UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de la competencia entre especies de rizobacterias sobre los rasgos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* y el desarrollo de modelo vegetal *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de vivero

Estefania Ceballos Ruiz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Escuela de Geociencias
Medellín, Colombia
2024

Efecto de la competencia entre especies de rizobacterias sobre los rasgos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* y el desarrollo del modelo vegetal *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de vivero

Effect of competition among rhizobacteria species on *in vitro* plant growth promotion traits and the development of the plant model *Solanum lycopersicum* under nursery conditions

Estefania Ceballos Ruiz

Proyecto de Tesis presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Biotecnología

Director (a):
Juan Carlos Bedoya. PhD Microbiología

Codirector (a):
Juan Carlos Pérez Naranjo. PhD Ciencias del Suelo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Área Curricular de Biotecnología
Medellín, Colombia
2024

A mis padres, amigos, compañeros mis más sinceros agradecimientos por nunca dejar de creer en mí, incluso cuando ni yo misma tenía fé en mí y en mi proceso.

A Dios gracias por permitirme mantener mi salud, con la que me levantaba todos los días a seguir esforzándome por terminar exitosamente mi paso durante este estudio.

Agradecimientos

Agradezco a la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) por permitirme la oportunidad de estudiar el posgrado y permitirme participar de este hermoso proyecto que ha sido tan enriquecedor tanto en el ámbito académico como en el ámbito personal. Gracias al Doctor Juan Carlos Bedoya por toda la gestión y por estar siempre dispuesto a colaborar con el desarrollo de este trabajo de maestría. Agradezco también a todos mis compañeros de la CIB que siempre fueron un apoyo académico y emocional indispensable.

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por ser un lugar que aporto altísimo valor profesional y académico, porque durante mi paso por la universidad, pude explorar otros ámbitos de la microbiología que me dejaron profundamente enamorada. Gracias al profesor Juan Carlos Pérez por los grandes aportes académicos, esenciales para el planteamiento de este trabajo de tesis.

Resumen

Los bioinoculantes a base de microorganismos benéficos representan una estrategia prometedora para mejorar la salud del suelo y la productividad de los cultivos. Sin embargo, su desempeño bajo condiciones de campo es inconsistente, lo que ha impulsado la investigación en muchas áreas del conocimiento con el fin de mejorar su efectividad. Una posible causa de esto puede estar relacionada con el ciclo de vida bacteriano en el suelo. El uso de inóculos microbianos implica constantes interacciones competitivas entre las comunidades presentes en el suelo y los agentes biológicos aplicados. La competencia microbiana con la microbiota residente del suelo, puede impedir que el microorganismo introducido sobreviva, se establezca y exprese los rasgos deseados lo que puede ejercer una presión selectiva e inducir la aparición de variantes fenotípicas con mayor capacidad para establecerse en un ambiente selectivo dado. Así, las interacciones microbianas podrían representar una alternativa para la obtención de fenotipos con mejores rasgos de promoción de crecimiento vegetal potenciando su aplicación como bioinoculantes en sistemas agrícolas. No obstante, para alcanzar esta instancia, es necesario comprender las interacciones microbianas y los principios ecológicos que las gobiernan. Este trabajo evaluó el efecto de la competencia entre rizobacterias sobre sus rasgos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*. Se aplicó un enfoque de evolución experimental basado en interacciones de competencia sucesivas en medio solido con la finalidad de inducir variaciones fenotípicas en tres aislados bacterianos previamente seleccionados por su capacidad biofertilizante. Se analizaron cambios en la morfología de las colonias bacterianas, rasgos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* (solubilización de fosfatos y producción de indoles totales), y el efecto de aislamientos seleccionados sobre el desarrollo de plántulas de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de vivero. La interacción microbiana generó cambios en la morfología colonial y variaciones significativas en los rasgos de promoción de crecimiento entre poblaciones seleccionadas de procesos de repique, competencia y los aislamientos parentales. Los resultados obtenidos sugieren que la competencia microbiana puede ser utilizada como una alternativa de selección de fenotipos mejorados para el desarrollo de bioinoculantes agrícolas más eficaces.

Palabras clave: (Rizobacterias, Biofertilizantes, Variación fenotípica, Competencia microbiana, Evolución experimental).

Abstract

Bioinoculants based on beneficial microorganisms represent a promising strategy for improving soil health and crop productivity. However, their performance under field conditions is inconsistent, prompting research in many areas of knowledge aimed at improving their effectiveness. One possible cause of this may be related to the bacterial life cycle in the soil. The use of microbial inoculants involves constant competitive interactions between the communities present in the soil and the biological agents applied. Microbial competition with the resident soil microbiota can prevent the introduced microorganism from surviving, establishing, and expressing desired traits. This can exert selective pressure and induce the emergence of phenotypic variants with a greater capacity to establish in a given selective environment. Thus, microbial interactions could represent an alternative for obtaining phenotypes with improved plant growth-promoting traits, enhancing their application as bioinoculants in agricultural systems. However, to achieve this goal, it is necessary to understand microbial interactions and the ecological principles that govern them. This work evaluated the effect of competition among rhizobacteria on their plant growth-promoting traits *in vitro*. An experimental evolution approach based on successive competitive interactions in solid media was applied to induce phenotypic variations in three bacterial isolates previously selected for their biofertilizing capacity. Changes in bacterial colony morphology, in vitro plant growth-promoting traits (phosphate solubilization and total indole production), and the effect of selected isolates on the development of Solanum lycopersicum seedlings under nursery conditions were analyzed. Microbial interactions generated changes in colonial morphology and significant variations in growth-promoting traits among selected populations from stemming processes, competition, and parental isolates.

The results obtained suggest that microbial competition can be used as an alternative for selecting improved phenotypes for the development of more effective agricultural bioinoculants.

Keywords: (Rhizobacteria, Biofertilizers, Phenotypic variation, Microbial competition, Experimental evolution).

Contenido

Contenido i
Lista de Figuras ii
Lista de Tablas v
Lista de Ecuaciones v
1. Introducción 7
2. Planteamiento del Problema 9
3. Justificación y aplicación en el campo de la biotecnología 11
4. Marco Teórico 12
4.1 Rizobacterias en la agricultura 12
4.2 Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal en rizobacterias 13
4.3 Microorganismos PGPR como bioinoculantes para la agricultura 16
4.4 Mercado de bioinoculantes 18
4.5 Variación fenotípica en bacterias y su función biológica 18
4.6 Competencia microbiana como mecanismo de inducción/selección de variaciones fenotípicas. 20
5 Hipótesis 21
6 Objetivos 22
6.5 Objetivo general 22
6.6 Objetivos específicos. 22
7. Metodología 22
8. Resultados 35
9. Discusión 71
10. Conclusiones 98
11. Limitaciones 99
12) Bibliografía 100

Lista de Figuras

Figura 1. Flujograma de actividades para el desarrollo del objetivo específico 1…….página 23

Figura 2. Flujograma de actividades para el desarrollo del objetivo específico 2….página 28

Figura 3. Esquema de inoculación de las interacciones de competencia in vitro..página 30

Figura 4. Flujograma del proceso experimental de las competencias microbianas.página 31

Figura 5. Flujograma de actividades para el desarrollo del objetivo específico 3…página 33

Figura 6. Efecto de la inoculación de los aislamientos bacterianos preseleccionados sobre la longitud aérea (cm) de plántulas de tomate (*S. lycopersicum*) bajo condiciones de vivero. ..... página 37

Figura 7. Efecto de la inoculación de diferentes aislamientos bacterianos preseleccionados sobre el peso seco (g) de plántulas de tomate (S. lycopersicum) bajo condiciones de vivero.. ..... página 38

Figura 8. Efecto de la inoculación de los aislamientos B1 (a), B12 (b) y B58 (c) a diferentes concentraciones (10^6 UFC/mL y 10^8 UFC/mL) sobre el desarrollo de plántulas de tomate bajo condiciones de vivero…….. página 40

Figura 9. Interacción de competencia B12B12 (ciclo 4). Imagen a fondo oscuro (a), imagen a contraluz (b), imagen procesada en el software IMAGE J (c)……. página 41

Figura 10. Interacción de competencia B1B58 (ciclo 1). Imagen a fondo oscuro (a), imagen a contraluz (b), imagen procesada en el software IMAGE J (c)…….página 41

Figura 11. Imágenes procesadas en el software IMAGE J. Cambios asociadas a la densidad celular en las colonias bacterianas sometidas a interacciones de competencia ……..pagina 42

Figura 12. Imágenes procesadas en el software IMAGE J. Cambios observados en la colonias bacterianas sometidas a interacciones de competencia. Disrupcion de las colonias. ..... página 42

Figura 13. Imágenes procesadas en el software IMAGE J. Cambios observados en la morfología de la colonias de B12 en la estructura tipo anillo……..página 43

Figura 14. Cambios morfológicos de B12 bajo diferentes condiciones de competencia, crecimiento individual y de repique a lo largo de los ciclos de competencia……. página 44 .....

Figura 15. Variación del ancho del borde de B1 en diferentes interacciones de competencia y de B1 repique, con respecto a B1 criovial……..página 45

Figura 16. Variación del ancho del borde de B12 en diferentes interacciones de competencia, y de B12 repique, con respecto a B12 criovial……. .página 46

Figura 17. Variación del ancho del borde de B58 en las diferentes interacciones de competencia, y de B58 repique, con respecto a B58 criovial……..……página 48

Figura 18. Morfología de las colonias de los aislamientos variantes morfológicos obtenidos. tras sucesivos ciclos de competencias y de crecimiento sucesivos de repique sin interacción en medio sólido……...página 49

Figura 19. Análisis de similitud Neighbor Joining basado en secuencias parciales de la región ADNr 16S de los aislamientos bacterianos de B12: el aislamiento parental (B12 Criovial), los aislamientos variantes resultantes de las competencias (B12B12, B12B12*, B12B1, B12B1*, B12B58) y los aislamientos resultantes de las siembras sucesivas/repiques (B12R1, B12R2) ……página 50

Figura 20. Eficiencia relativa de solubilización (%ERS) para las variantes seleccionadas post competencia……página 52

Figura 21. Producción de indoles totales por parte de las variantes seleccionadas post competencia……...pagina 53.

Figura 22. Efecto de los tratamientos bacterianos sobre la longitud aérea (cm) de plántulas de tomate bajo condiciones de vivero para los grupos bacterianos B1 (A), B58 (B) y B12 (c)……..página 55

Figura 23. Efecto de los tratamientos bacterianos sobre la longitud de raíz (cm) en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero para los grupos bacterianos B1 (A), B58 (B) y B12 (C)…….página 56

Figura 24. Efecto de los tratamientos bacterianos sobre el número de hojas en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero para los grupos bacterianos B1 (A), B58 (B) y B12 (C)……....página 57

Figura 25. Efecto de los tratamientos bacterianos sobre el número de hojas (g) en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero para los grupos bacterianos B1 (A), B58 (B) y B12 (C)……..…página 59

Figura 26. Imágenes del montaje del experimento en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero.....……..…página 61

Figura 27. Imágenes de los resultados de la inoculación de la población crioconservante, la población variante de las interacciones competitivas, la población variante de repique de B1 en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero. .....…….……página 60

Figura 28. Imágenes de los resultados de la inoculación de la población crioconservante, la población variante de las interacciones competitivas, la población variante de repique de B158 en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero. .....…….……página 60

Figura 29. Árboles de similitud construidos mediante el método Neighbor Joining (NJ) a partir de secuencias parciales de la región ADNr 16S de los aislamientos bacterianos B1, B12 y B58...……..…página 64

Figura 30. Interacciones competitivas entre las variantes seleccionadas resultantes de las de competencias, las poblaciones parentales y las poblaciones de repique para cada aislamiento B1, B12 y B58 post-competencia en medio PVK analizada mediante imágenes

a contraluz y procesamiento digital con filtros '6 shades' y 'Edges' del software libre ImageJ.……..……..página 67

Lista de Tablas

Tabla 1. Combinaciones de los aislamientos bacterianos seleccionados para evaluar por pares en arreglos de competencia in vitro.....página 28

Tabla 2. Rasgos de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal evaluados en los aislamientos bacterianos seleccionados…….…..…….página 35

Tabla 3. Identificación molecular de los aislamientos bacterianos preseleccionados. ..... página 36

Lista de Ecuaciones

$\text{Eficiencia relativa de solubilización } (\%) = \frac{\text{Diámetro del halo}}{\text{Díametro de la colonia}} \text{ x } 100$(Ecuación 1). . página 25

$\text{Variación del borde de la colonia } (\%) = \frac{\text{ABt-ABc}}{\text{ABc}} \text{ x } 100$ (Ecuación 2) …….página 32

1. Introducción

La agricultura representa el motor económico de muchos países en desarrollo (Bula et al., 2020), sin embargo, la alta dependencia hacia los fertilizantes sintéticos para mejorar los rendimientos agrícolas ha generado serios problemas ambientales, entre los que se encuentran: la eutrofización de cuerpos de agua (Armenta et al., 2010), la emisión de gases de efecto invernadero (González et al., 2017), el daño en la estructura de los suelos (Ulibarry et al., 2019), y la perdida de la biodiversidad y los ecosistemas (Vallejo et al., 2013). Estos impactos negativos, junto con el creciente costo de los fertilizantes químicos, han generado una alta demanda mundial de prácticas agrícolas más sostenibles (Ahmad et al., 2011). En este sentido, entre las estrategias que se están explorando para reducir la dependencia de agroquímicos y promover sistemas agrícolas más resilientes se encuentran la agricultura de precisión, la agroecología y el uso de bioinoculantes (Oliver et al., 2013; Suhag et al., 2016; Wezel et al, 2014).

Los bioinoculantes permiten el uso y aplicación de microorganismos al contener una o más cepas microbianas benéficas (hongos, bacterias, virus) y/o sus derivados (metabolitos secundarios, endosporas, proteínas, enzimas) en materiales portadores fáciles de usar y económicos (Reddy et al., 2013). Este tipo de productos pueden ser aplicados como biocontroladores de plagas y enfermedades, bioestimulantes y biofertilizantes, mejorando la fertilidad del suelo y promoviendo el crecimiento saludable de las plantas de forma sostenible y ecológica (Maheshwari et al., 2010; Singh et al., 2019). Específicamente, los biofertilizantes ofrecen potenciar rasgos agrícolas importantes como la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fósforo, la producción de antibióticos y la liberación de nutrientes esenciales en el suelo, facilitando su absorción por las plantas (Singh et al., 2021). Además, contribuyen al aumento de la productividad de los cultivos y la reducción del impacto ambiental de la agricultura emergiendo como una alternativa prometedora para establecer sistemas agrícolas ambientalmente sostenibles (Nosheen et al., 2021).

A pesar de su efectividad bajo condiciones controladas, los bioinoculantes enfrentan desafíos significativos cuando son aplicados en campo. El efecto y la función del bioinoculante puede ser modulada por diversos factores generando un desempeño inconsistente y limitando su adopción generalizada. Desde la selección de los microorganismos hasta los procesos de producción masivos, los fenotipos microbianos y sus interacciones pueden variar considerablemente con efectos desconocidos sobre la función del producto final (Alzate et al., 2024 Kaminsky et al.,

2019; Sharma et al., 2012). La producción de microorganismos en medios de cultivo artificiales ricos en nutrientes y bajo condiciones muy controladas, al igual que constantes cultivos en serie pueden generar fenotipos diferentes al ancestro silvestre originalmente aislado alterando tanto su función como la capacidad de establecimiento en campo (Sessitsch et al, 2019). Además, una vez que los microorganismos son introducidos al suelo, enfrentan una variedad de condiciones bióticas (depredadores, competencia con otras especies microbianas residentes) y abióticas (pH, tipo de suelo, humedad, nutrientes) que pueden regular la expresión diferencial del genoma y, por ende, su desempeño y/o diferenciación en campo (Ahmad et al., 2011; Barra et a., 2017; Bashan et al., 2014; Bowen et al., 1999). Esto desencadena un desbalance entre la eficiencia industrial y la funcionalidad biológica (Kaminsky et al., 2019).

Consecuentemente, el proceso de producción y formulación de bioinoculantes debe garantizar tanto la producción en masa como su capacidad de supervivencia y la preservación de rasgos de interés agronómico en campo. Existe la necesidad de una mayor investigación para comprender mejor los factores que influyen en la eficacia de un bioinoculante y el desarrollo de estrategias para optimizar su uso (Kaminsky et al., 2019; Malusà et al., 2016; Naveed et al., 2015). Uno de los mayores enfoques investigativos ha sido la compresión de las interacciones microbianas y su ecología. La variación fenotípica ha sido ampliamente descrita en el ámbito de la genética poblacional como un fenómeno capaz de diferenciar individuos dentro de una población isogénica que pueden proliferar bajo condiciones de selección. De esta manera, las subpoblaciones fenotípicas resultantes pueden presentar variación en los patrones de expresión génica, pero también mostrar cambios a nivel morfológico y bioquímico (Smits et al., 2006; Spratt et al., 2022). Este fenómeno ha sido considerado como una estrategia altamente conservada, por la cual, los microorganismos son capaces de responder y sobrevivir a condiciones ambientales fluctuantes.

Un factor biótico de estrés en el suelo está asociado con los intensos niveles de competencia que enfrentan los microorganismos por nutrientes, espacio, colonización, supervivencia y éxito reproductivo (Mącik et al., 2020). La competencia puede ser de dos tipos: explotativa y de interferencia. La competencia de tipo explotativa, también denominada competencia indirecta competencia por recursos, se refiere principalmente al uso de mecanismos indirectos como el consumo eficiente de recursos y altas tasas de reproducción con la finalidad de ocupar espacios y acceder a nutrientes privilegiados. La competencia de interferencia o interferencia microbiana está dirigida a provocar un daño directo a la célula vecina mediante la producción de sustancias

inhibitorias como antibióticos y toxinas hasta complejos sistemas de secreción que actúan como un arma bacteriana capaz de inyectar efectores tóxicos a las células vecinas para obtener una ventaja competitiva, degradar ácidos nucleicos o alterar la pared celular (Rudzite et al., 2023). Estas constantes presiones de selección microbiana favorecen el despliegue de variantes fenotípicas con rasgos diferenciados como la tasa de crecimiento o una mayor resistencia a antibióticos (Ghoul et al., 2016). Esta heterogeneidad de respuesta podría ayudar a un microorganismo a utilizar diferentes nichos dentro de un ecosistema, e incluso tiene el potencial de aumentar el éxito reproductivo general de la especie (Thattai et al., 2004).

De acuerdo con lo anterior, cuando las condiciones ambientales cambian, los microorganismos reorganizan las redes regulatorias complejas que conducen a cambios celulares que favorecen su adaptación al ambiente o que son necesarios para la supervivencia a largo término (Lee et al., 2020). Sin embargo, se ha prestado poca atención a los efectos generados por la competencia ecológica sobre la regulación de estos rasgos (Cornforth et al., 2013), y su utilidad en el aprovechamiento y selección de individuos que expresan fenotipos con mejor potencial y capacidad de supervivencia bajo condiciones de selección (Spratt et al., 2022). Por tal razón, este proyecto propuso, a través de un experimento de evolución experimental, explorar cómo sucesivas interacciones de competencia en un medio sólido entre rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) aisladas de un cultivo comercial de aguacate afectan algunos rasgos de promoción de crecimiento vegetal deseados tanto a nivel *in vitro* como bajo condiciones de vivero utilizando como modelo vegetal *Solanum lycopersicum*.

2. Planteamiento del Problema

La creciente demanda de prácticas agrícolas sostenibles y la necesidad de reducir la dependencia al uso de fertilizantes químicos ha impulsado el interés en el desarrollo y utilización de bioinoculantes. Sin embargo, a pesar de décadas de investigación en el uso de microorganismos del suelo aún hay obstáculos considerables que limitan el uso generalizado de productos biológicos con fines de nutrición y sanidad vegetal. Entre éstos, la falta de resultados consistentes y reproducibles bajo condiciones de campo continúa siendo uno de los grandes problemas que afectan su aceptación en el mercado (Kaminsky et al., 2019). La supervivencia y eficacia de los microorganismos presentes en un bioinoculante no se puede predecir de forma segura, generando poca confiabilidad y alta dificultad para evaluar su éxito en campo (De

Salamone et al., 2019). Esto puede deberse a que el aislamiento de un microorganismo y su posterior adaptación a las condiciones de producción en masa puede generar variaciones en su fenotipo inicial y la funcionalidad biológica. Los microorganismos que sobreviven a los procesos de producción pertenecen a generaciones muy lejanas a la de su fenotipo parental con consecuencias desconocidas sobre los fenotipos resultantes y la función final del producto (Takors et al., 2012).

La falta de un marco teórico y práctico que integre conocimientos en ecología microbiana y evolución experimental en la manipulación de estas bacterias limita su efectividad y aplicación en la producción de bioinsumos. Este vacío en las estrategias de manipulación microbiana impide una optimización adecuada de las rizobacterias para su supervivencia en diferentes condiciones edafoclimáticas, tipos de suelos y cultivos. La ausencia de un enfoque eco evolutivo puede llevar a una comprensión incompleta de los mecanismos que gobiernan las interacciones de las rizobacterias con las plantas, el suelo y la microbiota residente del suelo, así como de los factores que afectan la estabilidad y eficacia de estos bioinsumos a lo largo del tiempo (Giri et al., 2020).

De esta manera, un proceso productivo integral debe enfocarse tanto en la producción en masa del microorganismo como en su capacidad de supervivencia o establecimiento en el suelo y la expresión de los rasgos deseados (Kaminsky et al.,2019). Entre los muchos retos que enfrenta el sector de la investigación y desarrollo en bioinsumos agrícolas, la comprensión de las interacciones microbianas parece ser uno de los problemas más subvalorados. Aunque las interacciones antagónicas y sinérgicas se evalúan comúnmente bajo condiciones *in vitro*, aún se desconocen cómo se modifican estas dinámicas una vez que los microorganismos son formulados y almacenados, como ocurren en bioinsumos polimicrobianos, así como de qué manera se configuran las interacciones microbianas al introducir estos microorganismos formulados en un ambiente nuevo con comunidades microbianas previamente establecidas (Lambert et al., 2014). Todo esto puede alterar el funcionamiento adecuado del bioinoculante en campo y, por lo tanto, se requiere un desarrollo de estrategias exploratorias que aborden los principios de ecología microbiana y evolución experimental para mejorar y apoyar la selección y utilización de rizobacterias con potencial de promoción del crecimiento vegetal.

Teniendo en cuenta que estas estrategias podrían mejorar la obtención de bioinsumos más efectivos y sostenibles, contribuyendo así a prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente y menos dependientes de insumos químicos, con esta propuesta se plantea la inducción de variaciones fenotípicas en RPCV a través de procesos de competencia microbiana,

y la evaluación de sus efectos sobre la estimulación del desarrollo vegetal bajo condiciones de vivero utilizando *S. lycopersicum* como planta modelo.

3. Justificación y aplicación en el campo de la biotecnología

Los bioinoculantes representan un mercado activo y dinámico con gran potencial de crecimiento. Las ventas globales fueron de 9,2 billones de dólares en 2023 y se espera que alcancen los 15,1 billones de dólares en 2028, creciendo a una tasa compuesta anual del 10,5% (Mordorintelligence, 2024). Sin embargo, la industria aún sigue luchando para obtener aceptabilidad y popularidad entre productores y consumidores finales debido a la baja disponibilidad y calidad y a su desempeño inconsistente bajo condiciones de campo (Suman et al., 2022). Dentro de los múltiples retos que enfrentan las compañías productoras de bioinsumos, la bioprospección de nuevas especies bacterianas con características promisorias en la promoción de crecimiento vegetal es uno de los mayores desafíos para el área de investigación. Esta tarea requiere de una gran inversión en tiempo y recursos económicos, e implica, entre otras cosas, el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento y nuevos medios de cultivo. Por otra parte, los procesos de manipulación genética son altamente costosos con respecto a la mejora de fenotipos existentes y se ha reportado que ciertos genomas bacterianos cambian rápidamente bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Liu et al., 2017).

Por otra parte, los mecanismos de manipulación y selección de cepas bacterianas recién aisladas o ya disponibles en la industria, mediante herramientas como la evolución experimental, son poco entendidos y aplicados para la obtención de nuevos fenotipos bacterianos. Los experimentos en evolución experimental conducen a la obtención de poblaciones bacterianas capaces de adaptarse a las presiones selectivas del arreglo experimental y pueden tener tanto mejoras como desmejoras en diferentes rasgos característicos del microrganismo. En este sentido, si durante la manipulación microbiana se obtienen fenotipos con rasgos de interés mejorados o potenciados, el paso a seguir debe ser la selección y domesticación de estos fenotipos bajo condiciones en las que se espera que el microorganismo prospere para su producción masiva y posterior uso como bioinoculante (Kaminsky et al., 2019). Esto representa una oportunidad para el desarrollo de alternativas de manipulación microbiana que permitan seleccionar fenotipos PGPR mejorados, como una mayor capacidad de producción de fitohormonas, solubilización de

nutrientes o resistencia al estrés. Estos nuevos fenotipos pueden ser utilizados para desarrollar bioinsumos más eficaces.

Por lo tanto, la exploración e integración del área de la ecología y la evolución experimental microbiana representan una herramienta poderosa para impulsar la innovación en el sector de los bioinsumos y contribuir a un futuro más sostenible para la agricultura, mediante la generación de nuevos conocimientos y la mejora en la eficacia de los bioproductos. Consecuentemente, este proyecto busca, explorar de manera general, una alternativa de manipulación microbiana experimental que permita mejorar los fenotipos bacterianos con potencial de biofertilización. Se propone implementar un protocolo experimental para inducir variaciones fenotípicas en rizobacterias con el fin de mejorar su desempeño y supervivencia bajo condiciones de vivero. De esta forma, se espera mejorar el grado de conocimiento sobre métodos de inducción y detección de cambios fenotípicos en bacterias. Además, en el largo plazo los resultados podrían favorecer el desarrollo de bioinoculantes más eficaces, y la mejora en su aceptación y uso por productores de hortalizas y otros cultivos.

4. Marco Teórico

4.1 Rizobacterias en la agricultura

La rizosfera se refiere a la zona del suelo que está influenciada por las raíces de las plantas y que presenta la mayor actividad biológica y química dentro de la matriz del suelo, siendo determinante para el crecimiento y salud vegetal, la producción de exudados y la actividad de poblaciones macro y microbianas como las RPCV (Ahmad et al., 2011; Souza et al., 2015). Las RPCV son bacterias del suelo capaces de colonizar activamente las raíces de las plantas y la rizosfera y que potencian el crecimiento vegetal (Ahmad et al., 2011; Kloepper et al.1978; Reddy et al., 2013). Estos microorganismos poseen diversos mecanismos de acción, directa o indirecta, que influencian el crecimiento vegetal: i., la solubilización de minerales y fijación de nitrógeno; ii., la represión de patógenos del iii., el mejoramiento de la tolerancia a factores de estrés como la sequía, la salinidad y metales pesados y iv., la producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), giberelinas y citoquininas (Gupta et al., 2000; García et al., 2015; Singh et al., 2019; Souza et al., 2015 Tabassum et al., 2017).

La naturaleza de las bacterias RPCV varía desde bacterias de vida libre a bacterias endófitas y bacterias diazotróficas. Sin embargo, la mayoría del enfoque ha sido en cepas bacterianas de vida libre, especialmente las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* formadores de endosporas (Ahmad et al., 2011). Debido a sus atributos y sus efectos en la salud vegetal, la idea de manipular poblaciones microbianas como alternativa para la producción de bioinoculantes capaces de estimular el crecimiento vegetal de muchas especies de interés agrícola, ha fomentado el estudio de las RPCV por más de un siglo y sus resultados han sido prometedores bajo condiciones de laboratorio e invernaderos. Sin embargo, los resultados bajo condiciones en campo han sido altamente variables (Ahmad et al., 2011; Bashan et al., 2014; Bowen et al., 1999). Adicionalmente, el uso de las RPCV también aplica en temáticas ambientales como la fitorremediación y la recuperación de suelos degradados por efectos de la minería y condiciones ambientales extremas (Bacilio et al., 2006; Gerhardt et al., 2009).

4.2 Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal en rizobacterias

Las interacciones físicas, químicas y biológicas que rodean el ambiente rizosférico modulan en gran parte los efectos neutrales, deletéreos y beneficiosos que tienen rizobacterias sobre el crecimiento vegetal y la salud del suelo. Las RPCV poseen diferentes mecanismos de acción directos e indirectos como la producción de fitohormonas, la mejora en la toma de nutrientes y agua, la inducción de resistencia sistémica, la producción de antibióticos entre otros (Siddiqui et al., 2006). Por lo tanto, los microorganismos asociados a la rizosfera se pueden caracterizar como biofertilizantes, biocontroladores y bioestimulantes según los rasgos que expresen en la interacción microorganismo-planta-suelo.

Los microorganismos que producen un estímulo directo en el crecimiento y desarrollo vegetal se caracterizan por expresar rasgos como la síntesis de fitohormonas, la solubilización de minerales (fosfatos, potasio entre otros), la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la síntesis de enzimas que regulan los niveles hormonales, entre otros (Siddiqui et al., 2006). Por su parte, los microorganismos que producen un estímulo indirecto se refieren a aquellos microorganismos que expresan rasgos de biocontrol, competencia, parasitismo, producción de cianuro de hidrogeno, inducción de resistencia sistémica en plantas e interrupción de sistemas de comunicación *Quorum sensing* (Bhattacharyya et al., 2012; Reséndez et al., 2018).

4.2.1 Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los elementos más limitantes para la producción agrícola (Billah et al., 2019). A pesar de su abundancia, existen varios factores que regulan la dinámica del fósforo en el suelo como la mineralogía del material parental, la distribución del tamaño de partícula, el contenido de materia orgánica y el pH (Li et al., 2016). Específicamente, el pH del suelo influye de manera significativa en la facilidad de reacción del fósforo disponible con otros elementos (p.ej. Ca, Fe y Al) transformándolo en formas químicas no disponibles para las plantas (Goswami et al., 2016). Igualmente, algunas arcillas y óxidos tienen la capacidad de atrapar el fósforo en su superficie. Las arcillas tipo alófanas, son especialmente llamativas por su alta capacidad de adsorber y retener el fósforo, estas arcillas están comúnmente presentes en algunos suelos como los andisoles y los oxisoles que son bastante abundantes en las regiones tropicales y subtropicales (Osorio et al., 2015).

Para suplir las necesidades de fosforo en el suelo, se ha incrementado el uso de fertilizantes fosforados, sin embargo, una vez son agregados al suelo, el fósforo tiende a ser inmovilizado nuevamente (Khan et al., 2006) y el exceso en el uso de estos fertilizantes se está convirtiendo en un problema de tipo ambiental debido a que por procesos de escorrentía, el exceso de fosforo alcanza los cuerpos de agua siendo la principal causa eutrofización, además de incrementar los costos asociados a los procesos productivos agrícolas y elevar los precios de estos fertilizantes a nivel mundial (Hart et al., 2004; Manzoor et al., 2017; Montoya et al., 2009; Weber et al., 2014).

Existen microorganismos capaces de solubilizar las complejas estructuras químicas no disponibles para la toma por las plantas como el fosfato tricálcico, la roca fosfórica, el fosfato de aluminio, entre otros, a formas inorgánicas utilizando diferentes mecanismos de solubilización (Goswami et al., 2016). El mecanismo principal para la solubilización de fosfatos por estos microorganismos se basa en la secreción de ácidos orgánicos, específicamente los ácidos orgánicos alifáticos (ácido acético, ácido láctico, acido málico, acido succínico, acido tartárico) producidos a partir del metabolismo de azucares que provienen principalmente de exudados radiculares (Goswami et al., 2016; Paredes-Mendoza et al., 2010). Los ácidos orgánicos actúan como quelantes de los cationes $Ca^{2+,}$ Mg^{+2}, Fe^{+3} y Al^{+3} disociando estructuras químicas complejas y liberando iones fosfato. Además, disminuyen el pH del medio y modifica la solubilidad de algunos compuestos (Sarmah et al., 2022).

Otra forma de solubilización del fósforo, en este caso, fósforo orgánico por microorganismos, es la producción y liberación de enzimas como las fosfatasas, las fitasas y liasas que hidrolizan el

enlace químico entre el carbono y el fósforo lo que conduce a procesos de mineralización de fósforo orgánico (Billah et al., 2019). De esta forma, la búsqueda dirigida de microorganismos solubilizadores de fosfatos eficientes, han tomado gran relevancia en el área de la producción de biofertilizantes y en su uso como tecnología para mejorar la disponibilidad de P en los suelos y mejorar los rendimientos de producción agrícola (Sarmah et al., 2022).

4.2.2 Producción de indoles totales

El crecimiento y desarrollo vegetal es dependiente de diferentes compuestos reguladores y fitohormonas (p.ej. auxinas, citoquininas y giberelinas) los cuales se diferencian entre sí, por el efecto morfofisiológico sobre el desarrollo vegetal (Szajdak et al., 2007). Estas fitohormonas ejercen un efecto directo en la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal modulando diversos procesos fisiológicos en la planta que van desde las respuestas al estrés abiótico, interacción planta – patógeno hasta la modificación de la arquitectura radicular y del brote, y la producción de metabolitos secundarios (Szajdak et al., 2007; Tsukanova et al., 2017). Asimismo, su efecto benéfico esta finalmente definido por el contenido total de estos compuestos en el sistema planta – suelo. (Pantoja et al., 2023).

Dentro del amplio grupo de las auxinas, el ácido Indol Acético (AIA) es la que se encuentra en mayor abundancia en la naturaleza. Sin embargo, auxinas naturales como el ácido 4-cloro-indolacético (4-ClIAA), ácido fenol acético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA) están continuamente activos en el sistema vegetal en pequeñas cantidades y su producción es altamente regulada (Jordán et al., 2006; Siddiqui et al., 2006). El ácido indol acético (AIA) es producido principalmente en los ápices meristemáticos de las raíces y brotes (Lin et al., 2018) y ejerce un papel fundamental en el desarrollo vegetal ya que se involucra en procesos como la división, elongación y diferenciación celular, además de procesos importantes como el fototropismo y gravitropismo de las raíces y brotes, define la morfogénesis floral, alivia el estrés por factores abióticos y pueden modular muchos tipos de relaciones planta-microbiota. (Lin et al., 2018; Tsukanova et al., 2017)

Sin embargo, las plantas no son las únicas capaces de sintetizar estos reguladores; numerosos microorganismos, particularmente rizobacterias, también poseen esta capacidad. De hecho, se ha reportado que hasta el 80% de los aislados bacterianos asociados a las rizosferas de diversas plantas pueden sintetizar estas sustancias (Vega et al, 2016). Igualmente, algunos suelos con alto contenido de materia orgánica pueden presentar un efecto similar al de algunas fitohormonas, un fenómeno conocido como “*auxin like activity*”. Además, es importante anotar

que el efecto de las RPCV en la rizosfera vegetal puede modificar no solo la concentración, sino la localización y señalización de las fitohormonas. (Szajdak et al., 2007)

La biosíntesis de AIA comienza con la acción de la enzima indol piruvato descarboxilasa en presencia del aminoácido triptófano (Cavalcante da Silva et al., 2020), que puede ser secretado en varios exudados radiculares en respuesta a un estímulo o como señalizador para el reclutamiento de microorganismos rizosféricos (Yanofsky et al., 2007). Además, se puede encontrar en la degradación microbiana y bioquímica de la materia orgánica del suelo y en general, el triptófano es una fuente de nitrógeno debido a que la catálisis del triptófano libera grupos amino. (Suemori et al., 1995). A partir de este aminoácido y se han descrito al menos cinco vías diferentes: la vía indol-3-acetamida (IMA), la vía indol-3-piruvato (IPA), la vía indol-3-acetronilo (INA), la vía tríptamina (TAM) y la vía indol-3-acetaldoxima (IAOx), siendo más ampliamente estudiadas y descritas en bacteria las vías IMA e IPA (Lambrecht et al., 2000; Patten et al., 2013; Spaepen et al., 2011).

4.3 Microorganismos PGPR como bioinoculantes para la agricultura

Los bioinoculantes (bioestimulantes, biofertilizantes, biocontroladores, y bioestabilizadores) se definen como productos biológicamente activos que contienen uno o más cepas microbianas benéficas (hongos, bacterias, virus) y/o sus derivados (metabolitos secundarios, proteínas, enzimas) en materiales portadores fáciles de usar y económicos. Estos productos pueden ser aplicados en semillas, suelo y hojas para la protección y nutrición de los cultivos (Maheshwari et al.,2010; Singh et al., 2019). No obstante, para su comercialización y adecuado funcionamiento, los bioinoculantes deben cumplir con características esenciales como: i., la supervivencia de los microorganismos objeto; ii., conservar un numero viable de células microbianas en buena condición fisiológica por un periodo de tiempo aceptable y, iii., la aplicación de una cantidad suficiente de microorganismos en el momento de la inoculación para obtener la respuesta deseada en la planta (Bashan et al., 2014; Stephens et al., 2000).

Por otra parte, se ha identificado una tendencia al uso de inóculos polimicrobianos. Este tipo de bioinóculos contienen dos o más microrganismo en una misma formulación y se cree que ejercen una mayor y más diversa función asociada a la promoción del crecimiento vegetal y la productividad. Además, podrían ser utilizados en un rango más amplio de cultivos (Reddy et al., 2013; Singh et al., 2019). Sin embargo, durante el proceso de formulación de este tipo de

bioproductos, se deben considerar las interacciones microbianas dentro de la formulación, ya que factores como el material portador y las condiciones ambientales de almacenamiento pueden cambiar la naturaleza de estas interacciones y por tanto la calidad del producto final (Ptaszek et al., 2023).

El material portador es unos de los factores críticos para la formulación y el éxito del bioinoculante porque está directamente relacionado con la supervivencia y protección de los microorganismos. Además, el material portador determina el tipo de formulación (sólida o líquida), las condiciones o necesidades de almacenamiento y el tipo de aplicación en campo. Dentro de los materiales orgánicos que se han evaluado como portadores para la producción de bioinoculantes sólidos, la turba ha sido el material portador más reportado (Reddy et al., 2013). Sin embargo, aunque la turba es apta para la mayoría de las cepas RPCV, es raramente disponible en algunos países, y puede presentar alta variabilidad en calidad y composición (Bashan et al., 2014; Reddy et al., 2013). Como alternativa, los bioinoculantes sólidos con portadores de base sintética han sido intensamente evaluados por años ya que parecen ofrecer mejores ventajas como una vida útil más prolongada, mayores tasas de supervivencia, suficiente densidad celular y, son de fácil manejo y mejor desempeño (Bashan et al., 2014; John et al., 2011; Malusá et al., 2016; Reddy et al., 2013). Algunas desventajas asociadas a este tipo de bioformulaciones son los altos costos de las materias primas y la liberación lenta de microorganismos en el suelo que no permiten percibir una respuesta consistente en planta (Bashan et al., 2014).

Los tipos de bio inoculantes que actualmente se encuentran en el mercado son:

Biofertilizantes: son productos formulados que contienen uno o más microorganismos que potencian el estado nutricional (el crecimiento y rendimiento) de las plantas, haciendo los nutrientes más disponibles para las plantas y/o incrementando el acceso vegetal a los nutrientes (Malusá et al., 2016; Singh et al., 2019).

Bioestimulantes: es un producto capaz de mejorar la eficiencia de absorber y asimilar nutrientes en las plantas por el mejoramiento de la tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico. Pueden estar compuestos de ácidos húmicos y fúlvicos, aminoácidos, enzimas, o vitaminas, mezclas de péptidos, hormonas vegetales, extractos de algas y/o microorganismos benéficos que tienen como propósito acondicionar el suelo y hacerlo un ambiente más estimulante (Singh et al., 2019).

Biocontroladores: son sustancias de base biológica o mezclas de origen vegetal, animal, microbiano o mineral con propiedades nutritivas utilizada para prevenir y controlar pestes en plantas (insectos, ácaros, nematodos, caracoles, babosas) y enfermedades causadas por hongos, bacterias, nematodos y virus (Singh et al., 2019; Nava-Pérez et al., 2012).

4.4 Mercado de bioinoculantes

El mercado internacional de bioinoculantes fue estimado en 9,2 billones de dólares en 2023 y se espera que alcance los 15,1 billones de dólares en 2028, creciendo a una tasa compuesta anual del 10,5% (Mordorintelligence, 2024). El comportamiento en este mercado está vinculado con la adopción mundial de nuevos enfoques para la agricultura de precisión y protección, así como nuevas oportunidades de mercado en Asia y África. Ahora bien, bioproductos de corta vida útil y el riesgo de contaminación biológica, restringen el crecimiento de esta industria

A pesar de que Colombia es un país con alta producción agrícola, la participación de los bioinsumos en el mercado nacional es bajo (5% del mercado total de insumos agrícolas), siendo las soluciones agroquímicas las de mayor aceptación (Perfetti et al., 2013). Esto está relacionado con la incapacidad para producir grandes cantidades de bioinoculantes, de buena calidad, que puedan ser competitivas. Además, falta inversión en el sector de la investigación y desarrollo de bioinsumos en una articulación sólida de transferencia de conocimiento entre universidad - empresa - productor para mejorar la agremiación de este sector en el país.

No obstante, el potencial de producción interno de bioinoculantes es alto y representa una alternativa de crecimiento económico para el país, que además se encuentra enmarcada dentro de la producción limpia y sostenible. En este sentido, el Plan de Bioeconomía al 2030 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación del país proyecta que la bioeconomía aportará un 10% al PIB nacional y que, para ese mismo año se espera identificar nuevos principios activos, contar con nuevos bioproductos en etapas pre-comerciales y comerciales y, lograr ampliaciones de registros a nuevos mercados nacionales e internacionales (Gonzales et al., 2022).

4.5 Variación fenotípica en bacterias y su función biológica

La variación fenotípica se define como un fenómeno generalizado que ocurre en procariotas en el cual algunas células presentes dentro de una población genéticamente isogénica y cultivadas en condiciones ambientalmente homogéneas, muestran patrones de respuesta variable

(Ackermann et al., 2015; Smits et al., 2006). Algunos de los mecanismos moleculares más estudiados que puede dar paso a la variación fenotípica son: expresión génica estocástica, oscilaciones periódicas en funciones celulares, procesos epigenéticos. edad celular e interacciones célula-célula mediadas por contacto físico entre células individuales o por moléculas difusibles (Casadesús et al., 2013; Elowitz et al., 2002; Lenz et al., 2011; Macara et al., 2008; Reuven et al., 2011; Shrestha et al., 2013; Volfson et al., 2013 Shrestha et al., 2013).

Para comprender las repercusiones biológicas de la variación fenotípica, es necesario primero establecer que las diferencias fenotípicas observadas entre individuos tienen un impacto funcional significativo y diferencial. Esta relevancia funcional ha sido probada experimentalmente para algunos rasgos específicos en varios organismos en los que se analizó el efecto en la supervivencia, crecimiento y comportamiento de células que expresan diferentes fenotipos. Algunos de estos experimentos han demostrado que células genéticamente idénticas pueden mostrar una respuesta diferencial en rasgos como la tolerancia al estrés (Levy et al., 2012) y a antibióticos (Balaban et al., 2004; Wakamoto et al., 2013). Además, en la expresión de rasgos de virulencia que determinan las dinámicas de infección dentro de un huésped (Ackermann et al., 2008).

Cuando se establece la relevancia funcional mediante la evaluación de rasgos fundamentales para la supervivencia y el éxito reproductivo y evolutivo de un genotipo en un entorno de interés, se pueden identificar varias consecuencias potencialmente beneficiosas de la variación fenotípica. Uno de los beneficios es la capacidad de persistir en ambientes fluctuantes (Frankel et al., 2014). La diferenciación y división del trabajo en poblaciones microbianas permite resolver incompatibilidades entre procesos celulares, como cuando dos o más procesos son incompatibles pero necesarios para una función biológica (Johnson et al., 2012). Además, la división del trabajo favorece la funcionalidad colectiva, ya que las propiedades de un grupo microbiano se moldean a través de las interacciones entre individuos con fenotipos diferentes. El concepto clave es que la variación fenotípica puede aportar tales beneficios porque es un rasgo biológico moldeado por la selección natural y puede evolucionar. Además, el grado de variación fenotípica en un rasgo dado es variable y heredable (Ackermann et al., 2015).

Diferentes estudios han reportado variaciones morfológicas y funcionales de microorganismos sometidos a diferentes condiciones de crecimiento (nutrientes, agitación, temperatura, oxigenación, etc.) con resultados que indican mayor capacidad de adaptación y supervivencia (Lee et al., 2020; Achouak et al., 2004). Esta variación fenotípica podría ayudar a un microorganismo a aprovechar diferentes nichos dentro de un ecosistema, e incluso tiene el

potencial de aumentar el éxito reproductivo general de la especie por su capacidad de conferir un mejor grado de actividad en rasgos como: la habilidad para colonizar raíces, la cantidad y composición de metabolitos extracelulares, la estructura de los lipopolisacáridos, motilidad, formación de biopelículas, entre otros (Lee et al., 2020; Sousa et al., 2012; Shrestha et al., 2013; Thattai et al., 2004; Volfson et al., 2013; Wisniewski et al., 2015;).

La variación fenotípica es un rasgo fundamental que confiere a las poblaciones microbianas una mayor capacidad de adaptación y supervivencia en entornos cambiantes. Sin embargo, demostrar su importancia en la naturaleza representa un desafío considerable. Los estudios con sistemas modelo y modelos matemáticos ofrecen una herramienta potente para comprender los mecanismos subyacentes a esta variabilidad y diseñar experimentos de campo más precisos. La integración de diferentes enfoques, desde el laboratorio hasta el campo, es esencial para avanzar en nuestro conocimiento sobre el papel de la variación fenotípica en la estructura, función y biología de las comunidades microbianas en matrices naturales (Ackermann et al., 2015).

4.6 Competencia microbiana como mecanismo de inducción/selección de variaciones fenotípicas.

El ciclo de vida de un microorganismo en el suelo conlleva una interacción constante con diferentes especies microbianas y, por lo tanto, compite constantemente por recursos escasos y espacios limitados (Hibbing et al., 2010). Estas condiciones hostiles de vida inducen la aparición de fenotipos competitivos que buscan superar y desplazar a sus competidores. Para ello, se despliegan una serie de mecanismos de competencia como la secreción de moléculas químicas capaces de cosechar recursos, la perdida de genes energéticamente costosos para aprovechar recursos a expensas de otros individuos, la producción de compuestos que causan envenenamiento en las células vecinas y la colonización acelerada de espacios privilegiados. No obstante, con el tiempo, la competencia local tiende a disminuir, lo que conducirá a una coexistencia estable entre linajes genotípicamente distintos (Ghoul et al., 2016).

Existen dos vías por las cuales los microorganismos compiten: i., indirectamente, a través de una competencia explotativa y, ii., directamente, a través de competencia interferente. La primera implica una competencia pasiva que incluye, por ejemplo, un consumo más eficiente de nutrientes, limitando de este recurso a su competidor (Ghoul et al., 2016), la colonización rápida y efectiva del espacio, entre otros mecanismos. (Kim et al., 2014). En el caso de una competencia

activa e interferente, es necesaria una alta capacidad para matar las células que ya estaban colonizando un nicho, por ejemplo, a través de la producción de antimicrobianos o toxinas (Borgeaud et al., 2015; Bucci et al., 2011).

Definimos que un fenotipo microbiano es competitivo cuando éste es capaz de disminuir el éxito reproductivo de la cepa vecina y es más probable que hayan evolucionado como consecuencia de la interacción biótica en lugar de señales ambientales. Muchos de estos fenotipos competitivos pueden expresarse diferencialmente dentro de poblaciones clonales mejorando el éxito competitivo de un genotipo (Ackermann et al., 2015). Por ejemplo, las células clonales dentro de una población pueden desempeñar diferentes funciones fisiológicas y, por lo tanto, contribuir a una función biológica colectiva como un mejor aprovechamiento de los nutrientes bajo condiciones ambientales fluctuantes. (Schreiber et al., 2016; Stewart et al., 2008). Uno de los mecanismos que conduce a la variación fenotípica microbiana involucra las interacciones célula – célula mediada por moléculas difusibles o a través de contacto físico entre células (Reuven et al., 2011). Este proceso está regulado por la expresión de varios genes que censan señales ambientales, incluidas las señales de las células vecinas.

La regulación de los fenotipos competitivos está asociado al reconocimiento y respuesta celular frente a una interacción de competencia mediante diferentes respuestas de estrés fisiológico inducidas por la presencia de competidores (Cornforth et al., 2013; LeRoux et al., 2015). Posteriormente, las células pueden reconocer y ajustas las respuestas dependiendo si el tipo de competencia es por nutrientes o daño celular. La presencia de colonias microbianas vecinas también es capaz de desencadenar el comportamiento competitivo de muchas bacterias en el suelo (Abrudan et al., 2015; Traxler et al., 2013), y dependiendo de la identidad de la colonia vecina, las células pueden aumentar o reprimir su producción de antibióticos (Kelsic et al., 2015). La variación fenotípica que permite la supervivencia en presencia de antibióticos se origina, en muchos casos, en cambios en la expresión génica de algunas células que persisten (Ackermann et al., 2015).

5 Hipótesis

La competencia entre colonias de bacterias rizosféricas induce variaciones fenotípicas que favorecen la expresión de rasgos de promoción y crecimiento vegetal.

6 Objetivos

6.5 Objetivo general

Evaluar el efecto de la competencia intra e interespecífica entre rizobacterias sobre rasgos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* y su capacidad para favorecer el desarrollo de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de vivero.

6.6 Objetivos específicos.

- Seleccionar aislamientos bacterianos con rasgos de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal a partir de una colección diversa de rizobacterias provenientes de un cultivo comercial de aguacate.
- Evaluar el impacto de la competencia microbiana intra e interespecífica de tres aislamientos bacterianos seleccionados sobre las morfologías de sus colonias y los rasgos de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal *in vitro*.
- Comparar la capacidad de aislamientos bacterianos parentales y sus variantes fenotípicas en la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum)* bajo condiciones de vivero.

7. Metodología

Objetivo específico 1. Seleccionar aislamientos bacterianos con rasgos de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal a partir de una colección diversa de rizobacterias provenientes de un cultivo comercial de aguacate.

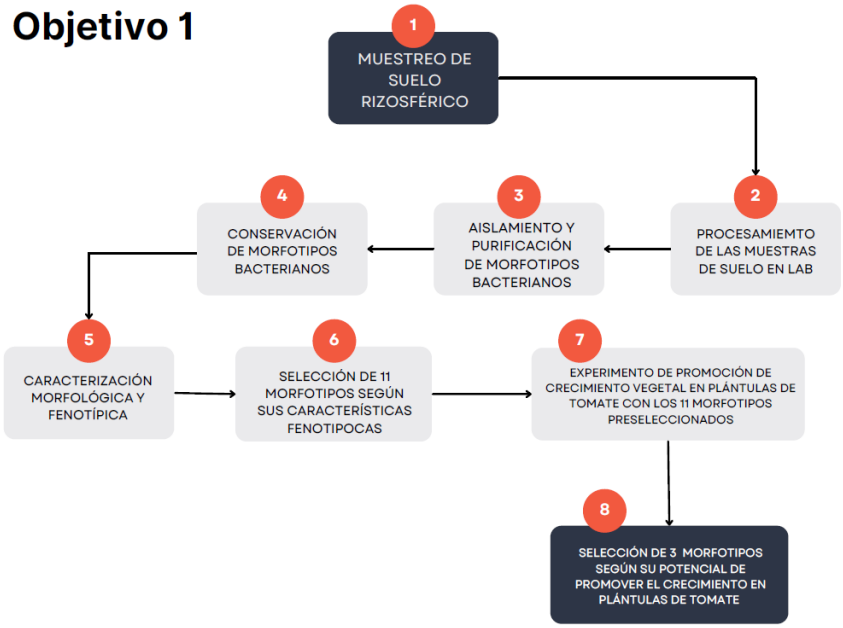


Figura 1. Flujograma de actividades para el desarrollo del objetivo específico 1.

7.1 Colección de rizobacterias aisladas de un cultivo comercial de árboles de aguacate.

7.1.1 Muestreo de suelo y de raíces. Durante el mes de julio del año 2023, se seleccionaron seis de los árboles más productivos y vigorosos distribuidos en un solo lote perteneciente al cultivo comercial de aguacate La España, ubicado en el municipio de El Retiro, Antioquia (5°59'24.1"N 75°29'19.9"W). Para cada árbol se eligieron tres puntos aleatorios del plato del árbol. En cada punto se excavó un hoyo a una profundidad máxima de 20 cm y se tomaron aproximadamente 100 g de suelo influenciado por la presencia de raíces vegetales (suelo rizosférico) y se formó una muestra compuesta. Las seis muestras compuestas se almacenaron en neveras de icopor para su transporte al laboratorio y posterior procesamiento.

7.1.2. Procesamiento de muestras de suelo. A partir de cada muestra compuesta se tomó una porción de suelo y se pasó por un tamiz de 2 mm. Del cernido, se tomaron dos submuestras de un gramo cada una. Cada submuestra se agregó a tubos Falcón de 15 mL conteniendo 9 mL de agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas 1:100 hasta 10^{-6}. 100 µL de las

diluciones 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5} fueron sembradas por duplicado en cajas de Petri conteniendo agar extracto de suelo modificado estéril (en g/L: agar, 15; glucosa, 1; K_2HPO_4, 0,5. En mL/L: extracto de suelo 100, agua 900. pH 6.8). El extracto de suelo fue preparado calentando 1000 g de suelo con 1000 ml de agua durante 30 min a 120°C. La suspensión del suelo se filtró una vez en papel filtro (papel filtro grado 4 Whatman). De no usarse inmediatamente para la preparación del medio, la suspensión se debe almacenar en nevera a 4 °C (pH 6.8-7.0) (Johnson et al.,1959). La siembra se realizó por el método de siembra en superficie (Sánchez et al., 2017). Las cajas de Petri fueron incubadas a 26°C durante 72 horas. (Aquilanti, et al., 2004, Kato et al., 2018)

7.1.3. Aislamiento y purificación de colonias bacterianas. Pasadas las 72 h de incubación, se analizaron los crecimientos obtenidos y se aislaron aquellas colonias bacterianas con características morfológicas distintivas. Las colonias seleccionadas se purificaron en medio agar extracto de suelo modificado mediante siembra por agotamiento. Los monocultivos puros obtenidos en este proceso fueron utilizados en los experimentos posteriores.

7.1.4. Descripción morfológica macroscópica y microscópica de los aislados obtenidos. Los aislados bacterianos se sembraron en cajas de Petri conteniendo 25 mL de agar Tripticasa de Soya (TSA, Merk®) (en g/L peptona de origen no animal 20, D (+) glucosa monohidratada 2.5, NCl 5.0, K_2HPO_4 2.5, agar 18.) al 25%. La siembra se realizó por el método de agotamiento. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se describió la morfología macroscópica de las colonias bacterianas y se realizó tinción de Gram para describir las características microscópicas.

7.1.5. Conservación de los aislados bacterianos. Todos los aislamientos obtenidos fueron conservados en crioviales conteniendo 1 mL de caldo de Tripticasa de soya (TSB, Merk®) (en g/L peptona de origen no animal 20, D (+) glucosa monohidratada 2.5, NCl 5.0, K_2HPO_4 2.5.) al 25% y glicerol al 30%, previamente esterilizado (121°C, 20 PSI, 20 min) (Nursofiah, et al., 2021). Se prepararon al menos cinco crioviales por aislamiento bacteriano. Los crioviales fueron almacenados a -80°C.

7.2. Evaluación de rasgos de promoción de crecimiento vegetal in vitro en los aislados bacterianos obtenidos

7.2.1. Prueba cualitativa de solubilización de fosfato. Se prepararon suspensiones bacterianas a 10^8 UFC/mL para todos los aislados conservados. Una microgota (10 µL) de cada suspensión

fue colocada en la superficie de medio sólido Pikovskaya (PVK), (en g/L: glucosa, 10; $Ca_3(PO_4)_2$, 5; $MgCl_2.6H_2O$, 5; $MgSO_4.7H_2O$, 0,5; KCl, 0.2; $(NH_4)_2SO_4$, 0.1; agar, 15) previamente esterilizado a 121 °C por 15 min. Una vez se absorbieron las microgotas, las cajas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 8 días. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Manzoor, et al., 2017, Yanez-Ocampo, et al., 2020).

Al finalizar el tiempo de incubación se observó el crecimiento de las colonias y la formación de halos transparentes alrededor de la colonia. Para la determinación cualitativa de solubilización de fosfato se utilizó la ecuación de eficiencia relativa de solubilización (Ec. 1). Los morfotipos que presentaron mayor porcentaje de eficiencia relativa de solubilización fueron considerados como aquellos aislados que presentaron una mayor capacidad para solubilizar fosfato bajo condiciones *in vitro*

$$Eficiencia\ relativa\ de\ solubilización\ (\%) = \frac{Diámetro\ del\ halo}{Diametro\ de\ la\ colonia}\ x\ 100 \quad \text{(Ecuación 1).}$$

7.2.2. *Producción de indoles totales:* Para evaluar la producción de indoles totales se implementó el método de Salkoswki (Gordon & Weber, 1951). Brevemente, 100 µL de suspensión bacteriana a 10^8 UFC/mL fueron adicionados a tubos de vidrio con tapa de 5 mL conteniendo 2 mL de caldo Triptona a 20 g/L (Oxoid®) (en g/L: amino nitrógeno 3.7; NaCl, 0.4; triptófano (presente) total nitrógeno, 12.7), e incubados a 120 rpm y 25°C durante 48 horas bajo condiciones de oscuridad. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 10621 xg durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. 100 µL del sobrenadante se mezclaron con 100 µL de reactivo de Salkoswki en una placa de micro pozos, la mezcla se dejó incubar en agitación a 120 rpm bajo condiciones en oscuridad durante 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de Elisa BioRad®. La concentración de indoles totales se estimó con base en una curva de calibración obtenida a partir de concentraciones conocidas de ácido indol acético y la adición del reactivo de Salkoswki en la misma proporción descrita anteriormente.

7.2.3. Producción de la enzima ureasa: Tubos de ensayo conteniendo 2 mL de agar ureasa (en g/L: Tripteína 1.0; glucosa 1.0; NCl 5.0; KH_2PO_4 2.0; rojo de fenol 0.012; agar 15. pH final 6.8 ± 0.2) en forma de bisel fueron inoculados en forma de estría con una colonia joven (crecimiento entre 24 y48 h) e incubados durante 72 h. Pasado el tiempo de incubación, la producción de ureasa se evaluó con base en la coloración final del medio: fucsia, prueba positiva; amarillo, prueba negativa (Mekonnen, et al., 2021)

7.2.4. Preselección de aislamientos bacterianos. A partir de las pruebas anteriores, se procesaron los datos y se eligieron los aislamientos que mostraron mayor potencial en cada uno de los rasgos evaluados.

7.2.5. Identificación molecular de los aislamientos bacterianos preseleccionados. Se realizó la siembra de los aislamientos en medio sólido y líquido para verificar su pureza, posteriormente se realizó la extracción de ADN por medio del Kit (Wizard Genomic DNA Isolation Kit) (Cat. FB022). Se amplificaron las regiones ADNr 16s por medio de PCR con primers universales, posteriormente se procedió a secuenciar los fragmentos resultantes. Todos los amplicones obtenidos fueron enviados en conjunto a la empresa Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas forward y reverse fueron depuradas, editadas y alineadas usando el software BioEdit versión 7.2.5. Las secuencias consenso fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del Genbank usando nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para determinar la identidad de los aislamientos.

7.3. Evaluación del efecto de la inoculación de aislados bacterianos preseleccionados sobre la promoción de crecimiento vegetal en plántulas de tomate (Solanum lycopersicum). Semillas de tomate cultivar chonto comercializadas por la empresa Fercón fueron desinfectadas con sucesivos lavados de HClO al 1% durante 1 min y posteriormente lavadas con agua destilada estéril. A continuación, las semillas fueron pregerminadas en cámaras húmedas estériles durante cuatro días. Grupos de cuatro semillas pregerminadas se plantaron en recipientes de icopor cónicos (alto: 13,2 cm; diámetro inferior: 5,5 cm; diámetro superior; 9,5 cm) conteniendo 300 g de suelo arenoso (90% arena, 10% suelo de vivero). Los recipientes fueron dispuestos en jarras de Leonard (CIAT et al.,1988). Los recipientes fueron distribuidos aleatoriamente en un área de 3.36 m^2 garantizando homogeneidad de condiciones (Temperatura, humedad, luminosidad). Cada unidad experimental consistió en un recipiente de icopor con cuatro plántulas. Se tuvieron cuatro réplicas por tratamiento.

Para la preparación de los inóculos bacterianos, las bacterias se sembraron de manera masiva en medio TSA al 25%, luego de 48 h de incubación, se realizaron raspados de la biomasa bacteriana agregando agua destilada estéril en la caja de Petri. La suspensión obtenida fue ajustada a 10^8 UFC/mL aproximadamente (DO_{600nm} 1,0 para bacterias gram positivas, DO_{600nm} 0.1-0.2 para bacterias gram negativas) (Borisova et al., 2016; Chatterjee et al., 2015).

Adicionalmente, de estas suspensiones se realizaron diluciones en agua destilada hasta 10^6 UFC/mL.

Se evaluaron individualmente once aislados bacterianos preseleccionados a dos niveles de concentración (10^6 y 10^8 UFC/mL) y un control absoluto inoculado con agua. Se inocularon 10 mL de volumen por tratamiento. Durante la experimentación se realizaron inoculaciones a los cinco y veinte días después de haber trasplantado las semillas germinadas a los recipientes cónicos. Se realizó una fertilización con solución de Hoagland al 50% después de la primera inoculación. El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero en instalaciones de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Antioquia. El experimento tuvo una duración total de 21 días sin réplica en el tiempo

7.4 *Análisis de datos y presentación de resultados.* Para evaluar diferencias significativas entre tratamientos con respecto a rasgos de promoción de crecimiento vegetal los resultados fueron analizados mediante ANOVA utilizando un modelo lineal ($Y=\mu+T+\varepsilon$) en el lenguaje R, siendo μ la media poblacional, T el efecto del tratamiento (aislamientos bacterianos preseleccionados) y ε el error experimental. Como variables respuesta (Y) fueron definidas: el porcentaje de eficiencia relativa de solubilización de fosfatos (%ERS), la cantidad de indoles totales producidos (µg/mL), la longitud aérea (cm) y el peso seco(g). En los casos que los supuestos de normalidad y homocedasticidad no se cumplieron, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se hicieron análisis *post hoc* de Tukey (paramétrico) o Dunn (no paramétrico).

Objetivo 2. Evaluar el impacto de la competencia microbiana intra e interespecífica de tres aislamientos bacterianos seleccionados sobre las morfologías sus colonias y los rasgos de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal *in vitro*.

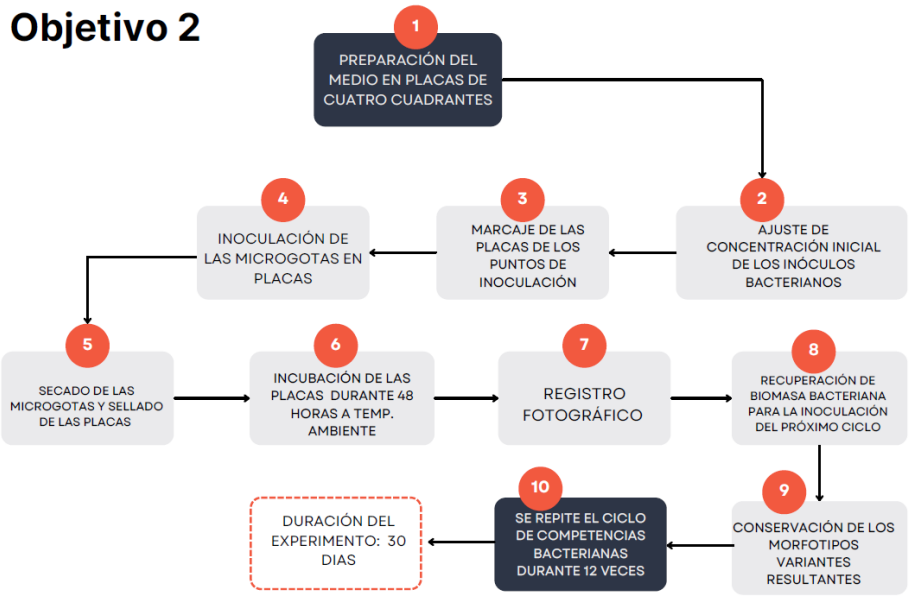


Figura 2. Flujograma de actividades para el desarrollo del objetivo específico 2.

7.4. Pruebas de competencia entre colonias de rizobacterias. A partir de los resultados obtenidos en el ensayo anterior se eligieron los aislados bacterianos B1, B12 y B58 para las pruebas de competencia *in vitro* (Tabla 1).

Tabla 1: Combinaciones de los aislamientos bacterianos seleccionados para evaluar por pares en arreglos de competencia *in vitro*.

Competencia	Notación Utilizada	Competencia	Notación Utilizada
B1 vs B1	B1B1	B1 vs B12	B1B12
		B1 vs B58	B1B58
B12 vs B12	B12B12	B12 vs B1	B12B1
		B12 vs B58	B12B58
B58 vs B58	B58B58	B58 vs B1	B58B1
		B58 vs B12	B58B12

Se estableció un protocolo de competencia bacteriana sucesiva de 12 ciclos. Cada ciclo con una duración de 48 horas. En cada una de las interacciones evaluadas (Tabla 1), la colonia del aislamiento ubicado a la derecha se denominó “Colonia Causa” y la colonia ubicada a la izquierda se denominó “Colonia Efecto”. Para la evaluación de cada interacción dual, una microgota (10 µL a 10^8 UFC/mL) de cada aislamiento (“Colonia Causa” y “Colonia Efecto”) fue colocada en cajas de Petri conteniendo TSA al 50% y a una separación entre centros de 0,8 cm.

Las cajas de Petri se dejaron en reposo para permitir que las microgotas se absorbieran y luego fueron incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas. Después de cada ciclo de competencia, se recuperó aproximadamente la mitad de la “Colonia Efecto” (la parte más cercana a la “Colonia Causa”), se transfirió a tubos eppendorf de 2 mL conteniendo 0,5 mL de agua destilada estéril y se agitó en vortex durante un minuto para ser utilizada como inóculo de la colonia “Efecto” en el siguiente ciclo de competencia. En cada ciclo de competencia la colonia “Causa” fue preparado a partir de los crioviales conservados. Después de inocular un nuevo ciclo de competencia, a los tubos eppendorf conteniendo la biomasa resuspendida de la colonia “Efecto” fueron conservados como se describió anteriormente. Al finalizar cada ciclo, se tomaron fotografías a fondo oscuro y con luz transmitida con el fin de evaluar alteraciones morfológicas en las colonias “Efecto”.

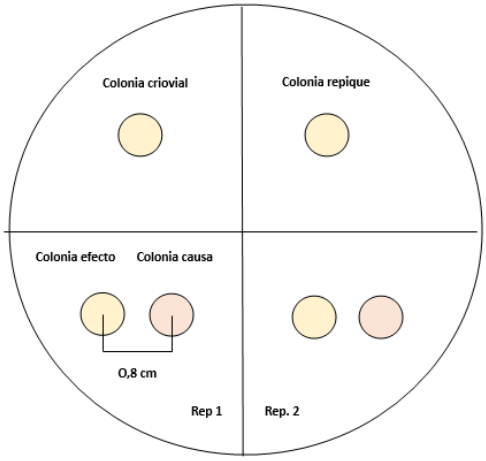


Figura 3. Esquema de inoculación de las interacciones de competencia *in vitro*.

Los experimentos de competencia se realizaron por cuadruplicado. Adicionalmente, se mantuvo un control de repique que consistió en una colonia de cada uno de los aislados bacterianos que se repicó de manera individual en cada uno de los tiempos de competencia y se tuvo otro control que era la siembra de una colonia de cada uno de los aislados bacterianos provenientes de crioviales conservados.

Al final de cada ciclo de competencia, se obtuvieron imágenes fotográficas capturaron de dos formas: la primera con un fondo oscuro, para resaltar las diferencias en el color y otros aspectos morfológicos de las colonias bacterianas; y la segunda utilizando un panel de luz LED, con el fin de destacar los bordes y estructuras internas de las colonias, permitiendo una observación más detallada.

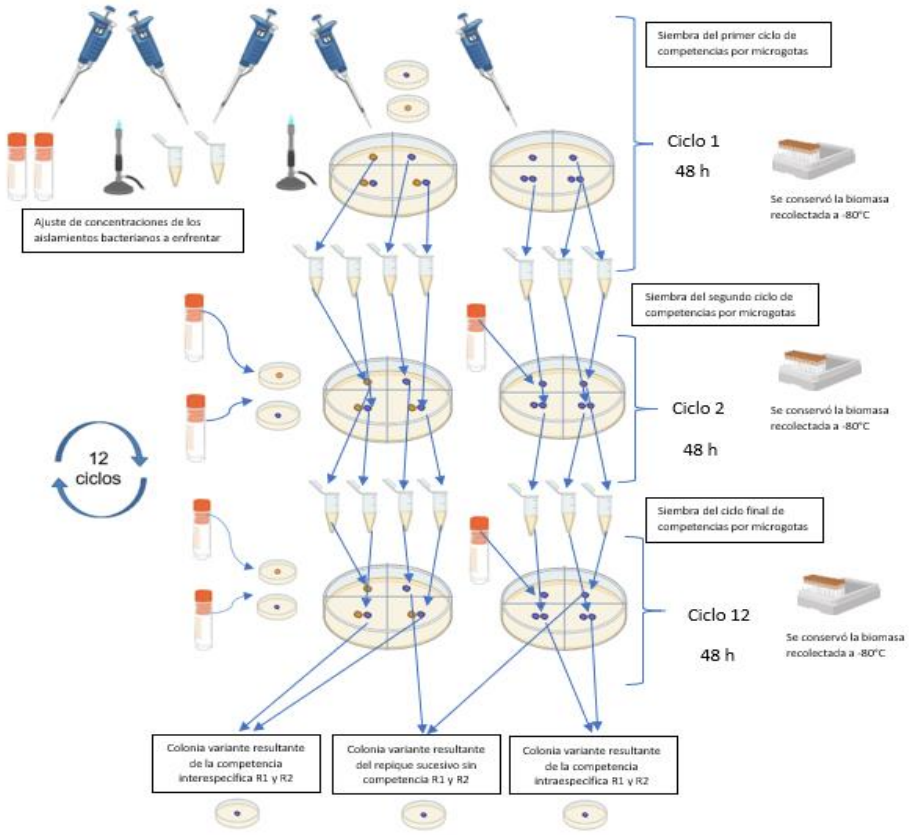


Figura 4. Flujograma del proceso experimental de las competencias microbianas.

7.5. Rasgos de promoción de crecimiento in vitro post competencia: Con el fin de evaluar el impacto de la competencia bacteriana en la solubilización de fosfatos y la producción de indoles totales, se compararon las poblaciones variantes obtenidas, los aislados ancestros/originales y los controles de repique. Se realizaron las pruebas de solubilización de fosfatos en medio PVK y la cuantificación de indoles totales, siguiendo los protocolos detallados en las secciones 7.2.1 y 7.2.2, respectivamente. Estos análisis permitieron identificar posibles diferencias fenotípicas asociadas a la competencia bacteriana.

7.6. *Procesamiento de las imágenes de competencia y medición de los bordes de las colonias.* Para obtener información de los cambios morfológicos de las colonias durante las interacciones de competencia, se tomaron fotografías al final de cada ciclo de interacción (48 horas). Éstas fueron procesadas en el software ImageJ para resaltar en color verde los bordes de la colonia. El ancho del borde fue medido utilizando herramientas propias del software. Este valor fue utilizado para determinar porcentajes de variación (Ecuación 2) en el ancho del borde con respecto al control.

$$\%Vb = \frac{ABt - ABc}{ABc}\ x\ 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En donde:

%Vb: Variación porcentual del ancho del borde de la colonia respecto al control

ABt: es el ancho del borde de la colonia efecto (pixeles/mm)

ABc: es el ancho del borde de la colonia control (pixeles/mm)

7.7. Secuenciación de las poblaciones bacterianas variantes resultantes de las interacciones competitivas y de repique para el aislamiento B12. La secuenciación de las poblaciones bacterianas variantes resultantes de las interacciones competitivas y de repique para el aislamiento B12 se realizó con el objetivo de confirmar que las variantes morfológicas resultantes para este aislamiento conservaban la identidad genética de su aislamiento parental y que, por lo tanto, no se trataban de eventos de contaminación cruzada, sino que el arreglo experimental había provocado variaciones morfológicas en B12. Se utilizó el procedimiento descrito en el numeral 7.23.5

Para la construcción de los dendogramas (NJ), se seleccionaron secuencias de referencia de los genes ADNr 16S de la base de datos de GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Las secuencias fueron alineadas, utilizando el método “ClustalW” en software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 12.0.10 (Rivera, et al, 2016). El árbol filogenético se construyó utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ). Las distancias evolutivas fueron inferidas utilizando el modelo de Kimura de dos parámetros (K2P). El soporte de las ramas se evaluó mediante un análisis Bootstrap de 1000 réplicas para estimar la robustez de los clados. El árbol fue enraizado utilizando *Paenibacillus polymyxa* como outgroup (Hoang, et al., 2018; Minh, et al., 2013).

Objetivo 3. Comparar la capacidad de aislamientos bacterianos parentales y sus variantes fenotípicas en la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum)* bajo condiciones de vivero.

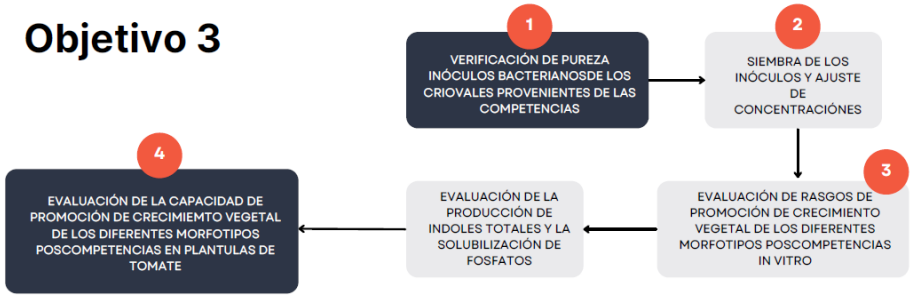


Figura 5. Flujograma de actividades para el desarrollo del objetivo específico 3.

7.6. Evaluación del efecto de la inoculación de los aislados ancestros y las poblaciones variantes resultantes sobre rasgos de promoción del crecimiento vegetal en plántulas de tomate (S. lycopersicum) bajo condiciones de vivero. Semillas de tomate cultivar choto comercializadas por la empresa Fercón cultivar fueron superficialmente desinfectadas con lavados sucesivos de hipoclorito al 1% durante 1 min y agua destilada estéril, y posteriormente pregerminadas en cámaras húmedas durante cuatro días. Grupos de cuatro semillas pregerminadas se plantaron en recipientes de icopor cónicos (alto: 13,2 cm; diámetro inferior: 5,5 cm; diámetro superior; 9,5 cm) conteniendo 400 g de suelo arenoso (90% arena, 10% suelo de vivero). Se determinó la máxima capacidad de retención de humedad del sustrato (suelo arenoso) en cuestión y se mantuvo un régimen de riego a capacidad de campo. Los recipientes fueron distribuidos en un diseño por bloques completamente aleatorizado y cada unidad experimental consistió en un recipiente de icopor con cuatro plántulas.

Para la preparación de los inóculos bacterianos, se realizó el proceso metodológico descrito en la sección 7.3. Se evaluaron individualmente los aislados ancestros de B1, B12 y B58 (proveniente de viales crioconservados), y aquellas variantes postcompetencia que mostraron mayor variación en los rasgos de promoción de crecimiento vegetal evaluados. Durante la experimentación se realizaron inoculaciones semanales durante un mes. El experimento se

realizó bajo condiciones de invernadero en instalaciones de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Antioquia. Al final del periodo de crecimiento, las plántulas se cosecharon y se midieron las siguientes variables: Longitud aérea de la plántula (LA), longitud radicular (LR), peso seco de la plántula (PS) y número de hojas (NH). Para obtener datos de peso seco, las plántulas se colocaron en bolsas de papel y se llevaron a secar en horno a 50°C durante aproximadamente 48 horas, posteriormente el peso seco se determinó en balanza analítica. Los resultados fueron analizados como se describió en el numeral 7.4

7.7. Re-secuenciación de las poblaciones bacterianas evaluadas en plántulas de tomate: aislamientos parentales (B1Cr, B12Cr, B58Cr) variantes resultantes de las interacciones competitivas (B1B1, B12B1, B1B58) y variantes de repique (B1RPQ, B12RPQ, B58RPQ). La secuenciación de las poblaciones bacterianas evaluadas en plántulas de tomate se realizó con el objetivo de confirmar que las variantes morfológicas resultantes para cada aislamiento conservaban la identidad genética de su aislamiento parental y que, por lo tanto, no se trataban de eventos de contaminación cruzada, sino que el arreglo experimental había provocado variaciones morfológicas en los aislamientos parentales.

Para ello, se realizó el procedimiento descrito en el numeral 7.2.5. Para la construcción de los dendogramas (NJ), se seleccionaron secuencias de referencia de los genes ADNr 16S de la base de datos de GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Las secuencias fueron alineadas, utilizando el método “ClustalW” en software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 12.0.10 (Rivera, et al, 2016). El árbol filogenético se construyó utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ). Las distancias evolutivas fueron inferidas utilizando el modelo de Kimura de dos parámetros (K2P). El soporte de las ramas se evaluó mediante un análisis Bootstrap de 1000 réplicas para estimar la robustez de los clados. (Hoang, et al., 2018; Minh, et al., 2013). Para el aislamiento B1, el árbol fue enraizado utilizando la cepa *Caballeronia udeis Hg2*, mientras que para el árbol de B12 se usó la cepa *Paenibacillus polymyxa* como outgroup y finalmente el árbol de B58 fue enraizado con la cepa *Paraburkholderia tropica* AFS07264

8. Resultados

OBJETIVO 1

1.1) Evaluación de rasgos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*

Tabla 2: Rasgos de promoción de crecimiento y desarrollo vegetal evaluados en los aislamientos bacterianos seleccionados.

Aislado bacteriano	Abundancia crecimiento		Solubilización de Fosfatos		Indoles totales (µg/mL)	Actividad ureasa
	TSA 25%*	Agar suelo*	%ERS**	IS***		
B1	(+)	(+)	130,3 ±4,7	2,30 ± 0,05	1,69 ± 0,7	(-)
B3	(+)	(+/-)	---	---	0,37 ± 0,4	(-)
B4	(+)	(+)	123,6 ±2,9	2,24 ± 0,03	0,67 ± 0,2	(+) tardío
B7	(+)(+)	(+)	112,5 ±8,7	2,13 ± 0,10	1,29 ± 0,3	(-)
B8	(+)	(+/-)	---	---	2,30 ± 1,8	(+) débil
B10	(+)	(+)(+)	106,9 ±3,0	2,07 ± 0,03	1,54 ± 0,3	(-)
B11	(+)(+)	(+)(+)	119,4 ±3,8	2,19 ± 0,04	1,88 ± 0,8	(-)
B11B	(+)	(+)	113,5 ±2,6	2,14 ± 0,02	4,40 ± 3,8	(+) débil
B12	(+)	(+)	131,0 ± 9,1	2,31 ± 0,09	1,21 ± 0,7	(-)
B15	(+)(+)	(+)	96,6 ± 1,4	1,97 ± 0	1,80 ± 0,3	(-)
B20	(+)(+)	(+)(+)	112,5 ± 3,9	2,13 ± 0,03	4,15 ± 3,0	(+)
B33	(+)	(+)(+)	147,2 ± 4,6	2,47 ± 0,05	2,17 ± 1,3	(-)
B41	(+)	(+)	---	---	3,59 ± 0,3	(+) débil
B42	(+/-)	(+/-)	---	---	0,20 ± 0,1	(-)
B47	(+)(+)	(+)(+)	135,0 ± 8,6	2,30 ± 0,01	3,01 ± 1,1	(-)
B50	(+)(+)	(+)	---	---	1,64 ± 0,1	(+)
B56	(+)(+)	(+)(+)	100,0 ± 0	2,00 ± 0,00	0,35 ± 0,5	(-)
B57	(+/-)	(+/-)	---	---	0,14 ± 0,3	(+)
B58	(+)	(+)(+)	153,2 ± 6,4	2,53 ± 0,07	1,16 ± 0,2	(-)
B60	(+)	(+)(+)	118,3 ± 1,6	2,18 ± 0,02	1,38 ± 0,2	(+)
B64	(+/-)	(+/-)	---	---	2,93 ± 0,3	(-) débil
B68	(+)	(+/-)	---	---	7,05 ± 3,5	(-)
B69	(+)	(+)(+)	110,9 ± 1,2	2,11 ± 0,01	1,08 ± 0,8	(-)
B79	(+)	(+/-)	108,3 ± 2,3	2,09 ± 0,01	2,39 ± 1,6	(+)
B81	(+)	(+)	138,7 ± 4,1	2,39 ± 0,01	6,83 ± 1,1	(-)
B82	(+)(+)	(+)(+)	93,6 ± 2,1	1,94 ± 0,01	2,53 ± 0,3	(-)
BS4	(+)	(+)	127,9 ± 5,3	2,28 ± 0,04	0,23 ± 0,1	(+)

(+) (+) Muy abundante, (+) Abundante, (+/-) Abundancia media o normal, (-) Poco abundante

* Trypticase Soy Agar (Agar tripticasa de soya) al 25% de la concentración

** Porcentaje de eficiencia de solubilización de fosfatos

*** Índice de solubilización de fosfatos.

Se obtuvieron 82 aislamientos bacterianos a partir de las muestras de suelo. Sin embargo, 27aislamientos con características macroscópicas diferenciables, como la arquitectura y color de la colonia, fueron utilizados para la caracterización fenotípica, en la que se incluyeron los rasgos de promoción de crecimiento vegetal. En la Tabla 1. se indican los valores obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados. B1, B4, B12, B20, B33, B41, B47, B58, B68, B81, BS4 fueron seleccionados como los de mayor potencial para promover el crecimiento vegetal y fueron identificados a nivel de género y especie (Tabla 2.). Se encontró que B1, B33, B41, B47, B58, y B68 pertenecen al filo *Pseudomonadota*, B1 y B58 a la familia *Burkholderiaceae*, y B33 a la familia *Pseudomonadaceae* (B33). Por otra parte, se encontraron dos aislados (B54, B12) pertenecientes al género *Bacillus* y dos aislados (B81, B4) pertenecientes al filo *Actinomycetota*.

Tabla 3. Identificación molecular de los aislamientos bacterianos preseleccionados.

Código	Nombre	Cobertura (%)	Identificación (%)	Accesión
B1	*Caballeronia arví*	100	98	NR_145594.1
B4	*Rhodococcus pseudokoreensis*	100	99	CP070619.1
B12	*Bacillus zhangzhouensis*	100	99	MN826587.1
B33	*Pseudomonas baetica*	98	97	MT078669.1
B41	*Pelomonas sccharophila*	98	99	FJ513082.1
B47	*Caulobacter* sp.	100	93	KY085924.1
B58	*Parabulkholderia flava*	100	99	MH379802.1
B68	*Microvirga ossetica*	99	98	NR_156049.1
B81	*Kitasatospora phosaanea*	100	99	MF093185.1
BS4	*Bacillus bataviensis*	100	96	EU334358.1

El aislamiento “B20” no pudo ser identificado por la baja concentración del ADN extraído.

1.2) Pruebas de promoción de crecimiento vegetal de los aislamientos bacterianos preseleccionados sobre el modelo vegetal tomate *(S. lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero

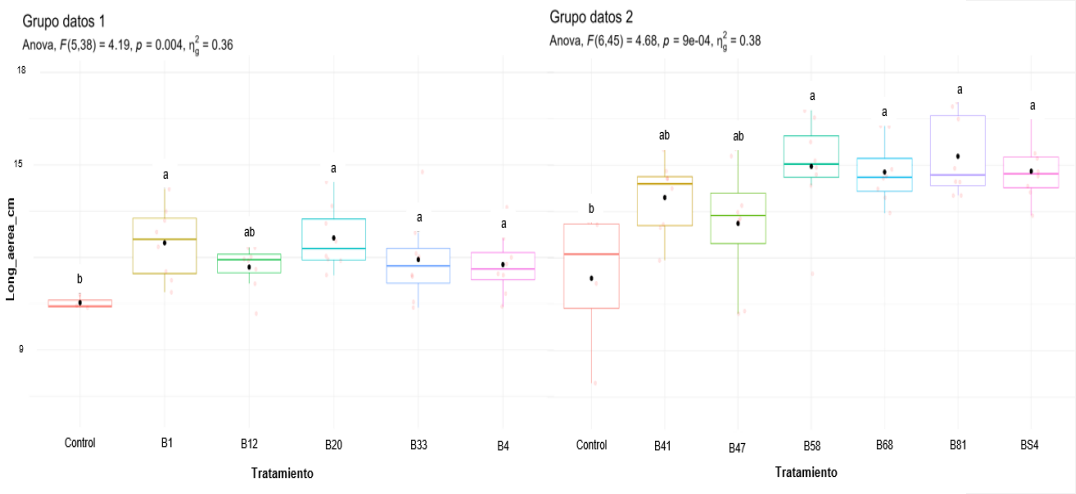


Figura 6. *Efecto de la inoculación de los aislamientos bacterianos preseleccionados sobre la longitud aérea (cm) de plántulas de tomate (S. lycopersicum) bajo condiciones de vivero*. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes (Grupo de datos 1 y Grupo de datos 2). En ambas pruebas, las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$).

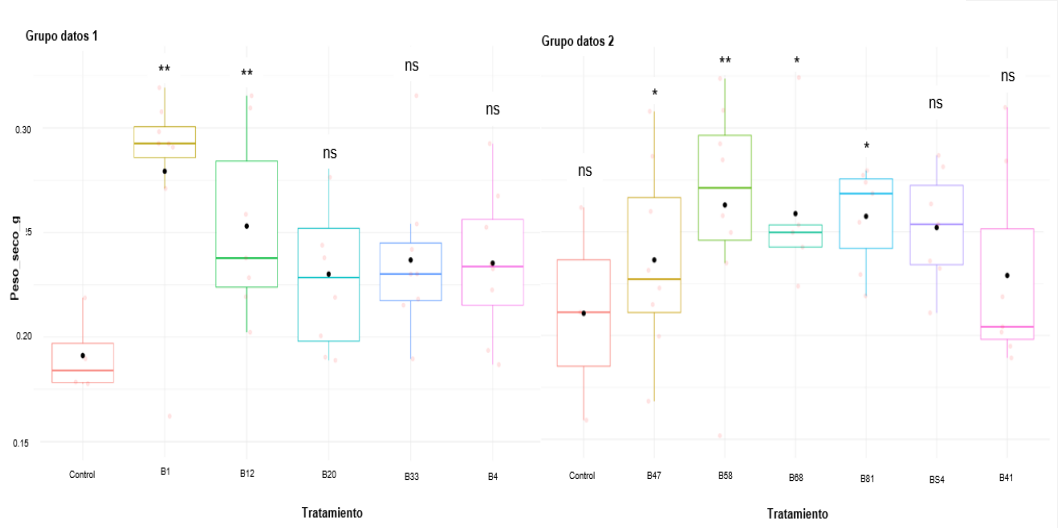


Figura 7. Efecto de la inoculación de diferentes aislamientos bacterianos preseleccionados sobre el peso seco (g) de plántulas de tomate (S. lycopersicum) bajo condiciones de vivero. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes (Grupo de datos 1 y Grupo de datos 2). Se realizó una prueba T-student para comparar cada tratamiento con el control de su grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y "ns" indica diferencias no significativas ($p \geq 0.05$). Los puntos negros representan las medias y las líneas de las cajas representan la mediana, los cuartiles y los valores extremos. Cada tratamiento corresponde a un aislamiento bacteriano diferente.

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos con respecto a la longitud aérea (Fig. 6) y peso seco de las plantas (Fig. 7). Igualmente, el incremento en la concentración del inóculo no tuvo efectos significativos sobre estas variables. La inoculación con diferentes aislamientos bacterianos tuvo un efecto significativo sobre la longitud aérea de las plántulas de tomate en ambos datos de grupos evaluados. Sin embargo, con respecto al control, las plantas inoculadas con los tratamientos con los aislamientos B1, B4, B20, y B33, promovieron un incremento significativo en la longitud aérea comparado con el control ($p < 0.05$), mientras que B12 no mostró diferencias significativo frente al control. En el grupo de datos 2, los aislamientos B58, B68, B81, y BS4 mostraron mejorar las longitudes aéreas de manera significativamente mayor que el control ($p < 0.05$), mientras que aquellas inoculadas con B1, B12, B47, B58, y B68 registraron un peso seco superior al control, siendo significativamente mayores los tratamientos B1, B12 y B58, los cuales obtuvieron valores *P* inferiores a 0.001. Lo resultados anteriores indican los efectos bioestimulantes de estas cepas.

Control	B1 (10^6 UFC/mL)	B1 (10^8 UFC/mL)

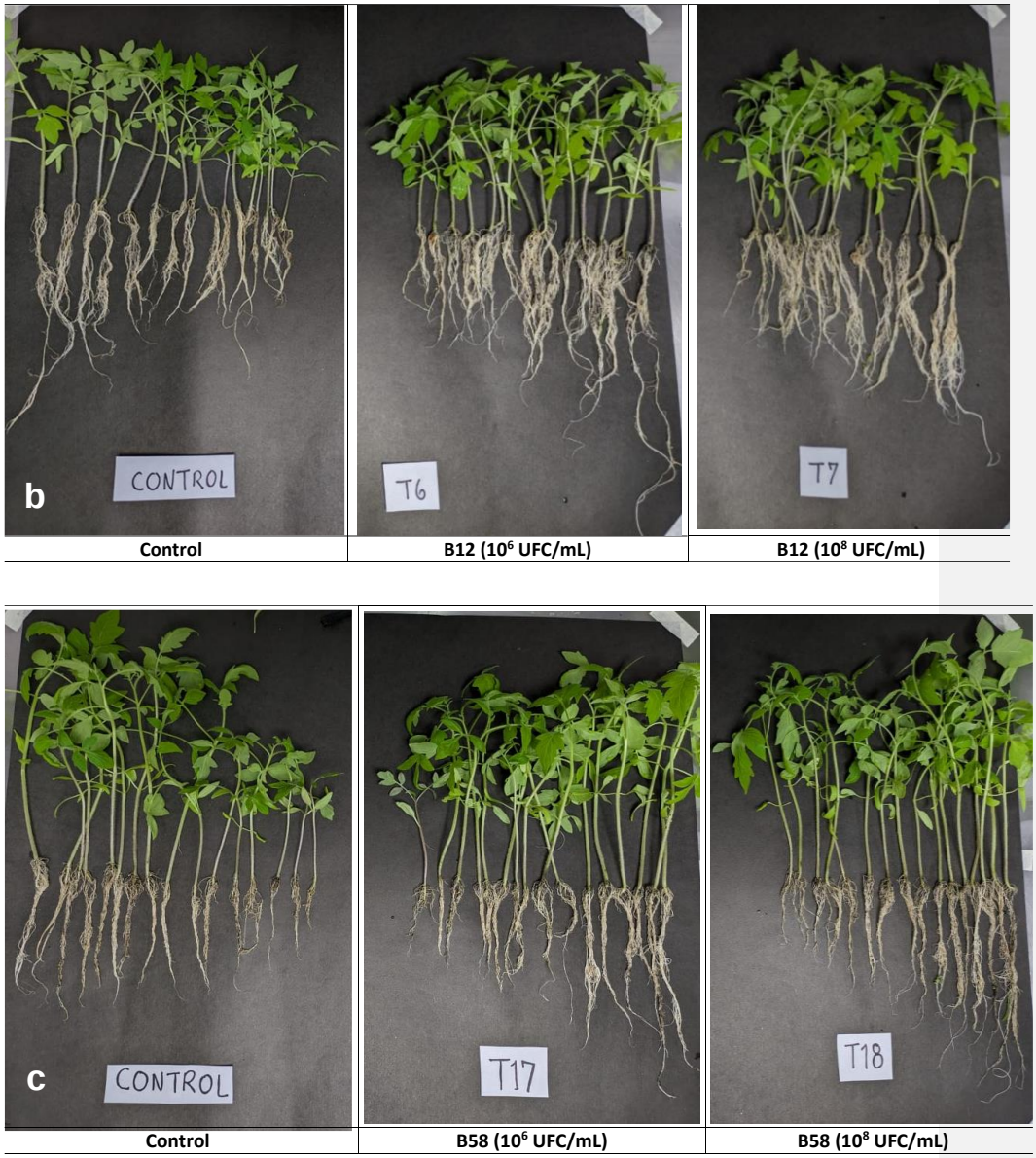
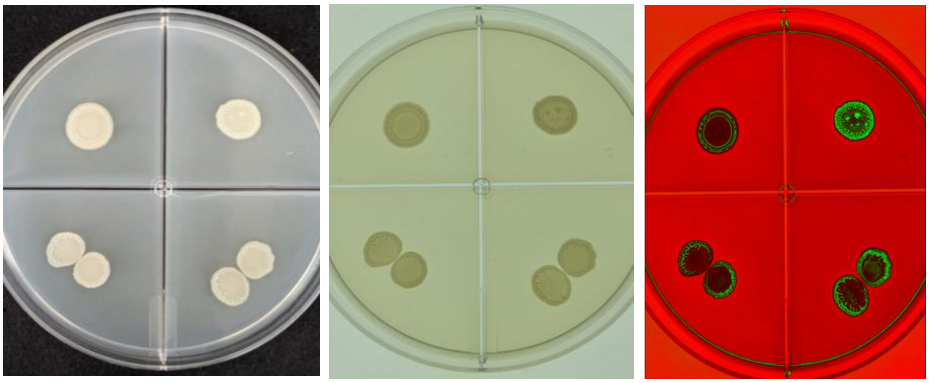


Figura 8. Efecto de la inoculación de los aislamientos B1 (a), B12 (b) y B58 (c) a diferentes concentraciones (10^6 UFC/mL y 10^8 UFC/mL) sobre el desarrollo de plántulas de tomate bajo condiciones de vivero.

OBJETIVO 2

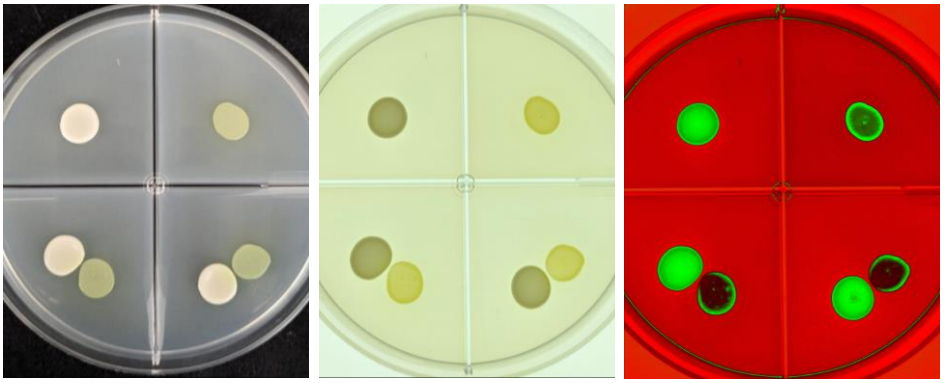
2.1) Cambios morfológicos en las colonias bacterianas asociados a las interacciones de competencia y a los repiques sucesivos

En las figuras 9 y 10 se muestran algunas de las imágenes obtenidas durante los experimentos de competencia entre los aislamientos bacterianos seleccionados. Cada 48 horas (correspondiente a un ciclo de competencia) se tomaron fotografías a fondo oscuro (9a y 10a) y a fondo contra luz (9b y 10b). El procesamiento de imágenes en el software ImageJ (Fig. 9c y 10c) permitió mejorar el contraste facilitando la visualización de los cambios morfológicos asociados a cada interacción. Durante los enfrentamientos duales, en la zona de mayor proximidad entre colonias, se observaron algunas variaciones en la estructura del anillo formado (Fig. 9a y 9b) y cambios aparentes en la densidad en el centro de la colonia (Fig. 10c) con respecto a la colonia de repique y criovial.



(a) (b) (c)

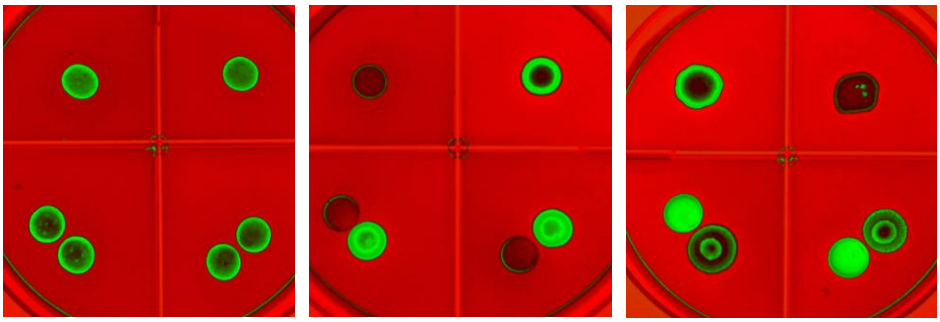
Figura 9. Interacción de competencia B12B12 (ciclo 4). Imagen a fondo oscuro (a), imagen a contraluz (b), imagen procesada en el software IMAGE J (c). Colonia B12 criovial (cuadrante superior izquierdo), colonia B12 repique (cuadrante superior derecho), interacción B12B12 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho).



(a) (b) (c)

Figura 10. Interacción de competencia B1B58 (ciclo 1). Imagen a fondo oscuro (a), imagen a contraluz (b), imagen procesada en el software IMAGE J (c). Colonia B1 de criovial (cuadrante superior izquierdo), colonia B58 de criovial (cuadrante superior derecho), interacción B1B58 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho).

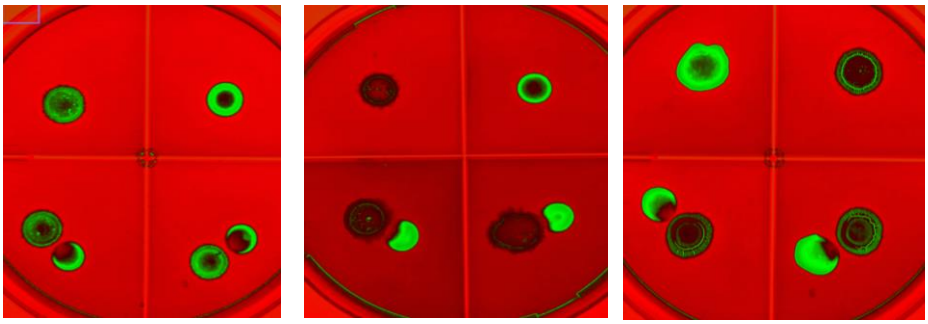
Las figuras 11, 12 y 13 muestran algunas imágenes obtenidas durante las interacciones de competencia que evidenciaron cambios en la densidad (Fig. 11) y deformación en los bordes de la colonia (Fig.12). Además, se evidenció alteración en la estructura del anillo interno de la colonia B12 (Fig. 13)



(a) (b) (c)

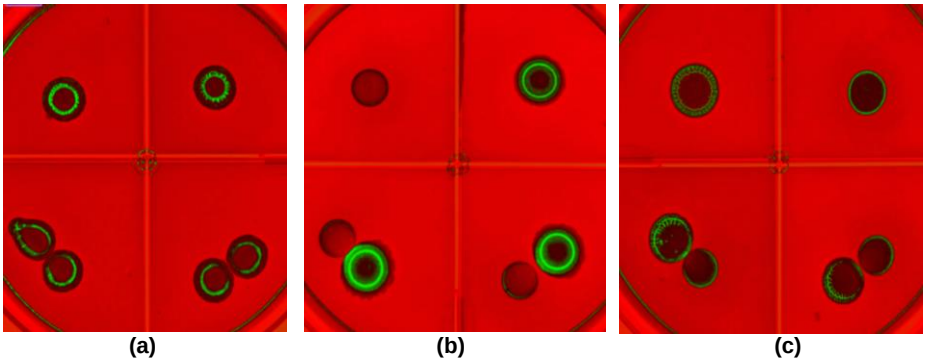
Figura 11. Imágenes procesadas en el software IMAGE J. (a) Interacción de competencia B58B58 (ciclo 1). Colonia B58 criovial (cuadrante superior izquierdo), colonia B58 repique (cuadrante superior derecho), interacción B58B58, replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho); (b) Interacción de competencia B58B1 (ciclo 2). Colonia B58 repique (cuadrante superior izquierdo), colonia B1 repique (cuadrante superior derecho),

interacción B58B1 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho); (c) Interacción de competencia B1B12 (ciclo 6). Colonia B1repique (cuadrante superior izquierdo), colonia B12 repique (cuadrante superior derecho), interacción B1B12 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho).



(a) (b) (c)

Figura 12. Imágenes procesadas en el software IMAGE J. (a) interacción de competencia B12B1 (ciclo 2), (b) interacción de competencia B12B1 (ciclo 12). Colonia B12 repique (cuadrante superior izquierdo), colonia B1 repique (cuadrante superior derecha), interacción B12B1 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho); (c) interacción de competencia B1B12 (ciclo 2), colonia B1 repique (cuadrante superior izquierdo), colonia B12 repique (cuadrante superior derecho), interacción B1B12 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho).

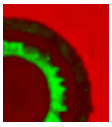
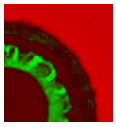
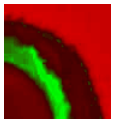
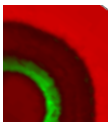
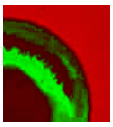
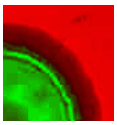
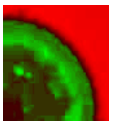
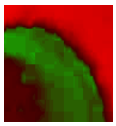
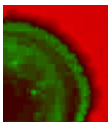
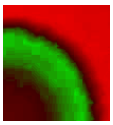


(a) (b) (c)

Figura 13. Imágenes procesadas en el software IMAGE J. (a) interacción de competencia B12B12 (ciclo 1). Colonia B12criovial (cuadrante superior izquierdo y derecho), colonia B12 repique (cuadrante superior derecho), interacción B12B12 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho); (b) interacción de competencia B58B12 (ciclo 2). Colonia B58 repique (cuadrante superior izquierdo), colonia B12 repique (cuadrante superior derecha), interacción B58B12 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho); (c)

interacción de competencia B12B58 (ciclo 4). Colonia B12 repique (cuadrante superior izquierdo), colonia B58 repique (cuadrante superior derecho), interacción B12B58 replica 1 (cuadrante inferior izquierdo), replica 2 (cuadrante inferior derecho).

En las interacciones B58B1 (ciclo 2) y B1B12 (ciclo 6), observadas en las figuras 11b y 11c, respectivamente, se identificaron cambios aparentes en la densidad de la colonia de B1: la colonia B1 repique (Fig. 11 cuadrante superior derecho) muestra una segmentación notable, en donde el centro de la colonia presenta baja densidad y la periferia alta densidad, con un borde grueso que ocupa la mitad del diámetro de la colonia. En la interacción de B1 con B58, la segmentación entre el centro y la periferia persiste, pero ambas regiones son densas, mientras que la colonia de B58 cercana a la interacción muestra una discontinuidad en el borde en comparación con la colonia de repique (figura 12b, cuadrante superior izquierdo); en la interacción B1B12. En la figura 11c, B1 actúa como colonia "efecto" frente a B12 como "causa". En este caso, la colonia B1 repique (figura 12c, cuadrante superior izquierdo) cada de B1 presenta nuevamente una segmentación entre el centro y la periferia. Sin embargo, durante la competencia, la colonia B1 se vuelve homogéneamente densa, con un borde más delgado y discontinuo (figura 12c, cuadrantes inferiores). B12, por su parte, exhibe un anillo céntrico y un borde marcado durante la competencia, mientras que B12 repique (figura 12c, cuadrante superior derecho) su colonia repicada en T6 no presenta el anillo, pero muestra un borde sobresaliente y dentado. En presencia de B1, la colonia de B12 desarrolla nuevamente un anillo céntrico prominente, lo que podría indicar sugiere que la competencia influye directamente en la aparición de estructuras morfológicas en las colonias.

	Criovial	Repique	(B12 vs B12)	(B12 vs B1)	(B12 vs B58)
Ciclo 1					
Ciclo 2					

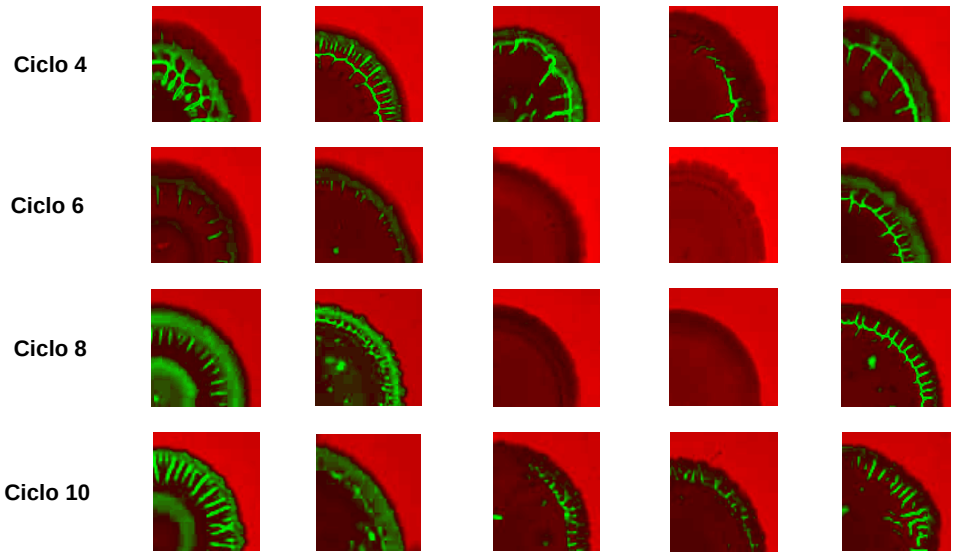


Figura 14. Cambios morfológicos de B12 bajo diferentes condiciones de competencia, crecimiento individual y de repique. Imágenes procesadas con el filtro "Thal" (ImageJ) que muestran la morfología colonial del aislamiento B12.

Por otra parte, se observa en la figura 14 que las interacciones de competencia bacteriana indujeron cambios fenotípicos significativos en la morfología colonial del aislamiento B12, particularmente en la estructura del anillo céntrico. Sin embargo, también se observaron variaciones en la morfología de las colonias provenientes de criovial y de los repiques sucesivos, aunque estas variaciones difieren ligeramente de las variaciones resultantes de las interacciones competitivas. Las respuestas morfológicas en B12 muestran tendencias dinámicas y dependientes a lo largo de los ciclos de experimentación, esto podría estar relacionado con diferentes mecanismos adaptativos frente a las condiciones experimentales que representan diferentes tipos de presión biótica como la competencia, los repiques sucesivos y la criopreservación. Con base en estos resultados se cuantificaron variaciones en el ancho del borde de las colonias B1, B12 y B58.

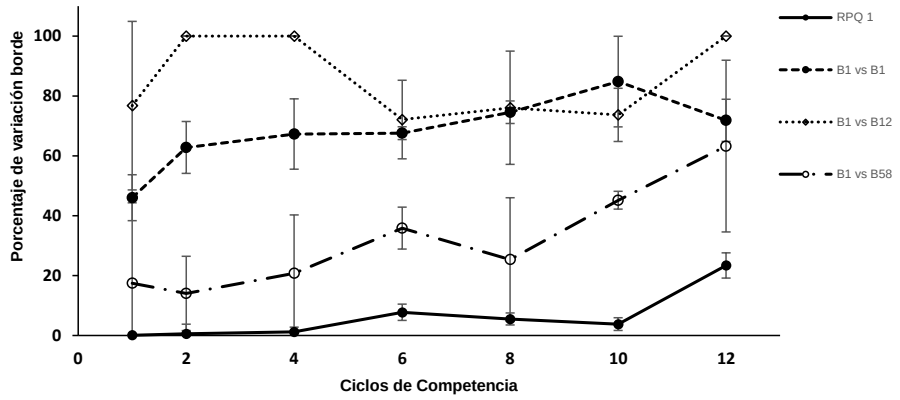


Figura 15. Variación del ancho del borde de B1 en diferentes interacciones de competencia y de B1 repique, con respecto a B1 criovial.

Las siembras sucesivas tuvieron un impacto mínimo (< 20%) sobre el grosor del borde de B1 con respecto al control a lo largo de los ciclos (Fig. 15). En contraste, la interacción B1B1 generó una disminución progresiva en el grosor la variación, alcanzando un 60% en los primeros ciclos y un 80% en el ciclo 10. La interacción B1B12 produjo la mayor variación disminución en el grosor del borde, llegando a “desaparecer” por completo l (100%) en desde el ciclo 2 y manteniéndose por encima del 70% durante todo el tiempo de evaluación. Aunque hubo una reducción del 30% en el ciclo 6, la variación se mantuvo elevada y mostró un incremento sostenido hasta el ciclo 12. Esto sugiere que la interacción de B1 con B12 genera un estrés competitivo que altera la morfología de B1. En el caso de la Por otra parte, en la interacción B1B58, las reducciones en el grosor del borde de B1 fueron inferiores al 50% indicando un efecto menos significativo de B58. variación fue menor en comparación con B1B12. Durante los primeros ciclos (2-4), el grosor del borde fluctuó entre un 40-50%, disminuyendo progresivamente desde el ciclo 6 hasta alcanzar un 60% en el ciclo 12.

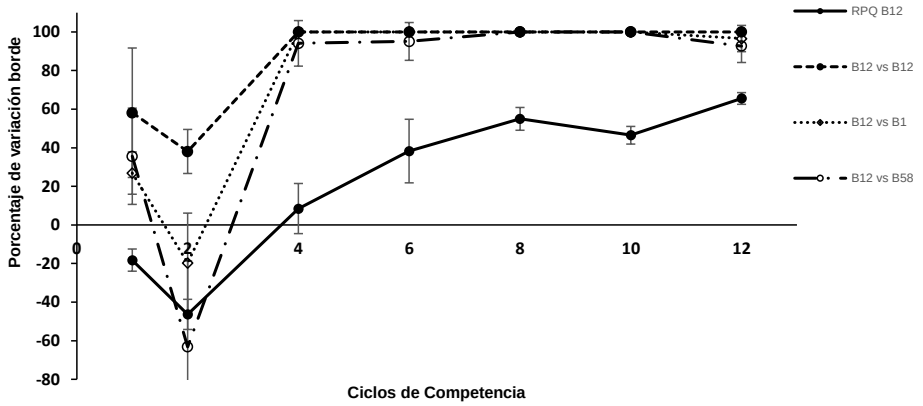


Figura 16. Variación del ancho del borde de B12 en diferentes interacciones de competencia, y de B12 repique, con respecto a B12 criovial.

Con respecto a B12, se observa una tendencia general en el ciclo 2. Todas las interacciones disminuyeron casi en un 100% el grosor del borde de B12 con respecto al control. Estos resultados sugieren que tanto B1 como B58 inducen un efecto sostenido sobre la morfología de la colonia de B12, y comparable al de la competencia B12B12. Para las interacciones B12B1 y B12B58 el comportamiento fue similar a B12B12 con desaparición casi completa del borde de B12 con respecto al control. Estos resultados sugieren que tanto B1 como B58 inducen un efecto sostenido sobre la morfología de la colonia de B12, y comparable al de la competencia B12 vs B12. En general, todas las interacciones de competencia mostraron alterar la morfología del borde de B12, sin embargo, la siembra sucesiva tuvo un impacto menor en el grosor del borde con respecto al control. Por su parte, en el caso de B58 se observa en las diferentes interacciones un patrón oscilatorio similar en la variación del grosor del borde (Fig. 16).

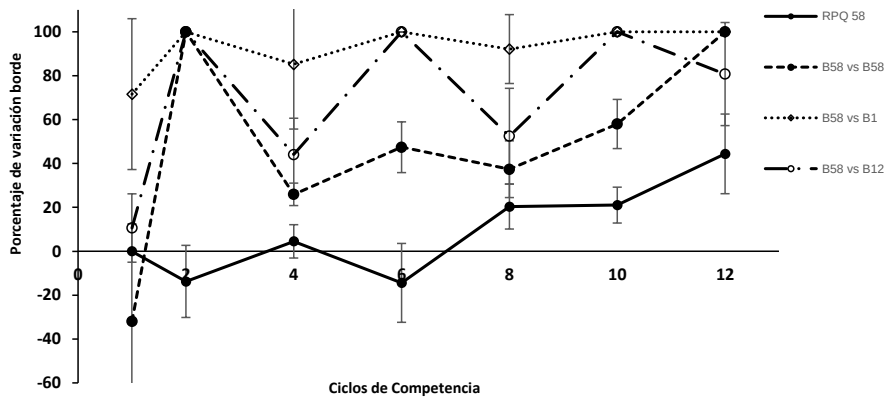


Figura 17. Variación del ancho del borde de B58 en las diferentes interacciones de competencia, y de B58 repique, con respecto a B58 criovial.

Los resultados de la figura 17 indican que diferentes interacciones de competencia inducen cambios morfológicos progresivos y consistentes en el borde de la colonia del aislamiento B58. Se observa que estos tres tratamientos presentan un patrón oscilatorio similar en la variación del grosor del borde, con alternancias entre pérdida y ganancia de grosor a lo largo de los ciclos. La interacción B58 vs B1 genera variaciones más estables, con valores que oscilan entre el 80 % y el 100 %, lo que indica una respuesta sostenida pero menos fluctuante. En contraste, las interacciones B58B58 y B58B12 muestran una pérdida abrupta del borde en el ciclo 2, seguida de oscilaciones más marcadas a lo largo del tiempo. En el caso de la interacción con la colonia hermana (B58), la variación inicia entre el 25 % y el 40 % y se incrementa progresivamente hasta alcanzar el 90 % de variación al final de los ciclos. Por su parte, la competencia con B12 mantiene un rango de variación más amplio y fluctúa entre el 40 % y el 90 % de variación respecto al control entre los ciclos 2 al 10

En contraste, el repique sucesivo sin competencia conserva una morfología más estable, sin embargo, se puede apreciar una pérdida progresiva del grosor del borde la colonia de B58 a lo largo de los ciclos de competencia. Estos resultados sugieren que la plasticidad del borde del aislamiento B58 está regulada por señales específicas de interacción.

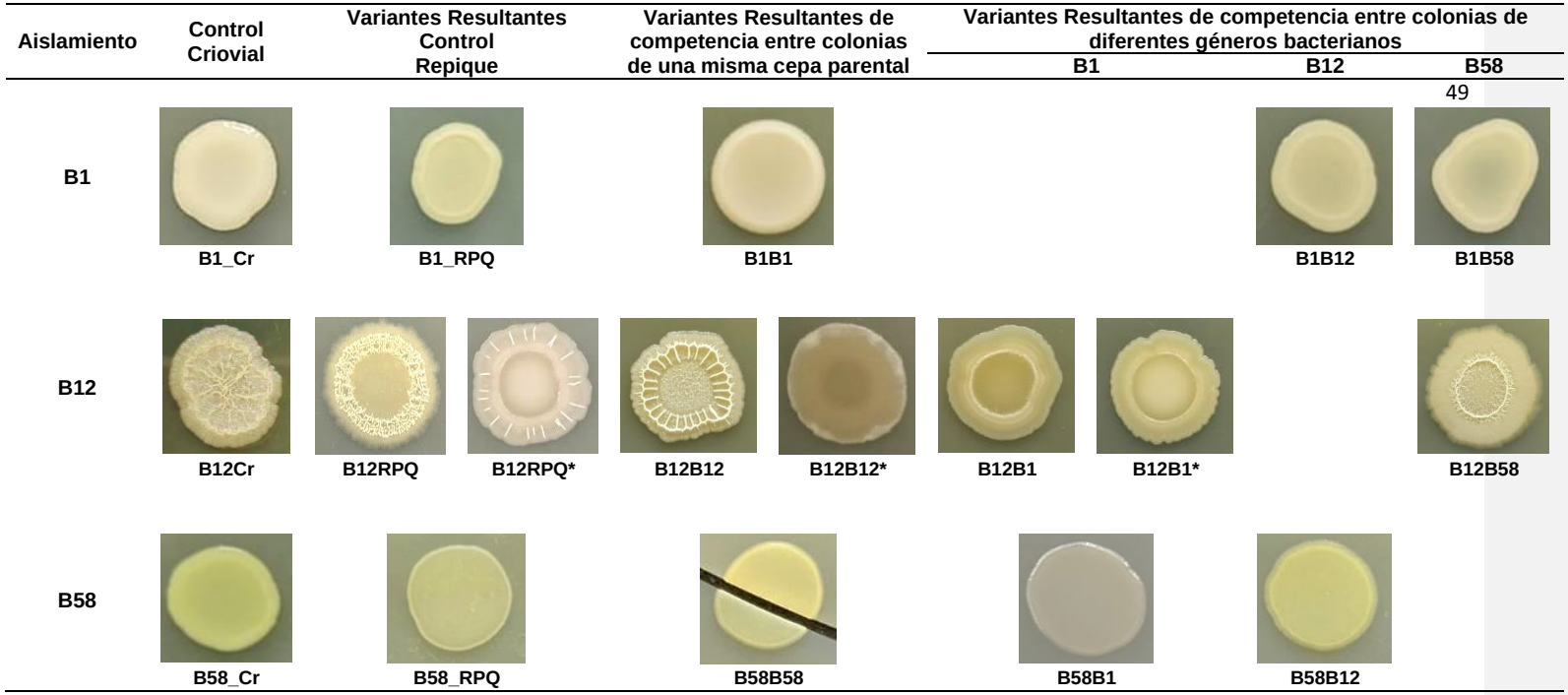


Figura 18. Morfología de las colonias de los aislamientos variantes morfológicos obtenidos. tras sucesivos ciclos de competencias y de crecimiento sucesivos de repique sin interacción en medio sólido. Se muestran las colonias de los aislamientos bacterianos B1, B12 y B58 en sus controles crioconservados (columna "Control Criovial") y tras 12 ciclos de repique sin competencia (columna "Control Repique"). Las columnas siguientes presentan las variantes morfológicas resultantes de las diferentes interacciones competitivas. Las imágenes reflejan la diversidad morfológica inducida por las diferentes condiciones de cultivo, evidenciando respuestas específicas según el tipo de interacción. Las morfologías incluyen cambios en borde, relieve, textura y pigmentación.

Se evidenciaron ligeras diferencias morfológicas en las colonias del aislamiento B1 bajo distintas condiciones experimentales tras los ciclos de competencia sucesiva. La colonia control (B1 criovial) presenta una morfología cremosa y homogénea, con bordes lisos y solo una leve reducción de densidad en el centro. En contraste, la colonia B1 repique muestra una coloración beige, bordes más definidos y una clara diferenciación entre un centro menos denso y una periferia más elevada. Las colonias sometidas a competencia (B1B1, B1B12 y B1B58) presentan morfologías similares a la de B1 repique, con ligeras variaciones en el borde y la densidad del

centro de la colonia. Estos resultados indican que las interacciones competitivas no modificaron de manera sustancial la morfología de B1, mientras que los ciclos de repique sí indujeron ciertos cambios estructurales, aunque sin alterar significativamente su forma general.

Por otra parte, el aislamiento B12 presentó una notable variabilidad morfológica en las colonias resultantes tras las competencias y siembras sucesivas. La colonia B12 criovial (parental) exhibe una superficie rugosa de forma homogénea en toda la colonia. En contraste, B12B12 muestra un morfotipo con pliegues bien definidos y organizados en forma de flor alrededor del centro. B12B12*, por su parte, presenta una colonia más plana, sin estructuras complejas en la superficie. Las colonias B12B1 y B12B1* comparten una morfología, en donde el centro de la colonia está fuertemente segmentado de la periferia, sin embargo, el centro de la colonia de B12B1 tiene una coloración más oscura que el centro de la colonia de B12B1*, la cual muestra un centro de color beige crema, similar al color de la periferia y un borde mucho más ondulado. Además, la colonia B12B58 muestra un centro de colonia con estructuras mucho más complejas y un anillo de pliegues pronunciados, mientras que la periferia se observa una textura lisa y borde de colonia dentado. Finalmente, las colonias de repique B12RPQ y B12RPQ* presentan morfologías ligeramente distintas: B12RPQ muestra una periferia con pliegues estructurados y un centro plano, mientras que B12RPQ* posee pliegues en forma de dientes en la periferia, manteniendo también un centro plano. Dada la alta diversidad morfológica encontrada, todos estos aislamientos fueron secuenciados para corroborar similitud genética con el aislamiento parental del que provenían (Fig. 19).

Las colonias del aislamiento B58 presentan una morfología mayormente conservada. La colonia criovial mantiene una forma circular y un color amarillo intenso. En contraste, las colonias de repique exhiben bordes más delgados y menor densidad. Aunque la mayoría de las colonias sometidas a competencia son similares al control, B58B1 destaca por cambios notables en color y textura, adoptando una tonalidad blanco translúcido y una superficie cerosa, lo que sugiere posibles adaptaciones o respuestas al estrés inducidas por los ciclos de competencia y repique.

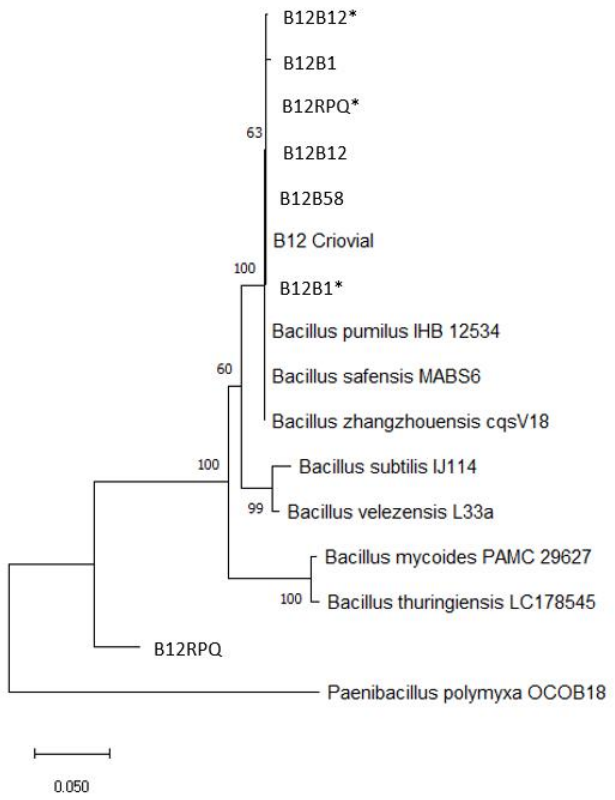


Figura 19. Análisis de similitud Neighbor Joining basado en secuencias parciales de la región ADNr 16S de los aislamientos bacterianos de B12: el aislamiento parental (B12 Criovial), los aislamientos variantes resultantes de las competencias (B12B12, B12B12*, B12B1, B12B1*, B12B58) y los aislamientos resultantes de las siembras sucesivas/repiques (B12R1, B12R2). Se usaron secuencias de referencias de GenBank del género *Bacillus*. El árbol filogenético se construyó utilizando el ´Neighbor Joining´ en el software MEGA y un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas. Los valores sobre las ramas indican porcentajes de soporte de Bootstrap (1000 réplicas). La escala representa la distancia evolutiva (sustituciones por sitio).

Se observa en el árbol filogenético que la mayoría de los aislamientos obtenidos de B12 (B12 criovial, B12B12, B12B12*, B12B1, B12B1*, B12B58, B12RPQ*) se ubican en un clado cercano con las secuencias de referencia de *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. zhangzhouensis*, exceptuando el aislamiento B12RPQ que se ubica en un clado externo lo que indica que está más distante evolutivamente que los demás microorganismos del árbol y posiblemente se trate de un evento de contaminación.

Al final de los 12 ciclos de competencias microbianas, fueron seleccionados 15 aislamientos (4 para B1, 7 para B12 y 4 para B58), los cuales fueron considerados como variantes fenotípicas (Fig. 18). Se evidenciaron diferencias morfológicas en las colonias del aislamiento B1 bajo distintas condiciones experimentales tras los ciclos de competencia sucesiva. La colonia control (B1 criovial) presenta una morfología cremosa y homogénea, con bordes lisos y solo una leve reducción de densidad en el centro. En contraste, la colonia B1 repique muestra una coloración beige, bordes más definidos y una clara diferenciación entre un centro menos denso y una periferia más elevada. Las colonias sometidas a competencia (B1B1, B1B12 y B1B58) presentan morfologías similares a la de B1 repique, con ligeras variaciones en el borde y la densidad del centro de la colonia. Estos resultados indican que las interacciones competitivas no modificaron de manera sustancial la morfología de B1, mientras que los ciclos de repique sí indujeron ciertos cambios estructurales, aunque sin alterar significativamente su forma general.

2.2) Impacto de las interacciones de competencia en los rasgos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*

2.3.1) Solubilización de fosfatos en medio PVK post-competencia

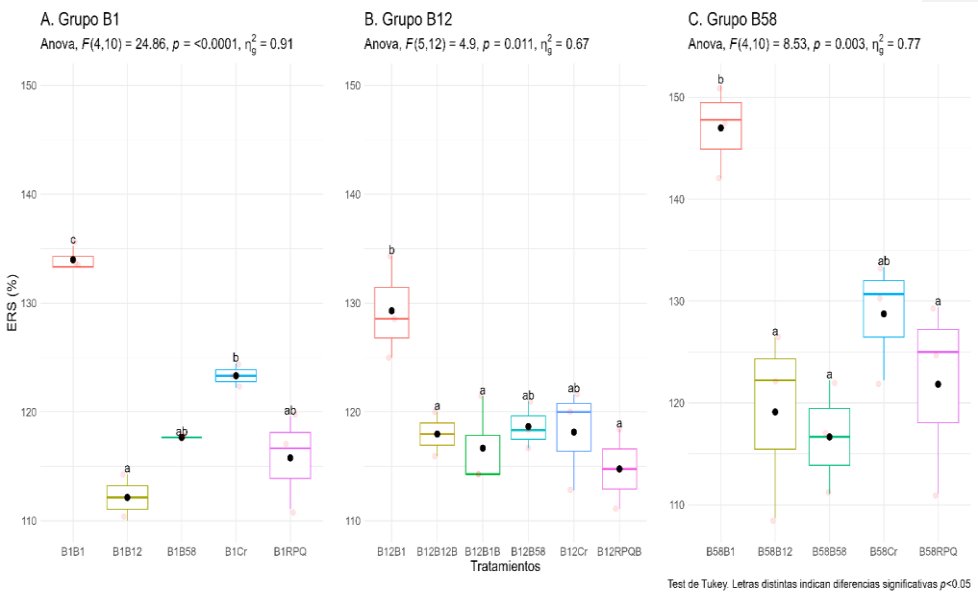


Figura 20. Eficiencia relativa de solubilización (%ERS) para las variantes seleccionadas. Cada panel muestra la comparación de la cepa parental y las variantes resultantes de las interacciones competitivas y el repique. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Las variantes B12B12A y B12RPQA no mostraron actividad.

Entre las variantes de B1, B1B1 mostró la mayor capacidad para solubilizar fósforo (%ERS = 134%) siendo significativamente mayor que los demás (Fig. 20). En contraste, B1B12 presentó la menor %ERS (aprox. 113%) indicando un posible efecto negativo de B12 sobre B1, sin embargo, esto también podría estar asociado a procesos de reselección en medios artificiales o una combinación de ambos efectos. B1Cr, B1B58 y B1RPQ mostraron valores intermedios sin diferencias significativas entre ellos. Entre las variantes de B12 y B58 también se encontraron diferencias significativas, aunque en menor magnitud que las encontradas en el grupo de B1. B12B1 y B58B1 fueron las únicas variantes que destacaron por el %ERS (131 y 148, respectivamente).

2.3.2) Producción de indoles totales post-competencia

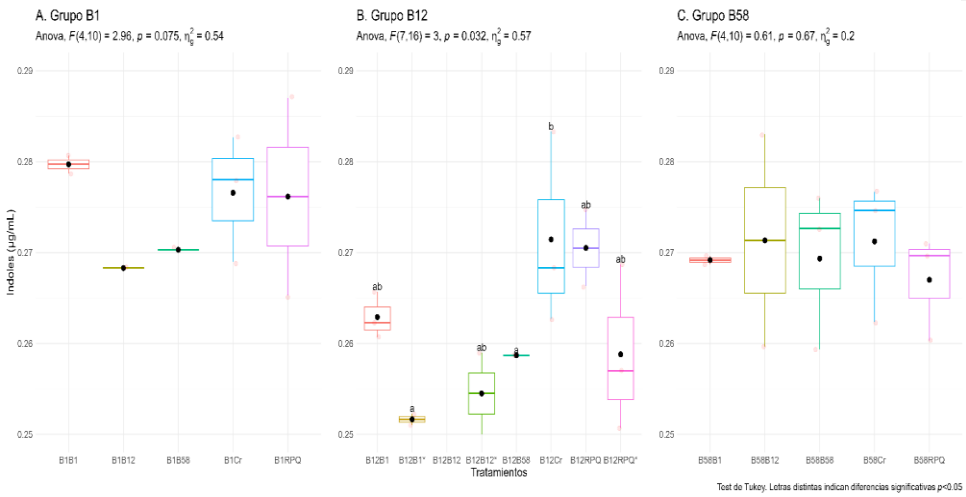


Figura 21. Producción de indoles totales por parte de las variantes seleccionadas. Cada panel (A, B y C) corresponde a un grupo bacteriano distinto. Se muestran los valores promedio, dispersión y posibles diferencias entre los tratamientos relacionados con las poblaciones parentales, las poblaciones variantes provenientes de las interacciones competitivas y las poblaciones sometidas a repiques sucesivos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según test post hoc Tukey (α=0.05).

En el grupo de B1, la variante B1B1 presentó la mayor producción de indoles con valores medios alrededor de 0.28 µg/mL. La población parental (B1Cr) y la población sometida a repiques sucesivos (B1RPQ) no difirieron significativamente de ésta (Fig. 21). En el grupo de B12, la variante B12B1* presentó la menor producción de indoles (~0.25 µg/mL) y fue significativamente diferente del tratamiento de la población parental (B12Cr), el cual mostró los valores más altos dentro del grupo (~0.27–0.28 µg/mL). Las poblaciones sometidas a repiques (B12RPQ y B12RPQ*) mostraron valores intermedios.

Por otro lado, entre las variantes pertenecientes a B58 no se encontraron diferencias significativas. La producción de indoles se mantuvo relativamente constante en todos los tratamientos (~0.27 µg/mL), sin patrones definidos ni cambios relevantes con respecto a la cepa parental. Esto sugiere una mayor estabilidad funcional del rasgo en este grupo bacteriano, o bien

una falta de presión selectiva suficientemente fuerte para inducir diferencias medibles bajo las condiciones experimentales empleadas.

Para la fase final del experimento en plántulas de tomate bajo condiciones de invernadero, se seleccionó una de las variantes resultantes de las interacciones competitivas por cada grupo bacteriano, tomando como criterio principal los resultados previos de solubilización de fosfatos postcompetencia. En consecuencia, se eligieron las variantes B1B1, B12B1, B1B58 para los grupos B1, B12 y B58, respectivamente, por mostrar un desempeño ligeramente destacado en este rasgo funcional. Aunque también se evaluó la producción de indoles totales, esta variable no presentó diferencias estadísticamente significativas para los grupos B1 y B58, ni reveló resultados concluyentes para el grupo de B12, por lo que no fue considerada como un criterio de selección. Las variantes elegidas fueron utilizadas en la siguiente fase de experimentación en planta.

OBJETIVO 3

3.1) Respuesta del desarrollo vegetal de *S. lycopersicum* a la inoculación de los aislamientos parentales, las poblaciones de repique y las variantes resultantes de las interacciones competitivas seleccionadas para cada uno de los aislamientos B1, B12 y B58.

Con el objetivo de evaluar los efectos de la inoculación de las poblaciones variantes derivadas de los aislamientos seleccionados (B1, B12 y B58), se diseñó un experimento en condiciones de vivero utilizando *S. lycopersicum* como planta modelo. Para cada aislamiento se incluyó su población parental, una población variante seleccionada como resultado de interacciones competitivas, y una población obtenida por repiques sucesivos. Las bacterias fueron aplicadas semanalmente a una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL. Este enfoque permitió comparar el impacto de las diferentes poblaciones bacterianas sobre diversas variables agronómicas relacionadas con el crecimiento y desarrollo de la planta (Fig. 22-25).

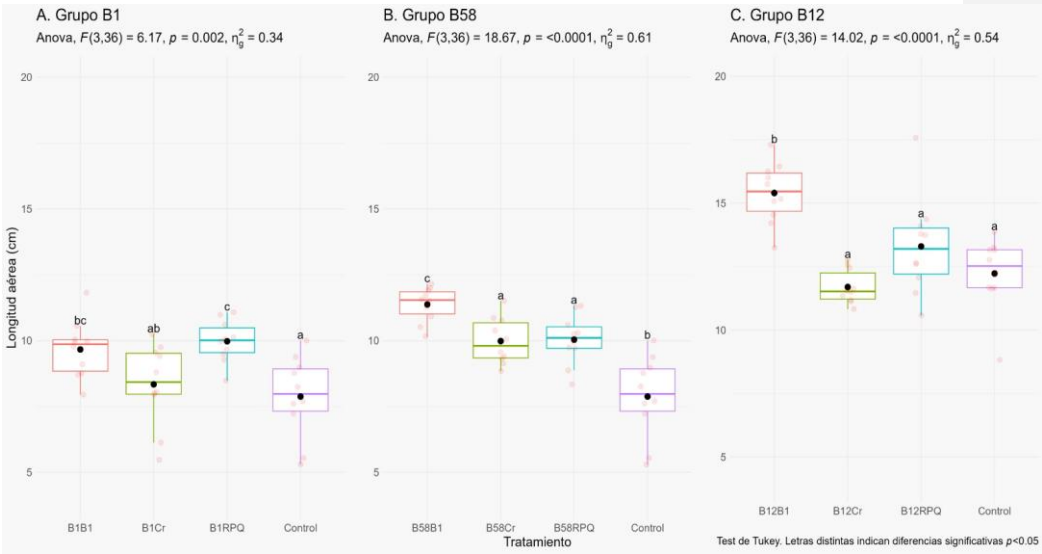


Figura 22. Efecto de los tratamientos bacterianos sobre la longitud aérea (cm) de plántulas de tomate bajo condiciones de vivero para los grupos bacterianos B1 (A), B58 (B) y B12 (c)Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey (α=0.05).

Para el grupo de B1, el análisis de varianza reveló diferencias significativas entre tratamientos, la población de repique (B1RPQ) presentó la mayor longitud aérea promedio (~11 cm) siendo significativamente superior al control absoluto. Por su parte, el aislado parental (B1Cr) y la variante resultante de las interacciones competitivas (B1B1) mostraron valores similares entre sí (~9–10 cm) y no se diferenciaron estadísticamente del control absoluto.

En cuanto al grupo de B58, el tratamiento con la variante B58B1 promovió la mayor longitud aérea (~13 cm), siendo significativamente superior a los demás tratamientos. La población parental (B58Cr) y la población de repique B58RPQ presentaron valores intermedios (~10 cm) sin diferenciarse significativamente del control absoluto (~9 cm).

Por último, para el grupo de B12, la variante B12B1 mostró favorecer en mayor medida la longitud aérea (~16 cm), siendo significativamente mayor que la de los demás tratamientos. La población parental (B58Cr) y la población de repique, aunque mostraron valores ligeramente superiores al control (~12–13 cm frente a ~12 cm), no presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto a este.

En conjunto, estos resultados evidencian que los tratamientos con aislamientos parentales, particularmente B58B1 y B12B1, fueron los más efectivos para promover el crecimiento aéreo de las plántulas de aguacate. En contraste, las variantes generadas por competencia o repique mostraron una disminución en dicha capacidad, posiblemente debido a cambios fenotípicos o genéticos inducidos por las condiciones de presión ambiental a las que fueron sometidas.

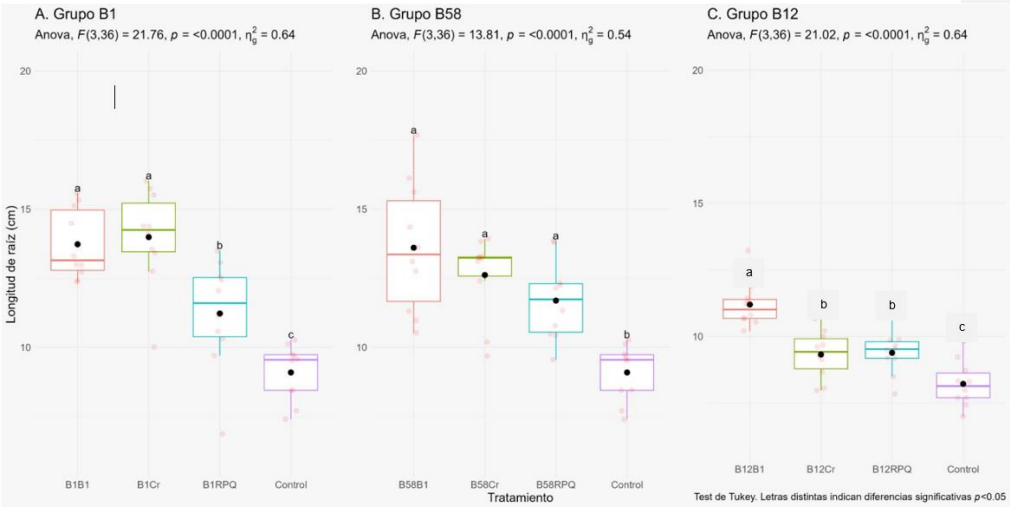


Figura 23. Efecto de los tratamientos bacterianos sobre la longitud raíz (cm) de plántulas de tomate bajo condiciones de vivero para los grupos bacterianos B1 (A), B58 (B) y B12 (c)Se presentan diagramas de caja para cada tratamiento: poblaciones parentales (B1Cr, B58Cr, B12Cr), variantes obtenidas por competencia (B1B1, B58B1, B12B1), repiques sucesivos (B1RPQ, B58RPQ, B12RPQ) y control sin inoculación. Se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) con su correspondiente estadístico F, valor de p y tamaño del efecto (η^2_g). Las letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los puntos negros representan los promedios de los datos y los puntos rosados los valores individuales de los datos.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la longitud de raíz de plántulas de tomate en respuesta a los distintos grupos bacterianos evaluados (Fig. 23). En todos los casos, los análisis de varianzas (ANOVA) evidenciaron efectos significativos de los tratamientos sobre la variable evaluada ($p < 0.0001$). En el grupo bacteriano de B1, el aislamiento parental (B1Cr) y la variante resultante de las interacciones competitivas (B1B1) promovieron el crecimiento radicular de manera significativamente mayor que la población de repique (B1RPQ)

y el control absoluto. La longitud de la raíz promedio para estos dos tratamientos superó los 15 cm, mientras que el control presentó los valores más bajos (~10 cm).

En el caso del grupo de B58, la variante resultante de las interacciones competitivas (B58B1) indujo el mayor crecimiento radicular (~15.5 cm), siendo significativamente superior al control absoluto. La población parental (B58Cr) y la de repique (B58RPQ) también mostraron un efecto positivo en la longitud de la raíz y no difirieron significativamente de la variable resultante de las interacciones competitivas (B58B1) ni entre ellas.

Finalmente, para el grupo de B12, la variante resultante de las interacciones competitivas (B12B1) presentó el efecto más notable sobre la longitud de raíz siendo significativamente superior a la población parental (B12Cr), el repique (B12RPQ) y el control absoluto. En contraste, la población parental (B12Cr) y el repique (B12RPQ) no difirieron entre sí, pero fueron ligeramente superiores al control absoluto.

Estos resultados, en general, indican que las variantes resultantes de las interacciones competitivas mostraron un mayor potencial en promover el desarrollo radicular en las plántulas de tomate, mientras que las poblaciones parentales o de repique mostraron una ligera reducción en este efecto, aunque en la mayoría de los casos superaron al control absoluto.

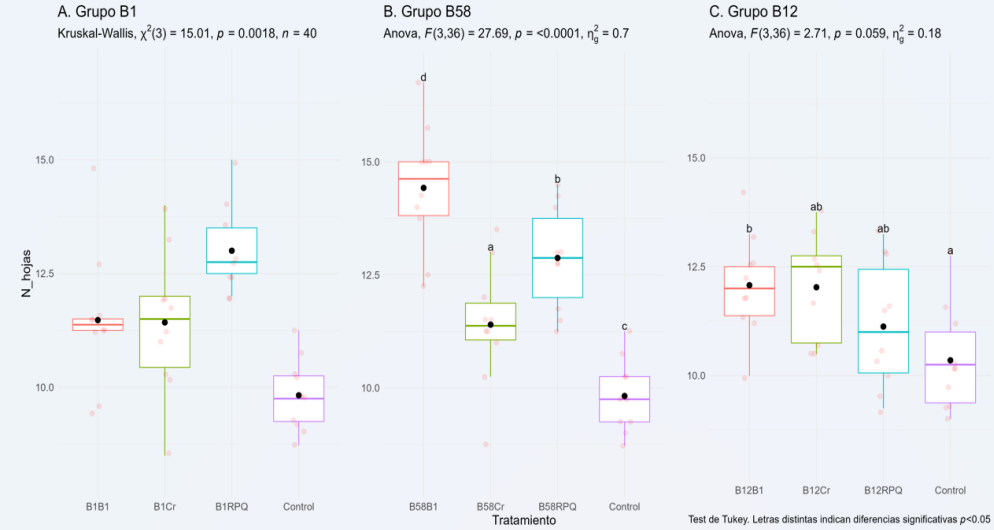


Figura 24. Número de hojas en plántulas de tomate para cada grupo de variantes seleccionado. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Wilcoxon y Tukey (α=0.05).

La variable número de hojas mostró respuestas diferenciales antes los tratamientos evaluados en los tres grupos (Fig. 24). En el grupo B1 (Panel A), el análisis estadístico de Kruskal Wallis evidenció diferencias significativas entre tratamientos. La prueba de Wilcoxon reveló que todos los tratamientos bacterianos B1B1, B1Cr y B1RPQ (entre 11 y 13 hojas) promovieron un mayor número de hojas en comparación con el control (~ 9 hojas), sin diferencias significativas entre ellos, lo que puede sugerir por una parte, que hubo un efecto bajo del tratamiento experimental al que se sometieron las poblaciones bacterianas (población variante resultante de las interacciones competitivas, población resultante de los repiques sucesivos) o por otra parte que las adaptaciones adquiridas durante el arreglo experimental fueron transitorias y no mostraron un efecto diferencial con respecto a la población crioconservada cuando se evaluaron en un arreglo experimental diferente, como en este caso, en suelo.

Para el grupo B58 (Panel B), la prueba de Tukey indicó que la variante B58B1 generó el mayor número de hojas (~14), siendo estadísticamente superior a todos los demás tratamientos. Por su parte, B58RPQ también fue superior al control, mientras B58Cr presentó un efecto intermedio. Por su parte, para el grupo B12 (Panel C), el ANOVA no arrojó diferencias significativas a un nivel convencional, aunque la prueba de Tukey sugiere una tendencia. El tratamiento con la variante B12B1 presentó un número significativamente mayor número de hojas que el control (~ 12.5), mientras que B12Cr y B12RPQ mostraron valores intermedios (entre 11 y 12) sin diferenciarse estadísticamente ni del control ni de B12B1. Este patrón indica una posible mejora funcional en B12B1, aunque con menor magnitud y consistencia que en el grupo B58.

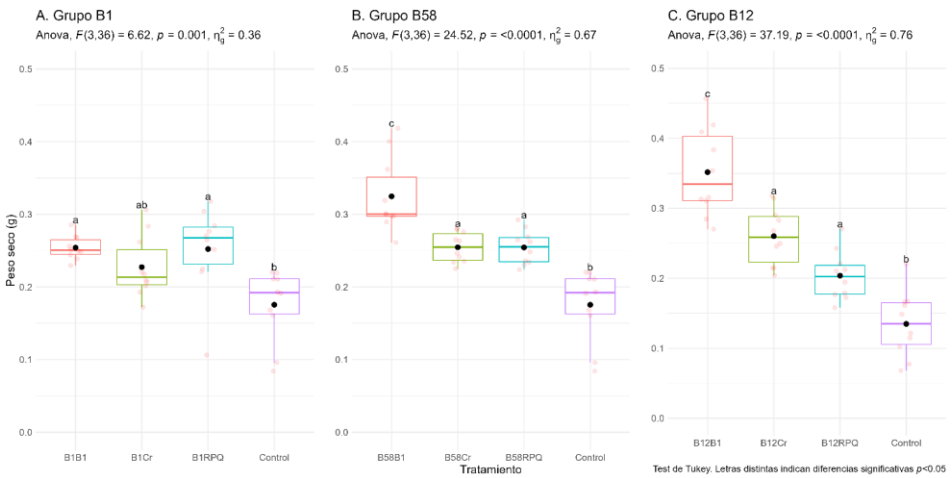


Figura 25. Efecto de los tratamientos bacterianos sobre el número de hojas (g) en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero para los grupos bacterianos B1 (A), B58 (B) y B12 (C). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey (α=0.05).

Los tratamientos bacterianos evaluados tuvieron una influencia significativa en el peso seco de las plántulas, con diferencias claras los tratamientos de cada grupo bacteriano (Fig. 25). En el grupo B1 (Panel A), las plantas inoculadas con las variantes B1RPQ y B1B1 presentaron valores significativamente mayores de peso seco (~0.25 g) en comparación con el control (0.19 g), mientras que el tratamiento con la población parental (B1Cr) no difirió de ninguno significativamente de ninguno de los otros tratamientos.

En el grupo B58 (Panel B), la variante B58B1 promovió un mayor peso seco (~0.32 g), siendo significativamente superior a todos los demás tratamientos incluyendo el control (~0.18 g). La población parental (B1Cr) y la población de repique (B1RPQ) mostraron valores intermedios, sin diferencias entre sí, pero significativamente superiores al control.

Por su parte, en el grupo B12 (Panel C), la variante B12B1 fue el tratamiento más efectivo para aumentar el peso seco de las plántulas de tomate para este grupo (~0.35 g). La población parental (B12Cr) y la población de repique (B12RPQ) obtuvieron valores intermedios, ambos con valores significativamente superiores al control (~ 0.14 g), pero sin diferencias significativas entre ellas.

Figura 26. Imágenes del montaje del experimento en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero.

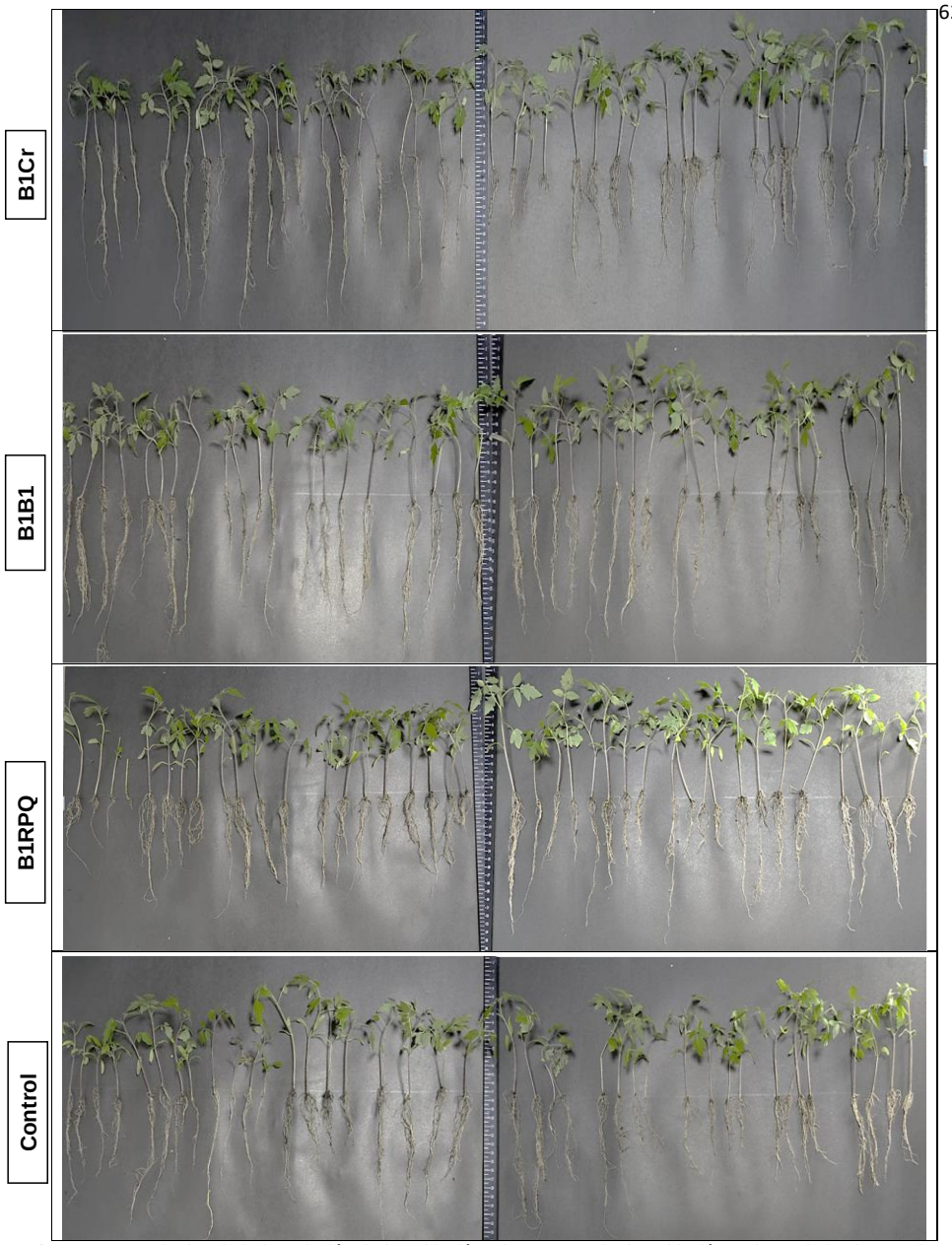


Figura 27. Resultados de la inoculación de la población crio conservada, la población variante de las interacciones competitivas, la población variante de repique de B1 en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero.

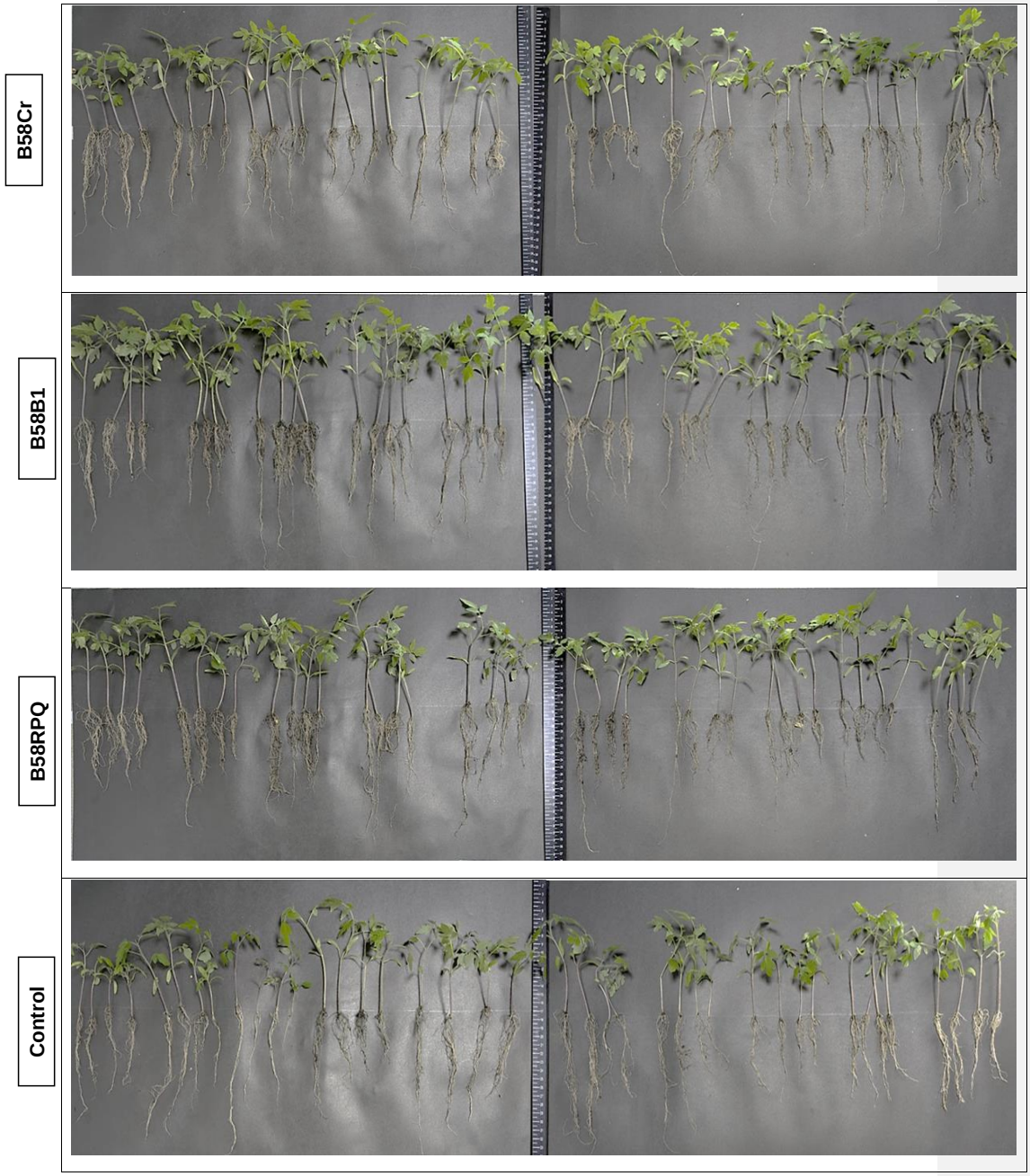
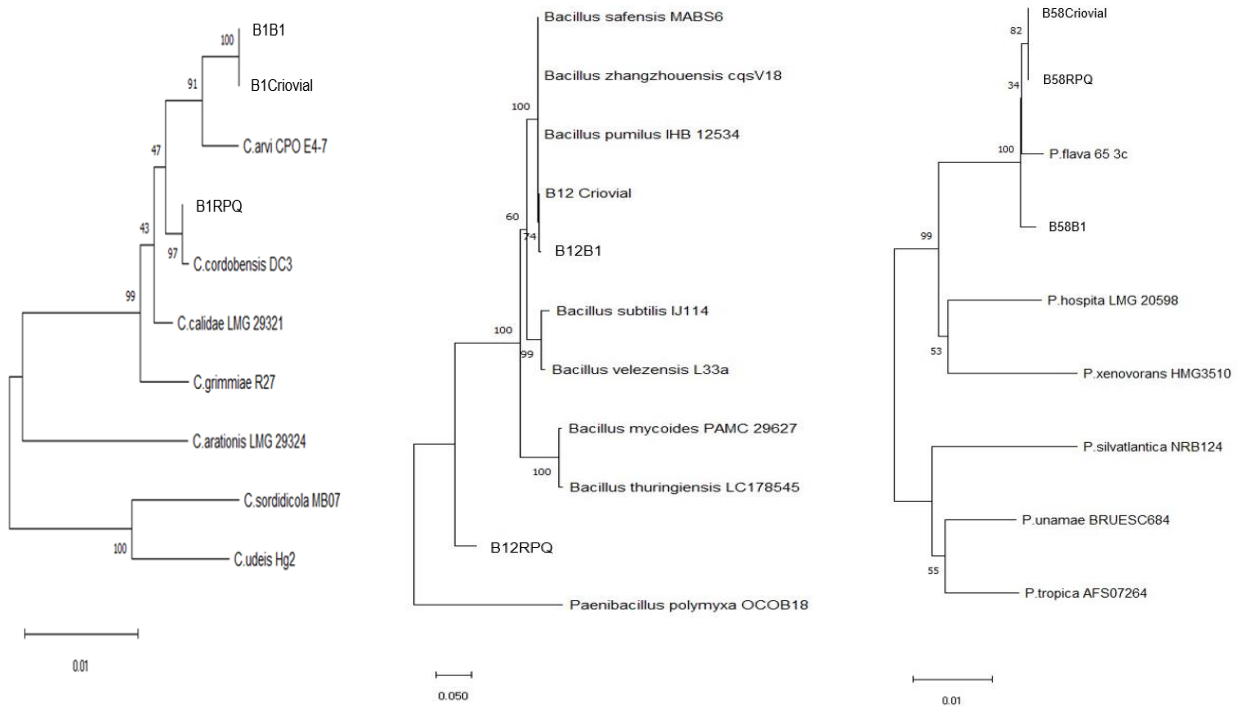

B58Cr
B58B1
B58RPQ
Control

Figura 28. Resultados de la inoculación de la población crioconservada, la población variante de las interacciones competitivas, la población variante de repique de B58 en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero

Re-secuenciación de la región ADNr 16S de los aislamientos parentales, las poblaciones variantes resultantes de las interacciones competitivas y las poblaciones de repique.



(a) **(b)** **(c)**

Figura 29. Árboles de similitud construidos mediante el método Neighbor Joining (NJ) a partir de secuencias parciales de la región ADNr 16S de los aislamientos bacterianos B1, B12 y B58. Se incluyeron sus respectivas poblaciones parentales (B1Cr, B12Cr, B58Cr), variantes obtenidas por ciclos de competencia (B1B1, B12B1, B58B1) y poblaciones de repique (B1RPQ, B12RPQ, B58RPQ). El análisis se realizó en el software MEGA (versión 12.0.10), utilizando el modelo de sustitución Kimura de dos parámetros (K2P) y un análisis de bootstrap con 1000 réplicas para evaluar la robustez de las agrupaciones. Los valores numéricos en

los nodos representan los porcentajes de soporte bootstrap. Se emplearon secuencias de referencia de los géneros *Caballeronia, Bacillus* y *Paraburkholderia*, obtenidas de la base de datos de GenBank. La escala representa la similitud genética (sustituciones por sitio).

En la Figura 29a se observa el árbol filogenético construido para el grupo de los aislamientos de B1 fue enraizado utilizando la especie *Caballeronia udeis Hg2* como grupo externo (outgroup), permitiendo así establecer la dirección evolutiva del clado. Las variantes experimentales B1B1, B1Criovial forman un clado con alto soporte bootstrap (100), lo que indica una alta similitud genética. No obstante, aunque B1RPQ también está dentro del mismo grupo general que los aislamientos anteriores (B1B1, B1Criovial) su soporte de rama es bajo (bootstrap=43), lo que sugiere una menor certidumbre de su ubicación exacta en el clado. Sin embargo, todos los aislamientos de B1 (B1Criovial, B1B1, B1RPQ) se agrupan dentro del clado correspondiente a *Caballeronia arví CPO E4-7,* lo que indica que pertenecen al mismo grupo taxonómico, probablemente a nivel de especie o subespecie

En la Figura 29b, el árbol fue enraizado con *Paenibacillus polymyxa OCOB18 (outgrup)*. En este caso, B12Criovial y B12B1 se agrupan en un clado a parte dentro del grupo de *Bacillus pumilus, Bacillus zhangzhuensis* y *Bacillus safensis*, indicando una fuerte afinidad genética con un soporte bootstrap 74. Sin embargo, B12RPQ se agrupa en un clado separado, más cercano al subgrupo *Bacillus cereus* (incluyendo *B. mycoides y B. thuringiensis*), lo que sugiere una divergencia genética notable con respecto a las demás variantes del grupo B12. Esta separación podría a un evento de contaminación.

En la Figura 29c, los aislamientos del grupo B58 (58Criovial, 58RPQ y 58B1) se agrupan con alta solidez (bootstrap = 100) junto con *Paraburkholderia flava 65 3c,* lo que respalda su identificación dentro de esta especie. Dentro del clado, 58Criovial y 58RPQ presentan una relación más cercana (bootstrap = 82), mientras que 58v2 se posiciona como grupo hermano de la cepa de referencia, con una divergencia genética mínima. El soporte del nodo que une a los tres tratamientos con la cepa tipo es moderado a bajo (bootstrap = 34), lo que sugiere la existencia de cierta variabilidad interna. Es importante destacar que este árbol no fue enraizado con un grupo externo, por lo que las relaciones deben interpretarse sin dirección evolutiva explícita. Para futuros análisis, se recomienda incluir un outgroup de un género cercano, como *Burkholderia* o *Cupriavidus,* con el fin de mejorar la interpretación evolutiva.

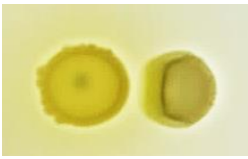
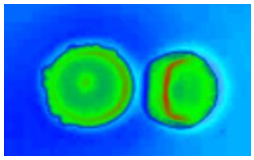
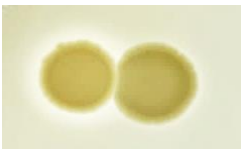
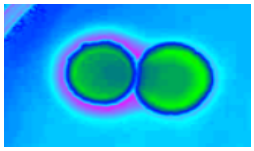
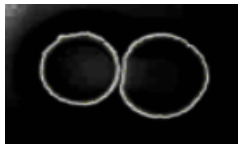
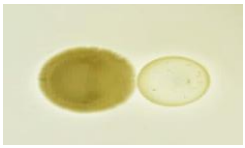
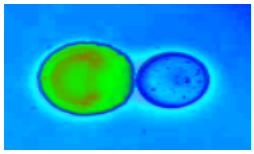
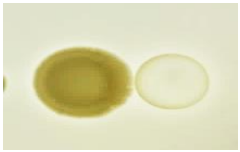
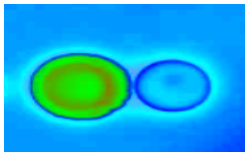
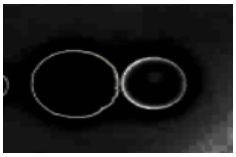
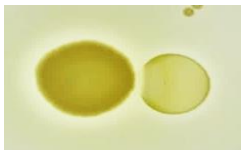
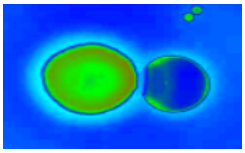
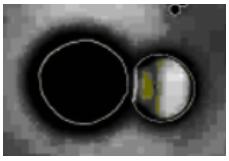
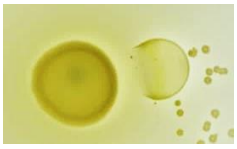
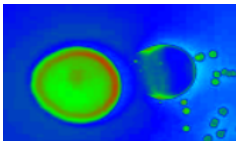
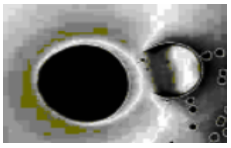
A pesar de las diferencias observadas entre tratamientos y especies de referencia en los tres árboles, un elemento común que podría estar afectando la resolución filogenética es la posible presencia de polimorfismo intragenómico en la región 16S del ADNr. Este fenómeno, descrito en varios géneros bacterianos como *Bacillus, Caballeronia* y *Paraburkholderia,* se refiere a la existencia de

múltiples copias del gen 16S con ligeras variaciones dentro de un mismo genoma. Estas diferencias intracelulares pueden generar señales de divergencia incluso entre variantes genéticamente muy cercanas, afectando la agrupación filogenética y dando lugar a interpretaciones erróneas sobre relaciones evolutivas.

En este sentido, aunque los resultados sugieren que la mayoría de los tratamientos conservan su identidad filogenética general, la variabilidad observada entre variantes derivadas de un mismo aislamiento podría estar influenciada tanto por los tratamientos experimentales como por el polimorfismo intragenómico. Por tanto, para mejorar la resolución y robustez de futuros análisis, se recomienda complementar el uso de la región 16S con otros marcadores moleculares más discriminantes (por ejemplo, genes housekeeping como *gyrB, rpoB* o análisis multilocus), que permitan una mejor inferencia filogenética y taxonómica.

3.2) Interacciones de competencia entre las poblaciones variantes, las poblaciones parentales y las poblaciones de repique en medio PVK.

Para evaluar si las variantes resultantes de la competencia seleccionadas presentaban alguna respuesta diferencial entre la capacidad de solubilizar fosfato en medio PVK y su capacidad para antagonizar a otros aislamientos bacterianos en el mismo medio durante interacciones de competencias con sus poblaciones parentales y sus poblaciones de repique, se realizó un experimento en el que se sembraron microgotas de los aislamientos bacterianos variantes resultantes de la competencia seleccionadas, las poblaciones parentales y las poblaciones de repique para cada aislamiento (B1, B12, B58) en diferentes interacciones de competencia en el medio selectivo PVK (Fig. 30).

	Contra luz	Filtro 6 shades (*Image J*)	Filtro Edges (*Image J*)
B58_Cr Vs B1_Cr (a)			
B58B1 Vs B1_Cr (b)			
B1_Cr Vs B12_RPQ (c)			
B1_Cr Vs B12B1 (d)			
B58_Cr Vs B12_Cr (e)			
B58_RPQ Vs B12_Cr (f)			

B58B1 VS B12_Cr (g)

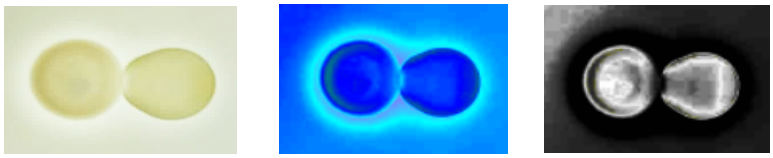


Figura 30. Interacciones competitivas entre las variantes seleccionadas resultantes de las de competencias, las poblaciones parentales y las poblaciones de repique para cada aislamiento B1, B12 y B58 post-competencia en medio PVK analizada mediante imágenes a contraluz y procesamiento digital con filtros '6 shades' y 'Edges' del software libre ImageJ. Competencia entre B58Cr y B12Cr (a), competencia entre B58 RPQ y B12Crl (b) competencia entre la variante B58B1 y B12Cr (c) competencia entre B1Cr y la variante B12B1 (d), competencia entre B58Cr y B12Cr (e), competencia entre B58RPQ y B12Cr (f), competencia entre la variante B58B1 y B12Cr (g).

Las pruebas duales en medio PVK revelaron diferencias en las interacciones competitivas y en la capacidad de solubilización de fosfatos entre los tratamientos bacterianos evaluados (Figura 30). El análisis con filtros de contraste y bordes en ImageJ permitió visualizar con mayor claridad los halos de solubilización y la zona de contacto entre colonias. En general, se observaron diferencias notables en la forma y extensión de los halos de solubilización, así como en la interacción en la zona de contacto entre colonias, lo cual puede reflejar relaciones de competencia, inhibición o neutralidad.

Una comparación entre las interacciones B58Cr vs B1Cr (Fig. 30a) y B58B1 vs B1Cr (Fig. 30b) revela diferencias marcadas en comportamiento competitivo y capacidad de solubilización de fosfatos. El aislamiento parental B58Cr mostró baja actividad de solubilización, pero evidenció una interacción competitiva con B1Cr, observable en la deformación del borde de la colonia de B1Cr, que se aplana y detiene su crecimiento en la zona de contacto (Fig. 30a, filtro "*Edges*"). Además, en el filtro "6 shades", se destaca un anillo rojo intenso en B1Cr, lo que sugiere una posible respuesta defensiva ante la proximidad de B58Cr. En contraste, para B58B1 en la misma interacción con B1Cr, se observa la presencia de un halo de solubilización más amplio y definido, con tonalidades púrpura en el filtro *"6 shades"* (Fig. 30b), lo que indica una mayor capacidad para solubilizar fosfatos. Además, la interacción con B1Cr fue menos competitiva, ya que se observó una ligera superposición entre las colonias (filtro *"Edges"*), lo cual sugiere una relación más neutral o coexistente.

La comparación entre las interacciones B1Cr vs B12RPQ (Fig 22c) y B1Cr vs B12B1 (Fig 30d) revela diferencias en la morfología del anillo central de B12 en presencia de B1Cr. En

la interacción con B12RPQ, se observa una contracción del anillo central (representado por la estructura roja en el filtro *"6 shades*"), lo que sugiere una menor resistencia a la competencia. Por el contrario, B12B1 mantiene una morfología anular intacta, sin signos de deformación, lo que indica una mayor estabilidad estructural y posible resistencia competitiva frente a B1Cr.

La comparación entre B58Cr, B58RPQ y B58B1 en presencia de B12Cr revela diferencias marcadas entre la capacidad de solubilización de fosfatos y el potencial antagonista de estas variantes. En la interacción B58Cr vs B12Cr (Fig. 30e), se observa una actividad media de solubilización, evidenciada por un halo visible en el filtro *6 shades*, junto con un efecto antagonista moderado reflejado en la reducción parcial de la biomasa en el borde de B12Cr más cercano a B58Cr.

Por su parte, durante la interacción de B58RPQ con B12Cr (Fig. 30f) muestra un comportamiento más competitivo donde afecta significativamente la biomasa de B12Cr adyacente y presenta una actividad de solubilización prácticamente nula. En contraste, B58B1 en interacción con B12Cr (Fig. 30g) exhibe un bajo nivel de antagonismo, incluso con indicios de superposición entre colonias, pero destaca por una mayor capacidad de solubilización de fosfatos, evidenciada por un halo más amplio que el observado en la interacción de B58Cr o B58RPQ contra B12Cr.

En general, los resultados sugieren que las poblaciones variantes (B58B1, B12B1) muestran un comportamiento competitivo menos agresivo y una mayor capacidad para formar halos de solubilización más prominentes, lo que podría relacionarse con una estrategia funcional orientada a la eficiencia en la adquisición de nutrientes, más que a la exclusión directa del competidor. Estos patrones reflejan diferencias en la expresión de solubilización de fosfatos y la capacidad de antagonizar colonias vecinas, lo que podría sugerir posibles adaptaciones ecológicas derivadas del arreglo experimental de las poblaciones bacterianas evaluadas.

9. Discusión

Objetivo 1

Evaluación de rasgos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de los aislamientos bacterianos obtenidos

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización fenotípica de los 27 aislamientos bacterianos revelan una diversidad funcional en los rasgos asociados a la promoción del crecimiento vegetal (Tabla 1.). Esta variabilidad, frecuentemente observada en colecciones microbianas de origen edáfico, especialmente de la zona rizosférica representa una ventaja para la selección de cepas con múltiples mecanismos de acción complementarios (Castaño, et al., 2021). De hecho, algunos autores han reportado el aislamiento de bacterias de la rizosfera de aguacate con rasgos promisorios para el control biológico y/o la promoción del crecimiento vegetal en algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas, Arthrobacter, Lysinibacillus, Serratia*, entre otros (Mendez et al., 2018; Solórzano et al., 2024; Tzec et al., 2020; Gamboa et al., 2022).

Aunque las pruebas *in vitro* de rasgos de promoción del crecimiento vegetal permiten estimar el potencial de los aislamientos bacterianos, las evaluaciones en planta ofrecen un enfoque más preciso y representativo de su efecto bajo condiciones reales. A partir de los experimentos realizados, B1, B12 y B58 mostraron mayor potencial para favorecer el desarrollo de plantas de tomate bajo condiciones de vivero (Fig. 1 y 2). En términos de longitud aérea y peso seco no hubo diferencia estadística significativa al variar la concentración de inóculo (10^8 UFC/mL y 10^6 UFL/mL) en los aislamientos evaluados. B1, B20, B58, B68, B81 y BS4 mostraron incrementar la longitud aérea de las plantas respecto al grupo control (Fig. 1). En términos de peso seco, B1, B12 y B58 mostraron una capacidad superior de incrementar la biomasa total de las plantas (Fig. 2). Por tanto, estos tres aislamientos fueron seleccionados para ser sometidos a sucesivas pruebas de competencia en medio sólido.

El aislamiento B1 pertenece a la especie *Caballeronia arví* que se clasifica como un bacilo ubicuo gram-negativo reportado como promotor de crecimiento vegetal (Dobritsa, et al., 2017), sin embargo, no se encontraron reportes que indiquen que haya sido aislado a partir de la rizosfera de árboles de aguacate. No obstante, Rivera y colaboradores (2024), reportaron microorganismos funcionales asociados a la rizosfera de maíz variedad *tunicata*, entre ellos, la bacteria *C. arvi,* la cual además fue evaluada y caracterizada como PGPR.

El aislamiento B12, pertenece a la especie *Bacillus zhangzhouensis* que se clasifica como un bacilo gram-positivo, formador de endosporas, es oxidasa y catalasa positivo, y según los análisis filogenéticos de sus secuencias de la región ADNr 16S pertenece al clado de *Bacillus pumilus* (Liu, et al., 2016). Se ha aislado de la rizosfera de *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata* y *Cajanus cajan* en la India y ha demostrado tener algunos rasgos de promoción de crecimiento vegetal como producción de compuestos indólicos y capacidad de antagonismo (Bhutani, et al., 2021). También se aisló de la rizosfera de *Xanthium italicum* en China (Han, et al., 2021) y a partir de ambientes acuáticos (Liu, et al.,2016).

Por su parte, B33 (*Pseudomonas baetica*) ha sido aislado de ambientes acuáticos y se clasifica como un patógeno en peces (Lopez, et al., 2012). Así mismo B41 (*Pelomonas saccharophila*) se ha aislado de ambientes húmedos como lodos de aguas estancadas y cuerpos de agua (Xie & Yokota 2005). Estas observaciones pueden indicar que, posiblemente, los riegos que hacen en el cultivo de aguacate donde se realizaron los muestreos se realizan con agua de rio, estanque o algún otro afluente de agua cercano. Algunos de estos microorganismos parecen no son ser propios de la rizosfera de aguacate, sin embargo, gracias a su versatilidad metabólica, han encontrado formas de adaptarse y exhibir rasgos funcionales que les permita persistir en este ambiente influenciado por las raíces vegetales. No obstante, algunos autores han reportado el aislamiento de bacterias de la rizosfera de aguacate con rasgos promisorios para el control biológico y/o la promoción del crecimiento vegetal en algunas especies de los géneros *Bacillus sp, Pseudomonas sp*, *Arthrobacter sp, Lysinibacillus sp, Serratia sp,* entre otros (Gamboa et al., 2022; Méndez-Bravo, et al.,2018, Solórzano, et al., 2024, Tzec, et al., 2020)

B58 es un aislamiento que pertenece a la especie *Paraburkholderia flava* y se caracteriza por ser un bacilo corto gram-negativo, aeróbico. Las especies de este género han sido reportadas como fijadoras de nitrógeno, antagonista de fitopatógenos y promotores de crecimiento vegetal (Trinh et al., 2020). Gallart y colaboradores (2022) estudiaron el efecto de *Paraburlkholderia sp.* en la adquisición de nitrógeno en plántulas de aguacate con resultados prometedores para usar especies de este género como promotoras del crecimiento vegetal. Por otra parte, los aislamientos B68, B4, B47, BS4 y B81 pertenecientes a las especies *Microvirgaossetica, Rhodococcus pseudokorensis, Caulobacter zeae*, *Bacillus bataviensis*, *Kitasatospora phosalacinea* respectivamente, han sido reportadas ser aislados de las rizosferas de algunas plantas, suelos agrícolas y de

tejidos como endófitos (Safronova et al., 2017; Kämpfer et al., 2022; Gao et al., 2018; Heyrman et al., 2004; Li et al., 2021).

Diversos estudios han reportado consistentemente la aparición de géneros bacterianos como *Bacillus* y *Pseudomonas* en experimentos de promoción del crecimiento vegetal en plántulas de tomate cultivadas en sustratos de arena o suelo bajo condiciones controladas. Estas especies han demostrado una alta capacidad para producir compuestos como ácido indolacético (AIA), solubilizar fosfatos y son capaces de mejorar la absorción de nutrientes, lo que se traduce en un incremento significativo del desarrollo radicular y aéreo de las plantas (Cochard et al., 2022; Rehan et al., 2023). En particular, especies como *Bacillus subtilis*, *Bacillus aryabhattai* y *Pseudomonas fluorescens* han sido señaladas como cepas altamente eficaces para mejorar la biomasa vegetal y la eficiencia en el uso de nutrientes en plántulas del modelo vegetal tomate (Abbamondi et al., 2016).

La recurrencia de los géneros Bacillus y Pseudomonas en diferentes estudios sugiere que poseen rasgos funcionales ampliamente conservados que los hacen exitosos en condiciones edáficas variadas, especialmente en sustratos pobres como la arena, donde el aporte microbiano puede ser crucial para el establecimiento temprano de las plántulas. La preselección de los aislamientos bacterianos B1, B12 y B58 se fundamentó tanto en su potencial *in vitro*, su desempeño funcional en planta, así como en su pertenencia a géneros filogenéticamente relacionados con géneros ampliamente reportados por su capacidad en la promoción del crecimiento vegetal.

B12 es una especie del género Bacillus, B58 y B1, pertenecientes a los géneros *Paraburkholderia* y *Caballeronia* respectivamente, representan linajes que, aunque menos estudiados que Bacillus o Pseudomonas, han evolucionado en ambientes similares y comparten rasgos funcionales clave asociados a la vida en la rizosfera. Estas capacidades incluyen la producción de ácido indolacético, sideróforos, y la capacidad de adaptarse a condiciones edáficas variables. Además, algunas especies de *Caballeronia* y *Paraburkholderia* surgieron de la reestructuración filogenética del género *Burkholderia sensu lato* (Mullins, et al., 2021) que agrupaba tanto especies patógenas como ambientales, siendo estas últimas reconocidas actualmente por su potencial en la promoción del crecimiento vegetal (Tang et al., 2020; Zhang et al., 2024).

Así, la inclusión de estos tres aislamientos bacterianos en ensayos con tomate permite explorar no solo su capacidad en la promoción del crecimiento de este modelo vegetal, sino

también su valor como representantes de grupos bacterianos recién reubicados en nuevos géneros bacterianos con evidencia creciente de funcionalidad ecológica en sistemas agrícolas de interés.

Objetivo 2

Cambios morfológicos en las colonias bacterianas asociados a las interacciones de competencia y a los repiques sucesivos

Este estudio se enfocó en caracterizar los cambios morfológicos inducidos por interacciones de competencia entre colonias bacterianas con el fin de observar si estos cambios se asociaban con una expresión alterada de rasgos funcionales relacionados con la promoción de crecimiento vegetal *in vitro* y en el desarrollo de plántulas en el modelo vegetal *S. lycopersicum*. Para ello, se implementaron 12 ciclos de consecutivos de competencia, de 48 horas cada uno, con el propósito de seleccionar variantes fenotípicas estables que pudieran mantenerse aún en ausencia de la presión de competencia directa, lo cual sugeriría un cambio heredable y no meramente una respuesta plástica. Los cambios morfológicos observados en la arquitectura de las colonias (Fig. 11 - 14), respaldan la hipótesis de que las bacterias pueden variar fenotípicamente para adaptarse a presiones ambientales como las impuestas por la interacción de competencia (Mould et al.,2021) y que tales adaptaciones podrían representar rutas hacia una especialización funcional (Li et al.,2023; Wang et al., 2021). Esta variación fenotípica, ampliamente documentada en la fisiología microbiana (Mould et al., 2021; Rosenberg et al., 2016; Spratt et al., 2022), permite a las poblaciones bacterianas modificar rasgos morfológicos en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico, además, dichas respuestas pueden tener un carácter plástico-reversible y dependiente del ambiente o reflejar cambios evolutivos más estables. (Ackermann et al., 2015; Vetsigian et al., 2011).

Las diferencias observadas en la morfología con respecto a los repiques sucesivos y las poblaciones crio-conservadas refuerza la posibilidad de que la competencia actúe como una fuerza selectiva capaz de inducir modificaciones con estabilidad fenotípica (Ghoul et al.,2016; Yan et al., 2018). Si bien el diseño experimental incluyó colonias de repique seriadas sin competencia con el objetivo de separar parcialmente los efectos del mantenimiento en un medio de cultivo artificial, no es posible descartar completamente que parte de la variación observada responda a la reselección en estas condiciones sintéticas y no exclusivamente a la interacción directa con otra colonia, además, tampoco se pueden

descartar fenómenos como mutaciones aleatorias del genoma o deriva genética como un motor de inducción de los cambios morfológicos observados(Barrick & Lenski, 2013). Aun así, se observaron diferencias entre las morfologías resultantes entre las colonias de repique que crecieron sin competencia y aquellas que creciendo en sucesivas interacciones de competencia visibles en las figuras 11-14, lo que podría estar relacionado con estrategias defensivas, de expansión territorial o con efectos asociados a la producción de sustancias inhibitorias (Be'Er et al., 2009).

Muchos de los cambios observados en las interacciones de competencia entre colonias de la misma o diferente especie/cepa producen la deformación de las colonias en la zona de contacto con la colonia vecina. El acercamiento o contacto entre dos colonias microbianas conduce a cambios en la morfología y la composición de las células en la zona de interacción sugiriendo una señalización intraespecie o interespecie (Rosenberg et al., 2016; Yannarell et al., 2023). Estudios previos han demostrado que la competencia bacteriana puede inducir una reorganización profunda de fenotipo de colonia inicial como se evidencia en el trabajo de Wang y colaboradores (2021), en donde se observa que la diferenciación celular y la motilidad determinaron la arquitectura de las colonias en *Bacillus subtilis* (Molina et al., 2018). En el estudio, la competencia espacial entre dos colonias bacterianas de la misma cepa, promueve una segregación fenotípica que favorece la expansión o defensa territorial mediante subpoblaciones especializadas, así mismo, los resultados expuestos en el estudio de Li y colaboradores (2023), refuerzan la idea de que la proporción en la cantidad de células productoras de matriz y células esporuladas en las zonas sometidas a mayor presión competitiva modifican en el grosor de la biopelícula y la capacidad de formar estructuras arrugadas. Paralelo a los cambios morfológicos observados en este trabajo, en particular, las alteraciones en el borde de la colonia y la pérdida de coloración en uno de los aislamientos podrían reflejar una diferenciación funcional inducida por la presión constante de la interacción con la colonia vecina. Aunque dentro de los alcances de este estudio no se exploraron los mecanismos moleculares subyacentes que permitieran determinar si los cambios morfológicos eran de naturaleza heredable o plasticidad fenotípica, los resultados respaldan la idea de que la competencia puede actuar como una presión biótica capaz de impulsar la aparición de variantes fenotípicas potencialmente estables, como también ha sido reportado en sistemas modelo de bacterias formadoras de biopelículas.(Hansen et al., 2007; Lin et al., 2022)

Be´Er y colaboradores (2009) indican que la desaceleración de un frente de la colonia es independiente de la separación inicial entre colonias lo que indica que una vez que una colonia detecta un nivel de inhibidor por encima de cierto umbral, se ve afectada de la misma manera y por ello se observa deformación de la forma inicial de la colonia en los frentes cercanos a la inhibición. Durante el mismo estudio, se observó que la competencia particularmente en el contexto de colonias hermanas (colonias de la misma cepa), de *Paenibacillus dendritiformis*, se afectó la densidad celular en las colonias vecinas mediante la secreción de compuestos inhibidores. No obstante, cuando las colonias enfrentadas censan la competencia ecológica por nutrientes o competencia de interferencia, existe suficiente comunicación celular en la colonia para rearreglar su distribución espacial de manera que logre sobrevivir más exitosamente al factor de estrés. Tampoco hay que descartar que los cambios morfológicos observados, especialmente en la cepa B12 pueden ser un efecto combinado de interacciones competitivas y del efecto de la reselección bajo medios artificiales, lo que podrían conducir a predicciones poco precisas sobre estas interacciones de competencia bajo arreglos naturales (Lawrence et al., 2012).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado por Liu y colaboradores (2018), quienes demostraron que *B. subtilis* responde a señales químicas, las cuales fueron identificadas como compuestos antimicrobianos, emitidas por bacterias competidoras, como *Streptomyces venezuelae*, activando una forma específica de motilidad deslizante. Esta respuesta ocurre incluso ante concentraciones sub-inhibitorias de antibióticos, lo cual evidencia que dosis no letales de ciertos compuestos pueden actuar como estímulos ecológicos que desencadenan respuestas adaptativas complejas. De manera similar, en el presente trabajo se observó que la exposición a interacciones competitivas indujo cambios en la morfología colonial, como modificaciones en el grosor del borde, la coloración y la densidad celular que puede estar asociado a la exposición de sustancias inhibitorias como antibióticos. Estos resultados apoyan la noción de que las bacterias poseen una notable plasticidad fenotípica que se expresa según las condiciones ambientales y refuerzan el uso de los rasgos morfológicos como indicadores confiables de adaptación microbiana frente a presiones bióticas. Además, en el estudio de Fajardo y Martínez (2008) se refuerza la idea de que las bacterias no solo detectan compuestos antimicrobianos, sino que responden a ellos de forma específica y funcionalmente ventajosa, lo cual puede llevar a adaptaciones fenotípicas o fisiológicas observables.

En otro estudio adelantado por Lyng y colaboradores (2024) se observa que la presencia de bacillibactin, un sideróforo considerado como una molécula importante en el biocontrol, fue capaz de modificar la interacción antagonista entre *B. subtilis* y *Pseudomonas marginalis* modificando la morfología de la colonia de *P. marginalis* al detener su expansión y al inhibir la producción de metabolitos secundarios como la piocianina y la viscosina en *P. marginalis*. Además, la cantidad de hierro en el medio fue determinante en esta interacción y en ese sentido se puede argumentar que la concentración de nutrientes constituye una de las fuerzas de interacción más importantes capaz de modular las interacciones sociales (Yang et al., 2017). Por lo tanto, la competencia por recursos, como en el caso de *B. subtilis* y *P. marginalis* se estaría dando como una competencia de interferencia donde hay producción de sustancias inhibitorias, en ese caso, la producción de sideróforos.

La producción de antibióticos en microorganismos también es muy común y altamente documentada (Arnaouteli et al., 2021; Cronenberg et al., 2021). Metabolitos como las bacteriocinas, cuando la competencia por interferencia emerge como respuesta a una intensa presión de selección natural, ejercida durante la competencia explotativa por recursos entre distintos genotipos, o entre genotipos estrechamente relacionados que coexisten en un mismo nicho ecológico (Be'Er et al., 2009; Cornforth et al., 2013; Czárán et al., 2002). Aunque los compuestos antibacterianos, como las bacteriocinas, suelen afectar solo a bacterias similares o estrechamente relacionadas, estas 'armas químicas' pueden incluso emplearse para atacar células hermanas dentro de la misma colonia (Be'Er, at al., 2009).

En este estudio, se observaron cambios morfológicos en las colonias sometidas a repiques sucesivos con respecto a las colonias que provenían del crioconservado, así como de las colonias que estuvieron sometidas a las interacciones de competencias, especialmente en la colonia de repique del aislamiento B12. Estos resultados sugieren que el mantenimiento prolongado en medios sintéticos puede ejercer presiones selectivas que favorecen la aparición de fenotipos especializados a esas condiciones experimentales. Este fenómeno ha sido descrito en diversos estudios que han demostrado que los pases seriados o subcultivos sucesivos (repiques) bajo condiciones de laboratorio tiene un efecto en el fenotipo inicial de un microorganismo y que puede inducir cambios morfológicos y funcionales (Konstantidinis et al., 2021; Kram et al; 2017; Martin et al., 2016). Subcultivos continuos de bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, condujeron a una pérdida de funciones como la hemólisis o la virulencia, así como cambios

en la tasa de crecimiento y la morfología de colonia (Somerville et al., 2002; Stevens & Sebert, 2011). También se han observado alteraciones fenotípicas asociadas al repique en hongos como *Metarhizium anisopliae* manifestadas por la aparición de sectores diferenciados en la colonia y una reducción en la capacidad infectiva, indica una reconfiguración funcional inducida por la adaptación al medio de cultivo (Hussein et al., 2021). Estos hallazgos indican que los repiques sucesivos no solo son una herramienta de mantenimiento, sino también un factor experimental que puede generar modificaciones fenotípicas y genotípicas relevantes y que debe ser considerado cuidadosamente al interpretar la estabilidad funcional de las cepas.

Es importante además reconocer, que desde que los genomas bacterianos son altamente dinámicos (Manríquez et al., 2021), muchos de los cambios morfológicos y funcionales observados en las poblaciones microbianas pueden deberse no solo a presiones selectivas del ambiente, sino también a procesos evolutivos aleatorios como las mutaciones espontáneas en el genoma, el flujo y la deriva genética. Estos mecanismos pueden generar variabilidad fenotípica incluso en ausencia de condiciones selectivas evidentes, lo que resalta la complejidad de interpretar las respuestas adaptativas en estudios de evolución microbiana. (Kayser et al., 2018).

Por otra parte, una de las mayores fuerzas capaces de modificar las interacciones entre microorganismos es la competencia por nutrientes (Cornforth et al., 2013; Hoek et al., 2016; Hu et al., 2022). Por ejemplo, en el estudio conducido por Li y colaboradores (2023), se exploraron los efectos de la competencia por nutrientes en el desarrollo de biopelículas de *B. subtilis*, utilizando modelos de crecimiento limitado por difusión (DLG) y distancias de inoculación controladas de 5 mm y 10 mm. Se demostró que cuando las biopelículas se encuentran más cerca entre sí, compiten de manera más intensa por los nutrientes reduciendo la expansión bacteriana cerca del centro de inoculación, lo que produjo colonias más delgadas y con patrones de crecimiento irregulares. El estudio también afirmó que las biopelículas sometidas a competencia, presentaron morfotipos con arrugas más cortas y con direcciones de crecimiento sesgadas, especialmente anuladas en la dirección que enfrenta a la colonia competidora, además, se disminuyó el número de células productoras de matriz y aumentó el número de células esporuladas (Li, et al., 2023). Otros cambios asociados a la densidad celular de las colonias bacterianas en diferentes interacciones de competencia pueden estar relacionados con diferentes respuestas al estrés biótico como la afectación de diferentes sistemas de *Quorum sensing* (QS), (Lombardía et al., 2006), la

competencia por nutrientes (Hibbing et al., 2010) la exposición a sustancias inhibitorias como los antibióticos y las toxinas (Cornforth et al., 2013).

Otro aspecto importante a considerar en los resultados de las interacciones entre colonias bacterianas en medio sólido es la distancia de siembra, observamos que en el estudio de Wang y colaboradores (2021), se demostró que las biopelículas de *B. subtilis* inoculados a una corta distancia (2 mm) tienden a fusionarse rápidamente en una estructura continua, mientras que aquellas sembradas a un distancia mayor (11 mm) muestran un patrón de crecimiento mutuamente inhibitorio, conservando una zona de separación. Estas diferencias espaciales condicionan tanto la morfología macroscópica de la colonia como la diferenciación celular: a mayor proximidad, se acelera la aparición de células esporuladas y se disminuye la proporción de células productoras de matriz y motiles, lo que disminuye la capacidad de expansión de la biopelícula. Además, la competencia generada por la cercanía entre las colonias provoca una inhibición localizada del movimiento celular, especialmente en las regiones adyacentes entre las colonias. Estos hallazgos indican que el espacio físico no solo regula el contacto directo entre poblaciones bacterianas, sino que también puede afectar las estrategias fisiológicas y morfogenéticas adoptadas por las bacterias en escenarios de competencia (Li et al., 2023). No obstante, en el arreglo experimental empleado en este estudio, usamos una distancia de siembra entre los centros de las colonias de 8 mm y se observó que las colonias de algunas de las interacciones competitivas tendían a inhibirse entre ellas mostrando deformación de los frentes de colonia adyacentes a la colonia vecina, por lo tanto, la distancia de siembra influirá de acuerdo al resto de las condiciones experimentales como el volumen de la microgota, el tipo de medio y las cepas utilizadas (Bailey et al., 2015; Manríquez et al., 2021).

Existen muchos estudios que usan especies de Bacillus, especialmente, *B. subtilis*, ha sido un modelo para estudiar fenómenos asociados a la formación de biopelículas y características de su colonia. Diversos estudios de evolución experimental han demostrado que *B. subtilis* posee una alta versatilidad para modificar su arquitectura colonial y adaptarse rápidamente a presiones ambientales específicas. Kovács y Dragoš (2019) resumen numerosos experimentos en los que poblaciones clonales de *B. subtilis* evolucionaron en condiciones controladas para formar biopelículas, observándose en pocas generaciones la aparición de morfotipos diferenciados como rugoso, áspera, esparcida o extendida y lisa, con expresión diferencial en la producción de matriz, la hidrofobicidad y estructura superficial, rasgos importantes para la protección de la colonia

contra el ataque de otras colonias vecinas (Molina et al., 2018). Estos cambios no solo reflejan adaptaciones funcionales, sino que pueden responder a una dinámica ecológica interna de la biopelícula, como la explotación de bienes públicos, la división de trabajo y la presión por colonizar nichos específicos (Cornforth et al., 2013; Hansen et al., 2007).

Dragos y colaboradores (2018) demostraron que *B. subtilis* posee una notable capacidad para responder a presiones ambientales mediante una rápida diversificación fenotípica. Observaron que la competencia favoreció la aparición de morfotipos con funciones diferenciadas, como una mayor producción de matriz, expansión superficial o estrategias explotadoras, lo cual permitió reorganizar el espacio ecológico y reducir la competencia directa. De manera análoga, en este trabajo se observaron variantes morfológicas emergentes, especialmente en B12 (*B. zhangzhouensis*), tras interacciones competitivas, caracterizadas por diferencias en la morfología colonial (bordes, color, densidad) y ligeros cambios funcionales clave como la solubilización de fosfatos o el antagonismo. Estos hallazgos sustentan la idea de que microorganismos, como algunas especies del género Bacillus spp (Alcaraz et al., 2010) tienen una aptitud más pronunciada para modular su fenotipo y arquitectura colonial como respuesta adaptativa a presiones bióticas específicas, lo que no solo refleja una alta plasticidad ecológica, sino que también puede favorecer la coexistencia funcional de morfotipos especializados en contextos como la rizosfera, donde la diversidad microbiana es intensa y dinámica (Kour et al., 2019; Polonca. S, 2020).

Al observar la figura 15 se puede confirmar que los aislamientos de B12 resultantes de los ciclos de competencia y el repique sucesivo y que, presentaron gran diversificación morfológica, si pertenecen a la especie de *B. zhangzhouensis*, no obstante, el aislamiento B12RPQ mostró una gran divergencia filogenética con respecto al resto de los aislamiento B12 y se ubicó en un clado distante del género Bacillus, lo que podría significar que se trató de un evento de contaminación y no una variante de B12 objeto de este estudio. Además, al interpretar los dendrogramas generados mediante el método Neighbor-Joining (NJ), es importante considerar que la resolución filogenética obtenida a partir del gen ADNr 16S puede estar influenciada por la presencia de polimorfismo intragenómico en este marcador. Diversos estudios han documentado que muchas bacterias, especialmente aquellas aisladas de ambientes naturales, poseen múltiples copias del gen ADNr 16S con ligeras variaciones entre sí, fenómeno que puede distorsionar las inferencias filogenéticas si no se detecta o controla adecuadamente (Acinas et al., 2004; Sun et al., 2013).

Este fenómeno resulta particularmente relevante en el análisis de cepas ambientales como las utilizadas en este estudio, donde se observaron diferencias morfológicas y posibles divergencias filogenéticas dentro de un mismo aislamiento. La aparición de variantes morfológicas podría estar asociada no solo a la presión selectiva generada por las interacciones competitivas, sino también a la existencia de diferencias reales entre copias del región de ADNr 16S dentro del mismo genoma, las cuales pueden haber sido amplificadas diferencialmente durante la PCR, dando lugar a secuencias que, aunque provienen de la misma cepa, se posicionan en ramas separadas del dendrograma y no necesariamente reflejan eventos de especiación o diferenciación filogenética genuina (Větrovský, et al., 2013).

Múltiples estudios de evolución experimental se han conducido usando especies de Bacillus spp o Pseudomonas spp para estudiar los efectos adaptativos de diferentes presiones selectivas tanto bióticas como abióticas, los cuales muestran consistentemente una diversificación morfológica, generalmente acompañada de cambios funcionales. Por ejemplo, en el estudio de Nordgaard y colaboradores (2022), una cepa de *B. subtilis* mostró una rápida adaptación al entorno de *Arabidiopsis thaliana*, mejorando su capacidad de colonización tras 12 trasferencias en un sistema hidropónico. Las cepas evolucionadas presentaron una alta diversificación morfológica y adquirieron mutaciones en genes relacionados con la formación de biofilm, motilidad y metabolismo de la pared celular. Aunque algunas de estas cepas evolucionadas superaron al ancestro en colonización de raíces, mostraron desventajas en ambientes no selectivos, indicando un costo adaptativo.

En un estudio similar conducido por Pomerleau y colaboradores (2024), quienes utilizaron evolución adaptativa en raíces de tomate para demostrar que la competencia con *P. fluorescens* impulsa la emergencia de variantes de *B. subtilis* con morfologías coloniales distintas y mayor capacidad de formación de biopelículas. Estas variantes, producto de mutaciones en genes reguladores como *sinR* y *ywcC*, mostraron una mejor colonización de raíces y un rendimiento superior en condiciones competitivas. De forma paralela, en este trabajo se observó que las interacciones de competencia entre cepas bacterianas inducen la aparición de morfotipos diferenciados, con ligeras diferencias en rasgos funcionales clave. Esto refuerza la noción de que la competencia microbiana actúa como motor de diversificación fenotípica y funcional, permitiendo la selección de cepas mejor adaptadas a ambientes específicos como la rizosfera.

Bridier y colaboradores (2019) se reportaron la aparición de tres variantes morfológicas de *P. putida* KT2440 derivadas del crecimiento de biopelículas en co-cultivo con *P. putida* PCL1480 durante 168 h. Interesantemente, estas variantes no fueron identificadas en cultivos axénicos ni en cultivos planctónicos, lo que indica que la interacción competitiva fue clave para su aparición. Además, estas variantes presentaron alteraciones en rasgos como morfología colonial, motilidad, hidrofobicidad celular y arquitectura de la biopelícula y estudios de secuenciación de todo el genoma revelaron mutaciones en los genes de proteínas de biosíntesis de polisacáridos, transportadores de membrana o peptidasas de señal de lipoproteínas. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de la generación de diversidad funcional y estructural en comunidades microbianas puede conferir ventajas adaptativas tanto a nivel individual como colectivo, especialmente en contextos como la rizosfera, donde la coexistencia de múltiples cepas y especies es común.

Uno de los resultados más importantes de este estudio fue la pérdida estable de la pigmentación de la colonia variante B58B1 (*P. flava*), la cual, pasó de mostrar un color amarillo-verdoso (color original del aislamiento parental) a un color blanco traslúcido. Esto podría estar asociado a un mecanismo adaptativo relacionado con las condiciones de estrés ambiental, entre ellas, el estrés que supone la competencia microbiana y las condiciones experimentales de laboratorio. Se ha descrito que la presencia de estas moléculas de pigmentación no solo provee protección a las condiciones de estrés ambiental, oxidativo y UV (Koshti, et al., 2022), sino que también tienen un papel fundamental en el desarrollo de estrategias defensivas, así como comunicación celular entre especies (Agarwal, et al., 2023, Rámirez-Mata, et al., 2014). Por lo tanto, el cambio en la pigmentación observado podría reflejar una reprogramación fenotípica inducida por señales químicas interespecíficas (*QS*), por la necesidad de redirigir rutas metabólicas frente a una disponibilidad reducida de nutrientes o el estrés producido por las interacciones de competencia. Además, la pérdida de pigmentación observada en la variante B58B1 podría estar relacionada con una reducción en la producción de metabolitos secundarios como sideróforos, particularmente pigmentos fluorescentes tipo pioverdinas, cuya expresión está asociada con la adquisición de hierro y la competencia microbiana en la rizosfera.

En bacterias como *P. fluorescens*, se ha reportado que la disminución en la producción de pioverdinas no solo modifica la capacidad de antagonismo (Sharifi, et al.,2010) sino que también altera la coloración de las colonias, tornándolas más pálidas o translúcidas (Moreno-Fenoll, et al., 2024). Por otra parte, estudios previos han demostrado que, además

del intercambio de metabolitos beneficiosos, algunas bacterias pueden modular la producción de compuestos involucrados en la competencia o virulencia como respuesta a la presencia de otras especies. (Rodríguez-Verdugo &Ackermann). Baishya y colaboradores (2019), reportaron que cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* reduce la producción de piocianina, un pigmento azul con factor de virulencia, para favorecer interacciones menos competitivas con especies microbianas. Este tipo de represión metabólica podría representar una forma de cooperación interespecífica o una adaptación ecológica que permite la coexistencia en ambientes complejos. En este sentido, la pérdida del pigmento original en la cepa estudiada podría interpretarse como un cambio fenotípico inducido por presiones ecológicas que favorecen perfiles metabólicos menos agresivos en contextos de competencia persistente. Esto se alinea con la hipótesis propuesta por Ghoul y colaboradores (2016) que plantea que la competencia tiende a caer con el tiempo para dar paso a un equilibrio ecológico entre las especies que conviven en comunidad

Otro importante cambio fenotípico asociado a la variante B58B1 que perdió la coloración, es que ésta variante adquirió mayor capacidad de solubilizar fosfatos en comparación con su población parental, por lo que, desde una perspectiva ecológica, estos cambios podrían representar un posible costo adaptativo, donde la bacteria redistribuye sus recursos metabólicos, sacrificando funciones asociadas al antagonismo, como la producción de pigmentos secundarios, posiblemente de tipo similares a pioverdinas, para favorecer mecanismos que optimicen la adquisición de nutrientes esenciales, como el fósforo (Ferenci, 2016). Esta reconfiguración metabólica podría representar una ventaja adaptativa bajo condiciones competitivas o limitadas en nutrientes, al priorizar la eficiencia nutricional sobre el gasto energético que implica sostener la competencia microbiana. Si bien, este rasgo puede conferir beneficios funcionales en ambientes *in vitro* o pobres en fósforo, sus implicancias en contextos más complejos como la rizosfera aún requieren ser exploradas. (Kaminsky et al., 2019).

Otra de las observaciones destacadas en este estudio fue la modulación progresiva del efecto antagonista ejercido por el aislamiento B12 sobre el aislamiento B1 a lo largo de los ciclos de competencia, particularmente al comparar el ciclo 2 con el ciclo final (ciclo 12) (Fig. 12a y 12b). En el ciclo 2, se observa que B12 provoca una inhibición clara en el crecimiento de B1, afectando no solo el borde, sino también parte del centro de su colonia donde se nota una ausencia de biomasa celular, lo que podría estar asociado a la producción de metabolitos bioactivos con capacidad bactericida o bacteriostática. En contraste, para el

ciclo 12, la colonia de B1 no presenta alteraciones en la densidad celular o signos de disrupción en la periferia o centro de la colonia, sin embargo, se observa que B12 detiene la expansión de la colonia B1 en dirección a la colonia vecina y por consiguiente se observa una deformación en la forma circular original de la colonia de B1. Este cambio en la respuesta sugiere una modulación del efecto antagonista de B12 sobre B1, posiblemente asociado a la producción de sustancias inhibitorias de un espectro no letal para B1, capaz de detener su crecimiento sin causar una muerte celular aparente.

Este cambio funcional en la interacción de competencia de B12 y B1 se acompañó de alteraciones morfológicas visibles en la colonia de B12. A lo largo de los ciclos de competencia, B12 muestra una reducción progresiva en el grosor del borde del anillo periférico hasta casi desaparecer en el ciclo 12 (Fig. 14). En el ciclo 12, muestra una estructura en lóbulos prominentes y desordenados comparados con la morfología de la colonia de B12 para el ciclo 2. También se observaron diferencias en la densidad colonial, lo que puede indicar un re-arreglo fenotípico como repuesta a una interacción de competencia sostenida. Sin embargo, cabe destacar que la morfología de la colonia de B12 obtenida de los repiques sin competencia en el ciclo 12 presenta algunas similitudes con la morfología de B12 para el mismo ciclo, lo que dificulta separar completamente los efectos derivados de las interacciones de competencia de aquellos asociados a los pases sucesivos en un medio sintético. Esto remarca la importancia de considerar ambos factores al interpretar los cambios morfológicos observados en las colonias. El cambio funcional observado en la interacción B12B1 (Fig 12a y 12b) puede estar asociado a la modulación en la producción o secreción de compuestos o sustancias inhibidoras como antimicrobianos como respuesta a las condiciones ambientales, acumulación de ciclos de competencia o reorganización metabólica inducida por estrés. Se ha reportado que bacterias como *B. subtilis* pueden alterar su respuesta competitiva frente a rivales tras exposiciones a compuestos antimicrobianos, modificando su perfil de producción de metabolitos secundarios, su morfología e incluso su resistencia como se evidenció en el estudio de Stubbendieck y colaboradores (2015).

Gorter y colaboradores (2021) observaron que la competencia en el tiempo puede modular la respuesta antagonista debido a que la selección prolongada, con o sin presencia de competidores, puede conducir a adaptaciones específicas al entorno experimental. Cuando las cepas evolucionan en ausencia de un competidor, tienden a perder rasgos antagonistas, lo que sugiere que mantener estos mecanismos puede representar un costo innecesario en

contextos donde no hay presión de competencia directa. Por el contrario, la presencia continua de un competidor sensible puede favorecer la retención o incluso el aumento de la inhibición, especialmente cuando hay un nivel intermedio de similitud genética entre cepas, lo cual incrementa la competencia por recursos compartidos. Así, el entorno social y la historia evolutiva influyen fuertemente en la expresión del antagonismo microbiano. El estudio concluye afirmando que el nivel de competencia por interferencia puede evolucionar fácilmente para ser más o menos antagónico. Además, existen algunas teorías ecológicas que indican que la competencia tiende a caer con el tiempo lo que conduce a equilibrios estables que implican interacciones débiles entre cepas que han eliminado a sus competidores o han repartido los nichos y el espacio disponibles (Ghoul et al., 2016; Gorter et al., 2021).

En general, los resultados que evidencian modificaciones morfológicas en la arquitectura de la colonia como la densidad celular (Fig.11), cambio en el grosor del borde de la colonia (Fig.12-13), hasta cambios en la estructura del anillo céntrico de la colonia del aislamiento B12 (Fig.14) a lo largo de los ciclos de competencia y en condiciones de crecimiento individual de repique sin competencia indican que el comportamiento morfológico de la colonia no es constante y que las variaciones morfológicas, funcionales y genéticas que surgen son completamente dependientes de la cepa microbiana a la que se enfrentan (Gorter et al., 2021). Se ha reportado que la presencia de colonias vecinas es capaz de alterar el comportamiento competitivo de muchas especies de bacterias del suelo y que, dependiendo de la identidad de una colonia vecina, un par de especies puede aumentar o suprimir su producción de antibióticos (Abrudan, et al., 2015; Ghoul, et al., 2016). Esto sugiere que un aislamiento bacteriano puede ajustar dinámicamente su perfil metabólico y, por ende, su morfología de colonia en función del entorno biótico con el que interactúan. Tal variabilidad puede involucrar la modulación en la producción de metabolitos secundarios, incluidos compuestos antimicrobianos, estructurales y señalizadores.

Este fenómeno es consistente con lo reportado por Traxler y colaboradores (2013) y Westhoff y colaboradores (2021), quienes describen mecanismos de *competition sensing*, mediante los cuales, por ejemplo, especies del género Streptomyces, como *S. coelicolor,* varían dramáticamente el set de compuestos derivados de una interacción a otra, sugiriendo una respuesta en gran medida específica en cada caso. Esto indica la modificación de su comportamiento metabólico al detectar señales químicas específicas de

sus competidores, lo que se traduce en cambios morfológicos de colonia únicos según el competidor que enfrentan.

Estas observaciones no solo son relevantes desde una perspectiva eco evolutiva, sino que además tienen implicaciones directas en la selección de cepas con características de promoción de crecimiento vegetal. La capacidad de un aislamiento para ajustar su expresión fenotípica y funcional bajo presión biótica puede influir en la producción de compuestos clave en la promoción del crecimiento vegetal, como fitohormonas, sideróforos o enzimas relacionadas con la solubilización de nutrientes (Diabankana et al., 2022). Sin embargo, para establecer la relevancia funcional de las modificaciones morfológicas, es necesario primero determinar si estos cambios son de naturaleza heredable o si se deben a plasticidad fenotípica. Las modificaciones que se mantienen incluso en ausencia del estímulo biótico, en este caso, competitivo, indicaría un cambio estable que puede aprovecharse en la selección de cepas para el desarrollo de bioinoculantes con características consistentes. En contraste, si los cambios son plásticos, dependerán de la presencia constante del estímulo ambiental, lo que podría limitar su aplicabilidad en condiciones variables de campo. Por lo tanto, la distinción entre ambas naturalezas no solo tiene implicaciones ecológicas, sino también agronómicas, al influir directamente en la predictibilidad y eficacia de los rasgos PGPR que se pretenden seleccionar.

En cuanto a los cambios vistos en las morfologías de las colonias resultantes tras los ciclos de competencias y los repiques sucesivos sin competencias (Fig. 18), se logran evidenciar algunos cambios morfológicos notables en comparación con sus respectivos aislamientos parentales crioconservados. Estos resultados muestran que, si bien algunos aislamientos como B1 y B58 tienden a conservar su morfología original con variaciones leves tras haber sido expuestos a sucesivos ciclos de competencia y de siembras en repique, el aislamiento B12 exhibe una marcada diversificación morfológica. Esta variabilidad, especialmente pronunciada en las colonias derivadas de competencia, sugiere una alta plasticidad fenotípica en este aislamiento. Esta diversidad puede deberse a varios factores, entre ellos: una elevada capacidad de respuesta a estímulos ambientales (Diabankana et al., 2022; Polanca S., 2020), mecanismos epigenéticos (Reva et al., 2019; Vasilchenko, et al., 2022) o de regulación génica activados por el estrés competitivo (Mould et al., 2021), e incluso posibles procesos de diferenciación celular o esporulación parcial inducidos por la interacción con otras cepas (Chong, et al., 2024; Eldar, et al., 2009). Dado que el género Bacillus es conocido por su versatilidad metabólica y estructural (Mandic-Mulec, et al., 2016;

Fajardo et al., 2016), no es sorprendente que bajo condiciones de presión ecológica muestre estrategias morfológicas diferenciadas como posibles adaptaciones o cambios morfológicos.

Impacto de las interacciones de competencia en los rasgos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*

Solubilización de fosfatos en medio PVK postcompetencia

Los resultados obtenidos (Fig. 21) muestran que la eficiencia relativa en la expresión de este rasgo funcional (%ERS) varía significativamente según las condiciones experimentales impuestas, lo que sugiere que tanto que las interacciones de competencia como las siembras sucesivas produjeron una alteración positiva y/o negativa en los valores de solubilización de fosfato respecto a la población parental (criovial). No obstante, se observó un aumento en el grado de la expresión de este rasgo en las variantes obtenidas de las interacciones de competencia para los tres grupos bacterianos (B1, B12 y B58): B1B1, B12B1, B58B1, revelando valores de solubilización ligeramente más altos que sus poblaciones parentales, las poblaciones de repique o las demás poblaciones resultantes de interacciones competitivas entre estos aislamientos (B1B12, B1B58, B12B12, B12B58, B58B58, B58B12). Interesantemente, las variantes resultantes de interacciones competitivas que obtuvieron mejor porcentaje de solubilización estuvieron en interacción competitiva con el aislamiento B1, lo que sugiere que este aislamiento en particular, provocó una alteración significativa en los aislamientos que enfrentó, inclusive en una población de la misma cepa (B1B1). Esta alteración puede estar asociada a la producción especifica de una sustancia inhibitoria o de señalización producida bajo interacciones bióticas de competencia.

De los resultados obtenidos, más específicamente, la variante B58B1, que previamente habría mostrado un cambió morfológico drástico con respecto a la colonia parental, pues perdió su coloración y textura original, fue la variante que mostró el mayor porcentaje de eficiencia relativa de solubilización de fosfatos superando a la población parental en la expresión de este rasgo. Además, algunas variantes como B1B12*, B12RPQ* y B58B58 exhibieron valores inferiores que las poblaciones parentales en la expresión de este rasgo y las variantes B12B12 y B12RPQ no mostraron actividad en la expresión de este rasgo. Los resultados de este estudio coinciden ligeramente con hallazgos recientes que destacan

el papel de las presiones ecológicas, como la competencia, en la modulación de rasgos funcionales.

Faller y colaborores (2024) demostraron que el método de propagación, basado en ciclos sucesivos de selección a nivel de comunidad, incrementó significativamente la solubilización de fosfatos, superando incluso en un 24.2% la actividad de las comunidades originales del suelo. Este aumento se mantuvo estable al transferirse a un sistema hidropónico, indicando que la selección por competencia entre comunidades puede inducir adaptaciones funcionales duraderas, así como modular la expresión y estabilidad de funciones relevantes, en este caso, para el desarrollo de bioproductos agrícolas. De forma similar a lo reportado por Kaminsky y colaboradores (2025), quienes demostraron que la evolución en bacterias solubilizadoras de fosfato en medios líquidos redujo su aptitud en el suelo, los resultados de este trabajo sugieren que las condiciones de laboratorio (repiques),pueden alterar rasgos funcionales relevantes para la promoción del crecimiento vegetal. Esto resalta la importancia de considerar los efectos evolutivos del manejo experimental de las cepas antes de su inoculantes, así como la necesidad de desarrollar estrategias de evolución en condiciones más dirigidas que simulen, por ejemplo, el entorno rizosférico.

Producción de indoles totales postcompetencia

La figura 21 muestra los resultados para la producción de indoles totales entre los tratamientos evaluados para los grupos bacterianos B1, B12 y B58. Estos compuestos actúan como fitohormonas capaces de estimular el desarrollo radicular, entre ellos, la auxina más estudiada, el ácido indol acético (Garay et al., 2014). El grupo B1 y B58 no revelaron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, se observa que la variante resultante B1B1 presentó una mayor producción de indoles totales sin diferencias concluyentes con los demás tratamientos, así mismo, B58Cr mantuvo una mediana ligeramente superior los demás tratamientos, sin embargo, la distribución de los datos no permitió una diferencia significativa con respecto a los tratamientos. Estos resultados pueden indicar, en cierta medida, la conservación de esté rasgo para estos dos aislamientos en particular, sin embargo, se debe considerar el efecto de reselección en medios artificiales, así como los protocolos del laboratorio para la cuantificación de estos productos y la falta de robustez estadística.

En contraste, el grupo B12 fue el único grupo bacteriano que reveló diferencias estadísticamente significativas, el tratamiento B12B12* presentó la menor producción de indoles, siendo estadísticamente diferente del tratamiento B12Cr, que mostró valores superiores. B12B1 y B12RPQ mostraron valores intermedios. Estos resultados indican que la variabilidad morfológica que expresan algunas especies del género Bacillus pueden tener implicaciones funcionales según el arreglo experimental al cual son sometidas (Kumar et al., 2014; Kysela et al., 2016). En este caso, según los resultados, se sugiere que es posible que la crio-preservación haya preservado la expresión de este rasgo, mientras que las interacciones competitivas y/o los efectos del repique podrían haber promovido una pérdida parcial o modulación en la expresión de este rasgo.

En el estudio desarrollado por Barreto y colaboradores (2020) se evidenció que variantes evolutivas de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas chlororaphis*, obtenidas tras un proceso de propagación en condiciones de laboratorio, presentaron una reducción significativa de la producción de ácido indol acético (AIA), una fitohormona clave en la promoción del crecimiento vegetal. En *P. chlororaphis,* cinco de siete variantes mostraron una disminución en la síntesis de AIA, pasando de un promedio de 15.2 ± 1.4 µg/mL en la cepa silvestre a valores entre 2.1 y 7.8 µg/mL. De manera similar, en *B. subtilis*, seis de siete variantes redujeron su producción desde 9.7 ± 1.1 µg/mL a un rango de 1.5–6.3 µg/mL. Esta tendencia sugiere que la presión selectiva en ambientes artificiales favorece mutaciones que disminuyen o eliminan la inversión en metabolitos que benefician el desarrollo vegetal, como el AIA, reflejando una regresión de los rasgos benéficos en planta. Este patrón también puede estar ocurriendo en las variantes analizadas en este este estudio, donde se observaron leves diferencias en la capacidad de producción de AIA entre los morfotipos expuestos a las diferentes interacciones de competencia, así como en aquellas poblaciones que crecieron en repique sin competencia, lo que dificulta separar los efectos de la presión competitiva y la selección en medios artificiales.

Además, en el estudio conducido por Diabankana y colaboradores (2022) se evidenció que las variantes fenotípicas de *Bacillus mojavensis* PS17 generadas bajo condiciones de estrés (condiciones mínimas de nutrición), presentan diferencias significativas en la producción de ácido indol acético (AIA). Se observaron diferencias marcadas entre los dos fenotipos obtenidos PS17(I) y PS17 (II). En presencia del triptófano, ambos fenotipos mostraron capacidad de producir AIA, pero el morfotipo PS17(I) alcanzó una concentración de 6.01 µg/mL, mientras que PS17(II) produjo solo 2.12 µg/mL, lo que representa una

disminución de 64.72%. Además, en ausencia del precursor, únicamente PS17(I) mantuvo una producción residual (0.67 µg/mL), mientras que PS17(II) no produjo cantidades detectables. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la expresión de rasgos asociados a la promoción del crecimiento vegetal, como la síntesis de fitohormonas puede estar modulada por presiones selectivas que afectan el desempeño funcional de los microorganismos en contextos fluctuantes. En el presente estudio, se observó una variación leve en la producción de AIA entre las variantes morfológicas obtenidas de interacciones competitivas y aquellas mantenidas por repiques sucesivos, en comparación con sus respectivas cepas parentales, lo que pudiera concordar con la tendencia observada en estos estudios, sugiriendo un posible compromiso ecológico entre la estabilidad fenotípica y la funcionalidad fisiológica.

De manera general, algunos estudios han mostrado la diferencia en la expresión de algunos rasgos que se someten a variación fenotípica. Por ejemplo, en el estudio de Ambrico y colaboradores (2019) investigaron que las diferencias en la capacidad en la producción de Iturina A (lilopéptido) en la cepa ET-1 de *B. subtilis* estaba asociado a la presencia de al menos tres morfotipos coloniales distintos, denominados arbitrariamente como rugoso (R), suave (S) y mucoso (M). Los análisis por HPLC revelaron que el morfotipo R fue el más productivo, con rendimientos aproximadamente 10 y 100 veces mayores que los observados en los morfotipos S y M, respectivamente.

Así mismo, en el estudio de Vial y colaboradores (2010) también se evaluó la expresión de rasgos asociados a la promoción del crecimiento vegetal en variantes fenotípicas de *Burkholderia ambifaria*. Se compararon cepas tipo silvestre y variantes obtenidas de *B. ambifaria* HSJ1, observándose diferencias en diversos rasgos funcionales. Entre las características evaluadas se incluyeron la producción de sideróforos, la actividad proteolítica, la actividad de colesterol oxidasa y la formación de biopelículas. Adicionalmente, se documentaron diferencias morfológicas evidentes entre las colonias en medio CRTSB con rojo Congo. Estos resultados sugieren que la variación fenotípica dentro de una misma cepa puede influir en la expresión de rasgos relevantes (Ackermann, 2015) para la interacción con plantas, lo que podría tener implicaciones importantes en aplicaciones agrícolas.

En conjunto, estos resultados destacan que las respuestas a las condiciones experimentales expuestas varían entre los grupos bacterianos, lo que sugiere que la

sensibilidad a las presiones selectivas ambientales bióticas (competencia) y abióticas (crio preservación, repiques) dependen de linaje microbiano.

Los efectos observados durante los experimentos de competencia sobre la expresión de rasgos de promoción de crecimiento vegetal (PGPR) resultan ser, en muchos casos, ambiguos. Esta ambigüedad puede deberse a que dichos rasgos no son estáticos, sino que están influenciados por múltiples factores, entre ellos el enfoque experimental adoptado, como en este caso, un enfoque de evolución experimental el cual es altamente dependiente del contexto y dirección del diseño experimental, así como por las características propias de las cepas microbianas involucradas en el estudio (Kawecki et al., 2012).

Diversos estudios han reportado que las bacterias pueden modular su comportamiento funcional en respuesta a señales bióticas específicas de otros microorganismos, lo que puede inducir variaciones en la producción de fitohormonas, sideróforos o enzimas asociadas a la promoción del crecimiento vegetal (Goh et at., 2013; Westhoff et al., 2021). Sin embargo, una limitación importante es que resulta difícil separar con certeza los efectos reales generados por las interacciones microbianas del ruido experimental introducido por variaciones en los protocolos, errores técnicos o condiciones de medición. Estos factores pueden conducir a la subestimación o sobreestimación de las cantidades reales de los compuestos producidos o de los efectos observados en planta, lo cual añade un nivel adicional de incertidumbre a la interpretación de los resultados.

No obstante, es importante destacar, que dichos efectos no pueden atribuirse exclusivamente a las interacciones competitivas, ya que también podrían estar influenciados por otros factores como la reselección generada por pases sucesivos en medios artificiales (Dragosits et al., 2013) o fenómenos estocásticos como la deriva genética que también opera durante los procesos de evolución experimental (Heffernan et al., 2002).

Además, es importante considerar que algunos de los resultados obtenidos, podrían estar influenciados por errores estadísticos tipo I, es decir, encontrar diferencias significativas en donde no existen. Esto puede estar relacionado con la baja cantidad de réplicas biológicas utilizadas en algunas evaluaciones, así como la falta de repeticiones del experimento a lo largo del tiempo, lo cual limita la robustez estadística y reduce la potencia del análisis.

Por otra parte, la naturaleza de los cambios, si son heredables o producto de una plasticidad fenotípica transitoria, influye directamente en su aplicabilidad. Por ello, comprender la

estabilidad temporal y genética es fundamental para establecer criterios sólidos de selección de cepas PGPR con potencial de uso agronómico.

OBJETIVO 3

Respuesta del desarrollo vegetal de *S. lycopersicum* a la inoculación de los aislamientos parentales, las poblaciones de repique y las poblaciones variantes resultantes de las interacciones competitivas de los aislamientos B1, B12 y B58.

En general, se evaluaron los efectos de la inoculación de las poblaciones bacterianas: el aislamiento parental (Cr), la población variante obtenida tras interacciones competitivas y la población tras repiques sucesivos (RPQ) para cada uno de los aislamientos B1, B58 y B12 (panel A, B y C respectivamente) sobre cuatro variables agronómicas: longitud aérea, longitud de raíz, número de hojas y peso seco total (Fig 22- Fig 25 respectivamente) en plántulas de tomate bajo condiciones de vivero.

Los resultados obtenidos muestran que la inoculación con los distintos grupos bacterianos generó efectos diferenciados sobre el desarrollo agronómico de plántulas de tomate, con una influencia marcada en la naturaleza poblacional (criopreservadas, resultantes de las interacciones competitivas y repiques sucesivas). De forma general, las poblaciones derivadas de las interacciones competitivas (B1B1, B12B1, B58B1) mostraron una mayor eficacia en la promoción de crecimiento vegetal, especialmente en variables como la longitud aérea y el peso seco, en comparación con las poblaciones crioconservadas o aquellas sometidas a repiques sucesivos. Este patrón sugiere que los procesos de competencia microbiana *in vitro*, pudieron haber favorecido la selección de variantes funcionalmente más eficientes, como ha sido descrito en estudios sobre evolución experimental de comunidades microbianas (Fiegna et al., 2015; Scheuerl et al., 2019). No obstante, el arreglo experimental usado en este trabajo, dificulta separar los efectos mixtos de la competencia en condiciones de laboratorio, por lo que los efectos observados en a nivel *in vitro* podrían ser parcialmente modulados en suelo.

Además, las respuestas no fueron consistentes entre todos los grupos. En el grupo B58, por ejemplo, la población derivada de las interacciones competitivas, generó aumentos significativos en la longitud aérea, mientras que en el grupo B12 no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos, lo que puede indicar una menor plasticidad o una conservación funcional de algunos rasgos asociados a la promoción de crecimiento

vegetal en un linaje especifico (Krause et al., 2020). Este tipo de variabilidad sugiere que el efecto de las interacciones ecológicas sobre los rasgos funcionales no es universal, sino dependiente del contexto genético y fisiológico de cada cepa (Ackermann, 2015; Martiny et al., 2015; Nestor et al., 2023), además de las condiciones experimentales a las que son sometidas (Van den Bergh et al., 2018).

Es importante destacar que, si bien se observaron diferencias estadísticas en algunas de las variables evaluadas, los resultados deber ser interpretados con cautela. La falta de repeticiones experimentales en el tiempo limita la robustez estadística del estudio y puede aumentar la probabilidad de detectar diferencias significativas cuando en realidad no existen. La ausencia de réplicas temporales impide confirmar la consistencia de los efectos observados, lo cual resulta esencial para validar la estabilidad funcional de los inoculantes evaluados.

En general, estos hallazgos resaltan tanto el potencial de las interacciones ecológicas para modular el desempeño funcional de las cepas bacterianas, como la necesidad de implementar diseños experimentales más robustos que permitan confirmar la reproducibilidad de estos enfoques. La integración de enfoques eco evolutivos con experimentos racionalmente diseñados, resulta fundamental para el entendimiento de las adaptaciones ambientales bacterianas y cómo esto nos puede conducir a la selección de confiable de cepas microbianas con aplicaciones agronómicas (Moreira et al., 2023).

En coherencia con lo observado en el presente estudio, Diabankana y colaboradores (2022) demostraron que la variación fenotípica en *Bacillus mojavensis* PS17 afecta significativamente sus propiedades biológicas, incluyendo su capacidad promotora de crecimiento vegetal. En experimentos con plántulas de tomate, el morfotipo I (colonias opacas) demostró un efecto significativamente superior sobre las variables evaluadas, incrementando la longitud aérea (12.26 cm), la longitud de raíz (5.10 cm) y el peso fresco (0.491 g) en comparación tanto con el control como con el morfotipo II (colonias translúcidas), cuyas respuestas fueron estadísticamente similares al tratamiento sin inoculación. Estos resultados resaltan que, aunque ambos morfotipos conservaron su capacidad endofítica, sólo el morfotipo I mantuvo un efecto bioestimulante robusto. Esta pérdida parcial de funcionalidad en el morfotipo II fue atribuida a una disminución en la producción de AIA y enzimas hidrolíticas esenciales para la promoción del crecimiento vegetal.

3.2) Re-secuenciación de la región ADNr 16S de las poblaciones variantes obtenidas de las interacciones competitivas y las poblaciones de repique para cada uno de los aislamientos evaluados (B1, B12 y B58)

Los árboles filogenéticos construidos a partir de secuencias de la región ADNr 16S por el método *"Neighbor joining"* (Fig. 29) permitieron observar la similitud genética entre las variantes obtenidas de las interacciones competitivas y aquellas mantenidas en repiques sucesivos con sus respectivas cepas parentales. En general, los resultados evidencian que la mayoría de las variantes mantuvieron una identidad filogenética congruentes con sus cepas parentales, agrupándose en un mismo clado con alto soporte bootstrap que respalda la estabilidad filogenética de las variantes.

Por otro lado, para B1, aunque la variante B1B1 muestra una agrupación con su cepa parental B1Cr en un clado con un soporte bootstrap de 100, la variante resultante de la población de repique sucesivo muestra una menor certidumbre de su ubicación en el clado del grupo taxonómico *C. arvi* con bajo soporte de rama bootstrap (47) lo que indicaría una divergencia incipiente que puede ser atribuible a errores en la secuenciación o alineamiento (Lachance, M.A, 2022), así como polimorfismo intragenómico de la región de ADNr 16s que puede tener múltiples copias del gen con diferencias ligeras entre ellas (Hassler et al., 2022) y también a un reordenamiento o mutación reciente no representativo del linaje principal, pero amplificado en condiciones experimentales.

En B12, los resultados sugieren la alta afinidad genética entre B12B1 y la su cepa parental B12Criovial y que además ambos presentan alta afinidad en un nodo en donde se agrupan *B. pumilus*, *B. zhangzhouensis* y *B. safensis*. Mientras que a la alta divergencia observada en B12RPQ con respecto a su cepa parental, lo indicaría un posible evento de contaminación, el cual puede estar asociado al trabajo en laboratorio en donde se manejan múltiples tipos de microorganismos.

Particularmente, los árboles enraizados con grupos externos permitieron establecer la direccionalidad evolutiva de los clados y confirmar la filiación de las variantes con especies de los géneros *Caballeronia*, *Bacillus* y *Paraburkholderia*. Las agrupaciones con altos valores de bootstrap respaldan la estabilidad filogenética de ciertos tratamientos, mientras que las ramas divergentes o con bajos soportes sugieren una mayor variabilidad, como se evidenció en B12R1 o en el nodo que agrupa a los tratamientos B58 con la cepa tipo.

Estas diferencias pueden explicarse, de manera parcial, por la influencia de presiones selectivas derivadas de los tratamientos aplicados, como la competencia, la crioconservación o los repiques sucesivos, los cuales podrían haber favorecido la selección de subpoblaciones con ligeras variantes genéticas. No obstante, un aspecto crítico a considerar es la posibilidad de que los patrones de divergencia observados no reflejen cambios genómicos reales, sino que estén asociados a la presencia de polimorfismo intragenómico en las múltiples copias del gen 16S.

Este fenómeno, ampliamente reportado en géneros bacterianos como *Bacillus* y *Paraburkholderia* (Duflos et al., 2024), consiste en la coexistencia de secuencias ligeramente diferentes del gen 16S dentro del mismo genoma, lo que puede generar artefactos en los análisis filogenéticos basados únicamente en esta región. Por tanto, las diferencias observadas entre variantes derivadas de un mismo aislamiento podrían no representar una verdadera especiación o divergencia evolutiva, sino más bien reflejar limitaciones técnicas del marcador utilizado.

Dado lo anterior, los resultados obtenidos deben interpretarse con cautela. Aunque el análisis del gen 16S es una herramienta útil para aproximaciones taxonómicas iniciales, no posee una resolución suficiente para discriminar con precisión entre cepas muy relacionadas, especialmente cuando se analiza variabilidad intracelular. Para superar estas limitaciones y confirmar la validez de los patrones observados, es recomendable complementar este análisis con otros marcadores moleculares más resolutivos, como genes housekeeping o enfoques de genómica comparativa (p. ej., ANI o secuenciación del genoma completo).

Como era de esperarse, los resultados obtenidos indican que las variantes derivadas tanto de interacciones competitivas como de repiques sucesivos conservan una alta similitud genética con sus poblaciones parentales, al menos en lo que respecta a la secuencia del gen 16S ADNr. No obstante, en ausencia de análisis genómicos de mayor resolución, no puede descartarse la posibilidad de que hayan ocurrido mutaciones puntuales o reordenamientos genéticos en otros loci funcionales. Por ello, se sugiere que las diferencias fenotípicas observadas en este estudio podrían ser el resultado de mecanismos de plasticidad fenotípica más que de cambios genéticos estables. Estos hallazgos también destacan la necesidad de interpretar con cautela los árboles filogenéticos construidos únicamente con la región del ADNr 16S, ya que el polimorfismo intragenómico de este gen

puede limitar la resolución taxonómica y enmascarar variaciones biológicamente relevantes.

Interacciones de competencia entre las poblaciones parentales, las poblaciones derivadas de las interacciones competitivas y las poblaciones de repique en medio PVK.

Este estudio evaluó los posibles cambios funcionales entre la capacidad de los aislamientos bacterianos para solubilizar fosfatos en medio PVK y su capacidad antagonista en interacciones de competencia duales en el mismo medio (Fig. 30). Se analizaron las colonias de las poblaciones variantes derivadas de las interacciones competitivas, las poblaciones parentales y las poblaciones de repique, utilizando imágenes procesadas con software IMAGE J para observar los cambios morfológicos y de densidad en las colonias evaluadas.

En el caso de B58, se encontraron diferencias notables en el comportamiento de las colonias bajo diversas condiciones de competencia. La variante B58B1 mostró una mayor capacidad de solubilización de fosfatos en interacción con B1Cr en comparación con su colonia parental B58 criovial, que presentó una baja actividad de solubilización, pero mantuvo un fuerte efecto antagonista sobre B1Cr. Por el contrario, en la interacción entre B58B1y B1Cr, no se observó una inhibición visible entre las colonias, lo que indica una disminución de la capacidad antagonista en esta variante.

En cuanto a la interacción entre B1 criovial y la variante B12B1 y la población B12 RPQ, se observaron diferencias significativas. B12RPQ mostró un efecto inhibidor sobre la colonia de B1Cr, afectando la densidad celular y causando una contracción en su estructura céntrica tipo anillo. Sin embargo, la variante B12B1 no generó una deformación visible en B1 criovial, lo que sugiere una reducción en su capacidad antagonista. En ambos casos, la actividad de solubilización de fosfatos en B12 fue limitada y no presentó diferencias significativas entre las variantes y la población de repique.

Por otro lado, las interacciones entre las poblaciones de B58 y B12Cr también revelaron comportamientos divergentes. Mientras que B58Cr mostró un fuerte efecto inhibidor, causando lisis en el borde de la colonia de B12Cr, su capacidad para solubilizar fosfatos fue moderada. En contraste, B58RPQ perdió prácticamente toda capacidad de solubilización de fosfatos, aunque mantuvo una elevada capacidad antagonista, lo que refuerza la idea de una modulación del efecto entre estos dos rasgos. Mientras que la

variante B58B1 mostro una alta capacidad de solubilización de fosfatos en medio PVK, su actividad antagonista fue reducida.

Estos resultados sugieren que los tratamientos tanto de criopreservación, como repique y competencia afectan de manera diversa los fenotipos de los aislamientos bacterianos. Se identificó la modulación de los rasgos de solubilización de fosfatos y la capacidad antagonista en varios aislamientos, con variantes que exhiben una mayor solubilización a expensas de su capacidad para inhibir a otras colonias. Dependiendo del contexto, la modulación funcional puede ser beneficiosa o perjudicial para las bacterias en términos de su supervivencia y capacidad para prosperar en un ambiente en específico.

La elevada solubilización de fosfatos observada en la variante B58B1 podría estar relacionada con una compensación ecológica en respuesta a la competencia y a los cambios morfológicos observados. Estudios previos de Cornforth y colaboradores (2013) han reportado que las cepas bacterianas sometidas a presión competitiva tienden a priorizar la producción de metabolitos útiles para la adquisición de nutrientes. Esto puede indicar que las interacciones bacterianas en ambientes competitivos no solo afectan la capacidad de antagonismo entre especies, sino que también inducen adaptaciones fenotípicas que podrían mejorar la adquisición de nutrientes esenciales en condiciones limitadas de fósforo.

Diversos estudios con enfoque de evolución experimental han demostrado que algunas especies microbianas involucradas pueden experimentar compensaciones ecológicas o costos evolutivos como resultado de las condiciones del arreglo experimental. Por ejemplo, Nordgaad y colaboradores (2022), mediante un enfoque de evolución experimental, observaron la rápida adaptación de *B. subtillis* para mejorar su capacidad de colonizar las raíces de *Arabidipsis thaliana*. Sin embargo, los aislamientos evolucionados presentaron una motilidad reducida, lo que sugiere que la formación de biopelículas fue más importante que la motilidad para la colonización de raíces bajo las condiciones del experimento. Además, la adaptación a las raíces de *A. thaliana* implicó un costo evolutivo, ya que los aislamientos evolucionados mostraron una desventaja competitiva en entornos no selectivos, lo que sugiere que la especialización en la colonización de raíces tiene consecuencias negativas fuera de ese entorno.

Por otra parte, Li y colaboradores (2021), mediante un enfoque de evolución experimental, demostraron que *Pseudomonas protegens* desarrolló mutaciones clave que mejoraron su capacidad para colonizar raíces de *Arabidopsis thaliana*. Se identificaron 35 mutaciones

distribuidas en 28 genes, muchas de ellas asociadas con la producción de sideróforos, la motilidad y la estructura de la superficie celular. En particular, las mutaciones en los genes reguladores *gacA* y *gacS* incrementaron la motilidad por natación, pero redujeron significativamente tanto la formación de biopelículas como la motilidad en enjambre, lo que indica una compensación evolutiva entre la capacidad de desplazamiento y la adherencia a la raíz.

10) Conclusiones

La evaluación de 82 aislamientos bacterianos obtenidos de la rizosfera árboles de aguacate permitió seleccionar e identificar 10 especies con rasgos funcionales claves asociados a la promoción del crecimiento vegetal, como la solubilización de fosfatos, la producción de indoles totales y, en algunos casos, actividad ureasa. Estos resultados demuestran que la rizosfera del aguacate representa un ambiente ecológico altamente prometedor para la bioprospección de microorganismos con potencial como PGPR, albergando una diversidad funcional capaz de expresar mecanismos benéficos para el desarrollo vegetal.

La competencia microbiana sucesiva se plantea como una estrategia experimental con potencial para inducir variaciones fenotípicas estables en PGPR. En este estudio se evidenciaron tanto cambios morfológicos, como el engrosamiento de los bordes de las colonias y una pigmentación estable diferenciada en al menos una de las colonias, así como variaciones en la expresión de algunos rasgos funcionales relevantes a nivel *in vitro*, como la solubilización de fosfatos y la producción de indoles. No obstante, debido al diseño experimental empleado, no es posible atribuir los cambios observados exclusivamente a las interacciones competitivas ya que otras presiones de selección, como el cultivo seriado en medios sintéticos bajo condiciones controladas de laboratorio, así como la posibilidad de mutaciones aleatorias o fluctuaciones genéticas espontáneas, pudieron haber contribuido a la emergencia de variantes fenotípicas.

Se observaron efectos diferenciados sobre el desarrollo de plantas de *S. lycopersicum* bajo condiciones de vivero, particularmente en variables agronómicas como longitud aérea, número de hojas y peso seco. Algunas variantes derivadas de la competencia promovieron el crecimiento vegetal con mayor eficacia que las poblaciones parentales o crioconservadas, mientras que otras no presentaron mejoras significativas. Esto evidencia que la variación fenotípica inducida puede impactar el desempeño funcional en condiciones reales de uso, aunque sus efectos no son universales y dependen del linaje bacteriano específico.

11) Limitaciones

En el diseño experimental se utilizaron poblaciones de repique como una alternativa para separar los efectos de la selección en medios artificiales de los efectos derivados de las interacciones competitivas. Sin embargo, no fue posible identificar con precisión cuál de estas presiones fue responsable de las variaciones fenotípicas observadas o si hubo efectos mixtos. Asimismo, no se evaluaron las variantes obtenidas de ciclos intermedios de competencia, lo que puede limitar la comprensión de la dinámica y estabilidad de los cambios funcionales observados a lo largo del tiempo.

Otra limitación importante fue la falta de estudios genómicos o genéticos específicos. Se utilizó exclusivamente el gen 16S ADNr para confirmar la identidad taxonómica de los aislamientos. Sin embargo, este marcador no permite dilucidar posibles mutaciones en genes funcionales asociados a la promoción del crecimiento vegetal, como aquellos implicados en la formación de biopelículas, la producción de ácidos orgánicos, antibióticos o de vías de asimilación del triptófano para la síntesis de compuestos indólicos. Por lo tanto, no es posible descartar que algunas de las variaciones observadas tengan un origen genético y no meramente plástico, por lo que se requiere profundizar en esta diferenciación mediante enfoques moleculares.

Los experimentos de competencia microbiana se realizaron bajo condiciones nutricionales y ambientales únicas, lo que limita la posibilidad de evaluar cómo varía la fuerza de las interacciones competitivas y la expresión de rasgos funcionales bajo diferentes escenarios ambientales. La extrapolación de estos resultados también se ve restringida por el uso de condiciones controladas de invernadero que no reproduce completamente la complejidad de los sistemas agrícolas reales.

La falta de repeticiones experimentales en el tiempo bajo condiciones de vivero no permitió comprobar la consistencia de los resultados obtenidos y aumentar la resolución estadística

del estudio. Asimismo, el número de especies bacterianas usado impide generalizar en patrones de respuesta a la competencia o a los tratamientos de repiques sucesivos por lo que se requiere incorporar una diversidad microbiana más amplia o bien, el uso de datos de interacciones competitivas microbianas duales ya reportados en literatura para identificar tendencias repetitivas y evaluar si los efectos observados son consistentes entre linajes.
La caracterización fenotípica evaluó pocos rasgos claves, sin considerar otros mecanismos importantes para la promoción de crecimiento vegetal como la producción de sideróforos, enzimas líticas o tolerancia a condiciones de estrés abiótico. Esto limita la comprensión global del potencial funcional de las variantes bacterianas obtenidas.

12) Bibliografía

1) Abbamondi, G. R., Tommonaro, G., Weyens, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorezis, P., ... & Vangronsveld, J. (2016). Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *3*, 1-10.
2) Abrudan, M. I., Smakman, F., Grimbergen, A. J., Westhoff, S., Miller, E. L., Van Wezel, G. P., & Rozen, D. E. (2015). Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(35), 11054-11059.
3) Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., & Heulin, T. (2004). Phenotypic variation of Pseudomonas brassicacearum as a plant root-colonization strategy. *Molecular plant-microbe interactions*, *17*(8), 872-879.
4) Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., & Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. *Journal of Bacteriology, 186*(9), 2629–2635. https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004
5) Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(8), 497-508.
6) Ackermann, M. et al. Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. Nature 454, 987–990 (2008).

7) Ahmad, I., Khan, M. S. A., Aqil, F., & Singh, M. (2011). Microbial applications in agriculture and the environment: a broad perspective. *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*, 1-27.
8) Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of Bacillus through comparative genomics. *BMC genomics*, *11*, 1-17.
9) Alzate Zuluaga, M. Y., Fattorini, R., Cesco, S., & Pii, Y. (2024). Plant-microbe interactions in the rhizosphere for smarter and more sustainable crop fertilization: the case of PGPR-based biofertilizers. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1440978.
10) Ambrico, A., Trupo, M., & Magarelli, R. A. (2019). Influence of phenotypic dissociation in Bacillus subtilis strain ET-1 on iturin A production. *Current Microbiology*, *76*(12), 1487-1494.
11) Agarwal, H., Bajpai, S., Mishra, A., Kohli, I., Varma, A., Fouillaud, M., ... & Joshi, N. C. (2023). Bacterial pigments and their multifaceted roles in contemporary biotechnology and pharmacological applications. *Microorganisms*, *11*(3), 614.
12) Aquilanti, L., Favilli, F., & Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of Azotobacter from soil samples. *Soil Biology and biochemistry*, *36*(9), 1475-1483.
13) Armenta-Bojórquez, A. D., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., Apodaca-Sánchez, M. Á., Gerardo-Montoya, L., & Nava-Pérez, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, *6*(1), 51-56.
14) Arnaouteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., & Kovács, Á. T. (2021). Bacillus subtilis biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(9), 600-614.
15) Bacilio, M., J.P. Hernandez y Y. Bashan. 2006. Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with Azospirillum brasilense. Biology and Fertility of Soils 43, 112-119.
16) Bailey, S. F., Rodrigue, N., & Kassen, R. (2015). The effect of selection environment on the probability of parallel evolution. *Molecular biology and evolution*, *32*(6), 1436-1448.
Baishya, J., & Wakeman, C. A. (2019). Selective pressures during chronic infection drive microbial competition and cooperation. *npj Biofilms and Microbiomes*, *5*(1), 16.
17) Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, *305*(5690), 1622-1625.

18) Barra, P. J., Inostroza, N. G., Mora, M. L., Crowley, D. E., & Jorquera, M. A. (2017). Bacterial consortia inoculation mitigates the water shortage and salt stress in an avocado (Persea americana Mill.) nursery. *Applied Soil Ecology*, *111*, 39-47.
19) Barreto, H. C., Cordeiro, T. N., Henriques, A. O., & Gordo, I. (2020). *Rampant loss of social traits during domestication of a Bacillus subtilis natural isolate. Sci Rep 10: 18886*.
20) Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil*, *378*, 1-33
21) Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, 1327-1350.
22) Be'Er, A., Zhang, H. P., Florin, E. L., Payne, S. M., Ben-Jacob, E., & Swinney, H. L. (2009). Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(2), 428-433.
23) Bhutani, N., Maheshwari, R., Kumar, P., & Suneja, P. (2021). Bioprospecting of endophytic bacteria from nodules and roots of Vigna radiata, Vigna unguiculata and Cajanus cajan for their potential use as bioinoculants. *Plant Gene*, *28*, 100326.
24) Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A., & Gurmani, A. R. (2019). Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, *36*(10), 904-916).
25) Borgeaud, S., Metzger, L. C., Scrignari, T., & Blokesch, M. (2015). The type VI secretion system of Vibrio cholerae fosters horizontal gene transfer. *Science*, *347*(6217), 63-67.
26) Borisova, M., Gaupp, R., Duckworth, A., Schneider, A., Dalügge, D., Mühleck, M., ... & Mayer, C. (2016). Peptidoglycan recycling in Gram-positive bacteria is crucial for survival in stationary phase. *MBio*, *7*(5), 10-1128.
27) Bowen, G. D., & Rovira, A. D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in agronomy*, *66*, 1-102.
28) Bucci, V., Nadell, C. D., & Xavier, J. B. (2011). The evolution of bacteriocin production in bacterial biofilms. *The American Naturalist*, *178*(6), E162-E173.
29) Bula, A. O. (2020). Importancia de la agricultura en el desarrollo socio-económico.
30) Casadesús, J., & Low, D. A. (2013). Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(20), 13929-13935.

31) Castaño, A. M. P., Durango, D. P. M., Echeverry, D. P., & Arias, J. A. C. (2021). Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR): Una revisión sistemática 1990-2019. *RIAA*, *12*(2), 9.

32) Cavalcante da Silva, M. J., Palmeira, S. F., Fortes, K., Nascimento, V. X., de Medeiros, A. S., Cavalcanti da Silva, S. J., ... & Sant'Ana, A. E. G. (2020). IAA production of indigenous isolate of plant growth promoting rhizobacteria in the presence of tryptophan. *Australian Journal of Crop Science*, *14*(3), 537-544.

33) Chatterjee, A., Perevedentseva, E., Jani, M., Cheng, C. Y., Ye, Y. S., Chung, P. H., & Cheng, C. L. (2015). Antibacterial effect of ultrafine nanodiamond against gram-negative bacteria Escherichia coli. *Journal of biomedical optics*, *20*(5), 051014-051014.

34) Chong, T. N., & Shapiro, L. (2024). Bacterial cell differentiation enables population level survival strategies. *Mbio*, *15*(6), e00758-24.

35) CIAT, T. (1988). Simbiosis Leguminosa-Rizobio; manual de metodos de evaluación, selección y manejo agronómico

36) Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., & Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from tomato roots: isolation, in vitro characterization and in vivo evaluation of treated tomatoes (Solanum lycopersicum L.). *Microorganisms*, *10*(4), 765.

37) Cornforth, D. M., & Foster, K. R. (2013). Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 285-293.

38) Cronenberg, T., Hennes, M., Wielert, I., & Maier, B. (2021). Antibiotics modulate attractive interactions in bacterial colonies affecting survivability under combined treatment. *PLoS Pathogens*, *17*(2), e1009251.

39) Czárán, T. L., Hoekstra, R. F., & Pagie, L. (2002). Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(2), 786-790.

40) De Salamone, I. E. G., & Di Salvo, L. P. (2019) Interactions Between Plant Genotypes and PGPR are a Challenge for Crop Breeding and Improvement Inoculation Responses. *Microbiological Activity for Soil and Plant Health Management*, 331.

41) Diabankana, R. G. C., Validov, S. Z., Vyshtakalyuk, A. B., Daminova, A., Safin, R. I., & Afordoanyi, D. M. (2022). Effects of phenotypic variation on biological properties of endophytic bacteria Bacillus mojavensis PS17. *Biology*, *11*(9), 1305.

42) Dobritsa, A. P., Linardopoulou, E. V., & Samadpour, M. (2017). Transfer of 13 species of the genus Burkholderia to the genus Caballeronia and reclassification of Burkholderia

jirisanensis as Paraburkholderia jirisanensis comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(10), 3846-3853.

43) Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution–principles and applications for biotechnology. *Microbial cell factories*, *12*, 1-17.

44) Duflos, R., Vailleau, F., & Roux, F. (2024). Toward Ecologically Relevant Genetics of Interactions Between Host Plants and Plant Growth-Promoting Bacteria. *Advanced Genetics*, *5*(3), 2300210.

45) Eldar, A., Chary, V. K., Xenopoulos, P., Fontes, M. E., Losón, O. C., Dworkin, J., ... & Elowitz, M. B. (2009). Partial penetrance facilitates developmental evolution in bacteria. *Nature*, *460*(7254), 510-514.

46) Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D. & Swain, P. S. Stochastic gene expression in a single cell. Science 297, 1183–1186 (2002).

47) Fajardo-Cavazos, P., Maughan, H., & Nicholson, W. L. (2016). Evolution in the Bacillaceae. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*, 21-58.

48) Faller, L., Leite, M. F., & Kuramae, E. E. (2024). Enhancing phosphate-solubilising microbial communities through artificial selection. *Nature Communications*, *15*(1), 1649.

49) Ferenci, T. (2016). Trade-off mechanisms shaping the diversity of bacteria. *Trends in microbiology*, *24*(3), 209-223.

50) Fiegna, F., Moreno-Letelier, A., Bell, T., & Barraclough, T. G. (2015). Evolution of species interactions determines microbial community productivity in new environments. *The ISME Journal*, 9(5), 1235–1245.

51) Frankel, N. W., Pontius, W., Dufour, Y. S., Long, J., Hernandez-Nunez, L., & Emonet, T. (2014). Adaptability of non-genetic diversity in bacterial chemotaxis. *Elife*, *3*, e03526.)

52) Gallart, M., Paungfoo-Lonhienne, C., & Trueman, S. J. (2022). Effects of a growth-promoting Paraburkholderia species on nitrogen acquisition by avocado seedlings. *Scientia Horticulturae*, *295*, 110767.

53) Gamboa-Becerra, R., Desgarennes, D., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., Kiel-Martínez, A. L., Carrión, G., & Ortiz-Castro, R. (2022). Plant growth-promoting and non-promoting rhizobacteria from avocado trees differentially emit volatiles that influence growth of Arabidopsis thaliana. *Protoplasma*, 1-20.

54) Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de Arabidopsis thaliana. *Revista de educación bioquímica*, *33*(1), 13-22.

55) García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Aims Bioengineering*, *2*(3), 183-205

56) Gao, J. L., Sun, P., Sun, X. H., Tong, S., Yan, H., Han, M. L., ... & Sun, J. G. (2018). Caulobacter zeae sp. nov. and Caulobacter radicis sp. nov., novel endophytic bacteria isolated from maize root (Zea mays L.). *Systematic and applied microbiology*, *41*(6), 604-610.

57) Giri, S., Shitut, S., & Kost, C. (2020). Harnessing ecological and evolutionary principles to guide the design of microbial production consortia. *Current Opinion in Biotechnology*, *62*, 228-238.

58) Gerhardt, K.E., X.D. Huang, B.R. Glick y B.M. Greenberg. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. Plant Science 176, 20-30.

59) Goh, C. H., Veliz Vallejos, D. F., Nicotra, A. B., & Mathesius, U. (2013). The impact of beneficial plant-associated microbes on plant phenotypic plasticity. *Journal of chemical ecology*, *39*, 826-839.

60) Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in microbiology*, *24*(10), 833-845.

61) González-Estrada, A., & Camacho Amador, M. (2017). Emisión de gases de efecto invernadero de la fertilización nitrogenada en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *8*(8), 1733-1745.

62) Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, *26*(1), 192.

63) Gorter, F. A., Tabares-Mafla, C., Kassen, R., & Schoustra, S. E. (2021). Experimental evolution of interference competition. *Frontiers in microbiology*, *12*, 613450.

64) Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1), 1127500.)

65) Gupta, A., Gopal, M., & Tilak, K. V. B. (2000). Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria.

66) Han, C., Kuchkarova, N., Zhou, S., Zhang, C., Shi, K., Zou, T., & Shao, H. (2021). Plant growth-promoting abilities and community structure of culturable endophytic bacteria from the fruit of an invasive plant Xanthium italicum. *3 Biotech*, *11*, 1-15.

67) Hansen, S. K., Rainey, P. B., Haagensen, J. A., & Molin, S. (2007). Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*, *445*(7127), 533-536.

68) Hart, M. R., Quin, B. F., & Nguyen, M. L. (2004). Phosphorus runoff from agricultural land and direct fertilizer effects: A review. *Journal of environmental quality*, *33*(6), 1954-1972.

69) Heffernan, J. M., & Wahl, L. M. (2002). The effects of genetic drift in experimental evolution. *Theoretical population biology*, *62*(4), 349-356.

70) Heyrman, J., Vanparys, B., Logan, N. A., Balcaen, A., Rodríguez-Díaz, M., Felske, A., & De Vos, P. (2004). Bacillus novalis sp. nov., Bacillus vireti sp. nov., Bacillus soli sp. nov., Bacillus bataviensis sp. nov. and Bacillus drentensis sp. nov., from the Drentse A grasslands. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *54*(1), 47-57.

71) Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews*

72) Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. https://doi.org/10.1093/molbev/msx281

73) Hoek, T. A., Axelrod, K., Biancalani, T., Yurtsev, E. A., Liu, J., & Gore, J. (2016). Resource availability modulates the cooperative and competitive nature of a microbial cross-feeding mutualism. *PLoS biology*, *14*(8), e1002540.

74) Hu, J., Amor, D. R., Barbier, M., Bunin, G., & Gore, J. (2022). Emergent phases of ecological diversity and dynamics mapped in microcosms. *Science*, *378*(6615), 85-89.

75) Hussien, R. H., Ezzat, S. M., El Sheikh, A. A., Taylor, J. W., & Butt, T. M. (2021). Comparative study of fungal stability between Metarhizium strains after successive subculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*, 1-6.

76) John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical reviews in biotechnology*, *31*(3), 211-226.

77) Johnson, D. R., Goldschmidt, F., Lilja, E. E., & Ackermann, M. (2012). Metabolic specialization and the assembly of microbial communities. *The ISME journal*, *6*(11), 1985-1991.)

78) Johnson, L. F., E. A. Curl, J. H. Bond and H. A. Fribourg. (1959). Methods for studying soil microflora. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minnesota.

79) Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.). Fisiología Vegetal*, 1-28.)

80) Kaminsky, L. M., Burghardt, L., & Bell, T. H. (2025). Evolving a plant-beneficial bacterium in soil vs. nutrient-rich liquid culture has contrasting effects on in-soil fitness. *Applied and Environmental Microbiology*, *91*(4), e02085-24.

81) Kaminsky, L. M., Trexler, R. V., Malik, R. J., Hockett, K. L., & Bell, T. H. (2019). The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. *Trends in Biotechnology*, *37*(2), 140-151.

82) Kämpfer, P., Glaeser, S. P., Blom, J., Wolf, J., Benning, S., Schloter, M., & Neumann-Schaal, M. (2022). Rhodococcus pseudokoreensis sp. nov. isolated from the rhizosphere of young M26 apple rootstocks. *Archives of Microbiology*, *204*(8), 505.

83) Kato, S., Yamagishi, A., Daimon, S., Kawasaki, K., Tamaki, H., Kitagawa, W., ... & Kamagata, Y. (2018). Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media. *Applied and environmental microbiology*, *84*(19), e00807-18.

84) Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., & Whitlock, M. C. (2012). Experimental evolution. *Trends in ecology & evolution*, *27*(10), 547-560.

85) Kayser, J., Schreck, C. F., Yu, Q., Gralka, M., & Hallatschek, O. (2018). Emergence of evolutionary driving forces in pattern-forming microbial populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1747), 20170106.

86) Kelsic, E. D., Zhao, J., Vetsigian, K., & Kishony, R. (2015). Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. *Nature*, *521*(7553), 516-519.

87) Kim, W., Racimo, F., Schluter, J., Levy, S. B., & Foster, K. R. (2014). Importance of positioning for microbial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(16), E1639-E1647.

88) Konstantinidis, D., Pereira, F., Geissen, E. M., Grkovska, K., Kafkia, E., Jouhten, P., ... & Patil, K. R. (2021). Adaptive laboratory evolution of microbial co-cultures for improved metabolite secretion. *Molecular systems biology*, *17*(8), e10189.

89) Koshti, R., Jagtap, A., Noronha, D., Patkar, S., Nazareth, J., Paulose, R., ... & Chakraborty, P. (2022). Evaluation of antioxidant potential and UV protective properties of four bacterial pigments. *Microbiology and Biotechnology Letters*, *50*(3), 375-386.

90) Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A. V., & Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in microbiology*, *8*(7), 298-300.

91) Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, A., Meena, V. S., ... & Saxena, A. K. (2019). Rhizospheric microbiomes: biodiversity, mechanisms of plant growth promotion, and biotechnological applications for sustainable agriculture. *Plant growth promoting rhizobacteria for agricultural sustainability: from theory to practices*, 19-65.

92) Kovács, Á. T., & Dragoš, A. (2019). Evolved biofilm: review on the experimental evolution studies of Bacillus subtilis pellicles. *Journal of molecular biology*, *431*(23), 4749-4759.

93) Kram, K. E., Geiger, C., Ismail, W. M., Lee, H., Tang, H., Foster, P. L., & Finkel, S. E. (2017). Adaptation of Escherichia coli to long-term serial passage in complex medium: evidence of parallel evolution. *Msystems*, *2*(2), 10-1128.

94) Krause, S., Le Roux, X., Niklaus, P. A., Van Bodegom, P. M., Lennon, J. T., Bertilsson, S., ... & Bodelier, P. L. (2020). Trait-based approaches for understanding microbial biodiversity and ecosystem functioning. *Frontiers in Microbiology*, 11, 574

95) Kumar, A., Kumar, A., & Pratush, A. (2014). Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of Bacillus species. *SpringerPlus*, *3*, 1-11.

96) Kysela, D. T., Randich, A. M., Caccamo, P. D., & Brun, Y. V. (2016). Diversity takes shape: understanding the mechanistic and adaptive basis of bacterial morphology. *PLoS Biology*, *14*(10), e1002565.

97) Lawrence, D., Fiegna, F., Behrends, V., Bundy, J. G., Phillimore, A. B., Bell, T., & Barraclough, T. G. (2012). Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. *PLoS biology*, *10*(5), e1001330.

98) Lachance, M. A. (2022). Phylogenies in yeast species descriptions: In defense of neighbor-joining. *Yeast*, *39*(10), 513-520.Lambert, G., & Kussell, E. (2014). Memory and fitness optimization of bacteria under fluctuating environments. *PLoS genetics*, *10*(9), e1004556.

99) Lee, Y., Kim, Y. S., Balaraju, K., Seo, Y. S., Park, J., Ryu, C. M., ... & Jeon, Y. (2020). Molecular changes associated with spontaneous phenotypic variation of Paenibacillus polymyxa, a commonly used biocontrol agent, and temperature-dependent control of variation. *Scientific reports*, *10*(1), 1-12.

100) Lenz, P., & Søgaard-Andersen, L. (2011). Temporal and spatial oscillations in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 565-577.

101) LeRoux, M., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2015). Bacterial danger sensing. *Journal of molecular biology*, *427*(23), 3744-3753.

102) Li, E., Zhang, H., Jiang, H., Pieterse, C. M., Jousset, A., Bakker, P. A., & de Jonge, R. (2021). Experimental-evolution-driven identification of Arabidopsis rhizosphere competence genes in Pseudomonas protegens. *MBio*, *12*(3), 10-1128.

103) Li, X., Kong, R., Wang, J., Wu, J., He, K., & Wang, X. (2023). The formation mechanism of Bacillus subtilis biofilm surface morphology under competitive environment. *Canadian Journal of Microbiology*, *69*(7), 251-261.

104) Li, Y., Wang, M., Sun, Z. Z., & Xie, B. B. (2021). Comparative genomic insights into the taxonomic classification, diversity, and secondary metabolic potentials of Kitasatospora, a genus closely related to Streptomyces. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 683814.

105) Li, Z., Sheng, Y., Yang, J., & Burton, E. D. (2016). Phosphorus release from coastal sediments: Impacts of the oxidation-reduction potential and sulfide. *Marine pollution bulletin*, *113*(1-2), 176-181.)

106) Lin, H. R., Shu, H. Y., & Lin, G. H. (2018). Biological roles of indole-3-acetic acid in Acinetobacter baumannii. *Microbiological research*, *216*, 30-39)

107) Liu, B., Eydallin, G., Maharjan, R. P., Feng, L., Wang, L., & Ferenci, T. (2017). Natural Escherichia coli isolates rapidly acquire genetic changes upon laboratory domestication. *Microbiology*, *163*(1), 22-30.

108) Liu, Y., Kyle, S., & Straight, P. D. (2018). Antibiotic stimulation of a Bacillus subtilis migratory response. *MSphere*, *3*(1), 10-1128.

109) Liu, Y., Lai, Q., Du, J., & Shao, Z. (2016). Bacillus zhangzhouensis sp. nov. and Bacillus australimaris sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *66*(3), 1193-1199.

110) Lopez, J. R., Dieguez, A. L., Doce, A., De la Roca, E., De la Herran, R., Navas, J. I., ... & Romalde, J. L. (2012). Pseudomonas baetica sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, Dicologlossa cuneata (Moreau). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *62*(Pt_4), 874-882.

111) Lyng, M., Jørgensen, J. P., Schostag, M. D., Jarmusch, S. A., Aguilar, D. K., Lozano-Andrade, C. N., & Kovács, Á. T. (2024). Competition for iron shapes metabolic antagonism between Bacillus subtilis and Pseudomonas marginalis. *The ISME journal*, *18*(1), wrad001.

112) Macara, I. G. & Mili, S. Polarity and differential inheritance – universal attributes of life? Cell 135, 801–812 (2008).

113) Mącik, M., Gryta, A., & Frąc, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in agronomy*, *162*, 31-87.

114) Maheshwari, D. K. (Ed.). (2010). *Plant growth and health promoting bacteria* (Vol. 18). Springer Science & Business Media.

115) Malusà, E., Pinzari, F., & Canfora, L. (2016). Efficacy of biofertilizers: challenges to improve crop production. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*, 17-40.

116) Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2016). Ecology of bacillaceae. *The bacterial spore: From molecules to systems*, 59-85.

117) Manzoor, M., Abbasi, M. K., & Sultan, T. (2017). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology journal*, *34*(1), 81-95)

118) Manríquez, B., Muller, D., & Prigent-Combaret, C. (2021). Experimental evolution in plant-microbe systems: A tool for deciphering the functioning and evolution of plant-associated microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 619122.

119) Martin, M., Hölscher, T., Dragoš, A., Cooper, V. S., & Kovács, Á. T. (2016). Laboratory evolution of microbial interactions in bacterial biofilms. *Journal of bacteriology*, *198*(19), 2564-2571.

120) Martiny, J. B., Jones, S. E., Lennon, J. T., & Martiny, A. C. (2015). Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science*, *350*(6261), aac9323.

121) Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., Kebede, G., & Tafesse, M. (2021). Isolation and characterization of urease-producing soil bacteria. *International journal of microbiology*, *2021*(1), 8888641.

122) Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular biology and evolution*, *30*(5), 1188-1195.

123) Méndez-Bravo, A., Cortazar-Murillo, E. M., Guevara-Avendaño, E., Ceballos-Luna, O., Rodríguez-Haas, B., Kiel-Martínez, A. L., ... & Reverchon, F. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against Phytophthora cinnamomi through volatile emissions. *PLoS One*, *13*(3), e0194665.

124) Mordor Intelligent (2024). Tamaño del mercado de inoculantes agrícolas y análisis de participación tendencias de crecimiento y pronósticos (2024-2029), mordorintelligence, 2024). https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/agricultural-inoculants-market

125) Moreira, Z. P. M., Chen, M. Y., Ortuno, D. L. Y., & Haney, C. H. (2023). Engineering plant microbiomes by integrating eco-evolutionary principles into current strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, *71*, 102316.

126) Moreno-Fenoll, C., Ardré, M., & Rainey, P.B. (2024). *Polar accumulation of pyoverdin and exit from stationary phase*. microLife, 5, uqae001. https://doi.org/10.1093/femsml/uqae001

127) Montoya, B., & Osorio, N. W. (2009). Mycorrhizal dependency of avocado at different levels of soil solution phosphorus. *Revista Suelos Ecuatoriales*, *39*(2), 143-147.

128) Mould, D. L., & Hogan, D. A. (2021). Intraspecies heterogeneity in microbial interactions. *Current Opinion in Microbiology*, *62*, 14-20.

129) Mullins, A. J., & Mahenthiralingam, E. (2021). The hidden genomic diversity, specialized metabolite capacity, and revised taxonomy of Burkholderia sensu lato. *Frontiers in microbiology*, *12*, 726847.

130) Nadeem, S. M., Shaharoona, B., Arshad, M., & Crowley, D. E. (2012). Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado trees in saline soils. *Applied Soil Ecology*, *62*, 147-154.

131) Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, *8*(3), 17-29.

132) Nestor, E., Toledano, G., & Friedman, J. (2023). Interactions between culturable bacteria are predicted by individual species' growth. *Msystems*, e00836-22.

133) Nordgaard, M., Blake, C., Maróti, G., Hu, G., Wang, Y., Strube, M. L., & Kovács, Á. T. (2022). Experimental evolution of Bacillus subtilis on Arabidopsis thaliana roots reveals fast adaptation and improved root colonization. *Iscience*, *25*(6).

134) Nosheen, S., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. Sustainability, 13(4), 1868.

135) Nursofiah, S., Hartoyo, Y., Amalia, N., Febrianti, T., Febriyana, D., Saraswati, R. D., ... & Multihartina, P. (2021, November). Long-term storage of bacterial isolates by using tryptic Soy Broth with 15% glycerol in the deep freezer (-70 to-80 C). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 913, No. 1, p. 012070). IOP Publishing.

136) Osorio, N. W., & Osorno, L. (2015). Biofertilization with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing microorganisms enhance effectiveness of phosphate fertilizers in tropical soils. *Fertilizer Technology*, *2*, 298-326.

137) Pantoja-Guerra, M., Valero-Valero, N., & Ramírez, C. A. (2023). Total auxin level in the soil–plant system as a modulating factor for the effectiveness of PGPR inocula: A review. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *10*(1), 6.)

138) Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. (2010). Organic acids produced by phosphate solubilizing rhizobacteria: a critical review. *Terra Latinoamericana*, *28*(1), 61-70.

139) Patten, C. L., Blakney, A. J., & Coulson, T. J. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, *39*(4), 395-415.)

140) Perfetti, J. J., Hernández, A., Leibovich, J., & Balcázar, Á. (2013). Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia.

141) Pomerleau, M., Charron-Lamoureux, V., Léonard, L., Grenier, F., Rodrigue, S., & Beauregard, P. B. (2024). Adaptive laboratory evolution reveals regulators involved in repressing biofilm development as key players in Bacillus subtilis root colonization. *Msystems*, *9*(2), e00843-23.

142) Polonca, S. (2020). Environment shapes the intra-species diversity of Bacillus subtilis isolates. *Microbial ecology*, *79*(4), 853-864.

143) Ptaszek, M., Canfora, L., Pugliese, M., Pinzari, F., Gilardi, G., Trzciński, P., & Malusà, E. (2023). Microbial-Based Products to Control Soil-Borne Pathogens: Methods to Improve Efficacy and to Assess Impacts on

144) Reddy, C. A., & Saravanan, R. S. (2013). Polymicrobial multi-functional approach for enhancement of crop productivity. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 82, pp. 53- Academic Press.

145) Rehan, M., Al-Turki, A., Abdelmageed, A. H., Abdelhameid, N. M., & Omar, A. F. (2023). Performance of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from sandy soil on growth of tomato (Solanum lycopersicum L.). *Plants*, *12*(8), 1588.

146) Reséndez, A. M., Mendoza, V. G., Carrillo, J. L. R., Arroyo, J. V., & Ríos, P. C. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria: A biofertilization alternative for sustainable agriculture. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *20*(1), 68

147) Reuven, P. & Eldar, A. Macromotives and microbehaviors: the social dimension of bacterial phenotypic variability. Curr. Opin. Genet. Dev. 21, 759–767 (2011).

148) Reva, O. N., Swanevelder, D. Z., Mwita, L. A., Mwakilili, A. D., Muzondiwa, D., Joubert, M., ... & Meijer, J. (2019). Genetic, epigenetic and phenotypic diversity of four

Bacillus velezensis strains used for plant protection or as probiotics. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2610.

149) Rivera-Hernández, G., Tijerina-Castro, G. D., Cortés-Pérez, S., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2024). Evaluation of functional plant growth-promoting activities of culturable rhizobacteria associated to tunicate maize (Zea mays var. tunicata A. St. Hil), a Mexican exotic landrace grown in traditional agroecosystems. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1478807.

150) Rivera Páez, F. A., González Salazar, V., González Acosta, J. G., & Ossa López, P. A. (2016). Caracterización molecular, análisis morfológico y colonización micorrízica en la rizósfera del aguacate (Persea americana Mill) en Caldas, Colombia. *Acta Agronómica*, *65*(4), 398-405.

151) Rodríguez-Verdugo, A., & Ackermann, M. (2021). Rapid evolution destabilizes species interactions in a fluctuating environment. *The ISME journal*, *15*(2), 450-460.

152) Rudzite, M., Subramoni, S., Endres, R. G., & Filloux, A. (2023). Effectiveness of Pseudomonas aeruginosa type VI secretion system relies on toxin potency and type IV pili-dependent interaction. *PLoS Pathogens*, *19*(5), e1011428.

153) Safronova, V. I., Kuznetsova, I. G., Sazanova, A. L., Belimov, A. A., Andronov, E. E., Chirak, E. R., ... & Tikhonovich, I. A. (2017). Microvirga ossetica sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species Vicia alpestris Steven. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(1), 94-100.

154) Sánchez, M. C., Vergara, V., Polo, L. D., & Álvarez Aldana, A. (2017). Primer acercamiento del estudiante de Microbiología a las técnicas de recuento en superficie, profundidad y cámara De Neubauer.

155) Sarmah, R., & Sarma, A. K. (2022). Phosphate Solubilizing Microorganisms: A Review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *54*(10), 1306–1315. https://doi.org/10.1080/00103624.2022.2142238).

156) Scheuerl, T., et al. (2019). Bacterial adaptation is constrained in complex communities. *Nature Communications*, 10(1), 1–9.

157) Schreiber, F., Littmann, S., Lavik, G., Escrig, S., Meibom, A., Kuypers, M. M., & Ackermann, M. (2016). Phenotypic heterogeneity driven by nutrient limitation promotes growth in fluctuating environments. *Nature microbiology*, *1*(6), 1-7.

158) Sessitsch, A., Pfaffenbichler, N., & Mitter, B. (2019). Microbiome applications from lab to field: facing complexity. *Trends in plant science*, *24*(3), 194-198.

159) Sharifi, R., Ahmadzadeh, M., Sharifi-Tehrani, A., & Talebi-Jahromi, K. (2010). Pyoverdine production in Pseudomonas fluorescens UTPF5 and its association with suppression of common bean damping off caused by Rhizoctonia solani (Kühn). *Journal of Plant Protection Research*.

160) Shrestha, R. K., Rosenberg, T., Makarovsky, D., Eckshtain-Levi, N., Zelinger, E., Kopelowitz, J., ... & Burdman, S. (2013). Phenotypic variation in the plant pathogenic bacterium Acidovorax citrulli. *PLoS One*, *8*(9), e73189.

161) Sharma, S., Gupta, R., Dugar, G., & Srivastava, A. K. (2012). Impact of application of biofertilizers on soil structure and resident microbial community structure and function. *Bacteria in agrobiology: Plant probiotics*, 65-77.Siddiqui, Z. A. (Ed.). (2006). *PGPR: biocontrol and biofertilization* (pp. 111-142). Dordrecht: Springer)

162) Siddiq, S., Saleem, U., Ahmad, K., Anayat, A., Affan, Q. M., Anwar, M. F., ... & Asghar, N. (2018). Comparison of conventional and non-conventional carriers for bacterial survival and plant growth. *Int. J. Agric. Innov. Res*, *6*(4), 126-129.

163) Smits, W. K., Kuipers, O. P., & Veening, J. W. (2006). Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(4), 259-271.

164) Singh, D. P., Gupta, V. K., & Prabha, R. (Eds.). (2019). *Microbial interventions in agriculture and environment: Volume 2: Rhizosphere, microbiome and agro-ecology*. Springer Nature

165) Solórzano-Acosta, R. A., & Quispe, K. R. (2024). Assessing the role of field isolated Pseudomonas and Bacillus as growth-promoting rizobacteria on avocado (Persea americana) seedlings. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, *3*(3), e12114.

166) Somerville, G. A., Beres, S. B., Fitzgerald, J. R., DeLeo, F. R., Cole, R. L., Hoff, J. S., & Musser, J. M. (2002). In vitro serial passage of Staphylococcus aureus: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. *Journal of bacteriology*, *184*(5), 1430-1437.

167) Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of microbiological methods*, *95*(3), 327-335.

168) Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, *38*, 401-419

169) Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(4), a001438

Con formato: Color de fuente: Automático, Diseño: Claro

170) Spratt, M. R., & Lane, K. (2022). Navigating Environmental Transitions: the Role of Phenotypic Variation in Bacterial Responses. *Mbio*, *13*(6), e02212-22.

171) Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, *65*(2-3), 249-258.

172) Stevens, K. E., & Sebert, M. E. (2011). Frequent beneficial mutations during single-colony serial transfer of Streptococcus pneumoniae. *PLoS genetics*, *7*(8), e1002232.

173) Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(3), 199-210.

174) Stubbendieck, R. M., & Straight, P. D. (2015). Escape from lethal bacterial competition through coupled activation of antibiotic resistance and a mobilized subpopulation. *PLoS genetics*, *11*(12), e1005722.

175) Suemori, A., Nakajima, K., Kurane, R., & Nakamura, Y. (1995). Degradation of aromatic amino acids by Rhodococcus erythropolis. *Letters in applied microbiology*, *21*(1), 55-59.)

176) Suhag, M. (2016). Potential of biofertilizers to replace chemical fertilizers. *Int. Adv. Res. J. Sci. Eng. Technol*, *3*(5), 163-167.

177) Suman, A., Govindasamy, V., Ramakrishnan, B., Aswini, K., SaiPrasad, J., Sharma, P., ... & Annapurna, K. (2022). Microbial community and function-based synthetic bioinoculants: A perspective for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 4400.

178) Sun, D. L., Jiang, X., Wu, Q. L., & Zhou, N. Y. (2013). Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and Environmental Microbiology, 79*(19), 5962–5969. https://doi.org/10.1128/AEM.01282-13

179) Szajdak, L., & Maryganova, V. (2007). Occurrence of IAA auxin in some organic soils. *Agron Res*, *5*(2), 175-187.)

180) Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Khan, M. S. I., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, *121*, 102-117.

181) Takors, R. (2012). Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions. *Journal of biotechnology*, *160*(1-2), 3-9.

182) Tang, A., Haruna, A. O., Majid, N. M. A., & Jalloh, M. B. (2020). Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms*, *8*(3), 442.

183) Thattai, M., & Van Oudenaarden, A. (2004). Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics*, *167*(1), 523-530.

184) Traxler, M. F., Watrous, J. D., Alexandrov, T., Dorrestein, P. C., & Kolter, R. (2013). Interspecies interactions stimulate diversification of the Streptomyces coelicolor secreted metabolome. *MBio*, *4*(4), 10-1128.

185) Trinh, N. H., & Kim, J. (2020). Paraburkholderia flava sp. nov., isolated from cool temperate forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2509-2514.

186) Tsukanova, K. A., Meyer, J. J. M., & Bibikova, T. N. (2017). Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African journal of botany*, *113*, 91-102.

187) Tzec-Interián, J. A., Desgarennes, D., Carrión, G., Monribot-Villanueva, J. L., Guerrero-Analco, J. A., Ferrera-Rodríguez, O., ... & Ortiz-Castro, R. (2020). Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with avocado trees (Persea americana Miller) and their potential use in the biocontrol of Scirtothrips perseae (avocado thrips). *PLoS One*, *15*(4), e0231215.

188) Van den Bergh, B., Swings, T., Fauvart, M., & Michiels, J. (2018). Experimental design, population dynamics, and diversity in microbial experimental evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *82*(3), 10-1128.

189) Vasilchenko, N. G., Prazdnova, E. V., & Lewitin, E. (2022). Epigenetic Mechanisms of Gene Expression Regulation in Bacteria of the Genus Bacillus. *Russian Journal of Genetics*, *58*(1), 1-19.

190) Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos tropicales*, *37*, 33-39.

191) Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one*, *8*(2), e57923.

192) Vetsigian, K., Jajoo, R., & Kishony, R. (2011). Structure and evolution of Streptomyces interaction networks in soil and in silico. *PLoS biology*, *9*(10), e1001184.

193) Vial, L., Groleau, M. C., Lamarche, M. G., Filion, G., Castonguay-Vanier, J., Dekimpe, V., ... & Déziel, E. (2010). Phase variation has a role in Burkholderia ambifaria niche adaptation. *The ISME journal*, *4*(1), 49-60.

194) Volfson, V., Fibach-Paldi, S., Paulucci, N. S., Dardanelli, M. S., Matan, O., Burdman, S., & Okon, Y. (2013). Phenotypic variation in Azospirillum brasilense Sp7 does not influence plant growth promotion effects. *Soil Biology and Biochemistry*, *67*, 255-262.

195) Wakamoto, Y. et al. Dynamic persistence of antibioticstressed mycobacteria. Science 339, 91–95 (2013).

196) Wang, X., Zhang, D., Dong, F., Liu, S., Zhang, J., & Zhao, H. (2021). Cell differentiation and motion determine the Bacillus subtilis biofilm morphological evolution under the competitive growth. *Journal of Basic Microbiology*, *61*(5), 396-405.

197) Weber, O., Delince, J., Duan, Y., Maene, L., McDaniels, T., Mew, M., ... & Krishnan, V. (2014). Trade and finance as cross-cutting issues in the global phosphate and fertilizer market. In *Sustainable phosphorus management: A global transdisciplinary roadmap* (pp. 275-299). Dordrecht: Springer Netherlands.

198) Westhoff, S., Kloosterman, A. M., van Hoesel, S. F., van Wezel, G. P., & Rozen, D. E. (2021). Competition sensing changes antibiotic production in streptomyces. *MBio*, *12*(1), 10-1128.

199) Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J. F., Ferrer, A., & Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*, *34*(1), 1-20.

200) Wisniewski-Dyé, F., Vial, L., Burdman, S., Okon, Y., & Hartmann, A. (2015). Phenotypic variation in Azospirillum spp. and other root-associated bacteria. *Biological nitrogen fixation*, 1047-1054.

201) Xie, C. H., & Yokota, A. (2005). Reclassification of Alcaligenes latus strains IAM 12599T and IAM 12664 and Pseudomonas saccharophila as Azohydromonas lata gen. nov., comb. nov., Azohydromonas australica sp. nov. and Pelomonas saccharophila gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(6), 2419-2425

202) Yanez-Ocampo, G., Mora-Herrera, M. E., Wong-Villarreal, A., De La Paz-Osorio, D. M., De La Portilla-Lopez, N., Lugo, J., ... & Del Aguila, P. (2020). Isolated phosphate-solubilizing soil bacteria promotes in vitro growth of Solanum tuberosum L. *Polish Journal of Microbiology*, *69*(3), 357.

203) Yang, T., Wei, Z., Friman, V. P., Xu, Y., Shen, Q., Kowalchuk, G. A., & Jousset, A. (2017). Resource availability modulates biodiversity-invasion relationships by altering competitive interactions. *Environmental Microbiology*, *19*(8), 2984-2991.

204) Yan, Q., Lopes, L. D., Shaffer, B. T., Kidarsa, T. A., Vining, O., Philmus, B., ... & Loper, J. E. (2018). Secondary metabolism and interspecific competition affect accumulation of spontaneous mutants in the GacS-GacA regulatory system in Pseudomonas protegens. *MBio*, *9*(1), 10-1128.

205) Yanofsky, C. (2007). RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. *Rna*, *13*(8), 1141-1154.

206) Zhang, T., Jian, Q., Yao, X., Guan, L., Li, L., Liu, F., ... & Lu, L. (2024). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and quality of several crops. *Heliyon*, *10*(10).