



Efectos de las interacciones microorganismo-microorganismo como parte de una comunidad microbiana sintética (SynCom) en la promoción del crecimiento inducido por rizobacterias en plantas *Arabidopsis thaliana*

Antonia Schultz Hoffmann

2023



Efectos de las interacciones microorganismo-microorganismo como parte de una comunidad microbiana sintética (SynCom) en la promoción del crecimiento inducido por rizobacterias en plantas *Arabidopsis thaliana*

Antonia Schultz Hoffmann

Profesor guía: María Josefina Poupin

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERÍA CIVIL EN BIOINGENIERÍA Y AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA - BIOINGENIERÍA

2023

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los siguientes proyectos por el financiamiento que permitió la realización de esta tesis: FONDECYT 1190634, Center of Applied Ecology and Sustainability (CAPES; ANID PIA/BASAL FB0002) y Núcleo Milenio Para el Desarrollo de Plantas Super adaptables (NCN2021_010).

ÍNDICE

GLOSARIO Y ABREVIATURAS	1
RESUMEN 2	
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA U OPORTUNIDAD	4
INTRODUCCIÓN	7
i) Mecanismos de comunicación e interacciones entre microorganismos en la rizósfera.	7
ii) Interacciones entre microorganismos y hospedero.	9
iii) Comunidades microbianas sintéticas (SynCom).	11
iv) Bacterias Promotoras del Crecimiento (PGPB) y su relación con una comunidad microbiana sintética (SynCom) y un hospedero.	13
HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
Hipótesis alternativa	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
METODOLOGÍA	18
Objetivo A.	18
Selección, aislamiento y crecimiento de bacterias representativas.....	18
Identificación de bacterias representativas: Extracción y purificación de ADN, Amplificación gen 16S rDNA y Análisis filogenético.	19
Relación cantidad bacterias presentes en medio de cultivo ((CFU) con densidad óptica (OD)	20
Objetivo B. Ensayos de competencia.....	21
Evaluación del crecimiento de cepas co-cultivadas en medio sólido R2A.....	21
Evaluación del crecimiento de las cepas de la SynCom en contacto indirecto.	22
Evaluación del crecimiento de las cepas de la SynCom en contacto directo.	23
Análisis del crecimiento simultaneo entre cepas de la SynCom en medio líquido R2A.	23
Capacidades metabólicas de las cepas integrantes de la SynCom.	24
Objetivo C.....	26
Medio, Esterilización semillas y Condición crecimiento	26
Definición de la concentración de las cepas a inocular.	27
Recolección de exudados de la planta <i>A. thaliana</i>	28
Evaluación de la curva de crecimiento de las cepas en exudados.....	29

Análisis del efecto fenotípico en la planta modelo <i>A. thaliana</i> de las interacciones entre dos cepas.....	30
Análisis del efecto fenotípico de la SynCom en la planta modelo <i>A. thaliana</i>	31
RESULTADOS	32
Objetivo A.	32
Aislamiento y crecimiento de bacterias representativas.....	32
Selección de medio óptimo de crecimiento bacteriano.	33
Relación cantidad bacterias presentes en medio de cultivo (CFU) con densidad óptica (OD)	34
Objetivo B.....	35
Evaluación del crecimiento de cepas co-cultivadas en medio sólido.	35
Evaluación del crecimiento de las cepas de la SynCom en contacto indirecto.	38
Evaluación del crecimiento de cepas en contacto directo.	40
Análisis del crecimiento simultaneo entre cepas de la SynCom en medio líquido R2A.	42
Capacidades metabólicas de las cepas miembros de la SynCom.	45
Objetivo C.....	46
Definición de la concentración de las cepas integrantes de la SynCom a inocular en la planta <i>A. thaliana</i>	46
Recolección de los exudados radiculares de la planta <i>A. thaliana</i>	53
Evaluación de la curva de crecimiento de las cepas en exudados.....	55
Análisis del efecto fenotípico en la planta modelo <i>A. thaliana</i> de la interacción entre dos cepas.	57
Análisis del efecto fenotípico de la SynCom en la planta modelo <i>A. thaliana</i>	61
DISCUSIÓN	
Efectos de una SynCom en plantas en comparación con el uso de cepas únicas.	62
Efectos e influencia de las interacciones entre microorganismos: ¿mutualismo o competencia?.....	64
Efectos de los microorganismos en el crecimiento y protección de las plantas: producción de fitohormonas, solubilización de fosfato/hierro y características sobre cepas.	66
CONCLUSIONES	69
PROYECCIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS 94	

ÍNDICE FIGURAS

- Figura 1.** Placa con medio sólido R2A y el crecimiento *zigzag* por el método de asa de las cepas *F. endophyticum* 522, *P. phytofirmans* PsJN, *A. brasilense* SP7, *P. putida* KT2440 y *V. paradoxus* B4.....19
- Figura 2.** **Curva estándar.** De izquierda a derecha se presencia los tubos de mayor concentración a menor concentración. Se evidencia los distintos cambios de color, siendo el color más intenso (naranja) indicador de producción de auxina.....25
- Figura 3.** **Ensayo Agar más Bacteria.** (A) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% más la cepa *N. plantarum* Grainger J70 con presencia de halo inhibitorio de *P. putida* KT2440. (B) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% más la bacteria *V. paradoxus* B4 con presencia de halo inhibitorio de *P. putida* KT2440.36
- Figura 4.** **Ensayo Agar más Bacteria.** (A) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% con la bacteria *F. endophyticum* 522. Todas las cepas crecieron normal. (B) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% con la bacteria *P. phytofirmans* PsJN. Todas las cepas crecieron normal. (C) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% y la bacteria *P. putida* KT2440. Estrellas rojas significa nulo crecimiento de cepas inoculadas *P. phytofirmans* PsJN y *V. paradoxus* B4. Estrellas naranjas significa débil crecimiento de cepa inoculada *F. endophyticum* 522. (D) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% y la bacteria *A. brasilense* SP7. Cepas *P. phytofirmans* PsJN y *F. endophyticum* 522 no lograron crecer.37
- Figura 5.** **Ensayo Gotas Adyacentes.** (A) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de 8 ul *P. putida* KT2440 junto a gotas de cepas restantes. Se presencia inhibición de crecimiento en las cuatro cepas. (B) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de de 8 ul *F. endophyticum* 522 junto a gotas de las otras cepas. Presencia leve inhibición de cepa *V. paradoxus* B4. (C) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de 8 ul *N. Plantarum* Grainger J70 junto a gotas de las otras cepas. Se presencia leve inhibición con cepa de cepa *P. putida* KT2440. (D) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de 8 ul *A. brasilense* SP7 junto a gotas de las otras cepas. Se presencia leve inhibición de cepa *V. paradoxus* B4.39
- Figura 6.** **Ensayo Rayas Cruzadas.** (A) Placa con trazo vertical de *P. putida* KT2440. Círculo rojo intermitente representa notoria inhibición hacia cepa *V. paradoxus* B4 y *F. endophyticum* 522. Círculo amarillo representa leve inhibición hacia *P. phytofirmans* PsJN. (B) Placa con trazo vertical de *P. phytofirmans* PsJN. Círculo rojo notoria inhibición hacia *V. paradoxus* B4. (C) Placa con trazo vertical de *F. endophyticum* 522. Círculo rojo notoria inhibición hacia *V. paradoxus* B4.41
- Figura 7.** **Ensayo Mezclas.** (A) Placa de mezcla entre *P. putida* KT2440 y *F. endophyticum* 522. (B) Placa de parejas *P. phytofirmans* PsJN y *P. putida* KT2440. (C)

Placa con combinación de *A. brasilense* SP7 y *P. putida* KT2440. (D) Placa de mezcla entre *V. paradoxus* B4 y *P. putida* KT2440. (E) Placa combinatoria *P. putida* KT2440 y *N. plantarum* J70. Figura demuestra diferencias de fenotipos de colonias de las diferentes cepas. 44

Figura 8. Solubilizaciones. (A) Solubilización de fósforo. Círculos intermitentes verdes presencia de solubilización de fósforo en las cepas *P. phytofirmans* PsJN y *A. brasilense* SP7. (B) Solubilización de hierro. Círculos intermitentes verdes presencia de solubilización de hierro en cepa *P. putida* KT2440.45

Figura 9. Producción auxina. (A) Tubos de ensayo con las cinco cepas crecidas en medio líquido R2A. Visualmente no existe cambio de coloración. (B) Tubos de ensayo con las cinco cepas más la adición de triptófano. Visualmente queda evidenciado que las cepas *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7 producen auxina. En (A) y (B) de izquierda a derecha: *F. endophyticum* 522, *V. paradoxus* B4, *P. phytofirmans* PsJN, *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7.46

Figura 10. Ensayo concentración bacteria *F. endophyticum* 522. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *F. endophyticum* 522 a concentraciones 104,106y107CFUml. (A) Control, (B) 104CFUml, (C)106CFUml y (D) 107CFUml.48

Figura 11. Ensayo concentración bacteria *P. putida* KT2440. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. Grupo control es significativo en comparación con los distintos grupos de concentraciones. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *P. putida* KT2440 a concentraciones 104,105y 106CFUml. (A) Control; (B) 104CFUml ; (C) 105CFUml; (D) 106CFUml.49

Figura 12. Ensayo concentración bacteria *P. phytofirmans* PsJN. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Concentración 108 es significativo en comparación con otras concentraciones. Resultados visuales y estadísticos de planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *P. phytofirmans* PsJN a concentraciones 104,106y 108CFUml. (A) Control; (B) 104CFUml ; (C) 106CFUml; (D)108CFUml.50

Figura 13. Ensayo concentración bacteria *A. brasilense* SP7. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. Concentración 106 y 107 son significativos en comparación con grupo control y concentración 104. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Concentración 106 y 107 son significativos en comparación con grupo control y concentración 104. Resultados visuales y estadísticos de planta *A.*

thaliana inoculada en medio MS/2 con bacteria *A. brasilense* SP7 a concentraciones 104,106y 107CFUml. (A) Control; (B) 104CFUml ; (C) 106CFUml ; (D) 107CFUml.51

Figura 14. Ensayo concentración bacteria *V. paradoxus* B4. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz, existe significancia en concentración 108 con respecto a las otras concentraciones. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de la planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *V. paradoxus* B4 a concentraciones 104,106y 108CFUml. (A) Control; (B)104CFUml ; (C) 106CFUml ; (D) 108CFUml.52

Figura 15. Ensayo concentración bacteria *N. plantarum* J70. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. Concentración 105 y 106 son significativos en comparación con grupo control y 104. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de la planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *N. plantarum* J70 a concentraciones 104,105y 106CFUml. (A) Control; (B)104CFUml ; (C) 105CFUml ; (D) 106CFUml.53

Figura 16. Ensayo Recolección Exudados. (A) Ensayo recolección exudados en hidropónico. Visualización de arriba del andamio después de 14 días de germinación. (B) Ensayo recolección exudados en agar. Visualización después de 14 días de germinación.54

Figura 17. Curvas de Crecimiento en Exudados. (A) Gráfico de cepa *V. paradoxus* B4 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. (B) Gráfico de cepa *F. endophyticum* 522 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. (C) Gráfico de *N. plantarum* J70 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 152 hrs de crecimiento. (D) Gráfico de cepa *P. putida* KT2440 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. En las horas 40, 48, 56 existe significancia en el tratamiento exudado + *P. putida* KT2440 con respecto a los otros tratamientos. A partir de la hora 64 hay significancia entre todos los tratamientos. (E) Gráfico de cepa *A. brasilense* SP7 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. En las horas 16, 24 y 32 existe significancia del grupo Exudado + *A. brasilense* SP7 con respecto a los otros tratamientos. En las horas 40, 48, 56 y 64 existe significancia entre todos los tratamientos. (F) Gráfico de cepa *P. phytofirmans* PsJN con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. En las horas 40, 48, 56 y 64 existe significancia entre todos los tratamientos.....57

Figura 18. Gráficos porcentuales relativo al grupo control de los resultados del largo de raíz, área de roseta y área de raíz de los distintos grupos. (A) Gráfico de los resultados

del largo de raíz de los distintos tratamientos de cepas aisladas y en parejas. Los datos fueron transformados a logaritmo. Se obtuvo significancia en comparación con el grupo control en todos los grupos, menos *V. paradoxus* B4 y *F. endophyticum* 522. Los grupos *P. phytofirmans* PsJN aislada y en *P. putida* KT2440 + *P. phytofirmans* PsJN son iguales significativamente. (B) Gráfico de los resultados del área de roseta de las cepas aisladas y las distintas parejas. La distribución fue transformada a logarítmica. Se obtuvo significancia en comparación con el grupo control en *F. endophyticum* 522 aislada. Tanto, los grupos *A. brasilense* SP7 + *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7 como *P. phytofirmans* PsJN + *P. putida* KT2440 y *P. phytofirmans* PsJN aislada, no son significativos entre sí. (C) Gráfico de los resultados del área de raíz de las cepas aisladas y las distintas parejas. La distribución fue transformada a logarítmica.60

Figura 19. Gráficos del largo de raíz (A) y área de roseta (B) porcentuales relativos al control del ensayo de SynCom y *A. thaliana*. (A) La cepa PsJN fue la única en mantener el largo de raíz. Los tratamientos restantes disminuyeron este parámetro. (B) Todos los tratamientos lograron aumentar el área de la roseta, siendo todos significativamente diferentes al control, excepto el tratamiento de B4, Sp7, 522, J70 + PsJN (denominado en el gráfico como 4 + PsJN).62

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Ilustración representativa de placa ELISA de 96 pocillos con los distintos tratamientos y las distintas cepas. Para ensayo hidropónico se usó MS/2 con sacarosa, para ensayo en agar se usó MS/2 sin sacarosa.....	30
Tabla 2. Resultados del crecimiento de las distintas bacterias en los distintos medios previamente descritos. El color rojo significa existencia de inhibición. El color naranja significa existencia de inhibición no tan notoria. El color verde significa inexistencia de inhibición. 34	
Tabla 3. Resultados de cada cepa en estudio de la cuantificación de la unidad formadora de colonias (CFU) por ml a una densidad óptica determinada	35
Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos del presente ensayo. En la columna 1 se describen las bacterias inoculadas con el agar posteriormente puestas en placas Petri. En la fila 1 se describen las gotas de las cepas inoculadas en cada placa Petri. El color rojo significa existencia de inhibición. El color naranja significa existencia de inhibición no tan notoria. El color verde significa inexistencia de inhibición.....	38
Tabla 5. Resultados de ensayos de gotas adyacentes y todas las posibles combinaciones. En la columna 1 se describen las bacterias que generan inhibición a otras cepas. En la fila 1 se describen las bacterias que fueron inhibidas. El color rojo significa existencia de inhibición. El color naranja significa existencia de inhibición no tan notoria. El color verde significa inexistencia de inhibición.....	40
Tabla 6. En la columna 1 se dispone las bacterias inoculadas de forma vertical en la placa Petri. En la fila 1 se disponen las bacterias inoculadas de forma perpendicular a la línea vertical.	42
Tabla 7. Resumen de los distintos fenotipos de las combinatorias y de las distinciones de las cepas. Columna 1 se presentan las distintas combinaciones, columna 2 se presentan los fenotipos presentes y en la columna 3 las observaciones.	43
Tabla 8. Cuantificación de colonias presente en los distintos tratamientos normalizado por largo de raíz (cm). 0 significa nulo crecimiento de respectiva cepa en tratamiento. La cepa <i>P. putida</i> KT2440 mantiene mismo orden de magnitud. No obstante, disminuye su orden de magnitud en los tratamientos que lograron crecer ambas cepas (<i>A. brasilense</i> SP7 + <i>P. putida</i> KT2440; <i>P. putida</i> KT2440 + <i>P. phytofirmans</i> PsJN). 61	

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

CFU: Unidad formadora de colonia.

OD: Densidad óptica.

MS: Medio Murashige y Skoog.

IAA: Ácido indol-3-acético.

PsJN: *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN.

522: *Flavobacterium endophyticum* 522.

J70: *Nocardioides plantarum* Grainger J70.

B4: *Variovorax paradoxus* B4.

SP7: *Azospirillum. brasilense* SP7.

KT2440: *Pseudomonas putida* KT2440.

SynCom: Comunidades microbianas sintéticas.

AHL: *N-acyl-l-homoserine lactone*.

QS: *quorum sensing*.

PGPB: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Fitness: Adecuación biológica de las plantas.

Microbioma: Conjunto de microorganismos, sus genomas y metabolitos presentes en un organismo, que cumplen alguna función e interaccionan con el ambiente.

Biocontrol: Utilización de organismos vivos para reducir las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito.

RESUMEN

La rizósfera es la porción del suelo que interactúa con las raíces de las plantas y en la cual ocurren una serie de interacciones biológicas, tanto entre microorganismos como entre microorganismos y la planta. Estas interacciones ecológicas pueden ser neutras, benéficas o perjudiciales para el hospedero. Por una parte, las comunidades microbianas sintéticas (SynCom) son grupos de tres o más microorganismos (ej. bacterias) que permiten estudiar, de manera simplificada, algunas de estas interacciones ecológicas y sus efectos sobre el hospedero. Por otra parte, dentro de las comunidades microbianas rizosféricas pueden haber Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB), que tienen la capacidad de favorecer el crecimiento de las plantas o su respuesta a distintos estreses.

En esta tesis se trabajó con una SynCom de cinco bacterias representativas de la rizósfera de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* en conjunto con la bacteria promotora del crecimiento (PGPB), *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN para evaluar el siguiente objetivo general: determinar y comparar los efectos de una bacteria promotora del crecimiento (PGPB), siendo inoculada de manera única y dentro de una comunidad microbiana sintética (SynCom) representativa de la rizósfera de *Arabidopsis thaliana*, en condiciones estándares de crecimiento para la planta.

Como primer alcance, se estudió microbiológicamente el comportamiento entre las bacterias de la SynCom, realizando ensayos de competencia y caracterizando las distintas cepas mediante ensayos *in vitro*. En los ensayos de competencia se observó que la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 inhibió el crecimiento de las otras cepas en estudio, incluyendo la PGPB, *P. phytofirmans* PsJN. La caracterización de la SynCom entregó información sobre solubilización de fosfato, producción de sideróforos y de ácido indol-3-acético (IAA). Posteriormente se llevaron a cabo ensayos *in vitro* con *A. thaliana* utilizando cepas aisladas, combinaciones de cepas y la SynCom. Además, ensayos de recolección de los exudados de las raíces de la planta, para evaluar el crecimiento de las cepas en estos. En el ensayo de cepas aisladas se definió la concentración (unidad formadora de colonias; CFU) de cada cepa que era capaz de

promover el crecimiento, siendo escogida la concentración $10^4 \left(\frac{CFU}{ml} \right)$. Luego se inocularon plantas *in vitro* con parejas de cepas, comparando el efecto de las cepas aisladas y en combinación con la cepa *P. putida* KT2440. Se observó que la cepa KT2440 no promovió el crecimiento de la planta, excepto en pareja con la cepa PsJN, logrando aumentar el largo de la raíz en comparación con los otros tratamientos. Al cuantificar colonias por largo de raíz $\left(\frac{CFU}{cm \text{ de raíz}} \right)$ todas las cepas lograron crecer de forma aislada, no obstante, sólo dos cepas (*A. brasilense* SP7 y *P. phytofirmans* PsJN) crecieron en conjunto con KT2440. Al evaluar la SynCom, todos los tratamientos aumentaron el área de roseta, pero la cepa PsJN, de manera aislada, y en conjunto con la SynCom sin la presencia de la cepa KT2440, logró incrementar el largo de raíz. En el ensayo de exudados se evaluó el crecimiento aislado de las cepas utilizando los exudados recolectados de las raíces de *A. thaliana*. Se observó que todas las cepas pudieron usar los exudados como fuente de carbono, excepto *F. endophyticum* 522.

En conclusión, este estudio ha evidenciado la existencia de diferencias entre los contextos con y sin planta. Los ensayos de competencia pueden predecir algunos efectos de las interacciones entre microorganismos y planta. La concentración a inocular de cada cepa es determinante en la promoción del crecimiento de la planta. La cepa *P. phytofirmans* PsJN corrobora efectos promotores del crecimiento a la planta, estando de manera aislada y en una SynCom, sin la presencia de la cepa KT2440. A partir de los ensayos de caracterización de las cepas y los ensayos *in vitro* se puede concluir la importancia de la elección de los miembros de una SynCom. Dado que, se observó la capacidad competitiva de una cepa (*P. putida* KT2440) frente a las otras. Además, se remarca la importancia de los exudados radiculares, debido que estas sustancias parecen ser esenciales para el crecimiento de las cepas.

No obstante, se requieren futuros estudios *in vitro* y análisis genómicos para determinar efectos directos de la SynCom en la planta. Como proyección se propone evaluar la SynCom en contexto de suelo, con el objetivo de recrear condiciones de un ambiente natural. Así como el análisis genómico de las cepas para una identificación más precisa.

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA U OPORTUNIDAD

El cambio climático, definido como variaciones a largo plazo de temperatura y patrones climáticos, y la acción humana en la agricultura ha perjudicado la fertilidad del suelo (Hannula, et al 2020). Esto se traduce en una disminución de los niveles de carbono en el suelo, un aumento en la tasa de erosión del suelo y una alteración en el balance natural (Lal, R. 2004; Smith, P. et al 2016). Las consecuencias actuales incluyen el deterioro de la biodiversidad, debido al uso no selectivo de insecticidas, que perjudican a diversos microorganismos (Tzec-Interián et al., 2020; Timmusk, S., et al. 2017). Así, como la acumulación de residuos químicos en la cadena alimentaria y la reducción de la disponibilidad nutricional en el suelo, debido al uso de pesticidas (De Coninck et al., 2015; Backer et al., 2018). En consecuencia, es necesario incrementar el rendimiento de los cultivos para lograr adaptarlos a los estreses ambientales (Arrouays, D., et al. 2017; Van der Heijden et al., 2006).

Últimamente se ha estudiado la aplicación de microorganismos como biocontrol para contrarrestar los efectos negativos mencionados, puesto que en el suelo viven microorganismos que ayudan a las plantas a adquirir nutrientes, regular y producir hormonas y proteger ante patógenos (Marin, O. et al. 2020; Yang et al., 2009; Kim et al., 2011; Berendsen et al., 2012). Específicamente, en la superficie de las raíces de las plantas se genera un ambiente nutritivo, llamada rizósfera (Faure, et al., 2008; Hiltner, 1904). La cual, está habitado por múltiples poblaciones de microorganismos, que secretan activamente moléculas de bajo y alto peso molecular, pudiendo asistir en la asimilación de nutrientes y mejorar el crecimiento de la planta (Lundberg et al., 2013; Combes-Meynet et al., 2011). Esta coordinación e interacción entre los microorganismos esta impulsada, principalmente, por los sustratos orgánicos expulsados por las raíces, los exudados (Zhalnina et al., 2018). Esta interacción conjunta de microorganismos, junto con sus genomas, conocido como microbioma, contribuye directamente al crecimiento de las plantas, la productividad, el secuestro de carbono, la fitorremediación, la absorción de nutrientes y la resistencia a enfermedades (Pascale

et al.,2020; Lundberg et al., 2012). Por lo tanto, el conocimiento y el uso de microorganismos pueden ser esenciales para lograr una agricultura más sostenible (Marin, O. et al. 2020).

Actualmente, se busca recrear el microbioma rizobacteriano a partir de comunidades microbianas sintéticas (SynCom) bajo una estrategia natural de cooperación metabólica y sintrofía (beneficio mutuo) entre microorganismos (Bernstein HC, et al. 2014; Morris BE, et al. 2013). Estas SynCom han demostrado tener un impacto positivo en la salud, crecimiento y nutrición del hospedero (Haney et al., 2015; Pieterse et al., 2016; Hacquard et al., 2015; Lugtenberg & Kamilova, 2009). En el ultimo tiempo, se ha implementado el uso de una SynCom para aprovechar sus capacidades emergentes con objetivos biotecnológicos, como enfrentar los desafíos ambientales (estrés por nutriente, salino; Scott, S.R. et al. 2016).

Las comunidades microbianas sintéticas son ensamblajes compuestas por dos o más bacterias que viven en simbiosis y pueden estar formadas por bacterias representativas del microbioma que habitan en la rizósfera de la planta (Astudillo-García et al., 2017). Dentro de este grupo se encuentran las Bacterias Promotoras del Crecimiento (PGPB, por sus siglas en inglés) que se caracterizan por beneficiar a la planta, influyendo en el crecimiento, respuesta inmune y tolerancia al estrés abiótico y biótico (Lugtenberg, B. et al. 2009; Poupin et al., 2013). Sin embargo, el escaso conocimiento sobre las interacciones microorganismo-microorganismo en la rizósfera de las plantas dificulta el diseño de comunidades para investigaciones biológicas, puesto que es difícil predecir qué bacterias o grupos bacterianos tendrán un efecto positivo o negativo en el hospedero (Herrera Paredes, et al., 2018; Finkel, O. M., et al. 2020; Liu, Y, et al. 2019).

En el presente estudio, se busca dilucidar y comprender algunos aspectos de las interacciones entre microorganismos-microorganismos-planta, específicamente entre microorganismos que habitan en la rizósfera. Con el fin de entender, si actúan de forma

mutualista o si se dan interacciones de competencia, si algún microorganismo toma ventaja de otro o si se aprovecha de la planta.

A partir de una extensa búsqueda bibliográfica y gracias al conocimiento de la planta modelo *A. thaliana*, se buscó aislar bacterias representativas del microbioma de *A. thaliana*, con el fin de formar una SynCom estable y robusta, evaluando las interacciones entre microorganismos, mediante ensayos de competencia y entre microorganismos y planta, a través de estrategias *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

i) Mecanismos de comunicación e interacciones entre microorganismos en la rizósfera.

Los microorganismos no suelen vivir aislados, en general conviven con otros microorganismos, formando comunidades microbianas complejas y dinámicas (Klitgord N, et al. 2010). La dependencia de vivir en comunidad radica en el hecho de cumplir roles complementarios, generando una red ecológica intrínseca (Johns, N. et al. 2016). Por ejemplo, los microorganismos necesitan de metabolitos suplementarios u otros compuestos químicos, que son secretados por otros miembros de la comunidad para mantener su viabilidad (Song h, et al. 2014). Por lo tanto, es primordial conocer y entender las interacciones célula-célula y cómo estos organismos se comunican en una comunidad microbiana (Schuster, M., et al. 2013).

A grandes rasgos, las interacciones de las comunidades microbianas pueden tener tres impactos sobre el hospedero: positivo (+), negativo (-) o neutro (0). De lo anterior, se pueden segregar 6 categorías: comensalismo (+/0), mutualismo (+/+), competencia (-/-), parasitismo (+/-), amensalismo (-/0) y neutralismo (0/0)¹ (Song h, et al. 2014). Estas categorías representan el resultado de la interacción entre dos organismos, pudiendo ser cooperativa, neutra o antagonista. Por ejemplo, el amensalismo significa que en la interacción uno de los organismos se ve desfavorecido (-) y el otro organismo no sufre ningún efecto (0). De esta manera, se pueden clasificar las propiedades y dinámicas de una comunidad como un sistema completo (Song, H. et al. 2014; Faust, K., & Raes, J. 2012).

Además, las interacciones coordinadas de múltiples microorganismos permiten procesos metabólicos específicos, los cuales pueden ser unidireccionales o bidireccionales. Una interacción comensal, en la cual uno de los organismos se ve beneficiado (+) y el otro organismo no experimenta ningún cambio (0), es

¹ Se considerará el símbolo (+), como un efecto favorecedor, el símbolo (-), como un efecto desfavorecer y el símbolo (0) sin efecto alguno.

unidireccional, puesto que un organismo depende del producto del otro. Por otro lado, el mutualismo (o sintrofia) es una dependencia mutua (bidireccional), debido que un microorganismo proporciona un compuesto químico, el cual es usado por otro microorganismo a cambio de una recompensa (Klitgord N, et al. 2010; Johns N.I., et al. 2016; Morris BE, et al. 2013).

Desde una perspectiva molecular, las interacciones entre microorganismos generan diversas reacciones y mecanismos para lograr un comportamiento en comunidad. Existen dos grandes mecanismos de comunicación: interacción por contacto e interacción sin contacto (Schuster, M., et al. 2013). El primer mecanismo es el intercambio de biomoléculas entre microorganismos por contacto físico celular (directo) (Compant, S., et al 2019). El segundo mecanismo es el intercambio de metabolitos y señalizaciones entre microorganismos sin contacto físico celular (señalizaciones químicas) (Song, H. et al. 2014.). Por ejemplo, el Quorum *sensing* (QS), el cual consiste en el automonitoreo de la densidad poblacional de la bacteria a partir de la producción de N-acyl-L-homoserine lactone (AHL) (Hassani, M. et al. 2018. Waters, C. M., & Bassler, B. L. 2005). Este mecanismo coordina la expresión génica y ejerce influencia sobre el comportamiento diferencial, implicando que las especies que contienen estas proteínas reguladoras, al unirse a un ligando en particular, regulan múltiples promotores del mecanismo QS (Scott, S.R. et al. 2016). Este sistema de detección se ha encontrado en varias bacterias asociadas a la rizósfera, lo cual demuestra que controlan expresiones funcionales en respuesta a la densidad poblacional (Steidle. A. et al. 2001).

Se han definido taxa claves dentro del microbioma de *A. thaliana*, , como, por ejemplo, *Acidobacteriota*, *Actinomycetota* (presente la familia *Nocardioidaceae*), *Pseudomonadota* (presente las clases α , β y γ) y *Planctomycetes* se encuentran principalmente en la rizósfera y *Actinomycetota*, *Pseudomonadota* (presente la familia *Azospirillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae* y *Pseudomonadaceae*) y

Bacteroidota (presente la familia *Flavobacteriaceae*) están presentes en las raíces (Poupin, et al 2023; Compant, S., et al 2019). La diversidad de taxa enriquece la cantidad de microorganismos, los cuales contienen genes con funciones esenciales para el fitness de la planta, como la producción de fitohormonas, que afecta el crecimiento de la planta o la secreción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que reduce el nivel de la hormona del estrés (etileno) en la planta (P. Lemanceau, et al 2017; N. Rascovan, et al 2015; Compant, S., et al 2019).

Además, existen las especies satélite, las cuales están en baja abundancia y cantidad, pero son reconocidas por ser impulsoras de funciones claves para el ecosistema, tales como reducir microorganismos no deseados (invasores) del suelo y/o la producción de compuestos antifúngicos volátiles que protegen a la planta de patógenos transmitidos por el suelo (I. Hanski, 1982; A.E. Magurran, et al 2003; W.H.G. Hol, et al 2015; C.A. Mallon, et al 2015).

ii) Interacciones entre microorganismos y hospedero.

Como se mencionó, el suelo es un ecosistema diverso y rico en microorganismos y las raíces de las plantas generan un ambiente beneficiosa para la proliferación de los microorganismos aledaños (Faure, D., et al 2008; Criollo, P. et al. 2012). La rizósfera genera constantes interacciones entre macroorganismos y microorganismos, incluyendo sus genomas (microbioma), y entre -microorganismos-hospedero, la cual desencadenan distintos efectos unos sobre otros (Hassani, M. et al. 2018; Poupin et al. 2023).

Debido a estas interacciones ecológicas complejas que se dan entre planta y microorganismos se ha creado el concepto holobionte, el cual considera como una entidad funcional al hospedero y su microbioma (Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I. 2016). El holobionte incluye las diferentes poblaciones bacterianas presentes en la rizósfera (rizobacterias) y a la planta hospedera, las cuales pueden tener efectos

beneficiosos o perjudiciales (Criollo, P. et al. 2012; Vandenkoornhuyse P, et al. 2015). Por ejemplo, las PGPB permiten que el holobionte de la planta sobreviva a diferentes estreses abióticos (cambios ambientales) y bióticos (Lyu D, et al. 2021; Bordenstein, SR et al. 2015). Además, los microorganismos que viven tanto dentro (endófitos) como en la superficie (epífitos) de la planta inciden al hospedero, incluso en su genoma, lo que lleva al concepto de hologenoma (Müller DB, et al. 2016). Se cree que, la combinación del genoma del hospedero y el microbioma podrían influir en el fitness de la planta (tanto morfológicamente, fisiológicamente, en comportamiento y desarrollo), así como adaptaciones en respuestas a cambios abióticos y/o bióticos y evolución (Poupin et al. 2023; Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I. 2016).

Adicionalmente, en la rizósfera ocurren una serie de complejas interacciones y procesos biogeoquímicos, impulsados por los exudados liberados por las raíces de la planta (Combes-Meynet et al., 2011; Lundberg et al., 2013; Zhalnina et al., 2018). Estos exudados son los principales recursos nutritivos (fuente de carbono y energía) de los microorganismos que habitan la zona, promoviendo el crecimiento de microorganismos beneficiosos e induciendo a fenómenos de motilidad y quimiotaxis, cambios metabólicos y transcriptómicos (De Weert et al., 2002; Rudrappa et al., 2008; Cordovez, V. et al., 2019; Pascale et al., 2020).

Cabe destacar, que las raíces de las plantas hospedan una diversidad de microorganismos, que incluye a arqueas (*Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*), protistas, virus, hongos (principalmente de los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota*) y oomicetos (*Pythium*, *Phytophthora*, *Peronospora* and *Albugo*; Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I. 2016; Larousse, M. & Galiana, E. 2017; Coleman-Derr, D. et al. 2016). Según literatura, se ha observado que la comunidad de arqueas es diversa y específica, además, tiene la capacidad de degradar glicógeno, el cual es exudado por los hongos (Taffner, J. et al. 2018). Los virus y protistas juegan un papel importante en el ensamblaje de la comunidad bacteriana y así en la composición del

suelo, contribuyendo en la diversidad del microbioma (Gao, Z. et al 2018; Pratama, A. et al. 2018). Estas interacciones entre diferentes reinos pueden afectar al fitness de la planta, aunque aun se requiere una mayor investigación en este campo. (Liu et al., 2019; Durán, P. et al. 2018).

iii) Comunidades microbianas sintéticas (SynCom).

Considerando que los microorganismos interactúan constantemente con la planta, influenciando en su crecimiento, en la absorción de nutrientes y hasta en la resistencia a enfermedades, es esencial entender cómo las plantas regulan sus microbiomas y cómo estos influyen en su crecimiento y desarrollo (Liu, Y, et al. 2019). Actualmente, se pueden estudiar de forma holística o reduccionista. La forma holística estudia el microbioma de las raíces como un todo, es decir, se mantienen las densas redes de interacciones y sus entornos naturales (Tecon, R. et al. 2019). El método reduccionista busca descomponer las interacciones entre plantas y microorganismos en factores experimentalmente controlables, así se pueden comprender sus funciones y mecanismos (Liu, Y, et al. 2019). Este método se ha utilizado para identificar los diversos mecanismos moleculares utilizados por los microorganismos para llevar a cabo tanto la cooperación como la competencia en la planta (Hassani, M. et al. 2018). Las SynCom serían una mezcla de ambos enfoques, utilizando microorganismos cultivables en condiciones únicas para obtener resultados reproducibles e investigar la función de la rizósfera en el fitness de la planta (Liu, Y, et al. 2019). Estas SynCom se han construido con el objetivo de emular comunidades naturales y evaluar sus interacciones reales (Marin O. 2020).

Además, basándose en los principios de interacción microbiana en la naturaleza, una SynCom, en comparación con monocultivos, permite la especialización celular y cooperación productiva de funciones (Jones J.A., et al. 2017; Wintermute, E.H. et al. 2010). Esta complementariedad de especies entrega mayor resistencia a perturbaciones ambientales y capacidades metabólicas más complejas, puesto que

benefician a cada miembro en términos de uso del sustrato, equilibrio redox y crecimiento celular (Brenner, K. et al 2008; Jones J.A., et al. 2017). Otro punto, es la capacidad de catalizar eficientemente más procesos al combinar procesos enzimáticos y metabólicos de distintos microorganismos (Jagmann, N., & Philipp, B. 2014). En contraposición, las cepas aisladas carecen de flexibilidad metabólica y, no simulan todos los factores que influyen, tales como las toxinas que degradan, la producción de compuestos naturales y en la capacidad de crecimiento y desarrollo en los distintos ambientes (Bernstein HC, et al. 2014; Schick, 2006).

Se sugiere que las SynCom que consisten en 2 o más especies desempeñan funciones cooperativas con complementariedad, lo que aumenta la productividad general y permite un comportamiento más complejo, superando las limitaciones de los monocultivos (Shun Che, et al. 2019; Teague, B.P. et al. 2015; Chen, Y., et al. 2015). La selección de las especies sigue distintos propósitos, como representar funciones o rasgos microbianas específicas, para representar un arreglo taxonómico determinado, basado en redes de interacción y combinar cepas con funciones previamente conocidas (Zheng et al., 2019; Toju et al., 2018, 2020; Poudel et al., 2016; Durán et al., 2018; Kong et al., 2018; Santhanam et al., 2019). No obstante, recrear estas SynCom presenta desafíos que requieren conocer los microorganismos y sus vías enzimáticas (McCarty et al. 2019). Para entender el metabolismo microbiano completo, primero hay que comprender las propiedades de las cepas individuales en cultivos puros, luego generar interacciones en comunidades complejas y evaluar los efectos (Wintermute EH, et al. 2010).

Una opción para aplicar biotecnológicamente funciones bacterianas es a través de la biología sintética, sin embargo, existen obstáculos al momento de analizar e implementar circuitos genéticos de microorganismos de alta complejidad y tamaño, tales como, interacciones genéticas no deseadas, límites del tamaño del DNA que acepte la célula hospedera y/o carga metabólica inducida al hospedero (Kylilis N, et al.

2018). Por lo tanto, el uso de la SynCom podría superar algunas de estas limitaciones al permitir la transferencia de metabolitos, la comunicación, la interacción y la especialización celular, aumentando la eficiencia de los bioprocesos y la organización espacial (Jagmann, N., & Philipp, B. 2014).

iv) Bacterias Promotoras del Crecimiento (PGPB) y su relación con una comunidad microbiana sintética (SynCom) y un hospedero.

Como se mencionó con anterioridad, existen bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPB), llamadas rizobacterias, las cuales crecen en asociación con una planta hospedera, ayudando a la adaptación de las variaciones medioambientales (estreses) y estimulando el crecimiento (Vessey, J. K. 2003; Roughgarden, J. et al., 2018). Dentro de estas bacterias, los géneros más referenciados son *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Erwinia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. (Criollo, et al. 2012).

Las PGPB colonizan la rizósfera de la planta, induciendo efectos positivos directos e indirectos en el crecimiento, en respuestas inmunes, al estrés abiótico o biótico, entre otros (Poupin, et al. 2013. Lugtenberg, et al. 2009). Por ejemplo, la cepa *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN es una PGPB, la cual habita en la rizósfera y endósfera (medio interno de la planta) de diversas especies vegetales. Esta bacteria promueve el crecimiento y mejora la adaptación al estrés en varias especies de plantas herbáceas y leñosas (Poupin, M.J. et al. 2016). Según el estudio de Poupin et al. (2013) se demostró que la cepa *P. phytofirmans* PsJN es capaz de acelerar el crecimiento y el ciclo de vida de plantas *Arabidopsis thaliana* gracias al sistema de *Quorum sensing* mediado por señalizaciones de AHL, lo que resulta en una colonización efectiva y en interacciones beneficiosas (Zúñiga, A. et al. 2013). Se evidencia la importancia de la comunicación entre celular, sugiriendo que la incorporación de una PGPB en una SynCom sugeriría un efecto benéfico hacia el hospedero.

La estructura de las comunidades de microorganismos de la rizósfera difiere entre las especies de plantas, puesto que estas cambian la composición física y química del suelo, alterando el pH, la estructura del suelo, la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes (Vessey, J. K. 2003; Lundberg, D. S, et al. 2012). Esto puede afectar la capacidad de colonización de las bacterias, lo que significa que no todas pueden invadir eficazmente el área radicular de las plantas (Finkel, O. et al. 2020). Por lo que, los efectos observados en la planta pueden ser consecuencias directas o indirectas de las interacciones entre microorganismos (Arnold, et al. 2019).

Un ejemplo del uso de comunidades microbianas sintéticas de tamaño mediano es el estudio de Tsolakidou et al., 2019, el cual diseñó una SynCom de 25 cepas bacterianas seleccionadas del compost. Se realizaron tres tratamientos: sin inoculación, inoculación de una cepa e inoculación de múltiples cepas. Los resultados indicaron que solo la inoculación de múltiples cepas en el suelo, es decir una SynCom, tuvo efectos beneficiosos a largo plazo en la rizósfera de la planta del tomate. Se concluyó, que la aplicación de comunidades microbianas sintéticas en sustratos pobres puede producir fenotipos de plantas reproducibles.

Otro ejemplo, es el estudio de Voges et al., 2019, el cual exploró el papel de los metabolitos en la determinación de las bacterias que habitan en la rizósfera. Para lograr el objetivo, se desarrolló una SynCom mediana compuesta por 22 bacterias de diversidad filogenética, todas aisladas de la rizósfera de *Arabidopsis thaliana*. El objetivo era detectar cambios en la comunidad que ocurren en ausencia de pequeñas moléculas secretadas, como fitoalexinas, flavonoides y cumarinas. Este estudio ayudó a comprender los mecanismos específicos por los cuales las moléculas derivadas de plantas median la composición del microbioma.

En cuanto al tamaño de las comunidades sintéticas, implementar una SynCom pequeña se asemeja más a un razonamiento reduccionista, puesto que busca centrarse en cada

miembro de la comunidad conociendo o no las posibles influencias que pudiera tener sobre el hospedero (Zhuang et al. 2020). Normalmente, se opta por esta opción cuando el objetivo de la investigación es evaluar los rasgos de las PGPB, priorizando funcionalidad antes que un análisis ecológico, de esta manera se simplifican los diferentes resultados de las interacciones (O. Marín. 2020). Por ejemplo, en el estudio de Zhuang et al. 2020 se exploró la rizósfera del ajo para seleccionar cepas PGPB. Descubrieron que, al aumentar la riqueza de la comunidad de *Pseudomonas* se beneficia la biomasa vegetal y el contenido de nutrientes. Se comparó la inoculación entre cepa aislada y en una SynCom de 5 cepas, las cuales pudieron promover el crecimiento de las plantas de manera más confiable y efectiva que las cepas aisladas.

Independiente del tamaño de las comunidades sintéticas, estas tienen un potencial uso para comprender y estudiar los efectos de las interacciones entre microorganismos y hospederos, siendo relevantes hoy en día para poder afrontar los cambios ambientales radicales (Großkopf, T., 2014). No obstante, para obtener una SynCom exitoso, que sostenga el crecimiento celular de forma estable y robusta, es crucial seleccionar adecuadamente los miembros de esta, para así formar interacciones interdependientes y estables (Shahab, R. L., 2018). Además, para obtener una inoculación exitosa microbiana, las bacterias tienen que invadir y persistir en el contexto radicular para interactuar con los microorganismos que habitan originalmente (endógenos) y adaptarse a las condiciones abióticas, de esta manera se establecería una interacción compatible con el hospedero (Finkel, O. et al. 2020).

Los multicultivos han permitido evaluar el impacto de los efectos de las PGPB, el biocontrol, la respuesta inmune del hospedero y la comunicación en la rizósfera a través de la liberación de diferentes sustancias químicas (Zhuang et al. 2020; Lee et al. 2020; Schulz-Bohm et al 2015). En cada estudio previamente mencionado, se concluyó que las capacidades complementarias de los miembros de la SynCom tienen un

impacto positivo mayor en comparación con las cepas aisladas en el hospedero (O. Marín 2021; Santhanam et al. 2019).

Debido lo anterior, en el presente estudio se trabajó con una comunidad microbiana sintética (SynCom) representativa de la rizósfera de la planta *A. thaliana* con la bacteria *P. phytofirmans* PsJN. Se estudió los efectos de las interacciones entre microorganismos y con la planta hospedera. Además, de comparar los efectos de cepas aisladas y como parte de una SynCom en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Se buscó responder a las preguntas, ¿Cómo se comportan las cepas en una SynCom, en comparación a cuando están inoculadas de manera aislada en plantas de *A. thaliana*?, ¿Qué tipo de interacciones se dan entre las bacterias de la comunidad microbiana sintética y entre las cepas y la planta? ¿Existe promoción del crecimiento, beneficio mutuo o tiene efectos perjudiciales?

HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Hipótesis alternativa

La inoculación de una cepa tipo PGPB en conjunto con una comunidad microbiana sintética (SynCom) tendrá un efecto adicional a la inoculación como cepa aislada en el crecimiento de las plantas *Arabidopsis thaliana*.

Objetivo general

Determinar y comparar los efectos de una bacteria promotora del crecimiento (PGPB), siendo inoculada de manera única y dentro de una comunidad microbiana sintética (SynCom) representativo de la rizósfera de la planta *Arabidopsis thaliana*, en condiciones estándares de crecimiento para la planta.

Objetivos específicos

- a. Diseñar una comunidad microbiana sintética (SynCom) representativa de la comunidad bacteriana de la rizósfera de *Arabidopsis thaliana*.
- b. Caracterizar la comunidad microbiana sintética (SynCom) más la presencia de cepa PGPB, a través de ensayos de compatibilidad bacteriana para evaluar interacciones entre las bacterias representativas.
- c. Comparar los efectos entre una comunidad microbiana sintética (SynCom) más la adición de una cepa PGPB y los efectos de una PGPB inoculada como cepa única en el crecimiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

METODOLOGÍA

Objetivo A.

Selección, aislamiento y crecimiento de bacterias representativas

Las bacterias representativas de la rizósfera de *A. thaliana* utilizadas fueron:

DSM 29537 – *Flavobacterium endophyticum* 522 (Bacteroidetes)

DSM 11054 – *Nocardioides plantarum* Grainger J70 (Actinobacteria)

DSM 17436 – *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN (β -proteobacteria)

DSM 06125 – *Pseudomonas putida* KT 2440 (γ -proteobacteria)

DSM 11541 – *Rhizobium etli* CFN-42 (α -proteobacteria)

DSM 40451 – *Streptomyces olivochromogenes* (Actinobacteria)

DSM 21786 – *Variovorax paradoxus* B4 (β -proteobacteria)

Las cepas fueron obtenidas de la colección de DSMZ y activadas en un medio específico diluido. Luego, todas las cepas fueron cultivadas por método de aislamiento en placas Petri redondas con medio LB sólido por 24 h a 30°C en la incubadora de placas (Memmert D-06062 600). De cada placa Petri redonda se seleccionaron colonias y se re-aislaron.

Para tener cultivos frescos, se creció en tubos de ensayo con medio líquido LB, “picando” cada cepa con una micropipeta RAININ Pipet-Lite XLS modelos P200 y dejando la punta dentro del tubo de ensayo. El grupo control fue solo medio líquido LB. Se realizó un ensayo (ensayo definición medio óptimo) para seleccionar el medio que logre un crecimiento óptimo de cada cepa. Todas las bacterias fueron inoculadas en medios sólidos y líquidos selectivos 535, 1, 1139, 65, 92 y R2A (véase en anexos). Cada cepa se inoculó por el método de asa de forma *zigzag* en 1/7 de placa Petri redonda con los distintos medios selectivos, replicando 3 veces cada medio, en la figura 1 se ejemplifica la forma de plaquear cada bacteria en la placa Petri.

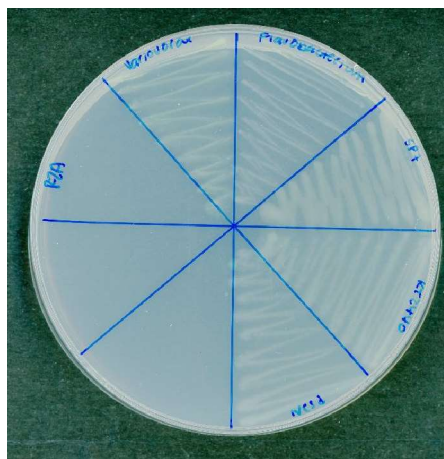


Figura 1. Placa con medio sólido R2A y el crecimiento *zigzag* por el método de asa de las cepas *F. endophyticum* 522, *P. phytofirmans* PsJN, *A. brasilense* SP7, *P. putida* KT2440 y *V. paradoxus* B4.

Identificación de bacterias representativas: Extracción y purificación de ADN, Amplificación gen 16S rDNA y Análisis filogenético.

Se extrajo el ADN de todas las cepas en estudio mediante el protocolo del kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, 2019). Para las cepas *Nocardioide* *plantarum* Grainger J70 y *Streptomyces olivochromogenes* se realizó el protocolo correspondiente a bacterias gram positiva. Para las cepas *Flavobacterium endophyticum* 522, *Pseudomonas putida* KT2440, *Rhizobium etli* CFN-42 y *Variovorax paradoxus* B4 se procedió a realizar el protocolo para bacterias gram negativas. Se purificó el DNA a partir del protocolo de precipitación por etanol. Se agregó 0.1 vol de acetato de sodio 3M (CH_3COONa) y 2.5 vol de etanol 100% enfriado en hielo a -20°C ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a cada tubo de PCR que contiene el ADN amplificado, se agitó para mezclar bien. Luego, para que precipite, se almacenó a -80°C el PCR durante 1 hora. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 30 min a 4°C . Los pellets fueron lavados dos veces con 0.5 ml de etanol al 75% y enfriados a -20°C . Se realizó una segunda centrifugación a 14.000 rpm durante 30 min a 4°C . Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el sedimento en 20 μL de H_2O . Finalmente, los tubos fueron almacenados a -20°C .

Para obtener las cepas representativas se amplificó el gen 16S mediante un PCR en *Bio-Rad T100 Amplification Thermal Cycle* con los partidores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3), siguiendo el régimen de una denaturación inicial por 10 min a 95°C, para luego realizar 38 ciclos de denaturación a 95°C por 30 s, unión a 58°C por 30 s y amplificación a 72°C por 45 s. Se uso una solución compuesta por partidores *forward* y *reverse*, un mix de dNTPs mix, 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl pH-8.3), MgCl 250 mM y enzima Taq. En cada tubo se dispuso 24 ul de la solución más 1 ul del DNA extraído. Además, se realizó un control positivo y un control negativo. El resultado del PCR (3 ul) fue dispuesto para una electroforesis en *Sigma power PS 500-2*. Se uso 1.5% agarosa (60mL por gel, Laftken, ca. No.: FER/00A200), Omega Bio-tek 50X TAE Buffer (diluido 1X, Lot no: TAE50X052518SKM3878), RedGel Nucleic Acid Stain 10,000X in DMSO (6µL per-gel, cat. No.: 41002, Lot. No.: 17G0919), loading 6X BM-0330 Buffer (2µL por muestra, Lot no.: 20160949) y *standard* Ladder. La cuantificación del contenido de ADN en los productos de PCR se realizó con Biotek EON 259271.

El ADN purificado fue secuenciado por Macrogen, el cual se envió a Corea del Sur. Los resultados obtenidos se alinearon mediante la aplicación Ape, utilizando los partidores *forward* y el *reverse* complementario. Los nombres filogenéticos se obtuvieron mediante la base de datos NCBI, específicamente en Blast de nucleótidos. Las bacterias obtenidas fueron las descritas con anterioridad con un *e-value* sobre 99%.

Relación cantidad bacterias presentes en medio de cultivo ((CFU) con densidad óptica (OD)

Se midió la cantidad de bacterias presentes con una densidad óptica a 600 nm, mediante el método de dilución de muestras, con el fin de cuantificar las bacterias a tratar. Se evaluaron las OD 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 con sus respectivas diluciones. Se usó el espectrofotómetro *Healthcare Bio-Sciences GeneQuant 130* para evaluar la densidad óptica de cada cepa. Para cada OD, se diluyó la muestra hasta 10^{-5} ,

inoculando 100 ul de cada dilución en placas Petri con método de rastrillo de vidrio en césped, esterilizándolas en etanol absoluto para cada uso.

Se guardaron las placas en la incubadora de medios frescos a 30°C durante 24 hrs. Al día siguiente, se escogieron las placas con la dilución en la que se encuentren entre 30 y 300 colonias. El fin de este procedimiento fue lograr cuantificar la cantidad de colonias presentes y realizar una relación de la magnitud de bacterias existentes a una OD determinada.

Objetivo B.

Con la finalidad de analizar las interacciones entre cepas, se llevaron a cabo diversos escenarios experimentales, en los cuales las cepas se sometieron a interacciones de contacto directo e indirecto, además, se evaluó el crecimiento en conjunto en medio sólido y líquido. En esta sección se trabajó con las mismas concentraciones de bacterias, por lo tanto, en cada ensayo, previamente, se llevaron a todas las bacterias a la misma concentración, $1 \times 10^6 \frac{CFU}{ml}$. El procedimiento estándar fue medir cada cepa su densidad óptica (OD) hasta obtener la OD conocida descrita en la sección “Relación cantidad bacterias presentes en medio de cultivo (CFU) con densidad óptica (OD)”. Se realizaron diluciones específicas a cada cepa. Las respectivas diluciones fueron: Las cepas *F. endophyticum* 522, *V. paradoxus* B4 y *A. brasilense* SP7 se diluyeron 1:10. La bacteria *P. putida* KT2440 y *N. plantarum* Grainger J70 no fueron diluidas, puesto que su magnitud es de $1 \times 10^6 CFU$. La cepa *P. phytofirmans* PsJN se diluyó 1:100.

Evaluación del crecimiento de cepas co-cultivadas en medio sólido R2A.

El objetivo fue evaluar el crecimiento de una cepa en presencia de otra cepa, cuando se encontraba co-cultivadas en el medio sólido R2A. Primero, en placas Petri se vertió 10 ml de medio sólido R2A, generando una delgada película del medio, entregando una base. Segundo, se vertió una mezcla del medio R2A con agar al 50% (8 gr de agar) y la bacteria respectiva a una concentración $1 \times 10^4 \frac{CFU}{ml}$. Debido a lo anterior, las bacterias *F. endophyticum* 522, *V. paradoxus* B4 y *A. brasilense* SP7 fueron diluidas en 1:1.000,

teniendo que mezclar 50 ml de R2A con agar al 50% con 50 ul de bacteria. La cepa *P. phytofirmans* PsJN fue diluida en 1:10.000, teniendo que mezclar 50 ml de R2A con agar al 50% con 5 ul de bacteria. La cepa *P. putida* KT2440 se diluyó en 1:100 teniendo que agregar 50 ml de R2A con agar al 50% con 500 ul de bacteria. Por cada bacteria se realizó 3 réplicas, vertiendo aproximadamente 15 ml de mezcla (R2A con agar al 50% más bacteria) en cada placa Petri.

Por último, se inoculó una gota de 8 ul de cada bacteria en 5 puntos distantes dentro de la placa Petri. Cada placa fue cerrada con Bemis Parafilm PM-996, para luego incubarlas en la estufa durante 48 hrs. Después del tiempo de incubación, se escanearon con escáner fotográfico a color EPSON *Perfection* V600 para documentar el resultado obtenido.

Evaluación del crecimiento de las cepas de la SynCom en contacto indirecto.

La finalidad del ensayo fue evaluar el crecimiento de las cepas en ausencia de contacto directo, con el propósito de detectar posibles efectos de inhibición o de mutuo crecimiento. Cada cepa en estudio, por separado, se dejó inoculando en tubos de ensayo con 2 ml de medio líquido R2A durante 24 hrs a 30°C en la incubadora con agitación Daihan LabTech LSI-1005. Cada bacteria tuvo que estar a la misma concentración de CFU, siendo $1 \times 10^6 \frac{CFU}{ml}$. En placas petri con medio R2A sólido se inoculó 4 gotas de 10 ul de una cepa. Adyacentemente a esa gota inoculada, se inoculó 10 ul de una cepa distinta, las gotas deben estar lo más cercano posible, evitando contacto entre gotas. Se dejó secar por 1 hora bajo la cabina de seguridad biológica Nuaire clase II tipo A/B3 y luego fueron selladas con Bemis Parafilm PM-996. Se realizaron 3 réplicas por bacteria, buscando generar la máxima cantidad de combinatorias posibles (Ishizawa et al., 2019). Todas las placas fueron dejadas por 24 hrs en la incubadora de placas (Mettler D-06062 600) a 30°C.

Evaluación del crecimiento de las cepas de la SynCom en contacto directo.

El propósito del ensayo fue evaluar el crecimiento de una cepa al estar en contacto directo con otra, se buscó determinar si se producía inhibición o si ambas crecían de manera óptima. Se procedió a inocular cada cepa en estudio, por separado, en tubos de ensayo con 2 ml de medio líquido R2A durante 24 hrs a 30°C en la incubadora con agitación Daihan LabTech LSI-1005. Cada bacteria debió estar a la misma concentración de CFU, siendo $1 \times 10^6 \frac{CFU}{ml}$.

En placas Petri previamente vertidas con medio sólido R2A, se trazó una línea vertical con una de las cepas, insertando cuidadosamente un asa estéril dentro del cultivo líquido y luego generando una línea vertical sobre la placa Petri. Se esperó 30 minutos. A continuación, con un asa estéril previamente insertada en otro cultivo líquido de una cepa distinta, se trazó una línea perpendicular al trazo vertical, generando cruces de cepas. En cada placa quedó un trazo vertical con una cepa y trazos perpendiculares con las cepas restantes. Por cada bacteria (trazo vertical) se realizaron 3 réplicas y todas las placas fueron dejadas por 24 hrs en la incubadora de placas (Memmert D-06062 600) a 30°C (Eng et al., 2020).

Análisis del crecimiento simultaneo entre cepas de la SynCom en medio líquido R2A.

El propósito de este ensayo fue registrar el crecimiento simultáneo de dos cepas diferentes, inoculadas a la misma concentración en medio líquido R2A. El objetivo fue verificar si hay algún tipo de inhibición entre las cepas, si alguna de ellas modifica su fenotipo o si ambas crecen de manera óptima en estas condiciones. Cada cepa en estudio, por separado, se dejó inoculando en tubos de ensayo con 2 ml de medio líquido R2A durante 24 hrs a 30°C en la incubadora con agitación Daihan LabTech LSI-1005. Cada bacteria tuvo que estar a la misma concentración, siendo $1 \times 10^6 \frac{CFU}{ml}$. Posteriormente, en tubos de ensayo se mezcló 1 ml de una cepa con 1 ml de otra cepa, realizando todas las posibles combinaciones. Cada combinatoria fue dejada en la incubadora con agitación Daihan LabTech LSI-1005 por 24 hrs. Transcurrido el tiempo, se realizó 5 diluciones a cada combinatoria: 1:10, :100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000. De

cada dilución, se extrajeron 100 ul con una micropipeta RAININ Pipet-Lite XLS P200 y se vertió el contenido en placas Petri con medio R2A sólido. A partir del método de rastrillo, se esparció uniformemente los 100 ul previamente vertidos. Para cada dilución se realizaron 2 réplicas y todas las placas fueron dejadas por 24 hrs en la incubadora de placas (Mettler D-06062 600) a 30°C.

Capacidades metabólicas de las cepas integrantes de la SynCom.

Para cada ensayo se creció cada cepa en medio líquido R2A durante 24 hrs a 30°C en la incubadora con agitación Daihan LabTech LSI-1005. Posteriormente, se midió la OD, para dejar a todas las bacterias a la misma concentración, $1 \times 10^6 \frac{CFU}{ml}$.

Para evaluar la capacidad de solubilización de fosfato de las bacterias, se vertió 25 ml del medio National Botanical Research Institute's phosphate (NBRI-P, véase en Anexos) en tres placas Petri redondas. Una vez seco, se inoculó 8 ul de cada bacteria a la misma concentración sobre la placa Petri de forma aislada y próximas entre las distintas cepas (Nautiyal, 1999; Suleman et al., 2018). Cada placa fue dejada en la incubadora de placas (Mettler D-06062 600) a 30°C por 48 hrs.

Para la detección de producción de sideróforos de las distintas cepas, en 3 placas Petri se vertió 25 ml del medio CAS de agar azul (véase en Anexos) más la adición de succinato a 15 mM (Lynne et al., 2011). La adición de succinato fue para el crecimiento de la bacteria *P. phytofirmans* PsJN. Se inoculó 8 ul de cada bacteria sobre la placa Petri, de forma aislada y próximas entre las distintas cepas. Cada placa fue dejada en la incubadora de placas (Mettler D-06062 600) a 30°C por 48 hrs.

Para detectar producción de ácido indol-3-acético (IAA), se preparó 50 ml del reactivo (R1), compuesto por 1 g de $FeCl_3 \times 6H_2O$, 28.945 ml de agua estéril y 21.055 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Se realizó una curva estándar, compuesta de 500 μ l de solución IAA $50 \frac{mg}{L}$, 80 μ l de triptófano a 50mM y el resto de medio líquido R2A hasta completar 10 ml de solución. Para formar la curva estándar se realizaron 9 distintas concentraciones de la solución y agua destilada, para la concentración $50 \frac{mg}{L}$ (100% de solución), concentración $40 \frac{mg}{L}$ (80% de solución), $30 \frac{mg}{L}$ (60% de solución), $20 \frac{mg}{L}$ (40% de solución), $15 \frac{mg}{L}$ (30% de solución), $10 \frac{mg}{L}$ (20% de solución), $5 \frac{mg}{L}$ (10% de solución), $1 \frac{mg}{L}$ (2% de solución) y $0 \frac{mg}{L}$ (0% de solución) (Glickmann E, et al. 1995). La figura 2 representa el resultado final de las coloraciones a las distintas concentraciones de la curva estándar.

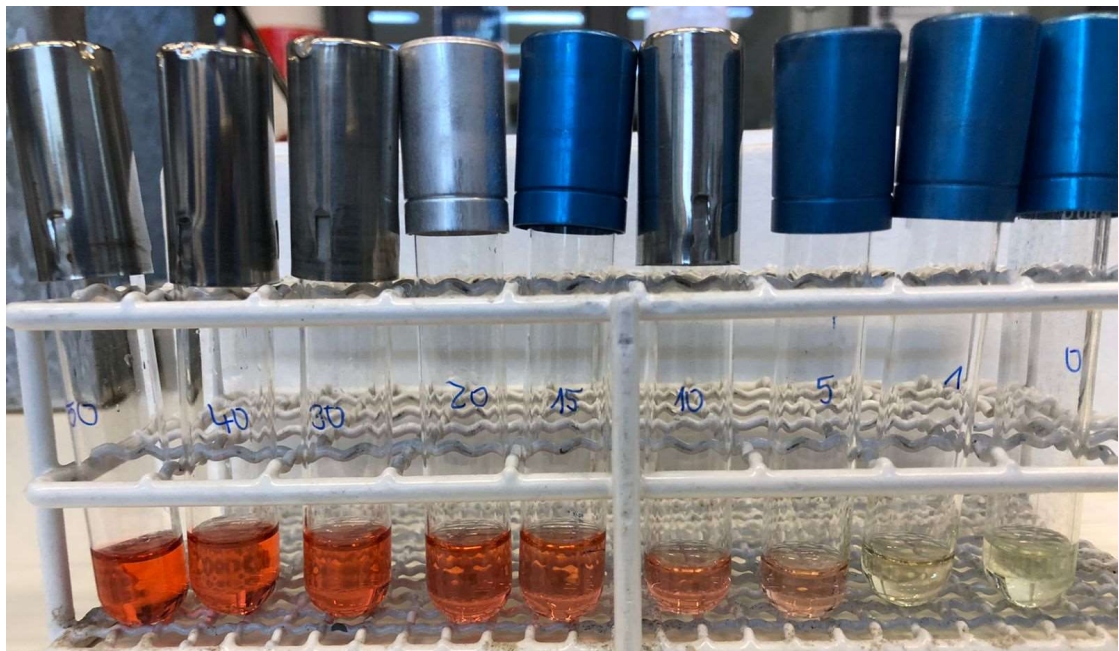


Figura 2. Curva estándar. De izquierda a derecha se presencia los tubos de mayor concentración a menor concentración. Se evidencia los distintos cambios de color, siendo el color más intenso (naranja) indicador de producción de auxina.

En tubos de ensayo, se agregó 1 ml de cada concentración más 1 ml del reactivo R1. Se esperó 15 min para medir la absorbancia a 530 nm de 2 ml en el espectrofotómetro Biotek Eon 259271. Este procedimiento de curva estándar se realizó dos veces.

Para evaluar si alguna cepa produce IAA, se realizaron dos ensayos para cada bacteria. Un ensayo consistió en cada cepa crecida aislada en tubos de ensayo con medio líquido R2A por 24 hrs en la incubadora de placas a 30°C. El otro ensayo, consistió en cada cepa crecida en conjunto con 2 mM triptófano en tubos de ensayo con medio líquido R2A por 24 hrs en la incubadora con agitación Daihan LabTech LSI-1005R a 30°C. De cada ensayo, se extrajo 1 ml de cada tubo de ensayo y se mezcló con 1 ml del reactivo R1, esperando 15 minutos. Pasado el tiempo, se midió la absorbancia de 2 ml de muestra a 530 nm en el espectrofotómetro Biotek Eon 259271.

Objetivo C.

Medio, Esterilización semillas y Condición crecimiento

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana*, *in vitro* en medio Murashige y Skoog (MS) (Cappellari et al., 2019; Finkel et al., 2019) con 1% agar (pH 5,7) en placas Petri cuadradas (12 cm × 12 cm) y selladas con cinta *parafilm* Bemis PM-996, crecidas dentro una cámara de cultivo a 21-22°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad por 14 días.

La estratificación de semillas de *Arabidopsis thaliana* se realizó esterilizando con etanol absoluto durante 1 min en vortex, Cloro 50% (50% agua destilada autoclavada y 50% Cloro comercial (10%)) durante 7 min en vortex, seguido de 3 lavados de agua destilada autoclavada durante 1 min en vortex (Khan et al., 2020), se agregó un último volumen de agua destilada autoclavada para dejar en estratificación durante 4 días para sincronizar la germinación (Poupin et al., 2013).

Las condiciones de crecimiento fueron estándares, por lo tanto, las semillas fueron sembradas en placas de Petri cuadradas (12 cm × 12 cm) con medio MS/2 y sin sacarosa para germinar las semillas (Finkel et al., 2019). Las placas fueron selladas con *parafilm* Bemis PM-996 y las semillas se dejaron germinando verticalmente. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de crecimiento vegetal a 21-22° C, fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad durante 14 días.

Definición de la concentración de las cepas a inocular.

La finalidad del ensayo fue identificar la concentración óptima en la que se presencié un efecto de la bacteria en el crecimiento de la raíz primaria y área de la roseta de *A. thaliana* en condiciones estándares. Para el presente ensayo, aproximadamente 4 días antes, se estratificaron 12 mg de semillas de *A. thaliana* (aproximadamente 600 semillas), para inocular 8 semillas por placa Petri cuadrada.

Primeramente, cada tratamiento de cada bacteria fue dividido en tres concentraciones distintas, para determinar la concentración que genere efectos adicionales sobre la planta *A. thaliana*. Cada cepa fue crecida en matraces de 250 ml en medio líquido R2A por 48 hrs. Se realizaron segundos inóculos para obtener mayor volumen. Cada cepa fue inoculada con 50 ml de medio MS/2 en placas Petri cuadradas, teniendo que diluir y/o centrifugar para disminuir y/o aumentar la magnitud de concentración.

Cada concentración tuvo 4 réplicas, obteniendo como final 12 placas por bacteria. La bacteria *P. putida* KT2440 fue llevada a concentraciones de 10^4 , 10^5 y $10^6 \frac{CFU}{ml}$. La bacteria *F. endophyticum* 522 y *A. brasilense* SP7 fueron llevada a concentraciones de 10^4 , 10^6 y $10^7 \frac{CFU}{ml}$. Las bacterias *V. paradoxus* B4 y *P. phytofirmans* PsJN fueron llevadas a concentraciones 10^4 , 10^6 y $10^8 \frac{CFU}{ml}$. Cada concentración de cada bacteria se mezcló con 50 ml de medio MS/2 y se esperó 45 min hasta que solidificó. Con una micropipeta RAININ Pipet-Lite XLS modelo P20 se dispuso 8 semillas separadas en la parte superior de cada placa Petri cuadrada, cada punta fue cambiada a medida que se inoculó cada semilla, evitando contaminación. Se realizaron 6 placas control solamente con medio MS/2 sin sacarosa. Cada placa fue sellada con *parafilm* Bemis PM-996 y dejadas de forma vertical en orden aleatorio en una cámara de cultivo con luz led a 21°C por 14 días.

Pasado los 14 días se procedió a escanear con el escáner fotográfico a color EPSON *Perfection* V600. Para analizar las estadísticas se utilizó Graphpad y las variables a

evaluar fueron largo raíz (cm) y área roseta (cm^2). Los datos de ambas variables a medir se obtuvieron con ImageJ. En Graphpad se realizaron análisis estadísticos de normalidad, como Shapiro-Wilk y D'Angostino-Pearson. Además, para saber si existía significancia entre los tratamientos, se realizó el test paramétrico ANOVA de una vía.

Recolección de exudados de la planta *A. thaliana*.

El objetivo del ensayo fue recaudar los exudados provenientes de *A. thaliana* para la evaluación del posible crecimiento de las cepas en estos. La recolección de exudados se realizó de dos formas distintas. El primer ensayo consistió en un experimento hidropónico con artefactos manuales. Se fabricó un *andamio*, el cual está compuesto por una malla plástica entre 2 placas plásticas con 70 agujeros, cerrada con amarras de plástico convencionales. Se pegaron 4 patas de plástico en cada extremo (Cillero J, et al 2019).

En recipientes plásticos esterilizados se vertió aproximadamente 50 ml de medio líquido MS/2 sin sacarosa, colocando el andamio a dentro con pinzas estériles. En cada agujero se inoculó con una micropipeta RAININ Pipet-Lite XLS modelo P20 una semilla previamente estratificada de *A. thaliana*. Este procedimiento se repitió 5 veces.

Cada recipiente plástico fue sellado con parafilm Bemis PM-996 y dispuestas en una cámara de cultivo con luz led a 21°C por 14 días. La recolección de exudados se realizó dentro de la cabina de seguridad biológica Nuaire clase II tipo A/B3 con una jeringa estéril de 50 ml y se vertió con filtros singer de 0.22 μm en tubos Falcon de 15 ml.

El segundo ensayo consistió en la recolección del exudado a partir de la extracción del agar de placas Petri. En placas redonda previamente dispuestas con medio semisólido MS/2 sin sacarosa, se inocularon 24 semillas estratificadas de *A. thaliana*. Se realizaron 13 réplicas, selladas con cinta *parafilm* Bemis PM-996 y dispuestas por 14 días en una cámara de cultivo con luz led a 21°C.

La recolección del exudado consistió en la extracción de cada planta, para luego centrifugar el agar y guardar el sobrenadante. El líquido fue filtrado con filtros singer 0.22 um y vertidos en Falcon de 50 ml.

Evaluación de la curva de crecimiento de las cepas en exudados.

A partir de los exudados recolectados en el ensayo previo, se analizó el efecto de estos para determinar su influencia en el crecimiento bacteriano. Esto se llevó a cabo mediante la medición prolongada del desarrollo de cada cepa usando el equipo Biotek EON 259271. Se realizaron dos ensayos en placas ELISA de 96 pocillos, debido que para el ensayo hidropónico se utilizó sacarosa y para el ensayo en agar no, entonces los tratamientos variaban. Los ensayos consistían en cuatro tratamientos a cada de las 6 cepas en estudio. Como primer paso, días previos, se debió crecer en tubos de ensayo cada cepa por separado en medio liquido R2A. Transcurrido el tiempo, se midió la OD de cada cepa, debido que las cepas deben iniciar a una OD 0.1. De cada tratamiento se realizó tres replicas. Como grupo control se usó el medio MS/2 con sacarosa y sin sacarosa más la adición de cada cepa por separado. Otro tratamiento fue medio liquido R2A más la adición de cada bacteria al 100% por separado. Un tercer tratamiento fue el líquido exudado -exudado extraído del ensayo hidropónico y exudado extraído del ensayo agar- más la adición de cada bacteria. Como último tratamiento se realizó 50% de líquido de exudado más 50% de cada bacteria crecida en medio R2A. La siguiente tabla (tabla 1) revela la disposición de cada tratamiento y de cada cepa dentro de la placa ELISA para el ensayo de exudado hidropónico, la variación con el segundo ensayo es el uso de MS/2 sin sacarosa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4
B	522	522	522	522	522	522	522	522	522	522	522	522
C	J70	J70	J70	J70	J70	J70	J70	J70	J70	J70	J70	J70
D	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440
E	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7	SP7
F	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN	PsJN
G												
H												

- Tratamiento medio líquido R2A más adición de cepa al 100%
- Tratamiento medio líquido MS/2 con sacarosa más adición de cepa al 100%
- Tratamiento líquido exudado más adición de cepa al 100%
- Tratamiento líquido exudado al 50% más adición de cepa al 50%

Tabla 1. Ilustración representativa de placa ELISA de 96 pocillos con los distintos tratamientos y las distintas cepas. Para ensayo hidropónico se usó MS/2 con sacarosa, para ensayo en agar se usó MS/2 sin sacarosa.

Análisis del efecto fenotípico en la planta modelo *A. thaliana* de las interacciones entre dos cepas.

Se buscó evaluar los efectos de combinaciones de cepas en la planta *A. thaliana*, centrándose en particular en la interacción con la cepa, *P. putida* KT2440, debido a los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos, que mostraron una inhibición del crecimiento hacia las otras bacterias. Los tratamientos fueron: *P. putida* KT2440 + *F. endophyticum* 522; *P. putida* KT2440 + *N. plantarum* Grainger J70; *P. phytofirmans* PsJN + *P. putida* KT2440; *P. putida* KT2440 + *V. paradoxus* B4; *P. putida* KT2440 + *A. brasilense* SP7. Además, se buscó evaluar el efecto de cada cepa aislada, teniendo grupos aislados de *P. putida* KT2440, *F. endophyticum* 522, *N. plantarum* Grainger J70, *P. phytofirmans* PsJN, *A. brasilense* SP7 y *V. paradoxus* B4. Como control negativo (grupo control) no se dispuso de ninguna cepa.

Las condiciones de crecimiento de la planta y estratificación de semillas fueron estándares. A partir del resultado del ensayo definición de concentración de bacteria en planta, la cantidad de bacteria a utilizada fue de una magnitud de $10^4 \frac{CFU}{ml}$. Por lo tanto, la suma de ambas cepas debió quedar a una magnitud de $10^4 \frac{CFU}{ml}$. Se combinó medio semisólido MS/2 sin sacarosa con las distintas cepas para luego verter aproximadamente 50 ml en cada placa Petri cuadrada y luego sembrar 8 semillas de *A. thaliana* -previamente estratificadas- con aproximadamente 1 cm de distancia entre semilla. Se realizaron 4 réplicas por cada tratamiento (48 placas totales), las cuales fueron selladas con *parafilm* Bemis PM-996 y dejadas de forma vertical en orden aleatorio en una cámara de cultivo con luz led a 21°C por 14 días.

Análisis del efecto fenotípico de la SynCom en la planta modelo *A. thaliana*.

El propósito del ensayo fue analizar los efectos en la planta causados por diferentes tamaños y miembros de la comunidad microbiana sintética. El objetivo principal fue explorar las diversas respuestas fenotípicas que los tratamientos pudieron inducir en *A. thaliana*. El ensayo constó de siete grupos, cada uno se realizó con condiciones ambientales y estratificación de semillas estándares. Los tratamientos evaluados fueron: SynCom (*F. endophyticum* 522 + *N. plantarum* Grainger J70 + *P. putida* KT 2440 + *V. paradoxus* B4 + *A. brasilense* SP7) más la adición de *P. phytofirmans* PsJN; SynCom sin cepa PsJN; SynCom sin cepa KT2440; SynCom sin cepa PsJN y KT2440; cepa *P. phytofirmans* PsJN aislada; cepa *P. putida* KT2440 aislada; grupo control (ausencia de bacterias).

El experimento fue realizado en placas Petri cuadradas, en las cuales se mezcló homogéneamente para cada grupo (exceptuando el grupo control) medio sólido MS/2 sin sacarosa más una magnitud final de bacterias de $10^4 \frac{CFU}{ml}$. Posteriormente, se sembraron en la parte superior 8 semillas con aproximadamente 1 cm de distancia entre semilla. Fueron selladas con *parafilm* Bemis PM-996 y dejadas de forma vertical en orden aleatorio en una cámara de cultivo con luz led a 21°C por 14 días. Se realizaron 4 réplicas por tratamientos (28 placas totales).

RESULTADOS

Objetivo A.

Aislamiento y crecimiento de bacterias representativas

Se aisló y creció con éxito 4 cepas bacterianas, *Flavobacterium endophyticum* 522, *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Variovorax paradoxus* B4. De cada cepa, se creció en placas de agar con medio R2A una colonia para su posterior uso. No se realizó extracción de DNA y PCR, puesto que estas cepas ya estaban identificadas y chequeadas previamente en el laboratorio.

Para las tres cepas restantes, se aislaron cepas provenientes de un stock en glicerol a -80°C, debido a que las cepas frescas no correspondían a las bacterias representativas. Se inició por aislarlas en medio líquido LB y en placas de agar con medio LB, logrando crecimiento en *Rhizobium etli* CFN y *Streptomyces olivochromogenes*.

La cepa *Nocardioides plantarum* Grainger J70 logró crecer débilmente en el medio LB y en sus dos medios óptimos según DSMZ (medio 92 y medio 535, véase en Anexos). Se obtuvo crecimiento en el medio líquido R2A, por lo tanto, se plaqueó por método de asa en placas Petri redonda con medio sólido R2A. Luego se realizó extracción de DNA y PCR, enviando a secuenciar a Macrogen en Corea del Sur para corroborar que correspondía a la bacteria en estudio.

La bacteria *Streptomyces olivochromogenes* fue aislada y crecida en el medio LB y 65, (medio óptimo según DSMZ, véase en Anexos). En ambos medios se obtuvo crecimiento granular, en el medio 65 los gránulos fueron más grandes. Al tener un fenotipo filamentoso, su eventual caracterización y uso en los experimentos iba a resultar complejo, decidiendo no incorporarla en la SynCom.

La bacteria *Rhizobium etli* CFN-42 creció, pero el resultado de la secuenciación no coincidía con la bacteria. Por lo tanto, se extrajo del crudo y se creció en medio líquido

LB y R2A, obteniendo nulo crecimiento, concluyendo no incorporarla en la SynCom. Debido a lo anterior, se cambió de cepa por la *Azospirillum brasilense* SP7, la cual proviene de la familia alpha-proteobacteria (al igual que *Rhizobium etli* CFN-42) y es representativa de la rizósfera de *A. thaliana* (Spaepen et al., 2014).

En resumen, se trabajó con 6 bacterias identificadas:

Flavobacterium endophyticum 522 (Bacteroidetes)

Paraburkholderia phytofirmans PsJN (β -proteobacteria)

Variovorax paradoxus B4 (β -proteobacteria)

Pseudomonas putida KT2440 (γ -proteobacteria)

Azospirillum brasilense SP7 (α -proteobacteria)

Nocardioides plantarum Grainger J70 (Actinobacteria)

Debido al difícil manejo, se desistió con las cepas *Rhizobium etli* CFN-42 (α -proteobacteria) y *Streptomyces olivochromogenes* (Actinobacteria).

Selección de medio óptimo de crecimiento bacteriano.

La finalidad de este ensayo es comprobar el medio general, en el cual todas las cepas crecen óptimamente para luego hacer uso de ese medio en los ensayos posteriores. El ensayo se realizó con 5 bacterias identificadas, *Flavobacterium endophyticum* 522, *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN, *Variovorax paradoxus* B4, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Azospirillum brasilense* SP7, debido que la cepa *N. plantarum* Grainger J70 todavía no era identificada.

Las cepas *Pseudomonas putida* KT2440 y *Azospirillum brasilense* SP7 crecieron óptimamente en todos los medios. La cepa *Flavobacterium endophyticum* 522 no creció en el medio GyM. La cepa *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN no presentó crecimiento en el medio M1. La cepa *V. paradoxus* B4 creció débilmente en el medio PyG, GyM y LB.

Todas las cepas crecieron óptimamente en el medio R2A, siendo este medio como el medio general para los eventuales ensayos de competencia a realizar.

La cepa *Nocardioides plantarum* Grainger J70 no está presente en este experimento, pero solo creció en el medio R2A. Esta cepa se demora aproximadamente 5-6 días en crecer en medio líquido y sólido. Se determinó al medio R2A como el óptimo para las 6 bacterias en estudio. En la tabla 2 se resumen los resultados del crecimiento de cada cepa en los distintos medios.

Tabla 2: Resultados del crecimiento de las distintas bacterias en los distintos medios previamente descritos.

MEDIOS	<i>P. putida</i> KT2440	<i>F. endophyticum</i>	<i>A. brasilense</i> SP7	<i>P. phytofirmans</i> PsJN	<i>V. paradoxus</i> B4
M1	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Débil	Crecimiento Débil	Crecimiento Nulo	Crecimiento Óptimo
GyM	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Nulo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Nulo
PyG	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Débil	Crecimiento Débil	Crecimiento Débil	Crecimiento Nulo
LB	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Débil	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Débil	Crecimiento Débil
R2A	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo

Tabla 2. Resultados del crecimiento de las distintas bacterias en los distintos medios previamente descritos. El color rojo significa existencia de inhibición. El color naranja significa existencia de inhibición no tan notoria. El color verde significa inexistencia de inhibición.

Relación cantidad bacterias presentes en medio de cultivo (CFU) con densidad óptica (OD)

La tabla 3 contiene los resultados de la cuantificación de CFU a una OD correspondiente.

Bacteria	Densidad óptica (OD)	$\left[\frac{CFU}{ml}\right]$
<i>P. putida</i> KT2440	0.6	5.35×10^6
<i>F. endophyticum</i> 522	0.7	6.6×10^7
<i>A. brasilense</i> SP7	0.6	1.07×10^7
<i>V. paradoxus</i> B4	0.6	5.34×10^7
<i>N. plantarum</i> Grainger J70	0.6	1.84×10^6
<i>P. phytofirmans</i> PsJN	0.6	1×10^8

Tabla 3. Resultados de cada cepa en estudio de la cuantificación de la unidad formadora de colonias (CFU) por ml a una densidad óptica determinada

Objetivo B.

Evaluación del crecimiento de cepas co-cultivadas en medio sólido.

El ensayo busca verificar si existe inhibición o falta de crecimiento al inocular una cepa homogéneamente al agar momento previo de solidificación y luego verter gotas de distintas cepas sobre el medio solidificado, con el fin de identificar posibles interacciones cooperativas y/o competitivas. A partir de las fotos escaneadas (figura 3) se pudo presenciar, que en las placas inoculadas homogéneamente con R2A con agar al 50% más la bacteria *V. paradoxus* B4 y *N. plantarum* Grainger J70, la cepa *P. putida* KT2440 generó un halo de inhibición.

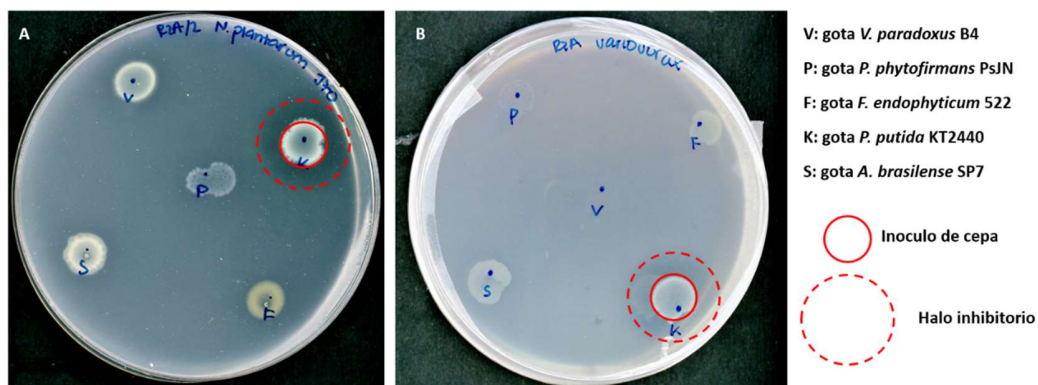


Figura 3. Ensayo Agar más Bacteria. (A) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% más la cepa *N. plantarum* Grainger J70 con presencia de halo inhibitorio de *P. putida* KT2440. (B) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% más la bacteria *V. paradoxus* B4 con presencia de halo inhibitorio de *P. putida* KT2440.

En las placas inoculadas homogéneamente con R2A con agar al 50% más la bacteria *F. endophyticum* 522 y *P. phytofirmans* PsJN las cepas inoculadas crecieron de forma normal y a su tiempo correspondiente (figura 4A y 4B). En la placa inoculada homogéneamente con R2A al 50% más la bacteria *P. putida* KT2440 (figura 4C), las cepas *V. paradoxus* B4 y *P. phytofirmans* PsJN no lograron crecer dentro del tiempo inoculado y las demás cepas crecieron débilmente. En las placas inoculadas homogéneamente con R2A con agar al 50% más la bacteria *A. brasilense* SP7 (figura 4D) no crecieron las cepas *F. endophyticum* 522 y *P. phytofirmans* PsJN. Las cepas *P. putida* KT2440 y *V. paradoxus* B4 crecieron luego de las 48 horas de incubación.

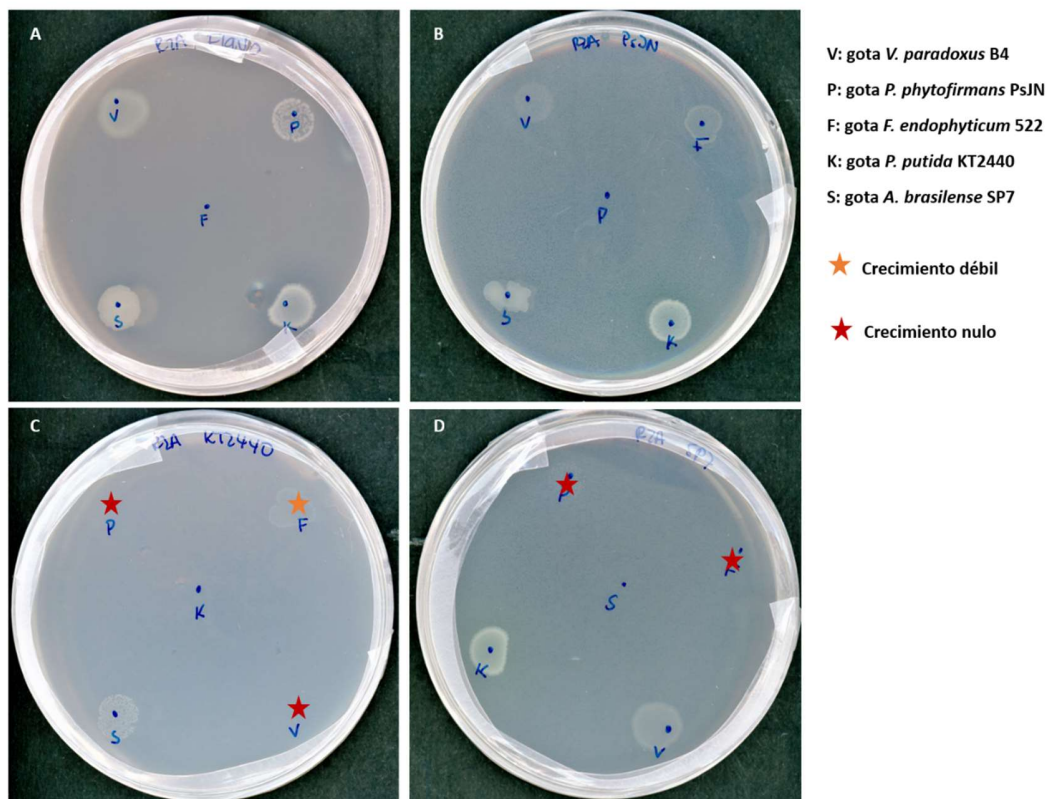


Figura 4. Ensayo Agar más Bacteria. (A) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% con la bacteria *F. endophyticum* 522. Todas las cepas crecieron normal. (B) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% con la bacteria *P. phytofirmans* PsJN. Todas las cepas crecieron normal. (C) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% y la bacteria *P. putida* KT2440. Estrellas rojas significa nulo crecimiento de cepas inoculadas *P. phytofirmans* PsJN y *V. paradoxus* B4. Estrellas naranjas significa débil crecimiento de cepa inoculada *F. endophyticum* 522. (D) Resultados de placas inoculadas con R2A al 50% y la bacteria *A. brasilense* SP7. Cepas *P. phytofirmans* PsJN y *F. endophyticum* 522 no lograron crecer.

La tabla 4 resume los resultados del presente ensayo. En la columna 1 se encuentran las placas Petri con la mezcla de R2A con agar al 50% más la cepa y en la fila 1 se encuentran las gotas de las cepas inoculadas en las respectivas placas Petri.

Tabla 4: Resumen de resultados visuales obtenidos del ensayo de R2A con agar al 50% más las distintas cepas con gotas inoculadas

Gotas inoculadas					
Agar + Bacteria	<i>P. putida</i> KT2440	<i>F. endophyticum</i>	<i>A. brasilense</i> SP7	<i>P. phytofirmans</i> PsJN	<i>V. paradoxus</i> B4
<i>P. putida</i> KT2440		Crecimiento Débil	Crecimiento Débil	Crecimiento Nulo	Crecimiento Nulo
<i>F. endophyticum</i>	Crecimiento Óptimo		Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo
<i>A. brasilense</i> SP7	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Débil		Crecimiento Débil	Crecimiento Óptimo
<i>P. phytofirmans</i> PsJN	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo		Crecimiento Óptimo
<i>V. paradoxus</i> B4	Halo Inhibitorio	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	
<i>N. plantarum</i> Grainger J70	Halo Inhibitorio	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo	Crecimiento Óptimo

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos del presente ensayo. En la columna 1 se describen las bacterias inoculadas con el agar posteriormente puestas en placas Petri. En la fila 1 se describen las gotas de las cepas inoculadas en cada placa Petri. El color rojo significa existencia de inhibición. El color naranja significa existencia de inhibición no tan notoria. El color verde significa inexistencia de inhibición.

Evaluación del crecimiento de las cepas de la SynCom en contacto indirecto.

El presente ensayo busca verificar el comportamiento de las bacterias una vez que son inoculadas al mismo tiempo a una distancia cercana (sin tocarse). La cepa *P. putida* KT2440 inhibió el crecimiento de todas las otras cepas, inhibiendo notoriamente a las cepas *V. paradoxus* B4, *F. endophyticum* 522, *P. phytofirmans* PsJN e inhibiendo levemente a las cepas *A. brasilense* SP7 y *N. plantarum* Grainger J70 (figura 5A). En las placas inoculadas con las cepas *F. endophyticum* 522 (figura 5B) y *A. brasilense* SP7 (figura 5D) se presentó una leve inhibición hacia la cepa *V. paradoxus* B4. Las cepas *P.*

phytofirmans PsJN (no se muestra figura), *N. plantarum* Grainger J70 (figura 5C) y *V. paradoxus* B4 (no se muestra figura) no ejercieron ninguna inhibición sobre las otras cepas.

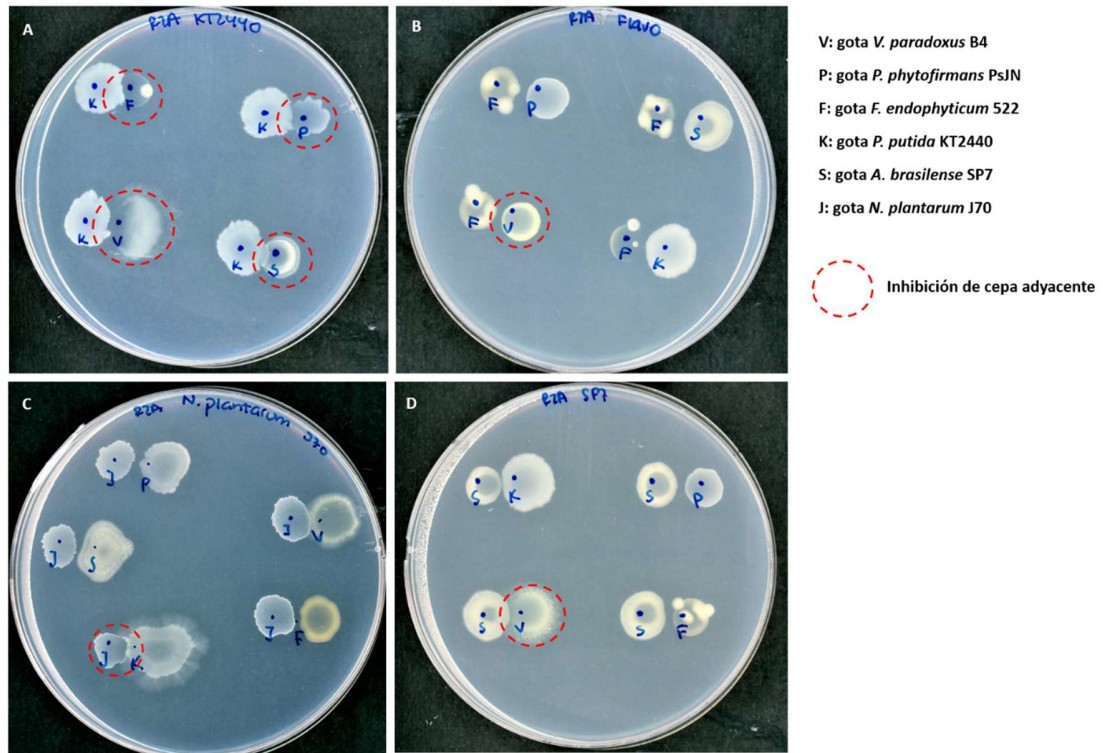


Figura 5. Ensayo Gotas Adyacentes. (A) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de 8 ul *P. putida* KT2440 junto a gotas de cepas restantes. Se presencia inhibición de crecimiento en las cuatro cepas. (B) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de de 8 ul *F. endophyticum* 522 junto a gotas de las otras cepas. Presencia leve inhibición de cepa *V. paradoxus* B4. (C) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de 8 ul *N. Plantarum* Grainger J70 junto a gotas de las otras cepas. Se presencia leve inhibición con cepa de cepa *P. putida* KT2440. (D) Placas Petri inoculadas con 4 gotas de 8 ul *A. brasilense* SP7 junto a gotas de las otras cepas. Se presencia leve inhibición de cepa *V. paradoxus* B4.

La tabla 5 resume los resultados de todos los ensayos. Las placas de *V. paradoxus* B4 y *P. phytofirmans* PsJN no presentaron ningún signo inhibitorio hacia las otras cepas. Las placas de *P. putida* KT2440 provocó inhibición en cada cepa adyacente.

Tabla 5: Resumen de resultados visuales inhibitorios del ensayo Gotas Adyacentes

Inhibidas						
Inhibitorias	<i>P. putida</i> KT2440	<i>F. endophyticum</i> 522	<i>A. brasilense</i> SP7	<i>P. phytofirmans</i> PsJN	<i>V. paradoxus</i> B4	<i>N. plantarum</i> Grainger J70
<i>P. putida</i> KT2440		Notoria Inhibición	Leve Inhibición	Notoria Inhibición	Notoria Inhibición	Leve Inhibición
<i>F. endophyticum</i>	Sin Inhibición		Sin Inhibición	Sin Inhibición	Leve Inhibición	Sin Inhibición
<i>A. brasilense</i> SP7	Sin Inhibición	Sin Inhibición		Sin Inhibición	Leve Inhibición	Sin Inhibición
<i>P. phytofirmans</i> PsJN	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición		Sin Inhibición	Sin Inhibición
<i>V. paradoxus</i> B4	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición		Sin Inhibición
<i>N. plantarum</i> Grainger J70	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	

Tabla 5. Resultados de ensayos de gotas adyacentes y todas las posibles combinaciones.

En la columna 1 se describen las bacterias que generan inhibición a otras cepas. En la fila 1 se describen las bacterias que fueron inhibidas. El color rojo significa existencia de inhibición. El color naranja significa existencia de inhibición no tan notoria. El color verde significa inexistencia de inhibición.

Evaluación del crecimiento de cepas en contacto directo.

Al igual que el ensayo anterior, se busca comprobar el comportamiento del crecimiento de una cepa al estar en contacto directo con otra cepa, con el fin de verificar si existe inhibición o si crecen óptimamente. Las placas con el trazo vertical de la bacteria *P. putida* KT2440 (figura 6A) presentó inhibición notoria hacia *F. endophyticum* y *V. paradoxus* B4 e inhibición leve hacia *P. phytofirmans* PsJN. En las placas con el trazo vertical de *P. phytofirmans* PsJN (figura 6B) y *F. endophyticum* (figura 6C) se presenció una notoria inhibición hacia la cepa *V. paradoxus* B4. Las placas con trazo vertical de las

bacterias *A. brasilense* SP7, *V. paradoxus* B4 y *N. plantarum* Grainger J70 no generaron ningún signo inhibitorio hacia las demás cepas (no se muestran figuras).

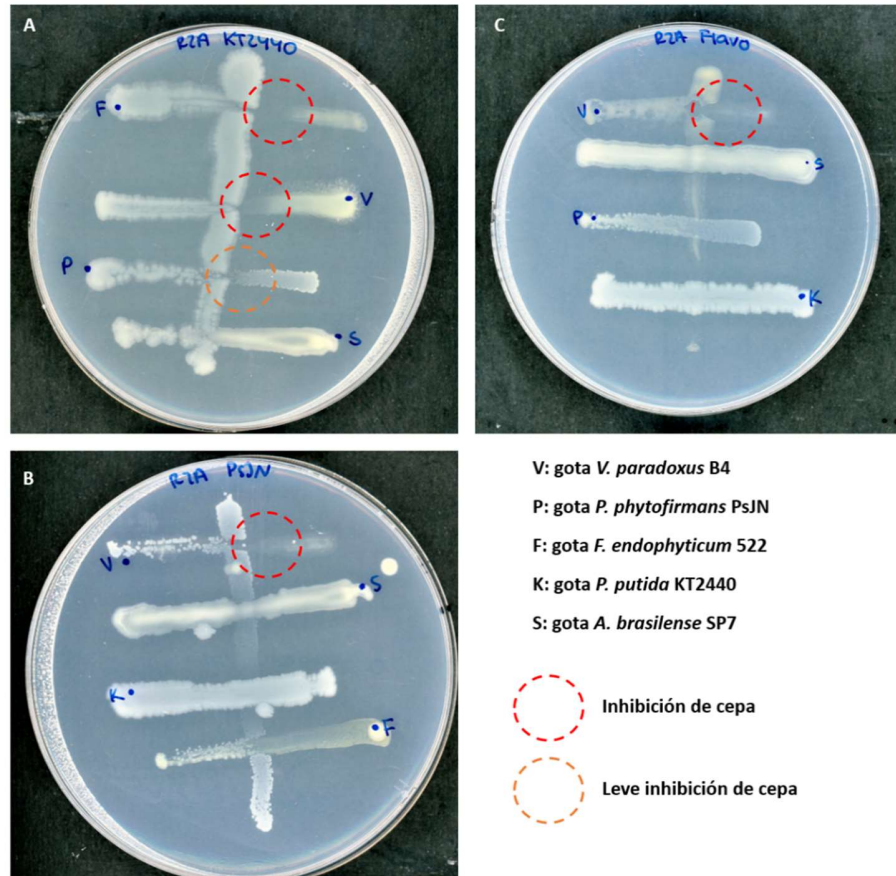


Figura 6. Ensayo Rayas Cruzadas. (A) Placa con trazo vertical de *P. putida* KT2440. Círculo rojo intermitente representa notoria inhibición hacia cepa *V. paradoxus* B4 y *F. endophyticum* 522. Círculo amarillo representa leve inhibición hacia *P. phytofirmans* PsJN. (B) Placa con trazo vertical de *P. phytofirmans* PsJN. Círculo rojo notoria inhibición hacia *V. paradoxus* B4. (C) Placa con trazo vertical de *F. endophyticum* 522. Círculo rojo notoria inhibición hacia *V. paradoxus* B4.

La tabla 6 resume los resultados visuales que se obtuvieron.

Tabla 6: Resumen de resultados visuales de ensayo rayas cruzadas.					
Línea horizontal	<i>P. putida</i> KT2440	<i>F. endophyticum</i> 522	<i>A. brasilense</i> SP7	<i>P. phytofirmans</i> PsJN	<i>V. paradoxus</i> B4
Línea vertical					
<i>P. putida</i> KT2440		Notoria Inhibición	Sin Inhibición	Leve Inhibición	Notoria Inhibición
<i>F. endophyticum</i> 522	Sin Inhibición		Sin Inhibición	Sin Inhibición	Notoria Inhibición
<i>A. brasilense</i> SP7	Sin Inhibición	Sin Inhibición		Sin Inhibición	Sin Inhibición
<i>P. phytofirmans</i> PsJN	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición		Notoria Inhibición
<i>V. paradoxus</i> B4	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	
<i>N. plantarum</i> J70	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición

Tabla 6. En la columna 1 se dispone las bacterias inoculadas de forma vertical en la placa Petri. En la fila 1 se disponen las bacterias inoculadas de forma perpendicular a la línea vertical.

Análisis del crecimiento simultaneo entre cepas de la SynCom en medio líquido R2A.

La finalidad de este ensayo fue documentar el crecimiento simultaneo de dos cepas distintas inoculadas a la misma concentración en medio R2A líquido, para verificar si existe inhibición de alguna cepa sobre otra, si alguna cepa cambia el fenotipo o si crecen óptimamente. Los resultados del presente ensayo fueron resumidos en la siguiente tabla (tabla 7), en la cual se dividen por las combinatorias de bacterias, los fenotipos presentes transcurrido 48 hrs y las observaciones sobre las colonias crecidas.

Combinaciones	Fenotipos Presentes	Observaciones
<i>V. paradoxus</i> B4 <i>A. brasilense</i> SP7	Ambos (fácil distinción)	<i>A. brasilense</i> SP7 colonias más grandes. Similar cantidad.
<i>V. paradoxus</i> B4 <i>P. phytofirmans</i> PsJN	Ambos (difícil distinción)	Ambas colonias muy pequeñas y en gran cantidad.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. phytofirmans</i> PsJN	Ambos (fácil distinción)	<i>P. putida</i> KT2440 colonias grandes y en mayor cantidad. <i>P. phytofirmans</i> PsJN colonias muy pequeñas.
<i>P. phytofirmans</i> PsJN <i>A. brasilense</i> SP7	Ambos (fácil distinción)	<i>A. brasilense</i> SP7 colonias grandes. <i>P. phytofirmans</i> PsJN colonias muy pequeñas.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>A. brasilense</i> SP7	Ambos (fácil distinción)	<i>P. putida</i> KT2440 colonias grandes y mayor cantidad. <i>A. brasilense</i> SP7 colonias grandes y menor cantidad.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>F. endophyticum</i>	Ambos (fácil distinción)	<i>P. putida</i> KT2440 colonias grandes. <i>F. endophyticum</i> colonias muy pequeñas.
<i>V. paradoxus</i> B4 <i>P. putida</i> KT2440	Ambos (difícil distinción)	<i>P. putida</i> KT2440 colonias grandes y en mayor cantidad. <i>V. paradoxus</i> B4 colonias muy pequeñas.
<i>A. brasilense</i> SP7 <i>F. endophyticum</i>	Ambos (fácil distinción)	<i>A. brasilense</i> SP7 colonias grandes. <i>F. endophyticum</i> colonias muy pequeñas.
<i>F. endophyticum</i> <i>V. paradoxus</i> B4	Ambos (fácil distinción)	Ambas colonias muy pequeñas y en gran cantidad.
<i>F. endophyticum</i> <i>P. phytofirmans</i> PsJN	Ambos (fácil distinción)	Ambas colonias muy pequeñas y en gran cantidad.
<i>N. plantarum</i> J70 <i>F. endophyticum</i>	Ambos (fácil distinción)	<i>F. endophyticum</i> colonias pequeñas y amarillas. <i>N. plantarum</i> J70 colonias muy pequeñas y blancas. Cantidades similares.
<i>N. plantarum</i> J70 <i>P. phytofirmans</i> PsJN	Ambos (fácil distinción)	<i>N. plantarum</i> J70 colonias muy pequeñas y blancas. <i>P. phytofirmans</i> PsJN colonias pequeñas y blancas. Cantidades similares.
<i>N. plantarum</i> J70 <i>V. paradoxus</i> B4	Ambos (difícil distinción)	<i>N. plantarum</i> J70 colonias muy pequeñas y menor cantidad. <i>V. paradoxus</i> B4 colonias pequeñas y mayor cantidad.
<i>N. plantarum</i> J70 <i>P. putida</i> KT2440	Ambos (fácil distinción)	<i>N. plantarum</i> J70 colonias muy pequeñas. <i>P. putida</i> KT2440 colonias grandes. Cantidades similares.
<i>N. plantarum</i> J70 <i>A. brasilense</i> SP7	Ambos (fácil distinción)	<i>N. plantarum</i> J70 colonias muy pequeñas y mayor cantidad. <i>A. brasilense</i> SP7 colonias grandes.

Tabla 7. Resumen de los distintos fenotipos de las combinatorias y de las distinciones de las cepas. Columna 1 se presentan las distintas combinaciones, columna 2 se presentan los fenotipos presentes y en la columna 3 las observaciones.

La figura 7 representa las distintas combinatorias de la cepa *P. putida* KT2440 con las distintas cepas a una dilución de 1:100.000. Las demás combinatorias no se muestran, pero sus respectivos fenotipos están descritos en la tabla 6.

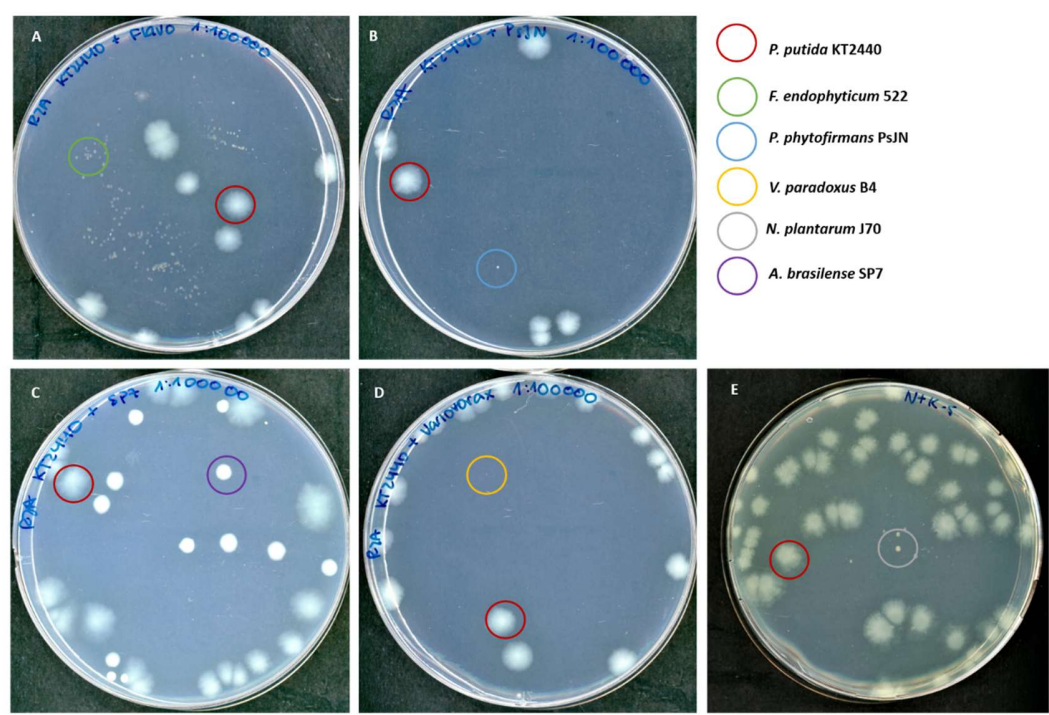


Figura 7. Ensayo Mezclas. (A) Placa de mezcla entre *P. putida* KT2440 y *F. endophyticum* 522. (B) Placa de parejas *P. phytofirmans* PsJN y *P. putida* KT2440. (C) Placa con combinación de *A. brasilense* SP7 y *P. putida* KT2440. (D) Placa de mezcla entre *V. paradoxus* B4 y *P. putida* KT2440. (E) Placa combinatoria *P. putida* KT2440 y *N. plantarum* J70. Figura demuestra diferencias de fenotipos de colonias de las diferentes cepas.

Capacidades metabólicas de las cepas miembros de la SynCom.

Este experimento se realizó con el fin de verificar si alguna bacteria es capaz de solubilizar fósforo. Las cepas *P. phytofirmans* PsJN y *A. brasilense* SP7 lograron solubilizar fósforo, debido que se generó un halo (círculos intermitentes verdes) alrededor de la cepa crecida (figura 8A).

Este experimento se realizó con el fin de verificar si alguna bacteria es capaz de producir sideróforos. La cepa *P. putida* KT2240 solubilizó hierro, formando un halo (círculos intermitentes verdes). Sin embargo, no se obtuvo crecimiento de las cepas *P. phytofirmans* PsJN, *F. endophyticum*, *V. paradoxus* B4 y *N. plantarum* Grainger J70 (figura 8B).

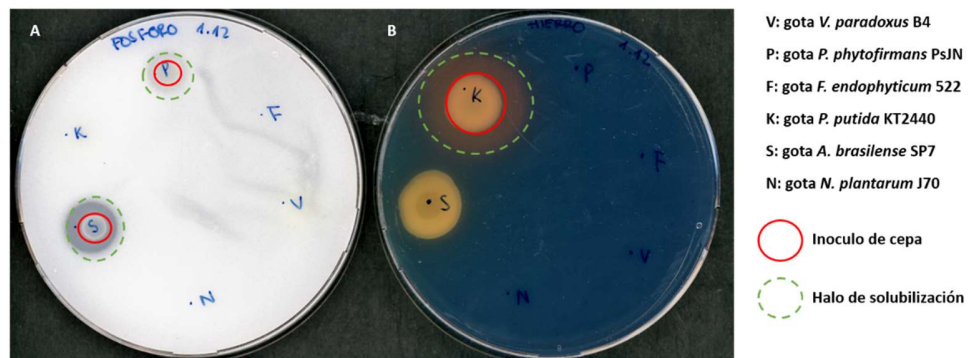


Figura 8. Solubilizaciones. (A) Solubilización de fósforo. Círculos intermitentes verdes presencia de solubilización de fósforo en las cepas *P. phytofirmans* PsJN y *A. brasilense* SP7. (B) Solubilización de hierro. Círculos intermitentes verdes presencia de solubilización de hierro en cepa *P. putida* KT2240.

Este experimento se realizó con el fin de verificar si alguna bacteria es capaz de producir auxina. Del primer ensayo (sin la adición de triptófano), todas las cepas estuvieron entre la absorbancia de la curva estándar con concentraciones $10 \frac{mg}{L}$ y $15 \frac{mg}{L}$, obteniendo la mayor medición de OD la cepa *P. putida* KT2440 (figura

9A). En el segundo ensayo (con la adición de triptófano) las cepas *F. endophyticum* 522, *V. paradoxus* B4, *P. phytofirmans* PsJN no presenciaron un cambio significativo en la medición de absorbancia, manteniéndose entre las concentraciones $10 \frac{mg}{L}$ y $15 \frac{mg}{L}$ (figura 9B). La cepa *P. putida* KT2440 tuvo una medición acorde a la concentración de $20 \frac{mg}{L}$, presenciando visualmente un cambio de color. La bacteria *A. brasilense* SP7 tuvo un resultado mayor a la máxima medida por el espectrofotómetro, se diluyó 1:2, lo cual corresponde a una concentración de $50 \frac{mg}{L}$.

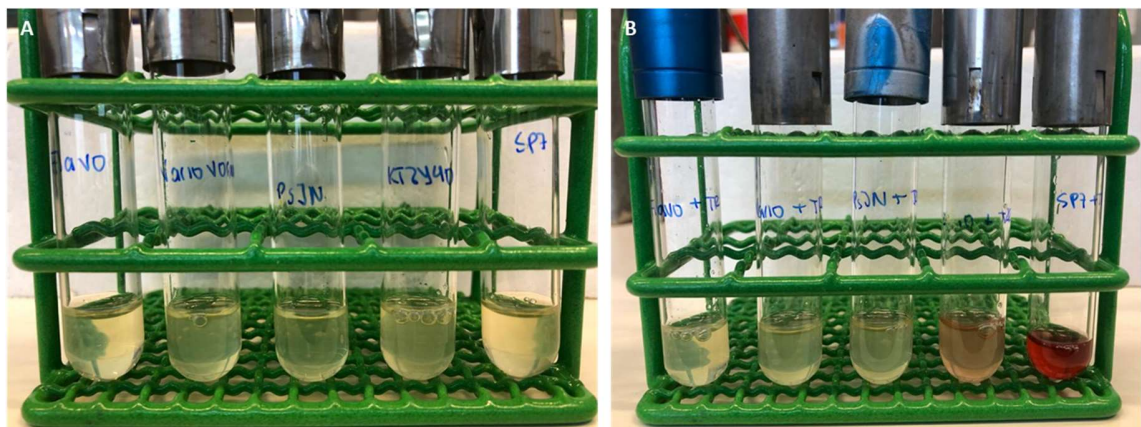


Figura 9. Producción auxina. (A) Tubos de ensayo con las cinco cepas crecidas en medio líquido R2A. Visualmente no existe cambio de coloración. (B) Tubos de ensayo con las cinco cepas más la adición de triptófano. Visualmente queda evidenciado que las cepas *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7 producen auxina. En (A) y (B) de izquierda a derecha: *F. endophyticum* 522, *V. paradoxus* B4, *P. phytofirmans* PsJN, *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7.

Objetivo C.

Definición de la concentración de las cepas integrantes de la SynCom a inocular en la planta *A. thaliana*.

Este ensayo tiene como finalidad definir la concentración de cada cepa que tenga mayor efecto promotor del crecimiento (midiendo largo de raíz y área de roseta) sobre

la planta *A. thaliana*, para luego utilizar dicha concentración en los ensayos de parejas y de SynCom. Las siguientes figuras (10-15) reflejan los resultados visuales de la planta *A. thaliana* 14 días después de la germinación y los gráficos representan los datos obtenidos con sus respectivos análisis estadísticos. Se representó al control como el 100%, por lo que se puede apreciar porcentualmente los cambios de las variables a distintas concentraciones de cada cepa.

Para los datos de área de roseta de todas las cepas la distribución no fue normal, transformándola a una distribución logarítmica. Se realizó ANOVA de una vía a todas las cepas y se procedió a identificar datos significativos. Para los datos de largo de raíz *V. paradoxus* B4, *A. brasilense* SP7 y *P. putida* KT2440 la distribución debió ser transformada a logaritmo. Se realizó ANOVA de una vía a todas las cepas y se procedió a identificar datos significativos, los cuales quedan denotados en las siguientes figuras (10-15). A partir de los test estadísticos se logra evidenciar que los efectos más significativos, tanto para largo de raíz y área roseta, fueron a las concentraciones $10^4 \frac{CFU}{ml}$.

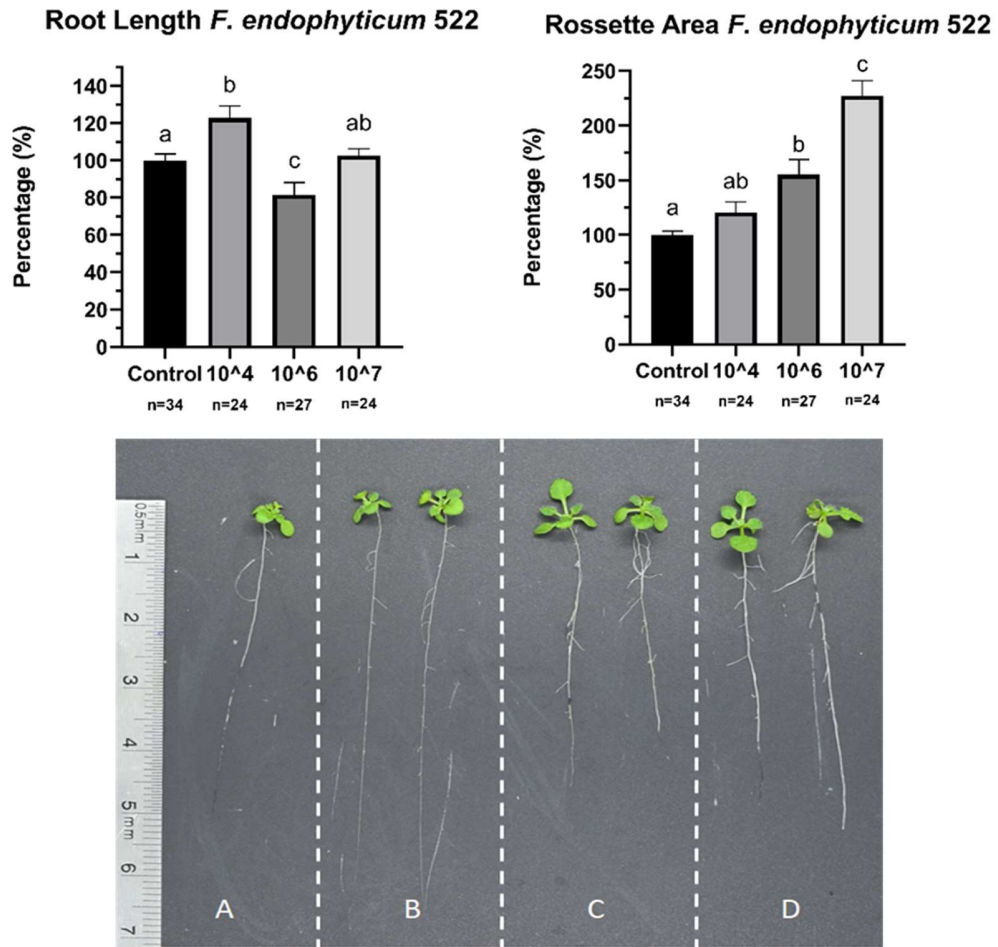


Figura 10. Ensayo concentración bacteria *F. endophyticum* 522. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *F. endophyticum* 522 a concentraciones 10^4 , 10^6 y 10^7 $\frac{CFU}{ml}$. (A) Control, (B) 10^4 $\frac{CFU}{ml}$, (C) 10^6 $\frac{CFU}{ml}$ y (D) 10^7 $\frac{CFU}{ml}$.

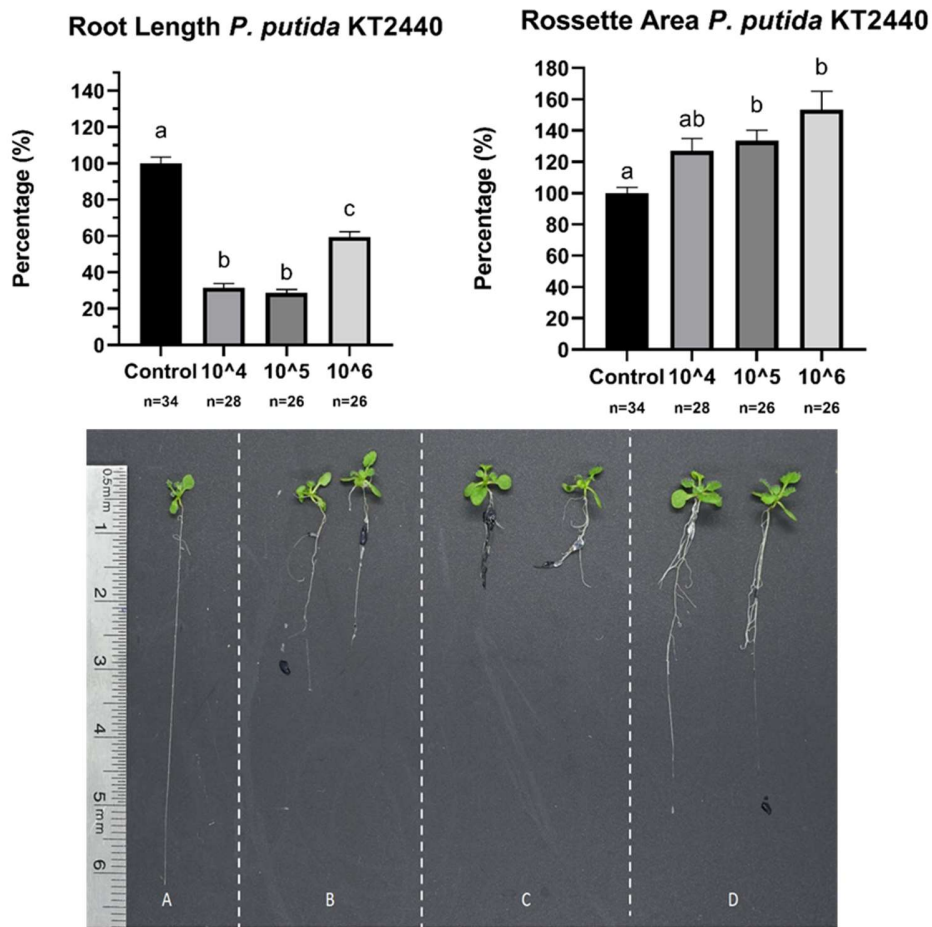


Figura 11. Ensayo concentración bacteria *P. putida* KT2440. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. Grupo control es significativo en comparación con los distintos grupos de concentraciones. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *P. putida* KT2440 a concentraciones 10^4 , 10^5 y $10^6 \frac{CFU}{ml}$. (A) Control; (B) $10^4 \frac{CFU}{ml}$; (C) $10^5 \frac{CFU}{ml}$; (D) $10^6 \frac{CFU}{ml}$.

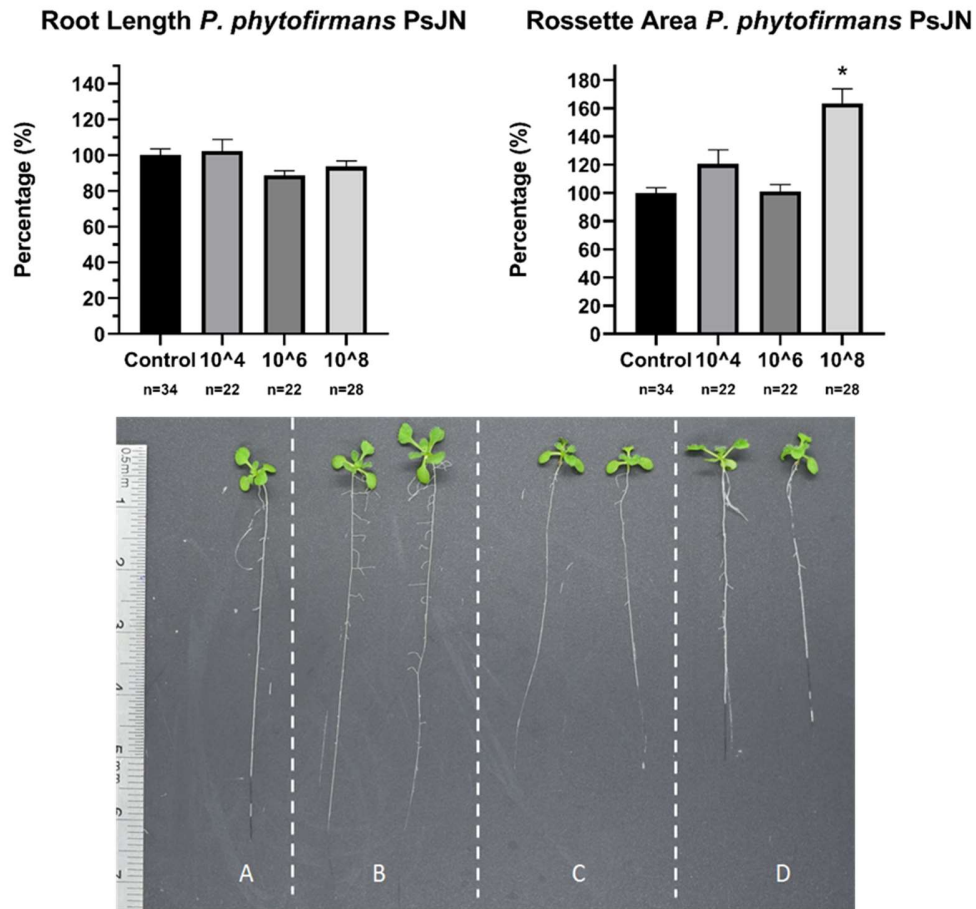


Figura 12. Ensayo concentración bacteria *P. phytofirmans* PsJN. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Concentración 10^8 es significativo en comparación con otras concentraciones. Resultados visuales y estadísticos de planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *P. phytofirmans* PsJN a concentraciones 10^4 , 10^6 y $10^8 \frac{CFU}{ml}$. (A) Control; (B) $10^4 \frac{CFU}{ml}$; (C) $10^6 \frac{CFU}{ml}$; (D) $10^8 \frac{CFU}{ml}$.

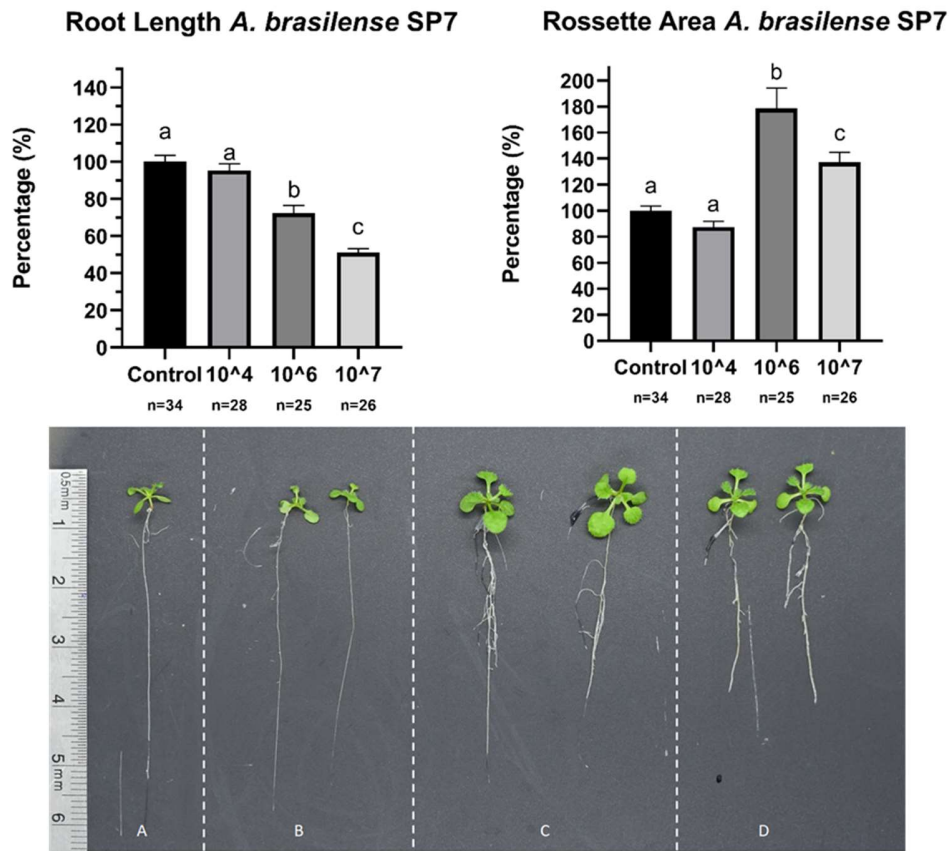


Figura 13. Ensayo concentración bacteria *A. brasilense* SP7. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. Concentración 10^6 y 10^7 son significativos en comparación con grupo control y concentración 10^4 . (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Concentración 10^6 y 10^7 son significativos en comparación con grupo control y concentración 10^4 . Resultados visuales y estadísticos de planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *A. brasilense* SP7 a concentraciones 10^4 , 10^6 y 10^7 $\frac{CFU}{ml}$. (A) Control; (B) 10^4 $\frac{CFU}{ml}$; (C) 10^6 $\frac{CFU}{ml}$; (D) 10^7 $\frac{CFU}{ml}$.

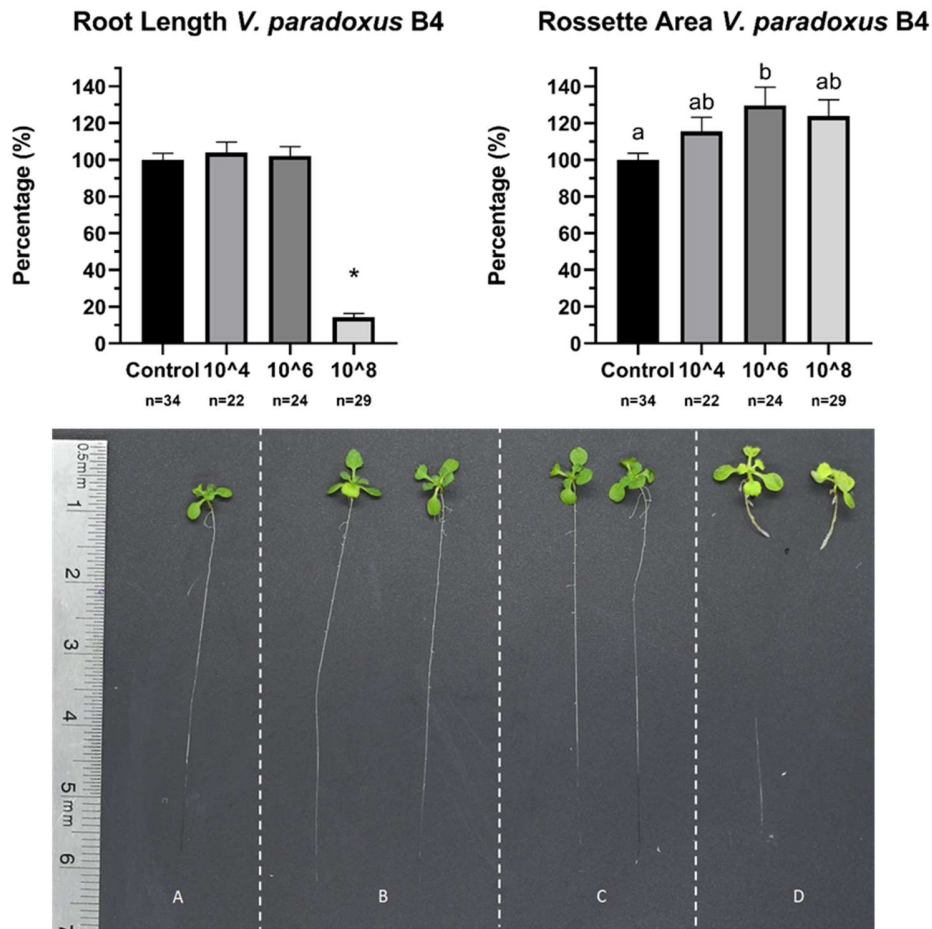


Figura 14. Ensayo concentración bacteria *V. paradoxus* B4. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz, existe significancia en concentración 10^8 con respecto a las otras concentraciones. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de la planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *V. paradoxus* B4 a concentraciones 10^4 , 10^6 y 10^8 $\frac{CFU}{ml}$. (A) Control; (B) 10^4 $\frac{CFU}{ml}$; (C) 10^6 $\frac{CFU}{ml}$; (D) 10^8 $\frac{CFU}{ml}$.

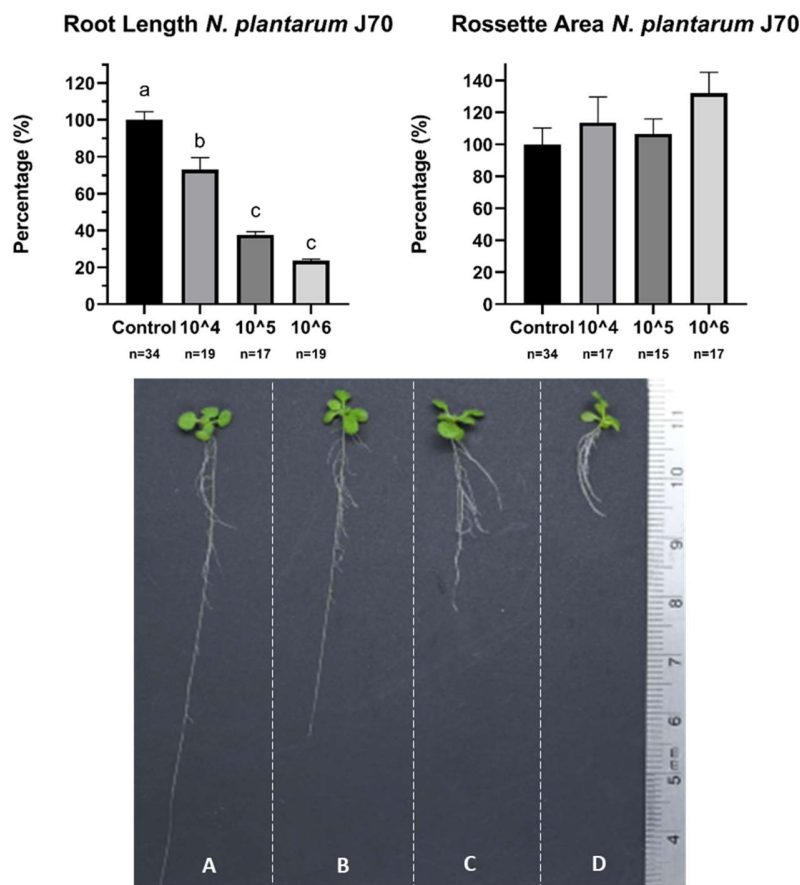


Figura 15. Ensayo concentración bacteria *N. plantarum* J70. (Izquierda) gráfico porcentual del largo de raíz. Concentración 10⁵ y 10⁶ son significativos en comparación con grupo control y 10⁴. (Derecha) gráfico porcentual del área de la roseta. Resultados visuales y estadísticos de la planta *A. thaliana* inoculada en medio MS/2 con bacteria *N. plantarum* J70 a concentraciones 10⁴, 10⁵ y 10⁶ $\frac{CFU}{ml}$. (A) Control; (B) 10⁴ $\frac{CFU}{ml}$; (C) 10⁵ $\frac{CFU}{ml}$; (D) 10⁶ $\frac{CFU}{ml}$.

Recolección de los exudados radiculares de la planta *A. thaliana*.

Se realizó el presente ensayo de dos formas distintas, buscando obtener el mayor concentrado de exudado. Además, la finalidad de este fue recolectar y guardar los exudados provenientes de la raíz de *A. thaliana* y utilizarlo con el fin de evaluar el efecto/comportamiento de las bacterias.

Después de 14 días en los ensayos hidropónicos se obtuvo crecimiento de raíz en 2 de las 5 réplicas, recolectando aproximadamente 200 ml de exudados. El exudado recolectado fue filtrado con filtros *synger* de 0.22 μm y dispuestos en tubos Falcon de 15 ml para luego almacenarlos a -80°C . Para una de las réplicas, de un total de 40 semillas inoculadas en los orificios, germinaron y crecieron 30 semillas. Para la otra réplica, de un total de 48 semillas puestas en los orificios, se obtuvo un crecimiento de 32 semillas. La figura 16A muestra los andamios y las semillas inoculadas después de los 14 días desde la germinación.

Del ensayo de recolección de exudados a partir de agar se procedió a retirar con pinzas estériles cada planta de *A. thaliana*, luego el agar fue centrifugado tres veces a 15.000 rpm por 5 min para recolectar el sobrenadante y proceder a filtrar con jeringas de 50 ml con filtros *synger* 0.22 μm . Se obtuvo aproximadamente 150 ml de exudado.

La figura 16B muestra el crecimiento de las plantas después de 14 días en la cámara de plantas.

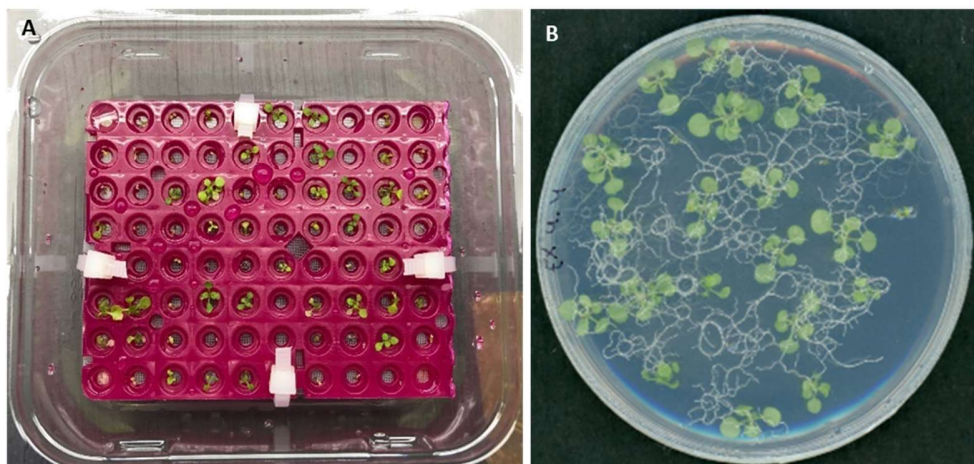


Figura 16. Ensayo Recolección Exudados. (A) Ensayo recolección exudados en hidropónico. Visualización de arriba del andamio después de 14 días de germinación. (B) Ensayo recolección exudados en agar. Visualización después de 14 días de germinación.

Evaluación de la curva de crecimiento de las cepas en exudados.

El presente ensayo tiene como finalidad evaluar el crecimiento de las distintas cepas con el exudado recolectado, sometiendo a cada cepa a 4 tratamientos: Grupo control (MS/2 sin sacarosa + cepa); 100% R2A + cepa; 100% Exudado + cepa; 50% exudado + 50% cepa en MS/2 (previamente crecida en R2A líquido). A partir de la recolección de datos en el Biotek EON 259271 se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada batería en los distintos tratamientos. Las curvas fueron analizadas con exudados del ensayo hidropónico y del agar, debido que se obtuvo mayor crecimiento de raíz en el ensayo de agar, los siguientes resultados corresponden a los gráficos obtenidos del ensayo de agar. Todas las cepas, a excepción de *F. endophyticum* 522, logran crecer con el exudado de *A. thaliana*. El mayor crecimiento de todas se obtuvo en el tratamiento de R2A. En los tratamientos de 50% exudado se obtuvo aproximadamente la mitad de crecimiento, que en los tratamientos de 100% exudado. Por último, en el grupo control (MS/2 sin sacarosa) no se presenció crecimiento de las cepas. La figura 17 muestra los resultados de las curvas de cada bacteria en los distintos tratamientos.

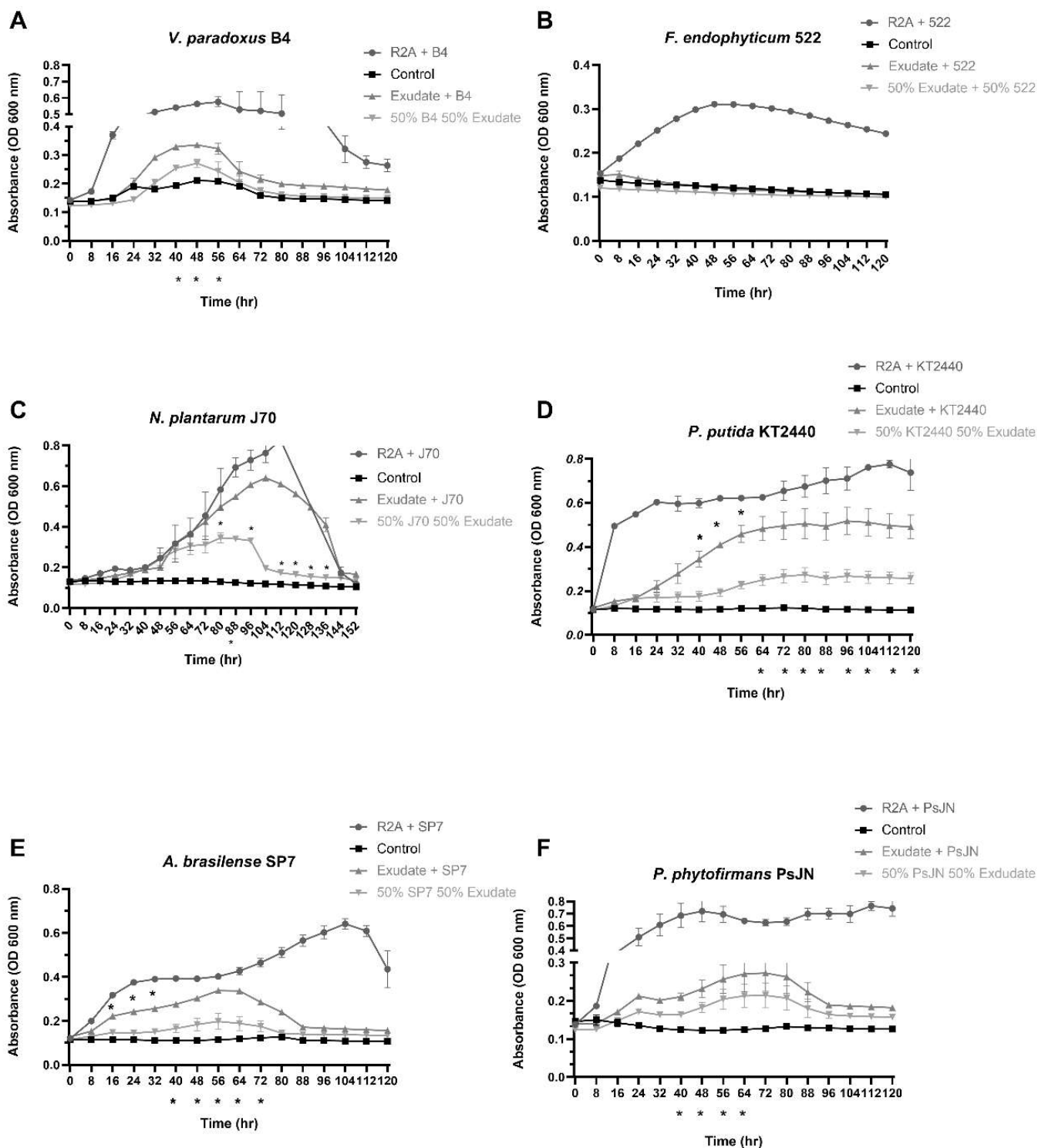


Figura 17. Curvas de Crecimiento en Exudados. (A) Gráfico de cepa *V. paradoxus* B4 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. (B) Gráfico de cepa *F. endophyticum* 522 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. (C) Gráfico de *N. plantarum* J70 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 152 hrs de crecimiento. (D) Gráfico de cepa *P. putida* KT2440 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. En las horas 40, 48, 56 existe significancia en el tratamiento exudado + *P. putida* KT2440 con respecto a los otros tratamientos. A partir de la hora 64 hay significancia entre todos los tratamientos. (E) Gráfico de cepa *A. brasilense* SP7 con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. En las horas 16, 24 y 32 existe significancia del grupo Exudado + *A. brasilense* SP7 con respecto a los otros tratamientos. En las horas 40, 48, 56 y 64 existe significancia entre todos los tratamientos. (F) Gráfico de cepa *P. phytofirmans* PsJN con las respectivas curvas de crecimiento de los distintos tratamientos, mostrando 120 hrs de crecimiento. En las horas 40, 48, 56 y 64 existe significancia entre todos los tratamientos.

Análisis del efecto fenotípico en la planta modelo *A. thaliana* de la interacción entre dos cepas.

El ensayo constó de la combinación de cepas realizando 12 grupos con 4 réplicas cada uno. La finalidad fue evaluar los efectos de las combinaciones de *P. putida* KT2440 junto a las demás cepas sobre la planta. Después de 14 días las placas Petri fueron escaneadas y se realizaron análisis estadísticos en Graphpad. A partir de las imágenes escaneadas se midió largo de raíz (cm) y área de roseta (cm²) utilizando el programa ImageJ. En Graphpad se analizaron los ensayos estadísticos. Los datos de largo de raíz y área de roseta fueron transformados a logaritmo y posteriormente se procedió a realizar un ANOVA de una vía. Por un lado, en los tratamientos aislados del largo de raíz, las cepas *P. putida* KT2440 y *N. plantarum* J70 acortaron significativamente el tamaño. En los tratamientos de parejas, el efecto de *P. putida* KT2440 predominó, excepto en conjunto con la cepa *P. phytofirmans* PsJN, la cual logra revertir

significativamente el efecto. Por otro lado, para el área de roseta, todas las cepas aisladas presentaron mayor área que el grupo control, siendo *F. endophyticum* 522 la única significativa. En parejas, se logra presenciar una leve disminución del área de roseta, pero insignificante. Los tratamientos *A. brasilense* SP7 + *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7 como *P. phytofirmans* PsJN + *P. putida* KT2440 y *P. phytofirmans* PsJN no son significativos entre sí, sin sufrir una disminución del área de roseta tan notoria como *V. paradoxus* B4 y *F. endophyticum* 522 en parejas. La figura 18 muestra los gráficos de los resultados porcentuales relativos al control de las mediciones de largo de raíz (A) y área de roseta (B). Se realizó una cuantificación de bacterias (CFU/cm de raíz) presentes en las raíces.

Mediante el método de dilución y posterior plaqueo por rastrillo, se logró cuantificar la cantidad de bacteria y comparara el crecimiento de las cepas en pareja. En los tratamientos de cepas aisladas, todas las bacterias en estudio lograron crecer. En los grupos emparejados, solo los tratamientos de *A. brasilense* SP7 + *P. putida* KT2440 y *P. phytofirmans* PsJN + *P. putida* KT2440 lograron crecer ambas bacterias, en los demás grupos solo creció la cepa *P. putida* KT2440. Las cepas *P. putida* KT2440 y *P. phytofirmans* PsJN disminuyen su orden de magnitud al estar en parejas, reduciendo dos magnitudes KT2440. *A. brasilense* SP7 mantiene el mismo orden de magnitud de forma aislada y en pareja, pero *P. putida* KT2440 disminuye un orden estando en combinación con dicha cepa. La tabla 7 resume los datos obtenidos de la cuantificación de colonias en los distintos tratamientos, donde principalmente se observa que las cepas PsJN y SP7 lograron perdurar a lo largo del tiempo en conjunto con la cepa KT2440.

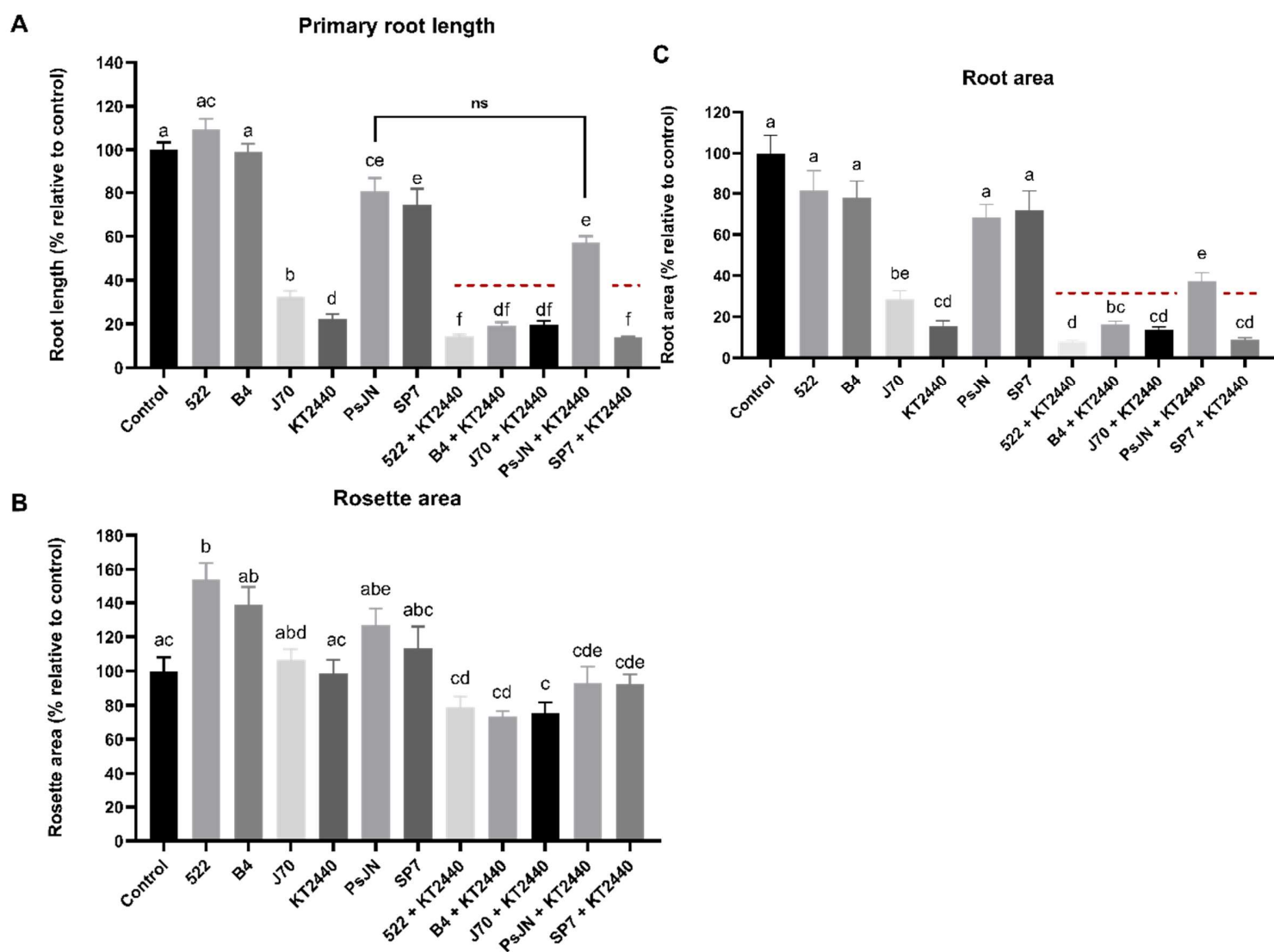


Figura 18. Gráficos porcentuales relativo al grupo control de los resultados del largo de raíz, área de roseta y área de raíz de los distintos grupos. (A) Gráfico de los resultados del largo de raíz de los distintos tratamientos de cepas aisladas y en parejas. Los datos fueron transformados a logaritmo. Se obtuvo significancia en comparación con el grupo control en todos los grupos, menos *V. paradoxus* B4 y *F. endophyticum* 522. Los grupos *P. phytofirmans* PsJN aislada y en *P. putida* KT2440 + *P. phytofirmans* PsJN son iguales significativamente. (B) Gráfico de los resultados del área de roseta de las cepas aisladas y las distintas parejas. La distribución fue transformada a logarítmica. Se obtuvo significancia en comparación con el grupo control en *F. endophyticum* 522 aislada. Tanto, los grupos *A. brasilense* SP7 + *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7 como *P. phytofirmans* PsJN + *P. putida* KT2440 y *P. phytofirmans* PsJN aislada, no son significativos entre sí. (C) Gráfico de los resultados del área de raíz de las cepas aisladas y las distintas parejas. La distribución fue transformada a logarítmica.

Tratamiento	CFU [n° colonias/cm]
<i>F. endophyticum</i> 522	4.45×10^2
<i>V. paradoxus</i> B4	1.44×10^5
<i>P. phytofirmans</i> PsJN	3.21×10^5
<i>N. plantarum</i> J70	7.07×10^4
<i>A. brasilense</i> SP7	1.76×10^4
<i>P. putida</i> KT2440	4.46×10^5
<i>F. endophyticum</i> 522 +	0
<i>P. putida</i> KT2440	1.18×10^5
<i>V. paradoxus</i> B4 +	0
<i>P. putida</i> KT2440	1.16×10^5
<i>P. phytofirmans</i> PsJN +	7.86×10^4
<i>P. putida</i> KT2440	7.95×10^3
<i>N. plantarum</i> J70 +	0
<i>P. putida</i> KT2440	3.53×10^5
<i>A. brasilense</i> SP7 +	3.63×10^4
<i>P. putida</i> KT2440	9.13×10^4

Tabla 8. Cuantificación de colonias presente en los distintos tratamientos normalizado por largo de raíz (cm). 0 significa nulo crecimiento de respectiva cepa en tratamiento. La cepa *P. putida* KT2440 mantiene mismo orden de magnitud. No obstante, disminuye su orden de magnitud en los tratamientos que lograron crecer ambas cepas (*A. brasilense* SP7 + *P. putida* KT2440; *P. putida* KT2440 + *P. phytofirmans* PsJN).

Análisis del efecto fenotípico de la SynCom en la planta modelo *A. thaliana*.

El ensayo se basó en evaluar el efecto en conjunto de las bacterias sobre *A. thaliana*. El propósito fue registrar distintos tratamientos con distintas cepas en conjunto y evaluar los efectos de las cepas como una SynCom y hacia la planta. Debido a los resultados obtenidos en el ensayo de parejas, se optó por usar a la cepa KT2440 y PsJN como protagonistas, puesto que la cepa KT2440 ocasionó inhibición hacia las otras cepas y se buscó evaluar si este comportamiento persistía en un contexto de SynCom. Se realizaron 7 tratamientos con 4 réplicas cada uno, estos fueron: control – PsJN aislada – KT2440 aislada – B4, Sp7, 522, J70 + PsJN – B4, Sp7, 522, J70 + KT2440 – B4, Sp7, 522, J70 – B4, Sp7, 522, J70, KT2440, PsJN. A continuación, se presenta la figura con los respectivos gráficos y análisis pertinentes. Se puede observar que la cepa PsJN aislada es la única que logra mantener el largo de raíz, siendo significativamente distinta a los tratamientos restantes (figura 19A). Los resultados en el área de roseta mostraron un incremento del tamaño en todos los tratamientos (figura 19B).

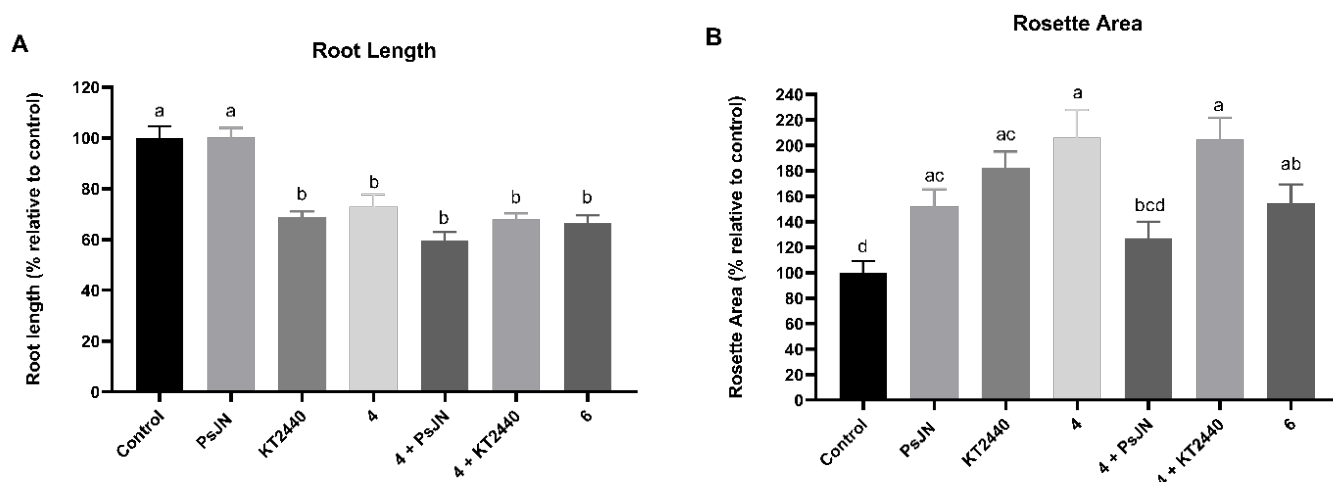


Figura 19. Gráficos del largo de raíz (A) y área de roseta (B) porcentuales relativos al control del ensayo de SynCom y *A. thaliana*. (A) La cepa PsJN fue la única en mantener el largo de raíz. Los tratamientos restantes disminuyeron este parámetro. (B) Todos los tratamientos lograron aumentar el área de la roseta, siendo todos significativamente diferentes al control, excepto el tratamiento de B4, Sp7, 522, J70 + PsJN (denominado en el gráfico como 4 + PsJN).

DISCUSIÓN

Efectos de una SynCom en plantas en comparación con el uso de cepas únicas.

Para crear una SynCom robusta es necesario conocer los microorganismos que habitan en la rizósfera de la planta *A. thaliana* (Dennis, P. G., et al 2010; Bulgarelli D, et al 2012). Para esto, es fundamental comprender la composición filogenética de la comunidad, donde, según literatura, se destaca la presencia de *Actinomycetota*, *Pseudomonadota* (*alpha*, *beta* y *gamma*), *Bacteroidota* y *Acidobacteriota* (Poupin, et al 2023; Adu-Oppong B, et al. 2020; Liu H, et al. 2017). Cada filo tiene funciones específicas, por ejemplo, el filo *Actinomycetota* es conocido por la producción de hormonas del crecimiento, habilidad para tolerar estreses y contener bacterias capaces de fijar nitrógeno, solubilizar fosfato y secuestrar hierro (Sathya, A. et al. 2017; Olanrewaju OS, et al 2019; Van der Meij A, et al. 2018). El filo *Pseudomonadota* contiene miembros que

fijan nitrógeno, promueven el crecimiento y entregan protección a la planta (Sahu, B., et al 2021; Weimer et al. 2020; Mendes R, et al. 2011; Lundberg, D. S. et al. 2012). Otro punto, es evaluar el rol que cumple la SynCom de manera aislada (interacciones microorganismo-microorganismo), debido que es un proceso altamente dinámico, y, evaluar las interacciones microorganismo-planta, para comprender los cambios que puede experimentar el hospedero (plasticidad fenotípica) (Faith JJ, et al. 2014; Hassani et al. 2018; Hu J, et al. 2016; Finkel, O. et al. 2020; Herrera Paredes, et al. 2018).

En relación a los monocultivos, se ha observado que las SynCom podrían tener efectos superiores en las plantas en comparación con cepas aisladas, puesto que las interacciones sinérgicas de los distintos microorganismos podrían proporcionar nutrientes, eliminar productos inhibidores y estimular mutuamente a través de interacciones por contacto o bioquímicos (Zoppellari F. et al. 2014; Molina-Romero et al., 2017). En contraste, los monocultivos asumen una alta carga metabólica, lo cual puede afectar los procesos celulares normales, afectar las vías de expresión génica y la síntesis de productos (Glick B. et al. 1995; Wu, G. et al. 2016). Además, se han presenciado respuestas beneficiosas en la fisiología de la planta, lo que sugiere que una SynCom puede modular las respuestas fenotípicas del hospedero (Herrera Paredes, et al. 2018). Por ejemplo, ciertas cepas de *Pseudomonas putida* ofrecen ambientes protectores hacia otras cepas, formando biopelículas y así, promoviendo la sintrofia en una SynCom (Haagensen JA, et al 2015; Shun Che, et al 2019). El tamaño de la SynCom es un aspecto importante, implementar una SynCom pequeña, es útil para analizar el efecto comunitario de una cepa PGPB, como observar la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Lee et al. 2020). Adicionalmente, se facilita la capacidad de estudiar la comunicación en la rizósfera a partir del análisis de los compuestos químicos liberados (Schulz-Bohm et al. 2015). El uso de una comunidad sintética pequeña prioriza un enfoque funcional en lugar de uno ecológico, puesto que se busca evaluar el comportamiento específico de cada cepa, tratando de emular los efectos del factor común de forma simplificada (Marín, O. 2020; Zhuang et al. 2020).

Además, estas SynCom podrían ser tan diversamente funcional como para mantener un desarrollo ecológico normal, puesto que utilizan eficiente- y productivamente los nutrientes limitados (Menéndez and Paço, 2020; Toju, et al. 2018). Lo anterior podría incrementar el éxito adaptativo de la planta, debido a los efectos sinérgicos, cooperativos, aumentando la robustez ante fluctuaciones ambientales y la estabilidad a largo plazo (Mee, M.T. et al 2014; Brenner, K., et al 2008; Renda, BA et al 2014).

Dentro de los efectos identificados que inducen las SynCom se destaca el crecimiento de la raíz primaria y el área de roseta. Estos cambios están relacionados directamente con los efectos de las interacciones microorganismo-microorganismo-planta (Finkel, O. et al. 2020). Según la literatura, la especie *Variovorax paradoxus* revierte la inhibición severa del crecimiento de raíz, la cual puede ser inducida por condiciones ambientales o interacciones antagonistas entre cepas (Finkel, O. et al. 2020). En el ensayo de concentración bacteriana, se evidenció que las cepas, *V. paradoxus* B4, *F. endophyticum* 522, *P. phytofirmans* PsJN y *A. brasilense* SP7, a concentraciones $10^4 \frac{CFU}{ml}$ mantenían y/o incrementaban el largo de raíz en condiciones estándares de crecimiento. Un futuro alcance sería evaluar el efecto de la bacteria en el largo de raíz bajo condiciones ambientales adversas (déficit nutricional y/o estrés salino).

Efectos e influencia de las interacciones entre microorganismos: ¿mutualismo o competencia?

La estrategia reduccionista de los ensayos de pares entrega información sobre las interacciones entre microorganismos, caracterizándose por ser altamente reproducibles, de corta duración y normalmente fácil de cuantificar (Eng et al., 2020; Köhl et al., 2019). No obstante, estos escenarios no reflejan totalmente la compleja dinámica del microbioma y, además, no logran predecir todos los efectos *in vivo*, por la falta de consideración de las variables naturales (Bulgarelli et al., 2015; Tecon et al., 2019; Bulgarelli, D., et al 2013; Tsolakidou MD, et al 2019). Sin embargo, en experimentos *in vitro* se pueden regular múltiples factores (temperatura, tiempo, luz,

condiciones abióticas y patogénica), buscando simplificar el contexto real y poder observar los efectos de las interacciones entre microorganismos y microorganismos más planta (Lundberg et al., 2013; Vives-Peris et al., 2020).

En términos de competencia, según literatura, las bacterias capaces de formar mayores poblaciones a menor tiempo pueden indicar una capacidad competitiva superior, mientras, que las cepas que mantienen proporciones estables de colonias pueden sugerir una coexistencia constante (Ishizawa et al., 2019; Hatzinger PB, et al 1994). De los ensayos de competencia, se presenció que las cepas *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* SP7 tienen un ritmo de crecimiento más rápido y sus colonias son significativamente más grandes en comparación con las demás cepas en estudio. En contraste, las cepas *F. endophyticum* 522, *V. paradoxus* B4 y *P. phytofirmans* PsJN presentan un tiempo similar de crecimiento y un tamaño de colonia más pequeño. Por último, la cepa *N. plantarum* Grainger J70 se caracteriza por tener colonias muy pequeñas y una alta demora para crecer.

Como se mencionó, los ensayos de competencia binaria son relevantes para el diseño de comunidades microbianas sintéticas, dado que pueden entregar resultados preliminares que podrían ayudar a predecir efectos de las interacciones entre microorganismos y hospedero (Herrera Paredes, et al. 2018). A partir de los resultados de los ensayos de Rayas Cruzadas, Gotas Adyacentes y Agar más Bacteria, se pudo presenciar que la cepa *P. putida* KT2440 inhibió a las cepas *F. endophyticum* 522, *V. paradoxus* B4, *N. plantarum* Grainger J70 y *P. phytofirmans* PsJN. La razón podría radicar en su rápida tasa de crecimiento, la formación de colonias de mayor tamaño, la secreción de metabolitos que afecten a las otras cepas y la capacidad de competir con otros organismos (Maroniche et al., 2018; Bernal, P., et al. 2017). Sin embargo, la cepa KT2440 no presentó signos de competencia al estar co-cultivadas en medio sólido con las cepas restantes. Lo anterior sugiere que las cepas pueden interactuar de forma

sinérgica/cooperativa o al menos neutral, demostrando capacidad para crecer en conjunto.

Los exudados son compuestos orgánicos conocidos, que atraen poblaciones microbianas complejas presentes en la rizósfera, iniciando la primera comunicación entre hospedero y endófitas (Kawasaki et al., 2016). La composición de los exudados puede variar según la característica del suelo y afectar la estructura de la rizósfera y el crecimiento bacteriano, ya sea beneficiando o inhibiendo (Voges, M., et al. 2018; Eilers KG, et al. 2010; Herrera Paredes, et al. 2018; Ziegler J, et al. 2016). Los exudados proporcionan nutrientes esenciales (metabolitos primarios), que promueven la proliferación de microorganismos en el suelo y metabolitos secundarios, necesarios para la tolerancia al estrés abiótico (Stringlis, I. A. et al. 2018; Gunina, A., et al 2015). Adicionalmente, se sostiene que las PGPB son capaces de explotar el acervo de percursores presentes en los exudados de la raíz con el fin de producir fitohormonas, que estimulan la promoción de crecimiento de las plantas (Bais, H. P., et al 2006; Steenhoudt O, et al 2000). Ante esta perspectiva, el eventual uso de exudados para evaluar el comportamiento de las bacterias entregaría un enfoque más realista, dado que reflejaría las condiciones en las que las cepas normalmente se encuentran.

Efectos de los microorganismos en el crecimiento y protección de las plantas: producción de fitohormonas, solubilización de fosfato/hierro y características sobre cepas.

En general, las cepas PGPR pueden estimular el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y etileno), la actividad enzimática, facilitando la nutrición (solubilización de fosfato) y/o proteger a la planta de patógenos a partir de la producción de sideróforos (Tsolakidou MD, et al 2019; Persello-Cartieaux, F., et al 2003; Penrose, D. M., et al 2003; Whipps, J. M. 2001). Según resultados del ensayo de caracterización y literatura, la cepa *P. putida* KT2440 produce sideróforos, que está relacionado con la capacidad de adherencia a las semillas y producción de sustancias inhibitorias que incrementan su competitividad (Planchamp C., et al 2015;

M. A. Molina, et al 2006; Matilla MA, et al 2010;). Por otro lado, la cepa *A. brasilense* SP7 puede solubilizar fosfato y producir auxina, una hormona que estimula el crecimiento de las plantas (Rodríguez H, et al 2004; Somers E, et al 2005; Ludwig-Müller, et al. 2015). Tanto *P. putida* KT2440 como *A. brasilense* SP7 presentan un mecanismo indirecto de promoción del crecimiento, como el antagonismo de patógenos, desencadenando una respuesta de defensa protectora en las plantas (Rojas-Tapias DF, et al 2014; Gulati A, et al 2009; P. Bernal, et al 2017).

La gran mayoría de *P. putida* solubilizan fosfato, debido a la secreción de ácido glucónico, no obstante, en el ensayo realizado no se obtuvo ese resultado (Rojas-Tapias DF. Et al 2014; An & Moe, 2016; Molina-Romero, D., et al 2017). Lo anterior se puede deber a que la cepa haya mutado.

El ácido indol-3-acético es una hormona importante, ya que está relacionado con el desarrollo y sobrevivencia de la planta, ayudando a la división celular y elongación (Conway, J.M., et al. 2022; Krome, K. et al 2010). En el ensayo de producción de IAA, la cepa *P. putida* KT2440 logró producir auxina, lo cual coincide con la literatura (Duca, D. R., et al. 2020; Parales RE, et al 2013). Mientras que la cepa PsJN es capaz de degradar IAA y está regulado por el gen *iac*, la degradación influye en la colonización y promoción del crecimiento de la planta (Donoso, R., et al 2016; Tromas A, et al 2010; Zúñiga A, et al 2013). Lo anterior puede explicar el efecto de la cepa PsJN al revertir el fenotipo de la cepa KT2440 en el ensayo de parejas, aumentando el largo de raíz y área de roseta estando cuando ambas cepas se encontraban juntas.

La fitohormona etileno está involucrada en la respuesta al estrés de la planta (Abeles, 1972). Según la literatura, se ha evidenciado que la cepa *V. paradoxus* B4 y *P. phytofirmans* PsJN degradan el precursor de etileno, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), con la enzima desaminasa ACC. Estas cepas usan los componentes (cetobutirato

y amoníaco) como fuente de nitrógeno y carbón, los cuales promueven el crecimiento de la raíz (Glick et al., 2007; Belimov et al., 2009; Brandt, U. et al, 2013).

Sobre características de las cepas, se ha observado que muchos grupos de genes involucrados en la motilidad, producción de biopelículas, adhesión y la síntesis de sideróforos pueden reflejar una colonización eficiente a la planta (Mitter et al., 2013; Ali et al., 2014). Tanto la cepa *V. paradoxus* B4 como *P. phytofirmans* PsJN producen exopolisacaridos, los cuales son vitales para la adhesión de la bacteria a la planta y la formación de biopelículas (Kandel et al., 2017; Sutherland, 2001; Pehl et al., 2012).

Adicionalmente, como se mencionó, la motilidad entrega un aspecto importante de simbiosis bacteria-planta (Dörr et al., 1998). Los genes encargados y el componente pili tipo IV están presente en la cepa *V. paradoxus* B4, *P. phytofirmans* PsJN y *P. putida* KT2440, que en conjunto le pudiese entregar un efecto aditivo en comparación a cepas aisladas (O'Toole and Kolter, 1998; Lugtenberg et al., 2002; Sessitsch et al., 2005; Breed et al., 1957). Además, que tanto *P. phytofirmans* PsJN como *P. putida* KT2440 actúan como agentes de control frente a patógenos de las plantas (Hardoim et al., 2015; Ait Barka et al., 2000; Miotto-Vilanova et al., 2016).

La cepa *F. endophyticum* 522 es capaz de fijar nitrógeno (Gao, JL., et al 2015). Esto sería útil para el mundo agrícola, debido al daño ocasionado por los fertilizantes y los efectos nocivos en el mundo marino, debido a la hipoxia que genera en el mar (Backer et al., 2018; Lata et al., 2019). Además, se ha evidenciado interacciones de simbiosis entre plantas y bacterias fijadoras de nitrógeno (Suliman et al., 2015). Sobre la cepa, *N. plantarum* Grainger J70, según literatura se sabe que no es móvil y tampoco fijadora de nitrógeno (Collins, M.D, et al 1994; Zhang S., et al. 2020). En los ensayos realizados, esta cepa mostró una tasa de crecimiento alta, colonias muy pequeñas con fenotipo distintivo. Sin embargo, no inhibió el crecimiento de las demás cepas, sugiriendo interacciones cooperativas.

CONCLUSIONES

Frente a las consecuencias del cambio climático y la acción humana se subraya la importancia del estudio del microbioma de las plantas para entender las interacciones entre microorganismos de la rizósfera y comprender sus efectos en el crecimiento del hospedero. El uso de comunidades microbianas sintéticas (SynCom) se implementa para abordar la problemática, entendiendo la complejidad de las interacciones entre microorganismos.

A partir de los ensayos de pares, se demostró que la cepa *P. putida* KT2440 inhibió el crecimiento de las demás cepas en estudio. En un contexto de cepas aisladas con la planta modelo, todas las cepas logran crecer en conjunto con *A. thaliana*, pero se destacada la importancia de la concentración inicial al inocular, puesto que es determinante para observar posible promoción del crecimiento en la planta.

Ante una inoculación en parejas, la cepa *P. putida* KT2440 inhibió el crecimiento de las otras cepas, excepto de *P. phytofirmans* PsJN, lo que corrobora su efecto promotor como PGPB. Se evidenció, que en un contexto de una SynCom, todos los tratamientos promovieron el crecimiento del área de roseta, pero la cepa PsJN de manera aislada y en una SynCom, sin la presencia de la cepa KT2440, logra mantener el largo de raíz.

Además, el uso de exudados, para evaluar el comportamiento de las bacterias, ofrecería un enfoque más realista y reflejaría las condiciones en las que las cepas normalmente se encuentran. Dado que, se evidenció diferencias en los resultados del contexto sin planta y el contexto con planta, lo que sugeriría el efecto total de los factores presentes en la rizófera. No obstante, los ensayos binarios microbiológicos entregan un primer alcance de los posibles efectos de las interacciones entre microorganismos y plantas.

El uso de una SynCom en condiciones estándares puede ser más efectivo que las cepas individuales, debido a que la rizósfera entregaría un ambiente enriquecido en

nutrientes, facilitando las interacciones sinérgicas entre microorganismos.. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes en la agricultura y pueden ser utilizados para mejorar el crecimiento y la salud de las plantas de manera sostenible. Sin embargo, se requiere seguir investigando y explorando estas interacciones para comprender mejor los mecanismos involucrados y potenciar su aplicación en la agricultura.

PROYECCIONES

Una proyección a corto plazo sería implementar experimentos en suelo, de esta manera se lograría replicar mejor el ambiente natural de la planta. Con este alcance se podría evaluar las interacciones entre los microorganismos y la planta bajo un contexto con tierra.

Otra proyección sería evaluar el efecto de la SynCom frente ambientes estresores, deficiencia de nutrientes y/o estrés salino. La finalidad sería evaluar si existe algún beneficio para la planta al estar en conjunto con una SynCom frente a algún estrés.

Además, de investigar de manera molecular cada cepa, de esta manera se podría generar una SynCom con cualidades óptimas para un beneficio certero al hospedero.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.E. Magurran, P.A. Henderson. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature*, 422 (2003), pp. 714-716.
2. Abeles, F.B. (1972) Biosynthesis and mechanism of action of ethylene. *Ann Rev Plant Physio* 23: 259–292.
3. Adu-Oppong B, Mangan SA, Stein C, Catano CP, Myers JA, Dantas G. Prairie plants harbor distinct and beneficial root-endophytic bacterial communities. *PLoS One*. 2020 Jun 23;15(6): e0234537. doi: 10.1371/journal.pone.0234537. PMID: 32574172; PMCID: PMC7310688.
4. Ait Barka, E., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., and Audran, J. C. (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 91–95. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09087.
5. Ali, S., Duan, J., Charles, T. C., and Glick, B. R. (2014). A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J. Theor. Biol.* 343, 193–198. doi: 10.1016/j.jtbi.2013.10.007.
6. An, R., & Moe, L. A. (2016). Regulation of Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Glucose Dehydrogenase Activity in the Model Rhizosphere-Dwelling Bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 4955–4964. doi:10.1128/aem.00813-16
7. Arnold, P. A., Kruuk, L. E. B., & Nicotra, A. B. (2019). How to analyze plant phenotypic plasticity in response to a changing climate. *New Phytologist*, 222(3), 1235–1241. <https://doi.org/10.1111/nph.15656>.
8. Arrouays, D., et al. (2017). Soil carbon sequestration for climate food and ecosystems. Pan European Stakeholders Dialogue, JRC Science for Policy Report, 133, 1-88.
9. Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S, Smith DL. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for

- Sustainable Agriculture. Front Plant Sci. 2018 Oct 23; 9:1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473. PMID: 30405652; PMCID: PMC6206271.
10. Bai, Y., Müller, D. B., Srinivas, G., Garrido-Oter, R., Potthoff, E., Rott, M., et al. (2015). Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. Nature 528, 364–369. doi:10.1038/nature16192.
 11. Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology, 57(1), 233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.03.
 12. Belimov, A.A., Dodd, I.C., Hontzeas, N., Theobald, J.C., Safronova, V.I., and Davies, W.J. (2009) Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. New Phytol 181: 413–423.
 13. Bernal, P., Allsopp, L., Filloux, A. et al. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. ISME J 11, 972–987 (2017). <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.169>.
 14. Bernard R. Glick, Metabolic load and heterologous gene expression, Biotechnology Advances, Volume 13, Issue 2, 1995, Pages 247-261, ISSN 0734-9750, [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)00004-A](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)00004-A).
 15. Bernstein HC, Carlson RP. Design, construction, and characterization methodologies for synthetic microbial consortia. Methods Mol Biol. 2014; 1151:49-68. doi: 10.1007/978-1-4939-0554-6_4. PMID: 24838878.
 16. Bordenstein SR, Theis KR. Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. PLoS Biol. 2015; 13:e1002226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>.
 17. Brandt, U., Hiessl, S., Schuldes, J., Thürmer, A., Wübbeler, J. H., Daniel, R., & Steinbüchel, A. (2013). Genome-guided insights into the versatile metabolic capabilities of the mercaptosuccinate-utilizing β -proteobacterium *Variovorax*

- paradoxus* strain B4. Environmental Microbiology, 16(11), 3370–3386. doi:10.1111/1462-2920.12340.
18. Breed et al. (1957) assigned the family *Pseudomonadaceae* Winslow et al. 1917 (Approved Lists 1980) to this suborder. Publication: Parker CD. Genus V. *Thiobacillus* Beijerinck 1904. In: Breed RS, Murray EGD, Smith NR (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th edition, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1957, p. 83-88.
 19. Brenner K, You L, Arnold FH. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. Trends Biotechnol. 2008 Sep;26(9):483-9. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.05.004. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18675483.
 20. Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. Trends in Biotechnology, 26(9), 483–489. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.05.
 21. Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. Trends in Biotechnology, 26(9), 483–489. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.05.004.
 22. Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, van Themaat EVL, Ahmadinejad N, Assenza F, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. Nature. 2012; 488(7409):91–5. <https://doi.org/10.1038/nature11336> PMID: 22859207.
 23. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L. & Schulze-Lefert, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. Annu. Rev. Plant Biol. 64, 807–838 (2013).
 24. C. Planchamp, G. Glauser, and B. Mauch-Mani, “Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants”, Front. Plant Sci., vol., 5(179), pp. 1–10, January 2015.

25. C.A. Mallon, F. Poly, X. Le Roux, I. Marring, J.D. van Elsas, J.F. Salles. Resource pulses can alleviate the biodiversity–invasion relationship in soil microbial communities. *Ecology*, 96 (2015), pp. 915–926.
26. Cappellari, L. del R., Santoro, M. V., Schmidt, A., Gershenzon, J., & Banchio, E. (2019). Induction of essential oil production in *Mentha x piperita* by plant growth promoting bacteria was correlated with an increase in jasmonate and salicylate levels and a higher density of glandular trichomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141(March), 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.030>.
27. Chen, Y., Kim, J. K., Hirning, A. J., Josi, K., & Bennett, M. R. (2015). Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium. *Science*, 349(6251), 986–989. doi:10.1126/science.aaa3794.
28. Coleman-Derr, D. et al. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytol.* 209, 798–811 (2016).
29. Collins, M. D., Cockcroft, S., & Wallbanks, S. (1994). Phylogenetic analysis of a new LL-diaminopimelic acid containing coryneform bacterium from herbage, *Nocardioides plantarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 523–526. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-523>.
30. Combes-Meynet, E., Pothier, J. F., Moënne-Loccoz, Y., & Prigent-Combaret, C. (2011). The *pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetyl phloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 271–284. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-014>.
31. Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>.

32. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). (2015). *Arabidopsis thaliana*: anónima en el campo, popular en el laboratorio.
33. Conway, J.M., Walton, W.G., Salas-González, I. et al. Diverse MarR bacterial regulators of auxin catabolism in the plant microbiome. *Nat Microbiol* 7, 1817–1833 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01244-3>
34. Cordovez, V.; Dini-Andreote, F.; Carrión, V.J.; Raaijmakers, J.M. Ecology and Evolution of Plant Microbiomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 2019, 73, 69–88.
35. Criollo, Paola Jimena, Obando, Melissa, Sánchez M., Leonardo, Bonilla, Ruth. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
36. Dalia Molina-Romero, Yolanda-Elizabeth Morales-García, Ana-Laura Hernández-Tenorio, Miguel Castañeda-Lucio, Alma-Rosa Netzahuatl-Muñoz y Jesús Muñoz-Rojas. *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Universidad Politécnica de Tlaxcala. 2017.
37. De Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B. P. A., & Kazan, K. (2015). What lies beneath: Belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science*, 20(2), 91–101.
38. De Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H. M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De Mot, R., & Lugtenberg, B. J. J. (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11), 1173–1180. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.1>.
39. Donoso, R., Leiva-Novoa, P., Zúñiga, A., Timmermann, T., Recabarren-Gajardo, G., & González, B. (2016). Biochemical and genetic basis of indole-3-acetic acid (auxin phytohormone) degradation by the plant growth promoting

- rhizobacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN. Applied and Environmental Microbiology, AEM.01991–16. doi:10.1128/aem.01991-16.
40. Dörr, J., Hurek, T., and Reinhold-Hurek, B. (1998) Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. Mol Microbiol 30: 7–17.
 41. Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. doi:10.1007/s00253-020-10869-5.
 42. Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R, Agler M, Kemen E, Schulze-Lefert P, Hacquard S. Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote *Arabidopsis* Survival. Cell. 2018 Nov 1;175(4):973-983.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.020. PMID: 30388454; PMCID: PMC6218654.
 43. Eilers KG, Lauber CL, Knight R, Fierer N. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. Soil Biol Biochem. 2010;42: 896–903.
 44. Eng, T., Herbert, R. A., Martinez, U., Wang, B., Chen, J. C., Brown, J. B., Deutschbauer, A. M., Bissell, M. J., Mortimer, J. C., & Mukhopadhyay, A. (2020). Iron Supplementation Eliminates Antagonistic Interactions Between Root-Associated Bacteria. Frontiers in Microbiology, 11(July). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01742>.
 45. Faith JJ, Ahern PP, Ridaura VK, Cheng J, Gordon JL. Identifying Gut Microbe–Host Phenotype Relationships Using Combinatorial Communities in Gnotobiotic Mice. Sci Transl Med. 2014;6.
 46. Faure, D., Vereecke, D., & Leveau, J. H. J. (2008). Molecular communication in the rhizosphere. Plant and Soil, 321(1-2), 279–303. doi:10.1007/s11104-008-9839-2.
 47. Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. Nature Reviews Microbiology, 10(8), 538–550. doi:10.1038/nrmicro2832 FEMS Microbiol. Ecol. 72, 313–327 (2010).

48. Finkel OM, Castrillo G, Herrera Paredes S, Salas González I, Dangl JL. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol.* 2017 Aug; 38:155-163. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.018. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28622659; PMCID: PMC5561662.
49. Finkel, O. M., Salas-González, I., Castrillo, G., Conway, J. M., Law, T. F., Teixeira, P. J. P. L., et al. (2020). A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome. *Nature* 587, 103–108. doi:10.1038/s41586-020-2778-7.
50. Gao JL, Lv FY, Wang XM, Yuan M, Li JW, Wu QY, Sun JG. *Flavobacterium endophyticum* sp. nov., a nifH gene-harboursing endophytic bacterium isolated from maize root. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015 Nov;65(11):3900-3904. doi: 10.1099/ijsem.0.000513. PMID: 28875916.
51. Gao, Z., Karlsson, I., Geisen, S., Kowalchuk, G. & Jousset, A. Protists: puppet masters of the rhizosphere microbiome. *Trends Plant Sci.* 24, 165–176 (2018).
52. Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., and McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 227–242. doi: 10.1080/07352680701572966.
53. Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Feb;61(2):793-6. doi: 10.1128/aem.61.2.793-796.1995. PMID: 16534942; PMCID: PMC1388360.
54. Großkopf, T., & Soyer, O. S. (2014). Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 72–77. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.002.
55. Gulati A, Vyas P, Rahi P, Kasana RC. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *CurrMicrobiol.* 2009; 58: 371–377. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9339-x> PMID: 19137371.
56. Gunina, A. & Kuzyakov, Y. Sugars in soil and sweets for microorganisms: Review of origin, content, composition and fate. *Soil Biol. Biochem.* 90, 87–100 (2015).

57. Haagen-Jensen JA, Hansen SK, Christensen BB, Pamp SJ, Molin S. Development of Spatial Distribution Patterns by Biofilm Cells. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Sep;81(18):6120-8. doi: 10.1128/AEM.01614-15. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26116674; PMCID: PMC4542232.
58. Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S. L., McHardy, A. C., Dangl, J. L., Knight, R., Ley, R., & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host and Microbe*, 17(5), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>.
59. Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., & Ausubel, F. M. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature*, 1(6), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51.Associations>.
60. Hannula, S. E., Ma, H. kun, Pérez-Jaramillo, J. E., Pineda, A., & Bezemer, T. M. (2020). Structure and ecological function of the soil microbiome affecting plant–soil feedbacks in the presence of a soil-borne pathogen. *Environmental Microbiology*, 22(2), 660–676. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14882>.
61. Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., et al. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 293–320. doi: 10.1128/MMBR.00050-14.
62. Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>.
63. Hatzinger PB, Alexander M (1994) Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. *Plant Soil* 158:211–222. <https://doi.org/10.1007/BF00009496>.
64. Herrera Paredes S, Gao T, Law TF, Finkel OM, Mucyn T, Teixeira PJPL, et al. (2018) Design of synthetic bacterial communities for predictable plant phenotypes. *PLoS Biol* 16(2): e2003962. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003962>.

65. Herrera Paredes, S., et al. Design of synthetic bacterial communities for predictable plant phenotypes. *PLOS Biol.* 16, e2003962 (2018).
66. Hong, Y. et al. (1991) Biological consequences of plasmid transformation of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol.* 37, 796–799. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0566-0> PMID: 15502903.
67. Hu J, Wei Z, Friman V-P, Gu S, Wang X, Eisenhauer N, Yang TJ, Ma J, Shen QR, Xu YC, Jousset A. (2016) Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. *MBio.* 2016;7: e01790–16.
- I. Hanski. Dynamics of regional distribution: the core and satellite species hypothesis. *Oikos*, 38 (1982), pp. 210-221.
68. Ishizawa, H., Kuroda, M., Inoue, K., Inoue, D., Morikawa, M., & Ike, M. (2019). Colonization and Competition Dynamics of Plant Growth-Promoting/Inhibiting Bacteria in the Phytosphere of the Duckweed *Lemna minor*. *Microbial Ecology*, 77(2), 440–450. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1306-x>.
69. Jagmann, N., & Philipp, B. (2014). Reprint of Design of synthetic microbial communities for biotechnological production processes. *Journal of Biotechnology*, 192, 293–301. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.005.
70. Jin, L., & Mackey, D. M. (2017). Measuring callose deposition, an indicator of cell wall reinforcement, during bacterial infection in *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology*, 1578, 195–205. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6859-6_16.
71. Johns NI, Blazejewski T, Gomes AL, Wang HH. Principles for designing synthetic microbial communities. *Curr Opin Microbiol.* 2016 Jun; 31:146-153. doi: 10.1016/j.mib.2016.03.010. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27084981; PMCID: PMC4899134.
72. Jones JA, Vernacchio VR, Collins SM, Shirke AN, Xiu Y, Englaender JA, Cress BF, McCutcheon CC, Linhardt RJ, Gross RA, Koffas MAG. Complete Biosynthesis of

- Anthocyanins Using *E. coli* Polycultures. *mBio*. 2017 Jun 6;8(3): e00621-17. doi: 10.1128/mBio.00621-17. PMID: 28588129; PMCID: PMC5461408.
73. Kato, S. et al. (2005) Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7099–7106.
 74. Khan, N., Bano, A. M. D., & Babar, A. (2020). Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231426>.
 75. Klitgord N, Segrè D (2010) Environments that Induce Synthetic Microbial Ecosystems. *PLoS Comput Biol* 6(11): e1001002. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001002>.
 76. Kong, Z., Hart, M., and Liu, H. (2018). Paving the way from the lab to the field: using synthetic microbial consortia to produce high-quality crops. *Front. PlantSci.* 9, 1–5. doi: 10.3389/fpls.2018.0146.
 77. Krome K, Rosenberg K, Dickler C, Kreuzer K, Ludwig-Müller J, Ullrich-Eberius C, Scheu S, Bonkowski M. Soil bacteria and protozoa affect root branching via effects on the auxin and cytokinin balance in plants. *Plant Soil*. 2010; 328:191–201. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0101-3>
 78. Kylilis N, Tuza ZA, Stan GB, Polizzi KM. Tools for engineering coordinated system behavior in synthetic microbial consortia. *Nat Commun*. 2018 Jul 11;9(1):2677. doi: 10.1038/s41467-018-05046-2. PMID: 29992956; PMCID: PMC6041260.
 79. Lal, R. (2004). Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 304(5677), 1623-1627.
 80. Larousse, M. & Galiana, E. Microbial partnerships of pathogenic oomycetes. *PLoS Pathog.* 13, e1006028 (2017).
 81. Lee, S. A., Kim, Y., Kim, J. M., Chu, B., Joa, J. H., Sang, M. K., Song, J., & Weon, H. Y. (2019). A preliminary examination of bacterial, archaeal, and fungal communities inhabiting different rhizocompartments of tomato plants under real-world environments. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45660-8>.

82. Li, X., Garbeva, P., Liu, X., Klein Gunnewiek, P. J. A., Clocchiatti, A., Hundscheid, M. P. J., Wang, X., & de Boer, W. (2020). Volatile-mediated antagonism of soil bacterial communities against fungi. *Environmental Microbiology*, 22(3), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.148>.
83. Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, et al. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8(2552)
84. Liu, Y. X., Qin, Y., & Bai, Y. (2019). Reductionist synthetic community approaches in root microbiome research. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.010>.
85. Ludwig-Müller, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *J. Plant Physiol.* 172, 4–12 (2015).
86. Lugtenberg, B., and Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
87. Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T.F.C., and Bloemberg, G.V. (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Anton Leeuw Int J G* 81: 373–383.
88. Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Del Rio, T. G., Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2013). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 501(7468 SUPPL.), 86–90.
89. Lyu D, Zajonc J, Pagé A, Tanney CAS, Shah A, Monjezi N, Msimbira LA, Antar M, Nazari M, Backer R, Smith DL. Plant Holobiont Theory: The Phytomicrobiome Plays a Central Role in Evolution and Success. *Microorganisms*. 2021 Mar 24;9(4):675. doi: 10.3390/microorganisms9040675. PMID: 33805166; PMCID: PMC8064057.

90. M. A. Molina, J. L. Ramos, and M. Espinosa-Urgel, A two-partner secretion system is involved in seed and root colonization and iron uptake by *Pseudomonas putida* KT2440, *Environ. Microbiol.*, vol., 8(4), pp. 639–647, April 2006.
91. Marin, O. 2021. A Systematic Review of the opportunities with Synthetic Microbial Communities (SynComs) and an in vitro evaluation of bacterial antagonism and growth inhibition between strains in a SynCom of the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. Laboratorio de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad Adolfo Ibáñez.
92. Marín, O., González, B., & Poupin, M. J. (2021). From microbial dynamics to functionality in the rhizosphere: A systematic review of the opportunities with synthetic microbial communities. *Frontiers in Plant Science*, 12, 650609. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.650609>
93. Maroniche, G. A., Diaz, P. R., Borrajo, M. P., Valverde, C. F., & Creus, C. M. (2018). Friends or foes in the rhizosphere: traits of fluorescent *Pseudomonas* that hinder *Azospirillum brasilense* growth and root colonization. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(12), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy202>.
94. Mathias J.E.E.E. Voges, Yang Bai, Paul Schulze-Lefert, Elizabeth S. Sattely. Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome bioRxiv 485581; doi: <https://doi.org/10.1101/485581>.
95. Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri DV, Vivanco JM, et al. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ Microbiol Rep*. 2010; 2: 381–8. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x> PMID: 23766110.
96. McCarty, Nicholas S. Ledesma-Amaro, Rodrigo. Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2018.11.002>.

97. Mee, M. T., Collins, J. J., Church, G. M., & Wang, H. H. (2014). Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), E2149–E2156. doi:10.1073/pnas.1405641111.
98. Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JH, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PA, Raaijmakers JM. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*. 2011 May 27;332(6033):1097-100. doi: 10.1126/science.1203980. Epub 2011 May 5. PMID: 21551032.
99. Miotto-Vilanova, L., Jacquard, C., Courteaux, B., Wortham, L., Michel, J., Clément, C., et al. (2016). *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial effect combined with a better resource m
100. Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., et al. (2017). A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Front. Microbiol.* 8:11. doi: 10.3389/fmicb.2017.00011.
101. Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, M. del R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Munive, A., & Muñoz-Rojas, J. (2017). Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE*, 12(11), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>.
102. Morris BE, Henneberger R, Huber H, Moissl-Eichinger C. Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiol Rev.* 2013 May;37(3):384-406. doi: 10.1111/1574-6976.12019. PMID: 23480449. Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu Rev Genet.* 2016 Nov 23; 50:211-234. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-034952. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27648643.

103. N. Rascovan, B. Carbonetto, D. Perrig, M. Díaz, W. Canciani, M. Abalo, et al. Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Sci Rep*, 6 (2016), p. 28084.
104. Nathan I Johns, Tomasz Blazejewski, Antonio LC Gomes, Harris H Wang, Principles for designing synthetic microbial communities, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 31, 2016, Pages 146-153, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.010>.
105. O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295–304. doi: 10.3389/fpls.2016.01236.
106. Olanrewaju OS, Babalola OO. Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Feb; 103(3): 1179-1188. doi: 10.1007/s00253-018-09577-y. Epub 2018 Dec 29. PMID: 30594952; PMCID: PMC6394478.
107. other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?
108. P. Bernal, L. P. Allsopp, A. Filloux, and M. A. Llamas, The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopatogens, *ISME J.*, vol., 3, pp. 1–16, January 2017.
109. P. Lemanceau, M. Blouin, D. Muller, Y. Moënne-Loccoz. Let the core microbiota be functional. *Trends Plant Sci*, 22 (2017), pp. 583-595.
110. Parales RE, Luu RA, Chen GY, Liu X, Wu V, Lin P, Hughes JG, Nesteryuk V, Parales JV, Ditty JL (2013) *Pseudomonas putida* F1 has multiple chemoreceptors with overlapping specificity for organic acids. *Microbiol (United Kingdom)* 159:1086–1096. <https://doi.org/10.1099/mic.0.065698-0>
111. Pascale, A., Proietti, S., Pantelides, I. S., & Stringlis, I. A. (2020). Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*, 10(January), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.0>.

112. Pehl, M.J., Jamieson, W.D., Kong, K., Forbester, J.L., Fredendall, R.J., Gregory, G.A., et al. (2012) Genes that influence swarming motility and biofilm formation in *Variovorax paradoxus* EPS. PLoS ONE 7: e31832.
113. Penrose, D. M. & Glick, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118, 10–15 (2003).
114. Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. & Robaglia, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. Plant, Cell Environ. 26, 189–199 (2003).
115. Pieterse, C. M. J., de Jonge, R., and Berendsen, R. L. (2016). The soil-borne supremacy. Trends Plant Sci. 21, 171–173. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.018.
116. Poudel, R., Jumpponen, A., Schlatter, D. C., Paulitz, T. C., Gardener, B. B. M., Kinkel, L. L., et al. (2016). Microbiome networks: a system frame work for identifying candidate microbial assemblages for disease management. doi: 10.1094/PHYTO-02-16-005.
117. Poupin, M. J., Greve, M., Carmona, V., and Pinedo, I. (2016). A complex molecular interplay of auxin and ethylene signaling 607 pathways is involved in *Arabidopsis* growth promotion by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Front. Plant Sci. 7, 1–16. 608 doi:10.3389/fpls.2016.00492.
118. Poupin, M. J., Timmermann, T., Vega, A., Zuñiga, A., & González, B. (2013). Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 8(7), 15.
119. Pratama, A. A. & van Elsas, J. D. The ‘neglected’ soil virome — potential role and impact. Trends Microbiol. 26, 649–662 (2018)
120. Promega. 2019. Technical manual, The Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

121. R., Wang-Pruski, G., & Nowak, J. (2005a). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(3), 1187–1192. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>.
122. Renda BA, Hammerling MJ, Barrick JE: Engineering reduced evolutionary potential for synthetic biology. Mol Biosyst 2014, 10:1668-1678.
123. Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften. 2004; 91: 552–555.
124. Rodríguez, H. & Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17, 319–339 (1999).
125. Rojas-Tapias DF, Bonilla R, Dussaán J. Effect of inoculation and co-inoculation of *Acinetobacter* sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on growth, fitness, and copper accumulation of maize (*Zea mays*). Water Air Soil Pollut. 2014; 225. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2232-2>.
126. Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2013). The Hologenome Concept: Human, Animal and Plant Microbiota. doi:10.1007/978-3-319-04241-1.
127. Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: The Hologenome Concept. mBio, 7(2). doi:10.1128/mbio.01395-15.
128. Roughgarden, J.; Gilbert, S.F.; Rosenberg, E.; Zilber-Rosenberg, I.; Lloyd, E.A. Holobionts as Units of Selection and a Model of Their Population Dynamics and Evolution. Biol. Theory 2018, 13, 44–65.
129. Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., & Bais, H. P. (2008). Causes and consequences of plant-associated biofilms. FEMS Microbiology Ecology, 64(2), 153–166. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00465>.
130. Sahu, B., Suyal, D. C., Prasad, P., Kumar, V., Singh, A. K., Kushwaha, S., et al. (2021). “Microbial diversity of chickpea rhizosphere,” in Rhizosphere

- microbes. *microorganisms for sustainability*, vol. 23 . Eds. Sharma, S. K., Singh, U. B., Sahu, P. K., Singh, H. V., Sharma, P. K. (Singapore: Springer), 483–501.
131. Santhanam, R., Menezes, R. C., Grabe, V., Li, D., Baldwin, I. T., & Groten, K. (2019). A suite of complementary biocontrol traits allows a native consortium of root-associated bacteria to protect their host plant from a fungal sudden-wilt disease. *Molecular Ecology*, 28(5), 1154–1169. <https://doi.org/10.1111/mec.>
 132. Sathya, A., Vijayabharathi, R. & Gopalakrishnan, S. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech* 7, 1–10 (2017).
 133. Schink B (2006) Syntrophism among prokaryotes. In *The Prokaryotes*, Dworkin M (ed), Vol. 2, pp 309–335. New York: Springer.
 134. Schulz-Bohm, K., Zweers, H., de Boer, W., & Garbeva, P. (2015). A fragrant neighborhood: Volatile mediated bacterial interactions in soil. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.201.>
 135. Schuster, M., Joseph Sexton, D., Diggle, S. P., & Peter Greenberg, E. (2013). Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 43–63. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155635.
 136. Scott, S. R., & Hasty, J. (2016). Quorum Sensing Communication Modules for Microbial Consortia. *ACS Synthetic Biology*, 5(9), 969–977. doi:10.1021/acssynbio.5b00286
 137. Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E. A., Salles, J. F., Van Elsas, J. D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.
 138. Shahab, R. L., Luterbacher, J. S., Brethauer, S., & Studer, M. H. (2018). Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to lactic acid by a synthetic fungal-bacterial consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), 1207–1215. doi:10.1002/bit.26541.
 139. Shahab, R. L., Luterbacher, J. S., Brethauer, S., & Studer, M. H. (2018). Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to lactic acid by a

synthetic fungal-bacterial consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), 1207–1215. doi:10.1002/bit.26541.

140. Shun Che, Yujie Men, Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 46, Issue 9-10, 1 October 2019, Pages 1343–1358.
141. Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, Sauro HM: Designing and engineering evolutionary robust genetic circuits. *J Biol Eng* 2010, 4:12.
142. Smith, P., et al. (2016). Biophysical and economic limits to negative CO₂ emissions. *Nature Climate Change*, 6(1), 42-50.
143. Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M, Vanderleyden J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71: 1803–1810. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1803-1810.2005> PMID: 15812004.
144. Song H, Ding MZ, Jia XQ, Ma Q, Yuan YJ. Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications. *Chem Soc Rev*. 2014;43(20):6954-81. doi: 10.1039/c4cs00114a. Epub 2014 Jul 14. PMID: 25017039.
145. Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K., & Vanderleyden, J. (2014). Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*, 201(3), 850–861. <https://doi.org/10.1111/nph.12590>.
146. Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:487–506.
147. Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., ... Eberl, L. (2001). *Visualization of N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere. Applied*

- and *Environmental Microbiology*, 67(12), 5761–5770. doi: 10.1128/aem.67.12.5761-5770.2001.
- Stringlis, I. A. et al. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 201722335 (2018). doi:10.1073/pnas.1722335115.
148. Sulieman, S., Ha, C., Van Nasr Esfahani, M., Watanabe, Y., Nishiyama, R., Pham, C. T. B., et al. (2015). DT2008: a promising new genetic resource for improved drought tolerance in soybean when solely dependent on symbiotic N₂ fixation. *Biomed Res. Int.* 2015:687213. doi: 10.1155/2015/687213.
149. Sutherland, I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol-UK* 147: 3–9.
150. Taffner, J. et al. What is the role of Archaea in plants? New insights from the vegetation of alpine bogs. *MSphere* 3, e00122–18 (2018).
151. Tapia-Hernandez, Mascarúa-Esparza MA C-M J. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios.* 1990; 64: 73–83. PMID: 2148964.
152. Teague, B. P., & Weiss, R. (2015). Synthetic communities, the sum of parts. *Science*, 349(6251), 924–925. doi:10.1126/science.aad0876.
153. Timmermann, T., Armijo, G., Donoso, R., Seguel, A., Holuigue, L., & González, B. (2017). *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN protects *Arabidopsis thaliana* against a virulent strain of *Pseudomonas syringae* through the activation of induced resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(3), 215–230. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-16-0192-R>
154. Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., and Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 8:49. doi: 10.3389/fpls.2017.00049
155. Toju, H., Abe, M. S., Ishii, C., Hori, Y., Fujita, H., and Fukuda, S. (2020). Scoring species for synthetic community design: network analyses of functional core microbiomes. *Front. Microbiol.* 11, 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2020.01361.

156. Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., et al. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat. Plants* 4, 247–257. doi: 10.1038/s41477-018-0139-.
157. Tromas A, Perrot-Rechenmann C. Recent progress in auxin biology. *C R Biol.* 2010 Apr;333(4):297-306. doi: 10.1016/j.crv.2010.01.005. Epub 2010 Mar 11. PMID: 20371104.
158. Tsolakidou MD, Stringlis IA, Fanega-Sleziak N, Papageorgiou S, Tsalakou A, Pantelides IS. Rhizosphere-enriched microbes as a pool to design synthetic communities for reproducible beneficial outputs. *FEMS Microbiol Ecol.* 2019 Oct 1;95(10): fiz138. doi: 10.1093/femsec/fiz138. PMID: 31504462.
159. Tzec-Interián, J. A., Desgarennés, D., Carrión, G., Monribot-Villanueva, J. L., Guerrero-Analco, J. A., Ferrera-Rodríguez, O., Santos-Rodríguez, D. L., Liahut-Guin, N., Caballero-Reyes, G. E., & Ortiz-Castro, R. (2020). Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with avocado trees (*Persea americana* Miller) and their potential use in the biocontrol of *Scirtothrips perseae* (avocado thrips). *PLoS ONE*, 15(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231215>.
160. Van der Meij A, Willemse J, Schneijderberg MA, Geurts R, Raaijmakers JM, van Wezel GP. Inter- and intracellular colonization of *Arabidopsis* roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2018 May;111(5):679-690. doi: 10.1007/s10482-018-1014-z. Epub 2018 Jan 15. PMID: 29335919; PMCID: PMC5913384.
161. Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 2015; 206:1196–206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>.
162. Vessey, J. K. (2003). *Plant and Soil*, 255(2), 571–586. doi:10.1023/a:102603721689

163. Voges, M.J., Bai, Y., Schulze-Lefert, P., & Sattely, E. (2018). Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. bioRxiv.
164. W.H.G. Hol, P. Garbeva, C. Hordijk, M.P.J. Hundscheid, P.J.A.K. Gunnewiek, M. van Agtmaal, et al. Non-random species loss in bacterial communities reduces antifungal volatile production. *Ecology*, 96 (2015), pp. 2042-2048.
165. Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.
166. Whipps, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, 487–511 (2001).
167. Wintermute EH, Silver PA. Emergent cooperation in microbial metabolism. *Mol Syst Biol.* 2010 Sep 7; 6:407. doi: 10.1038/msb.2010.66. PMID: 20823845; PMCID: PMC2964121.
168. Wintermute, E. H., & Silver, P. A. (2010). Dynamics in the mixed microbial concourse. *Genes & Development*, 24(23), 2603–2614. doi:10.1101/gad.1985210.
169. Wu G, Yan Q, Jones JA, Tang YJ, Fong SS, Koffas MAG. Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. *Trends Biotechnol.* 2016 Aug;34(8):652-664. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.010. Epub 2016 Mar 18. PMID: 26996613.
170. Zhalnina, K., Louie, K. B., Hao, Z., Mansoori, N., Da Rocha, U. N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loqué, D., Bowen, B. P., Firestone, M. K., Northern, T. R., & Brodie, E. L. (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature Microbiology*, 3(4), 470–480. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>.

171. Zhang S, Wang X, Yang J, Lu S, Lai XH, Jin D, Huang Y, Zhu W, Li J, Pu J, Huang Y, Tian Z, Dong K, Zhang G, Lei W, Wang S, Xu J. *Nocardioides dongxiaopingii* sp. nov., isolated from leaves of *Lamiophlomis rotata* on the Qinghai-Tibet Plateau. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020 May;70(5):3234-3240. doi: 10.1099/ijsem.0.004161. PMID: 32375979.
172. Zhang, H., & Wang, X. (2016). Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 37, 114–121. doi: 10.1016/j.ymben.2016.05.007.
173. Zhuang, L., Li, Y., Wang, Z., Yu, Y., Zhang, N., Yang, C., Zeng, Q., & Wang, Q. (2020). Synthetic community with six *Pseudomonas* strains screened from the garlic rhizosphere microbiome promotes plant growth. *Microbial Biotechnology*, 202005210130046. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.136>.
174. Ziegler J, Schmidt S, Chutia R, Müller J, Böttcher C, Strehmel N, et al. non-targeted profiling of semi-polar metabolites in *Arabidopsis* root exudates uncovers a role for coumarin secretion and lignification during the local response to phosphate limitation. *J Exp Bot*. 2016;67: 1421–1432. pmid:26685189.
175. Zoppellari F, Malus E, Chitarra W, Lovisolo C, Spanna F, Bardi L. Improvement of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) by selected rhizospheric microorganisms. 2014.
176. Zúñiga, A., Poupin, M. J., Donoso, R., Ledger, T., Guilian, N., Gutiérrez, R. A., & González, B. (2013). Quorum Sensing and Indole-3-Acetic Acid Degradation Play a Role in Colonization and Plant Growth Promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 546–553. doi:10.1094/mpmi-10-12-0241-r.

ANEXOS

1. Medios utilizados

El medio 92, Trypticase soy yeast extract médium, está compuesto por 30 g de trypticase soy broth, 3 g de yeast extract, 15 g de agar, 1000 ml de agua destilada. Ajustándolo a una pH entre 7 y 7.2.

El medio 535, Trypticase soy broth agar, está compuesto por 30 g de trypticase soy broth, 15 g agar y 1000 ml de agua destilada. Ajustándolo a un pH de 7.3

El medio 65, Gym streptommyces médium, está compuesto por 4 g de glucosa, 4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 2 g de CaCO_3 , 12 g de agar y 1000 ml de agua destilada. Ajustándolo a un pH de 7.2

El medio 1, nutrient agar, está compuesto por 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 15 g de agar (si es necesario) y 1000 ml de agua destilada. Ajustándolo a un pH de 7.

El medio 1139, medio PYG, está compuesto por 5 g de polipeptona, 5 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 40 ml de solución salina y 960 ml de agua destilada. La solución salina está compuesta por 0.2 g de CaCl_2 , 0.4 g de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g de K_2HPO_4 , 1 g de KH_2PO_4 , 10 g de NaHCO_3 , 2 g de NaCl y 1000 ml de agua destilada.

El medio R2A está compuesto por 18.2 g de R2A y 1000 ml de agua.

El medio MS, medio de Murashige y Skoog, está compuesto por 1.650 mg de Nitrato de amonio, 440 mg de Cloruro de calcio, 370 mg de Sulfato de magnesio, 170 mg de Fosfato de potasio, 1.9 mg de Nitrato de potasio, 6.2 de Ácido bórico, 0.0025 mg de Cloruro de cobalto, 0.025 mg de Sulfato cúprico, 27.8 mg de Sulfato ferroso, 22.3 mg de Sulfato de manganeso, 0.83 mg de Yoduro de potasio, 0.25 mg de Molibdato de sodio, 8.6 mg de Sulfato de zinc y 37.2 mg de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 mg. Además, de vitaminas como 100 mg de i-Inositol, 0.5 mg de Niacina, 0.5 mg de Piridoxina, 0.1 mg de tiamina, 2 mg de Glicinas.

Medio NBRIP por litro:

10 g Glucosa

2.5 g $Ca_3(PO_4)_2$

5 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$

0.25 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$

0.2 g KCl

0.1 g $(NH_4)_2SO_4$

Medio CAS

Solución 1: Tinte azul

i. Disuelva 0.06 g de CAS (Fluka Chemicals) en 50 ml de ddH₂O.

ii. Disuelva 0,0027 g de FeCl₃-6 H₂O en 10 ml de HCl 10 mM.

iii. Disuelva 0.073 g de HDTMA en 40 ml de ddH₂O. D.

Mezcle i. con 9 ml de ii. Luego mezcle con iii. La solución ahora debe ser de color azul.

Esterilice y almacene en un recipiente.

Solución 2: Mezclas una.

Stock de solución salina Minimal Media 9 (MM9): Disuelva 15 g de KH₂PO₄, 25 g de NaCl y 50 g de NH₄Cl en 500 ml de ddH₂O.

20% de stock de glucosa: Disuelva 20 g de glucosa en 100 ml de ddH₂O.

Stock de NaOH: Disolver 25 g de NaOH en 150 ml de ddH₂O; El pH debe ser ~12.

Solución de ácido casamino: Disuelva 3 g de ácido Casamino en 27 ml de ddH₂O.

Extraer con 3% de 8-hidroxiquinolina en cloroformo para eliminar cualquier rastro de hierro. Filtrar y esterilizar.

Solución 3: Preparación de agar CAS:

Agregue 100 ml de solución salina MM9 a 750 ml de ddH₂O.

Disuelva 32,24 g de TUBOS de piperazina-N, N'-bis (ácido 2-etanosulfónico): Las TUBERÍAS no se disolverán por debajo de un pH de 5. Lleve el pH a 6 y agregue

lentamente las TUBERÍAS mientras revuelve. El pH bajará a medida que PIPES se disuelva. Mientras revuelve, suba lentamente el pH a 6,8. No exceda de 6,8, ya que esto hará que la solución se vuelva verde.

Agregue 15 g de agar Bacto.

Esterilizar y enfriar a 50°C.

Añada 30 ml de solución estéril de ácido casamino y 10 ml de solución estéril de glucosa al 20% a la mezcla MM9 / PIPES.

Agregue lentamente 100 ml de solución de tinte azul a lo largo de la pared de vidrio con suficiente agitación para mezclar bien.

Vierta los platos asépticamente.