a la inoculación en condiciones de invernáculo donde los microorganismos del ambiente se agregan como nuevos componentes al holobionte estudiado. También sería interesante estudiar la respuesta de los cultivares inoculados expuestos a condiciones de estrés abiótico (sequía, frío, etc.) o el producido por el pastoreo de los animales.
- Construir una colección de 57 aislamientos de posibles endófitos de semilla de festuca, de los cuales se pudo identificar a nivel de género a 50 de ellos. Dentro de los aislamientos no se detectaron cepas cultivables pertenecientes al género *Streptomyces* como endófitas de las semillas de los cultivares de festuca analizados. Dicha colección será una gran herramienta para futuras investigaciones dirigidas a la comprensión de las interacciones entre plantas y microorganismos, así como de la cepa UYFA156 y los endófitos de semilla presentes. Por ejemplo, estos aislamientos podrán ser utilizados en futuros ensayos de antagonismo *in vitro* frente a la cepa UYFA156 con el fin de evaluar la hipótesis de que esta cepa tiene la capacidad de modular la microbiota existente dentro de la planta, con efectos en la promoción del crecimiento vegetal. Además, será posible caracterizarla desde el punto de vista bioquímico, genético y fisiológico en busca de otras cepas que puedan presentar un potencial biotecnológico.

Anexo

Medios de cultivo para bacterias utilizados

Tryptic Soy Agar (TSA)

Digerido pancreático de caseína	17 g
Digerido péptico de soja	3,0 g
Glucosa	2,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro

Starch Casein Agar (SCA) (Küster - Williams, 1964)

Almidón	10 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
K ₂ HPO ₄	2 g
NaCl	2 g
CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro

Agar-Avena

Harina de avena	60 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro

Medio de cultivo para plantas utilizado

Medio Jensen (Vincent, 1970)

CaHPO_4	1,0 g
K_2HPO_4	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl_3	0,01 g
Solución micronutrientes (*)	10 ml
Agua destilada c.s.p.	1 litro

(*) Solución micronutrientes

H_3BO_3	2,86 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,03 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g
Na_2MoO_4	0,14 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro

Soluciones utilizadas

Buffer Tris-Acético-EDTA

Tris-Acetato	0,04 M
EDTA pH 8,0	0,001 M

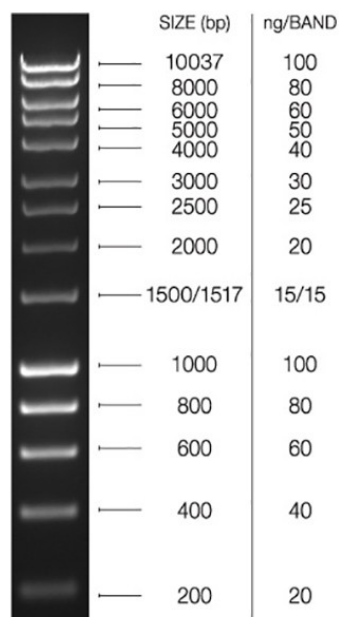
pH 8,0

Suero fisiológico

NaCl	0,9 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Marcador de peso molecular utilizado

HyperLadder™ 1 kb (Meridian Bioscience)



Bibliografía

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Akbari, A., Gharanjik, S., Koobaz, P., & Sadeghi, A. (2020). Plant growth promoting *Streptomyces* strains are selectively interacting with the wheat cultivars especially in saline conditions. *Heliyon*, 6(2), e03445. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03445>
- Chelius, M. K., & Triplett, E. W. (2000). Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 783-787. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.783-787.2000>
- Chen, C., Xin, K., Liu, H., Cheng, J., Shen, X., Wang, Y., & Zhang, L. (2017). *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. *Scientific Reports*, 7(1), 41564. <https://doi.org/10.1038/srep41564>
- Chen, Y.-F., Yin, Y.-N., Zhang, X.-M., & Guo, J.-H. (2007). *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Beticola*, A New Pathovar of Pathogens in Sugar Beet. *Plant Disease*, 91(6), 677-684. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0677>
- Chi, F., Shen, S.-H., Cheng, H.-P., Jing, Y.-X., Yanni, Y. G., & Dazzo, F. B. (2005). Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7271-7278. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7271-7278.2005>

- Colombo, E. M., Kunova, A., Pizzatti, C., Saracchi, M., Cortesi, P., & Pasquali, M. (2019). Selection of an Endophytic *Streptomyces* sp. Strain DEF09 From Wheat Roots as a Biocontrol Agent Against *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2356. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02356>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Coombs, J. T., & Franco, C. M. M. (2003). Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4260-4262. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4260-4262.2003>
- Coutinho, T. A., & Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis*: An unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 325-335. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00542.x>
- De Los Santos, M. C., Taulé, C., Mareque, C., Beracochea, M., & Battistoni, F. (2015). Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Annals of Microbiology*, 66(1), 329-342. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1113-2>
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 445-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>

- Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Motasharezadeh, B., & Sarmadian, F. (2020). Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*, 14, 100196. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100196>
- Ferrari, E., Taulé, C., Mareque, C., Gonzalez, A., Dourron, J., & Battistoni, F. (2023). Unravelling the plant growth promotion potential of the bacterial endophytic microbiota associated with Canola (*Brassica napus*) plants. *Environmental Sustainability*, 6(3), 403-413. <https://doi.org/10.1007/s42398-023-00289-2>
- Formoso, F. (2010). *Festuca arundinacea*, Manejo para producción de forraje y semillas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).
- Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., Von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martinez-Romero, E. (2011). Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 23-46. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039>
- Garabet, S., Ryan, J., & Wood, M. (1998). Nitrogen and water effects on wheat yield in a Mediterranean-type climate. II. Fertilizer-use efficiency with labelled nitrogen. *Field Crops Research*, 58(3), 213-221. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(98\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(98)00096-3)
- Gasser, I., Cardinale, M., Müller, H., Heller, S., Eberl, L., Lindenkamp, N., Kaddor, C., Steinbüchel, A., & Berg, G. (2011). Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant and Soil*, 347(1-2), 125-136. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0833-8>
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., Renato De Freitas, J., & Seib, A. M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26(1), 43-50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb01560.x>

- Gibson, D. J., & Newman, J. A. (2001). *Festuca arundinacea* Schreber (*F. elatior* L. ssp. *Arundinacea* (Schreber) Hackel). *Journal of Ecology*, 89(2), 304-324. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2001.00561.x>
- Graner, G., Persson, P., Meijer, J., & Alstr  m, S. (2003). A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 224(2), 269-276. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00449-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00449-X)
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>
- Guerrero, R., Margulis, L., & Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: The holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology*, 16, 133-143. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.188>
- Halvorson, A. D., Follett, R. F., Bartolo, M. E., & Schweissing, F. C. (2002). Nitrogen Fertilizer Use Efficiency of Furrow-Irrigated Onion and Corn. *Agronomy Journal*, 94(3), 442. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.0442>
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. V. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463-471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>

- Hernández, I., Taulé, C., Pérez-Pérez, R., Battistoni, F., Fabiano, E., Villanueva-Guerrero, A., Nápoles, M. C., & Herrera, H. (2023). Endophytic Seed-Associated Bacteria as Plant Growth Promoters of Cuban Rice (*Oryza sativa* L.). *Microorganisms*, 11(9), 2317. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092317>
- Höfte, M., & De Vos, P. (2007). Plant pathogenic *Pseudomonas* species. En S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria* (pp. 507-533). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_14
- Hoveland, C. S. (2015). Origin and History. En H. A. Fribourg, D. B. Hannaway, & C. P. West (Eds.), *Agronomy Monographs* (pp. 1-10). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr53.c1>
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). (s. f.). *Catálogo forrajeras*. Recuperado 9 de abril de 2024, de <https://catalogoforrajeras.inia.uy/>
- Instituto Nacional de Semillas (INASE). (s. f.). *Registro de cultivares*. INASE. Recuperado 8 de abril de 2024, de <https://www.inase.uy/EvaluacionRegistro/Licencias/>
- Kent, F, Cabo, S., & Ruiz, M.A.,. (2019). *Festuca alta*. Forrajeras cultivadas anuales y perennes más difundidas en la provincia de La Pampa. 23-26.
- Krawczyk, K., & Borodynko-Filas, N. (2020). *Kosakonia cowanii* as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.). *European Journal of Plant Pathology*, 157(1), 173-183. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01998-8>
- Krawczyk, K., Wielkopolan, B., & Obrępańska-Stęplowska, A. (2020). *Pantoea ananatis*, A New Bacterial Pathogen Affecting Wheat Plants (*Triticum* L.) in Poland. *Pathogens*, 9(12), 1079. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121079>

- Küster, E., & Williams, S. T. (1964). Selection of Media for Isolation of *Streptomyces*. *Nature*, 202(4935), 928-929. <https://doi.org/10.1038/202928a0>
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. En E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (p. 115,175). Wiley.
- Loaces, I., Ferrando, L., & Fernández Scavino, A. (2011). Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. *Microbial Ecology*, 61(3), 606-618. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9780-9>
- Loiret, F. G., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rodes, P., Rodes, R., & Dong, Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. From sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 504-511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02329.x>
- Lyu, D., Zajonc, J., Pagé, A., Tanney, C. A. S., Shah, A., Monjezi, N., Msimbira, L. A., Antar, M., Nazari, M., Backer, R., & Smith, D. L. (2021). Plant Holobiont Theory: The Phytomicrobiome Plays a Central Role in Evolution and Success. *Microorganisms*, 9(4), 675. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040675>
- Maheshwari, R. (2019). Functional diversity of cultivable endophytes from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum* Bioprospecting their plant growth potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- Maheshwari, R., Kumar, P., Bhutani, N., & Suneja, P. (2022). Exploration of plant growth-promoting endophytic bacteria from *Pisum sativum* and *Cicer arietinum* from South–West Haryana. *Journal of Basic Microbiology*, 62(7), 857-874. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100575>
- Malfanova, N., Lugtenberg, B. J. J., & Berg, G. (2013). Bacterial Endophytes: Who and Where, and What are they doing there? En F. J. De Bruijn (Ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (1.^a ed., pp. 391-403). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch36>

- Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M., & Battistoni, F. (2014). Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology*, 65(2), 1057-1067. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0951-7>
- Marian, M., Ohno, T., Suzuki, H., Kitamura, H., Kuroda, K., & Shimizu, M. (2020). A novel strain of endophytic *Streptomyces* for the biocontrol of strawberry anthracnose caused by *Glomerella cingulata*. *Microbiological Research*, 234, 126428. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126428>
- Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. D., Sánchez-Juanes, F., Rivas, R., Mateos, P. F., Santa Regina, I., Peix, Á., Martínez-Molina, E., Igual, J. M., & Velázquez, E. (2021). Identification of Canola Roots Endophytic Bacteria and Analysis of Their Potential as Biofertilizers for Canola Crops with Special Emphasis on Sporulating Bacteria. *Agronomy*, 11(9), 1796. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091796>
- Milne, G. (2009). Management in New Zealand, Australia, and South America. En H. A. Fribourg, D. B. Hannaway, & C. P. West (Eds.), *Agronomy Monographs* (pp. 101-117). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr53.c7>
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) y Dirección de Estadísticas Agropecuarias & (DIEA). (2011). *Censo General Agropecuario 2011*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/censo-general-agropecuario-2011>
- Misko, A. L., & Germida, J. J. (2002). Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(3), 399-407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01029.x>

- Nikolaidis, M., Hesketh, A., Frangou, N., Mossialos, D., Van De Peer, Y., Oliver, S. G., & Amoutzias, G. D. (2023). A panoramic view of the genomic landscape of the genus *Streptomyces*. *Microbial Genomics*, 9(6). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001028>
- Nozari, R. M., Ortolan, F., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2021). *Streptomyces* spp. Enhance vegetative growth of maize plants under saline stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1371-1383. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00480-9>
- Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). *Streptomyces*: Implications and interactions in plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1179-1188. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Ormskirk, M. M., Narciso, J., Hampton, J. G., & Glare, T. R. (2019). Endophytic ability of the insecticidal bacterium *Brevibacillus laterosporus* in Brassica. *PLOS ONE*, 14(5), e0216341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216341>
- Pinski, A., Betekhtin, A., Hupert-Kocurek, K., Mur, L. A. J., & Hasterok, R. (2019). Defining the Genetic Basis of Plant–Endophytic Bacteria Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1947. <https://doi.org/10.3390/ijms20081947>
- Ramírez-Bahena, M.-H., Salazar, S., Cuesta, M. J., Tejedor, C., Igual, J.-M., Fernández-Pascual, M., & Peix, Á. (2016). *Erwinia endophytica* sp. Nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 975-981. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000820>

- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (1998). Interactions of Gramineous Plants with Azoarcus spp. and Other Diazotrophs: Identification, Localization, and Perspectives to Study their Function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 29-54. <https://doi.org/10.1080/07352689891304186>
- Roberts, C. A., Lacefield, G. D., Ball, D., & Bates, G. (2009). Management to Optimize Grazing Performance in the Northern Hemisphere. En H. A. Fribourg, D. B. Hannaway, & C. P. West (Eds.), *Agronomy Monographs* (pp. 85-99). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr53.c6>
- Roberts, E. L. (2022). *Plant Growth Promoting Fungal and Bacterial Endophytes of Tall Fescue: A Review*.
- Roberts, E. L., Mormile, B., & Adamchek, C. (2019). Fitness Attributes of Bacterial and Fungal Seed Endophytes of Tall Fescue. En S. K. Verma & J. F. White, Jr (Eds.), *Seed Endophytes* (pp. 259-271). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_13
- Robinson, R. J., Fraaije, B. A., Clark, I. M., Jackson, R. W., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant and Soil*, 405(1-2), 381-396. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2495-4>
- Romano, I., Ventrino, V., Ambrosino, P., Testa, A., Chouyia, F. E., & Pepe, O. (2020). Development and Application of Low-Cost and Eco-Sustainable Bio-Stimulant Containing a New Plant Growth-Promoting Strain *Kosakonia pseudosacchari* TL13. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2044. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02044>

- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355-362. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: The Hologenome Concept. *mBio*, 7(2), e01395-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01395-15>
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 19(8), 827-837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- Sakiyama, C. C. H., Paula, E. M., Pereira, P. C., Borges, A. C., & Silva, D. O. (2001). Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 117-121. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00961.x>
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G. E., & Merli, S. (1992). Isolation of Endophytic *Streptomyces* Strains from Surface-Sterilized Roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2691-2693. <https://doi.org/10.1128/aem.58.8.2691-2693.1992>
- Sarkar, S. F., & Guttman, D. S. (2004). Evolution of the Core Genome of *Pseudomonassyringae* , a Highly Clonal, Endemic PlantPathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1999-2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1999-2012.2004>

- Schillaci, M., Raio, A., Sillo, F., Zampieri, E., Mahmood, S., Anjum, M., Khalid, A., & Centritto, M. (2022). *Pseudomonas* and *Curtobacterium* Strains from Olive Rhizosphere Characterized and Evaluated for Plant Growth Promoting Traits. *Plants*, 11(17), 2245. <https://doi.org/10.3390/plants11172245>
- Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Al-Hosni, K., Kang, S.-M., Seo, C.-W., & Lee, I.-J. (2017). Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biologica Hungarica*, 68(2), 175-186. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.2.5>
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Sturz, A. V. (1995). The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, 175(2), 257-263. <https://doi.org/10.1007/BF00011362>
- Sudarsan, S., Kumar Shankar, M., Kumar Belagal Motatis, A., Shankar, S., Krishnappa, D., Mohan, C. D., Rangappa, K. S., Gupta, V. K., & Siddaiah, C. N. (2021). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by *Cytobacillus firmus* Isolated from the Stem Bark of *Terminalia arjuna* and Their Antimicrobial Activity. *Biomolecules*, 11(2), 259. <https://doi.org/10.3390/biom11020259>

- Suman, A., Shukla, L., Division of Microbiology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110 012, India, Marag, P. S., Division of Microbiology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110 012, India, Verma, P., Division of Microbiology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110 012, India, Gond, S., Division of Microbiology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110 012, India, Sai Prasad, J., & Division of Microbiology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110 012, India. (2020). Potential use of plant colonizing *Pantoea* as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops. *Journal of Environmental Biology*, 41(5), 987-994. <https://doi.org/10.22438/jeb/41/5/MRN-1250>
- Surette, M. A., Sturz, A. V., Lada, R. R., & Nowak, J. (2003). Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *Sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil*, 253(2), 381-390. <https://doi.org/10.1023/A:1024835208421>
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V. M., Sicardi, M., & Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, 356(1-2), 35-49. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>
- Taulé, C., Castillo, A., Villar, S., Olivares, F., & Battistoni, F. (2016). Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant and Soil*, 403(1-2), 403-418. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2813-5>
- Taulé, C., Luizzi, H., Beracochea, M., Mareque, C., Platero, R., & Battistoni, F. (2019). The Mo- and Fe-nitrogenases of the endophyte *Kosakonia* sp. UYSO10 are necessary for growth promotion of sugarcane. *Annals of Microbiology*, 69(7), 741-750. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01466-7>

- Taulé, C., Vaz-Jauri, P., & Battistoni, F. (2021). Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02966-4>
- Uruguay XXI. (2022). *Sector agrícola en Uruguay*. <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/articulo/informe-agricola/>
- Vaz Jauri, P., Beracochea, M., Fernández, B., & Battistoni, F. (2019). Whole-Genome Sequencing of *Streptomyces* sp. Strain UYFA156, a Cultivar-Specific Plant Growth-Promoting Endophyte of *Festuca arundinacea*. *Microbiology Resource Announcements*, 8(38), e00722-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00722-19>
- Vaz Jauri, P., De Los Santos, C., Fernández, B., Sotelo, J., & Battistoni, F. (2023). Differential modulation of the bacterial endophytic microbiota of *Festuca arundinacea* (tall fescue) cultivars by the plant-growth promoting strain *Streptomyces albidoflavus* UYFA156. *Plant and Soil*, 485(1-2), 317-332. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05831-5>
- Vaz Jauri, P. & Taulé, C., De Los Santos, M. C., Fernandez, B., Di Paolo, A., Sotelo, J., & Battistoni, F. (2019). Interactions between putatively endophytic bacteria and tall fescue (*Festuca arundinacea*): Plant growth promotion and colonization in host and non-host cultivars. *Plant and Soil*, 451(1-2), 207-220. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04359-5>
- Vega, C., Rodríguez, M., Llamas, I., Béjar, V., & Sampedro, I. (2019). Silencing of Phytopathogen Communication by the Halotolerant PGPR *Staphylococcus Equorum* Strain EN21. *Microorganisms*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010042>
- Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F., & Buyer, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5), 371-380. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410551>

- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. International Biological Programme.
- Watling, G. (2022). *Festuca arundinacea* (tall fescue) (p. 23983) [dataset]. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.23983>
- Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274. <https://doi.org/10.2307/3545919>
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zaluga, J., Van Vaerenbergh, J., Stragier, P., Maes, M., & De Vos, P. (2013). Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 426-435. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.005>
- Zhang, H., Zhang, Q., Chen, S., Zhang, Z., Song, J., Long, Z., Yu, Y., & Fang, H. (2020). Enterobacteriaceae predominate in the endophytic microbiome and contribute to the resistome of strawberry. *Science of The Total Environment*, 727, 138708. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138708>
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198-2208. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>