

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación del crecimiento *in-vitro* de *Arabidopsis thaliana*
promovido por bacterias solubilizadoras de calcio y fósforo**

Proyecto de Investigación

Ana Carolina Tinajero Malta

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 2 de agosto de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación del crecimiento *in-vitro* de *Arabidopsis thaliana* promovido por
bacterias solubilizadoras de calcio y fósforo**

Ana Carolina Tinajero Malta

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León Reyes, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 2 de agosto de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Ana Carolina Tinajero Malta

Código:

00123524

Cédula de Identidad:

1715466585

Lugar y fecha:

Quito, 2 de agosto de 2019

DEDICATORIA

A todas las personas que creen en la ciencia para hacer de este mundo un lugar mejor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que contribuyeron con sus conocimientos para sacar este proyecto adelante.

A Antonio León, por abrirme las puertas del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos y haber confiado en mí para realizar este proyecto.

A Darío Ramírez, por haber sido mi principal apoyo en todo este tiempo. Por su paciencia y por haberme compartido sus conocimientos.

A todos mis compañeros del laboratorio, por estar siempre disponibles para dar una mano.

A José Rafael y María Elena, por abrirme las puertas de este mundo fascinante de la biotecnología de plantas y por ayudarme a formarme como profesional.

A mis amigos, por estos cinco años llenos de aprendizajes y retos alcanzados juntos.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante toda la carrera.

A Santiago, por estar a mi lado siempre y nunca dejar de creer en mí.

RESUMEN

La búsqueda por alternativas a los agroquímicos es un reto ya que conforme pasan los años, la necesidad de aumentar la producción de manera sostenible crece. Existen microorganismos benéficos, que forman consorcios con las plantas y estimulan su crecimiento mediante: la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas y/o la solubilización de nutrientes. Este último punto es el de principal interés ya que, la mayoría de los nutrientes esenciales para el desarrollo de la planta no se encuentran biodisponibles. De esta manera, en este estudio se evaluó el potencial de cepas de *Pseudomonas* spp. para solubilizar nutrientes esenciales como el calcio y el fósforo. Para esto, se aisló y se caracterizó microorganismos del suelo y de compost y raíces de rosas y se seleccionó aquellos con una alta actividad solubilizadora de calcio mediante ensayos *in-vitro* de solubilización de fosfato tricálcico. Posteriormente, estas cepas fueron evaluadas mediante un ensayo de co-cultivo en *Arabidopsis thaliana*. A partir de estos ensayos se analizó el peso seco y tamaño de la raíz de las plantas y, luego de ver los resultados, se encontró que dos cepas tienen un efecto sobre el fenotipo de las plantas *in-vitro* generando plantas con raíces más gruesas y rosetas más grandes por lo que no existe evidencia de que estimulan el crecimiento. Sin embargo, al no evidenciarse promoción de crecimiento, esto no podría ser atribuido a la solubilización de los nutrientes. De esta manera, se estableció que se necesitan análisis posteriores para afirmar que las cepas aisladas de *Pseudomonas* pueden ser consideradas como promotoras de crecimiento por medio de la solubilización de calcio y fósforo.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas* spp., fosfato tricálcico, cultivo vertical, solubilización de nutrientes, fitohormonas.

ABSTRACT

The search for alternatives to agrochemicals is a big challenge for the industry because, as the time go by, the need to increase production sustainably grows. There are beneficial microorganisms that form consortiums with the plants and promote their growth by: nitrogen fixation, production of phytohormones and/or solubilization of nutrients. This last point is of primary interest since most of the essential nutrients for the development of plants are not bioavailable as would be expected. In this way, in this study the potential of *Pseudomonas* spp. strains to solubilize calcium and phosphorus was evaluated. For this, microorganisms from soil, compost and roots of roses were isolated and characterized. Those with a high calcium solubilizing activity were selected from *in-vitro* assays using tricalcium phosphate. Subsequently, these strains were evaluated in a co-culture assay with *Arabidopsis thaliana*. From these tests, the dry weight and size of the root of the plants were analyzed. After seeing the results, it was found that two strains have an effect on the phenotype of *in-vitro* plants since they generate plants with thicker roots and larger rosettes. However, as no promotion of growth was evident, this could not be attributed to the solubilization of nutrients. In this way, it was established that further analyzes are needed to affirm that isolated strains of *Pseudomonas* can be considered as growth promoters through the solubilization of calcium and phosphorus.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas* spp., tricalcium phosphate, vertical culture, nutrient solubilization, phytohormones.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | Introducción | 13 |
| 1.1. | Fertilizantes químicos | 13 |
| 1.2. | Microorganismos promotores de crecimiento | 14 |
| 1.2.1. | Solubilización de nutrientes | 15 |
| 1.3. | Género <i>Pseudomonas</i> | 16 |
| 1.3.1. | Estimulación de crecimiento vegetal | 16 |
| 1.4. | Evaluación <i>in-vitro</i> | 17 |
| 1.4.1. | Generalidades del cultivo <i>in-vitro</i> | 17 |
| 1.4.2. | Planta modelo: <i>Arabidopsis thaliana</i> | 17 |
| 1.4.2.1. | Cultivo <i>in-vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 18 |
| 2. | Justificación | 20 |
| 3. | Objetivos | 21 |
| 3.1. | Objetivo general..... | 21 |
| 3.2. | Objetivos específicos | 21 |
| 4. | Área de estudio | 22 |
| 5. | Materiales..... | 23 |
| 5.1. | Aislamiento de microorganismos | 23 |
| 5.2. | Almacenamiento de cepas..... | 24 |
| 5.3. | Caracterización de cepas solubilizadoras de calcio | 24 |
| 5.3.1. | Confirmación bioquímica de <i>Pseudomonas</i> spp..... | 24 |
| 5.3.2. | Solubilización de calcio y fosfato | 25 |
| 5.3.3. | Identificación bioquímica | 25 |
| 5.4. | Propagación <i>in-vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 26 |
| 5.5. | Bioensayos de promoción de crecimiento | 27 |
| 5.6. | Análisis de peso seco y tamaño de raíz..... | 28 |
| 6. | Métodos..... | 29 |
| 6.1. | Aislamiento de microorganismos | 29 |
| 6.1.1. | Muestras de suelo y compost | 29 |
| 6.1.2. | Muestras de raíz | 29 |
| 6.1.3. | Almacenamiento de cepas..... | 30 |
| 6.2. | Comprobación de las cepas como <i>Pseudomonas</i> spp..... | 30 |
| 6.2.1. | Confirmación de actividad de solubilización de calcio y fosfato | 30 |
| 6.3. | Cultivo <i>in-vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 31 |
| 6.3.1. | Desinfección de semillas..... | 31 |
| 6.3.2. | Preparación de medios de cultivo | 31 |
| 6.3.3. | Siembra de semillas | 31 |
| 6.4. | Ensayos de promoción de crecimiento | 32 |
| 6.4.1. | Preparación de los inóculos microbianos..... | 32 |
| 6.4.2. | Preparación de tratamientos | 32 |
| 6.4.3. | Transferencia de <i>seedlings</i> | 33 |
| 6.4.4. | Análisis de peso seco y tamaño de raíz..... | 33 |
| 7. | Resultados | 34 |
| 7.1. | Aislamiento de microorganismos | 34 |
| 7.1.1. | Confirmación de la actividad solubilizadora de calcio y fosfato | 35 |
| 7.1.1.1. | Medición de calcio solubilizado | 36 |

| | | |
|--------|--|----|
| 7.1.2. | Identificación bioquímica de la especie de las cepas de <i>Pseudomonas</i> solubilizadoras de calcio y fosfato | 38 |
| 7.2. | Evaluación de promoción del crecimiento..... | 38 |
| 7.2.1. | Análisis de peso seco | 39 |
| 7.2.2. | Análisis de tamaño de raíz | 41 |
| 8. | Discusión..... | 43 |
| 8.1. | Aislamiento de microorganismos | 43 |
| 8.2. | Caracterización de microorganismos | 44 |
| 8.2.1. | Confirmación de la actividad solubilizadora de nutrientes..... | 44 |
| 8.2.2. | Identificación de cepas..... | 45 |
| 8.3. | Ensayo de co-cultivo..... | 47 |
| 9. | Conclusiones | 51 |
| 10. | Recomendaciones | 52 |
| 11. | Referencias bibliográficas..... | 53 |
| 12. | Anexos | 58 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Perfil de las cepas confirmadas con actividad solubilizadora de calcio | 38 |
| Tabla 2. Diseño experimental del ensayo de co-cultivo | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas de muestras de compost (M), suelo (S), endófitos de raíz de rosa (E) y rizósfera (R) en Agar Cetrinida | 34 |
| Figura 2. Actividad de solubilización de calcio de cepas <i>Pseudomonas</i> aisladas. | 35 |
| Figura 3. Concentración total de calcio, en partes por millón, disponible en caldo TCP después de cinco días de la inoculación con posibles cepas solubilizadoras. (A: medición con ICP-OES; B: medición con equipo LAQUAtwin) | 37 |
| Figura 4. Correlación entre los resultados con los dos equipos de medición | 37 |
| Figura 5. Comparación del fenotipo de <i>seedlings</i> cultivados en ½ MS con calcio insoluble. A: Control abiótico. B: Tratamiento con cepa M10. C: Tratamiento con cepa S6. | 39 |
| Figura 6. Peso seco de los <i>seedlings</i> de Col-0 germinados en ½ MS tradicional, ½ MS con calcio insoluble y ½ MS con calcio y fósforo insoluble. | 40 |
| Figura 7. Comparación del fenotipo de raíz. A: Control sin microorganismo. B: Tratamiento con M10..... | 41 |
| Figura 8. Tamaño de raíz principal de los <i>seedlings</i> de Col-0 germinados en ½ MS tradicional, ½ MS con calcio insoluble y ½ MS con calcio y fósforo insoluble..... | 42 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Resultados de medición de calcio mediante ICP-OES | 58 |
| Anexo 2. Resultados de medición de calcio usando el equipo LAQUAtwin Ca ²⁺ | 58 |
| Anexo 3. Datos de peso seco final de los <i>seedlings</i> por tratamiento | 59 |
| Anexo 4. Análisis ANOVA para el peso seco de <i>seedlings</i> en el medio 1/2 MS..... | 65 |
| Anexo 5. Análisis ANOVA para el peso seco de <i>seedlings</i> en el medio 1/2 MS con calcio insoluble | 66 |
| Anexo 6. Análisis ANOVA para el peso seco de <i>seedlings</i> en el medio 1/2 MS con calcio y fósforo insoluble..... | 67 |
| Anexo 7. Análisis ANOVA para el tamaño de raíz de <i>seedlings</i> en el medio 1/2 MS..... | 68 |
| Anexo 8. Análisis ANOVA para el tamaño de raíz de <i>seedlings</i> en el medio 1/2 MS con calcio insoluble..... | 69 |
| Anexo 9. Análisis ANOVA para el tamaño de raíz de <i>seedlings</i> en el medio 1/2 MS con calcio y fósforo insoluble | 70 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fertilizantes químicos

Hoy en día, el mundo se enfrenta a varios retos ambientales como es el crecimiento exponencial de la población humana lo cual fuerza a las industrias, principalmente a la alimenticia, a buscar alternativas para aumentar la productividad y resiliencia de los sistemas agronómicos. Por esta razón, año tras años, billones de hectáreas de terreno alrededor del mundo son tratadas con agroquímicos con la finalidad de aumentar la eficiencia de las cosechas (Savci, 2012). Los fertilizantes químicos son ampliamente usados ya que permiten el control de plagas en los cultivos, además de la fertilización de los suelos, a un costo accesible tanto para pequeñas como grandes industrias.

Los fertilizantes químicos son aquellos compuestos que tienen la función de enriquecer el suelo de siembra mediante el suministro tanto de macronutrientes como de micronutrientes. Estos principalmente actúan como una fuente de nutrientes para las plantas como nitrógeno, fósforo, potasio, entre otros elementos (Savci, 2012). A pesar del beneficio inminente que representan estos agroquímicos, la mayoría de ellos contienen también grandes cantidades de compuestos tóxicos tanto para el ser humano como para la planta.

La mayoría de los fertilizantes comercializados a nivel mundial contienen metales pesados tóxicos que, al acumularse fácilmente en el suelo, pueden causar problemas serios para la población. Además, al contener sales inorgánicas, su uso continuo trae como consecuencia la erosión del suelo por incremento en la salinidad, reducción de la materia orgánica y desbalances de pH (Savci, 2012).

El manejo de la disponibilidad de los nutrientes del suelo es necesario para garantizar el óptimo desarrollo de las plantas, mantener los suelos fértiles y aumentar la productividad de

los cultivos. Sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes químicos afecta directamente la salud del suelo, además de tener efectos adversos tanto en el medio ambiente como en el ser humano.

Una alternativa viable a estos compuestos son los biofertilizantes. Los biofertilizantes ejercen una función similar los fertilizantes químicos, la diferencia es que se encuentran formados por microorganismos benéficos para el suelo y las plantas, por lo que no representan un riesgo ni para la salud humana ni para el medio ambiente (Salama, 2006).

Los biofertilizantes son inóculos microbianos que se aplican a los suelos de producción agrícola con la finalidad de aumentar la productividad de los cultivos. A diferencia de los fertilizantes convencionales, en lugar de añadir una mayor cantidad de nutrientes al suelo, aumentan la disponibilidad de estos nutrientes para que las plantas los asimilen de manera más sencilla ya que son capaces de reducirlos a moléculas mejor asimilables (Salama, 2006). En los últimos años, la industria de la agricultura ha invertido esfuerzos en el desarrollo de este tipo de estimulantes de crecimiento, ya que promueven la formación de raíces, lo cual conlleva al aumento de la capacidad de absorción de nutrientes y la obtención de plantas más vigorosas, en comparación al uso de agroquímicos (Bashan y de-Bashan, 2010).

1.2. Microorganismos promotores de crecimiento

La buena nutrición del suelo de cultivo es esencial para un buen crecimiento de las plantas ya que permite su correcto anclaje y posterior desarrollo. Las raíces saludables secretan diferentes compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, que estimulan el crecimiento de microorganismos benéficos para las plantas (Kumar, 2016). A su vez, estos microorganismos colonizan las raíces e interaccionan de manera positiva con la planta ya que secretan otros compuestos que son absorbidos por la misma y asisten en su crecimiento.

Los microorganismos que son capaces de colonizar las raíces de las plantas, multiplicarse y expresar actividades de promoción de crecimiento se conocen como *plant growth-promoting microorganisms* (PGPM). Existen tres principales vías por las cuales estos

microorganismos estimulan el crecimiento vegetal: fijación de nitrógeno, secreción de fitohormonas y solubilización de nutrientes (Akhtar y Siddiqui, 2010).

El nitrógeno es un elemento limitante crítico para el crecimiento de las plantas. Por lo tanto, los microorganismos fijadores de nitrógeno son benéficos para la planta ya que poseen la enzima nitrogenasa que fija el nitrógeno atmosférico, N_2 , y lo transforma en amoníaco, NH_3^+ , el cual finalmente se ioniza hacia amonio, NH_4^+ (Wagner, 2011). Ambas formas de nitrógeno son asimiladas directamente por la planta al ser formas reducidas de este elemento, a diferencia del nitrógeno atmosférico. Por el otro lado, los factores de crecimiento también son elementos críticos para el crecimiento de las plantas. Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir fitohormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas como metabolitos secundarios (Kumar, 2016).

1.2.1. Solubilización de nutrientes

El uso excesivo de fertilizantes químicos da como resultado la precipitación de ciertos elementos esenciales para el desarrollo de la planta por lo que no pueden ser completamente asimilados (Khan, et al., 2007). De esta manera, la solubilización de estos elementos permite aumentar la biodisponibilidad de los mismos y así ser absorbidos por las raíces de las plantas.

El mecanismo de solubilización empleado por los microorganismos consiste en la producción de ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido cítrico, ácido láctico, entre otros, como parte de su metabolismo, los cuales disuelven los complejos que precipitan los nutrientes como consecuencia del descenso del pH (Kumar y Shastri, 2017).

Varios microorganismos, tanto bacterias como hongos, han sido descritos por sus habilidades de solubilizar nutrientes. Dentro de las bacterias se encuentran especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, entre otros (Kumar, 2016).

1.3. Género *Pseudomonas*

Los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* abarcan bacilos Gram negativos, aerobios estrictos los cuales están ubicados de manera predominante en suelo y rizósfera de plantas (Yasmin y Bano, 2011). Varias especies de este género secretan pioverdina, un pigmento fluorescente, lo cual las vuelven fluorescente bajo luz ultravioleta (Creanga, et al., 2011). Se ha observado que este sideróforo estimula directamente la síntesis de compuestos antimicrobianos lo cual les permite crecer en ambientes con alta diversidad microbiana, como es el suelo, y suprimir el crecimiento de patógenos tanto para la planta como para la bacteria en sí (Kumar, 2016). Estudios previos han identificado cepas de *Pseudomonas*, especialmente *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, capaces de solubilizar nutrientes, principalmente aquellas cepas que presentan fluorescencia (Sharma, Pal y Kaur, 2017).

1.3.1. Estimulación de crecimiento vegetal

Las plantas utilizan señales ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, para dirigir su crecimiento. Específicamente, las raíces pueden direccionarse en respuesta a estas señales ambientales y endógenas de la planta para así regular su desarrollo (Xu, et al., 2013). De esta manera, se ha encontrado cepas de *Pseudomonas* que estimular el crecimiento de plantas mediante la solubilización de nutrientes (Sharma, Pal y Kaur, 2017). Al solubilizar nutrientes, la actividad de *Pseudomonas* permite aumentar la biodisponibilidad de los mismos y así ser asimilados de manera más fácil por la planta y obtener plantas con raíces mejor desarrolladas.

Entre los principales nutrientes que se ha reportado que *Pseudomonas* spp. posee actividad solubilizadora se encuentran el calcio y el fósforo. La solubilización del calcio y el fósforo, en forma de fosfato, involucra que los microorganismos liberen distintos ácidos orgánicos que solubilizan los complejos formados por estos compuestos produciendo ortofosfato y Ca^{2+} (Otieno, et al., 2015). Específicamente, se encontró que la solubilización de

calcio y fosfato ocurre mediante la producción de ácido glucónico o 2-cetoglucónico (Otieno, et al., 2015). La biosíntesis de estos dos ácidos se lleva a cabo comúnmente por las enzimas glucosa deshidrogenasa, *gcd*, y gluconato deshidrogenasa, *gad*, en presencia del cofactor, pirroloquinolina quinona, *pqq* (Sharma, et al., 2013).

1.4. Evaluación *in-vitro*

1.4.1. Generalidades del cultivo *in-vitro*

El cultivo *in-vitro* es una técnica de propagación vegetal empleada por décadas ya que permite el control de cada uno de los factores que van a influenciar en el crecimiento de la planta. De esta manera, empleando un medio de cultivo es posible modificar la disponibilidad de nutrientes y así simular condiciones deseadas con la finalidad de determinar el efecto que posee sobre el cultivo (Barkla, Vera y Pantoja, 2014).

La evaluación *in-vitro* es una gran alternativa para la realización de ensayos ya que permite que el desarrollo de la plántula ocurra de manera rápida por lo que se obtendrá una mayor cantidad de plántulas listas para ensayo en un tiempo menor al que le tomaría germinar en tierra. De esta manera, el cultivo *in-vitro* permite una propagación masiva de las plantas y así realizar un screening de un factor específico.

1.4.2. Planta modelo: *Arabidopsis thaliana*

Para la investigación dentro del campo de la biología vegetal, es importante emplear una planta modelo para evaluar el efecto de un factor sobre esta planta y posteriormente poder extrapolarlo a otras especies. Uno de los modelos de estudio más empleados es *Arabidopsis thaliana*, debido a que posee un ciclo de vida corto y ampliamente descrito y se autopoliniza por lo que es fácil de cultivar (Xu, et al., 2013). Es parte de la familia Brassicaceae y se caracteriza por ser una planta herbácea de pequeño tamaño distribuida en Europa, Asia y América del Norte (Al-Shehbaz y O’Kane, 2002). Posee semillas de 0.5 mm que germinan

hasta convertirse en rosetas que pueden alcanzar los 10 cm de diámetro; sus flores son de color blanco y poseen cuatro pétalos (Meinke, et al., 1998).

Existen varios ecotipos silvestres bien caracterizados como es el caso de Col-0, el cual se emplea en la mayoría de estudios (Meinke, et al., 1998). Su ciclo de vida completo, desde la germinación hasta la floración y maduración de semillas dura un total de seis semanas (Meinke, et al., 1998).

De esta manera, *A. thaliana* es un buen modelo para estudiar la estimulación de crecimiento por parte de estos microorganismos mencionados anteriormente de manera preliminar. El uso de *Arabidopsis* como modelo ofrece importantes ventajas para la realización de un screening de alto rendimiento con la oportunidad de, posteriormente, extrapolar los resultados obtenidos a otros cultivos de interés comercial. En el Ecuador, específicamente, los principales cultivos de interés económico que se producen son el banano, cacao, brócoli y las flores de corte (FAO, 2005). De esta manera, los microorganismos evaluados en *Arabidopsis* pueden ser después evaluados en estos cultivos. Ya que estos poseen un alta importancia al ser, principalmente, cultivos de exportación.

1.4.2.1. Cultivo in-vitro de Arabidopsis thaliana

Las semillas de *A. thaliana* pueden ser germinadas en cajas Petri dentro del laboratorio empleando luces fluorescentes. Debido a su ciclo de vida corto, es posible obtener seedlings para evaluación en una semana y flores en tres semanas (Meinke, et al., 1998). Uno de los métodos más empleados para el cultivo in-vitro de *A. thaliana* es el cultivo vertical.

El cultivo vertical de esta especie representa una ventaja para el estudio de la estimulación de crecimiento ya que permite el análisis de manera no invasiva. Esta técnica consiste en la incubación de las plantas de manera vertical en cajas Petri, lo cual permite un

desarrollo natural de la raíz y así evidenciar el efecto directo de un determinado factor en el desarrollo de la planta (Xu, et al., 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

A medida que la población humana continúa creciendo, el saciar la alta demanda por alimentos será uno de los mayores desafíos para la industria alimenticia. A corto plazo, para aumentar la producción de alimentos, los productores agrícolas han recurrido al uso excesivo de fertilizantes químicos. A pesar de que permiten un correcto manejo de los cultivos, los fertilizantes representan también un riesgo tanto para la salud del ser humano como para el medio ambiente. Los agroquímicos contienen altas cantidades de nutrientes, los cuales forman complejos insolubles por lo que no pueden ser asimilados en su totalidad por la planta y como resultado se acumulan en el suelo y se filtran hasta alcanzar aguas subterráneas y dispersarse hacia ríos y lagos, contaminando el agua de uso doméstico (Sharma, Pal y Kaur, 2017).

El suelo de cultivo es rico en macronutrientes esenciales para el desarrollo de la planta. Sin embargo, alrededor del 95 al 99% de estos nutrientes no se encuentran directamente disponibles para la planta (Katiyar y Goel, 2003). Por esta razón se recurre a la suplementación del suelo con agroquímicos ya que estos suministran a la planta macronutrientes como nitrógeno, carbono, fósforo y calcio (Savci, 2012). Específicamente, entre el 75 y 90% del fósforo y calcio de estos agroquímicos forman complejos insolubles (Khan, et al., 2007).

De esta manera, para minimizar estos riesgos que representa el uso de químicos y aprovechar la riqueza de los suelos de cultivo, microorganismos benéficos, como *Pseudomonas* spp., pueden ser exitosamente empleados como una alternativa en remplazo a la nutrición química gracias a su actividad solubilizadora de nutrientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el crecimiento *in-vitro* de *Arabidopsis thaliana* tratada con cepas de *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de calcio y fósforo.

3.2. Objetivos específicos

- Aislar cepas de *Pseudomonas* spp. a partir de suelo, raíces y compost de rosas.
- Seleccionar las cepas de *Pseudomonas* spp. con potencial solubilizador de calcio y fosfato.
 - Caracterizar bioquímicamente la especie de las cepas de *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de calcio y fosfato.
- Propagar *in-vitro* *Arabidopsis thaliana*.
- Realizar bioensayos de co-cultivo de las cepas aisladas con las plántulas de *A. thaliana* *in-vitro* para evaluar crecimiento para evaluar la promoción del crecimiento por medio del peso seco y tamaño de raíz de las plántulas.

4. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de suelo y compost fueron recolectados en la florícola Rosen Tantau, en Pintag, Pichincha, Ecuador; mientras que las muestras de raíz fueron obtenidas a partir de patrón de rosa *Natal briar* adquirido a la empresa Brown Breeding Ing., ubicada en Puenbo, Ecuador.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* empleadas para los ensayos corresponden a la variedad silvestre Col-0 y fueron cosechadas a partir de las plantas sembradas en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

Los procedimientos de aislamiento y caracterización de microorganismos y los ensayos de co-cultivo se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos (BS-201) de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador y en las instalaciones de la Universidad de Utrecht, en Holanda. Por otra parte, los análisis de calcio y peso seco se realizaron en el Instituto de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

5. MATERIALES

5.1. Aislamiento de microorganismos

- Muestra de raíces de rosa
- Muestra de suelo
- Muestra de compost de rosas
- Fundas plásticas estériles
- Caja de transporte icopore
- Cloruro de magnesio (MgCl_2) 10mM
- Solución salina
- Alcohol 96%
- Tubos Falcon 50 ml (Boeco)
- Mortero y pistilo de cerámica
- Asa de vidrio
- Agar Cetrimida
- Cajas Petri 100mm (Phoenix Biomedical)
- Balanza analítica Pioneer PA214 (OHAUS)
- Vórtex Sea Star (Heathrow Scientific)
- Pala metálica
- Poda

5.2. Almacenamiento de cepas

- Caldo
- Hisopos estériles
- Glicerol
- Tubos para criovial
- Congelador -80°C

5.3. Caracterización de cepas solubilizadoras de calcio

5.3.1. Confirmación bioquímica de *Pseudomonas* spp.

- Agar Pseudomonas F (Difco)
- Cristal violeta
- Lugol
- Safranina
- Alcohol-acetona
- Luz UV
- Cajas Petri 100 mm
- Tiras para prueba de oxidasa
- Porta objetos
- Microscopio
- Palillos
- Asa estocada

5.3.2. Solubilización de calcio y fosfato

- Agar Tricalcium Phosphate (NBRIP)
- Caldo Tricalcium Phosphate (NBRIP)
- Tubos Falcon 50 ml (Boeco)
- Medidor de calcio LAQUAtwin Ca²⁺ (Horiba)
- Shaker
- Centrífuga 206A (Hermle)
- Asa estocada
- Cajas Petri 100 mm
- Espectrofotómetro ICP-OES (INA-USFQ)

5.3.3. Identificación bioquímica

- API 20E
- Palillos
- Asa estocada
- Aceite mineral
- Agua destilada estéril
- Tubos Falcon 15 ml (Boeco)
- Hisopos
- Reactivo de Kovac's
- Reactivo VP1, VP2
- Cloruro férrico

5.4. Propagación *in-vitro* de *Arabidopsis thaliana*

- Semillas de *Arabidopsis thaliana* wild type Col-0
- Malla
- Medio ½ Murashige & Skoog
- Ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico monohidratado (Phytotech)
- Bacto agar (Difco)
- Micropipeta 20-200 µl (Labnet)
- Puntas 20-200µl con filtro (Corning)
- Tubos Eppendorf 2 ml
- Agua destilada estéril
- Etanol 75%
- Hipoclorito de sodio 2.5%
- Parafilm (M)
- Cinta quirúrgica de papel Micropore (3M)
- Regla
- Cajas Petri 145 mm (Greiner Bio-One)
- Refrigeradora 4°C (Mabe)
- Vórtex Sea Star (Heathrow Scientific)
- Centrífuga Wise Spin CF-10 (WISD Laboratory Instruments)
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de cultivo

5.5. Bioensayos de promoción de crecimiento

- Seedlings de *Arabidopsis thaliana* wild type Col-0
- Medio ½ Murashige & Skoog
- Medio ½ Murashige & Skoog deficiente de calcio
- Medio ½ Murashige & Skoog deficiente de calcio y fósforo
- Fosfato tricálcico
- Agar Noble (Difco)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 10mM
- Pinzas de acero
- Etanol 96%
- Cinta quirúrgica de papel Micropore (3M)
- Regla
- Tubos Falcon 15 ml (Boeco)
- Espectrofotómetro UV-Vis 7315 (Jenway)
- Cubeta de cuarzo
- Micropipeta 100-1000 μ l (Labnet)
- Puntas 100-1000 μ l
- Micropipeta 10-100 μ l (Labnet)
- Puntas 10-100 μ l
- Asa de vidrio
- Cámara de flujo laminar (Biobase)
- Cámara de cultivo

5.6. Análisis de peso seco y tamaño de raíz

- Balanza analítica Pioneer PA214 (OHAUS)
- Pesa muestras
- Papel aluminio
- Regla
- Horno Quincy Lab 40 GC(IIA-USFQ)

6. MÉTODOS

6.1. Aislamiento de microorganismos

6.1.1. Muestras de suelo y compost

Primero, se recolectó muestras de suelo de cultivo y de compost de rosas. Con una pala se tomó una buena cantidad de suelo o de compost de cinco localizaciones distintas y se colocó en fundas plásticas estériles por separado. Antes del aislamiento, se eliminó residuos de planta u otros desechos no orgánicos presentes en la muestra. A continuación, de cada una de las cinco muestras tanto de suelo como de compost se tomó 5 gramos y se las juntó para formar una muestra más grande de 25 gramos. En una funda estéril, se colocó 225 mililitros de solución salina estéril junto con los 25 gramos de muestra correspondientes y se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Posteriormente, se sembró 100 μ l de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} por extensión en placa tanto para la muestra de suelo como para la muestra de compost en agar Cetrimida. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas. Este procedimiento se realizó en base al protocolo descrito por Alexandre (2017).

6.1.2. Muestras de raíz

A partir de patrón de rosa *Natal briar*, con una poda esterilizada se tomó muestras de la raíz y se almacenó en una funda plástica estéril. En un tubo Falcon de 50 ml se colocó 1 gramo de muestra y se aforó a 10 mililitros con cloruro de magnesio 10mM. Para eliminar los residuos de la raíz se colocó el tubo Falcon en un vórtex por 5 minutos. En un mortero autoclavado se colocó la muestra de raíz y se machacó hasta obtener una pasta homogénea. Esta pasta se transfirió a un nuevo tubo y se aforó a 10 mililitros con $MgCl_2$ 10mM.

Tanto de la solución con raíz como de la solución con los residuos de raíz se realizó dilución 10^{-1} y se sembró 100 μ l en agar cetrimida por extensión en placa. La primera se empleó para aislar microorganismos endófitos mientras que la segunda se empleó para aislar

microorganismos de la rizósfera. Las cajas se incubaron por 48 a temperatura ambiente como se recomienda en el protocolo para aislamiento de microorganismos a partir de raíz descrito por Alexandre (2017).

6.1.3. Almacenamiento de cepas

Las cepas con morfologías distintas se aislaron mediante estriado en agar Cetrimida. Para la posterior caracterización, las colonias obtenidas se guardaron a -80°C en una solución para congelación, compuesta por caldo nutritivo y 20% de glicerol.

6.2. Comprobación de las cepas como *Pseudomonas* spp.

Las cepas aisladas anteriormente se revivieron en agar *Pseudomonas* F y se incubó las cajas por 48 horas a temperatura ambiente. Las colonias se confirmaron mediante tinción Gram, prueba oxidasa y fluorescencia en luz UV.

6.2.1. Confirmación de actividad de solubilización de calcio y fosfato

Las cepas confirmadas como *Pseudomonas* spp. (bacilos Gram negativos, oxidasa positiva y UV positivo) se sembraron mediante estriado en agar Tricalcium Phosphate (TCP) según el protocolo por (Oteino, et al., 2015). Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente por 5 días. Una vez transcurrido este tiempo se identificaron aquellas cepas que formaron un halo transparente alrededor.

Estas cepas se transfirieron a Erlenmeyer con 15 mililitros de caldo Tricalcium Phosphate, cuatro colonias por cada Erlenmeyer, y se incubó en un shaker a 28°C y 200 rpm por 5 días (Oteino, et al., 2015). Finalmente, mediante espectrometría ICP-OES, realizada por el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la USFQ, y medición de calcio total empleando el

equipo LAQUAtwin Ca^{2+} , se cuantificó la actividad solubilizadora de calcio de cada una de estas cepas.

Las cepas que presentaron una alta solubilización de calcio se identificaron empleando la batería bioquímica API 20E para obtener la especie y posteriormente se las almacenó para su uso en los ensayos de cultivo *in-vitro*.

6.3. Cultivo *in-vitro* de *Arabidopsis thaliana*

6.3.1. Desinfección de semillas

Las semillas de Col-0 se colocaron en un tubo Eppendorf de 2 ml junto con 1 ml de hipoclorito de sodio 2.5% para su desinfección. Se mezcló vigorosamente empleando un vórtex por 10 minutos. Dentro de una cámara de flujo laminar se retiró la solución de hipoclorito de sodio y se realizó 5 lavados con agua destilada estéril. Finalmente se almacenaron las semillas, selladas correctamente con Parafilm, a 4°C por 48 horas para la estratificación fría (Xu, et al., 2013).

6.3.2. Preparación de medios de cultivo

Para la germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* se preparó ½ MS con 0.05% MES, 0.5% azúcar y 1% bacto agar. El medio se ajustó a pH 5.7 se lo autoclavó en frascos Pyrex. Finalmente se dispensó 100 mililitros de medio en cajas Petri de 20 centímetros de diámetro.

Una vez solidificado el medio, se marcó dos líneas rectas de 12 y 13 centímetros en la parte superior e inferior de la caja, respectivamente.

6.3.3. Siembra de semillas

Las semillas desinfectadas se sembraron dentro de la cámara de flujo laminar. Con una pipeta con puntas con filtro, se mezcló la solución con las semillas y se tomó una pequeña

cantidad de semillas. Lentamente se aplastó la pipeta para liberar una por una las semillas y se sembró en línea recta (De Diego, et al., 2017).

Las cajas se sellaron con cinta quirúrgica y se incubaron de manera vertical en gradillas de madera dentro del cuarto de cultivo con un fotoperiodo 12/12 por 7 días.

6.4. Ensayos de promoción de crecimiento

6.4.1. Preparación de los inóculos microbianos

Las cepas que presentaron solubilización positiva de calcio, se revivieron en agar *Pseudomonas* F y se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente se transfirió las colonias a agar TCP sólido por una semana. Finalmente, se inoculó 4 colonias por cepa en un Erlenmeyer con 25 mililitros de caldo nutritivo y se incubó por 24 horas a temperatura ambiente como indica Oteino, et al. (2015).

Una vez transcurrido este tiempo, se colocó 2 mililitros de cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 8 minutos a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet, por tres ocasiones, con 1 mililitro de $MgCl_2$ 10mM. Después de cada lavado, nuevamente se centrifugó el tubo por 8 minutos a 3000 rpm. Finalmente, el pellet final se resuspendió en 1 ml de $MgCl_2$ 10mM. Este procedimiento se realizó 10 veces para cada cepa de *Pseudomonas* en estudio y se juntó todo en un tubo Falcon de 15 mililitros.

Para medir la absorbancia de las muestras, se tomó 2 mililitros de la solución bacteriana y se colocó en una celda de cuarzo. Se registró la absorbancia de cada solución bacteriana a 600 nm y se diluyó hasta obtener una concentración de 10^8 ufc/ml (Oteino, et al., 2015).

6.4.2. Preparación de tratamientos

Para los tratamientos, se preparó $\frac{1}{2}$ MS con 3 concentraciones distintas de calcio y fósforo y con 0.9% de agar Noble. En el primer tratamiento se preparó $\frac{1}{2}$ MS convencional; en el segundo tratamiento se preparó $\frac{1}{2}$ MS deficiente en calcio y se añadió 5 g/L de fosfato

tricálcico; mientras que en el tercer tratamiento se preparó $\frac{1}{2}$ MS deficiente en calcio y fósforo y también se añadió 5 g/L de fosfato tricálcico (Nautiyal, 1999). Estos tres medios se autoclavó y se dispensó 100 mililitros en cajas Petri de 20 centímetros de diámetro. En cada una de las cajas se dibujó una línea recta de 12 centímetros y se marcó cada 2 centímetros una línea pequeña que indica la distancia entre cada planta. En las cajas correspondientes al tratamiento con microorganismo, se inoculó 100 μ l de la solución bacteriana correspondiente y se sembró por extensión en placa.

6.4.3. Transferencia de *seedlings*

Siete días después de la siembra de semillas, se seleccionaron aquellos *seedlings* que germinaron para el ensayo. Con una pinza se transfirió uno por uno los *seedlings* a las cajas Petri con cada uno de los tratamientos (De Diego, et al., 2017). El *seedling* se ubico en cada una de las marcas previamente realizadas. Una vez finalizada la transferencia, se marcó el inicio y el final de la raíz en ese momento.

Las cajas se sellaron con cinta quirúrgica y se incubaron de manera vertical en gradillas de madera dentro del cuarto de cultivo con un fotoperiodo 12/12 por 12 días.

6.4.4. Análisis de peso seco y tamaño de raíz

Una vez transcurridos los 12 días de incubación, con una regla se determinó el tamaño final de la raíz de cada uno de los *seedlings* para el análisis de tamaño de raíz.

Por el otro lado, para el análisis de peso seco, se retiró de la caja los *seedlings* y se los pesó uno por uno. A continuación se los colocó sobre un papel aluminio y se secó las muestras en un horno a 70°C por 3 días (Xu, et al., 2013). Finalmente, después de este tiempo, se pesó nuevamente los *seedlings* para obtener el peso seco final.

Los resultados obtenidos tanto para el peso seco como para el tamaño de raíz se analizaron empleando el software Minitab 17.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de microorganismos

A partir de las muestras de suelo, compost y raíces se aislaron un total de 44 cepas (13 de suelo, 24 de compost, 4 endófitos de raíz y 3 de rizósfera); cada una presentó una morfología diferente en agar Cetrimida como se observa en la Figura 1. Las cepas con la notación “M” corresponden a las cepas aisladas del compost, las cepas con notación “S” corresponden a las muestras de suelo, las cepas con notación “E” corresponden a las muestras de endófitos de raíz y las cepas con notación “R” corresponden a las muestras de rizósfera.

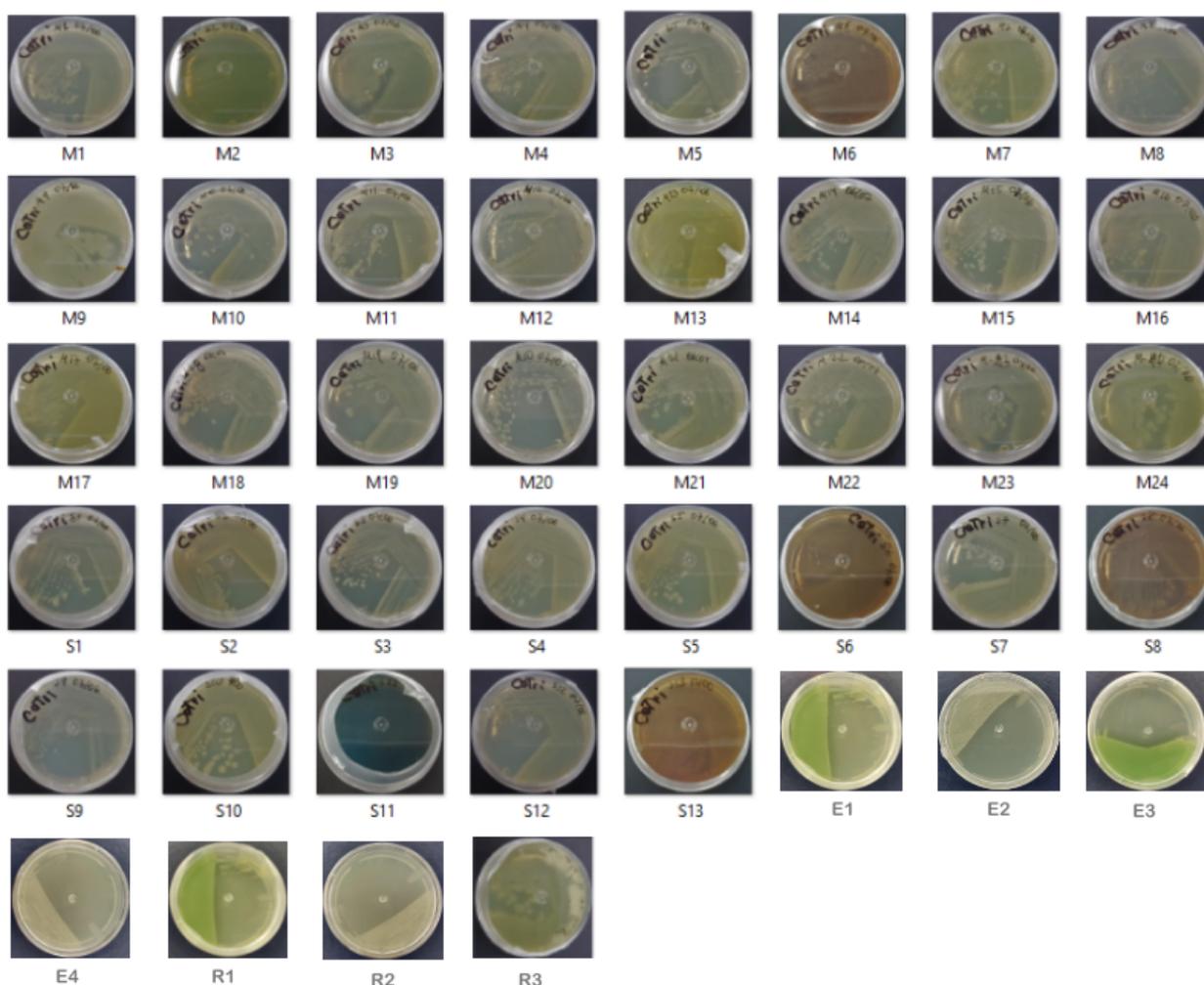


Figura 1. Cepas de *Pseudomonas* aisladas de muestras de compost (M), suelo (S), endófitos de raíz de rosa (E) y rizósfera (R) en Agar Cetrimida

7.1.1. Confirmación de la actividad solubilizadora de calcio y fosfato

Para la confirmación de la actividad solubilizadora de las cepas aisladas, se empleó el agar Tricalcium phosphate (TCP), donde la única fuente de calcio y fosfato es el fosfato tricálcico (insoluble). De esta manera, al ser un compuesto insoluble, no se encuentra disponible para el crecimiento microbiano y solo aquellas cepas con mecanismos de solubilización de estos nutrientes degradarán el TCP formando un halo alrededor de las colonias.

Después de la inoculación de las 43 cepas en el agar TCP, 8 aislados (6 de compost y 2 de suelo) presentaron un halo en el medio lo cual indica la solubilización de calcio y fósforo. Las cepas confirmadas con actividad solubilizadora corresponden a M1, M2, M3, M10, M14, M15, S6 y S8.

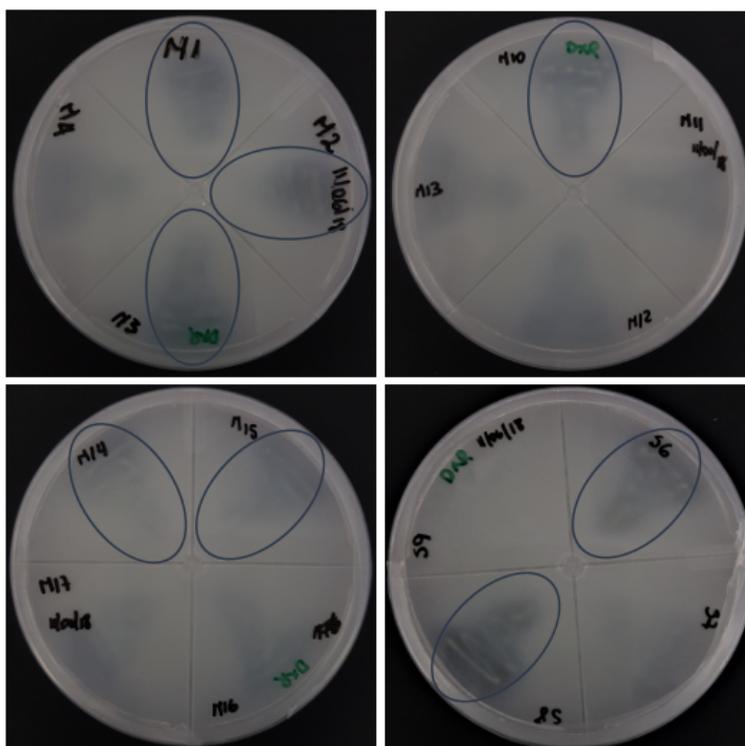


Figura 2. Actividad de solubilización de calcio de cepas *Pseudomonas* aisladas. Resultado positivo presentado con un óvalo azul.

7.1.1.1. Medición de calcio solubilizado

Con la finalidad de demostrar aquellas cepas con mayor actividad solubilizadora de nutrientes, se realizó un ensayo en cultivo líquido. Al igual que en el ensayo anterior, se espera que aquellas cepas solubilizadoras degraden el fosfato tricálcico, liberando moléculas solubles de calcio. De esta manera, mientras mayor sea la concentración de calcio disponible en el medio, mayor fue la actividad solubilizadora de los microorganismos.

Para seleccionar las cepas a evaluar, se realizó la medición de calcio total en cada caldo de cultivo por triplicado (Anexo 1 y 2). Además de las 8 cepas confirmadas en medio sólido, se añadió un control sin microorganismo (abiótico) y un control de la medición con una cepa con bajo potencial de solubilización (S2).

Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro ICP-OES (Figura 3A) y un medidor portátil de calcio LAQUAtwin (Figura 3B). El primero corresponde al método estándar, mientras que el segundo método se empleó para la estandarización del equipo y así analizar las diferencias entre ambas mediciones. En las gráficas se puede observar un alto nivel de solubilización, en ambos casos, para las cepas S8, M15, M10 y S6. Sin embargo, al realizar un análisis estadístico ANOVA se observó no existe una diferencia significativa entre todas las muestras analizadas.

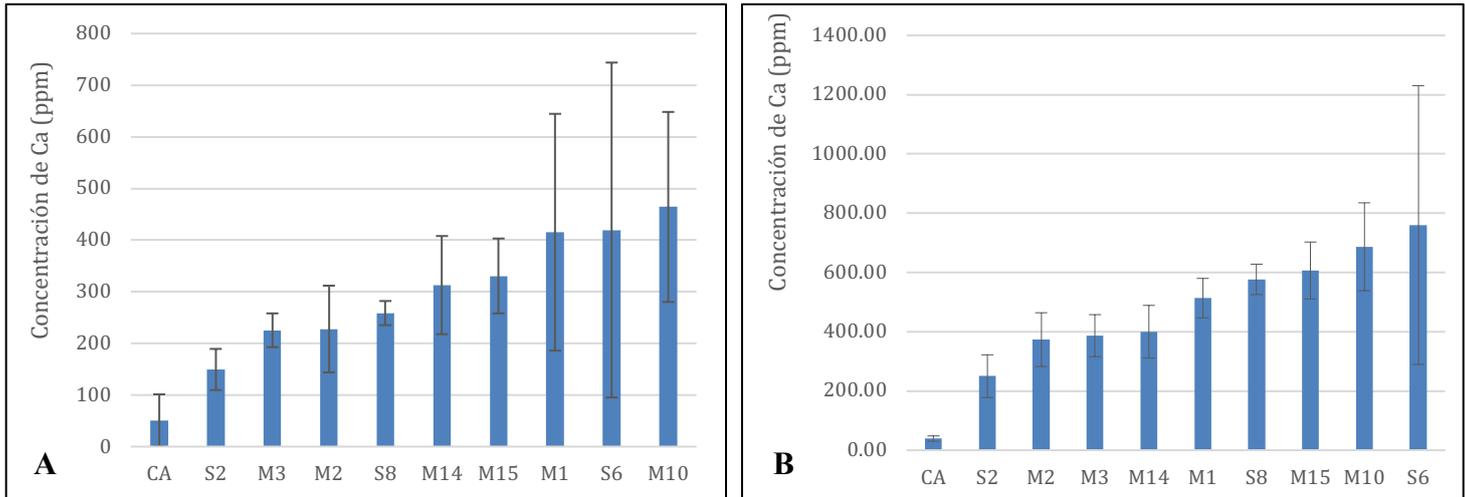


Figura 3. Concentración total de calcio, en partes por millón, disponible en caldo TCP después de cinco días de la inoculación con posibles cepas solubilizadoras. (A: medición con ICP-OES; B: medición con equipo LAQUAtwin)

Para determinar la confiabilidad de las mediciones realizadas por el equipo portátil LAQUAtwin Ca^{2+} , se graficó la correlación entre los resultados obtenidos de una misma muestra con ambos equipos (Figura 4). Se observa que a concentraciones bajas de calcio, la medición es más exacta que a concentraciones más altas por esta razón, en los gráficos anteriores no se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a cuales cepas son las que poseen la mayor actividad solubilizadora. Sin embargo, esta correlación explica la razón por la cual se obtuvieron resultados similares.

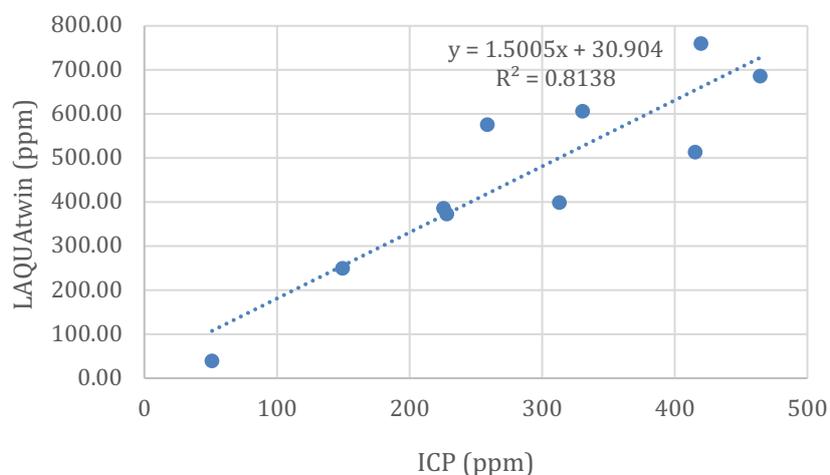


Figura 4. Correlación entre los resultados con los dos equipos de medición

7.1.2. Identificación bioquímica de la especie de las cepas de *Pseudomonas* solubilizadoras de calcio y fosfato

Como se mencionó anteriormente, las cepas seleccionadas para el ensayo fueron caracterizadas previamente mediante tinción Gram, prueba de oxidasa y fluorescencia UV. Posteriormente, mediante el uso de la batería bioquímica API 20E, se identificó la especie de cada una de las cepas seleccionadas para el ensayo de promoción de crecimiento.

Con los resultados obtenidos a partir del perfil bioquímico se determinó que todas las cepas corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, cada una de ellas presentó un perfil distinto lo cual se ve reflejado en los diferentes porcentajes de confianza de la identificación (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de las cepas confirmadas con actividad solubilizadora de calcio

| Cepa | Prueba | Resultado |
|------|------------------|--|
| S6 | Tinción Gram | Bacilos gram negativos |
| | Oxidasa | Positivo |
| | Fluorescencia UV | Positivo |
| | API 20E | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99.6% ID) |
| S8 | Tinción Gram | Bacilos gram negativos |
| | Oxidasa | Positivo |
| | Fluorescencia UV | Positivo |
| | API 20E | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99.6% ID) |
| M10 | Tinción Gram | Bacilos gram negativos |
| | Oxidasa | Positivo |
| | Fluorescencia UV | Positivo |
| | API 20E | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99.2% ID) |
| M15 | Tinción Gram | Bacilos gram negativos |
| | Oxidasa | Positivo |
| | Fluorescencia UV | Positivo |
| | API 20E | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99.9% ID) |

7.2. Evaluación de promoción del crecimiento

Con las cuatro cepas seleccionadas a partir del análisis anterior, se llevó a cabo los ensayos de co-cultivo para determinar el potencial de estimulación de crecimiento de *A. thaliana* (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental del ensayo de co-cultivo

| Tratamiento | Microorganismo | | | | |
|-------------------------|----------------|----|----|-----|-----|
| | Sin bacteria | S6 | S8 | M10 | M15 |
| ½ MS | x5 | x5 | x5 | x5 | x5 |
| ½ MS + Ca insoluble | x5 | x5 | x5 | x5 | x5 |
| ½ MS + Ca y P insoluble | x5 | x5 | x5 | x5 | x5 |

Cada tratamiento consistió en un medio de cultivo distinto para el desarrollo de la plantas; los medios se modificaron con la finalidad de obtener variantes con calcio insoluble y con calcio y fósforo insoluble. En cada uno de estos medios se inoculó un microorganismo distinto, esto se realizó por quintuplicado por lo que se emplearon 25 *seedlings* en cada una de las ocasiones.

7.2.1. Análisis de peso seco

Se analizó el peso seco de las raíces de cada uno de los *seedlings* evaluados, 12 días después de la inoculación del microorganismo (Anexo 2). En cuanto al fenotipo (Figura 5), los *seedlings* tanto del control como del tratamiento con M10 y M15 en los tres medios de cultivo, presentaron una roseta completamente desarrollada. Por el otro lado, los *seedlings* del tratamiento con S6 y S8 no presentaron hojas verdaderas como se observa a continuación.

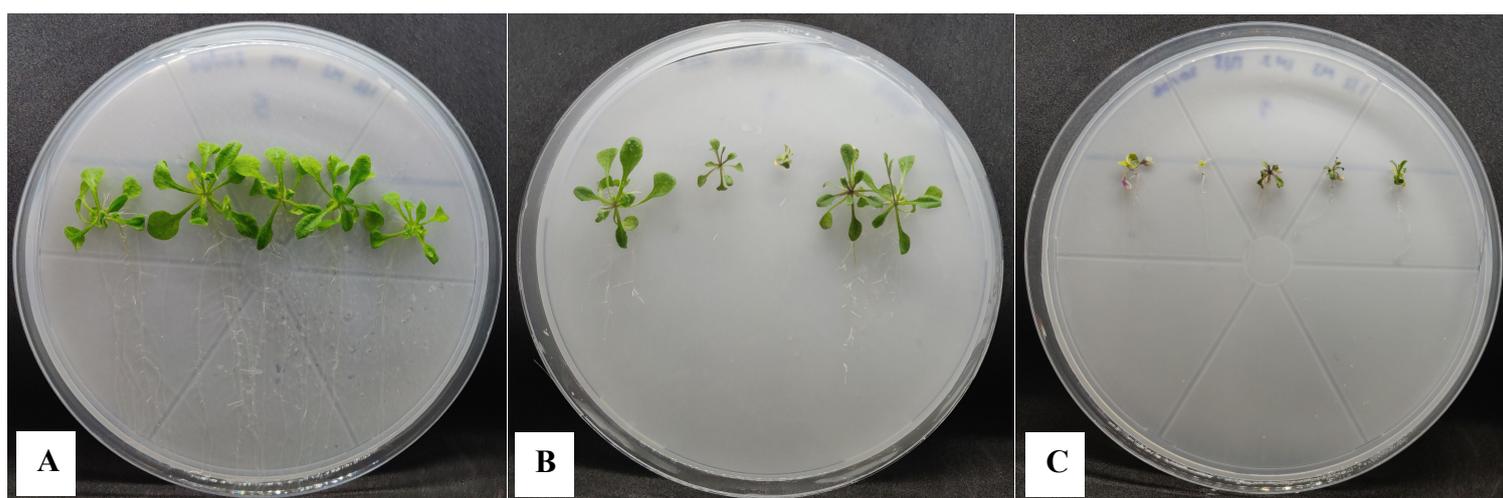


Figura 5. Comparación del fenotipo de *seedlings* cultivados en ½ MS con calcio insoluble. A: Control abiótico. B: Tratamiento con cepa M10. C: Tratamiento con cepa S6.

En la Figura 6 se presenta los resultados en miligramos de peso seco de la planta para cada uno de los tratamientos. Las barras azules corresponden al control, las barras rojas a la cepa S6, las barras verdes a la cepa S8, las barras violeta corresponden a la cepa M10, mientras que las barras turquesa corresponden a la cepa M15.

Como se observa en la gráfica, se obtuvo un mayor peso seco de la planta para las muestras inoculadas con las cepas M10 y M15 en comparación con las cepas S6 y S8 para los 3 medios de cultivo utilizados. El peso seco obtenido para los *seedlings* del control es comparable con los *seedlings* sometidos a la acción de M10 y M15.

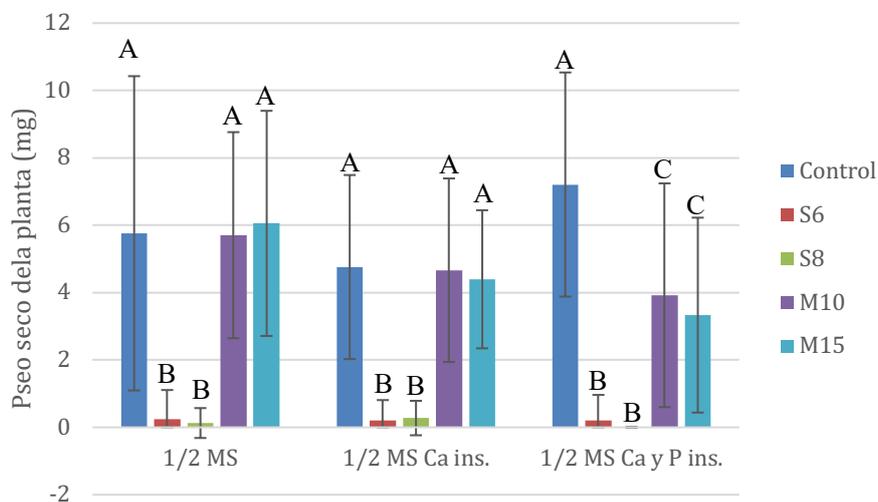


Figura 6. Peso seco de los *seedlings* de Col-0 germinados en $\frac{1}{2}$ MS tradicional, $\frac{1}{2}$ MS con calcio insoluble y $\frac{1}{2}$ MS con calcio y fósforo insoluble. Letras que se comparten indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Mediante un análisis ANOVA, con un nivel de confianza de 95%, se determinó que las medias de los cinco tratamientos son distintas ya que el valor P obtenido fue menor a 0.05. De esta manera, mediante una prueba de comparación múltiple de Fisher se agrupó los tratamientos como se indica en la Figura 6.

En cuanto al medio $\frac{1}{2}$ MS y al medio $\frac{1}{2}$ MS con calcio insoluble, en ambos casos, los resultados agrupan al control junto con el tratamiento con M10 y M15. Finalmente, en el medio

½ MS con calcio y fósforo insoluble, M15 y M10 pertenecen a un grupo; S6 y S8 pertenecen a otro grupo; y el control abiótico forma un tercer grupo.

7.2.2. Análisis de tamaño de raíz

Se analizó el tamaño de la raíz principal de cada uno de los *seedlings* evaluados, al día 0 y 12 después de la inoculación del microorganismo correspondiente al tratamiento (Anexo 2). En cuanto al fenotipo (Figura 7), los *seedlings* del control presentaron raíces finas y largas en los tres medios de cultivo, mientras que los *seedlings* del tratamiento con M10 y los del M15 presentaron raíces cortas pero gruesas en los medios con calcio y fósforo insoluble. Los *seedlings* del tratamiento con S6 y S8 no presentaron un fenotipo determinado de la raíz.



Figura 7. Comparación del fenotipo de raíz. A: Control sin microorganismo. B: Tratamiento con M10.

En la Figura 8 se presenta los resultados en centímetros para cada uno de los tratamientos. Al igual que en los resultados del análisis de peso seco, las barras azules corresponden al control, las barras rojas a la cepa S6, las barras verdes a la cepa S8, las barras violeta corresponden a la cepa M10, mientras que las barras turquesa corresponden a la cepa M15. En el gráfico se observa que sí existen diferencias significativas en el tamaño de raíz

principal entre cepas en comparación con el control. Se evidencia que según la restricción nutricional del medio, hubo decrecimiento en el tamaño de raíz.

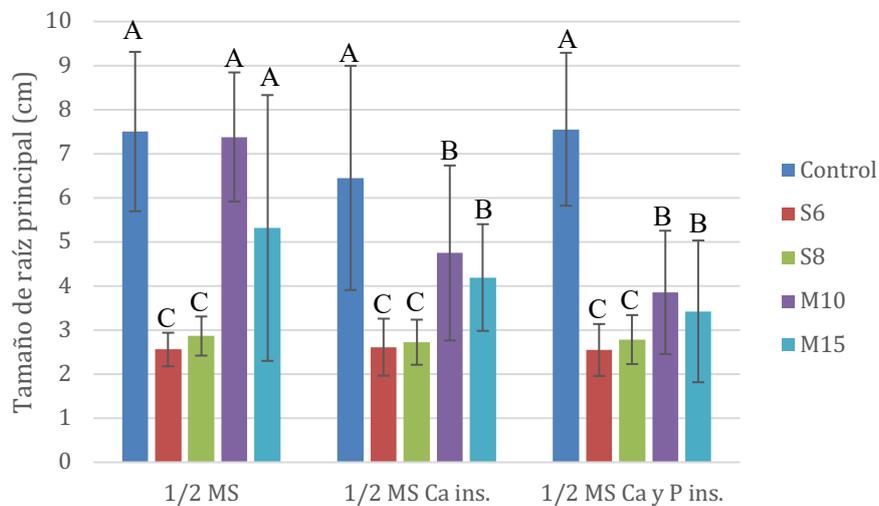


Figura 8. Tamaño de raíz principal de los *seedlings* de Col-0 germinados en ½ MS tradicional, ½ MS con calcio insoluble y ½ MS con calcio y fósforo insoluble. Letras que se comparten indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Mediante un análisis ANOVA, con un nivel de confianza de 95%, se determinó que las medias de los cinco tratamientos son distintas ya que el valor P obtenido fue menor a 0.05. De esta manera, mediante una prueba de comparación múltiple de Fisher se agrupó los tratamientos como se indica en la Figura 8.

En cuanto al medio ½ MS, los resultados agrupan al control junto con el tratamiento con M10 y M15; mientras que el segundo grupo está conformado por los tratamientos S6 y S8. En el medio ½ MS con calcio insoluble y el medio ½ MS con calcio y fósforo insoluble, los resultados indican que M15 y M10 pertenecen a un grupo; S6 y S8 pertenecen a otro grupo; y el control abiótico forma un tercer grupo.

8. DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento de microorganismos

Para la selección de cepas con capacidades intrínsecas de solubilización de nutrientes, es importante la correcta selección de la muestra inicial donde se realizará el aislamiento. Principalmente, los suelos de cultivo, son ricos en microorganismos benéficos para las plantas por lo que constituyen una buena muestra para el aislamiento y posterior identificación de microorganismos promotores de crecimiento.

Específicamente, los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas*, como se mencionó anteriormente, colonizan de manera principal en el suelo. De esta manera, se encuentran asociados con la rizósfera de la planta y por lo tanto son capaces de ejercer un efecto beneficioso sobre las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999).

Por esta razón, para el presente estudio se seleccionó muestras de suelo de cultivo, compost de rosas y raíces de rosas para el aislamiento de diferentes cepas de *Pseudomonas*. Para asegurar la selección únicamente de microorganismos de este género se empleó el medio selectivo Agar Cetrimida. Este agar contiene bromuro de cetiltrimetilamonio, el cual ejerce una función selectiva ya que al ser un detergente catiónico lisa las paredes celulares, especialmente de bacterias gram positivas, causando la liberación de nitrógeno y fósforo de las células por lo que mueren (Sigma-Aldrich, 2013). Se ha encontrado que especies del género *Pseudomonas* son resistentes al bromuro de cetiltrimetilamonio por lo que crecen en este medio y toman una coloración entre crema a verde o azul dependiendo de la tasa de producción de pigmentos (Scales, et al., 2014). De estas cepas, se sospecha que aquellas con pigmentación verde o azul corresponden a *Pseudomonas aeruginosa* ya que el Agar Cetrimida posee cloruro de magnesio y sulfato de potasio, las cuales son sales catiónicas que actúan como activadores

y coactivadores de la producción de sideróforos y así intensificar la fluorescencia emitida por esta especie (Corry, et al., 2011).

Mediante el método de siembra de diluciones seriadas por extensión en placa, se obtuvieron distintas morfologías de colonias bacterianas. De estas, se identificó 43 morfologías diferentes, con diferentes pigmentaciones lo cual sugiere que cada una de ellas se trata de una cepa distinta (Figura 1).

8.2. Caracterización de microorganismos

Una vez transferidas las 43 cepas aisladas al medio *Pseudomonas* F, se realizó las respectivas pruebas de caracterización preliminares. Se confirmó que las 43 cepas son bacilos Gram negativos, oxidasa positivo y fluorescencia UV positivo. Por lo tanto, las cepas aisladas si corresponden al género *Pseudomonas* spp. ya que, como la literatura indica, estas son las características de los microorganismos del género (Scales, et al., 2014).

8.2.1. Confirmación de la actividad solubilizadora de nutrientes

La solubilización de nutrientes, específicamente de calcio y fósforo, es un mecanismo importante para la promoción del crecimiento de las plantas ya que la deficiencia de estos dos elementos, limita el desarrollo de las mismas (Kumar, 2016). Por esta razón, es importante comprobar cuales cepas poseen esta característica para determinar aquellas que pueden ser potenciales candidatos de estimulantes de crecimiento.

Todos los aislados de *Pseudomonas* spp., obtenidos a partir de las muestras de suelo, compost y raíces de rosa, se examinaron para determinar la actividad solubilizadora de calcio usando el Agar TCP. Se reporta en la literatura que este medio de cultivo, desarrollado por el NBRI, National Botanical Research Institute, es eficiente para realizar un screening de microorganismos solubilizadores ya que contiene fosfato tricálcico como fuente única de fósforo y calcio (Nautiyal, 1999). El fosfato tricálcico es insoluble, por lo tanto, el calcio y el

fósforo no están disponibles para ser asimilados fácilmente por los microorganismos (Katiyar y Goel, 2003). De esta manera, únicamente aquellas cepas que poseen los mecanismo de solubilización de calcio y fósforo van a poder degradar el fosfato tricálcico y de esta manera crecer formando un halo transparente alrededor de las colonias (Nautiyal, 1999).

De las 43 cepas aisladas anteriormente, se identificó 8 cepas que formaron una zona clara bien marcada alrededor de las colonias (Figura 2). Estos aislados corresponden 6 a las muestras de compost (M1, M2, M3, M10, M14, M15) y 2 a las muestras de suelo (S6 y S8). No se obtuvieron aislados con actividad solubilizadora de calcio tanto de las muestras de endófitos de raíz como de las muestras de rizósfera.

Estas 8 cepas se cultivaron en medio TCP líquido y se midió el contenido de calcio total en el caldo después de 5 días de incubación (Figura 3). Comparando los resultados obtenidos en las dos mediciones realizadas, se determinó que las 4 cepas con actividad solubilizadora de calcio son M10, M15, S6 y S8.

8.2.2. Identificación de cepas

Para la identificación de cepas, existen distintas alternativas como es, principalmente, un análisis a nivel bioquímico o un análisis a nivel molecular. Si bien los análisis moleculares, como por ejemplo análisis 16S, permiten la búsqueda de un carácter específico para la identificación de una cepa; los análisis bioquímicos, como las galerías API, presentan la ventaja que, al comprender una serie de pruebas bioquímicas, se está abarcando una mayor parte del genoma en un menor periodo de tiempo (Bosshard, et al., 2006).

Con las 4 cepas seleccionadas para el ensayo de co-cultivo, se realizó una batería bioquímica API 20E y se determinó a que especie corresponde cada una de las cepas. A pesar de que existió diferencia en el perfil de cada una de las cepas, se determinó que todas

corresponden a *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 1). En los 4 casos se obtuvo una muy buena identificación con un porcentaje de identidad mayor a 99%.

Si bien el agar Cetrimida es empleado para el aislamiento de especies del género *Pseudomonas* en general, posee una mayor afinidad hacia la especie *P. aeruginosa* ya que inhibe el crecimiento también de bacterias Gram negativas, entre ellas ciertas especies de *Pseudomonas*, debido a su alta concentración de bromuro de cetriltrimetilamonio (Yilmaz, 2017). Sin embargo, a pesar de la extrema selectividad del medio, se ha reportado el aislamiento de *P. putida* y *P. fluorescens* empleando este medio de cultivo con concentraciones menores del agente selectivo (Scales, et al., 2014).

Comparando una a una las diferentes pruebas bioquímicas presentes en la galería API 20E, se observó una mayor similitud de las cepas S6 y S8 entre sí, difiriendo únicamente en la prueba de la gelatinasa. Esto indica que quizás, a pesar de haber presentado previamente una morfología y actividad solubilizadora distinta, se trata la misma cepa y no tenían que ser seleccionadas como dos cepas diferentes. Sin embargo, para afirmar esto es necesario realizar posteriormente un ensayo de clonalidad el cual consiste en identificar aquellos individuos que son clones ya que pueden distinguirse en fenotipo pero no en el genotipo (Spratt, 2004). Dos alternativas para identificar si se trata del mismo microorganismo son análisis MLST y BOX-PCR. El análisis multilocus sequence typing, o MLST, consiste en la caracterización de un aislado mediante el secuenciamiento de fragmentos internos de múltiples genes del tipo *housekeeping* (Maiden, et al., 1998). Por el otro lado, el BOX-PCR consiste en un análisis fingerprinting del genoma bacteriano mediante el uso de secuencias repetitivas conocidas como BOX (Bruseti, et al., 2008). De esta manera, con cualquiera de los dos análisis se obtiene el perfil de un aislado y se lo puede comparar con el del aislado con el que se cree que pueden ser clones entre sí.

8.3. Ensayo de co-cultivo

El crecimiento de la raíz se encuentra directamente afectado por las condiciones medioambientales en las cuales se desarrolle la planta ya que esta comprende el canal para el paso de nutrientes y agua desde el suelo hacia la planta (Monshausen, 2011). De esta manera, una raíz saludable se traduce en una planta saludable.

El diseño experimental de los ensayos de co-cultivo consistió en el análisis del desempeño de cada una de las cepas seleccionadas anteriormente en 3 condiciones diferentes de disponibilidad de nutrientes:

- 1) Calcio y fósforo solubles
- 2) Calcio insoluble y fósforo soluble
- 3) Calcio y fósforo insolubles

El objetivo es evaluar la capacidad de estimular el crecimiento de la planta tanto en condiciones favorables como en condiciones poco favorables con nutrientes insolubles (Tabla 2).

En cuanto al análisis de peso seco, los resultados demuestran que existe una diferencia significativa entre las rosetas obtenidas al emplear la cepa S6 y S8 al comparar con las rosetas obtenidas al emplear las cepas M10 y M15 en los 3 medios de cultivo empleados (Figura 5 y 6). Al comparar estos resultados con el control, se observa que el tamaño de las plantas se ve más afectado en el medio con calcio y fósforo insoluble por lo que se puede asumir que los microorganismos M10 y M15 no son capaces de disponibilizar los nutrientes en la cantidad necesaria. En los otros dos medios, el peso promedio de las plantas control es similar a las plantas inoculadas con M10 y M15. En cuanto a las cepas S6 y S8 el tamaño promedio se mantuvo de igual manera en los 3 medios. Por el otro lado, al comparar el fenotipo de las plantas correspondientes a cada tratamiento, las cepas M10 y M15 ayudaron a la formación de la roseta en los 3 medios mientras que las cepas S6 y S8 disminuyeron el crecimiento de la planta y la mataron en alguno de los casos (Figura 6). Para corroborar de manera estadística

los resultados anteriores, se realizó un ANOVA de un factor. El análisis de varianza y la diferencia de medias para cada uno de los medios de cultivo indican que las medias de las plantas con S6 y S8 son estadísticamente iguales para los 3 medios, mientras que las plantas con M10 y M15 también lo son en el medio $\frac{1}{2}$ MS tradicional y $\frac{1}{2}$ MS con calcio y fósforo insoluble (Figuras 5).

En cuanto al análisis de tamaño de raíz se evaluó el tamaño final de la raíz principal al momento de la cosecha de la raíz durante el tiempo de incubación. En primer lugar, se obtuvo un mayor tamaño de la raíz principal para las plantas inoculadas con M10 y M15, en comparación con las plantas inoculadas con S6 y S8 para los 3 medios de cultivo (Figura 7 y 8). En este caso, al comparar el fenotipo obtenido de las raíces, se obtuvieron los resultados esperados: raíces largas y finas en las plantas control, mientras que raíces cortas y gruesas en las plantas con microorganismos benéficos (Figura 7). Esto ocurre ya que, a pesar de la posible solubilización de nutrientes, los microorganismos producen metabolitos secundarios que funcionan como factores de crecimiento para las plantas (Kumar, 2016). En este caso, se puede determinar la producción de auxinas por parte de las cepas M10 y M15 ya, como se observa en la Figura 12, que este tipo de fitohormonas inhibe la elongación de la raíz y promueve la formación de raíces secundarias o adventicias (Pierik, 1997).

En cuanto al ANOVA, para los 3 tratamientos se estableció 3 grupos con diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 8). Tanto para el medio con calcio insoluble como para el medio con calcio y fósforo insoluble, las cepas M10 y M15 producen plantas con raíces de similar tamaño. Para el medio de cultivo control, se observa que la cepa M10 estimula el crecimiento de raíz de manera similar al tratamiento sin microorganismo. Específicamente, al comparar los tratamiento para las cepas M10 y M15 con el control, se observa una

disminución proporcional en el tamaño de raíz conforme disminuye la disponibilidad de nutrientes solubles (Figura 8).

Con los resultados detallados anteriormente, se evidencia que el ensayo de co-cultivo no permitió comprobar que los microorganismos efectivamente están solubilizando los nutrientes ya que no se evidencia la promoción del crecimiento como se esperaba. En cuanto a las cepas M10 y M15, a partir del análisis estadístico se observa que no existe una diferencia significativa en comparación con el control tanto para el análisis de peso seco como para el análisis de tamaño de raíz. Sin embargo, al existir un el cambio fenotípico en las plantas causado por parte de los microorganismos se puede determinar que existe algún efecto en el desarrollo de las mismas dado por la acción de las cepas M10 y M15. De todas maneras, no se puede afirmar nada ya que este fenotipo fue evaluado únicamente de manera visual analizando la planta de manera completa y no por separado el brote y la raíz para observar diferencias entre los mismos. Además, para confirmar que el efecto en el fenotipo, mencionado anteriormente, ocurre efectivamente por la acción de estos microorganismos, es necesario aumentar el número de controles en el ensayo para así confirmar que no es un efecto secundario de la falta de nutrientes esenciales para el desarrollo en el medio $\frac{1}{2}$ MS.

Cabe recalcar que este fenotipo de raíces cortas y gruesas, inducido por estas cepas, representa un beneficio biológico para la especie ya que las vuelve menos débiles ya que permite una mayor absorción de agua en suelos más áridos y por ende resistir a sequías (Barboza, et al., 2015).

Por el otro lado, se observó que la presencia de cepas antagónicas, como S6 y S8, afectaron el desarrollo de la planta ya que causaron heridas y finalmente su muerte. Si bien se ha reportado cepas de *P. aeruginosa* promotoras de crecimiento vegetal, también existen

variantes de la misma especie que son patógenos y causan necrosis en los tejidos una vez infectada la planta (Silby, et al., 2011).

Finalmente, en cuanto a la selección de cepas solubilizadoras de calcio y fosfato, no se obtuvieron los resultados esperados para *A. thaliana*, específicamente, porque quizás estos compuestos no nutrientes limitantes para su desarrollo *in-vitro*. Por esta razón, no fue posible evidenciar que la deficiencia de calcio afecte directamente al desarrollo de la planta.

9. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo Agar Cetrimida permite el aislamiento de microorganismos del género *Pseudomonas*.
- La medición de calcio mediante el equipo Horiba LAQUAtwin es más exacta a concentraciones más bajas de calcio que a concentraciones más altas en comparación con la medición de calcio estándar mediante ICP-OES.
- Las cepas con mayor actividad solubilizadora de calcio son M10, M15, S6 y S8.
- El método de cultivo *in-vitro* vertical permite el correcto desarrollo de la raíz y la roseta de *A. thaliana* para posteriormente analizar determinar el patrón crecimiento de la planta de manera no invasiva.
- Las cepas S6 y S8 son clones y posibles variantes de *P. aeruginosa* patógena para *A. thaliana* ya que causaron la muerte de los *seedlings*.
- Las cepas M10 y M15, al ser evaluadas en medio con calcio y fósforo insoluble, mostraron decrecimiento en el tamaño de raíz de los *seedlings* en comparación con el control.
- El ensayo de co-cultivo *in-vitro* no permitió comprobar que la actividad solubilizadora de nutrientes de las cepas de *Pseudomonas* es la causa de la estimulación de crecimiento de *A. thaliana*.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda repetir el ensayo con todas las cepas para evidenciar los diferentes efectos de promoción de crecimiento que pueden existir.
- Previo a los ensayos de co-cultivo, realizar análisis de clonalidad de las cepas para identificar posibles repeticiones.
- En los ensayos de co-cultivo, añadir un control que consista en el microorganismo en un medio completo de nutrientes para así evaluar si el efecto adverso en el crecimiento se debe a la falta de nutrientes o en sí a la actividad del microorganismo.
- Replicar los ensayos en un cultivo más demandante de calcio y fósforo para evidenciar el efecto de los microorganismos solubilizadores de nutrientes.
- Realizar análisis de peso seco de brote y peso seco de raíz por separado para así encontrar diferencias en el crecimiento de la planta.
- Una vez identificados los microorganismos solubilizadores, extrapolar el análisis a cultivos de interés económico cuya producción es elevada como es el caso de rosas, banano, brócoli, etc.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar, M. S., y Siddiqui, Z. A. (2010). Role of plant growth promoting rhizobacteria in biocontrol of plant diseases and sustainable agriculture. In *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 157-195). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Alexandre, G. (2017). *Azospirillum brasilense*, a Beneficial Soil Bacterium: Isolation and Cultivation. *Current protocols in microbiology*, 47(1), 3E-1.
- Al-Shehbaz, I. A., y O'Kane Jr, S. L. (2002). Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, 1.
- Amato, S., Vanik, J., y Kocka, F. E. (1980). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* with the API-20E system. *Canadian journal of microbiology*, 26(4), 554-555.
- Arend, D., Lange, M., Pape, J. M., Weigelt-Fischer, K., Arana-Ceballos, F., Mücke, I., ... y Junker, A. (2016). Quantitative monitoring of *Arabidopsis thaliana* growth and development using high-throughput plant phenotyping. *Scientific data*, 3, 160055.
- Barboza-Barquero, L., Nagel, K. A., Jansen, M., Klasen, J. R., Kastenholz, B., Braun, S., ... y Fiorani, F. (2015). Phenotype of *Arabidopsis thaliana* semi-dwarfs with deep roots and high growth rates under water-limiting conditions is independent of the GA5 loss-of-function alleles. *Annals of botany*, 116(3), 321-331.
- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., y Pantoja, O. (2014). Growing *Arabidopsis in vitro*: cell suspensions, in vitro culture, and regeneration. In *Arabidopsis Protocols* (pp. 53-62). Humana Press, Totowa, NJ.
- Bashan, Y. y de-Bashan, L. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacteria *Azospirillum* Promotes Plant Growth. *Advances in Agronomy*, 108: 77-122.

- Bosshard, P. P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M., y Böttger, E. C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 44(4), 1359-1366.
- Brusetti, L., Malkhazova, I., Gtari, M., Tamagnini, I., Borin, S., Merabishvili, M., ... y Daffonchio, D. (2008). Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BMC microbiology*, 8(1), 220.
- Creanga, D., Poiata, A., Fifere, N., Airinei, A., y Nadejde, C. (2011). Fluorescence of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas* under the effect of iron oxide nanoparticles. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(4), 6337.
- Corry, J. E., Curtis, G. D., y Baird, R. M. (Eds.). (2011). *Handbook of culture media for food and water microbiology*. Royal Society of Chemistry.
- De Diego, N., Fürst, T., Humplík, J. F., Ugena, L., Podlešáková, K., y Spíchal, L. (2017). An automated method for high-throughput screening of *Arabidopsis* rosette growth in multi-well plates and its validation in stress conditions. *Frontiers in plant science*, 8, 1702.
- He, Y., Wu, J., Lv, B., Li, J., Gao, Z., Xu, W., ... y Zhang, J. (2015). Involvement of 14-3-3 protein GRF9 in root growth and response under polyethylene glycol-induced water stress. *Journal of experimental botany*, 66(8), 2271-2281.
- Katiyar, V., y Goel, R. (2003). Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiological research*, 158(2), 163-168.

- Khan, M. S., Zaidi, A., y Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- Kumar, R., y Shastri, B. (2017). Role of Phosphate-Solubilising Microorganisms in Sustainable Agricultural Development. In *Agro-Environmental Sustainability* (pp. 271-303). Springer, Cham.
- Kumar, V. V. (2016). Plant growth-promoting microorganisms: interaction with plants and soil. In *Plant, soil and microbes* (pp. 1-16). Springer, Cham.
- Lowbury, E. J. L., y Collins, A. G. (1955). The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas pyocyanea*. *Journal of clinical pathology*, 8(1), 47.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., ... y Feavers, I. M. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140-3145.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
- Monshausen, G. B., Miller, N. D., Murphy, A. S., y Gilroy, S. (2011). Dynamics of auxin-dependent Ca^{2+} and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *The Plant Journal*, 65(2), 309-318.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.

- Otieno, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., y Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6, 745.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer science y business media.
- Rodríguez, H., y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- Salama, A. (2006). *Use of Microorganisms as Biofertilizers for Some Plants*. Tesis de maestría. Universidad de Zagazig. Zagazig, Egipto.
- Savci, S. (2012). Investigation of Effect of Chemical Fertilizers on Environment. *APCBEE Procedia*, 1: 287-292.
- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., y Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 927-948.
- Sharma, R., Pal, J., y Kaur, M. (2017). Isolation of phosphate solubilizing *Pseudomonas* strains from apple rhizosphere in the Trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India. *BioRxiv*, 193672.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., y Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.
- Sigma-Aldrich. (2013). *22470 Cetrimide Agar (Pseudomonas Selective Agar Base)*. Product Information. RyD. Missouri, Estados Unidos.

- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., y Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680.
- Spratt, B. G. (2004). Exploring the concept of clonality in bacteria. In *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology* (pp. 323-352). Humana Press.
- Wagner, S. C. (2011) *Biological Nitrogen Fixation*. Nature Education Knowledge, 3(10):15.
- Xu, W., Ding, G., Yokawa, K., Baluška, F., Li, Q. F., Liu, Y., ... y Zhang, J. (2013). An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, 3, 1273.
- Yao, J., Withers, J., y He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* infection assays in *Arabidopsis*. In *Jasmonate Signaling* (pp. 63-81). Humana Press, Totowa, NJ.
- Yasmin, H., y Bano, A. (2011). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock. *Pak. J. Bot*, 43(3), 1663-1668.
- Yilmaz, A. G. (2017). Development of a New *Pseudomonas* Agar Medium Containing Benzalkonium Chloride in Cetrimide Agar. *Food and Nutrition*, 8, 367-378.

12. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de medición de calcio mediante ICP-OES

| Código de la muestra | Disponibilidad de Ca (mg/L) | |
|----------------------|-----------------------------|---------------------|
| | Promedio | Desviación estándar |
| M1 A | 319,62 | 4,38 |
| M1 B | 676,86 | 6,73 |
| M1 C | 249,31 | 2,43 |
| M2 A | 197,27 | 4,96 |
| M2 B | 163,29 | 4,17 |
| M2 C | 322,78 | 6,07 |
| M3 A | 263,18 | 2,19 |
| M3 B | 206,05 | 3,70 |
| M3 C | 206,97 | 1,55 |
| M10 A | 650,25 | 5,25 |
| M10 B | 460,15 | 4,10 |
| M10 C | 282,40 | 8,01 |
| M14 A | 249,52 | 4,68 |
| M14 B | 422,16 | 2,64 |
| M14 C | 266,88 | 0,77 |
| M15 A | 287,58 | 10,91 |
| M15 B | 289,75 | 1,70 |
| M15 C | 414,28 | 5,21 |
| S2 A | 195,07 | 3,80 |
| S2 B | 121,41 | 4,07 |
| S2 C | 131,65 | 0,22 |
| S6 A | 210,71 | 2,75 |
| S6 B | 254,75 | 1,66 |
| S6 C | 793,08 | 7,69 |
| S8 A | 232,71 | 1,92 |
| S8 B | 278,01 | 4,50 |
| S8 C | 265,37 | 5,57 |
| CA A | 26,86 | 0,67 |
| CA B | 17,48 | 0,13 |
| CA C | 108,92 | 2,15 |

Anexo 2. Resultados de medición de calcio usando el equipo LAQUAtwin Ca²⁺

| Código de la muestra | Disponibilidad de Ca |
|----------------------|----------------------|
| | (mg/L) |
| M1 A | 440 |
| M1 B | 570 |
| M1 C | 530 |
| M2 A | 410 |
| M2 B | 270 |
| M2 C | 440 |
| M3 A | 450 |
| M3 B | 400 |
| M3 C | 310 |
| M10 A | 650 |
| M10 B | 850 |
| M10 C | 560 |
| M14 A | 430 |
| M14 B | 470 |
| M14 C | 300 |
| M15 A | 590 |
| M15 B | 520 |
| M15 C | 710 |
| S2 A | 330 |
| S2 B | 190 |
| S2 C | 230 |
| S6 A | 440 |
| S6 B | 540 |
| S6 C | 1300 |
| S8 A | 590 |
| S8 B | 620 |
| S8 C | 520 |
| CA A | 48 |
| CA B | 30 |
| CA C | 40 |

Anexo 3. Datos de peso seco final de los *seedlings* por tratamiento

| Tratamiento | Medio | Muestra | Peso del seedling (g) | | Tamaño raíz (cm) | |
|--------------|--------|---------|-----------------------|--------------|------------------|----------------|
| | | | Inicial (húmedo) | Final (Seco) | Inicial (día 0) | Final (día 12) |
| Sin bacteria | 1/2 MS | 1 | 0.0139 | 0.0009 | 3 | 5.4 |
| | | 2 | 0.0598 | 0.0016 | 3.6 | 9.5 |
| | | 3 | 0.141 | 0.0081 | 3.1 | 9.2 |
| | | 4 | 0.1485 | 0.0099 | 3 | 8.4 |
| | | 5 | 0.0468 | 0.0058 | 2.9 | 6.1 |
| | | 6 | 0.0045 | 0.0007 | 3.2 | 4.4 |
| | | 7 | 0.1514 | 0.0101 | 2.5 | 8.1 |
| | | 8 | 0.1651 | 0.0098 | 2.9 | 8.9 |
| | | 9 | 0.0484 | 0.0023 | 3.1 | 8.5 |
| | | 10 | 0.112 | 0.0084 | 3.6 | 8.3 |
| | | 11 | 0.0393 | 0.0023 | 1.4 | 5.8 |

| | | | | | | |
|----|---------------------------------|--------|---------|--------|-----|-----|
| | | 12 | 0.1818 | 0.0112 | 2 | 8.7 |
| | | 13 | 0.025 | 0.0025 | 2.8 | 9.3 |
| | | 14 | 0.0099 | 0.0005 | 3.1 | 3.9 |
| | | 15 | 0.3518 | 0.0198 | 3.2 | 8 |
| | | 16 | 0.0628 | 0.0045 | 3.1 | 6.2 |
| | | 17 | 0.0107 | 0.002 | 2.8 | 3.9 |
| | | 18 | 0.0701 | 0.0047 | 3.3 | 8.8 |
| | | 19 | 0.0477 | 0.0034 | 2.6 | 7.9 |
| | | 20 | 0.038 | 0.0031 | 3.3 | 8.6 |
| | | 21 | 0.2617 | 0.0136 | 3.2 | 8.4 |
| | | 22 | 0.0534 | 0.003 | 2.6 | 8.6 |
| | | 23 | 0.0799 | 0.0052 | 2 | 9.3 |
| | | 24 | 0.1088 | 0.0065 | 2.4 | 8.4 |
| | | 25 | 0.055 | 0.0041 | 1.9 | 5 |
| | 1/2 MS + Ca insoluble | 26 | 0.0447 | 0.003 | 2.6 | 8.3 |
| | | 27 | 0.0209 | 0.0012 | 1.9 | 6.5 |
| | | 28 | 0.0542 | 0.0045 | 1.8 | 9.6 |
| | | 29 | 0.098 | 0.007 | 2.5 | 9.2 |
| | | 30 | 0.0827 | 0.0055 | 1.8 | 8.1 |
| | | 31 | 0.0266 | 0.0025 | 2.2 | 8.3 |
| | | 32 | 0.1842 | 0.0112 | 1.9 | 8.6 |
| | | 33 | 0.0887 | 0.0049 | 1.8 | 5.5 |
| | | 34 | 0.1298 | 0.007 | 1.9 | 9.1 |
| | | 35 | 0.0903 | 0.0066 | 1.6 | 8.6 |
| | | 36 | 0.0076 | 0.0014 | 1.5 | 3 |
| | | 37 | 0.045 | 0.0046 | 2.1 | 5.2 |
| | | 38 | 0.0103 | 0.0008 | 3 | 4 |
| | | 39 | 0.1481 | 0.0091 | 3.4 | 9.4 |
| | | 40 | 0.0993 | 0.0071 | 2.7 | 8.9 |
| | | 41 | 0.0319 | 0.0074 | 2.6 | 4.1 |
| | | 42 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 43 | 0.0104 | 0.0009 | 1.5 | 1.5 |
| | | 44 | 0.1114 | 0.0076 | 2.8 | 9.3 |
| | | 45 | 0.0881 | 0.0048 | 3.1 | 8.8 |
| | 46 | 0.0135 | 0.0022 | 3.3 | 4.9 | |
| | 47 | 0.0335 | 0.0044 | 2.9 | 4 | |
| | 48 | 0.0443 | 0.0042 | 1.7 | 5.3 | |
| | 49 | 0.0336 | 0.0041 | 2.7 | 4.4 | |
| | 50 | 0.0089 | 0.0022 | 3.2 | 3.5 | |
| | 1/2 MS + Ca y P insoluble | 51 | 0.2621 | 0.0143 | 2.6 | 7.1 |
| | | 52 | 0.0873 | 0.0043 | 2.7 | 5.9 |
| | | 53 | 0.01601 | 0.0076 | 1.8 | 9.1 |
| | | 54 | 0.143 | 0.008 | 2.6 | 7.1 |
| | | 55 | 0.011 | 0.0015 | 3 | 3.2 |
| | | 56 | 0.1074 | 0.0071 | 2.5 | 7.6 |
| | | 57 | 0.2551 | 0.0077 | 1.9 | 7.3 |
| | | 58 | 0.1388 | 0.0067 | 2.4 | 6.1 |
| | | 59 | 0.3035 | 0.0077 | 1.4 | 7.2 |
| | | 60 | 0.1575 | 0.008 | 2.6 | 7.9 |
| | | 61 | 0.2489 | 0.0132 | 2.1 | 8.9 |
| | | 62 | 0.0318 | 0.0022 | 2.8 | 8.4 |
| | | 63 | 0.0503 | 0.0031 | 1.9 | 8.2 |
| | | 64 | 0.288 | 0.0116 | 2.2 | 8.3 |
| | | 65 | 0.0001 | 0 | 2.5 | 2.5 |
| | | 66 | 0.0837 | 0.0058 | 3.2 | 7.8 |
| | | 67 | 0.0713 | 0.0049 | 3 | 7.1 |
| | | 68 | 0.0836 | 0.0048 | 2.2 | 8.6 |
| | | 69 | 0.0465 | 0.0032 | 2.1 | 6.9 |
| | | 70 | 0.1818 | 0.0109 | 1.8 | 7.9 |
| | | 71 | 0.0599 | 0.0059 | 3.3 | 8.9 |
| | | 72 | 0.1382 | 0.0082 | 3 | 9.5 |
| | | 73 | 0.0978 | 0.0063 | 3.2 | 9.9 |
| | | 74 | 0.1452 | 0.011 | 3.3 | 9.2 |
| | | 75 | 0.106 | 0.009 | 2.9 | 8.3 |
| S6 | 1/2 MS | 1 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 2 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 3 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 4 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 5 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 6 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 7 | 0.0001 | 0 | 1.9 | 1.9 |

| | | | | | | |
|----|---------------------------------|----|--------|--------|-----|-----|
| | | 8 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 9 | 0.0001 | 0 | 2 | 2 |
| | | 10 | 0.014 | 0.0029 | 1.5 | 2 |
| | | 11 | 0.0001 | 0 | 2.5 | 2.5 |
| | | 12 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 13 | 0.0163 | 0.0033 | 2.9 | 3.2 |
| | | 14 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 15 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 16 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 17 | 0.0001 | 0 | 2.7 | 2.7 |
| | | 18 | 0.0001 | 0 | 1.9 | 1.9 |
| | | 19 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 20 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 21 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 22 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 23 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 24 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 25 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | 1/2 MS + Ca insoluble | 26 | 0.0087 | 0.002 | 2.2 | 2.5 |
| | | 27 | 0.0001 | 0 | 1 | 1 |
| | | 28 | 0.0001 | 0 | 2.1 | 2.1 |
| | | 29 | 0.0001 | 0 | 2.4 | 2.4 |
| | | 30 | 0.0063 | 0.002 | 2.6 | 3 |
| | | 31 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 32 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 33 | 0.0001 | 0 | 2.7 | 2.7 |
| | | 34 | 0.0001 | 0 | 3.4 | 3.4 |
| | | 35 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 36 | 0.0001 | 0 | 1.2 | 1.2 |
| | | 37 | 0.0001 | 0 | 1.5 | 1.5 |
| | | 38 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 39 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 40 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 41 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 42 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |
| | | 43 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |
| | | 44 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 45 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 46 | 0.0042 | 0.0013 | 2.7 | 2.8 |
| | | 47 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 48 | 0.0001 | 0 | 2.3 | 2.3 |
| | | 49 | 0.0001 | 0 | 2.4 | 2.4 |
| | | 50 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | 1/2 MS + Ca y P insoluble | 51 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 52 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 53 | 0.0001 | 0 | 1.4 | 1.4 |
| | | 54 | 0.0001 | 0 | 1.8 | 1.8 |
| | | 55 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 56 | 0.0001 | 0 | 3.5 | 3.5 |
| | | 57 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 58 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 59 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 60 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 61 | 0.0001 | 0 | 3.4 | 3.4 |
| | | 62 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 63 | 0.0001 | 0 | 1.7 | 1.7 |
| | | 64 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |
| | | 65 | 0.0001 | 0 | 1.8 | 1.8 |
| | | 66 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 67 | 0.0001 | 0 | 2.1 | 2.1 |
| | | 68 | 0.0001 | 0 | 2.5 | 2.5 |
| | | 69 | 0.0125 | 0.0021 | 2.4 | 2.6 |
| | | 70 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 71 | 0.0068 | 0.0032 | 2 | 3.6 |
| | | 72 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 73 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 74 | 0.0001 | 0 | 2.3 | 2.3 |
| | | 75 | 0.0001 | 0 | 1.9 | 1.9 |
| S8 | 1/2 MS | 1 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 2 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 3 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |

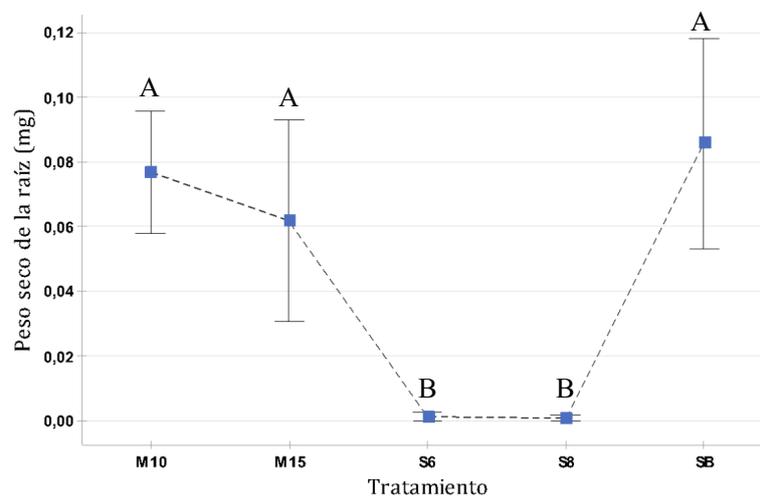
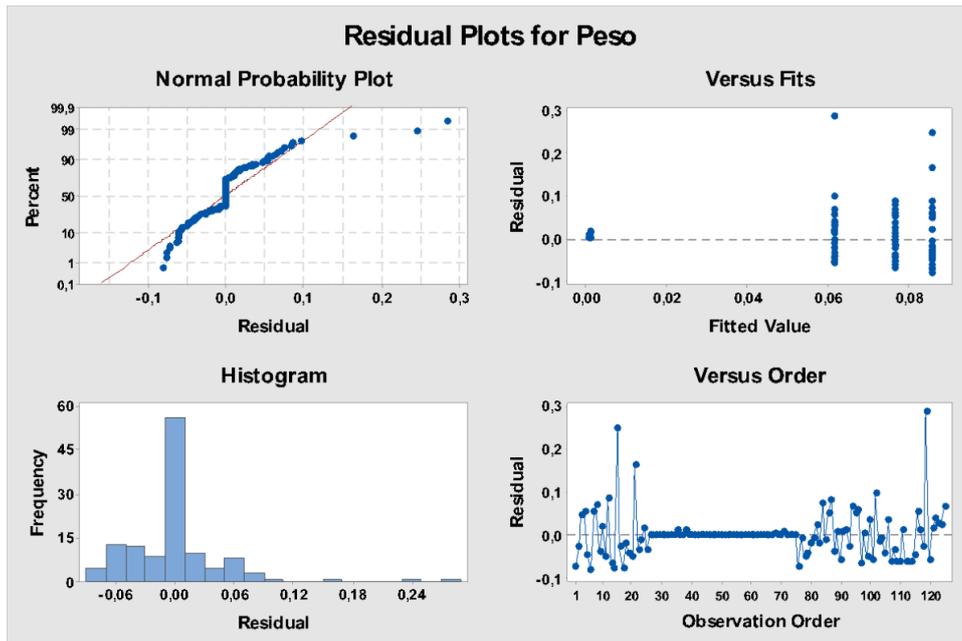
| | | | | | | |
|--|---------------------------------|----|--------|--------|-----|-----|
| | | 4 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |
| | | 5 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 6 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 7 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 8 | 0.0001 | 0 | 1.9 | 1.9 |
| | | 9 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 10 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 11 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 12 | 0.0001 | 0 | 2.7 | 2.7 |
| | | 13 | 0.0001 | 0 | 2.1 | 2.1 |
| | | 14 | 0.0001 | 0 | 2.5 | 2.5 |
| | | 15 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 16 | 0.0001 | 0 | 2 | 2 |
| | | 17 | 0.0001 | 0 | 2.5 | 2.5 |
| | | 18 | 0.0078 | 0.0015 | 2.6 | 2.8 |
| | | 19 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 20 | 0.0001 | 0 | 3.4 | 3.4 |
| | | 21 | 0.0084 | 0.0017 | 3.2 | 3.6 |
| | | 22 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 23 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 24 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 25 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | 1/2 MS + Ca insoluble | 26 | 0.0001 | 0 | 1.9 | 1.9 |
| | | 27 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |
| | | 28 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 29 | 0.0001 | 0 | 3.5 | 3.5 |
| | | 30 | 0.0001 | 0 | 2.4 | 2.4 |
| | | 31 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 32 | 0.0001 | 0 | 3.4 | 3.4 |
| | | 33 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |
| | | 34 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 35 | 0.003 | 0.0011 | 2.3 | 2.3 |
| | | 36 | 0.0001 | 0 | 1.9 | 1.9 |
| | | 37 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 38 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 39 | 0.0001 | 0 | 1.8 | 1.8 |
| | | 40 | 0.0001 | 0 | 2.5 | 2.5 |
| | | 41 | 0.0062 | 0.0013 | 3.5 | 3.5 |
| | | 42 | 0.003 | 0.0009 | 2.7 | 2.7 |
| | | 43 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 44 | 0.0057 | 0.0011 | 3.3 | 3.3 |
| | | 45 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 46 | 0.0001 | 0 | 2.3 | 2.3 |
| | | 47 | 0.0064 | 0.001 | 3.1 | 3.1 |
| | | 48 | 0.0001 | 0 | 2.7 | 2.7 |
| | | 49 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 50 | 0.0065 | 0.0015 | 3.1 | 3.1 |
| | 1/2 MS + Ca y P insoluble | 51 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |
| | | 52 | 0.0001 | 0 | 2.7 | 2.7 |
| | | 53 | 0.0001 | 0 | 2.4 | 2.4 |
| | | 54 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 55 | 0.0001 | 0 | 3.7 | 3.7 |
| | | 56 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | 57 | 0.0001 | 0 | 3.7 | 3.7 |
| | | 58 | 0.0001 | 0 | 2.1 | 2.1 |
| | | 59 | 0.0001 | 0 | 1.9 | 1.9 |
| | | 60 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 61 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | 62 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 |
| | | 63 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 64 | 0.0001 | 0 | 2.5 | 2.5 |
| | | 65 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 |
| | | 66 | 0.0001 | 0 | 1.7 | 1.7 |
| | | 67 | 0.0001 | 0 | 3.1 | 3.1 |
| | | 68 | 0.0001 | 0 | 3.5 | 3.5 |
| | | 69 | 0.0001 | 0 | 1.5 | 1.5 |
| | | 70 | 0.0001 | 0 | 2.3 | 2.3 |
| | | 71 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 72 | 0.0001 | 0 | 2.7 | 2.7 |
| | | 73 | 0.0001 | 0 | 2.6 | 2.6 |
| | | 74 | 0.0001 | 0 | 3.5 | 3.5 |

| | | | | | | |
|-----|---------------------------|--------|--------|--------|-----|-----|
| M10 | 1/2 MS | 75 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | | 1 | 0.0044 | 0.0004 | 3.4 | 3.6 |
| | | 2 | 0.0752 | 0.0061 | 3.3 | 8.2 |
| | | 3 | 0.0292 | 0.0026 | 1.5 | 5.7 |
| | | 4 | 0.0367 | 0.0029 | 2.6 | 5.5 |
| | | 5 | 0.0622 | 0.0052 | 2.4 | 7.7 |
| | | 6 | 0.0747 | 0.0052 | 2.3 | 8.1 |
| | | 7 | 0.1057 | 0.007 | 2.9 | 9 |
| | | 8 | 0.0633 | 0.0044 | 2.8 | 9.3 |
| | | 9 | 0.161 | 0.0096 | 3.5 | 8.9 |
| | | 10 | 0.0724 | 0.0055 | 2.3 | 7.8 |
| | | 11 | 0.1342 | 0.0085 | 3.2 | 6.8 |
| | | 12 | 0.1708 | 0.0114 | 3.3 | 8 |
| | | 13 | 0.0401 | 0.0026 | 3.1 | 6.3 |
| | | 14 | 0.0917 | 0.0068 | 2 | 6.3 |
| | | 15 | 0.021 | 0.0018 | 3.2 | 4.7 |
| | | 16 | 0.0917 | 0.0061 | 3.3 | 7.6 |
| | | 17 | 0.093 | 0.0064 | 3.4 | 8 |
| | | 18 | 0.0546 | 0.004 | 3.2 | 8.4 |
| | | 19 | 0.1514 | 0.0096 | 3.2 | 8.6 |
| | | 20 | 0.137 | 0.0086 | 2.9 | 7.8 |
| | | 21 | 0.1462 | 0.0108 | 2.4 | 7.7 |
| | | 22 | 0.0123 | 0.0009 | 3.7 | 8.6 |
| | | 23 | 0.0865 | 0.0061 | 2.8 | 8.7 |
| | | 24 | 0.0292 | 0.0022 | 1.3 | 5.4 |
| | 25 | 0.1177 | 0.0079 | 2.5 | 7.8 | |
| | 26 | 0.0718 | 0.0083 | 1.9 | 5.7 | |
| | 27 | 0.0591 | 0.0069 | 3.2 | 5 | |
| | 28 | 0.04 | 0.0048 | 3.5 | 4.3 | |
| | 29 | 0.0279 | 0.0029 | 2.9 | 4.2 | |
| | 30 | 0.04 | 0.0062 | 1.5 | 2 | |
| | 31 | 0.0501 | 0.0049 | 2.8 | 7.6 | |
| | 32 | 0.0001 | 0 | 3 | 3 | |
| | 33 | 0.0068 | 0.0009 | 3.8 | 4 | |
| | 34 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 | |
| | 35 | 0.022 | 0.0027 | 3.5 | 4.9 | |
| | 36 | 0.03 | 0.0025 | 1.6 | 2 | |
| | 37 | 0.054 | 0.0033 | 3 | 5.2 | |
| | 38 | 0.0271 | 0.002 | 1.3 | 3.1 | |
| | 39 | 0.0962 | 0.0062 | 3.4 | 8.8 | |
| | 40 | 0.095 | 0.0064 | 2.6 | 8 | |
| | 41 | 0.0072 | 0.0008 | 2.2 | 2.3 | |
| | 42 | 0.0167 | 0.0019 | 2.5 | 3.2 | |
| | 43 | 0.0375 | 0.0041 | 2.6 | 3.9 | |
| | 44 | 0.022 | 0.0039 | 3.1 | 4.4 | |
| | 45 | 0.0193 | 0.0023 | 2.7 | 2.9 | |
| | 46 | 0.1108 | 0.0082 | 1.9 | 7.2 | |
| | 47 | 0.1973 | 0.0097 | 3.3 | 4.4 | |
| | 48 | 0.0364 | 0.0022 | 2.7 | 4.3 | |
| | 49 | 0.1233 | 0.0098 | 1.3 | 7.2 | |
| | 50 | 0.0976 | 0.0064 | 1.4 | 7.8 | |
| | 51 | 0.0059 | 0.0006 | 3.5 | 3.5 | |
| | 52 | 0.0125 | 0.0023 | 2.6 | 2.6 | |
| | 53 | 0.0986 | 0.0087 | 3.9 | 6.1 | |
| | 54 | 0.0028 | 0.0016 | 2.3 | 2.3 | |
| | 55 | 0.003 | 0.0009 | 3.6 | 3.6 | |
| | 56 | 0.021 | 0.0042 | 3 | 4.7 | |
| | 57 | 0.0029 | 0.001 | 3.4 | 4 | |
| | 58 | 0.0048 | 0.0011 | 3.5 | 3.5 | |
| | 59 | 0.0103 | 0.0023 | 2.4 | 3.7 | |
| | 60 | 0.0141 | 0.0036 | 3.6 | 4.3 | |
| | 61 | 0.0221 | 0.0021 | 2.3 | 3.9 | |
| | 62 | 0.013 | 0.0016 | 1.7 | 2.5 | |
| | 63 | 0.0174 | 0.0025 | 1.5 | 2.1 | |
| | 64 | 0.056 | 0.0041 | 1.4 | 3.1 | |
| | 65 | 0.2403 | 0.0124 | 2.9 | 4.3 | |
| | 66 | 0.2259 | 0.0094 | 1.2 | 6.2 | |
| | 67 | 0.1146 | 0.0066 | 2.4 | 4.7 | |
| | 68 | 0.01 | 0.0012 | 1.5 | 2.9 | |
| | 69 | 0.0371 | 0.0051 | 3.2 | 4 | |
| 70 | 0.02 | 0.0025 | 1.9 | 2.4 | | |
| | 1/2 MS + Ca insoluble | | | | | |
| | 1/2 MS + Ca y P insoluble | | | | | |

| | | | | | | | |
|-----|--------|---------------------------------|--------|--------|--------|-----|-----|
| | | 71 | 0.0249 | 0.0038 | 2 | 3.1 | |
| | | 72 | 0.0001 | 0 | 3.3 | 3.3 | |
| | | 73 | 0.0001 | 0 | 3.6 | 3.6 | |
| | | 74 | 0.0146 | 0.0024 | 3.1 | 3.6 | |
| | | 75 | 0.1067 | 0.0102 | 3.5 | 8.4 | |
| M15 | 1/2 MS | 1 | 0.0072 | 0.0043 | 2.2 | 2.7 | |
| | | 2 | 0.1601 | 0.0028 | 2.3 | 5.9 | |
| | | 3 | 0.054 | 0.006 | 2.8 | 5.6 | |
| | | 4 | 0.057 | 0.0018 | 1.4 | 5.7 | |
| | | 5 | 0.0218 | 0.0038 | 2.8 | 4.6 | |
| | | 6 | 0.1057 | 0.0101 | 2.6 | 9.2 | |
| | | 7 | 0.0102 | 0.009 | 1.5 | 8.6 | |
| | | 8 | 0.0292 | 0.0033 | 2.6 | 5.7 | |
| | | 9 | 0.0001 | 0 | 1.7 | 1.7 | |
| | | 10 | 0.0001 | 0 | 1.3 | 1.3 | |
| | | 11 | 0.0824 | 0.008 | 2.4 | 6.1 | |
| | | 12 | 0.0001 | 0 | 1.4 | 1.4 | |
| | | 13 | 0.0001 | 0 | 1.6 | 1.6 | |
| | | 14 | 0.0001 | 0 | 1.1 | 1.1 | |
| | | 15 | 0.0164 | 0.0019 | 2.3 | 2.7 | |
| | | 16 | 0.1242 | 0.0093 | 2.3 | 9.4 | |
| | | 17 | 0.0743 | 0.001 | 2.1 | 2.8 | |
| | | 18 | 0.0375 | 0.0027 | 2.9 | 3.4 | |
| | | 19 | 0.3518 | 0.0062 | 3 | 9.5 | |
| | | 20 | 0.0072 | 0.0036 | 2.1 | 2.3 | |
| | | 21 | 0.0858 | 0.008 | 2.8 | 7.6 | |
| | | 22 | 0.1088 | 0.0102 | 3 | 8.3 | |
| | | 23 | 0.098 | 0.0075 | 2.4 | 9.6 | |
| | | 24 | 0.0962 | 0.0105 | 2.9 | 8.2 | |
| | | 25 | 0.137 | 0.0111 | 2.4 | 7.9 | |
| | | 1/2 MS + Ca insoluble | 26 | 0.0139 | 0.0039 | 2.8 | 4.1 |
| | | | 27 | 0.0319 | 0.0055 | 2.9 | 4.5 |
| | | | 28 | 0.0393 | 0.0066 | 3.4 | 5.6 |
| | | | 29 | 0.0279 | 0.0029 | 1.7 | 4.3 |
| | | | 30 | 0.0954 | 0.005 | 3.4 | 5.6 |
| | | | 31 | 0.0118 | 0.0036 | 2.8 | 4.3 |
| | | | 32 | 0.0167 | 0.0043 | 2.6 | 2.7 |
| | | | 33 | 0.0059 | 0.0037 | 2.6 | 3.8 |
| | | | 34 | 0.0068 | 0.0046 | 3.1 | 4.1 |
| | | | 35 | 0.0028 | 0.002 | 1.5 | 2.6 |
| | | | 36 | 0.0218 | 0.0038 | 3.1 | 4.9 |
| | | | 37 | 0.0076 | 0.0034 | 1.6 | 3.2 |
| | | | 38 | 0.0104 | 0.0022 | 2.2 | 2.3 |
| | | | 39 | 0.04 | 0.0034 | 3 | 4.1 |
| | | | 40 | 0.0001 | 0 | 2.3 | 2.3 |
| | | | 41 | 0.0622 | 0.0064 | 2.4 | 5.7 |
| | | | 42 | 0.1074 | 0.0079 | 3 | 7.1 |
| | | | 43 | 0.0029 | 0.0016 | 3.2 | 4.2 |
| | | | 44 | 0.0054 | 0.0038 | 2.7 | 3.8 |
| | | | 45 | 0.0501 | 0.0107 | 3 | 6.4 |
| | | | 46 | 0.0262 | 0.0041 | 0.8 | 4.5 |
| | | | 47 | 0.0102 | 0.0015 | 2.4 | 3.6 |
| | | | 48 | 0.0279 | 0.0048 | 2.4 | 3.9 |
| | | | 49 | 0.021 | 0.0045 | 2.5 | 4.1 |
| | | | 50 | 0.0099 | 0.0053 | 2.4 | 3.1 |
| | | 1/2 MS + Ca y P insoluble | 51 | 0.0001 | 0 | 2.4 | 2.4 |
| | | | 52 | 0.0001 | 0 | 2.2 | 2.2 |
| | | | 53 | 0.012 | 0.0012 | 2.1 | 3.2 |
| | | | 54 | 0.0001 | 0 | 2.7 | 2.7 |
| | | | 55 | 0.136 | 0.0023 | 1.9 | 2.5 |
| | | | 56 | 0.0001 | 0 | 1 | 1 |
| | | | 57 | 0.0176 | 0.0016 | 1.5 | 2.4 |
| | | | 58 | 0.0059 | 0.0015 | 3.1 | 3.5 |
| | | | 59 | 0.0089 | 0.0019 | 2.7 | 3.2 |
| | | | 60 | 0.0001 | 0 | 2.9 | 2.9 |
| | | | 61 | 0.0536 | 0.0079 | 1.5 | 7.7 |
| | | | 62 | 0.0001 | 0 | 2.3 | 2.3 |
| | | | 63 | 0.0076 | 0.0013 | 2.4 | 2.8 |
| | | | 64 | 0.021 | 0.0012 | 2.9 | 4.2 |
| | | | 65 | 0.0501 | 0.0113 | 3.3 | 6.9 |
| | | | 66 | 0.0001 | 0 | 2.8 | 2.8 |

| | | | | | |
|--|----|--------|--------|-----|-----|
| | 67 | 0.0241 | 0.0048 | 2.2 | 4.1 |
| | 68 | 0.0001 | 0 | 1.8 | 1.8 |
| | 69 | 0.0001 | 0 | 3.2 | 3.2 |
| | 70 | 0.0056 | 0.0012 | 2 | 2.6 |
| | 71 | 0.0332 | 0.0055 | 2.8 | 4.6 |
| | 72 | 0.021 | 0.0037 | 3.2 | 4.9 |
| | 73 | 0.0167 | 0.0011 | 2.4 | 3.1 |
| | 74 | 0.0747 | 0.0024 | 1.5 | 2.2 |
| | 75 | 0.0382 | 0.0044 | 2.2 | 6.4 |

Anexo 4. Análisis ANOVA para el peso seco de *seedlings* en el medio 1/2 MS



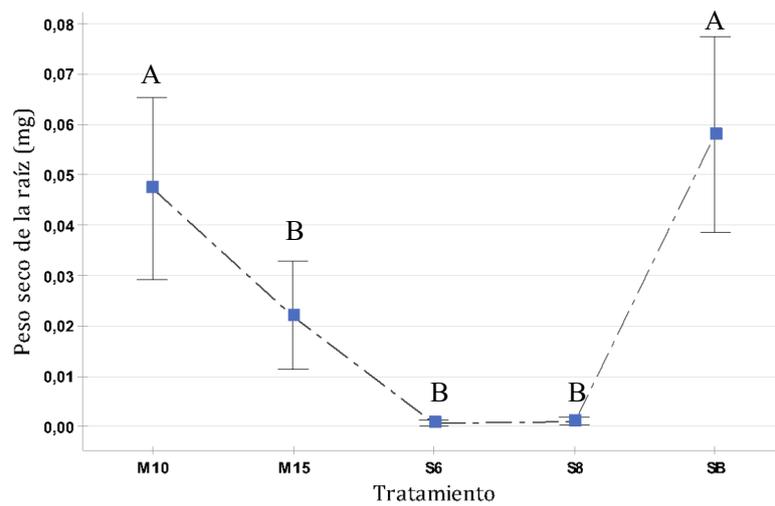
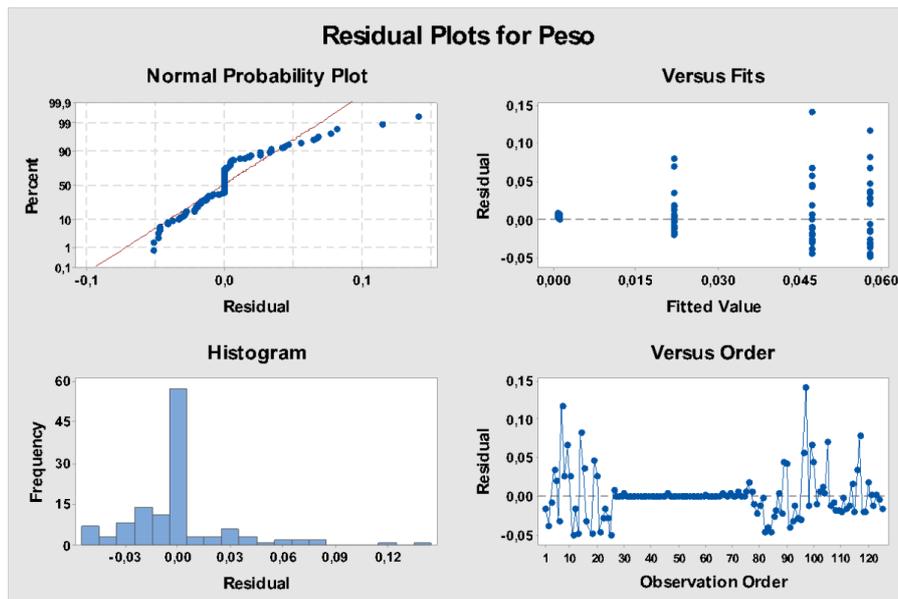
Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|----------|-----|--------|----------|---------|---------|
| Bacteria | 4 | 0,1717 | 0,042921 | 15,26 | 0,000 |
| Error | 120 | 0,3375 | 0,002812 | | |
| Total | 124 | 0,5092 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|-----------|--------|-----------|------------|
| 0,0530329 | 33,72% | 31,51% | 28,08% |

Anexo 5. Análisis ANOVA para el peso seco de seedlings en el medio 1/2 MS con calcio insoluble



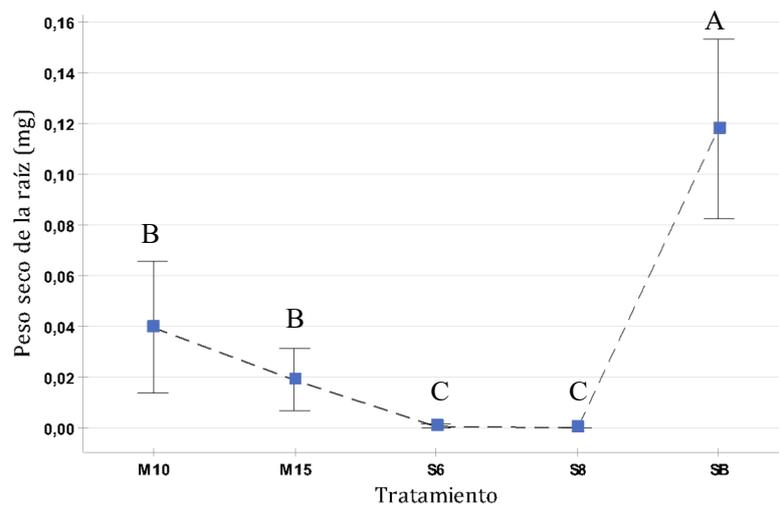
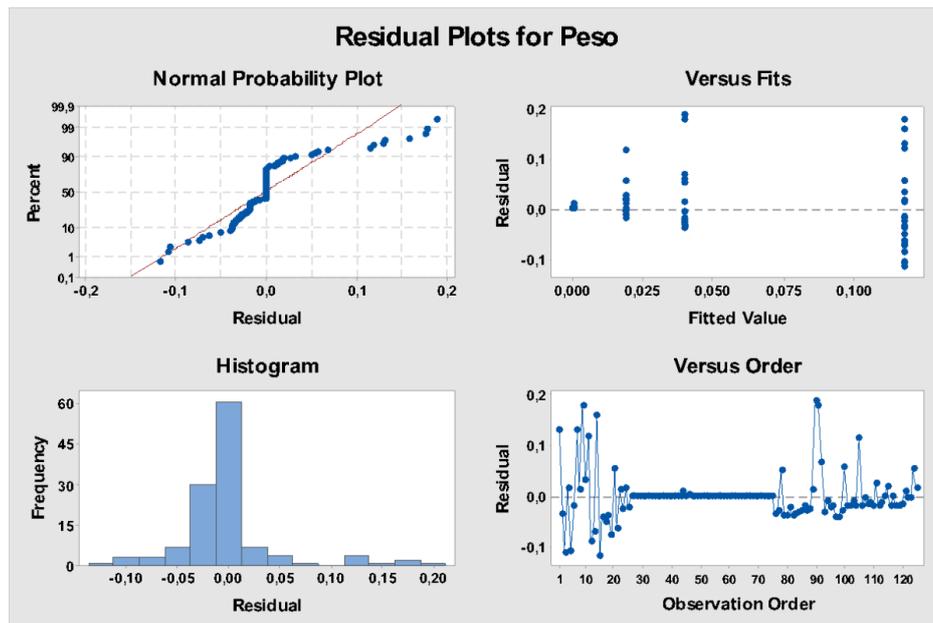
Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|----------|-----|---------|----------|---------|---------|
| Bacteria | 4 | 0,06807 | 0,017017 | 18,03 | 0,000 |
| Error | 119 | 0,11232 | 0,000944 | | |
| Total | 123 | 0,18038 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|-----------|--------|-----------|------------|
| 0,0307218 | 37,73% | 35,64% | 32,33% |

Anexo 6. Análisis ANOVA para el peso seco de seedlings en el medio 1/2 MS con calcio y fósforo insoluble



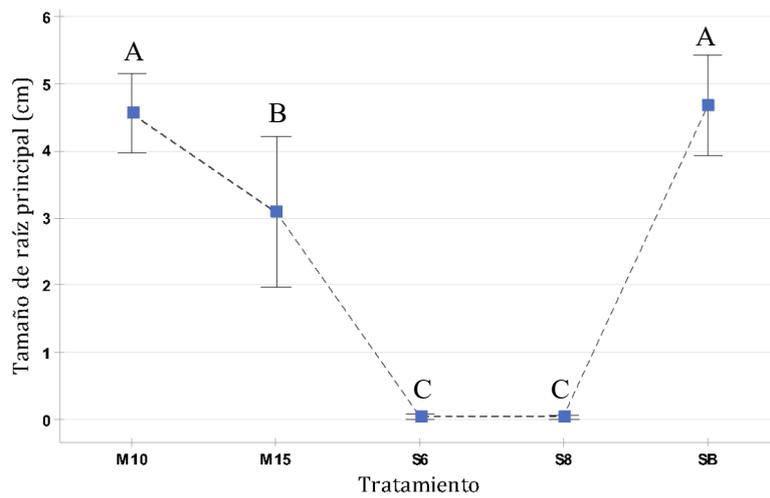
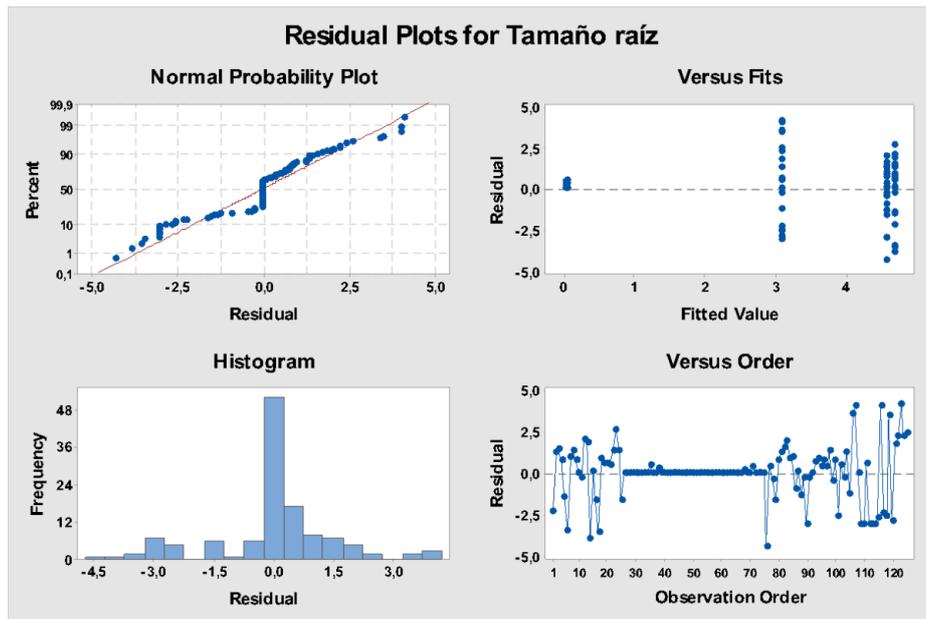
Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|----------|-----|--------|----------|---------|---------|
| Bacteria | 4 | 0,2381 | 0,059524 | 24,30 | 0,000 |
| Error | 120 | 0,2940 | 0,002450 | | |
| Total | 124 | 0,5321 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|-----------|--------|-----------|------------|
| 0,0494949 | 44,75% | 42,91% | 40,05% |

Anexo 7. Análisis ANOVA para el tamaño de raíz de seedlings en el medio 1/2 MS



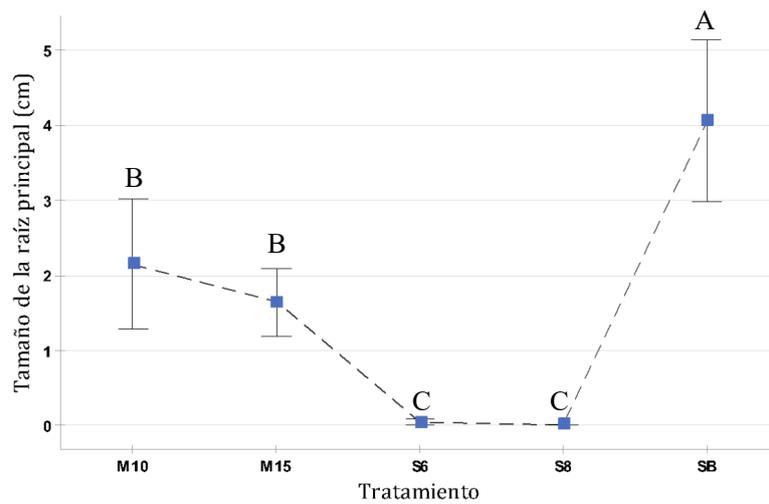
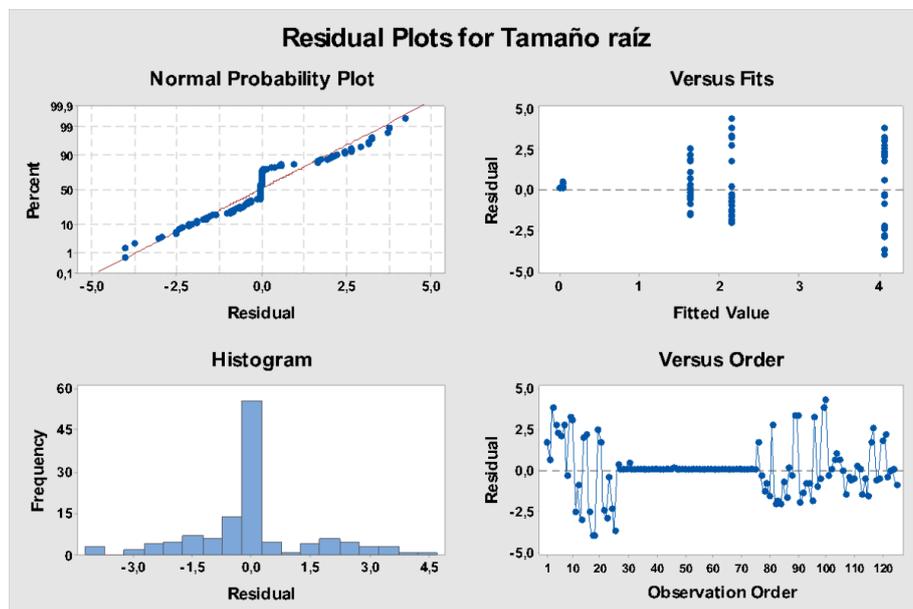
Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|----------|-----|--------|---------|---------|---------|
| Bacteria | 4 | 538,8 | 134,693 | 52,84 | 0,000 |
| Error | 120 | 305,9 | 2,549 | | |
| Total | 124 | 844,7 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|---------|--------|-----------|------------|
| 1,59661 | 63,78% | 62,58% | 60,70% |

Anexo 8. Análisis ANOVA para el tamaño de raíz de seedlings en el medio 1/2 MS con calcio insoluble



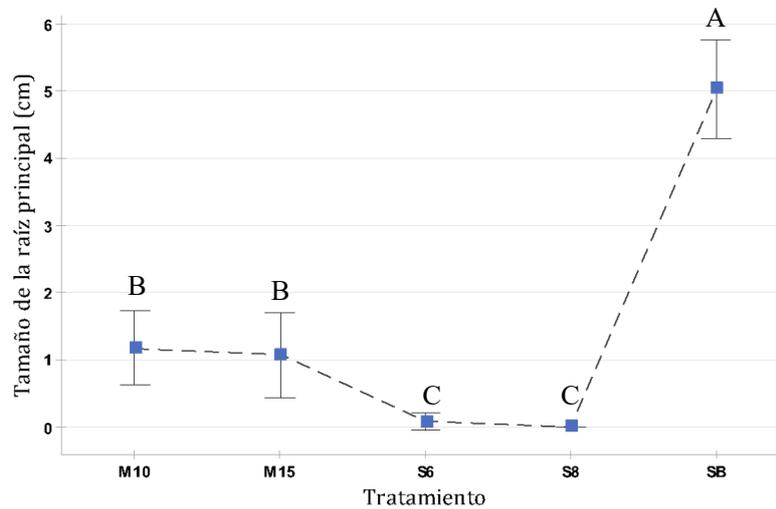
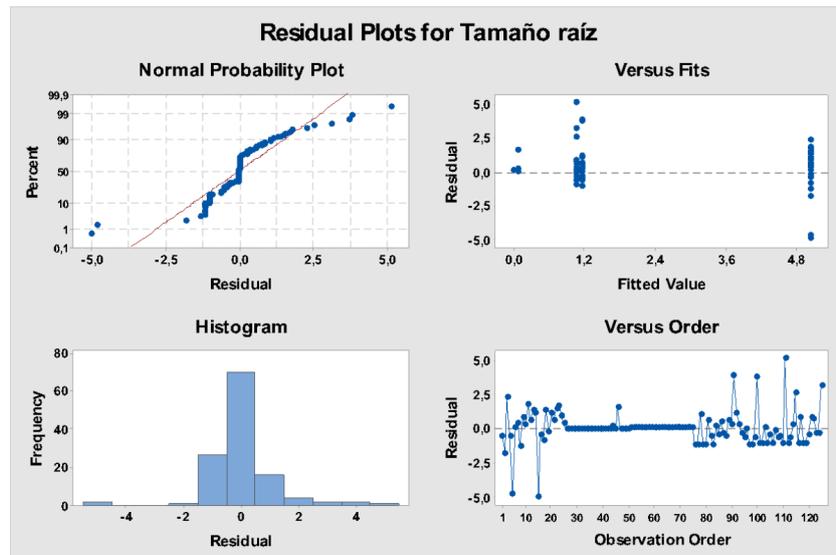
Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|----------|-----|--------|--------|---------|---------|
| Bacteria | 4 | 284,7 | 71,182 | 28,16 | 0,000 |
| Error | 120 | 303,4 | 2,528 | | |
| Total | 124 | 588,1 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|---------|--------|-----------|------------|
| 1,59001 | 48,41% | 46,70% | 44,03% |

Anexo 9. Análisis ANOVA para el tamaño de raíz de seedlings en el medio 1/2 MS con calcio y fósforo insoluble



Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|----------|-----|--------|---------|---------|---------|
| Bacteria | 4 | 427,3 | 106,813 | 71,56 | 0,000 |
| Error | 120 | 179,1 | 1,493 | | |
| Total | 124 | 606,4 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|---------|--------|-----------|------------|
| 1,22176 | 70,46% | 69,48% | 67,95% |