



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Generación de variaciones funcionales en rizobacterias por efecto de la competencia inter-específica e intra-específica

Claudia Elidia Jaramillo Guerrero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela Biociencias
Medellín, Colombia
2015

Generación de variaciones funcionales en rizobacterias por efecto de la competencia inter-específica e intra-específica

Claudia Elidia Jaramillo Guerrero

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Biotecnología

Director:

Juan Carlos Pérez Naranjo

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D

Línea de Investigación:

Evolución experimental y selección dirigida de microorganismos eficientes

Grupo de Investigación:

Sistemas Simbióticos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela Biociencias
Medellín, Colombia
2015

Agradecimientos

- A mi mamá Mercedes, hermanos, sobrinos, primos y amigos por creer en mí, por su paciencia y respaldo, desde la distancia en todo éste proceso.
- A mi gran amigo Sebastián Aristizabal Patiño, por su paciencia y ayuda en el proceso de mi tesis
- Grupo de investigación Sistemas Simbióticos
- Al profesor Juan Carlos Pérez, Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D por dirigir la realización de este proyecto, el cual me brindó las herramientas necesarias para su culminación.
- A Gloria Arango, M.Sc en química, por la asistencia con los análisis bioquímicos y de imágenes.
- Esp. Yobanni Tapasco Rector de la Institución Educativa Ciudadela Nuevo Occidente, a quien le agradezco infinitamente por su paciencia, apoyo y por brindarme los espacios para la ejecución de mi tesis de Maestría.
- A mis amigas Belkis, Cecilia, Karina, Lina, Margarita y Marleny, por sus palabras de ánimo y por su amistad
- A Diana Tamayo, Estudiante de Maestría en Ciencias-Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración y su amistad incondicional.
- A la Maestría en Biotecnología, profesores y administrativos, por su gestión y contribución a mi formación académica.

Contenido

	Pág
<u>RESUMEN</u>	<u>VI</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>VII</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>VIII</u>
<u>LISTA DE TABLAS</u>	<u>IX</u>
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
<u>2. MARCO TEÓRICO</u>	<u>3</u>
2.1 COMPETENCIA MICROBIANA Y EVOLUCIÓN FUNCIONAL	4
2.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS O “PLANT-GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA” (PGPR)	7
2.2.1 PGPR BIOCONTROLADORES DE FITOPATÓGENOS	8
2.2.2 PGPR EN CONDICIONES DE ESTRÉS VEGETAL	9
2.2.3 PGPR EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO	10
2.3 RUTAS DE BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO-3- INDOL ACÉTICO AIA	12
2.3.1 RUTA DE BIOSÍNTESIS DE AIA DEPENDIENTE DEL TRIPTÓFANO	13
2.3.2 RUTA DE BIOSÍNTESIS DE AIA INDEPENDIENTE DEL TRIPTÓFANO	14
2.4 PAPEL DEL AIA EN LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA	14
2.5 PRUEBA PARA DETERMINACIÓN DE INDOLES	16
2.6 ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS COMÚNMENTE USADAS PARA OBTENER BACTERIAS CON CARACTERÍSTICAS DESEABLES	17
2.7 DISTRIBUCIÓN DE SUELOS EN COLOMBIA	18
<u>3. OBJETIVOS</u>	<u>20</u>
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<u>4. METODOLOGÍA</u>	<u>21</u>

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.2 FASES DE ESTUDIO	21
4.2.1 FASE 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE RIZOBACTERIAS A PARTIR DE PLANTAS DE FRIJOL SEMBRADAS EN VARIOS SUELOS.	22
4.2.2 FASE 2: CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE INDOLES TOTALES AISLADAS DEL SUELO RIZOSFÉRICO Y DE RAÍZ	27
4.2.3 FASE 3: PRUEBAS DE COMPETENCIA BACTERIANA, SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVOS FENOTIPOS	28
4.2.4 FASE 4 EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE VARIOS FENOTIPOS BACTERIANOS NUEVOS O SUS ANCESTROS, EN EL DESARROLLO INICIAL DE RAÍCES DE PLANTAS DE FRIJOL.	32
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
5. RESULTADOS	35
5.1 FASE 1: COLECCIÓN DE RIZOBACTERIAS DE PLANTAS DE FRIJOL SEMBRADAS EN SUELO ANDISOL, OXISOL E INCEPTISOL	35
5.2 FASE 2: CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE INDOLES TOTALES AISLADAS DEL SUELO RIZOSFÉRICO Y DE RAÍZ	36
5.3 FASE 3: PRUEBAS DE COMPETENCIA BACTERIANA, SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVOS FENOTIPOS PRODUCTORES DE INDOLES	38
5.4 FASE 4: CAMBIOS EN LA ARQUITECTURA DE LA RAÍZ POR EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE COLONIAS DE BACTERIAS SOMETIDAS A COMPETENCIA INTRA-ESPECÍFICA E INTER-ESPECÍFICA	42
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
7.1 CONCLUSIONES	52
7.2 RECOMENDACIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA	54
9. ANEXOS	62

Resumen

La competencia entre microorganismos es clave para la generación de nuevos fenotipos y para su diversificación. En este estudio se establecieron pruebas de competencia mediante enfrentamiento dual entre colonias en cajas de Petri, compitiendo fenotipos diferentes (Competencia interespecífica) y fenotipos iguales (Competencia intraespecífica). Para evaluar la generación de nuevos fenotipos basados en la producción de AIA (Ácido -3- Indol Acético), se usaron cuatro morfotipos de bacterias en las que se determinó previamente su producción de AIA mediante la prueba de Salkowsky, adicionalmente se incluyeron controles sin competencia. Se utilizó muestras de colonias de bacterias provenientes de las pruebas de competencia, las cuales fueron analizadas por su producción de indoles y por su efecto en semillas de frijol pregerminadas inoculadas para determinar cambios en la arquitectura de la raíz mediante análisis de imágenes utilizando el software libre Image J. Los resultados obtenidos demostraron que las colonias que crecieron después de competir con otras colonias, presentaron cambios en la producción de indoles totales. Consistentemente, algunos de esos fenotipos que se inocularon en semillas pre-germinadas de frijol indujeron cambios en la arquitectura de la raíz, comparados con el efecto de aplicar colonias que crecieron individualmente. El conocimiento y uso de interacciones bacterianas incrementadas bajo competencia parece representar una estrategia biotecnológica y fácilmente escalable, para obtener rizobacterias con actividades mejoradas, que favorecerían la producción vegetal u otros procesos de interés ambiental.

Palabras clave: *Competencia bacteriana, arquitectura de raíces, AIA (Acido -3-Indol-Acético), interacciones intra-específicas e inter-específicas*

Abstract

Competition between organisms is key to the generation of new phenotypes and diversification. In this study they were established proficiency testing by dual confrontation between colonies in petri dishes, competing different phenotypes (interspecific competition). and similar phenotypes (intraspecific competition) To assess the generation of new phenotypes based on the production of IAA (Indole-3-Acetic Acid), four morphotypes of bacteria in which production IAA previously determined by testing used Salkowsky test, additionally without competition controls were included. Colonies of bacteria samples from proficiency testing was used, which were analyzed for their production of indoles and their effect on pre-germinated bean seeds inoculated to determine changes in the architecture of the root by image analysis. Using free software ImageJ. Los results showed that colonies increased after competing with other colonies, presented changes in total indole production. Consistently, some of these morphotypes were inoculated on pregerminated bean seeds induced changes in root architecture compared to the effect of applying individual colonies increased. The knowledge and use of bacterial interactions under increased competition seems to represent a biotechnology and easily scalable strategy for rhizobacterias with improved activities that stimulate crop production or other processes of environmental interest.

Keywords: *bacterial competition, root architecture, IAA (Indole-3-acetic -acid), intraspecific e interspecific interactions*

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Rutas para la biosíntesis del Ácido-3- Indol Acético (AIA) dependiente de triptófano	13
Figura 2-2: Reacción del reactivo de Kovac's sobre el Indol	16
Figura 4-1: Preparación de suspensión y dilución del suelo rizosférico y de raíz para el cultivo de microorganismos	24
Figura 4-2: Detalle de la siembra de colonias de bacterias sometidas a competencia	28
Figura 4-3: Esquema general de la prueba de competencia entre colonias de bacterias	29
Figura 5-1: Producción de indoles totales, en cuatro morfotipos de colonias de bacterias sembradas individualmente o provenientes de competencias intra-específica	39
Figura 5-2: Producción de indoles totales, en cuatro morfotipos de colonias de bacterias sembradas individualmente o provenientes de competencias inter-específica	41
Figura 5-3: Cambios en el diámetro de raíces primarias y secundarias	42
Figura 5-4: Cambios en la longitud de raíces primarias y secundarias	43

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Distribución de los órdenes de suelos de Colombia, por regiones naturales. Con base en información presentada por IGAC (2003)	19
Tabla 4-2: Diluciones empleadas para elaborar una curva de calibración y determinación del Ácido Indol-3- Acético (AIA)	31
Tabla 5-1: Número de Unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de bacterias aisladas de raíz y suelo rizosférico (SR) que crecen en los diferentes medios de cultivo.	35
Tabla 5-2: Características y prueba cualitativa de producción de indoles totales con el reactivo de Kovac's en los morfotipos 3, 81, 19 y 32	37
Tabla 5-3: Diferencias de promedios de rangos de producción de indoles	38

1. Introducción

La microbiota nativa del suelo cumple funciones importantes, como favorecer la absorción de nutrientes por las plantas o el control de fitopatógenos, el deterioro o baja efectividad de estas comunidades microbianas genera como consecuencia bajos rendimientos en las cosechas y aumento en los costos de producción para el sector agrícola (Khalid *et al.*, 2003).

Los microorganismos que habitan la rizósfera se clasifican teniendo en cuenta su efecto sobre las plantas y su interacción con las raíces, algunas pueden ser patógenas mientras que otras son benéficas como las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR (de su sigla en inglés). El uso de las PGPR para la agricultura sostenible ha aumentado en forma significativa el crecimiento y rendimiento de cultivos agrónomicamente importantes. Estas bacterias se encuentran en las raíces de las plantas ya que gracias a la producción de exudados vegetales se genera un ambiente favorable para el desarrollo de microorganismos (Kloepper *et al.*, 1980). En los últimos años se ha incrementado el interés en rizobacterias debido a que la rizósfera juega un papel muy importante como ecosistema. Varias especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia*, han sido reportadas como mejoradores de crecimiento de las plantas (Kloepper *et al.*, 1989; Joseph *et al.*, 2007).

Según Ehteshami *et al.*, (2007) el uso de inoculantes microbianos (biofertilizantes), capaces de solubilizar fosfatos, son una alternativa para promover el crecimiento rápido de raíces. Microorganismos como *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp. que fijan nitrógeno en forma asimbiótica también producen sustancias promotoras de crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas (Bashan y Holguin, 1997).

Se reporta en muchos trabajos el papel benéfico de las actividades bacterianas para las plantas, pero poco sobre cómo se afectan esas comunidades en las mismas condiciones microbiológicas del ambiente del suelo, recientemente se ha estudiado una gran gama de sustratos y el impacto de la limitación de recursos en la competencia bacteriana (Hibbing *et al.*, 2010).

Se conoce que los microorganismos no son metabólicamente pasivos, ellos implementan numerosas estrategias para aumentar la adquisición de recursos, actividades en las que involucran movilidad, producción de antibióticos y diferentes comportamientos que pueden determinar el balance de la competencia, resultados que difieren significativamente por la fuente de los recursos empleados (Hibbing *et al.*, 2010). Por ejemplo, se cree que las bacterias en condiciones adversas, como lo es la disminución de nutrientes producen compuestos antibacterianos llamados bacteriocinas (Be'er *et al.*, 2009).

En éste trabajo se evaluará la competencia intra-específica e inter-específica de rizobacterias sometidas a condiciones hostiles como la baja disponibilidad de nutrientes, que ocasionarían alteración en la producción de metabolitos secundarios, es por ello que se tomó como modelo la producción del ácido-3 -Indol acético (AIA), una hormona importante para la interacción entre bacterias y para el crecimiento y desarrollo de las plantas. La acción de ésta hormona vegetal será evaluada directamente teniendo en cuenta los cambios en el diámetro y longitud de la raíz afectadas por esta hormona.

2. Marco teórico

Desde el punto de vista biológico, según Mayr, (1970) la definición biológica de especie implica evolutivamente asumir que es una población reproductivamente aislada, por lo que constituye un linaje evolutivo separado y que es reforzado por una serie de barreras que pueden ser de carácter geográfico o biológico.

La fenética o más conocida como taxonomía numérica, también hace un aporte en el concepto de especie, en la que realizan análisis de múltiples caracteres biológicos los cuales se asocian a la clasificación (Sneath y Sokal, 1973). Los organismos son agrupados teniendo en cuenta su similitud global, se clasifican en el mismo grupo aquellos organismos que tengan la mayor cantidad de caracteres en común

La unidad básica en taxonomía de procariotas se ajusta al concepto que se denomina filofenético (Rosselló-Mora y Amann, 2001), y definen una especie como una categoría que circunscribe a un grupo de cepas de origen monofilético y que se muestran coherentes tanto desde el punto de vista genómico como fenotípico, y que por ello se pueden distinguir de otros grupos semejantes. El concepto de especie para las procariotas ha ido evolucionando en paralelo al desarrollo tecnológico aplicado a la microbiología (Rossello y amann, 2001). Los acontecimientos más importantes en el establecimiento del concepto de especie fueron el conocimiento del ADN como molécula informativa y el desarrollo de mecanismos de computación que permitieran la manipulación de un buen número de parámetros simultáneamente (Folguera y Marcos, 2013)

La reconstrucción filogenética basada en el análisis de la secuencia del RNA ribosómico 16S permite reconocer si un grupo de organismos es monofilético o no. A partir de ahí, y mediante técnicas de hibridación ADN-ADN entre genomas se puede reconocer el grado de similitud que estos presentan. En general los valores se expresan en porcentajes referidos a un organismo de referencia, lo que se conoce como la coherencia fenotípica la

cual se evalúa mediante el análisis de múltiples caracteres estructurales y metabólicos, sin embargo, lo más importante en la clasificación de una especie nueva es que ésta posea una propiedad fenotípica discriminante, o sea que se deben encontrar una serie de caracteres fenotípicos que en su conjunto sean únicos de la especie y que permitan identificar nuevos aislados como miembros de ésta (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002).

También se aplica el concepto ecológico para definición de especie. Según Van Valen (1976), elabora un concepto ecológico de especie, según el cual cada especie viene a ser un linaje que ocupa una zona adaptativa, o nicho ecológico, mínimamente diferente de la de cualquier otro linaje, y que evoluciona separadamente.

2.1 Competencia microbiana y evolución funcional

Algunos autores definen el término de competencia como un enfrentamiento entre rivales, esta connotación solo puede ser parcialmente aplicada en sistemas ecológicos, las partes que se esfuerzan por conseguir energía o nutrientes, cuando un competidor consume una parte de recurso no solo se está beneficiando él, también está perjudicando indirectamente a sus competidores dado que éstos ya no pueden utilizar lo que se ha consumido, este es el fundamento de muchos fenómenos competitivos (Begon *et al.*, 2006).

Cuando se presenta competencia por recursos, aquellos que tienen un recurso común competirán, pero solo en situaciones en que exista deficiencia de dicho recurso. Si el recurso es tan abundante que no constituye una limitación para los consumidores, no se presentarán interacciones competitivas, esto puede suceder por ejemplo, cuando las poblaciones se mantienen en bajas densidades debido a otros factores como depredación o disturbios abióticos (Brönmark y Hansson, 2005). Frecuentemente existe un trade-off en los organismos que les permite crecer bien con una baja o alta concentración de

nutrientes, serán competitivamente dominantes en diferentes concentraciones del recurso (Dodds, 2002).

Las competencias pueden ser de dos tipos, intra-específica en la que los organismos implicados son todos de la misma especie y tienden a regular el tamaño de las poblaciones y la inter-específica en la que los organismos pertenecen a especies distintas, y se presenta causa la extinción de las poblaciones implicadas en ella (Begon *et al*, 2006).

Un ejemplo de competencia inter-específica en plantas, es el desarrollo de dos especies de plantas del género *Galium* (*Rubiaceae*), que crecen en sustratos distintos. *G. saxatile*, vive en suelos ácidos, mientras que *G. sylvestre*, suele crecer sobre sustratos calizos. El experimento consistió en recolectar semillas de las dos especies, las cuales se hicieron germinar en jardines con sustratos ácido y básico, cuando las semillas eran plantadas separadamente, las plantas de ambas especies sobrevivían sin problemas en ambos tipos de sustrato, aunque crecían mejor en el que era similar a su sustrato de procedencia. Sin embargo, cuando las semillas de ambas especies eran sembradas conjuntamente utilizando sustratos calcáreos, las plantas de *G. sylvestre* crecían más y proyectaban sombra excesiva sobre las de *G. saxatile*. Lo contrario ocurría cuando el sustrato utilizado era de tipo ácido (Begon *et al*, 2006).

Así como se han reportado trabajos relacionados con la competencia entre organismos macroscópicos, también existen trabajos relacionados con la competencia entre microorganismos mediada por la antibiosis, tradicionalmente se han evaluado en pruebas *in vitro*, estas han sido clave para el estudio de proteínas (Be'er *et al.*, 2010). Un criterio común para la selección de microorganismos cultivables productores de antibióticos se basa en detección de zonas de inhibición de crecimiento de otros microorganismos, pero se presta menos atención a las variaciones morfológicas de las colonias de los microorganismos involucrados en la prueba, estas variaciones representan estrategias de respuesta global frente a la presencia de antibiosis u otras condiciones ambientales (Ben-Jacob *et al.*, 2000).

Las especies en su hábitat natural viven y se desarrollan dentro de las comunidades complejas donde interactúan con otras especies, lo que se conoce como interacción interespecífica (Hasan y Gore, 2012). Las bacterias aprovechan los productos de desecho de otras bacterias incrementando su metabolismo, adaptándose así a un nuevo ambiente, esta adaptación se da más en los policultivos que en los monocultivos. La magnitud de evolución en términos de cambio ha sido más significativo entre las diferentes especies (competencia inter específica) que de la misma especie (Competencia intra-específica) (Lawrence *et al.*, 2012).

Cuando se combinan especies de bacterias en pares, las interacciones son netamente negativas y cuando se mezclan más de dos especies entre sí, se presenta un efecto de orden positivo (Foster y Bell; 2012). Según Hibbing *et al.*, 2010), reporta que las interacciones dentro y entre especies de bacterias pueden afectar profundamente el comportamiento microbiano, las cuales están gobernada por aspectos como la tolerancia a factores abióticos, capacidad de síntesis, almacenaje de sustancias de reserva, como también la capacidad de crecimiento bacteriano a bajas concentraciones de recursos.

Las interacciones entre microorganismos siempre han tenido mayor atención en la evaluación de la capacidad de producir compuestos que proporciona una ventaja para los competidores inhibiendo o eliminando directamente los competidores potenciales. Una evidencia clara de ello es lo que pasa en la rizósfera, donde la producción de antibióticos por una cierta cantidad de bacterias contribuye a su capacidad para proteger plantas de patógenos específicos (Compant *et al.*, 2005). Por lo general los experimentos en el laboratorio se hacen al estudio de una sola especie sin contar que las especies en su hábitat natural viven y se desarrollan dentro de las comunidades complejas donde interactúan con otras especies (interacción interespecífica) (Celiker y Gore, 2012)

Los antibióticos producidos por los microorganismos son moléculas químicamente orgánicas que en bajas concentraciones, perjudican el crecimiento y las actividades

metabólicas de otros microorganismos, muchas veces los antibióticos detectados en la rizósfera se han determinado *in vitro* a través de técnicas y ensayos sensibles, demostrando de manera concluyente que los microorganismos sintetizan una variedad de éstos compuestos, un ejemplo de ello es la producción de un antibiótico de amplio espectro 2,4- diacetilfloroglucinol (PHL), (Thomashow *et al.*, 1997).

Las interacciones entre bacterias es un trabajo en conjunto que simula el trabajo en una fábrica, ellas han desarrollado señales célula a célula incluyendo interacciones directas por polímeros extramembrana, secreción de materiales extracelulares como surfactantes, lubricantes, comunicación bioquímica como es el quorum-sensing (empleando intermediarios como moléculas simples y proteínas complejas), promoviendo la morfogénesis de las colonias que finalmente es codificada por expresión de genes (Waters y Bassler, 2005).

2.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas o “Plant-Growth Promoting Rhizobacteria” (PGPR)

Las Interacciones entre las plantas y los microorganismos podrían ser positivas, negativas o neutras. Todas aquellas bacterias que habitan en las raíces de las plantas y que influyen en la planta en el crecimiento positivamente por cualquier mecanismo se denominan rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1980). La rizósfera en las plantas es una zona de gran actividad microbiológica, en la que las rizobacterias desarrollan mecanismos como la fijación biológica del nitrógeno, solubilización de minerales, aprovechamiento de nutrientes, producción de antibióticos y enzimas líticas, antagonismo con patógenos del suelo compitiendo por fuentes de hierro (producción de sideróforos), síntesis de fitohormonas como las auxinas particularmente el ácido-3-indol acético (AIA). Estas son específicas y efectivas a bajas concentraciones

(Teale *et al.*, 2006), para su determinación química se ha empleado la cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) (Castillo *et al.*, 2005).

En la raíz se encuentran sustancias orgánicas como aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas y nucleótidos, que interactúan con los microorganismos, (Hawes *et al.*, 2003). Varios estudios han indicado que la diversidad estructural y funcional de las poblaciones de la rizósfera se ve afectada por las especies de plantas debido a las diferencias de la raíz y a la disponibilidad de exudados en sus diferentes zonas (Jaeger *et al.*, 1999).

2.2.1 PGPR biocontroladores de fitopatógenos

Para el control de fitopatógenos se han empleado compuestos químicos como los pesticidas y para mejorar el crecimiento de las plantas se emplean fertilizantes, muchas veces en periodos prolongados, estos compuestos químicos se acumulan en las plantas y en los suelos, suprimiendo las poblaciones nativas del suelo y el equilibrio natural, ocasionando epidemias incontrolables, afectando así la salud de los vegetales y animales (Bashan y De-Bashan, 2005). Es por esto necesario realizar prácticas alternativas para reemplazar los tratamientos químicos por ejemplo, rotación de cultivos, empleo de mecanismos alelotrópicos y el desarrollo de estrategias de control biológico (Kremer y Kennedy, 1996).

Las PGPR participan en el biocontrol de patógenos en plantas y biofertilización (Compant *et al.*, 2005). Existen trabajos donde se reporta que un grupo importante de bacterias pertenecen al género *Pseudomonas* sp., las cuales desarrollaron varias estrategias que les permite su uso como biocontroladoras y promotoras de crecimiento en plantas, esto incluye: crecimiento acelerado *In vitro*, producción de biomasa, degradación rápida de exudados de semillas y raíces como también la colonización y multiplicación en la rizósfera y en el interior de la planta (Weller *et al.*, 2002).

También se ha referenciado a *Pseudomonas fluorescens* como agente de control biológico contra hongos patógenos, éstas bacterias tienen varios mecanismos para el biocontrol de patógenos siendo usada ampliamente en la industria agrícola por su habilidad de producción de antibióticos, enzimas quitinolíticas, hormonas promotoras de crecimiento, sideróforos, ácido cianhídrico, catalasas y también la habilidad para solubilizar fósforo. Estas *Pseudomonas* son usadas por ejemplo en plantas de arroz para favorecer su adaptación y crecimiento en suelos salinos (Kremer y Kennedy, 1996).

2.2.2 PGPR en condiciones de estrés vegetal

Las PGPR, contrarrestan las condiciones de estrés vegetal, el estrés abiótico y biótico llegan a convertirse en barreras que dificultan el crecimiento y desarrollo de las plantas en los cultivos expuestos a estas condiciones; pero los microorganismos del suelo pueden disminuir el impacto negativo, teniendo en cuenta la edad y especie de la plantación asociada (Saharan y Nehra 2011). Los factores abióticos incluyen, altas y bajas temperaturas, salinidad, sequía, invierno, luz ultravioleta, la contaminación del aire y metales pesados. Las pérdidas en los cultivos por estrés abiótico oscilan entre el 50 y 82 % dependiendo del cultivo (Nilsen y Orcutt, 1996).

Las PGPR empleadas como una alternativa para contrarrestar el estrés en las plantas, por ejemplo, la inoculación de trigo con *Pseudomonas* sp. estimula el crecimiento de las plantas puesto que es capaz de reducir el efecto de los iones tóxicos. Cuando se aplica *Arthrobacter* sp y *flavobacterium* sp, favorecen en la planta la captación de P, Ca, Cl y Ni y disminuyen la cantidad del metal pesado Pb en plantas de cebada bajo condiciones extremas de estrés (Hasnain y Sabri, 1997)

La salinidad del suelo limita el crecimiento de las plantas y los cultivos de producción, en muchas partes del mundo particularmente en áreas áridas y semiáridas, el estrés salino

decrece la actividad fotosintética debido al estrés osmótico, cierre parcial de estomas, desestabilización de la membrana y en general desbalance nutricional. Cuando las plantas están en estrés salino acumulan varias moléculas como prolina, glucosa, glicina etc. Los niveles de antioxidantes y la actividad enzimática y concentraciones de antioxidantes son frecuentemente usados como indicadores del estrés oxidativo por las plantas. Algunos estudios han demostrado que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tal como el superóxido (O_2^-), grupos hidroxilo (OH^-) y peróxido (H_2O_2) son causantes de la oxidación de biomoléculas como lípidos y proteínas conduciendo a la muerte de las células vegetales (Han y Lee, 2005)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas tolerantes a la sal, juegan un papel importante en el alivio de la tensión de la salinidad del suelo durante el crecimiento de las plantas, las sustancias poliméricas extracelulares (ESP) también ayudan a mitigar el estrés de salinidad reduciendo el contenido de Na^+ disponibles para la absorción de la planta. Este estudio se realizó con las cepas bacterianas nativas de la rizósfera de trigo en suelos de Varanasi- India, fueron seleccionadas para identificar los ESP, productos de las rizobacterias tolerantes a la sal. Once cepas bacterianas que mostraron inicialmente tolerancia a la salinidad de 80 g L^{-1} de NaCl, se inocularon a plantas sembradas en macetas, mostrando su potencial como productores de ESP, además se midieron otros parámetros como solubilizadores de fosfato, capacidad, producción de auxina, prolina, azúcares reductores y el total de azúcares solubles. Concluyendo que las plantas de trigo inoculadas tuvieron un aumento en la biomasa en comparación con las plantas no inoculadas. (Upadhyay *et al.*, 2011)

2.2.3 PGPR en la Producción de Ácido-3-Indol Acético

En las plantas se producen hormonas vegetales que se encargan de la coordinación de la división vegetal, crecimiento y diferenciación. (Hooley, 1994). Las hormonas vegetales pueden afectar en diferentes procesos de las plantas como latencia de semillas y la germinación (Graeber *et al.*, 2012). Las hormonas vegetales como el ácido abscísico

(ABA), etileno, giberelinas, auxinas (AIA), citoquininas y brasinoesteroides, son sustancias que controlan la fisiología y los procesos bioquímicos en la planta (Finkelstein, 2010).

El AIA es una de las hormonas que producen los vegetales pero también es producida por las PGPR, existen diversos estudios y revisiones con respecto a esta hormona y su relación con la promoción del crecimiento vegetal (Spaepen *et al.*, 2007). Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizósfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento especialmente cuando están en estado de plántula (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Inicialmente la producción de la auxina bacteriana estaba relacionada específicamente con la formación de la agalla de la corona, enfermedad causada por *Agrobacterium tumefaciens*, esta bacteria es capaz de infectar más de 600 especies vegetales en su mayoría dicotiledóneas y gimnospermas y poco frecuente en monocotiledóneas. La patogénesis se inicia a partir de heridas que puedan tener las plantas, provocando la proliferación de las células individuales infectadas, causando tumores. La enfermedad que se conoce como agalla de la corona se debe a la capacidad patogénica de estas bacterias, está asociada a la presencia de megaplásmidos llamados Ti ('tumor-inducing'). El T-ADN contiene genes, llamados oncogenes, que se expresan eficientemente en la célula vegetal infectada y producen síntesis de hormonas vegetales, responsables de la proliferación anormal del tejido (Echenique *et al.*, 2004).

El AIA es importante como molécula de señalización en la interacción planta microorganismo, determinada a través de estudios moleculares y de las rutas bioquímicas, estimula el crecimiento de la raíz y proliferación de pelos radiculares en las plantas mejora la absorción de agua y minerales (Spaepen., *et al* 2007). Es por ello que se han empleado bacterias productoras de éste metabolito como inoculantes (Zehnder *et al.*, 2001; Caballero, 2006), favoreciendo el rendimiento de los cultivos, acortando ciclos y disminuyendo la contaminación ambiental (Lara *et al.*, 2011).

2.3 Rutas de biosíntesis del Ácido-3- Indol Acético AIA

En algunos casos se ha demostrado que la presencia del aminoácido triptófano (TRP) estimula la producción del AIA, indicando así que los microorganismos emplean éste aminoácido como precursor; varios intermediarios se detectan en un medio suplementado con éste aminoácido, los microorganismos lo hacen por diferentes rutas aun siendo bacterias de la misma especie; pero también son capaces de producir auxina en ausencia de éste aminoácido (Frankenberger y Arshad, 1995)

En un estudio realizado por Kamilova *et al.*, (2006), determinaron que al inocular la auxina proveniente de *Pseudomonas. fluorescens* WCS365 en semillas de pepino, pimiento y tomate se presentó un aumento en el peso de las raíces, pero fue más significativo cuando se inocularon en rábano, éste produce por lo menos nueve veces más triptófano en su exudado que el resto de las plántulas empleadas en el ensayo.

También se ha reportado que cuando se marcó con carbono 14 el anillo del triptófano en presencia de una bacteria mutante k-60 de *Ralstonia Solanacearum* (Anteriormente llamada *Pseudomonas solanacearum*), el AIA originado por acción de ésta bacteria resulta débilmente marcado, mientras que en presencia de trazas de ácido antranílico y ácido 3-hidroxiantranílico el AIA resulta fuertemente marcado, esto muestra que k-60 *Ralstonia Solanacearum* no sintetizó en forma significativa el aumento de AIA por la descarboxilación y desanimación del triptófano. También encontraron que el AIA fue producido formándose precursores del resultado del metabolismo como ácido indol-3-pirúvico, (IPyA), Indolacetamida (IAM), e Indolacetaldehido (IAAid) pero no cuando se proporciona triptamina (TAM) (Frankenberger y Arshad, 1995)

2.3.1 Ruta de biosíntesis de AIA dependiente del triptófano

Existe un alto grado de similitud en las rutas metabólicas de AIA entre las especies de plantas y bacterias, las más conocidas empleando como precursor el triptófano son: Indolacetamida (IAM), ácido indol-3-piruvico, (IPyA), triptamina (TAM). Indolacetaldehido (IAAid), Indol-3 acetoniitrilo (IAN), cada una de estos intermediarios pueden transformarse finalmente en Acido-3- Indol Acético (AIA) a través de reacciones de descarboxilación, y desaminación bajo la participación de múltiples enzimas (Frankenberger y Arshad, 1995)

La ruta de Indolacetamida (IAM) es reconocida como una vía específica para bacterias ya que no existía evidencia de esta ruta en plantas. Sin embargo al hacer un estudio con un método altamente sensible de análisis HPLC y GC-MS/MS se probó que éste intermediario es un compuesto endógeno de *Arabidopsis thaliana* (Spaepen *et al.*, 2007).

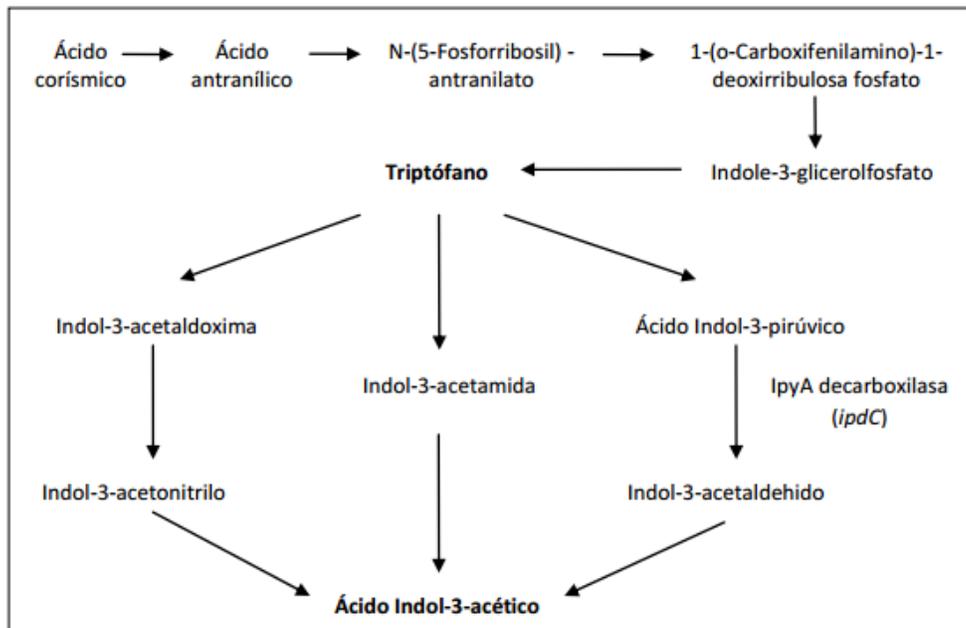


Figura 2-1: Rutas para la biosíntesis del Ácido-3- Indol Acético (AIA), dependiente de triptófano (Zakharova *et al.*, 1999)

2.3.2 Ruta de biosíntesis de AIA independiente del triptófano

Los análisis en mutantes de *Arabidopsis thaliana* (con defecto en la enzima alfa-beta triptófano -sintasa) demuestra que se producen niveles elevados de AIA a través de una ruta independiente del triptófano (Last *et al.*, 1991).

Un ejemplo en bacterias que emplean la ruta independiente del triptófano es *Azospirillum brasilense*, con la cual se han realizado experimentos de suplementación con precursores marcados, la ruta independiente es predominante cuando no se suministra triptófano en el medio de cultivo, 90% del AIA se sintetiza a través de la vía independiente mientras que el 0.1% se produce a través de la vía IAM que es una ruta dependiente del triptófano, no se conocen enzimas específicas en ésta ruta, aún se están realizando estudios acerca de las enzimas participantes. Es importante destacar que algunas bacterias poseen más de una ruta, en el caso de *Pantoea agglomerans* se han identificado genes de las rutas IAM (Indolacetamida) como también de la ruta IPyA (ácido indol-3- pirúvico) (Azcon y Talón 1993).

El conocimiento actual sobre la síntesis de AIA en bacterias se remonta al final del siglo XX, el uso de los análisis y las técnicas para la detección y cuantificación así como el avance rápido en la genómica funcional sin duda ha proporcionado un conocimiento más detallado sobre las rutas de biosíntesis del AIA presente en las bacterias (Spaepen *et al.*, 2007).

2.4 Papel del AIA en la interacción planta-bacteria

Muchas bacterias y hongos interactúan con la raíz de las plantas, puesto que dependen de sus exudados involucrando una serie de señales, algunas veces generando interacciones más complejas. Es difícil predecir esas interacciones entre microorganismos y las plantas, pero se considera que desempeñan un papel importante en las prácticas

agrícolas sostenibles (Subba Rao, 1999). Se han realizado ensayos de inoculaciones de microorganismos en plantas y se han encontrado diferentes respuestas que dependen de su fisiología y de la bioquímica de las moléculas presentes en la interacción, como también de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.* 2000).

Las PGPR presentan una agresiva colonización de la rizósfera desplazando así a otras bacterias y hongos perjudiciales para la planta presentándose la competencia por recursos y por espacio para poder colonizar en la rizósfera y posiblemente influenciar en el crecimiento de las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Estudios realizados con microorganismos de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* demostraron que éstas bacterias excretan sustancias promotoras de crecimiento (auxinas, giberelinas etc.) que pueden ser aprovechadas por las plantas (Ahmad *et al.*, 2005).

Una de las principales auxinas es el AIA, el uso de rizobacterias productoras de AIA, remplace el empleo de agroquímicos y se ajustan a prácticas de manejo sostenible, la manipulación de cultivos de poblaciones microbianas a partir de la rizósfera y su inoculación en plantas para aumentar su crecimiento es una promesa considerable en los estudios *in vitro* aunque las respuestas en campo han sido variables (Saharan y Nehra 2011).

También se han reportado que las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de inducir resistencia por parte de la planta, incrementando la velocidad y los niveles de síntesis de compuestos llamados fitoalexinas, implicados en la defensa de la planta. La señal responsable de la inducción de resistencia y del aumento en la acumulación de fitoalexinas está inducida por los lipopolisacáridos de la bacteria (Lemanceau y Alabouvette, 1993).

2.5 Prueba para determinación de indoles

Los indoles son el producto de la acción de la triptofanasa presente en los microorganismos. Cuando la enzima se produce ocurre una degradación del triptófano presente en gran cantidad en el extracto de carne que se emplea por lo general como el medio de cultivo, como producto final se obtiene ácido pirúvico, amoníaco e indol. La molécula de indol una vez extraída por acción del butanol o del alcohol isoamilico presente en el reactivo de Kovac's es coloreada por 1 para- dimetil-amino-benzaldehído formando un anillo de color rojo en la superficie del caldo utilizado para la reacción (Salgado, 2006). Aunque no cuantifica indoles, ésta prueba es sencilla y rápida y permite determinar preliminarmente las diferencias en producción de indoles en colecciones amplias de bacterias (Figura 2.2).

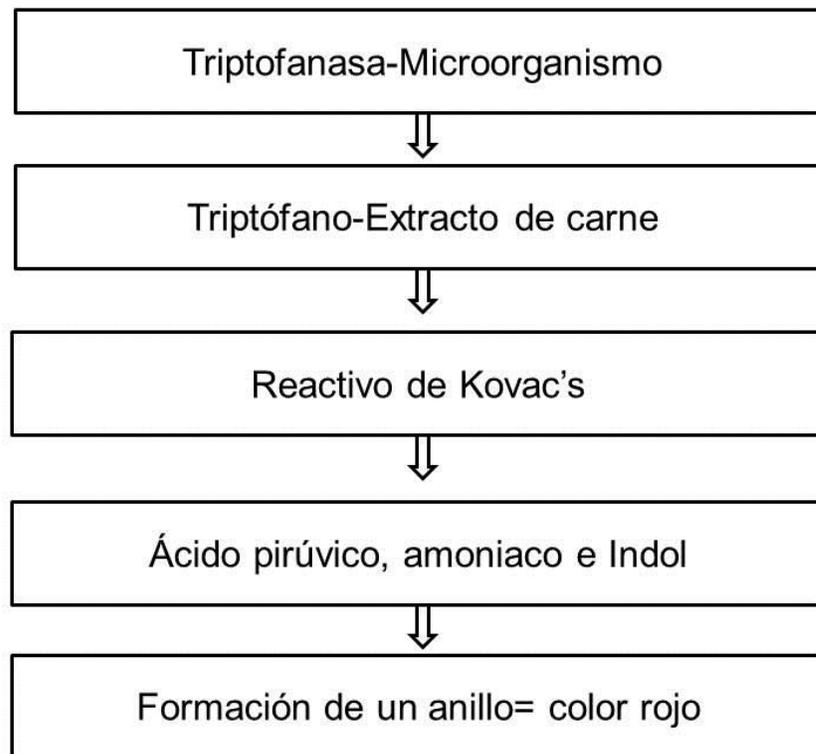


Figura 2-2: Reacción del reactivo de Kovac's sobre el Indol

También existen pruebas colorimétricas cuantitativas para la estimación de indoles principalmente el ácido-3-indol acético en soluciones acuosas; una de ellas es la que se realiza con el reactivo de salkowsky (mezcla de FeCl_3 y H_2SO_4), el empleo del ácido sulfúrico mejora el color de la solución cuando reaccionan el AIA y el reactivo de salkowsky. La lectura se realiza en 30 minutos en un espectrofotómetro a una absorbancia de 530nm (Gordon y Weber 1950).

2.6 Estrategias biotecnológicas comúnmente usadas para obtener bacterias con características deseables

Varias funciones de las rizobacterias han sido modificadas a través de manipulación genética, por ejemplo las secuencias de ADN que codifican genes para la síntesis de antibióticos (Thomashow *et al.*, 1997), inactivación de genes para obtener características deseables en bacterias mutantes (Bianciotto *et al.*, 2001), algunos genes *acdS* que codifican la enzima ACC desaminasa, identificados en bacterias, aislados y usados para la transformación genética de otras bacterias y de plantas (Holguin y Glick, 2003).

La ingeniería metabólica tiene como objetivo optimizar la actividad celular mediante la manipulación de enzimas, transporte o regulación de funciones de las células (Bailey, 1991). Hoy en día se considera que el análisis de mutantes es la aproximación experimental que aporta la evidencia más contundente sobre los mecanismos de acción de las PGPR, uno de ellos la evaluación en la producción de antibióticos (Thomashow *et al.*, 1997).

En algunos casos no es posible aún desarrollar o analizar mutantes, en forma simple y en su lugar es necesario hacer investigaciones con métodos indirectos tales como la detección *in vitro* de compuestos, la adición de filtrados de cultivo, o la detección de cambios específicos en los tejidos vegetales entre otros (Hoyos, 2012).

Las aplicaciones en el futuro de las PGPR son varias, por ejemplo en la actualidad muchas son las bacterias que son modificadas genéticamente, con base al conocimiento de secuencias genómicas, perfiles de expresión y microscopía avanzada (Hibbing *et al.*, 2010), permitiendo potencializar muchas de sus funciones mejorando la productividad y la salud de las plantas (Morrissey *et al.*, 2004). También se logra modificar bacterias bajo el efecto de la competencia, aunque éste campo aún se encuentra poco explorado.

Conocer más sobre la ecología microbiana permitirá entender las posibles interacciones positivas o negativas que existen entre los microorganismos, un organismo afecta a otro, ya sea por factores bióticos o abióticos como también por los fenotipos de los participantes (Fordyce, 2006). Queda mucho por conocer acerca de biodiversidad microbiana, siendo necesario identificar y caracterizar microorganismos que podrían ser aprovechados para generar rasgos deseados en las plantas, remplazando el uso desmedido de fertilizantes químicos, pesticidas o herbicidas y fungicidas (Morrissey *et al.*, 2004)

Para mejorar el efecto en las plantas por las PGPR modificadas genéticamente u obtenidas bajo la competencia, es necesario en un futuro determinar las clases de inoculantes más eficientes, con el fin de mantener la viabilidad y propiedades de las bacterias modificadas, de esta forma permitiría una mayor colonización y acción en las plantas (Compant *et al.*, 2005).

2.7 Distribución de suelos en Colombia

El suelo se constituye en un hábitat de una gran cantidad de organismos vivos que a su vez son factor clave en la formación y propiedades del mismo, así como en sus funciones y rendimiento en el ecosistema. No obstante esa biodiversidad apenas comienza a ser

conocida y entendida. Así, la diversidad de organismos en el suelo es un indicador de su calidad y su pérdida representa deterioro y degradación del mismo (Havlicek, 2012).

Según Jaramillo (2002) los suelos de orden andisol presentan predominio de minerales del orden de complejos del aluminio con humus (compuestos provenientes de la descomposición de materia orgánica por organismos y microorganismos), alta retención de fósforo, capacidad de agua disponible e intercambio catiónico. En los suelos de orden inceptisol se presenta acumulación de materiales orgánicos, la presencia de éstos elementos permiten que se presente múltiples reacciones de oxidación y reducción por parte de los microorganismos y puedan realizar su metabolismo.

Jaramillo (2002) reporta que los suelos del orden oxisol presentan erosión extrema, por lo general se encuentran en ambientes áridos, presentan baja fertilidad y altos contenidos de minerales de óxido de hierro y aluminio. En la Tabla 2-1, se reporta la distribución de los órdenes del suelo en Colombia.

Tabla 2-1: Distribución de los órdenes de suelos de Colombia, por regiones naturales. Con base en información presentada por IGAC (2003).

Región Natural	Órdenes de suelos dominantes
Amazonia	Oxisol (36.9%), Inceptisol (20.8%), Ultisol (18.9%), Entisol (16.1%), Espodosol (2.9%)
Andina	Inceptisol (35%), Entisol (33%), Andisol (18%), Alfisol (3%), Ultisol (3%), Mollisol (2%)
Orinoquia	Oxisol (39%), Inceptisol (28%), Entisol (21%), Ultisol (6%)
Llanura Caribe*	Inceptisol (38%), Entisol (31%), Mollisol (6%), Vertisol (6%), Aridisol (5%), Alfisol (4%), Oxisol (1%)
Andén Pacífico	Inceptisol (50%), Entisol (26%), Oxisol (8%), Ultisol (8%), Histosol (4%)
Valles interandinos**	Inceptisol (44.4%), Entisol (40.1%), Alfisol (3.7%), Mollisol (3.7%), Vertisol (1.4%), Andisol (0.8%)
Islas del Caribe	Inceptisol (30%), Entisol (22%), Vertisol (15%), Histosol (13%), Mollisol (12%)

* Incluye la Guajira.

** Comprende el valle alto y medio del río Magdalena y el valle del río Cauca.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Determinar los cambios funcionales en colonias de bacterias productoras de indoles totales sometidas a competencia inter-específica e intra-específica.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener una colección de rizobacterias de frijol, que varíen en su producción de indoles totales.
- Evaluar el papel de la competencia inter-específica e intra-específica entre colonias en la generación de nuevos fenotipos bacterianos variables en producción de indoles.
- Analizar en raíces de frijol y bajo condiciones semicontroladas los efectos de la inoculación de esos nuevos fenotipos bacterianos obtenidos bajo condiciones de competencia.

4. Metodología

4.1 Materiales y métodos

Localización

Este estudio se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Microbiología de suelos a una temperatura de 25°C y en el invernadero de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín a una altura sobre el nivel del mar de 1479 msnm

4.2 Fases de estudio

El trabajo se dividió en cuatro fases. En la primera fase se realizó una colección de rizobacterias de plantas de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L). En la segunda fase se caracterizaron fenotípicamente esas colonias y se determinó su capacidad de producción de indoles. En la tercera fase se realizaron pruebas de competencia inter e intra-específicas en colonias bacterianas y se determinaron cambios en la producción de indoles totales. Finalmente, en la cuarta fase en condiciones semicontroladas se evaluó el efecto de la inoculación de varios fenotipos bacterianos nuevos o sus ancestros, en el desarrollo inicial de raíces de plantas de frijol.

4.2.1 Fase 1: Aislamiento y caracterización de una colección de rizobacterias a partir de plantas de frijol sembradas en varios suelos.

En estudios anteriores se ha observado una frecuencia alta de bacterias productoras de indoles en las raíces y rizósfera de plantas de papa (Soler, 2012). Con base en ello, en éste estudio se aislaron bacterias productoras de indoles, tanto de raíz como de rizósfera a partir de plantas de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L), variedad cargamanto blanco provenientes del Corregimiento de San Cristóbal del Municipio de Medellín. Bajo condiciones de invernadero, se emplearon materas de 22x15 cm³ con tres tipos de suelos (inceptisol, andisol, y oxisol), en éstos suelos se colocaron las semillas de frijol previamente germinadas por un periodo de 4 a 6 días, se regaron y se hizo seguimiento del desarrollo de las plantas.

Para el aislamiento de bacterias y preparación de las suspensiones de suelo rizosférico y de raíces se basó en la metodología presentada anteriormente por Soler (2012).

El aislamiento de las bacterias de la raíz se realizó a partir de plantas de cuatro semanas de edad, las raíces se lavaron con agua corriente, posteriormente se pesaron 3 g y se esterilizaron por inmersión en etanol al 70 % por 30 segundos, después en hipoclorito de sodio al 5 % por 3 minutos y finalmente se realizaron lavados con agua destilada estéril, y se secaron con papel toalla estéril.

A partir de las raíces se preparó una suspensión (suspensión 1 de raíz), para ello se maceraron 3 g de raíz en 3 ml de agua destilada estéril, se transfirió 1 ml del macerado a un tubo con 9 ml de agua estéril, formando así la solución madre de raíz. A partir de ésta se tomaron 100 µl y se adicionaron en un tubo con 9.9 ml de agua estéril, de esta forma se obtuvo la suspensión 1 de raíz.

Para el aislamiento de las bacterias de suelo rizosférico se tomaron raíces con suelo adherido, estas se introdujeron en una bolsa plástica y se sacudieron fuertemente para remover el suelo, posteriormente se extrajo el suelo suelto. Para la obtención de la suspensión (suspensión 1 de suelo rizosférico), se adicionó 1.0 g en un tubo de ensayo y se suspendió en 9 ml de agua destilada estéril, se agitó fuertemente en vortex, obteniendo así la solución madre, se dejó en reposo aproximadamente 2 minutos, luego se preparó una dilución 1/10 tomando 1 ml (1000 μ l) del sobrenadante del tubo anterior y se adicionó a un tubo con 9 ml de agua destilada.

De la dilución anterior se tomaron 50 μ l y se adicionaron en un tubo de ensayo con un volumen de 4.95 ml de agua destilada. Esta fue la suspensión 1 de la muestra del suelo. (Figura 4-1).

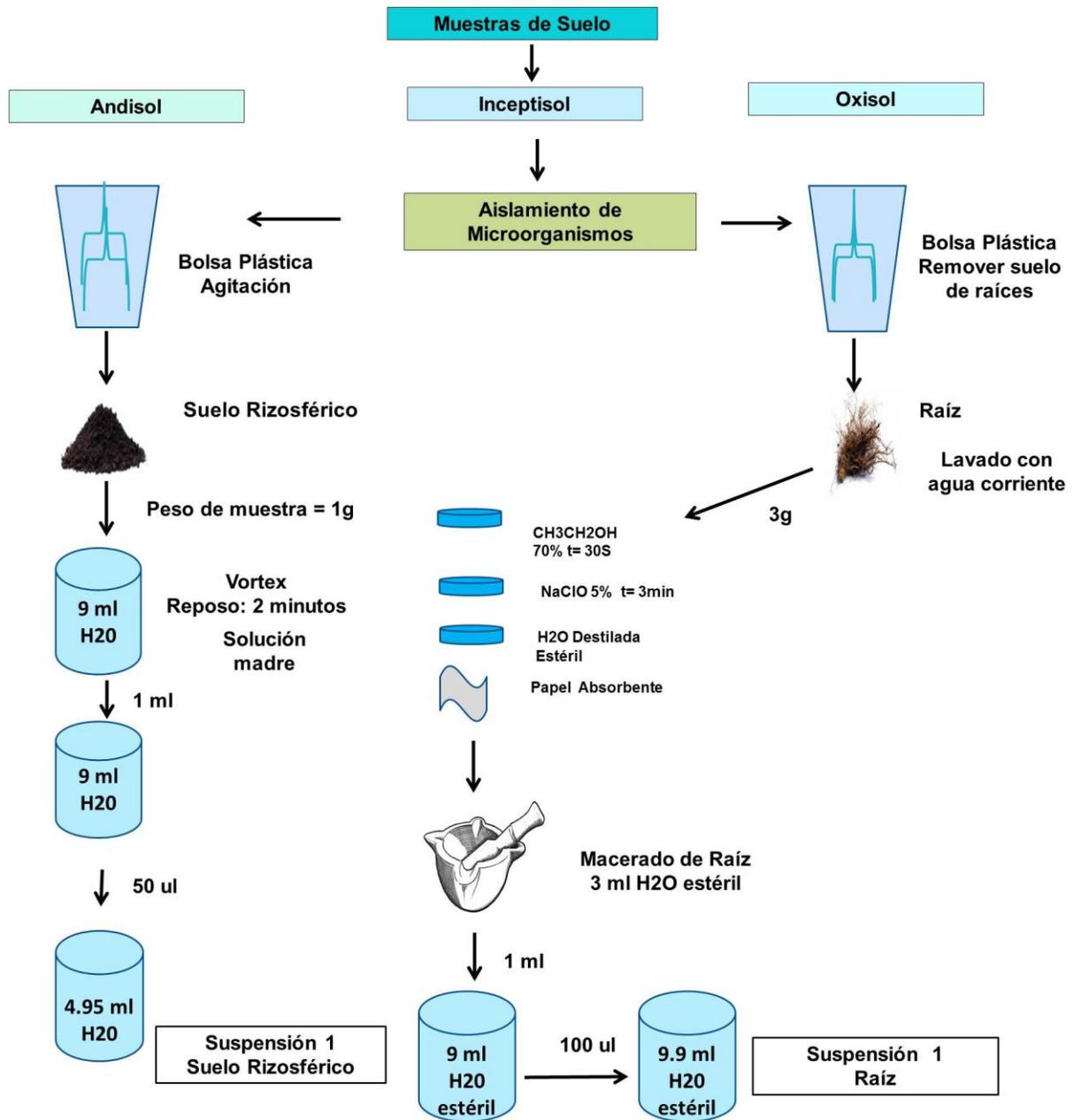


Figura 4-1: Preparación de suspensión y dilución del suelo rizosférico y de raíz para el cultivo de microorganismos

Para el cultivo de los microorganismos se prepararon medios de cultivo agar extracto de raíz de frijol (AER) de tres tipos de suelo (andisol, inceptisol y oxisol) y agar nutritivo (AN). Los detalles para preparación del medio, siembra y conservación de microorganismos están disponibles libremente y pueden consultarse en el texto presentado anteriormente por Soler (2012).

Brevemente, para preparar agar extracto de raíz de frijol se tomaron 10 ml de extracto de raíz, 15 g de agar agar, 1g de sacarosa comercial, 0.5 g de K_2HPO_4 y, 990 ml de agua destilada: luego se esterilizó la mezcla en autoclave a 121°C, 0.1 MPa, por 20 minutos. El extracto de raíz se obtuvo después de esterilizar la raíz con etanol al 70% por 30 segundos, luego en hipoclorito de sodio al 5 % por 3 minutos y finalmente un lavado con agua destilada estéril. Un gramo de las raíces desinfectadas se licuaron con 1000 ml de agua destilada estéril, finalmente se esterilizó la suspensión en un filtro de 0.2 μ m.

En esta forma se obtuvieron medios con extractos de raíces obtenidas de plantas sembradas en cada tipo de suelo: agar extracto de raíz inceptisol (AER-I) agar extracto de raíz andisol (AER-A) y agar extracto de raíz -oxisol (AER-0)

Para preparar el agar nutritivo se utilizó la mitad de la dosis recomendada por el fabricante (OXOID®). Para ello se disolvieron 10 g de caldo nutritivo y 6 gramos de agar-agar en 1000 ml de agua destilada, luego se esterilizó en autoclave a 121°C, 0.1 MPa, por 20 minutos.

Para la siembra de microorganismos, de la suspensión 1 de suelo rizosférico y de raíz se transfirieron 20 μ l a dos cajas de petri con cada medio de cultivo, luego se distribuyeron uniformemente por toda la caja con espátula de Digrafsky. En forma paralela se incluyeron cajas sin sembrar como controles ambientales

Después de 24, 30 y 72 horas se definieron morfotipos de colonias con base en su morfología, y se contó el número de colonias de cada morfotipo. Para el almacenamiento de colonias seleccionadas, estas se tomaron con una asa de anillo y se suspendieron en 300 μ l de solución salina 0.85%, se sellaron con papel vinipel y se almacenaron en nevera a 4°C. De la colección se escogieron morfotipos de bacterias teniendo en cuenta su color, su forma, y diferencias en producción de indoles totales, prueba que se enuncia a continuación.

Determinación cualitativa de indoles totales

Para la determinación cualitativa se preparó caldo extracto de carne, para ello se pesaron 8.6 g de extracto de carne, 6.2 g de cloruro de sodio (NaCl) en 1000 ml de agua destilada, ajustando la mezcla a un pH de 7.2 ± 0.1 , se mezclaron todos los ingredientes a una temperatura constante de 40°C, hasta lograr dilución completa, posteriormente se depositaron 4.5 ml en tubos de ensayo con tapa rosca, luego se esterizaron a 121°C, 0.1 MPa, por 20 minutos.

El criterio de selección de bacterias fue la realización de ésta prueba, se escogieron colonias de bacterias de mayor a menor concentración de indoles. Para ello se dispensaron 20 μ l de cada suspensión bacteriana en el caldo extracto de carne. Se incubó a 35°C a 37°C por un periodo de 18 a 24 h. Después del periodo de incubación se agregó a cada tubo 5 gotas de reactivo de kovac's, el cual reaccionó en la superficie del caldo de cultivo y se formó un anillo de color rojo en presencia de compuestos indólicos (Salgado, 2006).

Se seleccionaron las colonias de cuatro morfotipos de bacterias, los morfotipos 3 y 19, aislados de suelo rizosférico de plantas de frijol (Inceptisol), el morfotipo de la bacteria 32 aislada de raíz de plantas de frijol (andisol), y un cuarto morfotipo se tomó de una colección disponible en el laboratorio de microbiología de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, identificada como morfotipo N° 81, que fué aislada de raíces de

plantas de papa (Soler, 2012). Las colonias se suspendieron en 300 µl de solución salina estéril al 0.85% y se almacenaron en nevera a 4°C hasta su uso en las pruebas posteriores.

4.2.2 Fase 2: Caracterización preliminar de bacterias productoras de indoles totales aisladas del suelo rizosférico y de raíz

Para diferenciar los cuatro morfotipos de bacterias escogidos, se les realizó prueba cualitativa de indoles con el reactivo de Kovac's (Salgado, 2006) enunciada en la sección anterior, también se realizaron otras pruebas adicionales como: tinción de Gram, prueba de filancia y la determinación de fluorescencia en medio de cultivo King's B (KB) (Koneman, 2008).

Tinción de Gram: se utilizó colonias de bacterias de 48 horas de edad con una gota de agua destilada estéril, se dejó secar a temperatura ambiente, luego se realizó la coloración siguiendo el protocolo estandarizado (Cristal violeta 1 minuto, lugol 1 minuto, alcohol acetona 10 segundos y safranina 30 segundos). Posteriormente, se dejó secar la placa para ser observada en el microscopio con el objetivo de 100X con el fin de observar la coloración de la bacteria.

Reconfirmación del Gram con KOH: Para esta prueba, se adicionó una gota de hidróxido de potasio al 3 % en un portaobjetos, y luego se agregó una pequeña cantidad de bacteria de 24 horas de edad, se mezcló y se observó si hay presencia de filancia.

Fluorescencia en King B (KB): Producción de pigmento fluorescente a partir de los morfotipos bacterianos, para ello se empleó el medio de cultivo King-B, se sembró colonias de 48 horas de crecimiento de los cuatro morfotipos bacterianos, a una

temperatura de 28 °C, luego se determinó la presencia de pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta.

4.2.3 Fase 3: Pruebas de competencia bacteriana, selección y evaluación de nuevos fenotipos

Se preparó 350 ml medio de cultivo de caseína pancreática a una concentración de 2 g L⁻¹ Para ello se pesaron 0.7g de medio y se diluyeron en 350 ml de agua destilada, se adicionó agar-agar a una concentración de 15 g L⁻¹ Se colocó en un agitador magnético a 100 rpm y se calentó sin llegar a ebullición, se esterilizó en autoclave a 121°C, 0.1 MPa, por 20 minutos. Del medio esterilizado se depositaron 5 ml en cada caja de Petri de 60x 15 mm y se dejó solidificar.

Del inóculo almacenado previamente se sembraron 3 µl sobre el medio sólido y seco (2h en estufa a 40°C) para obtener colonias de bacteria en forma individual o bajo competencia (Intra-específica e inter-específica). Para las pruebas de competencia, las colonias de bacterias se sembraron a una distancia de 0.5 cm (Figura 4-2).

Las cajas selladas con vinipel se incubaron a 25°C de 18 a 24 horas. Se sembraron cuatro réplicas de cada combinación de colonias de bacterias o de colonias individuales (Figura 4.2).

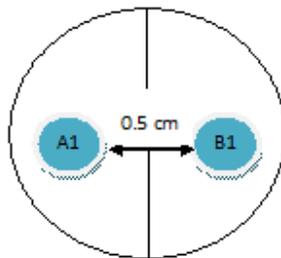


Figura 4-2: Detalle de la siembra de colonias de bacterias sometidas a competencia.

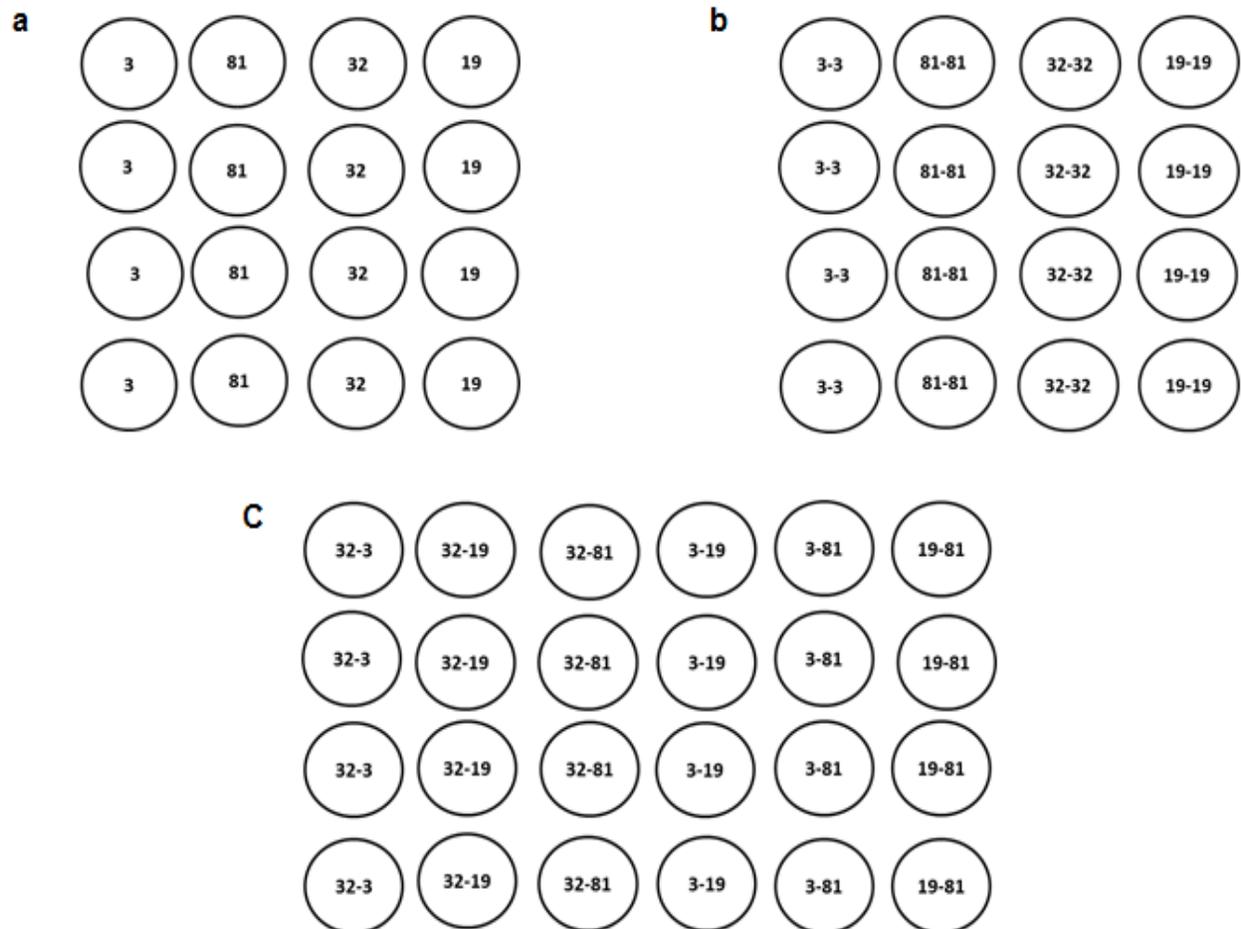


Figura 4-3: Esquema general de la prueba de competencia entre colonias de bacterias. **a.** Colonias de bacterias individuales **b.** Colonias de bacterias sometidas a competencia intra-especifica **c.** Colonias de bacterias sometidas a competencia inter-especifica. Cada círculo corresponde a una caja de Petri.

Producción de AIA por colonias de bacterias sin competencia o sometidas a competencia intra-específica e inter-específica

Se midieron los cambios en la producción de indoles totales de las colonias de bacterias de los morfotipos 3, 81, 32 y 19 sin competencia o sometidas a competencia. Para ello se tomó del borde de cada colonia una pequeña cantidad de inóculo, y se siguió el procedimiento como se describe a continuación

Determinación cuantitativa de AIA en colonias de bacterias

Para la determinación cuantitativa de AIA se realizó la siguiente metodología. Se preparó caldo nutritivo según Mantilla, 2007, se adicionaron 5 ml en tubos de ensayo que se esterilizaron a 121°C, 0.1 MPa, por 20 minutos. Para preparar el reactivo de Salkowsky se mezclaron 1000 ml de agua destilada, 600 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 30 ml de cloruro férrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.5M). Para la determinación espectrofotométrica de AIA se preparó una curva de calibración así: inicialmente se preparó una solución patrón de AIA (alfa aesar, 98.7%, $C_{10}H_9NO_2$) con concentración de 100 $\mu g/ml$ mediante dilución inicial de AIA en etanol y luego en agua (proporciones) 0.5 ml de etanol y 99.5 ml de agua destilada

Para la preparación de la solución patrón se pesaron 0.01 gramos de AIA y se mezclaron con 0.5 ml de etanol. Luego se aforó hasta 50 ml con agua destilada. A partir de esa solución patrón de AIA y con agua destilada se prepararon varias soluciones con concentración variable (Tabla 4.1).

Tabla 4-1: Diluciones empleadas en la curva de calibración del Ácido Indol-3- Acético (AIA) (Mantilla, 2007).

Concentración AIA µg/ml	Volumen en ml patrón de AIA 100 µg/ml	Volumen en µl patrón de AIA 100 µg/ml	Agua destilada (ml)	Agua destilada (µl)
0	0.0	0	1.0	1000
2	0.2	200	9.8	9800
5	0.5	500	9.5	9500
10	1.0	1000	9.0	9000
12	1.2	1200	8.8	8800
15	1.5	1500	8.5	8500
20	2.0	2000	8.0	8000
30	3.0	3000	7.0	7000
60	6.0	6000	4.0	4000
80	8.0	8000	2.0	2000

Prueba de Salkowsky

Para detectar cambios en la producción de indoles en colonias de bacterias, con un palillo de dientes estéril de 1 mm de diámetro se tomó una cantidad pequeña del borde de las colonias y se introdujo en tubos de ensayo que contenían 5 ml de caldo nutritivo suplementado con 500 µg/ml del aminoácido triptófano (TRP), se mezclaron las colonias en el medio. Los tubos se cerraron herméticamente y se incubaron en agitación recíproca (30°C a 100 rpm, 45 h). Luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 minutos. En 1 ml del sobrenadante se adicionaron 4 ml del reactivo de salkowsky, se dejaron en reposo por un tiempo de 30 minutos para lograr el desarrollo de un color fucsia, el cual es más intenso si hay más concentración del AIA en la muestra.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro Pharo 300 a una longitud de onda de 530 nm. Como controles de éste ensayo se emplearon, como control positivo una cepa de la bacteria *E-coli* y como control negativo un medio de cultivo sin inoculación de bacterias.

4.2.4 Fase 4 Efecto de la inoculación de varios fenotipos bacterianos nuevos o sus ancestros, en el desarrollo inicial de raíces de plantas de frijol.

Se emplearon semillas de frijol provenientes del Corregimiento de San Cristóbal del Municipio de Medellín, para la desinfestación de semillas se empleó un protocolo presentado anteriormente por (Ferrera, 1993) y que se resume así: en erlenmeyer estériles, las semillas se sumergieron en alcohol por un minuto, luego se pasaron dos veces por agua destilada estéril, posteriormente lavaron con hipoclorito de sodio al 2% por 1 minuto y finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Para la germinación se colocaron conjuntos de 15 semillas de frijol sobre papel absorbente en cajas de petri limpias (inmersión en hipoclorito de sodio al 2% y enjuague en agua). Se adicionaron 200 µl de agua destilada para conservar la humedad y se mantuvieron en oscuridad durante 24 a 48 horas hasta emergencia de la radícula.

Las suspensiones bacterianas se incrementaron en caldo nutritivo suplementado con 500 µg/ml de triptófano, el mismo medio que se empleó para el desarrollo de la prueba de salkowsky con las colonias de bacterias. Para ello se tomaron fragmentos directamente del borde de colonias en pruebas de competencia intra-específica e inter-específica o sin competencia; se incubaron en agitación recíproca durante 45 horas a 30°C y 100 rpm, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Las semillas se inocularon con una suspensión preparada con 200 µl del sedimento resuspendido en 1 ml de agua estéril.

Como control negativo se inocularon semillas con medio de cultivo estéril y sin bacterias, como control positivo se adicionó una solución de AIA con concentración de 50 µg/ml. Esa concentración fue presentada anteriormente por El Saeid *et al.*, (2010) y relacionada con el crecimiento de hojas en plantas de frijol.

Después de la inoculación con las bacterias, las semillas se incubaron 48 horas, luego se fotografiaron y se determinaron parámetros de crecimiento a partir de fotografías. Para determinar patrones de crecimiento, se midieron la longitud y el diámetro de la raíz primaria y raíz secundaria más larga. Esta estrategia se basa en una metodología de análisis de imágenes presentada anteriormente (Lobet *et al.*, 2011), utilizando el software libre ImageJ (Rasband, 2007).

La variable respuesta es la arquitectura de la raíz, definida aquí como la relación de diámetros de la raíz primaria y la raíz secundaria ($DR1/DR2$) y la relación de longitudes de la raíz primaria y la raíz secundaria ($LR1/LR2$).

4.3 Análisis estadístico

Los cambios en la producción de indoles totales por las colonias de bacterias 3, 81, 32 y 19, se establecieron a partir de un experimento con 20 tratamientos, representados por colonias individuales (4), colonias en competencia intraespecífica (4) y colonias en competencia interespecífica (12), con cuatro replicas por cada tratamiento. Para comparar valores de producción de indoles totales se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida por una prueba de Dunn

Experimentos con esos mismos 20 tratamientos se emplearon con el fin de establecer el efecto de la inoculación de varios fenotipos bacterianos nuevos o sus ancestros, en el desarrollo inicial de raíces de plantas de frijol. Adicionalmente se incluyeron como controles un tratamiento con adición de una solución de AIA a las semillas y un tratamiento con adición de agua estéril. Se emplearon cuatro repeticiones por cada tratamiento, cada repetición representada por una caja de petri con cinco semillas inoculadas con la suspensión bacteriana correspondiente.

Para comparar los efectos de los tratamientos en el desarrollo de raíces, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con ayuda del paquete estadístico SAS/STAT® V.9.0 para Windows, verificando los supuestos de normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas. En aquellos casos, donde se encontró significancia de $P < 0.05$, se realizó la prueba de Tukey con la que se comparan las medias de cada tratamiento.

5. Resultados

5.1 Fase 1: Colección de rizobacterias de plantas de frijol sembradas en suelo andisol, oxisol e inceptisol

Se obtuvieron en total 36 morfotipos de colonias de bacterias a partir de muestras de raíces y suelo rizosférico (SR) de plantas de frijol cargamanto (*Phaseolus Vulgaris* L), sembradas en tres tipos de suelos, andisol, oxisol e inceptisol. De éstos, ocho morfotipos provenientes de la siembra en suelo andisol, 15 morfotipos del suelo inceptisol y 18 morfotipos del suelo oxisol, encontrándose cinco morfotipos en común en los tres tipos de suelos, los aislamientos de éstos morfotipos se reportan en el Anexo 9. (Tablas 9-1, 9-2, y 9-3). La cantidad de las bacterias en suelo rizosférico correspondió a 558 UFC/ml mientras que en raíz el aislamiento fue de 350 UFC/ml (Tabla 5-1)

Tabla 5-1: Número de Unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de bacterias aisladas de raíz y suelo rizosférico (SR) que crecen en los diferentes medios de cultivo. Agar Nutritivo (AN) Agar Extracto de raíz Inceptisol (AER-I) Agar Extracto de Raíz Andisol (AER-A) y Agar Extracto de Raíz -Oxisol (AER-O)

Medio de cultivo	Número de colonias UFC/ml		Raíz y SR
	Raíz	Suelo rizosférico (SR)	
AN	167	75	242
AER-I	152	90	242
AER-A	0	220	220
AER-O	31	173	204
Total	350	558	908

Como se mencionó en la anterior sección, a partir de la colección general se escogieron cuatro morfotipos (3, 81, 32 y 19) de bacterias, que presentaron diferente producción de indoles, determinada por la prueba cualitativa de indoles, más adelante se confirma la concentración de AIA con la prueba de Salkowsky. También se escogió el morfotipo 81 proveniente de la colección bacteriana del laboratorio de Microbiología de suelos con un valor de AIA de 75.5 µg/ml con la prueba de Salkowsky, ésta bacteria representó un parámetro de referencia para ésta prueba.

5.2 Fase 2: Caracterización de bacterias productoras de indoles totales aisladas del suelo rizosférico y de raíz

Los resultados de la caracterización de los morfotipos de las bacterias se resume en la Tabla 5.2, En la prueba cualitativa para indoles, en el morfotipo 3 se evidenció la formación de un anillo de color rojo intenso, mientras que el morfotipo 19 presentó los menores valores y los aislamientos 81 y 32 presentaron niveles intermedios según la prueba cualitativa realizada con el reactivo de Kovac's.

Tabla 5-2: Características y denominación de las colonias seleccionadas para estudios de competencia intra-específica e inter-específica.

Morfotipos de Colonias bacterianas	Prueba de Filancia KOH 3%	Coloración de Gram	Fluorescencia en medio King's B(KB)	Producción de indoles-Reactivo de Kovac's	Características fenotípicas
3	Positiva	Cocos Gram negativos	Ausencia	+++	Colonias de color beige, borde ondulado con superficie cremosa, aislada de suelo rizosférico de plantas de frijol, sembradas en suelo inceptisol.
81	Negativa	Bacilos Gram positivos	Ausencia	++	Colonias de bacterias de color beige, aisladas de raíz de plantas de papa, sembradas en suelo andisol (Soler, 2012)
32	Positiva	Bacilos Gram negativos	Presencia	+	Colonias de color rosa, circulares con superficie cremosa, aislada de raíz de plantas de frijol sembradas en suelo andisol
19	Positiva	Bacilos Gram negativos	Ausencia	+	Colonias transparentes circulares, aisladas de suelo rizosférico de plantas de frijol, sembradas en suelo Inceptisol.

5.3 Fase 3: Pruebas de competencia bacteriana, selección y evaluación de nuevos fenotipos productores de indoles

La producción de AIA determinada cuantitativamente por la prueba de Salkowsky en cada uno de los cuatro morfotipos de las bacterias se encuentra referenciado en el anexo 9 (Tabla 9.4).

Las diferencias significativas, en la producción de indoles totales de las competencias de los morfotipos se determinaron con la prueba de Dunn (Tabla 5-3).

Tabla 5-3: Diferencias de los promedios de rangos de producción de indoles (valores en cursiva y negrilla) entre las colonias individuales y las sometidas a competencia intra-específica e inter-específica. Valores mayores que la diferencia crítica $H= 15.26$ (prueba de Dunn), se señalan con un asterisco e indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con la producción de indoles por colonias individuales

Morfotipo individual	Morfotipos en competencia			
3	3	81	19	32
	10	10.1	14.1	18*
81	81	3	19	32
	17*	25.4*	4.5	0.9
32	32	81	3	19
	3.5	7.8	3.9	34.8*
19	19	81	3	32
	20*	18.5*	2.8	12.5

Las colonias seleccionadas presentaron niveles diferentes de producción de indoles. sembradas individualmente, la colonia 3 presentó valores mayores que las demás colonias, mientras que la colonia 19, presentó los menores valores de producción de

indoles totales. Esos valores fueron afectados diferencialmente por la competencia intra específica o inter-específica.

La producción de indoles totales fue mayor en bacterias después de crecer compitiendo con otras del mismo aislamiento (inóculo), comparado con la producción de indoles en colonias de las bacterias individuales. Por ejemplo las colonias 81 y 19 que crecieron en competencia intra-específica presentaron mayores valores de producción de indoles totales, siendo éste aumento significativo (Figura 5-1).

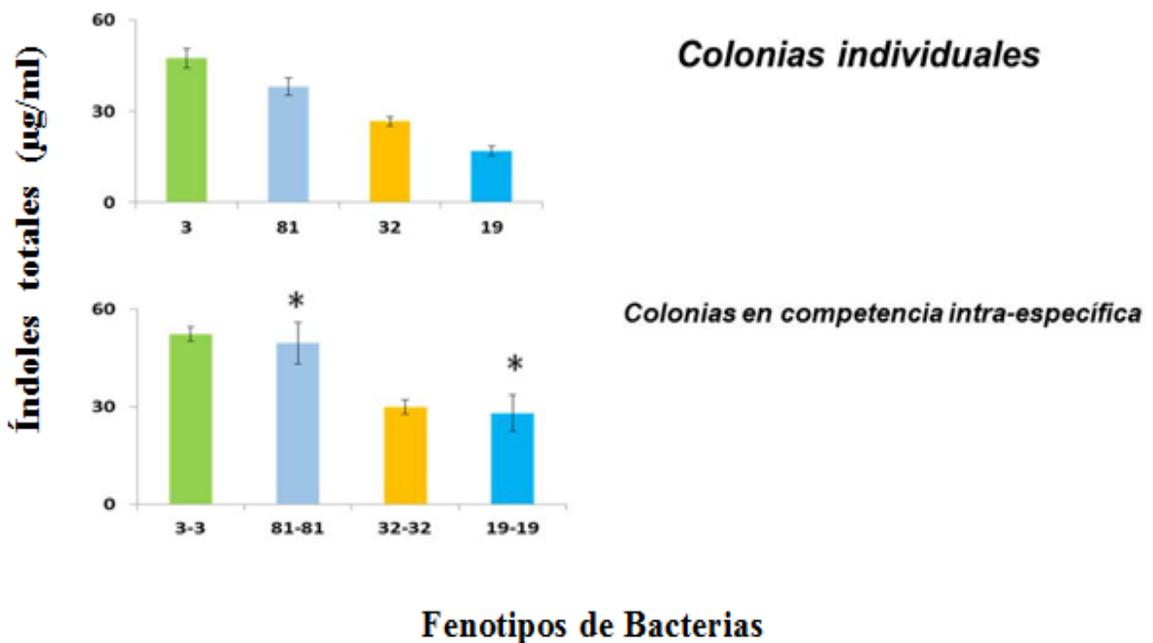


Figura 5-1: Producción de indoles totales, en cuatro morfotipos de colonias de bacterias sembradas individualmente o provenientes de competencias intra-específica. Los asteriscos indican diferencias significativas en los niveles de producción de indoles, comparado con los niveles de producción de indoles por colonias creciendo individualmente. Las líneas sobre las barras representan el error estándar.

Comparando la producción de indoles por las colonias bacterianas al crecer individualmente, con respecto a las colonias provenientes de la competencia inter-

específica, la bacteria 3 disminuyó significativamente su producción de indoles totales después de competir con las colonias de la bacteria 32. Al crecer individualmente las colonias de la bacteria 3 presentaron una producción de 47.32 $\mu\text{g/ml}$, comparado con un valor de 35.17 $\mu\text{g/ml}$ cuando provenía de la competencia inter-específica con colonias de la bacteria 32. Por otro lado se presentó un aumento significativo en la producción de indoles totales en las colonias de la bacteria 32 después de competir con las colonias de la bacteria 19.

También en la competencia interespecífica, se observó un aumento significativo en la producción de indoles totales por parte de las colonias de la bacterias 81 y 19 cuando fueron resultantes de la competencia con las colonias de la bacteria 3 y 81 respectivamente, al comparar su producción de indoles totales con los producidos cuando crecieron individualmente (Figura 5-2).

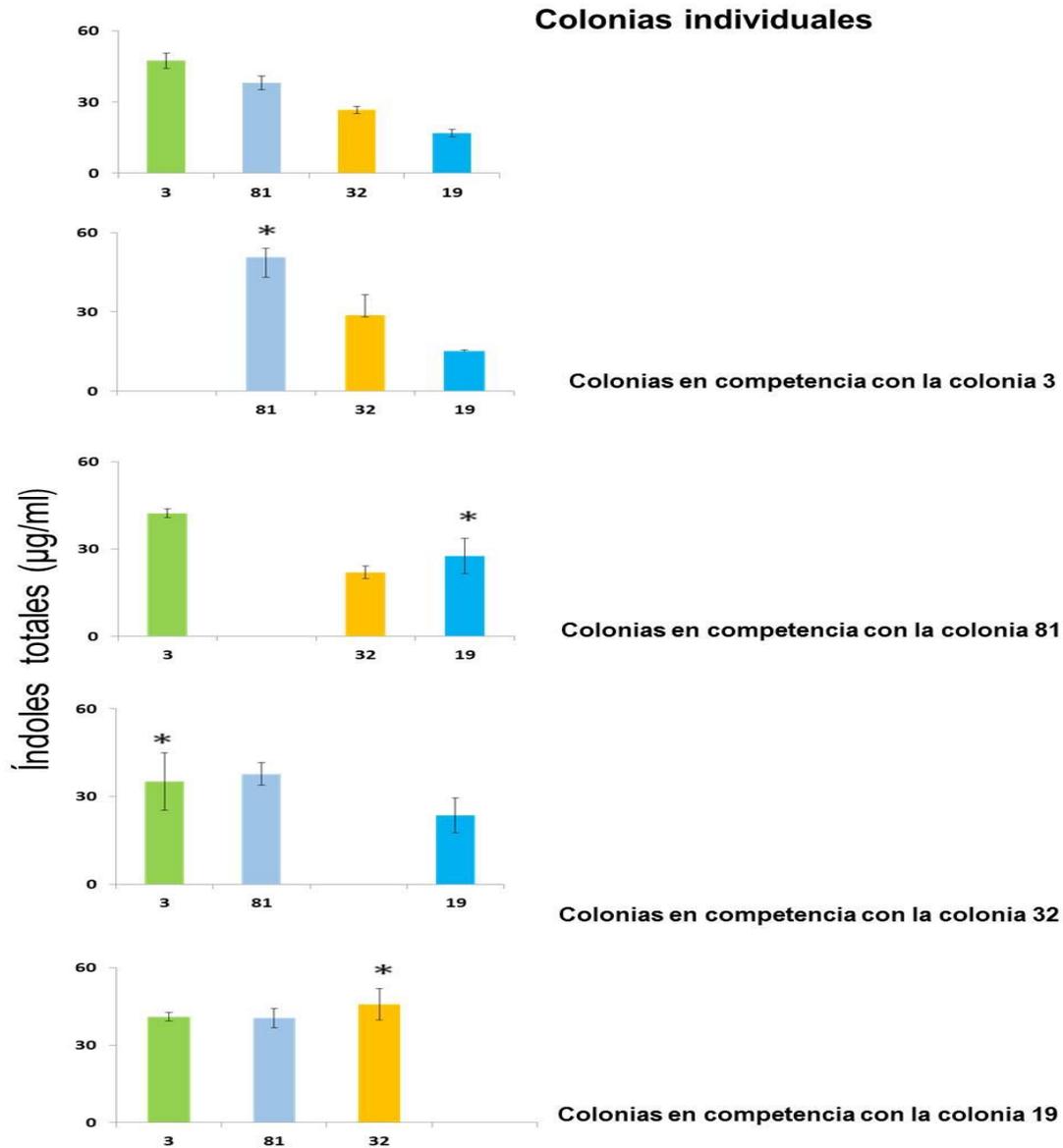


Figura 5-2: Producción de indoles totales, en cuatro morfotipos de colonias de bacterias sembradas individualmente o provenientes de competencias inter-específica. Los asteriscos indican diferencias significativas prueba de Dunn, en los niveles de producción de indoles, comparado con los niveles de producción de indoles por colonias creciendo individualmente. Las líneas sobre las barras representan el error estándar.

5.4 Fase 4: Cambios en la arquitectura de la raíz por efecto de la inoculación de colonias de bacterias sometidas a competencia intra-específica e inter-específica

La arquitectura de la raíz cambió como consecuencia de la inoculación de algunas colonias de bacterias sometidas a competencia. Cuando se inocularon en raíces colonias de bacterias que crecieron individualmente, no se presentaron diferencias significativas en valores de relación de diámetro (DR_1/DR_2), mientras que en raíces inoculadas con las colonias de la bacteria 32 después de competir con ella misma, representó un valor significativo (Tukey $P < 0.05$) (Figura 5-2).

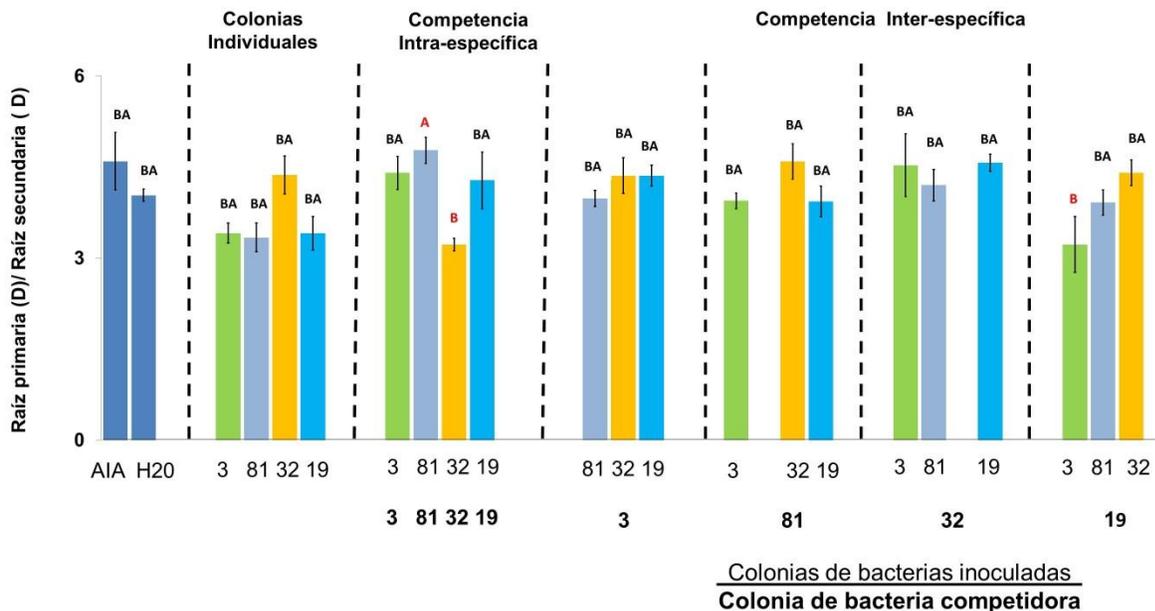


Figura 5-3: Cambios en el diámetro de raíces primarias y secundarias por efecto de la inoculación de colonias de bacterias que crecieron individualmente o provenientes de competencias intra-específicas e inter-específicas. Se representa las medias \pm error estándar de cada uno de los tratamientos, las medias seguidas por diferentes letras son significativamente diferentes usando la prueba de Tukey ($P < 0.05$)

A diferencia del diámetro, la longitud de raíces no fué afectada significativamente por la inoculación de las colonias crecidas individualmente o en competencia con otras colonias. Aunque en este caso se presentó mayor dispersión en los datos, comparado con la observada con los datos de diámetro de raíces (Figura 5-3).

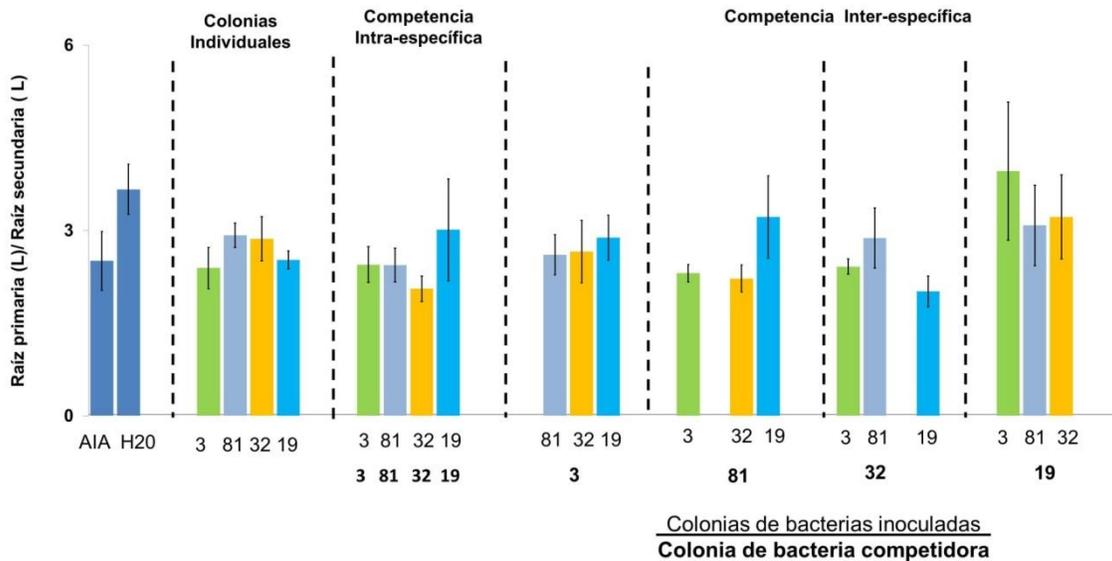


Figura 5-4: Cambios en la longitud de raíces primarias y secundarias inoculadas con colonias de bacterias que crecieron individualmente o provenientes de competencias intra-específicas e inter-específicas. Se representa las medias \pm error estándar de cada uno de los tratamientos. No se presentaron diferencias significativas ($p=0.05$) usando la prueba de Tukey.

La comparación de los valores de diámetro de raíz principal y raíz secundaria (DR_1/DR_2) y de longitud de raíz principal y raíz secundaria (LR_1/LR_2), en semillas de frijol por efecto de inóculos de bacterias individuales y provenientes de la competencia intra-específica e inter-específica (Prueba de Tukey), se encuentran referenciados en las tablas 9.5 y 9.6 del anexo 9

6. Discusión

Se aislaron diferentes morfotipos de raíz y de suelo rizosférico de plantas de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L) sembradas en tres tipos de suelos inceptisol, andisol y oxisol, éste aislamiento se realizó con el propósito de obtener diversidad de morfotipos de bacterias, en los diferentes órdenes del suelo comunes en Colombia (Tabla 2-1).

En éste trabajo se obtuvo mayor cantidad de bacterias de suelo rizosférico (Tabla 5-1), lo que concuerda con lo encontrado por Lynch, (1990), donde la concentración de bacterias por gramo de suelo rizosférico es mucho mayor que en el resto del suelo. La cantidad de microorganismos disminuye al aumentar la distancia a partir de la superficie de la raíz de las plantas y al aumentar la profundidad en el suelo (Paul y Clark, 1989), esto se debe a que en la rizósfera se producen diversos metabolitos orgánicos que se conocen como exudados, los cuales representan un nicho ecológico en el que se expresan diversas relaciones ecológicas entre plantas y microorganismos (González, 2005), éstos exudados dependen de la especie de las planta, la edad y las condiciones ambientales bajo las cuales crecen (Pinton *et al.*, 2001).

En cuanto al cultivo de microorganismos provenientes de raíz y de suelo rizosférico que se hizo en medios preparados con extracto de raíz (AER) y en un medio comercial como el agar nutritivo (AN), se encontró mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) en AER más que en AN, éste resultado pudo deberse a que las bacterias encontraron en el medio nutrientes similares a los de su hábitat natural, por lo que simular medios de cultivo es una forma de obtener un crecimiento más eficiente de los microorganismos (Freilich *et al.*, 2011).

En la caracterización de las bacterias, resultó positiva la prueba de fluorescencia en medio King-B para el morfotipo 32, posiblemente ésta bacteria sea *Pseudomonas fluorescens*. El

principio de ésta prueba explica que el empleo de este medio, promueve la elaboración de un pigmento de color amarillo verdoso conocido como pioverdina, que es soluble en agua, se difunde en el medio de cultivo y fluoresce cuando es expuesto a la luz ultravioleta (King *et al.*, 1978).

En la prueba cualitativa de indoles totales con el reactivo de Kovac's los cuatro morfotipos aislados de suelo rizosférico y de raíz, presentaron diferencias en la capacidad para producir este metabolito, se formó un anillo de color rojo intenso en el morfotipo 3 y menos intenso en el morfotipo 19 (los dos morfotipos aislados de la rizósfera). Según Salgado, (2006), la formación de un anillo de color rojo es indicio de la presencia de indoles, las cepas con mayor producción de indoles formarán un anillo de color más intenso en la superficie del caldo.

En éste trabajo se seleccionaron microorganismos teniendo en cuenta la producción de AIA y partiendo de bases teóricas de que las bacterias tienen rutas dependientes e independientes del TRP. Se logró una selección de bacterias empleando medios de cultivo suplementadas con éste aminoácido. Se ha reportado que la producción de índoles han sido ampliamente usadas como parámetros iniciales de selección de microorganismos con potencial biocontrolador o promotor de crecimiento vegetal (Soler, 2012)

En la tercera fase de este trabajo en la que se realizó las pruebas de competencia bacteriana, intra-específica e inter-específica entre colonias de rizobacterias, se demostró que la competencia afecta su funcionalidad, esos cambios se evidenciaron al comparar la producción de AIA en bacterias individuales y bacterias provenientes de las competencias (Figuras 5-1 y 5-2). Los cambios en la producción de esta hormona demostraron que las bacterias se comportan de manera diferente, mientras que en algunas competencias se potencializó la producción de indoles, en otras disminuyó su producción. Según Be'er *et al.*, (2009), Lawrence *et al.* (2012), mencionaron que el empleo de recursos por parte de los microorganismos en un monocultivo es diferente que cuando se encuentran en un policultivo, puesto que muchas veces las bacterias son capaces de aprovechar los

metabolitos resultantes de otras, esto se demostró por su mayor crecimiento en el medio utilizado previamente por otras especies y por el aumento de su uso de los productos de desecho de otras especies. También se han evaluado bajo la competencia intra-específica la producción de antibióticos, como es el caso *Paenibacillus dendritiformis* que produce un inhibidor que provoca la muerte de colonias individuales, mientras que cuando están solas no hay producción de éste inhibidor.

El morfotipo de la bacteria 19 cuando compitió con el morfotipo de la bacteria 81, (Competencia inter-específica), los niveles de la producción de AIA aumentaron significativamente (Prueba de Dunn), con respecto a la cantidad de AIA producida individualmente. Este cambio por la competencia inter-específica se puede explicar con base al principio de exclusión competitiva, Gause, (1932), establece que dos especies no pueden coexistir, cuando dos especies competidoras se encuentran en la naturaleza, el competidor inter-específico “fuerte” tiende a eliminar por competencia al competidor inter-específico “débil”, el realizó un experimento relacionado con la competencia entre dos especies de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces Kefir*, encontró que *S. Kefir* siempre triunfaba en su competencia con *S. cerevisiae* produciendo una concentración más alta de alcohol. Con relación a los resultados encontrados en éste trabajo se puede decir que la bacteria 19 tuvo que cambiar para aprovechar los recursos encontrados en el medio, por tanto correspondería al competidor fuerte frente al morfotipo 81, puesto que tuvo mayor capacidad de adaptación bajo éstas condiciones, en este caso se estaría evaluando la adaptabilidad de las bacterias es una forma indirecta, a través de la producción de AIA, sin embargo hubiera sido necesario determinar la población inicial de las dos bacterias participantes, ya que según Gause,(1932), afirma que una de las especies participantes de la competencia puede ser afectada su población por productos de desecho de la otra especie.

Comparando el efecto en el cambio funcional de la producción de AIA por la competencia, fue mayor en la competencia inter-específica, puesto que se presentaron cuatro resultados significativos, mientras que en la intra-específica solo se presentaron dos, Se podría esperar que las bacterias bajo la competencia intra-específica emplearan como principal recurso de energía al triptófano (TRP), más que cuando estaban creciendo

individualmente, dando como resultado bacterias más eficientes en producción de AIA que otras. Estos resultados no concuerdan con la teoría de Tilman, (1982), que afirma que la competencia entre la misma especie (competencia intra-específica) es más fuerte que cuando se enfrentan dos especies distintas, esto se debe a que los individuos de igual especie tienen las mismas necesidades y recursos

Por ejemplo, González, (2010), evalúa la competencia de dos especies de algas clorofíceas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* explica un modelo de coexistencia en la cual las dos especies están reguladas principalmente por competencia intraespecífica, ninguna especie puede alcanzar una densidad capaz de eliminar a la otra y por el contrario, cada especie inhibe su propio crecimiento poblacional.

En la cuarta fase del trabajo se evaluaron los cambios en la arquitectura de la raíz de semillas de frijol por acción de las bacterias provenientes de las competencias, encontrando cambios en algunos tratamientos. Se podría esperar que en aquellas competencias donde se generó mayor producción de AIA por parte de las bacterias promoviera más cambios en la arquitectura de la raíz y en aquellas donde la producción fue menor, los cambios de la arquitectura no fueron tan evidentes. Sin embargo en éste estudio no se presentaron estas características, puesto que algunos de los inóculos bacterianos provenientes de las competencias intra-específicas e inter-específicas que produjeron mayor cantidad de AIA no promovieron mayores cambios en la arquitectura de la raíz. Estos resultados son similares a los obtenidos por Rodríguez y Hernández, (2009) donde evaluaron la capacidad de promoción de germinación en semillas de uchuva (*Physalis peruviana* L), con éste ensayo lograron determinar que entre las cepas evaluadas, una de ellas presentó mayor producción de AIA, pero no presentó Índice de germinación relativos (GCR) altos y cuando emplearon otra cepa bacteriana que no era la mejor productora de AIA, las semillas presentaron los mejores GCR.

La principal limitación de estudiar la arquitectura de la raíz es la dificultad que existe en la observación, cuantificación e interpretación de la misma, es por eso que los estudios a veces se remiten más al estudio de los rasgos bacterianos de las PGPR, que a la

respuesta de la planta huésped (López *et al.*, 2009). Por esta razón en éste estudio se empleó una herramienta de análisis de imágenes, que permitió medir el diámetro y la longitud de las raíces para evidenciar los cambios que presentaron en la arquitectura de la raíz de frijol por acción de las bacterias provenientes de las competencias. Éste software fue empleado por Jiménez *et al.*(2013), para realizar mediciones de longitud y diámetro en vid silvestre (*Vitis* spp.), cultivadas *in vitro* con tres auxinas diferentes.

En la medición del diámetro y la longitud en las raíces de frijol se presentó al menos un valor significativo en el cambio del diámetro pero no en la longitud de la raíz siendo contrario a lo esperado, puesto que en la literatura se refiere que el AIA es una auxina que favorece la elongación de las de raíces (Lara *et al.*, 2011; López *et al.*, 2007). Una razón que puede explicar éste resultado es que la concentración de AIA no fue la apropiada para generar dichos cambios. Según Patten y Glick, (2002), afirman que el AIA es una hormona reconocida como un factor importante como promotor de crecimiento vegetal, cuando se aplican concentraciones comprendidas entre 10^{-12} y 10^{-9} M se presenta alargamiento de la raíz, mientras que frente a concentraciones muy altas se presenta un efecto deletéreo.

En éste trabajo, los cambios en la arquitectura ocasionados por las bacterias provenientes de varios tratamientos desarrollados en éste modelo experimental coincidieron con el control empleado en el ensayo, que fue el adicionar AIA sintético (alfa aesar, 98.7%. $C_{10}H_9NO_2$), con esto se podría decir que en un futuro se podría remplazar auxinas sintéticas por bacterias modificadas en forma natural bajo competencia, siendo una base fiable para la selección de PGPR eficaces, sobre todo si éste enfoque se utiliza en combinación con la detección de otras fitohormonas. Según Castillo *et al.*,(2005), en la actualidad se emplean auxinas obtenidas por síntesis química, pero el empleo de éstas sustancias por síntesis microbiológica resulta de gran importancia ya que la aplicación de caldos de fermentación que contienen auxinas, puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica.

Anteriormente se determinó en otras investigaciones el efecto de la adición externa de AIA en raíces (Mancuso *et al.*, 2005) o de la inoculación de microorganismos productores de índoles (Dobbelaere *et al.*, 1999). Igualmente se demostró la capacidad de rizobacterias productoras de índoles para proteger plantas contra patógenos (Soler, 2012).

No se conocen estudios acerca de la acción de inóculos bacterianos aplicados a plantas provenientes de competencias, pero se han reportado trabajos relacionados con cambios generados en las plantas con la participación de PGPR ancestrales. Babalola *et al.* (2007). reportan la acción de inóculos bacterianos en diferentes partes de la planta, realizaron una evaluación de aislamientos bacterianos como *Pseudomonas* sp., *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter sakazakii* con el objetivo de visualizar cambios en la germinación de *Striga hermonthica*. En otro estudio, Ryu *et al.*, (2005), analizaron los cambios en peso fresco foliar y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* al inocular ocho cepas de PGPR, y encontraron respuestas diferentes bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, atribuyendo éstas respuestas a la presencia de elicitores como brasinoesteroides de AIA, ácido salicílico y giberelinas. También se han empleado bacterias modificadas genéticamente capaces de generar cambios en las plantas. Barbieri *et al* (1986), inocularon dos tipos de cepas de *A. brasilense* a plantas de trigo (*Triticum aestivum*), una productora de AIA y una mutante con ausencia de ésta hormona, la primera incrementó el número y la longitud de raíces laterales mientras que la cepa mutante no afectó el desarrollo de la raíz.

Compant *et al.* (2005) afirma que adicionar bacterias como las PGPR en condiciones naturales no ha sido muy satisfactorio porque las bacterias compiten por sustratos o espacio con microorganismos de las rizósfera. Conocer más sobre las interacciones de los microorganismos es importante puesto que permitiría emplear en un futuro inoculantes con un potencial en la producción de AIA o el mejoramiento de otras funciones de las rizobacterias, modificadas bajo el efecto de la competencia.

Los cambios del diámetro y longitud está relacionado con el cambio que tuvieron las bacterias bajo el efecto de la competencia donde esas bacterias modificadas afectaron los parámetros medidos. Esto demostró que no necesariamente el crecimiento de las plantas

dependía del AIA. Según López (2009) no solamente las auxinas están relacionadas con el crecimiento de las raíces, reportó que *Bacillus megaterium* altera la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, lo cual lo atribuyen a un mecanismo como los factores NOD, estos son moléculas de señalización entre bacterias y las plantas huésped como el que se da entre leguminosa-*Rhizobium*. También se ha probado el efecto de los factores NOD de *Bradyrhizobium japonicum* en la longitud de las raíces en plantas como maíz (*Zea maíz*) y soya. (*Glycine max*) (Souleimanov., et al 2002)

Desde hace mucho tiempo en la teoría de Lamarck se hablaba de las modificaciones por efecto externo, donde se cambia una propiedad pero sin afectar la herencia, estas eran adaptaciones de los seres vivos en el transcurso del tiempo (Almeida y Falcao., 2005). En la actualidad la ciencia encargada del estudio de esos cambios es la epigenética, ésta ciencia se ocupa de las modificaciones como fosforilación, acetilación y metilación en la estructura afectando directamente las propiedades físicas de la cromatina influenciando la expresión de los genes (Jenuwein y Allis, 2001). Podría decirse que las bacterias bajo el efecto externo de la competencia cambiaron, es decir en ningún momento dejo de expresarse la función de la producción de AIA pero si se presentaron cambios en la estructura de la cromatina del ADN, posiblemente por los procesos que se dan en el ADN como lo es la metilación hace que algunos genes se expresen y otros no, como un apagado y encendido (Goldberg., et al 2007)

Según Hatzinger y Alexander, (1994), afirman que en condiciones naturales, la competencia por los exudados entre los microorganismos es intensa, si una determinada población bacteriana es alta, las bacterias estarán presentes en un mayor número de raíces vecinas y tendrán mayor disponibilidad de exudados que aquéllas con baja densidad. Esto es lo que se trató de simular en éste trabajo, un medio donde las bacterias sometidas bajo el efecto de la competencia sean capaces de generar cambios en una función, los cambios observados en condiciones *in vitro* es un leve acercamiento de lo que en realidad puede estar pasando. Queda en un futuro estudiar más a fondo las relaciones ecológicas y los factores que pueden desarrollar las bacterias, por que puede ser que esos cambios que se dieron en la arquitectura de la raíz no únicamente se deba a la

producción de auxinas sino a las modificaciones que sufrieron las bacterias bajo el efecto de la competencia y que en el momento de actuar en la semilla se vieron evidenciadas.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

- La competencia, intra-específica e inter-específica generó cambios funcionales en colonias de bacterias, como se evidencia al detectar cambios en la concentración de AIA producido por ellas y por los cambios detectados en la arquitectura de raíces cuando fueron inoculadas sobre semillas de frijol recién germinadas.
- Se presentaron cambios en la arquitectura de las raíces de frijol, al ser inoculadas con las colonias de bacterias provenientes de las competencias intra-específica e inter-específica, presentándose cambios significativos en el diámetro pero no en la longitud.
- En éste trabajo para cada fenotipo, se definieron varios aspectos que según revisión bibliográfica caracterizan a una especie tales como la producción de AIA, un nicho de crecimiento (raíz y suelo rizosférico). Posiblemente con el empleo de herramientas genéticas hubiese sido posible confirmar puntualmente cada una de ellas.

7.2 Recomendaciones

- Es recomendable complementar este estudio con técnicas de identificación molecular, las cuales permitan conocer en detalle la historia evolutiva y el comportamiento de estos microorganismos en ambientes naturales.
- A futuro sería conveniente aplicar éste tipo de metodología a escalas mayores, diseñando protocolos y modelos de producción en bioreactores, pero antes es conveniente estudios que permitan rastrear estos microorganismos en condiciones naturales.
- Es recomendable realizar análisis fisicoquímico de los suelos empleados en el ensayo puesto que esto permitiría explicar lo relacionado con la biodiversidad, como también la producción de AIA por parte de los microorganismos.
- Realizar pruebas de confirmación de la producción de AIA de las bacterias tanto individuales como aquellas sometidas a competencia, a través cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) por ser una prueba más específica para AIA.
- Profundizar estudios en principios naturales de ecología y evolución para seleccionar y producir microorganismos eficientes para el biocontrol de patógenos y producción de hormonas para el crecimiento de las plantas, que replacen técnicas moleculares y genéticas basadas en la manipulación de su ADN de microorganismos, que muchas veces son bioinsumos no pagables por los agricultores, puesto que se requiere inversiones considerables de tiempo y dinero en condiciones completamente artificiales.

8. Bibliografía

- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk Journal Biology* 29: 29-34.
- Almeida, A., y Falcão, J. (2005). Darwin and Lamarck research programs historic-conceptual structure and its conversion to the school environment. *Ciência & Educação (Bauru)* 11(1): 17-32.
- Azcon Bieto, J., y Talón, M. (1993). *Fisiología y Bioquímica General*. Madrid: Editorial. Interamericana Mc Graw Hill pp. 581.
- Babalola, O., Berner, D., y Amusa, N. (2007). Evaluation of some bacterial isolates as germination stimulants of *Striga hermonthica*. *African Journal of Agricultural Research* 2(1) :27-30.
- Bailey, J. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252:1668-1675.
- Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E., y Zanetti, G. (1986). Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *Federation of European Microbiological societies* 36:87-90.
- Bashan, Y., y De- Bashan, L.E. (2005). Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1795-1804.
- Bashan, Y., y Holguin, G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal Microbiology* 43(2): 103-121.
- Be'er, A., Zhang, H., Florin, E., Payne, S., Ben-Jacob, E., y Swinney, H. (2009). "Deadly competition between sibling bacterial colonies." *Proceedings of the National Academy of Science* 106(2):428-433.
- Be'er, A., Ariel, G., Kalisman, O., Helman, Y., Sirota-Madi, A., Zhang, H., y Swinney, H. L. (2010). Lethal protein produced in response to competition between sibling bacterial colonies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(14): 6258-6263.
- Ben-Jacob, E., Cohen, I. Golding, I. Gutnick, D., Tcherpakov, M., Helbing, D., y Ron, I. G. (2000). Bacterial cooperative organization under antibiotic stress. *Physica A* 282:247-282.
- Begon, M., Townsend, C., Harper, J. (2006). *Ecology, From Individuals to Ecosystems*. Fourth Edition. WileyBlackwell, Oxford. pp.1172.

- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P., y Parotto S. (2001). Mucoïd mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14:255-260.
- Brönmark, C., y Hansson, L. (2005). *The Biology of Lakes and Ponds*. Oxford, New York University Press. pp.109.
- Caballero, J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana Microbiología* 48(2):154-161.
- Castillo, G., Altuna, B. Michelena, G. Sánchez-Bravo, J y Acosta, M. (2005). "Cuantificación del contenido de Ácido Indol acético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana". *Anales de Biología* 27:137-142.
- Celiker, H., y Gore, J. (2012) Competition between species can public-goods cooperation within a species. *Molecular Systems Biology*. Cambridge.Usa 8:621.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., y Barka, E.A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9):4951-4959.
- Dodds, W. K. (2002). *Freshwater Ecology. Concepts and Environmental Applications*. Academic Press. pp.489.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande, B., y Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and soil*. 212:153-162.
- Ehteshami., SM R. Aghaalikhani, M., Khavazi, K., y Chaichi, MR. (2007). Effect of phosphate solubilizing microorganisms on quantitative and qualitative characteristics of maize (*Zea mays* L) under water deficit stress. *Journal of Biological Sciences* 10(20):3585-3591.
- Echenique, V., Rubinstein, C y Mroginski, L. (Eds.). (2004). *Bioteconología y mejoramiento vegetal II*. pp.258.
- El-Saeid H.M., Abou-Hussein S.D., y El-Tohamy W.A. (2010). Growth characters, yield and endogenous hormones of cowpea plants in response to IAA application. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 6(1):27-31.
- Ferrera, R. (1993). *Manual de Agromicrobiología*. México. Ed. Trillas. pp 11-51.
- Finkelstein, R.R. (2010). The role of hormones during seed development and germination. *Plant Hormones* pp 513-537.

- Folguera, G., y Marcos, A. (2013). El concepto de especie y los cambios teóricos en biología. *Ludus Vitalis*, 21(39):1-25.
- Fordyce, James A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology* 209(12):2377-2383.
- Foster, K., y Bell, T. (2012). Competition, not cooperation dominates interactions among culturable microbial species. *Current Biology* 22(19):1845-1850.
- Frankenberger, W.T., y Arshad, M. (1995). "Biochemistry of auxin metabolism by microorganisms". In: *Phytohormones in soils*. New York: Editorial. Marcel Dekker. pp. 86-97.
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E. S., Henry, C., S. Kupiec, M., y Ruppín, E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature communications* 2:1-7.
- Gause, G. F. (1932) Experimental Studies on the Struggle for Existence: I. Mixed Population of Two Species of Yeast *Experimental Biology* 9:389-402.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., y Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128(4), 635-638.
- González, M (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *TERRA Latinoamericana* 23(1):29-37.
- Gonzales, L. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Gordon, S., y Weber, R. (1950). Colorimetric estimation of indol acetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195.
- Graeber, K., Nakabayashi, K. Miatton, E. Leubner-Metzger, G y Soppe, W. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell and Environment* 35(10):1769-1786.
- Han, H.S., y Lee, K.D. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of Lettuce under soil salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(3):210-215.
- Hasan, C., y Gore, J (2012). Competition between species can stabilize public-goods cooperation within a species. *Molecular Systems Biology* 8 :1-9.
- Hasnain, S., y Sabri, A. N. (1997). Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonad strains. *Environmental pollution* 97(3):265-273.

- Hatzinger, P. B., y Alexander, M. (1995). Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental science and technology* 29(2): 537-545.
- Havlicek, E. (2012). Soil biodiversity and bioindication: from complex thinking to simple acting. *European Journal of Soil Biology* 49: 80-84.
- Hawes, M.C., Bengough, G. Cassab, G y Ponce, G. (2003). Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* 21(4):352-367.
- Hibbing, M., Clay, F. Matthew, R y Brook, P. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* 8(1):15-25.
- Holguín, G., y Glick, B.R. (2003). Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the Tetr gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microbial Ecology* 46(1):122-133.
- Hooley, R.(1994). Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Molecular Biology* 26(5): 1529-1555.
- Hoyos, L. (2012). "Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal". En: enfermedades de plants. Bogotá, D.C: Ecoe .pp :97-117.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (IGAC). (2003). Mapa suelos de Colombia. Escala 1:500 000. Memoria explicativa. [En CD-ROM]. IGAC. Bogotá.
- Jaeger, C., Lindow, S. Miller, W. Clark, E y Firestone, K. (1999). Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Applied Environmental. Microbiology* 65(6):2685-2690.
- Jaramillo Jaramillo, Daniel Francisco. (2002) Introducción a las Ciencias del Suelo, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Medellín - Colombia, pp 619.
- Jenuwein, T., y Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293(5532), 1074-1080.
- Jiménez, J., Gutiérrez, M., Franco, O., González, A., y Gutiérrez, A. (2013). Micropropagación de vides silvestres (*Vitis* spp.) *Revista Internacional de Botánica experimental* 82:107-112.
- Joseph, B., Ranjan, R., y Lawrence, R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant Production* 2:141-151.
- Kamilova, F., Kravchenko, LV., Shaposhnikov, AI., Makarova, N., y Lugtenberg, BJJ. (2006). Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19(10):1121-26.

- Khalid, A., Arshad, M., y Zahir, Z. (2003). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96(3):473-480.
- King, A., y Phillips I. (1978) The identification of *Pseudomonas* and related bacteria in a clinical Laboratory. *Journal of Medical Microbiology* 11(2):165-176.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., y Schroth, M.N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286(5776):885-886.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., y Zablutowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7(2): 39-44.
- Kremer, R.J., y Kennedy AC. (1996). Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds. *Weed Technology* 10(3):601-609.
- Koneman, A., y Dowell, S. (2008) Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas color. México: sexta edición Panamericana S.A pp 1691.
- Lemanceau, P., y Alabouvette C. (1993). Suppression of Fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol Science and Technology* 3(3): 219-34.
- Lara, C., Oviedo, L., y Betancur, C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de Ácido Indol Acético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical* 29(2):184-194.
- Last, R. L., Bissinger, P. H., Mahoney, D. J., Radwanski, E. R., y Fink, G. R. (1991). Tryptophan mutants in Arabidopsis: the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. *Plant Cell* 3(4):345-358.
- Lawrence, D., Fiegna, F. Behrends, F. Volker, B. Jacob, G. Phillimore A. Bell, T y Barraclough, T. (2012). Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. *PLoS Biology* 10(5):1-11.
- Lobet, G., Pagés, L y Draye, X. (2011). A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiology* 157(1):29-39.
- López, J., Campos, J. Velásquez, C. Farías, R. Macías, L y Valencia, E. (2007). Alteración de la arquitectura y la división celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana* por *Bacillus megaterium*. *Ciencia Nicolaita* 46:79-88.
- López, J., Campos, J., Campos, J., C. Farías, Valencia, E., Velásquez, C., Farias, R., y Macías, I. (2009). *Bacillus megaterium* modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* independientemente de auxinas y etileno. *Biológicas* 11: 1-8.
- Lugtenberg, B., y Kamilova F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Annual Review of Microbiology* 63:541-556.

- Lynch, J.M. (1990). The rhizosphere. A Willey–Interscience Publication, John Wiley y Sons Ltd. Baffins Lsne, Chichester England. pp 581.
- Mancuso, S.; Marras, A.; Magnus, V y Baluaka, F. (2005). Noninvasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon nanotube-modified and self-referencing microelectrode. *Analytical Biochemistry*. pp:344-351.
- Mantilla, M.E. (2007). Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum Morifolium* Var. Yoko ono) En Periodo de enraizamiento. Tesis. Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.
- Mayr, E. (1970) - Populations, Species, and Evolution. Cambridge: Harvard Univ. Press. pp 453.
- Morrissey, J. P., Dow, J.M., Mark, G.L., y O’Gara, F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production?. *European Molecular Biology Organization* 5(10):922-926.
- Nilsen ,E T., y Orcutt D M (1996) Physiology of plants under stress: abiotic factors. John Wiley and Sons, New York.
- Patten, C.I., y Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8):3795-3801.
- Paul, E. A., y Clark, F. (1989). Soil microbiology and biochemistry. Academic Press Inc. Londres. 275 p.
- Pinton, R., Varanini, Z y Nannipieri, P. (2001). The Rhizosphere Biochemistry and organic substances at the soil plant interface New York Marcel Dekker pp 427.
- Rasband, W.S.(2007). ImageJ, US. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>; consulta: July 2013.
- Rodríguez, C., y Hernández, M.(2009). Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L) con capacidad antagonica frente a *Fusarium* sp. Tesis. Universidad Javeriana Bogotá- Colombia.
- Rosselló-Mora, R., y Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *Federation of European Microbiological societies*. 25(1):39-67.
- Ryu, C. M., Hu, C. H., Locy, R. D., y Kloepper, J. W. (2005). Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 268(1) :285-292.
- Saharan, B., y Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 21:1-30.

- Salgado, M. (2006). Análisis de productos lácteos. En *Microbiología de alimentos*. (pp. 78-79). Manizales. Editorial Universidad de Caldas.
- Sneath, P.H.A., y Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman & Co., San Francisco, California. pp 1963.
- Soler, J. 2012. Selección y Evaluación de microorganismos promisorios Para el biocontrol del Patógeno *Spongospora subterranea*, causante de la sarna polvosa de la papa". Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Souleimanov, A., Prithviraj, B., y Smith, D. L. (2002). The major Nod factor of Bradyrhizobium japonicum promotes early growth of soybean and corn. *Journal of Experimental Botany*,53(376), 1929-1934.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. y Whitman, W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52(3) 1043–1047.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J y Roseline, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology* 31(4):425- 448.
- Subba Rao, N.S. (1999). Soil Microbiology. 4th ed., New Hampshire, USA: Science Publishers.inc Enfield. pp 407.
- Teale, W.D., Paponov, I., A.y Palme,K. (2006). Auxin in action: signaling transport and the control of plant and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:847-859.
- Thomashow, L. S., Bonsall, R. F., y Weller, D. M. (1997). Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, DC, 493-499.
- Tilman, D. (1982). Resource competition and community structure. Princeton University press, Princeton, New Jersey.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S y Singh, D. P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere* 21(2):214-222.
- Van Valen, L. (1976), "Ecological Species, Multispecies and Oaks". *Taxon* 25(2): 233- 239.
- Vázquez, M., César, S., Azcón, R., y Barea, J.M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*,*Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15:261-272.

- Wayne, L., Brenner, D., Colwell, R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., y Trüper, H.G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37(4):463-464.
- Waters, C., y Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: cell-to cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:319-346.
- Weller, D., Raaijmakers, J. M., Gardener, B.B.M., y Thomashow, L S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40(1): 309-348.
- Zakharova, E., Shcherbakov, A.A., Brudnik, V.V., Skripko, N.G., Bulkin, N. S., y Ignatov, V.V. (1999). Biosynthesis of indole- 3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: Insights from quantum chemistry. *European Journal of Biochemistry*. 259(3): 572–576.
- Zehnder, G., Murphy, J. Sikora, E y Kloepper, J. (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107(1):39-50.

Tabla 9-4: Concentración de AIA ($\mu\text{g/ml}$), determinado por la prueba de salkowsky, lectura a 530 nm, determinada en bacterias individuales, bacterias sometidas bajo competencia intraespecífica y bacterias sometidas a competencia interespecífica.

Bacterias individuales		
	Promedio	EE
3	47.32	3.17122479
81	38.07	2.93754433
32	26.67	1.51520076
19	16.82	1.61864141
Competencia Intraespecífica		
3-3	52.32	2.24870333
81-81	49.52	6.4007812
32-32	29.82	2.27303028
19-19	28.02	5.66450939
Competencia interespecífica		
Morfotipo de Bacteria 3		
81	50.77	3.29076992
32	28.67	7.76546843
19	14.97	0.62383224
Morfotipo de Bacteria 81		
3	42.27	1.53269914
32	21.97	2.17619699
19	27.52	6.08906123
Morfotipo de Bacteria 32		
3	35.17	9.7817432
81	37.67	3.87932554
19	23.57	5.90162407
Morfotipo de Bacteria 19		
3	40.97	1.60494029
81	40.42	3.71214224
32	45.77	6.10593973

Tabla 9-5: Comparación de los valores de diámetro de raíz principal y raíz secundaria (DR₁/DR₂) en semillas de frijol por efecto de inóculos de bacterias individuales y provenientes de la competencia intra-específica e inter-específica (Prueba de Tukey).

Tratamiento/ Bacteria Individual	Relación de diámetro (DR ₁ /DR ₂) Pixeles
3	3.4084±0.1653 ^{ba}
81	3.3383±0.2340 ^{ba}
32	4.3683±0.3095 ^{ba}
19	3.4046±0.2763 ^{ba}
Competencia Intraespecífica	
3-3	4.4013±0.2721 ^{ba}
81-81	4.7745±0.2154 ^a
32-32	3.2201±0.1027 ^b
19-19	4.2805±0.4645 ^{ba}
Competencia Interespecífica	
3-81	3.9818±0.1299 ^{ba}
3-32	4.3575±0.2915 ^{ba}
3-19	4.3550±0.1721 ^{ba}
81-3	3.9419±0.1300 ^{ba}
81-32	4.5917±0.2879 ^{ba}
81-19	3.9312±0.2519 ^{ba}
32-3	4.5278±0.5177 ^{ba}
32-81	4.2012±0.2590 ^{ba}
32-19	4.5720±0.1408 ^{ba}
19-3	3.2236±0.4610 ^b
19-81	3.9146±0.2067 ^{ba}
19-32	4.4045±0.2138 ^{ba}

Estos datos representan las medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos. Las medias seguidas por la mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) usando la prueba de Tukey.

Tabla 9-6: Comparación de los valores de longitud de raíz principal y raíz secundaria (LR_1/LR_2) en semillas de frijol por efecto de inóculos de bacterias individuales y provenientes de la competencia intra-específica e inter-específica.

Tratamiento/ Bacteria Individual	Relación de diámetro (LR_1/LR_2) Píxeles
3	2.1661±0.3050 ^{ba}
81	2.8408±0.2195 ^{ba}
32	2.5139±0.1057 ^{ba}
19	2.5292±0.1789 ^{ba}
Competencia Intraespecífica	
3-3	2.2906±0.2962 ^{ba}
81-81	2.2012±0.1645 ^{ba}
32-32	2.1338±0.2363 ^{ba}
19-19	2.2050±0.2275 ^{ba}
Competencia Interespecífica	
3-81	2.6061±0.3276 ^{ba}
3-32	2.6593±0.5072 ^{ba}
3-19	2.8845±0.3662 ^{ba}
81-3	2.3082±0.1413 ^{ba}
81-32	2.2221±0.2181 ^{ba}
81-19	3.2177±0.6654 ^{ba}
32-3	2.4146±0.1219 ^{ba}
32-81	2.8749±0.4862 ^{ba}
32-19	2.0134±0.2491 ^{ba}
19-3	3.9580±1.1185 ^{ba}
19-81	3.0808±0.6489 ^{ba}
19-32	3.2212±0.6800 ^{ba}

Estos datos representan las medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos. Las medias seguidas por la mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) usando la prueba de Tukey.

Tabla 9-8: Matriz de diferencias de los promedios de rangos de producción de indoles (valores en cursiva y negrilla) entre las colonias individuales y las sometidas a competencia intra-específica e inter-específica (Prueba de Dunn)

	3	19	32	81		3-3	19-19	32-3	81-81		3-19	19-3	3-81	81-3	19-81	81-19	3-32	32-3	19-32	32-19	32-81	81-32
3	0.0	-54.0	-37.0	-19.0		10.4	-34.1	-34.0	-1.6		-14.1	-57.0	-10.0	6.8	-35.6	-14.1	-18.0	-33.3	-41.6	-2.3	-44.9	-19.5
19	54.0	0.0	17.0	35.5		64.5	20.0	20.5	52.5		40.0	-2.8	44.0	60.9	18.5	40.0	36.1	20.9	12.5	51.9	9.3	34.6
32	37.1	-17.0	0.0	18.5		47.5	3.0	3.5	35.5		23.0	-20.0	27.0	43.9	1.5	23.0	19.1	3.9	-4.5	34.9	-7.8	17.6
81	18.6	-36.0	-19.0	0.0		29.0	-16.0	-15.0	17.0		4.5	-38.0	8.5	25.4	-17.0	4.5	0.6	-14.6	-23.0	16.4	-26.3	-0.9
3-3	-10.0	-65.0	-48.0	-29.0		0.0	-45.0	-44.0	-12.0		-25.0	-67.0	-21.0	-3.6	-46.0	-24.5	-28.0	-43.6	-52.0	-13.0	-55.0	-29.9
19-19	34.1	-20.0	-3.0	15.5		44.5	0.0	0.5	32.5		20.0	-23.0	24.0	40.9	-1.5	20.0	16.1	0.9	-7.5	31.9	-11.0	14.6
32-32	33.6	-21.0	+3.5	15.0		44.0	+0.5	0.0	32.0		19.5	+23.0	23.5	40.4	+2.0	19.5	15.6	0.4	+8.0	31.4	+11.0	14.1
81-81	1.6	-53.0	-36.0	-17.0		12.0	-33.0	-32.0	0.0		-13.0	-55.0	-8.5	8.4	-34.0	-12.5	-16.4	-31.6	-40.0	-0.6	-43.0	-17.9
3-19	14.1	-40.0	-23.0	-4.5		24.5	-20.0	-20.0	12.5		0.0	-43.0	4.0	20.9	-21.5	0.0	-3.9	-19.1	-27.5	11.9	-31.0	-5.4
19-3	56.9	2.8	19.8	38.3		67.3	22.8	23.3	55.3		42.8	0.0	46.8	63.6	21.3	42.8	38.9	23.6	15.3	54.6	12.0	37.4
3-81	10.1	-44.0	-27.0	-8.5		20.5	-24.0	-24.0	8.5		-4.0	-47.0	0.0	16.9	-25.5	-4.0	-7.9	-23.1	-31.5	7.9	-35.0	-9.4
81-3	-6.8	-61.0	-44.0	-25.0		3.6	-41.0	-40.0	-8.4		-21.0	-64.0	-17.0	0.0	-42.0	-20.9	-24.8	-40.0	-48.4	-9.0	-52.0	-26.3
19-81	35.6	-19.0	-1.5	17.0		46.0	1.5	2.0	34.0		21.5	-21.0	25.5	42.4	0.0	21.5	17.6	2.4	-6.0	33.4	-9.3	16.1
81-19	14.1	-40.0	-23.0	-4.5		24.5	-20.0	-20.0	12.5		0.0	-43.0	4.0	20.9	-22.0	0.0	-3.9	-19.1	-27.5	11.9	-31.0	-5.4
3-32	18.0	-36.0	-19.0	-0.6		28.4	-16.1	-16.0	16.4		3.9	-39.0	7.9	24.8	-18.0	3.9	0.0	-15.3	-23.6	15.8	-27.0	-15.0
32-3	33.3	-21.0	-3.9	14.6		43.6	-0.9	-0.4	31.6		19.1	-24.0	23.1	40.0	-2.4	19.1	15.3	0.0	-8.4	31.0	-12.0	13.8
19-32	41.6	-13.0	4.5	23.0		52.0	7.5	8.0	40.0		27.5	-15.0	31.5	48.4	6.0	27.5	23.6	8.4	0.0	39.4	-3.3	22.1
32-19	2.3	-52.0	-35.0	-16.0		12.6	-32.0	-31.0	0.6		-12.0	-55.0	-7.9	9.0	-33.0	-11.9	-15.8	-31.0	-39.4	0.0	-43.0	-17.3
32-81	44.9	-9.3	7.8	26.3		55.3	10.8	11.3	43.3		30.8	-12.0	34.8	51.6	9.3	30.8	26.9	11.6	3.3	42.6	0.0	25.4
81-32	19.5	-35.0	-18.0	0.9		29.9	-15.0	-14.0	17.9		5.4	-37.0	9.4	26.3	-16.0	5.4	1.5	-13.8	-22.1	17.3	-25.0	0.0

 Colonias individuales
  Competencia intra-específica
  Competencia inter-específica