



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“ACTINOBACTERIAS AUTÓCTONAS DE RIZÓSFERA DE *Persea americana* COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL”

TESIS QUE PRESENTA:

P.Q.F.B. PATRICIA TORRES SOLÓRZANO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGA

ASESOR DE TESIS:

M.C. KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ

CO-ASESOR:

M.C. ELIZABETH GARCÍA CÁRDENAS

Morelia, Michoacán, Enero de 2020





El trabajo experimental de tesis se realizó en conjunto entre el

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la

Facultad de Químico Farmacobiología

en asesoría de

M.C. Karla Gabriela Domínguez González

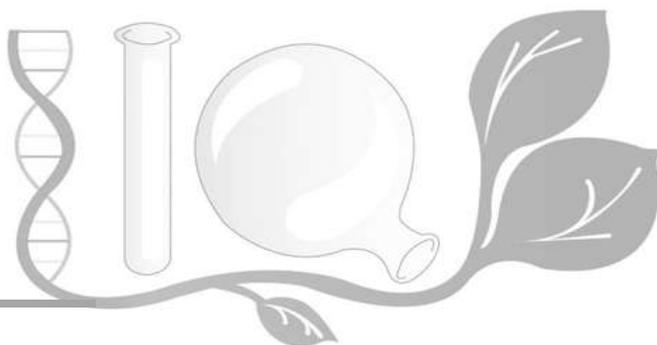
y el

Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

en co-asesoría de

M.C. Elizabeth García Cárdenas



AGRADECIMIENTOS

A la Maestra Karla: por abrirme el camino al mundo de la investigación, porque las oportunidades que me ha brindado son incomparables, gracias por invertir su tiempo en mi preparación y compartir conmigo sus conocimientos y habilidades, procurando siempre lo mejor para mi futuro. Le agradezco enormemente la confianza que puso en mí para incluirme en su equipo de trabajo.

Al Químico Soria: sus clases hicieron que centrara mi atención en la microbiología y desde el inicio siempre busqué consejo en usted porque es una persona a quien admiro mucho; le estaré por siempre agradecida porque gracias a eso es que ahora estoy aquí, gracias por acompañarme durante todo el trayecto, preparándome para crecer profesionalmente, aportando sus conocimientos a mi trabajo y, sobre todo, por ser un agradable amigo.

Al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores: por promover la investigación en nuestra facultad, porque gracias a ello fue posible realizar mi tesis, gracias por permitirme hacer uso de su Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos a través de mi asesora M.C. Karla Domínguez.

A Liz y a Kirán: que a pesar de sus ocupaciones, buscaron el tiempo y la forma de enseñarme pacientemente las técnicas de su laboratorio, por sus valiosas aportaciones, durante la experimentación y en el momento de redactar, fue un verdadero gusto trabajar con ustedes que tienen gran dedicación y compromiso con la ciencia.

Al D.C. José López Bucio: por disponer de su laboratorio y recursos para la culminación de este trabajo, porque su trayectoria y aportaciones a la ciencia motivan a continuar y trascender.

Al D.C. Javier Raya: no tengo ninguna duda de que es un gran investigador pero, sobre todo, es una excelente persona, estoy muy agradecida con usted por brindarme su apoyo para dar mi siguiente paso en mi vida profesional.

Al Químico Ricardo Vega: por estar presente en mi proceso de titulación, muchas gracias por el apoyo que me ofreció para que esto fuera posible.

A la Junta de Sanidad Vegetal de Uruapan: especialmente al Ing. Andrés Ciprés Torres, por su invaluable aportación y apoyo constante al disponer de sus recursos para poder llevar a cabo los muestreos. A los Ingenieros que invirtieron de su tiempo para conducirnos con cada uno de los huertos. Gracias a todos sus productores, que nos recibieron con mucha amabilidad y, además, nos dieron la confianza de ingresar a sus cultivos y trabajar con ellos.

A mis padres: Elena e Ignacio, les voy a estar siempre agradecida por su incondicional, constante y enorme apoyo y confianza que han tenido hacia mí, porque me han enseñado a valorar lo que tengo y a luchar por lo que quiero, son mi motivo y mi ejemplo para seguir siempre adelante, esperando hacerlos sentir orgullosos en todo momento.

A mis hermanos: César y Armando, quiero que sepan que ustedes fueron mi inspiración de elegir este rumbo de mi carrera, porque ambos han sido un gran ejemplo para mí; a Pepe, siempre serás el motivo de querer llegar a casa y verte ahí sentado lleno de alegría, regresar con él me recarga de energía; a Rocío y Diana, porque han sido grandes hermanas y amigas, por estar para mí en todos los momentos y por siempre buscar la forma de apoyarme. A Mariela, por todas las veces que me apoyaste, gracias por ser esa gran persona.

A Liz: porque desde el inicio fuiste mi compañera, de universidad y de vida, estuviste en los malos tiempos, cuando sentíamos que ya no podíamos más, pero también fue un gusto compartir cada logro. Espero que sigamos acompañándonos por mucho tiempo más.

A mis niñas: Liz, Ariz, Rebe y Sofy, siempre serán especiales para mí, comenzamos esto juntas e hicieron de mi etapa de universidad una muy bonita y emocionante experiencia, pues con ustedes nunca faltaron las risas y las bromas, nunca me quedó duda de que harían cualquier cosa por mí y no tengan duda de que yo la haría por ustedes; quiero verlas triunfar y tener mucho éxito en su vida.

A Sebastián: te agradezco infinitamente por tu interminable paciencia conmigo, por ser un gran compañero que me motivó cada día, no sólo para esforzarme en mi trabajo, sino para crecer como persona, gracias por estar ahí, por ser un gran apoyo moral y por recordarme de lo soy capaz cuando yo lo olvido.

**ACTINOBACTERIAS AUTÓCTONAS DE RIZÓSFERA DE
Persea americana COMO PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO VEGETAL**

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Descripción de la zona de muestreo.....	5
2.2. Descripción del cultivo de <i>Persea americana</i> Mill.....	7
2.2.1. Generalidades.....	7
2.2.2. Variedades.....	8
2.2.3. Requerimientos ambientales.....	9
2.2.4. Plagas.....	9
2.2.5. Nutrición.....	9
2.2.6. Producción mundial.....	10
2.2.7. Producción en México.....	10
2.2.8. Producción en Michoacán.....	11
2.2.9. Producción en Uruapan.....	11
2.3. La rizósfera.....	11
2.3.1. Generalidades.....	11
2.3.2. Estructura.....	12
2.3.3. Exudados de la raíz.....	13
2.3.4. Clasificación.....	14
2.3.5. Funciones.....	15
2.3.6. Interacciones planta - planta.....	16
2.3.7. Microorganismos de la rizósfera.....	17
2.3.9. Interacciones planta - microorganismo.....	18
2.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	20
2.4.1. Mecanismos directos.....	21
2.4.2. Mecanismos indirectos.....	24

2.5. Actinobacterias.....	25
2.5.1. Generalidades.....	25
2.5.2. Hábitat.....	29
2.5.3. Condiciones de aislamiento.....	30
2.5.4. Morfología.....	30
2.6. Modelos vegetales.....	33
2.6.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	39
4. HIPÓTESIS.....	39
5. OBJETIVOS.....	40
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	40
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
6. METODOLOGÍA.....	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
7.1. Muestreo.....	41
7.2. Determinación de pH.....	43
7.3. Tratamiento de descontaminación de la muestra.....	43
7.4. Primo-aislamiento.....	44
7.5. Purificación.....	44
7.6. Conservación.....	45
7.7. Maduración de colonias.....	46
7.8. Agrupación y selección.....	46
7.9. Interacción planta-microorganismo.....	47
7.9.1. Tratamiento de las semillas.....	47
7.9.2. Co-inoculación de plantas y bacterias.....	49
7.10. Análisis.....	49
7.11 Tinción.....	50
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
8.1. Descontaminación de la muestra.....	51
8.2. Aislamiento de actinobacterias.....	53
8.3. Determinación de pH.....	54
8.4. Características fenotípicas.....	56
8.5 Análisis de la interacción microorganismo - planta.....	59

8.5.1 Crecimiento de actinobacterias en medio MS	59
8.5.2. Análisis de la estimulación del crecimiento de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i> inducido por actinobacterias	59
8.5.3 Efecto de la inoculación de actinobacterias en <i>Arabidopsis thaliana</i> sobre la arquitectura radicular.....	63
8.5.4 Cálculo de la densidad de raíces	67
8.6. Expresión del marcador <i>DR5:uidA</i> en interacción con actinobacterias	69
9. CONCLUSIONES	73
10. EXPECTATIVAS.....	74
11. BIBLIOGRAFÍAS.....	75
12. ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de suelo del municipio de Uruapan, Michoacán.....	6
Figura 2. Uso del suelo del municipio de Uruapan, Michoacán.	7
Figura 3. Componentes estructurales de la rizósfera..	13
Figura 4. Efecto en la concentración de auxinas en <i>A. thaliana</i> inducido por la inoculación de <i>A. brasiliense</i>	23
Figura 5. Comparación del diámetro de los filamentos.	26
Figura 6. Dominio Bacteria.	27
Figura 7. Árbol filogenético de las actinobacterias.....	28
Figura 8. Corte transversal de una colonia de actinobacterias.	29
Figura 9. Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
Figura 10. Anatomía de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
Figura 11. Arquitectura de <i>Arabidopsis thaliana</i> dependiente de la biodisponibilidad de nutrientes.	38
Figura 12. Mapa satelital de los huertos muestreados.	42
Figura 13. Mapa satelital de ubicación de los huertos seleccionados.	47
Figura 14. Distribución de las semillas de <i>A. thaliana</i> sobre medio MS.	48
Figura 15. Disposición de inóculo bacteriano y plántulas de <i>A.</i> <i>thaliana</i> para la interacción.....	49
Figura 16. Descontaminación de la muestra..	52
Figura 17. Número de aislados en cada UP.	53
Figura 18. pH de la rizósfera de <i>P. americana</i>	55
Figura 19. Características fenotípicas de las cepas asiladas de rizósfera de <i>P.americana</i>	58
Figura 20. Efecto de las bacterias en la elongación de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	60
Figura 21. Estimulación en el crecimiento de la raíz principal inducida por actinobacterias.	61
Figura 22. Estimulación en el crecimiento de la raíz principal sin diferencia significativa inducida por las actinobacterias.....	62

Figura 23. Represión en el crecimiento de la raíz principal inducida por las actinobacterias.	62
Figura 24. Efecto de promoción por actinobacterias en la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
Figura 25. Efecto en arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i> por inoculación de actinobacterias.	66
Figura 26. Efecto de baja o nula estimulación en la arquitectura radicular por la inoculación de actinobacterias en <i>Arabidopsis</i>	67
Figura 27. Gráfico de densidad de raíces laterales..	68
Figura 28. Expresión del marcador <i>DR5:uidA</i> en interacción con actinobacterias. a).....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Morfología macroscópica y microscópica de los géneros de actinobacterias más comunes..	31
Tabla 2. Concentración de reactivos y condiciones de incubación para el establecimiento del protocolo de descontaminación de muestras.....	52
Tabla 3. pH correspondientes a las dos muestras tomadas de rizósfera de <i>P. americana</i> de cada UP. Se indica la media del pH de cada UP.	54
Tabla 4. Análisis estadístico de la longitud de la raíz primaria con el método de Dunnett y el método de Tukey.	60
Tabla 5. Análisis estadístico del número de raíces laterales con el método de Dunnett y el método de Tukey.	64
Tabla 6. Análisis estadístico de la densidad de raíces laterales con el método de Dunnett y el método de Tukey	68

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
µm	Micrómetro
AMF (Siglas en inglés)	Hongos micorrízicos arbusculares
BHI (Siglas en inglés)	Infusión de cerebro y corazón
cm	Centímetro
EM	Extracto de malta
G + C	Guanina más citosina
G	Gramo
Gb	Gigabases
H	Horas
Ha	Hectárea
IAA (Siglas en inglés)	Ácido-indol-3-acético
m / v	Masa / volumen
m	Metros
Mb	Megabases
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Murashige & Skoog
msnm	Metros sobre el nivel del mar
PGPR (Siglas en inglés)	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
pH	Potencial de hidrógeno
QS	Quorum sensing
rpm	Revoluciones por minuto
SDS (Siglas en inglés)	Dodecil sulfato de sodio
UFC	Unidades formadoras de colonias
UP	Unidades de producción
v / v	Volumen volumen
YE (Siglas en inglés)	Extracto de levadura

RESUMEN

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) influyen en el crecimiento y desarrollo de la planta incrementando la disponibilidad de nutrientes, participando en la producción de fitohormonas que regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento o liberando compuestos que inhiben a microorganismos fitopatógenos. Se ha reportado que las actinobacterias tienen características de PGPR por varios mecanismos y que se encuentran en gran número colonizando la rizósfera rica en materia orgánica participando en el ciclo de nutrientes, mientras que en suelos agrícolas, la aplicación de fertilizantes químicos, herbicidas y pesticidas, provoca un impacto negativo en el ecosistema que conlleva a una reducción de las poblaciones microbianas edáficas.

Con el objetivo de determinar la permanencia de actinobacterias autóctonas en suelos cultivados orgánicamente del municipio de Uruapan, Michoacán, se llevó a cabo un muestreo de rizósfera de *Persea americana* Mill, donde se obtuvieron 1,583 cepas con características fenotípicas de actinobacterias. Se seleccionaron 20 cepas con base a estas características y se evaluó su capacidad como PGPR *in vitro* utilizando como modelo vegetal a *Arabidopsis thaliana*. Los resultados mostraron que los 19 de los aislados manifiestan una bioestimulación tanto en la arquitectura radicular, como en la producción de follaje, que en última instancia, resultan en un incremento de la productividad de la planta. Sólo una cepa mostró represión del crecimiento de la raíz principal y marchitez en el follaje. El número de actinobacterias recuperadas en este estudio demuestra la conservación del microbioma que puede ser un indicativo de fertilidad. Además, su capacidad de promover el desarrollo vegetal les confiere un gran interés como una alternativa en futuras aplicaciones biotecnológicas agrícolas.

Palabras clave: rizósfera, actinobacterias, interacción, *Arabidopsis thaliana*, crecimiento vegetal.

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) influence plant growth and development by increasing the availability of nutrients, participating in phytohormone production that regulates the expression of genes and releasing compounds that inhibit phytopathogenic microorganisms. PGPR characteristics affect plant hosts by several mechanisms and they are found in large populations colonizing the rhizosphere rich in organic matter participating in the nutrient cycle, while in agricultural soils, the application of chemical fertilizers, herbicides and pesticides, may cause a negative impact on the ecosystem that leads to a reduction of edaphic microbial populations.

In order to determine the permanence of native actinobacteria in organically cultivated soils from Uruapan, Michoacán, a rhizosphere sampling of *Persea americana* Mill was carried out, where 1,583 strains with phenotypic characteristics of actinobacteria were retrieved. Twenty strains were selected and evaluated *in vitro* as PGPR using *Arabidopsis thaliana* as a plant model. The results showed an outstanding bio-stimulus, both in the root architecture, and in the size of the foliage, in 19 of the isolates, which ultimately result in an increase in plant productivity. Only one strain showed growth repression of the main root and wilting in the foliage. The number of actinobacteria recovered in this study demonstrates the conservation of the microbiome that may be an indication of fertility. In addition, their ability to promote plant development gives them great interest in future agricultural biotechnological applications.

Keywords: rhizosphere, interaction, actinobacteria, *Arabidopsis thaliana*, plant growth promoting.

1. INTRODUCCIÓN

La rizósfera es la zona del suelo influenciada por los exudados de las plantas a través de las raíces, que comprenden gran diversidad de compuestos químicos de alto y bajo peso molecular cuya concentración y composición dependen de factores físico-químicos y biológicos, además, son de gran importancia para el establecimiento de comunidades microbianas que utilizan estos sustratos como fuentes de nutrientes y energía (Huang *et al.*, 2014). Los exudados radicales también pueden actuar como moléculas de señalización para el acercamiento/formar asociaciones mutualistas con microorganismos y median las interacciones de éstos con las plantas (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Así, la rizósfera provee un complejo y dinámico microambiente, donde rizobacterias y hongos en asociación con las raíces, forman comunidades de gran importancia para el ecosistema edáfico (Martin *et al.*, 2011).

Los suelos rizosféricos contienen de 10 a 100 veces mayor número de microorganismos que el suelo adyacente (Jaramillo, 2002); entre ellos se encuentran las actinobacterias representando un 40% cuando se habla de suelos de bosques, mientras que en suelos cultivados se encuentran en un 20% debido a la menor cantidad de materia orgánica presente que usan como fuente de energía (Cardona *et al.*, 2009). Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas caracterizadas por su estructura filamentosa similar a la de los hongos y por su alto contenido de C + G en su ADN (Madigan *et al.*, 2009); gracias a su micelio filamentoso ramificado colonizan las raíces y pueden sobrevivir por periodos prolongados de tiempo debido a su capacidad de producir esporas. Son microorganismos saprófitos, pueden degradar una enorme cantidad y variedad de compuestos orgánicos y son extremadamente importantes en el ciclo de nutrientes y la fertilidad del suelo (Prescott *et al.*, 2002). Además de proveer nutrientes al suelo que son aprovechados por las plantas, las actinobacterias se incluyen en el grupo de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR).

Las PGPR son bacterias capaces de colonizar la superficie del sistema radicular y estimular el crecimiento, la salud y, con ello, la productividad (Varcheron *et al.*, 2013) a través de dos tipos de mecanismos: i) directos, como la solubilización de fósforo o fijación de nitrógeno que facilita su adquisición por parte de las plantas, o la producción de fitohormonas como auxinas, citocininas y giberelinas que modifican la arquitectura radicular lo que resulta en una mayor absorción de agua y nutrientes (Verbon *et al.*, 2016), y ii) indirectos, en los

cuales se promueve el crecimiento vegetal al inhibir el crecimiento de fitopatógenos, ya sea por la producción de sustancias antimicrobianas o de enzimas que actúan inhibiendo el micelio de hongos o por la producción de sideróforos que limita la disponibilidad del hierro, el cual es necesario para muchas de sus funciones biológicas (Moreno *et al.*, 2018). Sin embargo, la aplicación continua de fertilizantes y agroquímicos en las zonas de cultivo, así como la destrucción de los bosques para el mismo fin, ha provocado impactos negativos en los ecosistemas causando daños al ambiente, afectando la población de microorganismos edáficos y con ello, generando una baja en el rendimiento y productividad de los suelos (Moreno *et al.*, 2018).

Uruapan es uno de los municipios de Michoacán donde el cultivo de *Persea americana* ha aumentado considerablemente en los últimos años y donde los bosques han sido reemplazados para uso del suelo agrícola. Por lo que la recuperación de actinobacterias autóctonas de la rizósfera de aguacate puede ser un indicativo de la salud del suelo y nos permitiría realizar un estudio para evaluar su capacidad de promover el crecimiento vegetal con fines de aprovechamiento en el desarrollo de nuevas biotecnologías, pudiendo hacer uso de los microorganismos benéficos del suelo como bio-fertilizantes, fito-estimulantes o agentes de biocontrol y reducir el deterioro ambiental.

2. ANTECEDENTES

2.1. Descripción de la zona de muestreo

Uruapan proviene de la palabra tarasca "*uruapani*" y significa "el florecer y fructificar de una planta al mismo tiempo", por lo que se ha traducido como "lugar donde los árboles tienen siempre fruto" (INFAED, 2010). Se localiza al Oeste del estado, entre los paralelos 19°11' y 19°38' de latitud norte; los meridianos 101°56' y 102°24' de longitud oeste (INEGI, 2009) y tiene una altitud de 1640 msnm (metros sobre el nivel del mar) (INEGI, 2017). Colinda al norte con los municipios de Los Reyes, Charapan, Paracho y Nahuatzen; al este con los municipios de Nahuatzen, Tingambato, Ziracuaretiro, Taretan, Nuevo Urecho y Gabriel Zamora; al sur con los municipios de Gabriel Zamora, Parácuaro, Tancítaro y Nuevo Parangaricutiro; al oeste con los municipios de Nuevo Parangaricutiro, Tancítaro, Peribán y Los Reyes (INEGI, 2009).

La región del municipio de Uruapan tiene altitudes que van desde los 700 hasta los 3 300 msnm debido a la conformación del relieve por el sistema volcánico transversal, y los cerros de Charanda, la Cruz, Jicalán y Magdalena (INEGI, 2009). Esa variabilidad de altitudes conlleva a que haya diferentes tipos de clima, principalmente templado subhúmedo, templado húmedo, semicálido húmedo semicálido subhúmedo, cálido subhúmedo y un amplio rango de temperaturas que oscilan entre los 8 a 37°C la mayor parte del año (INFAED, 2010). Cuenta con siete tipos de suelo (Fig. 1), dominando el Andosol en un 51.98%, seguido por Leptosol (15.99%), Luvisol (13.98%), Cambisol (6.59%), Phaeozem (3.76%), Regosol (1.71%) y Vertisol (0.19%).

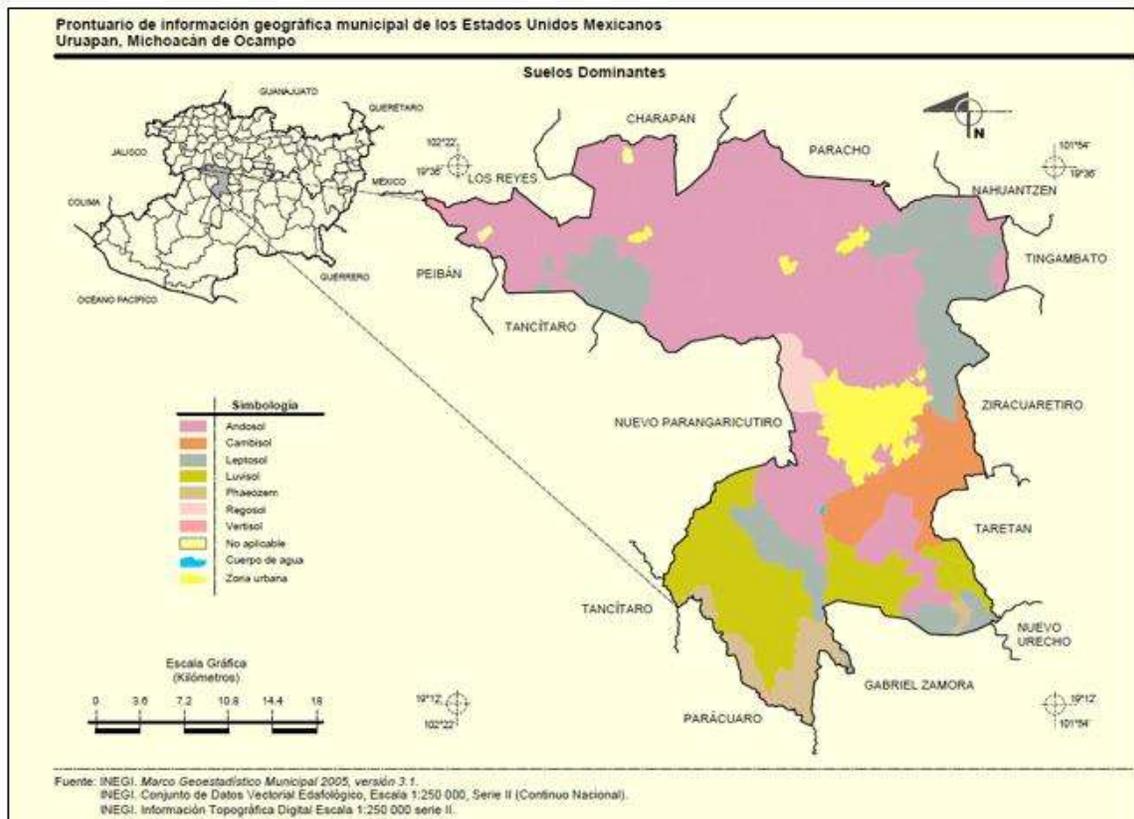


Figura 1. Tipos de suelo del municipio de Uruapan, Michoacán. Imagen recuperada de Prontuario Oficial de Información Geográfica INEGI, 2009.

Hasta el año 2009, el uso de suelo era en un 54.19% de bosque mixto con pino-encino, y bosque tropical y un 30.57% era suelo cultivado (Fig. 2). Sin embargo; la actividad socio-económica más importante del municipio de Uruapan es la agricultura, específicamente el cultivo de aguacate. Actualmente, su cultivo cubre 16,303.69 ha, aproximadamente 4,000 ha más que en 2009 (SIAP, 2019), lo que se refleja en un descenso de la superficie de áreas boscosas.

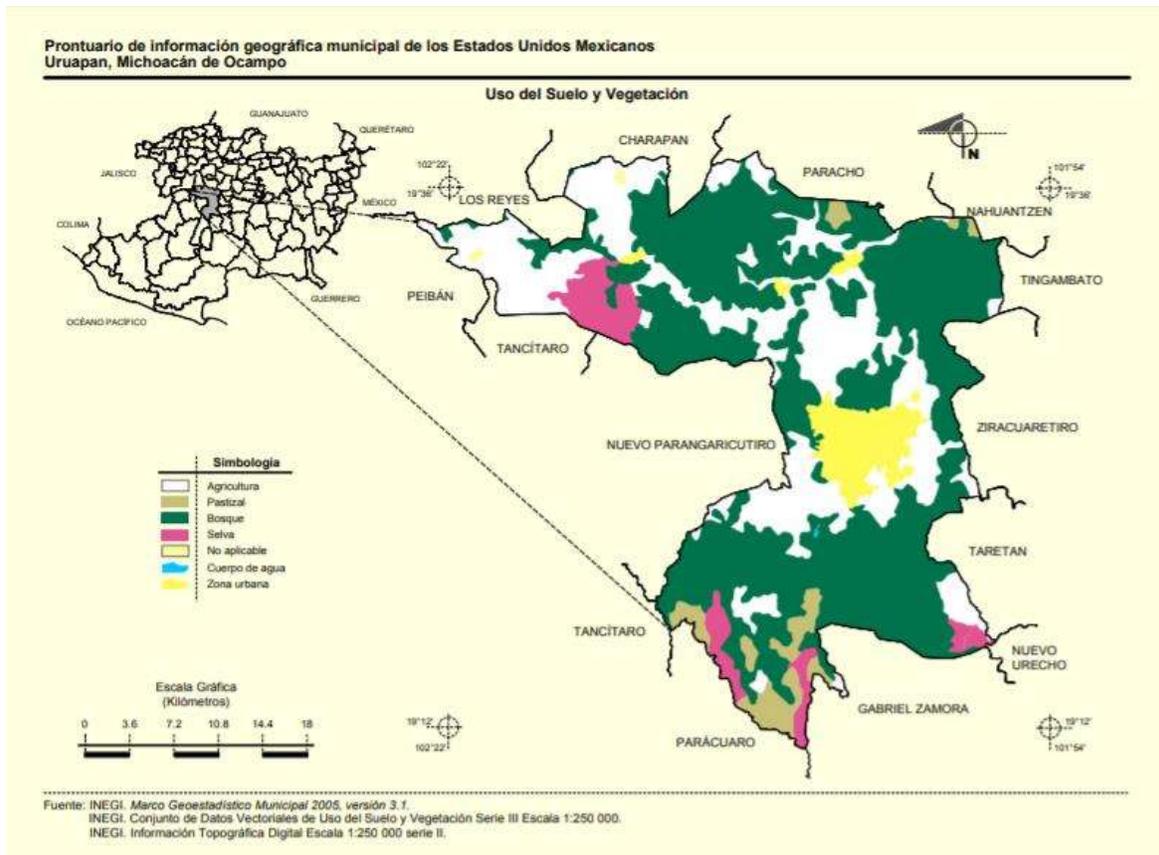


Figura 2. Uso del suelo del municipio de Uruapan, Michoacán. Imagen recuperada de Prontuario Oficial de Información Geográfica INEGI, 2009.

2.2. Descripción del cultivo de *Persea americana* Mill

2.2.1. Generalidades

El aguacate es un árbol de la familia *Lauraceae* cuyo nombre científico es *Persea americana* Mill; el nombre del aguacate proviene del náhuatl “ahuacatl”, que significa “testículos del árbol”; es originario de Mesoamérica lo cual incluye la parte Central de México, así como las partes altas de Guatemala y las Antillas (CEDRSSA, 2017) (SAGARPA, 2011). Se considera un producto perenne, es decir, que se cultiva durante todo el año; el árbol es frondoso y a pesar de que llega a crecer hasta 20 m, cuando se cultiva en plantaciones comerciales, no se deja a más de 5 m para facilitar las prácticas de

control sanitario, poda, cosecha y fertilización foliar (SAGARPA, 2011); tiene floración abundante, cada árbol llega a producir hasta un millón de flores, sin embargo; solo el 0.1% logra transformarse en fruto (SAGARPA, 2017). El fruto es una drupa con un rango amplio de peso (entre 120 y 500 g), con cáscara lisa o rugosa de color verde claro a verde oscuro mientras está en el árbol, y de violeta a negro en etapa de maduración, donde la pulpa tiene una consistencia suave y cremosa. Además de su principal uso como producto alimenticio, se emplea para extracción de aceite y en aplicaciones cosméticas (Pérez *et al.*, 2015).

2.2.2. Variedades

Generalmente se identifican tres variedades de aguacate que están distribuidas de acuerdo con la altitud y la presencia de zonas libres de heladas. Así tenemos que, en general, en el territorio nacional se le encuentra por arriba de los 2000 m de altitud (zona templada), predomina en bosques de pino-encino y se caracteriza por su alto contenido de aceite; la variedad guatemalteca crece entre los 1000 y 2000 m (zona subtropical) en los bosques mesófilos de montaña, posee una cáscara gruesa que le confiere protección durante su transporte pero dificulta conocer su estado de maduración mediante el tacto; y la antillana que se encuentra por debajo de los 1000 m (zona tropical) (Barrientos, 2010; Pérez *et al.*, 2015; González *et al.*, 2018). Existen híbridos que tienen una adaptación intermedia entre razas, ejemplos de ello son el aguacate denominado Hass, Fuerte, Criollo y Bacón (SAGARPA, 2011).

El aguacate Hass es un cruzamiento de las razas guatemalteca (predominantemente) y mexicana (de 10 a 15%) (González *et al.*, 2018) que fue patentado por Rudolph G. Hass, en La Habra Heights (California) en 1935 (DANE, 2016). Es el de mayor preferencia en el mundo, en un porcentaje cercano al 80% (Bernal *et al.*, 2014) y, por lo tanto, la variedad más comercializada internacionalmente (Pérez *et al.*, 2015), principalmente por su excelente calidad de pulpa, hueso pequeño y alto contenido de aceite (23.7%) (González *et al.*, 2018). Esta variedad es cultivada en el 90% de los huertos mexicanos (Barrientos, 2010), es autofértil y su fruto tiene la capacidad de permanecer adherido al árbol hasta tres meses después de su maduración fisiológica, esto le permite a los productores hacer una planeación de la cosecha considerando factores ambientales y, sobre todo, condiciones

del mercado (Salazar *et al.*, 2016). Además tiene alta resistencia al manejo post-cosecha y transportación (CEDRSSA, 2017).

2.2.3 Requerimientos ambientales

La temperatura para el cultivo de aguacate va de los 15 a los 24 °C; es sensible al frío y a la humedad; requiere regímenes pluviales de 1,000 a 2,000 mm de lluvia bien distribuidos durante todo el año (SAGARPA, 2011); se cultiva en altitudes que van desde los 800 hasta 2,500 msnm (González *et al.*, 2018); el suelo más recomendado son los de textura ligera, suelos arcillosos o franco-arcillosos (DANE, 2016), profundos y bien drenados (SIAP, 2019); con un pH óptimo de 5.5 a 7 (CEDRSSA, 2017) (SAGARPA, 2017).

2.2.4. Plagas

Los daños causados por fitopatógenos están entre los factores que más afectan la productividad y la vida de un árbol de aguacate. Entre ellos se encuentran *Phytophthora cinnamomi* y *Cylindrocladium sp*, que afectan las raíces; *Copturomimus perseae gunther* un taladrador del tronco; el gusano barrenador de hueso *Heilipus lauris Boheman*; *Verticillium albo atrum Reinke* produce marchitamiento de la planta; patógenos que atacan el fruto como *Cercospora purpurea Cooke*, *Rhizopus stolonifer Ehrenb*, *Dothiorella sp. Sacc*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Heliothrips haemorrhoidalis* comúnmente llamado “trip”, *Stenomema catenifer*; el hongo *Sphaceloma perseae* produce lo que vulgarmente se le conoce como roña, afecta a la hojas y daña a los frutos, deteriorando su calidad estética; y la antracnosis, que es la enfermedad que más afecta la post-cosecha, es causada por el hongo *Colletotrichum Gloeosporioides* (Bernal *et al.*, 2014) (INIFAP, 2017).

2.2.5. Nutrición

En México, los dueños de huertos viejos argumentaban que era común el obtener buen rendimiento en la producción de frutos sin la necesidad de aplicación de fertilizantes (Bernal

et al., 2014); sin embargo; la sobre-explotación del suelo ha declinado significativamente la fertilidad nativa, así también, el cultivo se ha expandido y establecido en áreas con mayores limitantes geográficas, lo que ha llevado a una necesidad de la aplicación de abonos y fertilizantes para evitar estas deficiencias nutricionales, pero de igual forma, su uso a corto y largo plazo afectan la sostenibilidad, lo que ha generado un problema aún mayor y un impacto negativo al ambiente (Tapia *et al.*, 2014). Algunos productores ya han optado por establecer huertos orgánicos, que reciben nutrición por medio de composta, lombricomposta, residuos estercolados, complejos orgánicos líquidos, roca fosfórica, harina de pescado y, en muchas ocasiones, complementan este manejo con fertilizantes biológicos como *Azospirillum* sp., *Glomus* sp. y algunas especies de *Bacillum* sp. (INIFAP, 2017).

2.2.6. Producción mundial

El aguacate es la cuarta fruta tropical de mayor importancia a nivel mundial por volumen de producción (Peña *et al.*, 2015); según datos de la FAO, en 2009, la producción global se estimó en 2.6 millones de toneladas, siendo 1.2 millones de toneladas aportadas por México; para 2017, la producción aumentó a 5.8 millones de toneladas (González *et al.*, 2018), siendo México nuevamente el mayor productor, seguido por República Dominicana, Perú, Colombia e Indonesia. La producción mexicana de aguacate es un referente de calidad y productividad a nivel internacional (SIAP, 2018).

2.2.7. Producción en México

México es el principal productor de aguacate internacionalmente, ya que produce una tercera parte del total mundial (Pérez *et al.*, 2015). Para el 2018, se reportaron 231, 524.02 Ha de superficie cultivada, principalmente en la región centro-occidente, del cual el 76.6% del valor de la producción nacional corresponde a Michoacán, sin embargo; el cultivo en los estados de Jalisco y el Estado de México va en aumento (SIAP, 2019).

2.2.8. Producción en Michoacán

La franja aguacatera del estado de Michoacán incluye a 22 municipios que va desde Zitácuaro en el oriente hasta Cotija en el poniente; abarca 5 tipos de climas y 11 tipos de suelo (CEDRSSA, 2017). Para el año 2018, se reportaron 166,603.84 Ha de superficie con este cultivo, 59,546.27 Ha más que en 2008.

2.2.9. Producción en Uruapan

El municipio de Uruapan, es una de las superficies con mayor extensión de cultivo de *P. americana* en el estado de Michoacán, con una superficie de 16,200 Ha registradas en 5,906 unidades de producción (UP), de las cuales 138 se encuentran registradas en producción orgánica hasta Diciembre del 2018, según datos de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Uruapan (JLSV, 2019).

El aguacate orgánico es una alternativa al aguacate convencional debido a que puede ser de menor impacto ambiental sobre todo en el aspecto fitosanitario y nutricional (Tapia *et al.*, 2014). Pese a ello, el porcentaje de este cultivo es relativamente bajo. En la región de Uruapan, la JLSV tiene los primeros registros de UP orgánico en el 2015, con una superficie que cubría 462 Ha, la cual aumentó a 3,200 Ha hasta Diciembre del 2018 (SIAP, 2019).

2.3. La rizósfera

2.3.1. Generalidades

La rizósfera es la parte del suelo inmediata a las raíces, por las que se liberan compuestos diversos que crean un entorno circundante y dinámico único (Ortiz-Castro *et al.*, 2009) en donde se llevan a cabo una serie de reacciones físicas y químicas que afectan a la estructura del suelo y a los organismos que viven en él (Martín *et al.*, 2011).

El término rizósfera fue acuñado por Hiltner, agrónomo alemán, que empleó esta palabra para hacer referencia al efecto de las raíces de las leguminosas sobre bacterias del suelo

(Hartmann *et al.*, 2008). Está relacionado con una mayor actividad microbiana causada por la liberación de materia orgánica desde una planta que está habitada por una población única de (McNear, 2013). Así pues, las características físicas, bioquímicas y ecológicas de la rizósfera se definen por el equilibrio entre los diferentes compuestos liberados (Ortiz-Castro *et al.*, 2009) y tienen importantes funciones para la nutrición, la salud y la calidad de los cultivos (Berg *et al.*, 2009).

2.3.2. Estructura

En la rizósfera se incluyen tres zonas que se definen en función de su proximidad relativa y, por lo tanto, de la influencia de la raíz (Fig. 3) (McNear, 2013):

1. La raíz en sí misma es parte del sistema y se denomina endorrizósfera o rizósfera interna; comprende la corteza de la raíz, es decir, el tejido que se encuentra entre la endodermis y la epidermis (Jaramillo, 2002) en el que ciertos microorganismos, los endófitos (Barea *et al.*, 2005), pueden colonizar los tejidos de la raíz, ocupando el "espacio libre" entre las células (McNear 2013).
2. Rizoplano, que es zona directamente adyacente de la raíz (Barea *et al.*, 2005), donde las partículas del suelo y los microbios se adhieren (Prashar *et al.*, 2013).
3. Exorrizósfera, ectorrizósfera o rizósfera externa, que es el suelo que está en íntimo contacto con la superficie de la raíz y que por ello es llamado también suelo rizosférico (Jaramillo, 2002).

Es el ecosistema terrestre más grande, tanto en términos energéticos como de extensión; su tamaño y forma varían debido a la complejidad y diversidad inherentes de los sistemas de raíces de las plantas (McNear, 2013) pero se acepta que tiene entre 1 y 10 mm de espesor (Jaramillo, 2002). Sin embargo; esta distancia no es absoluta, siendo dependiente de las propiedades del suelo, como lo es el tamaño de partícula, contenido de agua y la capacidad reguladora del pH (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009).

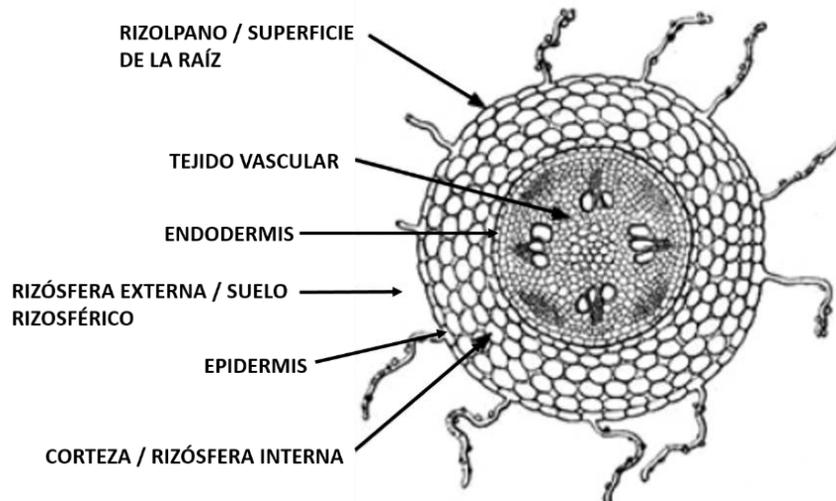


Figura 3. Componentes estructurales de la rizósfera. Se señalan las tres zonas de la rizósfera: rizósfera interna, rizoplaneo y rizósfera externa, así como las partes de la planta que las delimitan. Tomada y Modificada de Facultad de Ciencias Agrarias, 2016.

2.3.3. Exudados de la raíz

Además de las funciones clásicas de las raíces, como proporcionar soporte mecánico y permitir la absorción de agua y nutrientes (Megías *et al.*, 2018), es la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios con gran diversidad de propiedades físicas y químicas lo que otorga sus propiedades a la rizósfera (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009). Los microorganismos ajustan sus actividades metabólicas en respuesta al estrés o a estímulos de tipo bióticos y abióticos (Bais *et al.*, 2001). Los productos de la raíz impartidos al suelo circundante generalmente reciben el nombre de rizodeposiciones (McNear, 2013) o exudados radicales (Walker *et al.*, 2003).

Se sabe que no todas las plantas liberan la misma cantidad ni la misma composición química de exudados radicales, y que una misma especie puede liberar compuestos diferentes (Lobo, 2012), en diferente cantidad y en diferente tiempo (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Esta variabilidad está influenciada por muchos factores, incluidos las propiedades químicas, físicas, biológicas y nutricionales del suelo circundante, el tipo y la edad de la planta así como su estado de desarrollo (McNear, 2013), las condiciones propias del ambiente (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009), la disponibilidad de agua, el pH, la temperatura,

la intensidad de luz o la concentración atmosférica de CO₂ (Lobo, 2012). Se estima que entre el 20 a 40% del carbono fijado fotosintéticamente es finalmente transferido a la rizósfera (Ortiz-Castro *et al.*, 2009) y que el suministro de compuestos orgánicos a la zona de las raíces es de entre 50 y 100 mg de materia orgánica por gramo de raíz (Bach *et al.*, 2008).

2.3.4. Clasificación

Los exudados radicales se clasifican en tres grupos principales: (1) compuestos de bajo peso molecular, (2) compuestos de alto peso molecular y (3) compuestos orgánicos volátiles.

Los compuestos de bajo peso molecular representan la parte principal de los exudados y los de mayor interés al momento de evaluar la transmisión de información al medio por parte de las plantas (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009), son los más diversos y, por lo tanto, de los que se tiene mayor conocimiento (McNear, 2013); se liberan por difusión pasiva dependiente de la permeabilidad de la membrana y la polaridad de los compuestos (Huang *et al.*, 2014) y consisten en ácidos orgánicos, azúcares sencillos, polisacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, fenólicos simples, esteroides, factores de crecimiento, flavonoides, vitaminas y diversos metabolitos secundarios (Prashar *et al.*, 2013). Generalmente son los más fáciles de utilizar como fuente de energía por los microorganismos (McNear, 2013).

Los compuestos de alto peso molecular se liberan al medio de forma activa, mediante proteínas transportadoras con gasto de ATP (Huang *et al.*, 2014), constan de secreciones que incluyen carbohidratos poliméricos o mucílagos y proteínas (Walker *et al.*, 2003). Los mucílagos están formados fundamentalmente de polisacáridos, forman una cobertura alrededor de algunas partes de la raíz, principalmente la cofia y ejercen una función de lubricación que la protege durante su crecimiento, puesto que reduce la fuerza de fricción que se genera mientras se abre paso a través del suelo (McNear, 2013); además son capaces de retener gran cantidad de agua formando mucigeles que protegen contra la desecación (Vargas-Rojas, 2011) y que influyen en la agregación de las partículas interviniendo en el mantenimiento de la estabilidad del terreno frente a la erosión y la acción del agua (Torres *et al.*, 2013); también se ha demostrado que atraen microorganismos

benéficos, sirven como “cebo” los cuales interactúan con patógenos de las raíces y secuestran metales tóxicos (Hawes *et al.*, 2000). Las proteínas ejercen diferentes funciones; algunas pueden comportarse como moléculas de almacenamiento que proporcionan carbono, nitrógeno y azufre después de un periodo de reposo o estrés (Bais *et al.*, 2001), otras funcionan como factores de defensa y participan en el establecimiento de relaciones simbióticas (Huang *et al.*, 2014) así como poseen actividades enzimáticas diversas, incluyendo fosfatasas, proteasas, ureasas, glutaminasas, deshidrogenasas y proteínas inactivadoras de ribosomas (Bais *et al.*, 2001). El dióxido de carbono, ciertos metabolitos secundarios, alcoholes y aldehídos constituyen el grupo de compuestos orgánicos volátiles (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).

2.3.5. Funciones

Los exudados radicales participan en diversas interacciones rizosféricas que son muy importantes para el funcionamiento en el ecosistema edáfico (Berg *et al.*, 2009): brindan estructura y estabilidad al suelo gracias a la producción de mucigeles (Vargas-Rojas, 2011); la secreción de compuestos que ayudan a la adquisición de nutrientes insolubles (Lobo, 2012) al cambiar las condiciones del ambiente de la rizósfera por medio de una acidificación del suelo introduciendo ácidos como málico y cítrico o una alcalinización producida por bicarbonatos debido a que estos cambios de pH pueden influir en la disponibilidad de los nutrientes o forman quelantes directamente con el nutriente para, posteriormente, ser asimilado por las plantas (McNear, 2013).

Algunos vegetales exudan compuestos que reducen la competencia al modificar el medio con sustancias fitoactivas, en un proceso llamado alelopatía (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009) donde se impide la germinación y proliferación de semillas de otras plantas (Lobo, 2012). Confieren una acción protectora contra patógenos y plagas con la producción de metabolitos secundarios que resultan tóxicos (Bais *et al.*, 2001) o simplemente actúan como repelentes químicos (Torres *et al.*, 2013); o caso contrario, diversos compuestos son moléculas de señalización (Bais *et al.*, 2006) que producen reacciones de acercamiento de microorganismos (quimiotaxis) y establecen relaciones simbióticas (McNear, 2013). Las moléculas de señalización son encargadas de la comunicación y la formación de

interacciones ya sean de tipo planta-planta o planta-microorganismo (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).

2.3.6. Interacciones planta - planta

Los exudados radicales desempeñan importantes funciones en interacciones, tanto benéficas como negativas, de plantas que co-habitan en un entorno (LinKun *et al.*, 2014). A continuación, se describen algunas de ellas.

2.3.6.1 Interacciones negativas

Las interacciones negativas a través de exudados radicales son un factor importante en la competencia de las plantas y tienen gran impacto en la diversidad de la comunidad vegetal (Mommer *et al.*, 2016). Algunas plantas activan un mecanismo de defensa llamado aleopatía (Latif *et al.*, 2017), donde producen y liberan fitotoxinas potentes de bajo peso molecular llamados aleloquímicos, que ejercen un efecto perjudicial sobre el metabolismo primario necesario para el establecimiento, crecimiento y desarrollo de plantas vecinas susceptibles, lo que reduce la competencia y aumenta la disponibilidad de recursos procurando la prevalencia de la especie productora (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009) (Bais *et al.*, 2006).

2.3.6.2. Interacciones benéficas

Los exudados de la raíz pueden tener efectos positivos en las interacciones planta-planta (Bais *et al.*, 2006). Cuando las plantas están bajo ataque de algún organismo patógeno, las raíces responden secretando ciertas moléculas y proteínas pequeñas que actúan como señales para la defensa de vecinos contra patógenos o herbívoros (Walker *et al.*, 2003) que inmediatamente reconocen y responden adaptando sus fenotipos (Baldwin, 2006). La supervivencia de cualquier especie vegetal en un entorno rizosférico, depende particularmente de su capacidad de percepción de cambios ambientales y su respuesta adaptativa (Walker *et al.*, 2003) puesto que tienen más probabilidades de estar preparadas

a un ataque y pueden reducir sustancialmente las poblaciones de los acechantes (Bais *et al.*, 2006). Dentro de los mecanismos de respuesta inducida, se encuentra la producción de compuestos como proteínas relacionadas con patogénesis con actividad antimicrobiana, inhibidores de proteinasas que afectan insectos, producción de sustancias volátiles que atraen depredadores o parasitoides y néctar para atraer artrópodos que afectan a herbívoros (Ramírez *et al.*, 2012). Ejemplos de estas interacciones, fueron evidenciados por Glinwood *et al.* (2003), mediante un ensayo *in vitro* donde observaron que compuestos fitotóxicos exudados de las raíces de *Elytrigia repens* (pasto), del cual se identificó la carbolina, indujo respuestas de defensa de *Hordeum vulgare* (cebada) frente a poblaciones de áfidos que fueron repelidos por los olores generados por las plantas de cebada. De manera similar, plantas de *Vicia faba* (habas) bajo ataque de ácaros producen exudados de las raíces que inducen la producción volátil en plantas de *V. faba* no dañadas que aumentan la señal de atracción de depredadores (Guerrieri *et al.*, 2002).

2.3.7. Microorganismos de la rizósfera

Los suelos contienen una gran cantidad de bacterias, hongos, protozoos, nematodos, lombrices de tierra y artrópodos, siendo mayor el número y diversidad en sustratos ricos en materia orgánica, como los bosques y selvas (Bhattarai *et al.*, 2015). Las bacterias son el grupo más abundante, pues se les encuentra presentes en un rango aproximado de 10^6 y 10^8 células por gramo de suelo (Calvo-Vélez *et al.*, 2008), los actinomicetos llegan a representar hasta el 90% (Cardona *et al.*, 2009). En cuanto a los hongos, dado su mayor tamaño aunque menor abundancia, tienen la biomasa más significativa, representando un 10 a 20% de la microbiota total, esto es aproximadamente 10^5 a 10^6 organismos / gramo de suelo (Calvo-Vélez *et al.*, 2008). Sin embargo, los principales grupos de microorganismos, son de 10 a 100 veces más abundantes en la rizósfera que en el suelo adyacente (Jaramillo, 2002) y pueden comprender más de 30,000 especies en general (Bhattarai *et al.*, 2015), debido a que los exudados liberados por las raíces de las plantas son una fuente importante de alimento para los microorganismos y una fuerza impulsora de su densidad de población y sus actividades (Hartmann *et al.*, 2008) (Transati SL, 2014); así también, pueden actuar como señales de atracción microbiana y estos repercuten de manera directa, de forma positiva o negativa, en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales (Raaijmakers *et al.*, 2009) (Cano, 2011).

El suelo rico en materia orgánica, como el suelo de los bosques, contiene el mayor número de microorganismos (Bhattarai *et al.*, 2015) y esto refleja la salud de los ecosistemas (Tolosa *et al.*, 2014), puesto que su interacción y comunicación con las raíces, forman comunidades únicas que desempeñan un papel fundamental en la fertilidad, manteniendo el crecimiento y productividad de los cultivos (Transati SL, 2014). Particularmente, las poblaciones que se encuentran en la rizósfera son específicas y dependen en gran medida de la composición de la comunidad vegetal y de los exudados excretados (Steinauer *et al.*, 2016), siendo las bacterias el grupo con mayor densidad, por su rápido crecimiento y su habilidad de utilizar el amplio rango de sustratos como fuentes de carbono y nitrógeno (Calvo-Vélez *et al.*, 2008).

2.3.9. Interacciones planta - microorganismo

Las raíces atraen a los microorganismos mediante quimiotaxis (Bais *et al.*, 2006) y crean un sistema de intercambio químico que determinan los resultados de las interacciones, (Contreras, 2010). Dentro de este ambiente, las bacterias se comunican entre sí a través de la producción y detección de moléculas pequeñas o autoinductores bacterianos en concentración dependiente de la densidad poblacional en un mecanismo denominado “quorum sensing” (QS) (Rojas, 2011) y a su vez usan este sistema para poder comunicarse con sus huéspedes y mediar las interacciones planta-microbio, tanto patógenas como benéficas (Ortiz *et al.*, 2013). Los procesos de QS están involucrados en fenómenos como simbiosis, virulencia, producción de antibióticos, producción de toxinas, formación de biopelículas, fijación de nitrógeno, motilidad y esporulación (Ortiz *et al.*, 2013) (Kalia, 2014)

2.3.9.1. Interacciones negativas

Las interacciones negativas incluyen la patogénesis por microorganismos que residen en el suelo, principalmente por hongos (*Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*), entre otros y nematodos, sólo un pequeño grupo de bacterias pueden causar infección (comúnmente *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Dickeya solani*, y algunas especies de *Pectobacterium*), probablemente porque las bacterias que no forman esporas no pueden sobrevivir bien en el suelo por periodos largos, además requieren una herida o

abertura de la planta para poder infectar. Los virus pueden infectar plantas a través de las raíces pero requieren de vectores para poder penetrar al tejido (Mendes *et al.*, 2013). Los agentes patógenos del suelo pueden causar descomposición y pudrición de la raíz, tallos, frutos y semillas, lo que provoca pérdidas de cultivos o una considerable baja en el rendimiento de la producción (Raaijmakers *et al.*, 2009).

2.3.9.2. Interacciones benéficas

Los microorganismos benéficos se establecen cerca de las raíces y producen efectos sobre la inmunidad y la salud vegetal (Verbon *et al.*, 2016). Entre las interacciones benéficas se incluyen relaciones simbióticas, como la asociación *Rhizobium*-leguminosa, donde la bacteria tiene la capacidad de inducir la formación de nódulos en los cuales se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (López *et al.*, 2017) o las asociaciones formadas entre hongos micorrízicos arbusculares (AMF) y las raíces del más del 80% de las plantas terrestres, donde se promueve la proliferación de los AMF, la ramificación hifal y les aportan beneficios como el aumento de la absorción de nutrientes y mejora de la aptitud de la planta bajo condiciones de estrés abiótico y, a su vez, extraen lípidos y carbohidratos de la raíz del huésped (Barrer, 2009) (Bais *et al.*, 2006). En esta misma zona de la raíz, los hongos inducen respuestas de defensa contra ataques de microorganismos fitopatógenos con la activación de vías dependientes de moléculas señalizadoras como el ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido indol-3-acético, etileno, ácido abscísico y ácido giberélico (Contreras, 2010) (Verbon *et al.*, 2016). Las plantas también interactúan con microorganismos (principalmente especies de hongos como *Trichoderma* spp. y bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*) (Ciancio *et al.*, 2019) que actúan como agentes de biocontrol contra posibles patógenos (Bais *et al.*, 2006) a través de mecanismos como el antagonismo mediado por la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos o enzimas líticas, la competencia de nutrientes, el parasitismo por el agente de biocontrol contra el patógeno, la depredación y la inducción de respuestas de defensa y resistencia de las plantas (Raaijmakers *et al.*, 2009; Bolívar *et al.*, 2019). A diferencia de los simbiontes obligados, un grupo heterogéneo de bacterias denominadas Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (Vacheron *et al.*, 2013), pueden interactuar con un gran número de plantas hospederas colonizando sus raíces y proporcionándoles beneficios de crecimiento y desarrollo mediante diversos mecanismos (Verbon *et al.*, 2016).

2.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

El término PGPR (del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”) fue utilizado por primera vez por Kloepper (1978) para describir a las bacterias que habitan en la rizósfera y que afectan positivamente el crecimiento y productividad (Kloepper & Schroth, 1978), por lo que las investigaciones en esta área se han intensificado a un ritmo cada vez mayor desde entonces (Tsegaye *et al.*, 2017) en busca de una alternativa para la agricultura sustentable (Singh *et al.*, 2011). Para que una bacteria sea considerada PGPR debe cumplir tres características (i) debe ser capaz de colonizar la superficie de la raíz (ii) debe sobrevivir y multiplicarse en microhábitats en competencia eficaz y (iii) debe estimular el crecimiento vegetal (Franco, 2008). Los exudados de la raíz como carbohidratos y aminoácidos estimulan la quimiotaxis de las PGPR (Bais *et al.*, 2006) quienes colonizan el sistema radical y los pelos radiculares donde manifiestan sus propiedades benéficas (Vacheron *et al.*, 2013) estableciendo micro-colonias o biopelículas (Tsegaye *et al.*, 2017) donde la densidad y estructura que adquieren sobre la superficie de la raíz están dictadas por la disponibilidad de nutrientes y las variaciones fisicoquímicas en toda la superficie (McNear, 2013).

Los beneficios de las PGPR incluyen aumentos en la tasa de germinación de semillas y productividad, crecimiento de raíces y área foliar, peso de brotes y raíces, contenido de clorofila y/o tolerancia a la sequía, (Tsegaye *et al.*, 2017) mediante diversos mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos implican la producción de metabolitos sintetizados por las bacterias, que son capaces de estimular el crecimiento vegetal (Bach *et al.*, 2008), o bien, cuando las bacterias incrementan la disponibilidad de ciertos nutrientes del medio ambiente requeridos para su metabolismo y mejora de su proceso de nutrición; mientras que los mecanismos indirectos se caracterizan por promover el crecimiento vegetal al inhibir o antagonizar los efectos nocivos de microorganismos fitopatógenos u ocasionar su eliminación por acción de las PGPR (Singh *et al.*, 2011).

2.4.1. Mecanismos directos

2.4.1.1. Fijación no simbiótica de nitrógeno

El nitrógeno atmosférico es uno de los principales factores para el crecimiento y productividad de la planta, indispensable para la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos o aminoácidos (Franco, 2008). Cerca del 78% del N se encuentra en la atmósfera en forma de N₂ pero necesita su conversión en amoníaco para ser asimilado por las plantas. Sin embargo, a diferencia de las bacterias, las plantas no poseen el complejo enzimático de nitrogenasa que cataliza la reducción del N₂ atmosférico en amoníaco (Vieira *et al.*, 2019). Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentran *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Frankia*, *Gluconacetobacter*, *Beijerinckia*, entre otras (Bach *et al.*, 2008).

2.4.1.2. Solubilización del fósforo

El fósforo es el segundo nutriente esencial limitante para el crecimiento de las plantas, desempeña un papel importante en prácticamente todos los procesos metabólicos, incluidos la fotosíntesis y la respiración (Vieira *et al.*, 2019). El fósforo se adquiere en forma de fosfato (PO₄⁻³), que es poco soluble en los suelos ya que se une fuertemente a cationes como el Ca, Al y Fe, así mismo, la materia orgánica del suelo limita su disponibilidad (McNear, 2013). Las bacterias, principalmente de los géneros *Achromobacter*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* (Tsegaye *et al.*, 2017), solubilizan el fosfato por la acidificación del medio a través de la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el glucónico y el 2-cetoglucónico (Vacheron *et al.*, 2013), y además, forman complejos estables con los cationes unidos al fosfato (Moreno *et al.*, 2018). Las bacterias también liberan el fosfato orgánico mediante la acción hidrolítica de enzimas fosfatasas (Bach *et al.*, 2008).

2.4.1.3. Producción de fitohormonas

El mecanismo más estudiado de las PGPR es la producción de moléculas orgánicas que, a bajas concentraciones, regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento y desarrollo vegetal, denominadas fitohormonas (Bach *et al.*, 2008), destacando las auxinas, las citocininas y las giberelinas (Vieira *et al.*, 2019). Estas moléculas producen diferentes efectos sobre la fisiología vegetal como aumentar la tasa de respiración de la raíz (Molina-Romero *et al.*, 2015), el aumento de la biomasa de los brotes (Ortiz *et al.*, 2009) y la modulación de la arquitectura del sistema radical (Verbon, 2016), ya sea por el aumento del número y / o la longitud de las raíces laterales y pelos radicales (Vacheron *et al.*, 2013), que incrementa el potencial de exploración del sistema radicular para la absorción de agua y nutrientes, y por lo tanto, el crecimiento (Ortiz, 2008).

La producción de auxinas es el factor más importante en la estimulación del sistema radicular y la promoción del crecimiento vegetal (Ortiz, 2008). El ácido indol-3-acético (IAA) es la auxina más estudiada; se produce en las zonas meristemáticas, así como en los primordios y se distribuye a los tejidos de demanda (Maheshwari *et al.*, 2015). Se estima que alrededor de un 80% de las rizobacterias lo sintetizan como un producto final del metabolismo a partir del triptófano que se encuentra comúnmente en los exudados de raíz (Franco, 2008). *Azospirillum brasiliense* es un ejemplo de rizobacteria que estimula el crecimiento vegetal a través de éste mecanismo, se ha demostrado su capacidad para alterar la raíz en *A. thaliana* al aumentar la expresión génica y a señalización de auxinas (Fig. 4) (Spaepen *et al.*, 2013). El IAA exógeno a bajas concentraciones, estimula el alargamiento de la raíz, mientras que a niveles altos estimula la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Vacheron *et al.*, 2013), lo cual ayuda en la proliferación celular y mejora la absorción de nutrientes y minerales del suelo por parte del huésped (Singh, 2015). Además, estimula la germinación de semillas y tubérculos, controla el proceso de crecimiento vegetativo, interviene proceso de fotosíntesis al intervenir en respuesta a la luz, participa en la formación de pigmentos, la biosíntesis de metabolitos secundarios y resistencia a condiciones estresantes (Jog *et al.*, 2016).

Las giberelinas regulan diversos aspectos del crecimiento vegetativo y reproductivo, incluyendo la germinación de semillas, alargamiento del tallo y expansión de la hoja, inducción y crecimiento floral, promoción de la producción de fruta y actúan en respuesta a diferentes tensiones abióticas (Castillo *et al.*, 2015). La producción de giberelinas se ha

documentado en varios PGPR pertenecientes a *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconobacter diazotrophicus* y *Rizobia* (Vacheron *et al.*, 2013).

Las citocininas son una clase de fitohormonas que tienen un papel importante en todas las fases de desarrollo de la planta desde la germinación de las semillas hasta la respuesta al estrés abiótico y biótico (Castillo *et al.*, 2015), además promueven la división celular, controlan la diferenciación del meristemo de la raíz e inducen la proliferación de los pelos radicales e inhiben la formación de la raíz lateral y la longitud de la raíz primaria (Vacheron *et al.*, 2013).

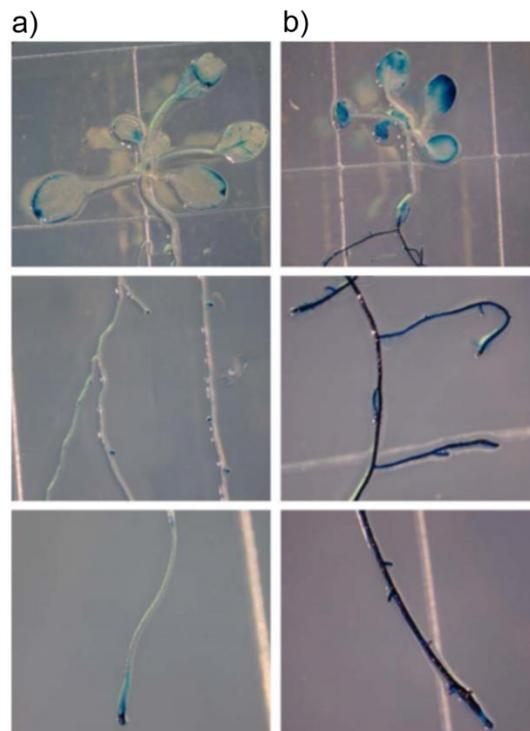


Figura 4. Efecto en la concentración de auxinas en *A. thaliana* inducido por la inoculación de *A. brasiliense*. El uso de un gen indicador en la planta (DR5:GUS) expresa la concentración de auxinas mediante una coloración azul. a) Expresión de auxinas en un tratamiento control. b) Expresión de auxinas en la planta inoculada con *A. brasiliense*. La imagen muestra el incremento de la expresión de auxinas inducido por la bacteria a lo largo de la raíz y en el follaje. Imagen tomada de Spaepen *et al.* (2013).

2.4.2. Mecanismos indirectos

2.4.2.1. Producción de sideróforos

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para los microorganismos, involucrado en procesos biológicos vitales para las células como cofactor de un gran número de reacciones enzimáticas (Molina-Romero *et al.*, 2015), además participa en la motilidad por lo que desempeña un papel importante en la formación de biopelículas (Vieira *et al.*, 2019).

Los sideróforos son péptidos de bajo peso molecular que tienen alta afinidad y capacidad de coordinar iones Fe^{+3} (Bach *et al.*, 2008). En condiciones de escasez de hierro, las bacterias producen sideróforos que quelan al hierro disponible, convirtiéndolo en un factor limitante para grupos de microorganismos patógenos, restringiendo así su colonización de la raíz y su proliferación (Molina-Romero *et al.*, 2015). Diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* han sido evaluadas y reportadas como agentes de biocontrol por la producción de sideróforos (Moreno *et al.*, 2018).

2.4.2.2. Producción de antibióticos

Muchas PGPR tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios que son perjudiciales para el crecimiento de o actividades metabólicas de otros microorganismos a bajas concentraciones (Saraf *et al.*, 2014), influyendo en la inhibición de síntesis de pared celular, la desestabilización estructural de la membrana celular y la inhibición de la formación del complejo de iniciación de la traducción (Molina-Romero *et al.*, 2015). Se han identificado una variedad de antibióticos producidos por *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., y *Stenotrophomonas* sp. que son activos contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y algunos hongos patógenos (Tsegaye *et al.*, 2017).

2.4.2.3. Producción de enzimas líticas

Varias bacterias producen enzimas tales como β -glucanasas, celulasas, dehidrogenasas, exo y endo-poligalacturonasas, fosfatasas, hidrolasas, lipasas, pectinoliasas, proteasas y

quitinasas (Moreno *et al.*, 2018) capaces de hidrolizar componentes estructurales de las paredes celulares de hongos y oomicetos (Saraf *et al.*, 2014). Entre los géneros con capacidad de biocontrol contra hongos se han identificado: *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Streptomyces* sp (Molina-Romero *et al.*, 2015).

2.4.2.4. Resistencia inducida

La interacción de algunas PGPR con su planta hospedera puede reducir enfermedades generadas por otros microorganismos activando respuestas de defensa que requieren la señalización de ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Samaniego-Gómez *et al.*, 2017) que pueden ser inducidas por bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum*, diferentes especies de *Bacillus*, *Burkholderia phytofirmans* y *Serratia marcescens* (Bhattacharyya *et al.*, 2012).

2.5. Actinobacterias

2.5.1. Generalidades

Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas o Gram-variables y que poseen un alto contenido de bases guanina más citosina (G + C) en su ADN (Brutti *et al.*, 2018). La pared celular varía (Anexo 1), está formada por derivados de ácido murámico y géneros como *Micobacterium* y *Nocardia* contienen ceras y ácidos micólicos que les dan propiedades de ácido – alcohol resistencia (AAR) (Bonifaz, 2012). En el ciclo de vida, muchas actinobacterias desarrollan filamentos ramificados que con el paso del tiempo se fragmentan en elementos cocoides, bacilares o ambos, denominado micelio y que es análogo al micelio de los hongos (Madigan *et al.*, 2009). Por esta razón, históricamente se les llegó a considerar como hongos debido a las semejanzas que comparten con este grupo y eran llamados actinomicetos (Reyes *et al.*, 2015). Sin embargo, características como el diámetro de sus hifas inferior a las de los hongos (< 1 µm) (Fig. 5); sus núcleos procarióticos, es decir, con ADN distribuido de forma libre en la célula y no organizado en el núcleo (Koneman *et al.*, 2008); la presencia de peptidoglicano en su pared celular y su

inhibición por antibióticos y resistencia a los antimicóticos, fueron incluidos en el dominio bacteria (Fig. 6) (Franco, 2008).

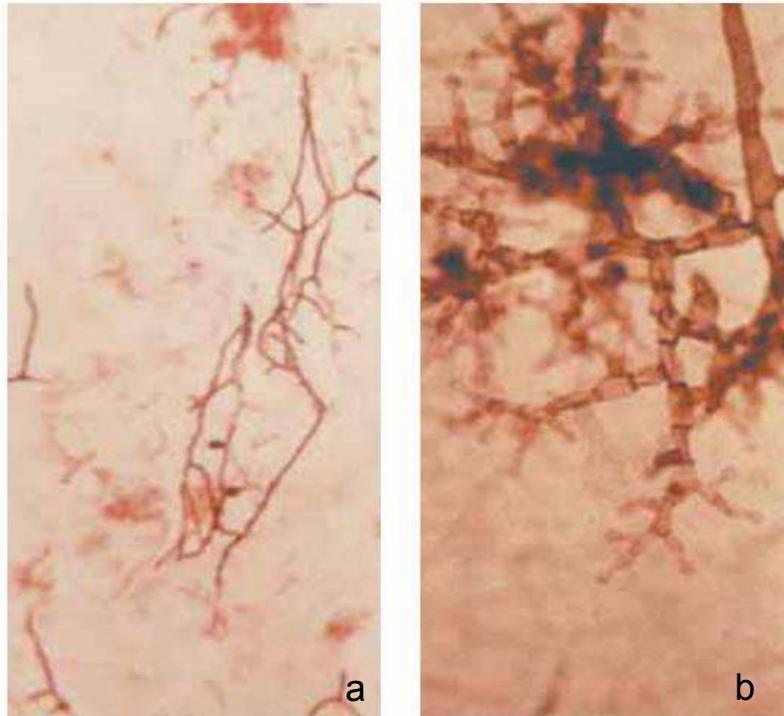


Figura 5. Comparación del diámetro de los filamentos. a) Filamentos actinomicéticos (<1 micrómetro). b) filamentos fúngicos (>1 micrómetro). Imagen tomada de Arenas, 2014.

El phylum Actinobacteria está compuesto por el orden de los Actinomycetales y las bacterias Gram positivas con una composición de la base de ADN por encima de aproximadamente 50% G + C. Está constituido por más de 215 géneros en 50 familias, 14 sub-órdenes y 6 órdenes (Fig. 7) (Prescott *et al.*, 2002).

El phylum incluye organismos fenotípicamente diversos que exhiben una amplia variedad de morfologías, desde células cocoides o coco-bacilares, hasta hifas fragmentadas o micelio permanente altamente diferenciado y ramificado (Brutti *et al.*, 2018), cuando crecen en un sustrato sólido como el suelo o agar, la ramificación crece hacia el interior, formando un “micelio de sustrato” y hacia arriba, formando un micelio aéreo (Fig. 8) donde, en respuesta a la privación de nutrientes, algunos géneros forman esporas asexuales llamadas conidios o conidiosporas, en las puntas de los filamentos (Pelaz, 2014). También

poseen diversas propiedades fisiológicas y metabólicas tales como la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica como antibióticos (particularmente el género *Streptomyces*) (Madigan *et al.*, 2009), antivirales, anticancerígenos, inmunosupresores y otros compuestos de interés industrial (Brutti *et al.*, 2018), así como la producción de enzimas extracelulares que participan en la descomposición de la materia orgánica de origen vegetal (Koneman *et al.*, 2008). El interés especial de las actinobacterias lo confiere su capacidad de adaptación en suelos extremadamente diferentes (Franco & Chavarro, 2016).

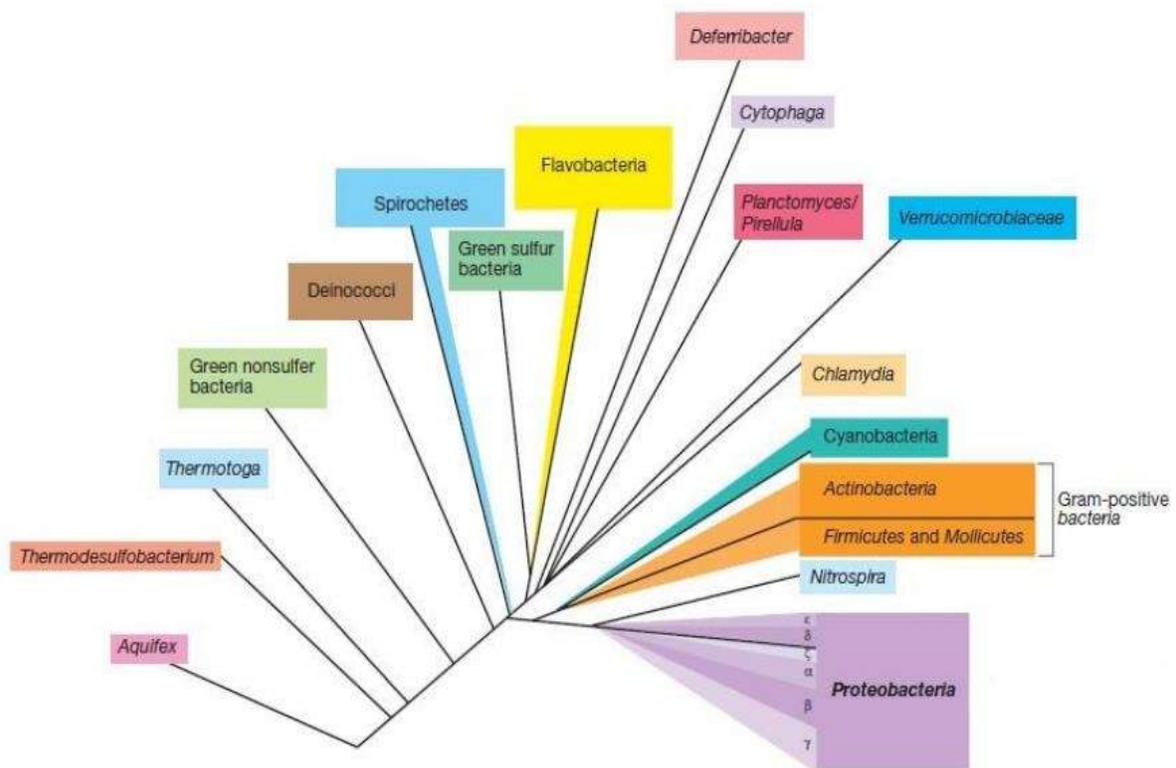


Figura 6. Dominio Bacteria. Se muestra el phylum Actinobacteria agrupado con las bacterias Gram-positivas. Imagen tomada de Madigan *et al.*, 2009.

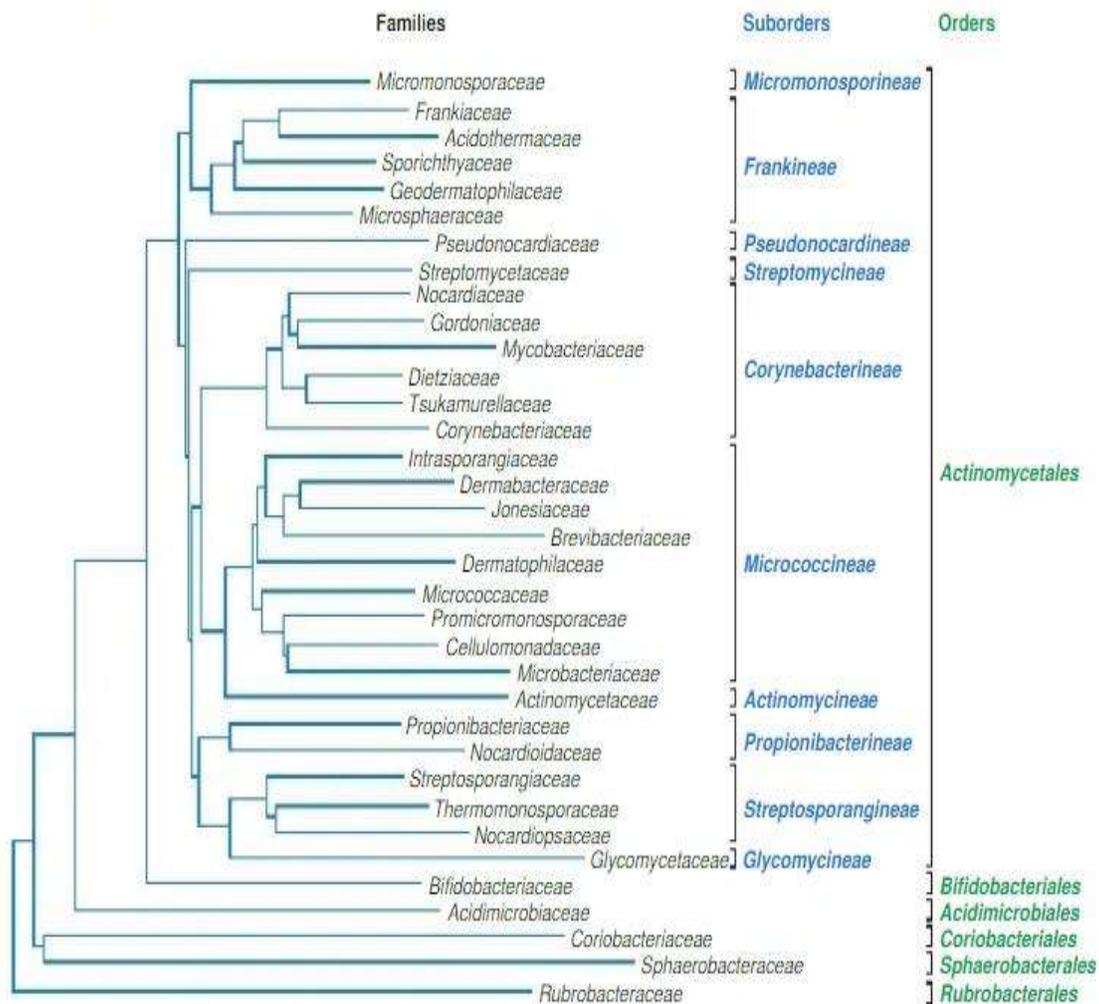


Figura 7. Árbol filogenético de las actinobacterias. Se presentan los órdenes, subórdenes y familias. Imagen tomada de Prescott et al., 2002.

Entre los principales géneros de actinobacterias, de acuerdo con su abundancia, se encuentran: *Streptomyces*, *Microeliobosporia*, *Sporichthya*, *Pseudonocardia*, *Nocardioides*, *Terrabacter* y *Frankia* (Reyes et al., 2015). En su mayoría son organismos inofensivos, con la notable excepción de las especies de *Mycobacterium* (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*) (Madigan et al., 2009) y algunos patógenos de plantas y animales, como es el caso de *Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies*, y *S. turgidiscabies* (Prescott et al., 2002). Otras viven en simbiosis, como el género *Frankia*, que forma nódulos en las raíces donde se fija el nitrógeno atmosférico que es aprovechado por la planta, en una asociación denominada actinorriza (Reyes et al., 2015).

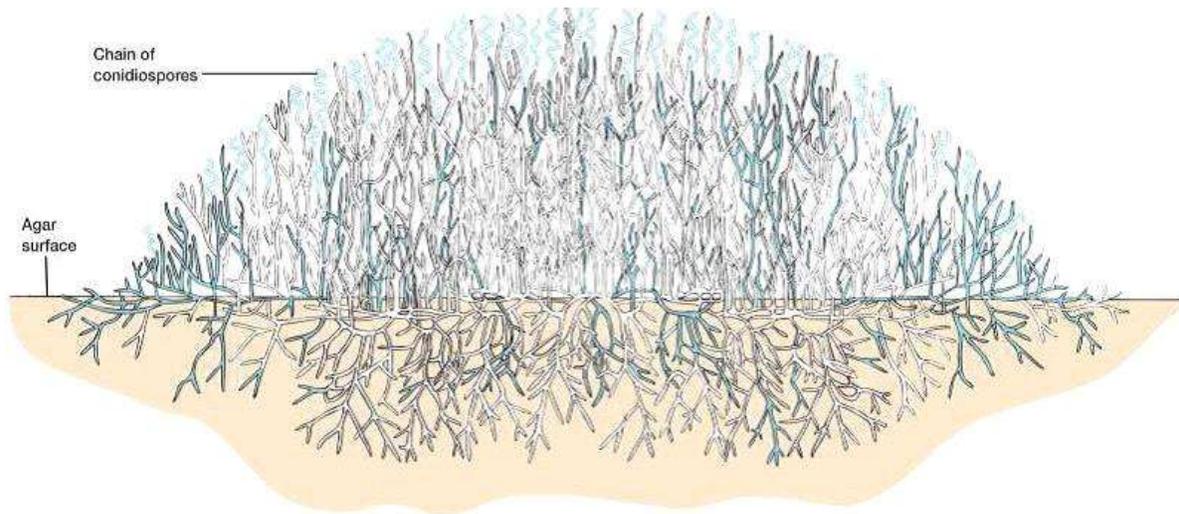


Figura 8. Corte transversal de una colonia de actinobacterias. Muestra el micelio aéreo y el micelio de sustrato (blanco – verde), así como la formación de conidiosporas (azul). Imagen tomada de Prescott et al., 2002.

2.5.2. Hábitat

Las actinobacterias se encuentran entre los colonizadores más exitosos de la biósfera, se pueden encontrar en superficies rocosas y en suelo rizosférico, ricos en humus, hojarasca, estiércol y en sedimentos marinos (Brutti *et al.*, 2018), aunque predominan sobre todo en el suelo, representando más del 40% de la comunidad en raíces y, aproximadamente, el 21% en suelos cultivados (Cardona *et al.*, 2009). Son microorganismos saprófitos y constituyen un componente sustancial para la microbiota al degradar una enorme cantidad y variedad de compuestos orgánicos siendo extremadamente importantes en la mineralización de la materia orgánica (Prescott *et al.*, 2002), por lo que pueden ser indicadores de fertilidad y de la salud del ecosistema y, por lo tanto, de la productividad (Bhattarai *et al.*, 2015).

La mayoría de actinobacterias son mesófilas y su crecimiento se registra entre 25 a 30°C, aunque también se han descrito especies termotolerantes y termofílicas de *Thermomonospora* sp., *Thermoactinomyces* sp. y *Streptomyces* sp. (Brutti *et al.*, 2018). Suelen crecer en un rango de pH de 5 a 9, con un óptimo en suelos alcalinos y neutros, sin embargo; algunas especies de *Streptomyces* pueden crecer en un pH ligeramente inferior

(Goodfellow & Willams, 1983). Se desarrollan principalmente en suelos bien aireados (a excepción de *Actinomyces*, *Arachnia* y *Rhotia*, que son anaerobios) (Arenas, 2014), encontrando el mayor número en los primeros 30 cm de profundidad (Cardona *et al.*, 2009) mientras que suelos con humedades entre el 80 y 90% resultan perjudiciales para su crecimiento (Franco, 2008).

2.5.3. Condiciones de aislamiento

La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 36°C, crecen en distintos medios bacteriológicos, que incluyen agar sangre o agar infusión de cerebro y corazón (BHI por sus siglas en inglés), o pueden ser aisladas en medios comunes para hongos (p. ej., agar dextrosa de Sabouraud sin antibióticos, puesto que son inhibidos por cloranfenicol, penicilina y estreptomycin), así como en medios designados para el aislamiento de micobacterias a base de huevo de Lowenstein Jensen o en agar sintético de Middlebrook (Koneman *et al.*, 2008). Sin embargo; para la diferenciación a partir de producción de esporas y/o pigmentos se necesita de suplementos como extracto de levadura o peptona, extracto de suelo, avena, almidón con sales inorgánicas o quitina coloidal (Franco, 2008).

Sus colonias se pueden visualizar en medio sólido a los 3 o 4 días de incubación, aunque el desarrollo del micelio aéreo maduro con esporas o metabolitos secundarios puede tardar entre 7 y 14 días y en algunas cepas hasta más de un mes de incubación (Brutti *et al.*, 2018). El crecimiento en medios líquidos requiere de agitación constante a velocidades de 200 o 250 rpm para suministrar aireación y crecen formando una película en la superficie o agrupaciones de filamentos de apariencia algodonosa dejando el medio líquido transparente (Franco, 2008).

2.5.4. Morfología

La morfología de las actinobacterias es muy diversa, en la Tabla 1 se muestran las características fenotípicas de los géneros más comunes:

Tabla 1. Morfología macroscópica y microscópica de los géneros de actinobacterias más comunes. Tomada de Bonifaz, 2012.

GÉNERO	MACROMORFOLOGÍA	MICROMORFOLOGÍA
<i>Mycobacterium</i>	Colonias húmedas, pastosas, limitadas, con surcos y color beige	Bacilos y algunas especies con filamentos rudimentarios que no ramifican
<i>Nocardia</i>	Colonias rocosas, secas, acuminadas. Algunas con pigmentos carotenoides	Filamentos; formas cocoides y bacilares; fragmentación de las hifas
<i>Dermatophilus</i>	Colonias pequeñas, húmedas, surcadas, pastosas, de color blanco-amarillentas	Filamentos irregulares, gruesos que tienden a adelgazarse, filas de esporas móviles (grupos de 8 unidades)
<i>Micromonospora</i>	Colonias húmedas, pastosas, algunas con pigmentos carotenoides (amarillo, naranja, rojo)	Sin micelio aéreo; micelio vegetativo que sostiene esporas en racimo
<i>Streptomyces</i>	Colonias rocosas, secas, acuminadas, con surcos. Color blanco-grisáceo	Filamentos microsifonados, ramificados, rectos y en espiral; formas cocoides y esporas en cadenas
<i>Actinomadura</i>	Colonias húmedas, pastosas, algunas con pigmentos carotenoides	Filamentos microsifonados; formas cocoides y bacilares, forman cadenas cortas de esporas
<i>Nocardiosis</i>	Colonias húmedas, pastosas, surcadas, color blanco-amarillentas	Filamentos microsifonados en zig-zag; formas cocoides y bacilares; cadenas cortas de esporas dentro de vainas
<i>Actinomyces</i>	Medio sólido: colonias húmedas, pastosas, limitadas. Medio líquido: Masa de micelio, similar a "cometas"	Filamentos microsifonados, no se organizan en micelio, formas cocoides. En cultivos dan también formas difteroides

<i>Corynebacterium</i>	Colonias húmedas, pastosas, limitadas; pueden tener diferentes colores, blanco, amarillo, naranja.	Formas cocoides y difteroides (en palizada, en forma de “V” o como letras chinas, o tipo “palitos de tambor”)
------------------------	--	---

2.5.5. Actinobacterias como PGPR

Las actinobacterias cumplen con características intrínsecas de un PGPR, debido a que colonizan la rizósfera gracias a su estructura filamentosa, sobreviven en suelos por largo tiempo gracias a la producción de esporas y metabolitos secundarios y estimulan el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos (Jog *et al.*, 2016).

Los actinomicetos rizosféricos influyen directamente en el crecimiento de las plantas por diferentes mecanismos:

- Al ser los descomponedores primarios de materia orgánica (Bhatti *et al.*, 2017) produciendo enzimas degradativas (celulasas, xilinasas, lignina peroxidasas o quitinasas) y que, en última instancia, los nutrientes complejos se convierten en formas minerales más simples que actúan como fertilizantes naturales (Reyes *et al.*, 2015).
- Especies de los géneros *Streptomyces* sp., *Frankia* sp., *Nocardia* sp. y *Thermobifida* sp. producen moderadamente IAA, mientras que, específicamente *Streptomyces sannanensis*, tiene capacidad de producción cercana al principal productor *Pseudomonas fluorescens*. Se planteó que IAA, además de intervenir en el crecimiento de las plantas, puede inducir la germinación de esporas y la producción de metabolitos secundarios de las actinobacterias (Jog *et al.*, 2016).
- *Frankia* sp. y algunas cepas de *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae* son fijadores de nitrógeno (Franco & Chavarro, 2016). Especialmente *Frankia* sp. tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por medio del desarrollo de nódulos en las raíces (Prescott *et al.*, 2002) tan eficiente que un árbol puede crecer sin fertilización nitrogenada (Quiñones *et al.*, 2016).

- Se ha reportado una alta producción de sideróforos por *Streptomyces* sp., *Pseudonocardia* sp. y *Arthrobacter* sp. (Jog *et al.*, 2016), principalmente del género *Thermobifida* sp. (Franco, *et al.*, 2010) en el cual se observó mayor rendimiento si se usa glucosa como única fuente de carbono (Franco & Chavarro, 2016).
- Las actinobacterias producen ácidos orgánicos como piruvato, lactato, α -cetoglutarato, succinato, malato y oxalato en concentraciones variables que participan en la solubilización del fosfato, así como géneros *Thermobifida* sp., *Thermonospora* sp. y *Streptomyces* sp. tienen la capacidad de secretar fosfatasas ácidas para la mineralización de fósforo orgánico (Franco & Chavarro, 2016).

Cuando las actinobacterias colonizan la rizósfera, compiten por espacio y nutrientes con otros microorganismos (muchos de ellos fitopatógenos) por medio de distintos mecanismos actuando como biocontroladores, lo cual repercute de manera benéfica en el crecimiento de las plantas (Reyes *et al.*, 2015).

- La principal actividad de las actinobacterias como agentes de biocontrol es la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos. Especialmente miembros del género *Streptomyces* juegan un papel importante produciendo un 75% del total (Kamal *et al.*, 2014) que tienen actividad antagónica al inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esporas de hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Plasmodiophora*, *Gibberella*, *Mucor*, *Fusicoccum*, *Ustilaginoidea*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pectobacterium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Ralstonia*, *Clavibacter* o *Sclerotinia* (Quiñones *et al.*, 2016).
- Se han reportado casos de cepas del género *Streptomyces* y *Thermobifida* que estimulan la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de hongos arbusculares micorrízicos (Franco *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2016).

2.6. Modelos vegetales

Desde tiempos pasados, se han adaptado métodos de crecimiento *in vitro* para diversos organismos que se usan como modelo en diferentes campos de la biología con el fin de conocer a detalle los mecanismos de funcionamiento y respuestas adaptativas (López & Ruiz, 2016). Entre ellos *Medicago truncátula*, una leguminosa empleada en el análisis de

simbiosis de fijación de nitrógeno (Barker *et al.*, 1990); *Lotus japonicus*, leguminosa con particular susceptibilidad de transformar fácilmente su ADN mediado por *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*, dando lugar a un gran número de líneas transgénicas (Jiang *et al.*, 1996); *Brachypodium distachyon*, un organismo modelo con los atributos físicos y genómicos necesarios para la investigación de las interacciones planta-patógeno en poblaciones de plantas silvestres (Shin-Young *et al.*, 2008); *Nicotiana benthamiana*, una de las especies más comunes en la investigación molecular, particularmente en estudios de interacción planta-patógeno debido a la gran cantidad de virus vegetales que pueden infectarlo con éxito (Goralski *et al.*, 2016) y *Arabidopsis thaliana*, el modelo vegetal más utilizado que se describe a continuación:

2.6.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta que pertenece a la familia Brassicaceae, descrita por primera vez por el médico Johannes Thal en las montañas Harz del norte de Alemania en 1577. Su tamaño pequeño de alrededor de 30 cm, su ciclo de vida corto (6-8 semanas) (Fig. 9), una alta fecundidad y la posibilidad de crecerla *in vitro* le dan ventaja sobre otros organismos modelos vegetales usados en la investigación (Ortiz, 2013), además de que en el 2000 se publicó como el primer genoma totalmente secuenciado de una planta con flores (Krämer, 2015), lo cual permite a los investigadores predecir la identidad y la estructura de los factores de transcripción o componentes de señalización de procesos específicos generando mutantes que son empleados en el estudio de temas particulares de interés (Dinneny *et al.*, 2010).

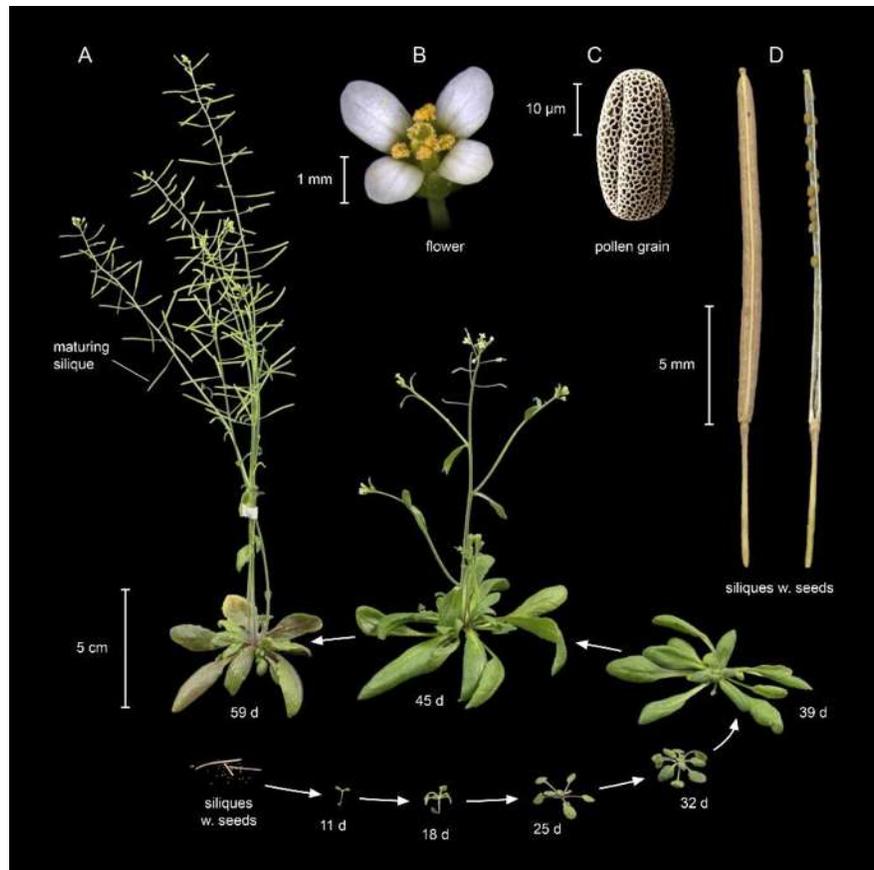


Figura 9. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. A) Diferentes etapas del ciclo de vida, desde la germinación hasta la senescencia (59 días). B) Flor. C) Grano de polen. D) Sílicua con semillas, abierta y cerrada. Imagen tomada de Krämer, 2015.

La raíz de *Arabidopsis* es uno de los sistemas de desarrollo más simples conocidos, lo que la hace ideal para su estudio, en particular, su meristemo apical es accesible, no contiene pigmentos, los tejidos diferenciados son relativamente pocos, su morfogénesis ocurre de manera continua y las filas de células especializadas son fáciles de observar al microscopio (López & Ruiz, 2018), ya que contiene una sola capa de cada tipo de célula especializada dispuestas en cilindros que rodean el eje radial (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2009).

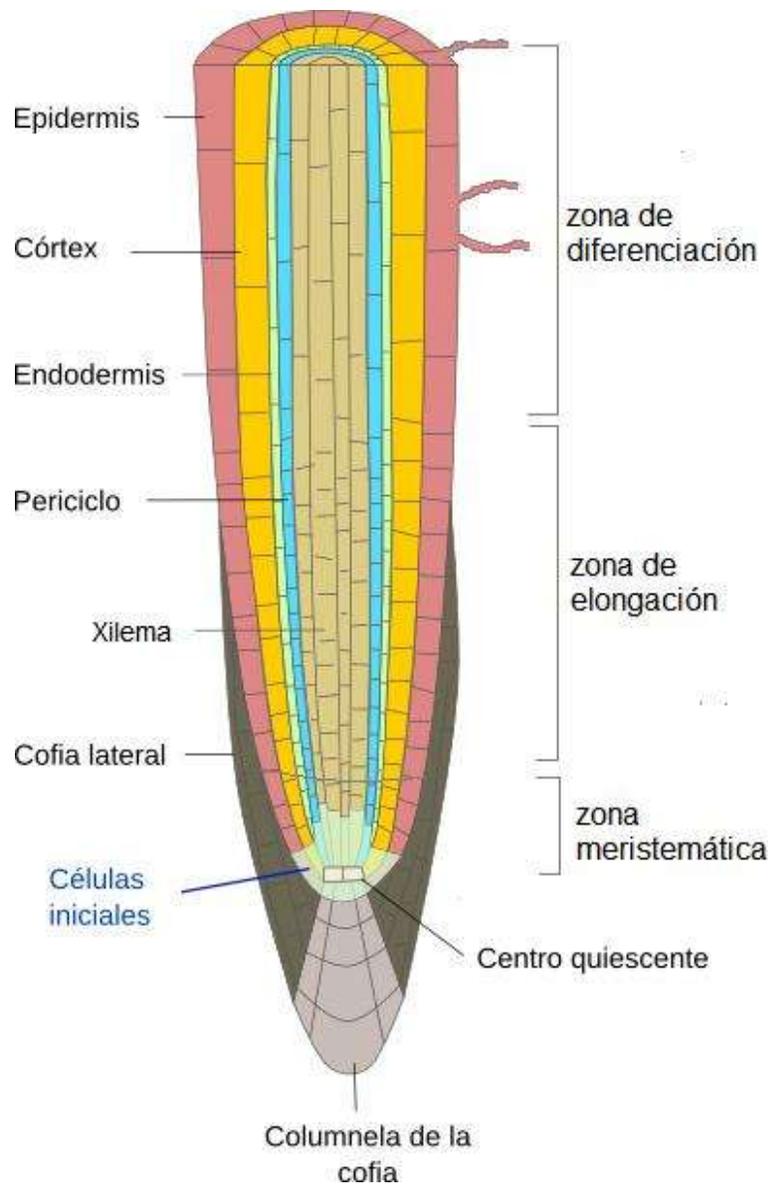


Figura 10. Anatomía de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se presentan las zonas de desarrollo a lo largo de la raíz: zona meristemática, zona de elongación y zona de diferenciación, así como las células especializadas dispuestas en una sola capa por tipo de célula alrededor del xilema. Imagen tomada y modificada de Megías *et al.*, 2018.

En la punta de la raíz de *A. thaliana*, se encuentran las células madre, también llamadas células iniciales, que rodean a las células organizadoras ubicadas en el centro (o centro quiescente) que tiene escasa actividad mitótica. Las células madre producen

continuamente células hijas por divisiones asimétricas, al sitio donde ocurre la división celular se le conoce como meristemo. Se distinguen dos tipos de células madre: las distales que producen la tapa de la raíz de la columela donde las células no se dividen nuevamente, sino que se diferencian en células que contienen almidón que se desprenden del órgano después de la formación de una nueva capa, por lo que el centro quiescente permanece a la misma distancia de la punta; y las proximales que forman una población celular amplificadora de tránsito en la que tienen lugar rondas adicionales de división celular y producen las células vasculares, endodérmicas, corticales, epidérmicas y laterales de la raíz (Scheres, 2007). Durante la diferenciación, estas células se expanden fuertemente a lo largo del eje principal llevando el nicho de las células madre hacia adelante junto con la punta de la raíz (Dinneny *et al.*, 2010). Las nuevas células producidas por las iniciales progresan a través de tres fases de desarrollo distintas en su camino hacia la madurez. En la zona meristemática, se dividen varias veces para generar un grupo de células que se alargarán y diferenciarán. En la zona de alargamiento, las células pierden su capacidad de dividirse y aumentan en longitud muchas veces su ancho y finalmente, en la zona de diferenciación, las células adquieren sus características y funciones especializadas (Fig. 10) (Petricka *et al.*, 2012).

La raíz primaria usualmente se ramifica para formar raíces laterales, las cuales facilitan el anclaje y aumentan la capacidad exploratoria para la absorción de agua y nutrientes de la planta. Se forman en la zona de diferenciación, a partir de las células del periciclo adyacentes a los dos polos del xilema (Casimiro *et al.*, 2003) mediante un proceso dependiente de la concentración y transporte de auxinas. Cuando los niveles de auxinas son bajos, una proteína represora mantiene a las células pericíclicas detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Petricka *et al.*, 2012), cuando hay un incremento de IAA, ocurre una degradación de la proteína represora activando la respuesta transcripcional de genes de respuesta a auxinas en la fase G1-S del ciclo celular, que se predice que conducirán al inicio de formación de raíces laterales (Casimiro *et al.*, 2003). Las células adquieren una organización de meristemo de raíz que finalmente se activa y da inicio a las divisiones celulares que producirán su elongación (Magaña-Dueñas *et al.*, 2015).

Los pelos radiculares tienen su inicio en células epidérmicas especializadas llamadas tricoblastos, expresan transportadores de agua y nutrientes de alta afinidad e incrementan la superficie de absorción de la raíz primaria y de las raíces laterales (Ortiz, 2013).

Los cambios estructurales de la raíz están mediados por la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo, hierro y azufre (Fig. 11) o señales ambientales que modifican la división celular y procesos de diferenciación celular en la raíz y por la síntesis, el transporte o la sensibilidad a factores de crecimiento de las plantas como auxinas, citocininas o etileno (López-Bucio *et al.*, 2003).

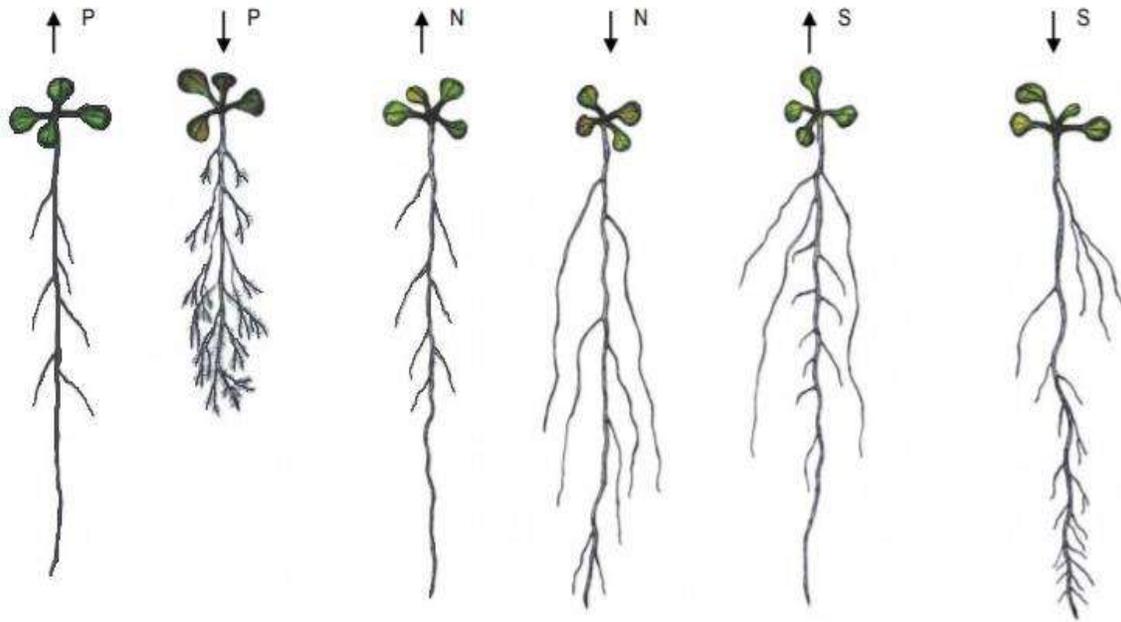


Figura 11. Arquitectura de *Arabidopsis thaliana* dependiente de la biodisponibilidad de nutrientes. En la figura se muestran los diferentes patrones que adquieren las raíces laterales sobre la raíz principal en función de alta o baja concentración de fósforo, nitrógeno y azufre. Un aumento de fosfato aumenta la elongación de la raíz primaria y disminuye el número de raíces laterales, así como su alargamiento; el aumento de nitrógeno reduce tanto el alargamiento de la raíz primaria como el de las raíces laterales; un aumento de sulfato genera raíces primarias alargadas y las raíces laterales se desarrollan a cierta distancia de la punta de la raíz, mientras que en una reducción, las raíces laterales se forman más cerca de la punta de la raíz y con una mayor densidad. Imagen tomada de López-Bucio *et al.*, 2003.

3. JUSTIFICACIÓN

En los bosques, la rizósfera es un importante ecosistema dinámico en el que, de manera natural, la microbiota interviene en procesos de asimilación de nutrientes; como la fijación del nitrógeno y hierro, la solubilización de fosfatos, degradación de compuestos carbonados, incremento de materia orgánica, lo que confiere estabilidad y fertilidad al suelo. Esto contribuye al establecimiento, crecimiento y desarrollo de las plantas. Así pues, la diversidad microbiana del suelo es el principal factor para la fertilidad del mismo.

Dentro de las bacterias autóctonas de rizósfera que contribuyen a la fertilidad y crecimiento vegetal, se encuentra en mayor abundancia al grupo de las actinobacterias, el cual se ha visto considerablemente afectado por el cambio de uso de suelo destinado para actividades agrícolas e incluso eliminada por el empleo excesivo de fertilizantes, agroquímicos, herbicidas, plaguicidas y otros aditivos.

Uruapan es uno de los municipios de Michoacán que cuenta con la mayor superficie de cultivos de *P. americana*, mientras esta extensión sigue en aumento, la extensión de bosque va en decremento al ser sustituido por este monocultivo, modificando también el micro ecosistema de la rizósfera, por lo que la recuperación, clasificación e identificación de actinobacterias autóctonas de esta región permitirá llevar a cabo un estudio del papel que desempeñan en la fertilidad del suelo como promotoras del crecimiento vegetal y su importancia en aplicaciones agrícolas biotecnológicas.

4. HIPÓTESIS

En la rizósfera de cultivos orgánicos de *P. americana* aún se encuentran actinobacterias autóctonas que bio-estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de un mecanismo dependiente de auxinas.

5. OBJETIVOS

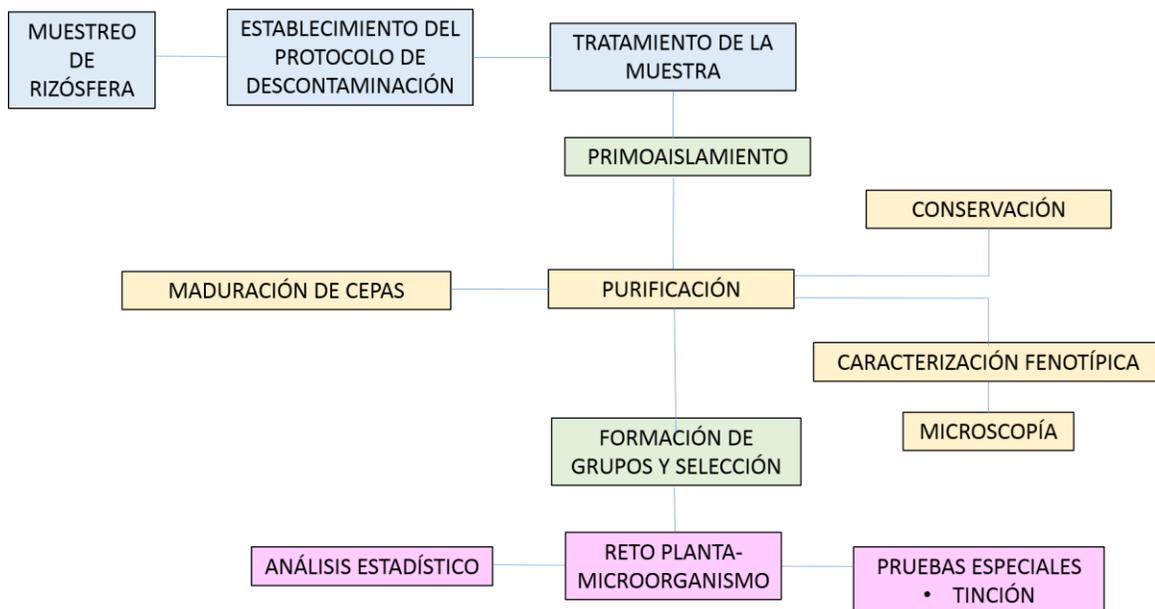
5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad como Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal de un grupo de actinobacterias aisladas de la rizósfera de huertos orgánicos de *P. americana* del municipio de Uruapan, Michoacán.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un protocolo de descontaminación de las muestras de suelo para garantizar la recuperación de microorganismos de interés.
2. Aislar y caracterizar fenotípicamente un grupo de actinobacterias provenientes de la rizósfera de *P. americana*.
3. Determinar que el grupo de actinobacterias aisladas promueve el crecimiento vegetal.
4. Establecer el papel de las auxinas en la fitoestimulación por actinobacterias.

6. METODOLOGÍA



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Muestreo

El municipio de Uruapan, Michoacán, cuenta con 5,906 UP de cultivo de aguacate solo para el programa de exportación hasta diciembre del 2018, de las cuales sólo 138 UP se encuentran dentro del registro de producción orgánica, según datos del programa de exportación de aguacate Hass de México a los Estados Unidos de América y la Junta Local de Sanidad Vegetal de Uruapan (JLSV, 2019). Se eligió el cultivo orgánico debido a que la sustitución de los agentes químicos, sugiere un impacto menor en la desaparición de microorganismos originales del suelo.

Se seleccionaron 30 huertos orgánicos de *P. americana* de la zona de Uruapan, representativos de las 138 UP y que cubrieran los distintos tipos de suelo de la región, eligiendo dos árboles al azar visiblemente productivos de cada UP para un total de 60 unidades experimentales (Fig. 12).

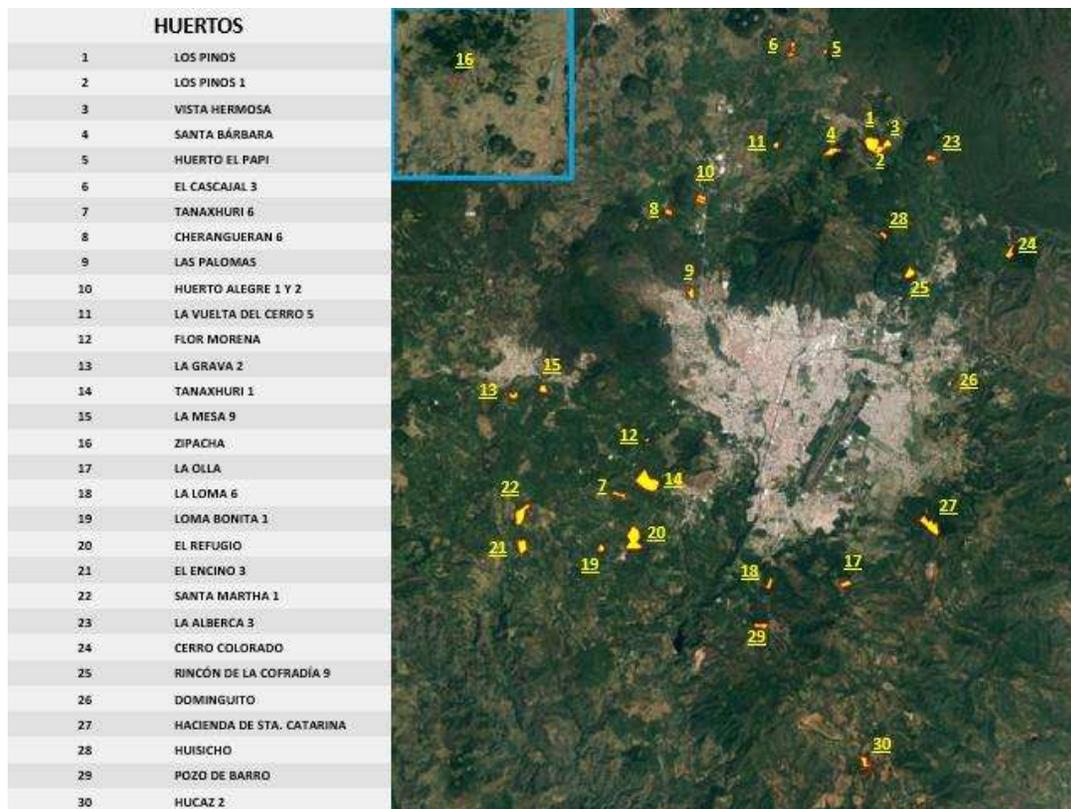


Figura 12. Mapa satelital de los huertos muestreados. Los números corresponden a la ubicación de los 30 huertos orgánicos de *P. americana* de la zona de Uruapan, Michoacán elegidos para el muestreo. Imagen proporcionada por el Ing. Andrés Ciprés Torres, JLSV Uruapan, 2019.

El muestreo se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se recolectaron dos muestras de cada huerto, teniendo un total de 60 muestras.
2. Se tomaron aproximadamente 400 g de suelo de la zona de las raíces secundarias del árbol, a unos 30 cm de profundidad, con base a lo reportado por Cardona *et al.* (2009) que en esta área es posible aislar un gran número de actinobacterias.
3. Las muestras se recolectaron en bolsas plásticas Ziploc® y se colocaron en un lugar fresco y protegido del sol para su transporte al laboratorio.
4. Las bolsas se rotularon registrando el número de huerto y de la muestra por huerto (1 y 2), así como la hora de recolección.
5. Una vez en el laboratorio, se conservaron en refrigeración hasta ser procesadas.

7.2. Determinación de pH

La determinación del pH de suelo se llevó a cabo de acuerdo a Kloster en (2008) y al Sistema de Apoyo Metodológico para Laboratorios de Suelos y Aguas (SAMLA) como se indica:

1. Se utilizó agua desionizada con un pH de 6.6 como extractor.
2. El potenciómetro utilizado fue un equipo de la marca HANNA instruments pH 210 Microprocessor pH Meter®.
3. El electrodo se calibró con soluciones buffer estandarizadas de pH 4 y 7 de la misma casa comercial de la marca HANNA®.
4. Se pesaron 20 g de la muestra y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
5. A continuación, se agregaron 30 mL de agua destilada y se agitó durante 30 segundos.
6. Se dejó reposar durante 1 hora.
7. Finalmente se determinó el pH del suelo introduciendo el electrodo en la solución.

7.3. Tratamiento de descontaminación de la muestra

Se realizó una estandarización del método empleado por Masayuki Hayakawa (1989), que utiliza el extracto de levadura (YE) y el choque térmico a 40°C para activar la germinación de esporas de algunas variedades de actinobacterias y el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) como germicida bacteriano con el fin de lograr mayor reducción de la biota indeseada.

Ensayo 1.

1. Se colocó en un tubo lo equivalente a 2 mL de suelo y se agregó agua destilada hasta completar 10 mL para tener una dilución 10^{-1} .
2. Se realizó una segunda dilución 10^{-2} , tomando 100 μ L de la dilución 10^{-1} y se adicionaron 900 μ L de una solución de YE al 3% (m/v) y SDS al 1% (m/v).
3. Se mezcló e incubó a baño maría durante 20 minutos a 40°C con 150 rpm.

Ensayo 2.

A diferencia del ensayo 1, se realizó una tercera dilución 10^{-3} , tomando 100 μL de la solución 10^{-2} y adicionando 900 μL de una solución de YE al 3% y SDS al 1% y se incubó a las mismas condiciones.

Ensayo 3.

Se realizó con base al ensayo 1, con sólo dos diluciones, pero aumentando la concentración del SDS de la solución al 2% (m/v) y se aumentó la temperatura de incubación a 43°C.

Ensayo 4.

Se realizaron dos diluciones con la solución de YE y SDS a una concentración del 3% (m/v) de cada componente, se incubaron a baño maría a 43°C - 44°C por 25 min a 150 rpm.

7.4. Primo-aislamiento

1. Se tomaron 30 μL de la dilución 10^{-2} del ensayo 4 y se colocaron sobre placas de agar BHI.
2. Se realizó una siembra masiva con asas de vidrio en "L".
3. Las placas se incubaron a 37°C y se estuvieron revisando cada 24 h hasta completar 72 h para observar el crecimiento.
4. Se dejaron a temperatura ambiente en un lugar oscuro, revisando diariamente el crecimiento hasta la visualización de colonias de interés.

7.5. Purificación

Los actinomicetos son bacterias gram positivas, filamentosas y ramificadas; producen comúnmente un micelio microsifonado (menor a 1 μm) similar a un hongo que se fragmenta o divide en formas de bacilos o cocoides cortos; la mayoría de los actinomicetos son formadores de esporas (Koneman *et al.*, 2008).

Macroscópicamente, las colonias se caracterizan por un crecimiento filamentososo a circular, algunas de tipo bacteriforme y otras rocosas o acuminadas, pueden crecer de forma radiada o similar a una estrella a causa de sus filamentos ramificados. Son de superficie y consistencia compacta, diámetro entre 0.5-5 mm, y algunas producen exopigmentos difusibles al medio (Cardona, 2009; Bonifaz, 2012).

1.- Se seleccionaron las cepas con morfotipos propios de las actinobacterias con base a lo descrito en el primer documento de clasificación de actinobacterias en 1983 (Goodfellow *et al.*, 1983) (Anexo 2) y se sembraron en placas de medio de cultivo BHI con el fin de purificarlas.

2.- Se les realizó tinción de Gram para confirmar que sus características microscópicas corresponden a las actinobacterias.

7.6. Conservación

Las cepas puras se conservaron en congelación para mantenerlas viables y para su uso posterior, en un medio glicerinado con una base de caldo BHI. El glicerol evita la completa congelación y cristalización de las moléculas de agua que contiene el medio y de esta forma se mantienen intactas las células bacterianas (Villalón, 2013). El procedimiento se realizó de acuerdo a la siguiente metodología:

1.- Se realizó una siembra masiva sobre placas de agar BHI.

2.- Una vez obtenido el crecimiento se hizo un raspado sobre el agar con asas de aro estériles, tomando asadas para coleccionar una cantidad suficiente de biomasa.

3.- El inóculo se suspendió en microviales Eppendorf® de 1500 µL con caldo BHI glicerinado al 20%.

4.- Se llevaron a congelación a una temperatura de -70°C en un congelador Revco®.

Para reactivar las cepas conservadas con este método, se deja el microvial a temperatura ambiente hasta descongelación completa antes de realizar la recuperación de los microorganismos. Sánchez y Corrales en 2005, evidenciaron que los microorganismos

recuperan su actividad enzimática en forma adecuada cuando son reactivados en medio líquido BHI incubado a 37°C por 24-48 h antes de realizar la siembra en el medio selectivo para el microorganismo en cuestión.

7.7. Maduración de colonias

La síntesis de metabolitos secundarios de las actinobacterias se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación morfológica; ocurre al final de la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria debido a que el aumento en la población, y a su vez, la disminución de alimento, somete a las bacterias a un estado de estrés (Evangelista *et al.*, 2017). Los compuestos excretados pueden ser de varios colores y se observan como pequeñas secreciones en forma de gotitas sobre la colonia microbiana que muchas veces se difunden en el agar y generan pigmentación del medio (Quiñones *et al.*, 2016).

- 1.- Se obtuvieron un total de 1583 cepas puras que fueron transferidas a tubos de ensayo con medio de cultivo Extracto de Malta (EM) en plano inclinado.
- 2.- Se guardaron en la oscuridad y se dejaron madurar por 20 días para observar la producción de pigmentos difusibles en el agar como otro aspecto de expresión fenotípica de diferenciación.

7.8. Agrupación y selección

Las cepas aisladas y puras se agruparon por UP; dentro de este grupo, se analizaron algunos aspectos fenotípicos, como: la morfología colonial de cada aislado, la presencia de micelio aéreo y/o vegetativo, la producción de metabolitos secundarios visibles y pigmentos difusibles en agar, lo que permitió la formación de subgrupos que comparten las mismas características. Aunque existían similitudes entre cepas de diferente huerto, se respetó la agrupación por su lugar de procedencia. Esto redujo el número de aislados obteniendo finalmente un total de 541 cepas.

Por diseño experimental, se seleccionaron únicamente 20 cepas provenientes de 11 huertos para el estudio (Fig. 13), considerando aspectos como el tipo de suelo, diferencias

en cuanto a pigmentación y morfología, que asegurara la facilidad de manipulación de las colonias.

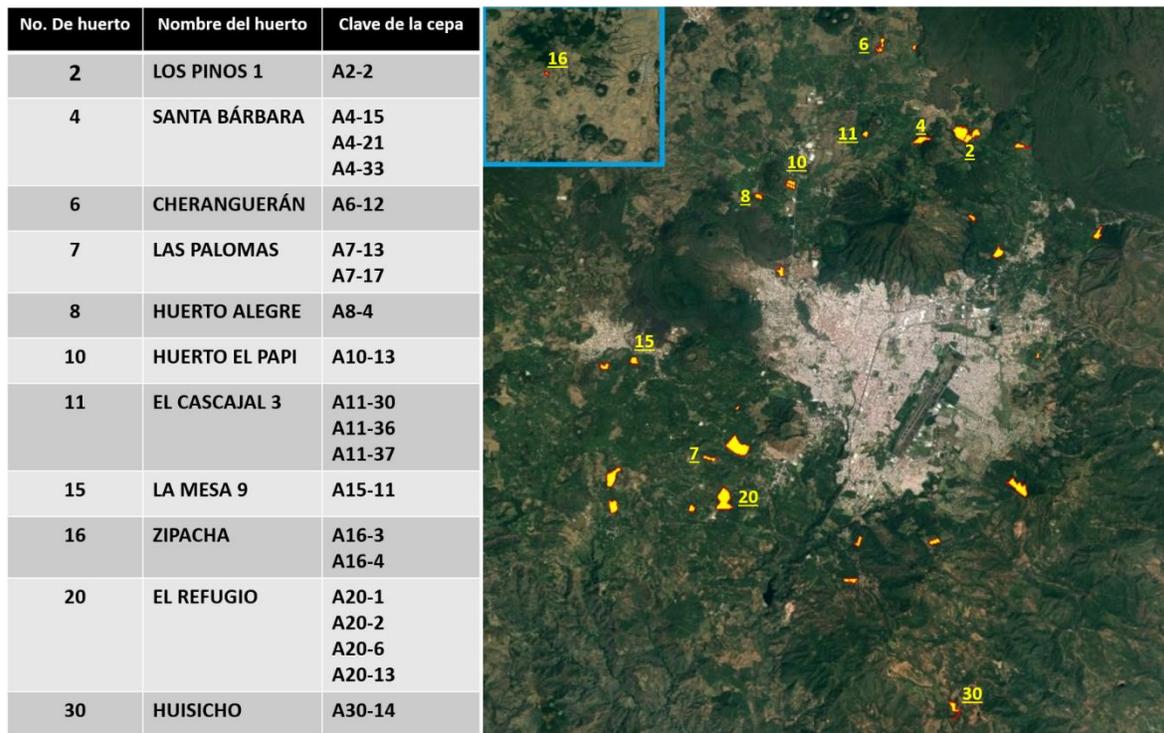


Figura 13. Mapa satelital de ubicación de los huertos seleccionados. Señala la ubicación de los 11 huertos y la clave de cada una de las cepas que fueron aisladas y utilizadas en el estudio. Imagen proporcionada por el Ing. Andrés Ciprés Torres, JLSV Uruapan, 2019.

7.9. Interacción planta-microorganismo

7.9.1. Tratamiento de las semillas

Para el estudio, se usaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0), las líneas transgénicas de respuesta a auxinas *DR5:uidA*. El gen *uidA* proviene de la bacteria *Escherichia coli* y codifica para la enzima beta glucoronidasa (GUS), *DR5:uidA* contiene un promotor sintético con 7 repetidos de elementos de respuesta a auxinas y se utilizó para investigar si la promoción del crecimiento vegetal está relacionado a esta fitohormona (Bayer, 2016). Para la desinfección se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se agregaron aproximadamente 300 semillas a un microvial microviales Eppendorf® de 1500 μ L.
2. Se adicionaron 500 μ L de etanol al 96% (v/v) y se sometió a 1300 rpm a 23°C durante 5 min.
3. Se retiró el etanol y a continuación se agregaron 700 μ L de cloro al 20% (v/v) y se llevó a 1300 rpm a 23°C por un periodo de 7 min.
4. Se realizaron 5 lavados, para ello, se retiró el cloro, se agregó 1 mL de agua desionizada estéril y se llevó a 1300 rpm a 23°C durante un minuto.
5. Una vez realizados los lavados, se agregaron 500 μ L de agua desionizada estéril y se llevaron a 4°C por un 48 h con el fin de lograr un mismo patrón de crecimiento y germinación.
6. Las semillas fueron sembradas en placas de Petri con medio sólido Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 0.6% y Phytagar al 1% y el pH ajustado a 7, realizando dos líneas paralelas, una en la parte superior, a un centímetro aproximadamente del borde de la caja, y otra línea en la parte media de la placa. Se colocaron entre 25 y 30 semillas por caja colocando cada una sobre el medio en una distancia aproximada de 0.5 cm entre ellas (Fig. 14).
7. La incubación se llevó acabo en una cámara de crecimiento Percival Scientific AR-95L ® a una temperatura de 22°C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad para su germinación durante 4 días.

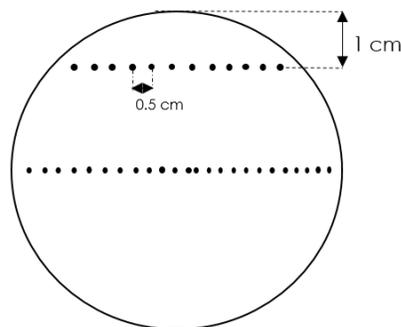


Figura 14. Distribución de las semillas de *A. thaliana* sobre medio MS.

7.9.2. Co-inoculación de plantas y bacterias

1. Las plántulas de *A. thaliana* fueron transferidas después de 4 días de la germinación sobre un inóculo de cada una de las cepas problema dispuesto en una línea recta sobre Gelosa MS (Fig. 15), colocando 6 plantas por placa y por triplicado.
2. Se marcó la punta de la raíz primaria en la base de la caja para medir su crecimiento después de la interacción.
3. Se llevaron a una cámara de crecimiento a 22°C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad por un periodo de 6 – 7 días.

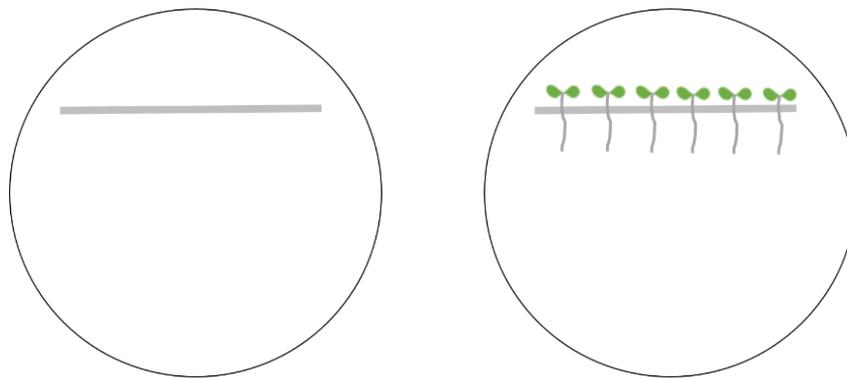


Figura 15. Disposición de inóculo bacteriano y plántulas de *A. thaliana* para la interacción. La línea gris representa el inóculo de bacteria. Las plantas se colocan a unos milímetros por encima del inóculo, procurando que la raíz tenga contacto completo al cruzar sobre él.

7.10. Análisis

Para el análisis del crecimiento y desarrollo de la raíz de las plántulas en interacción con las bacterias, se realizaron las siguientes cuantificaciones:

1. La longitud de la raíz primaria total fue medida con una regla en cm y posteriormente se evaluó el crecimiento de la raíz a partir de la marca hecha en el momento de la transferencia con la bacteria.

2. Se cuantificó el número de raíces laterales a lo largo de toda la raíz primaria con un microscopio estereoscópico Leica MZ6 ® a un aumento de 30x.
3. Se determinó la densidad de las raíces laterales dividiendo el número de estas entre la longitud de la raíz primaria total.
4. Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico jmp® de SAS Statistical Discovery.™ con el método de Dunnett y el método de Tukey para hacer las comparaciones correspondientes.

7.11 Tinción

La fitohormona auxina actúa como una señal en el gen reportero de *Arabidopsis DR5:uid*, que responde a con la producción de la enzima β -glucuronidasa (GUS). Cuando el tejido vegetal se incubaba con el sustrato cromogénico X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β - Ácido D-glucurónico) los tejidos que producen GUS se volverán azules (Kracher, 2002).

La metodología para observar la expresión del gen reportero fue la siguiente:

1. Las plántulas fueron colocadas en una placa de microtítulo con 300 μ L de una solución de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β - Ácido D-glucurónico) al 1% y se incubaron a 37°C.
2. El X-Gluc fue retirado y se añadió 1 mL de solución aclaradora de HCl 0.24 N y metanol 20% v/v por 60 min a 62 °C.
3. Se colocó una segunda solución de NaOH 7% con etanol 60% v/v por 30 min a temperatura ambiente.
4. Se hicieron lavados con etanol al 40, 20 y 10% (v/v) manteniendo por 30 min en cada uno.
5. Se reemplazó la solución por una solución de glicerol al 50% (v/v).
6. Finalmente, las plántulas fueron colocadas en un portaobjetos y selladas con esmalte transparente comercial para ser analizadas en un microscopio Nomarski ®.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Descontaminación de la muestra

El protocolo de descontaminación se estableció con base al nivel de contaminación (microorganismos que carecen de interés, en este caso) que presentó una de las muestras problema tomada como referencia, considerando que las muestras recolectadas de la misma naturaleza, pueden albergar semejantes especies microbianas (Steinauer, 2016). Para este análisis, se realizaron un total de cuatro ensayos que difieren entre sí, tanto en concentración de SDS y YE, como en las condiciones de temperatura y tiempo de incubación (Tabla 2). El ensayo número 1 (Fig. 16a) mostró crecimiento prácticamente en toda la superficie del medio de cultivo y no se evidenció el crecimiento de colonias presuntivas de actinobacterias; en el ensayo número 2 (Fig. 16b), el número de colonias se redujo respecto al primer ensayo, e incluso, se observó crecimiento de algunas colonias morfológicamente semejantes a las actinobacterias, sin embargo; el nivel de contaminación impedía su purificación. El ensayo número 3 (Fig. 16c) permitió el crecimiento de un considerable número de microorganismos de interés, aunque aún se manifestó gran cantidad de colonias contaminantes que, en la mayoría de los casos, crecieron muy cercanas a las colonias a aislar, lo que representaba alto riesgo de contaminación. El ensayo número 4 fue considerado el más idóneo para emplear en la purificación de colonias sospechosas, puesto que mostró una gran reducción de biota indeseable y nos permitió obtener un número cuantificable de colonias, de entre 50 a 250 UFC, dentro de las cuales se evidenciaban con mayor facilidad las que presentaban morfología típica de actinobacterias (Fig. 16d).

Tabla 2. Concentración de reactivos y condiciones de incubación para el establecimiento del protocolo de descontaminación de muestras.

Ensayo	Diluciones	Concentración de YE % (m/v)	Concentración de SDS % (m/v)	Temperatura °C	Tiempo de incubación (min)	Rpm
1	10 ⁻¹ , 10 ⁻²	3	1	40	20	150
2	10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³	3	1	40	20	150
3	10 ⁻¹ , 10 ⁻²	3	2	43	20	150
4	10 ⁻¹ , 10 ⁻²	3	3	43 – 44	25	150

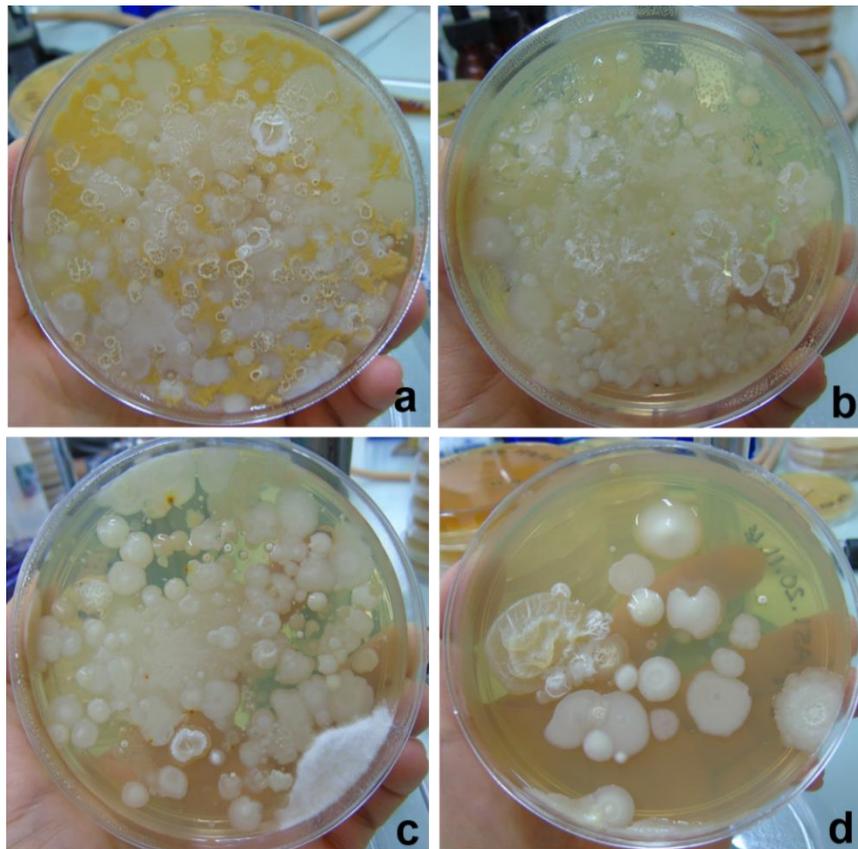


Figura 16. Descontaminación de la muestra. a) ensayo 1 con alto nivel de contaminación; b) ensayo 2 con reducción de contaminación. c) ensayo 3 con distinción colonial; d) ensayo 4 establecido para la descontaminación.

8.2. Aislamiento de actinobacterias

Las muestras tratadas se sembraron en medio de cultivo BHI e incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 h. Cuando hubo crecimiento, se evaluaron las características coloniales y microscópicas con tinción de Gram y se purificaron las posibles actinobacterias utilizando el mismo medio de cultivo. Se clasificaron por número de huerto y se agruparon por semejanzas fenotípicas. El número de aislados de cada UP (Fig. 17) presentó una gran diferencia entre sí, que puede deberse a diversos factores del suelo como sus características físico-químicas o la diversidad microbiológica. Para el estudio, se seleccionaron únicamente 20 cepas pertenecientes a 11 UP.

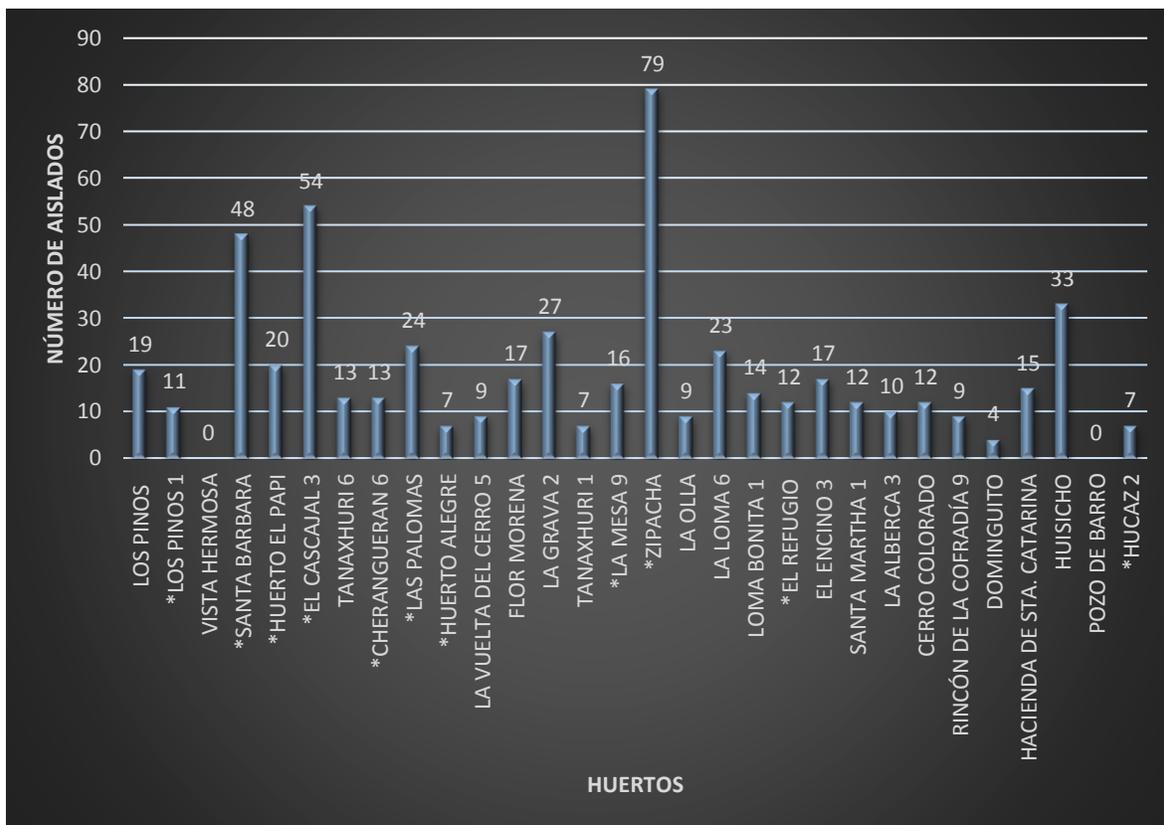


Figura 17. Número de aislados en cada UP. Muestra la amplia diferencia del número de aislados entre cada UP, del huerto Zipacha se obtuvo el mayor número con 79, mientras que de Vista Hermosa y Pozo de Barro no se aisló ninguna cepa. El “*” señala a los 11 huertos a los que pertenecen las cepas que se utilizaron en el estudio.

8.3. Determinación de pH

En la Tabla 3 se reporta el pH determinado de cada una de las muestras tomadas por huerto, resaltando en color rojo los huertos a los que pertenecen las cepas aisladas que se utilizaron para el ensayo y fueron organizados en una gráfica de dispersión (Fig. 18), con un rango de pH establecido desde 1983 por Goodfellow y Willams, quienes informaron que las actinobacterias tienen un óptimo crecimiento en suelos con tendencia alcalina, pero que existen algunas especies de *Streptomyces* que crecen en pH ligeramente ácidos, por lo que propusieron que el rango preferible es entre 5.0 y 9.0 (Goodfellow, 1983).

Tabla 3. pH correspondientes a las dos muestras tomadas de rizósfera de *P. americana* de cada UP. Se indica la media del pH de cada UP.

HUERTO	pH muestra 1	pH muestra 2	Media del pH
LOS PINOS	6.61	6.6	6.605
LOS PINOS 1	5.88	6.9	6.39
VISTA HERMOSA	6.18	6.55	6.365
SANTA BARBARA	6.51	6.21	6.36
HUERTO EL PAPI	6.12	6.25	6.185
EL CASCAJAL 3	6.25	6.44	6.345
TANAXHURI 6	6.83	6.63	6.73
CHERANGUERAN 6	6.71	6.77	6.74
LAS PALOMAS	7.92	6.95	7.435
HUERTO ALEGRE 1 Y 4	6.82	6.9	6.86
LA VUELTA DEL CERRO 5	7.1	6.49	6.795
FLOR MORENA	6.8	6.65	6.725
LA GRAVA 2	6.65	7.02	6.835
TANAXHURI 1	6.58	6.3	6.44
LA MESA 9	6.34	6.98	6.66
ZIPACHA	5.9	5.85	5.875
LA OLLA	6.6	7.7	7.15
LA LOMA 6	7.04	6.76	6.9
LOMA BONITA 1	6.58	6.42	6.5

EL REFUGIO	6.12	6.96	6.54
EL ENCINO 3	6.42	6.62	6.52
SANTA MARTHA 1	6.66	6.18	6.42
LA ALBERCA 3	6.6	6.14	6.37
CERRO COLORADO	6.05	6.21	6.13
RINCÓN DE LA COFRADÍA 9	6.43	6.87	6.65
DOMINGUITO	6.37	6.07	6.22
HACIENDA DE STA. CATARINA	7.2	6.04	6.62
HUISICHO	6.27	6.1	6.185
POZO DE BARRO	6.55	7.26	6.905
HUCAZ 2	6.66	5.38	6.02

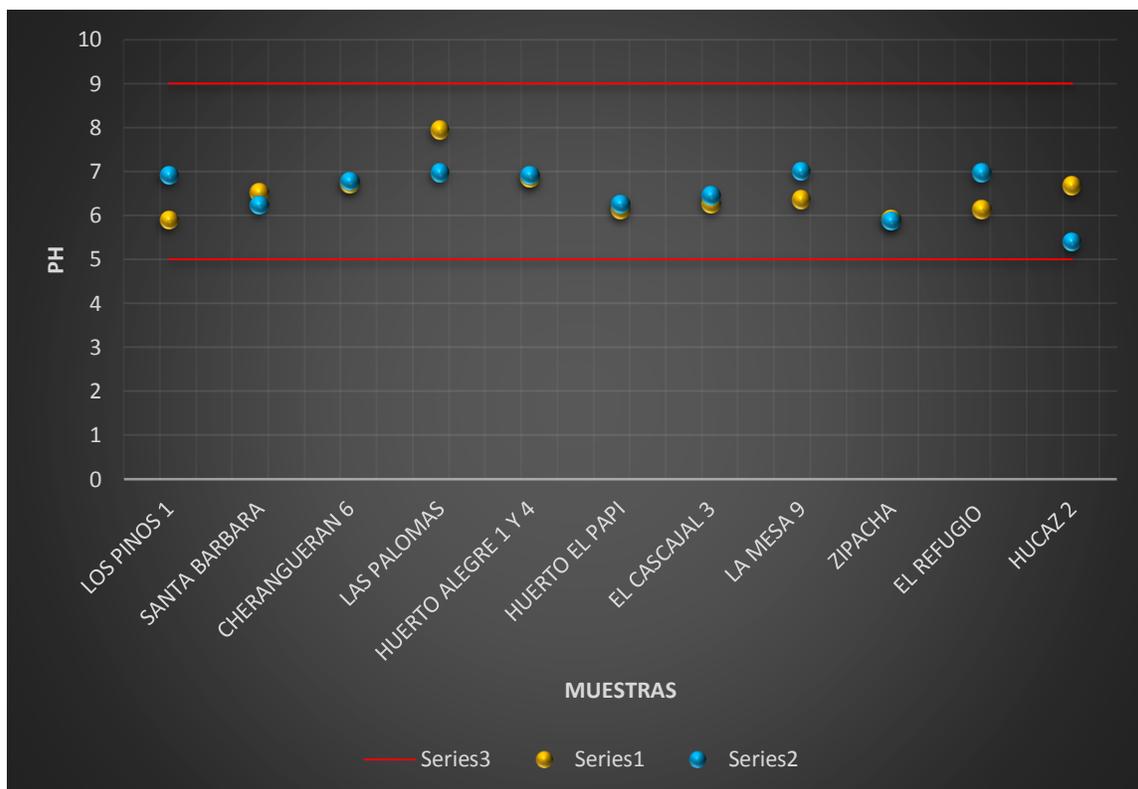


Figura 18. pH de la rizósfera de *P. americana*. Las líneas rojas señalan el rango de pH óptimo para el crecimiento de actinobacterias señalado por Goodfellow y Willams en 1983 (5-9), mientras

que los puntos amarillos y azules corresponden a los valores de pH determinados en cada una de las muestras de donde provienen las 20 cepas seleccionadas para el ensayo.

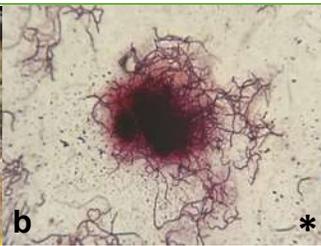
Los 11 huertos de donde se seleccionaron las bacterias a probar, presentaron valores de pH muy diversos entre sí, desde un suelo ligeramente ácido de 5.3 a uno ligeramente alcalino de 7.92; el gráfico (Fig. 18) señaló que la totalidad de los valores se encuentran dentro del rango establecido por Goodfellow y Williams, lo que indica que son suelos con pH ligeramente ácido a neutro, condiciones idóneas para el establecimiento de actinobacterias. Sin embargo; al comparar el pH del suelo con el número de aislados de cada UP, no se observó una relación, ya que todos los valores de pH resultaron ser óptimos pero se presentó una gran diferencia entre el número de bacterias de interés que se obtuvo de cada huerto, e incluso, no se recuperó ninguna cepa presuntiva de actinobacterias en dos de ellos; esto indica que, a pesar de que el pH es un factor importante para su establecimiento, no es el único factor involucrado.

8.4. Características fenotípicas

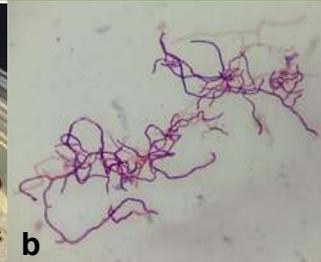
Las 20 cepas seleccionadas se sembraron en agar EM y se resguardaron en la oscuridad para su maduración y expresión de metabolitos secundarios, pigmentos o esporulación. En las siguientes imágenes (Fig. 19) se puede ver el fenotipo macroscópico y microscópico expresado por colonias de actinobacterias representativas del grupo aislado, que corresponde con lo descrito por Goodfellow & Williams (1983) y por Bonifaz (2012).



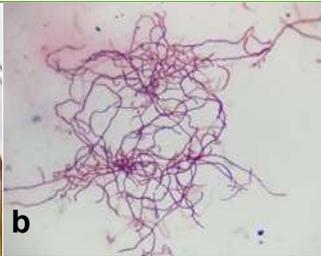
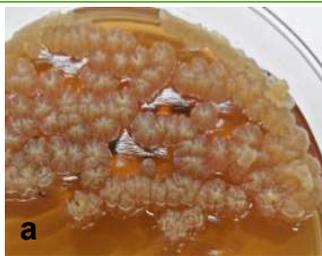
a) Colonias irregulares, surcadas, de color blanco (presencia de esporas), aterciopeladas y consistencia friable.
b) Filamentos delgados y aglomerados Gram-positivos que se fragmentan en bacilos.



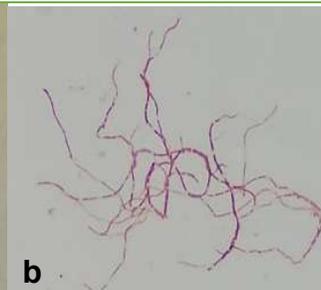
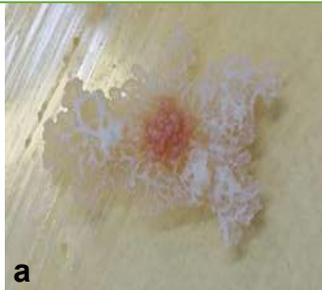
- a) Colonias radiadas, crateriformes de color beige y consistencia suave.
- b) Filamentos ramificados Gram-positivos que se aglomeran.



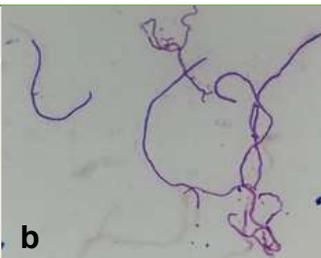
- a) Colonias de color rosa claro que, con el tiempo, se vuelven rojo-brillante, irregulares y umbilicadas de consistencia dura.
- b) Hifas microsifonadas Gram-positivas que se ramifican.



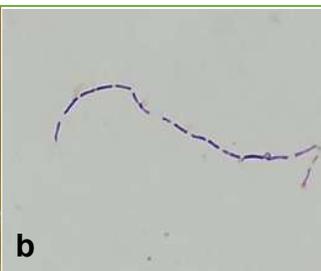
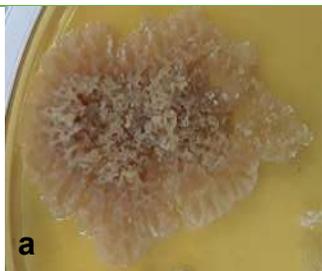
- a) Colonias surcadas y acuminadas, color beige, de consistencia muy dura y que se adhieren al agar.
- b) Filamentos largos Gram-positivos, ramificados.



- a) Colonia grande, rugosa e irregular, color blanco con un centro naranja y consistencia suave.
- b) Filamentos delgados Gram-positivos que se fragmentan en segmentos más cortos.



- a) Colonias medianas color beige, rugosas, irregulares y elevadas, de consistencia dura.
- b) Filamentos delgados Gram-positivos.



- a) Colonia grande de color café, rugosa, surcada, de borde irregular que tiende a elevarse en la parte central.
- b) Filamento Gram-positivo, delgado y fragmentado.

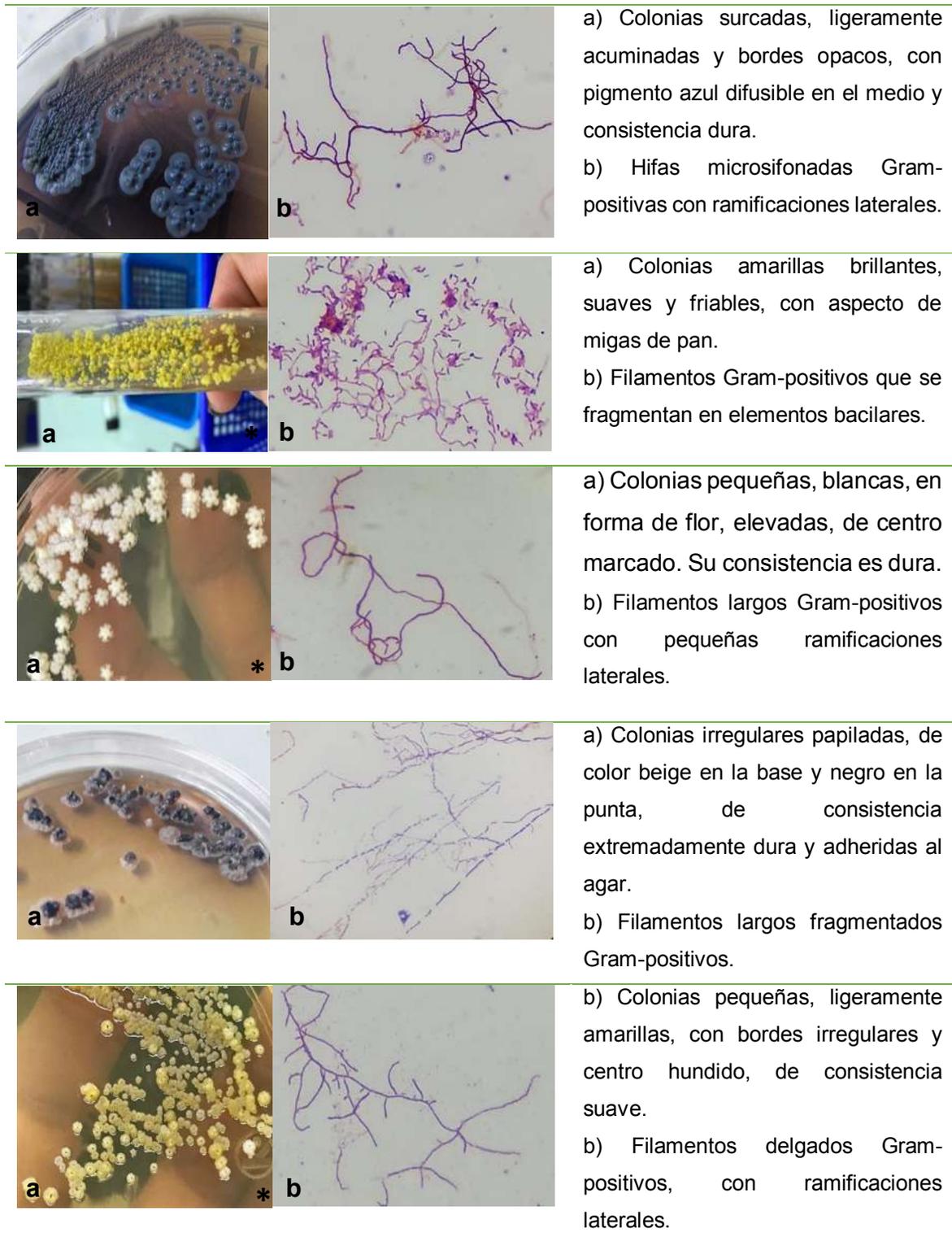


Figura 19. Características fenotípicas de las cepas aisladas de rizósfera de *P.americana*. a) morfología colonial. b) morfología micrscópica observada en aumento 100x. * Fotografías proporcionadas por la C. D. C. Karla Gabriela Domínguez González

8.5 Análisis de la interacción microorganismo - planta

8.5.1 Crecimiento de actinobacterias en medio MS

El crecimiento de las bacterias sobre la línea de inoculación, presentaron algunas diferencias en cuanto al patrón de crecimiento. La mayoría crecieron uniformemente, mientras que las cepas A8-4, A20-2, A4-21, A2-2 y A11-37 crecieron en cúmulos de bacterias. A20-1 y A20-6 se expandieron más allá de la línea de inoculación e incluso presentaron gran capacidad de colonización sobre las raíces de la plántula, al igual que A30-14, pero a diferencia de éstas, no presentó el mismo comportamiento de expansión.

8.5.2. Análisis de la estimulación del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* inducido por actinobacterias

Para determinar la capacidad de las actinobacterias para estimular el crecimiento en *A. thaliana*, primeramente, se cuantificó la longitud de la raíz primaria en cm y los datos se analizaron con el programa estadístico jmp® de SAS Statistical Discovery.™, empleando el método de Dunnett y el Método de Tukey (Tabla 4), un $p < 0.05$, indica que el tratamiento de inoculación de bacterias tiene un impacto significativo sobre los resultados y dicha información apoyará o rechazará la hipótesis de investigación. Los resultados se muestran en la Fig. 20, donde sobresalen A7-17 y A11-37, siendo notoriamente menores que el control.

La prueba de Dunnett, compara la media de cada interacción con respecto al control, permitió proporcionar información para la formación de tres grupos: i) las bacterias que estimularon el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 21), con claves A15-11, A16-3, A6-12, A20-13, A7-13, A4-15 y A8-4; ii) las bacterias que presentaron nula capacidad de alargar la raíz y se observaron semejantes al control (A11-30, A4-33, A20-2, A10-13, A20-1, A11-36, A16-4, A2-2, A4-21, A30-14 y A20-6) (Fig. 22); y iii) las bacterias que reprimieron el alargamiento de la raíz, siendo solamente A7-17 y A11-37 (Fig. 23).

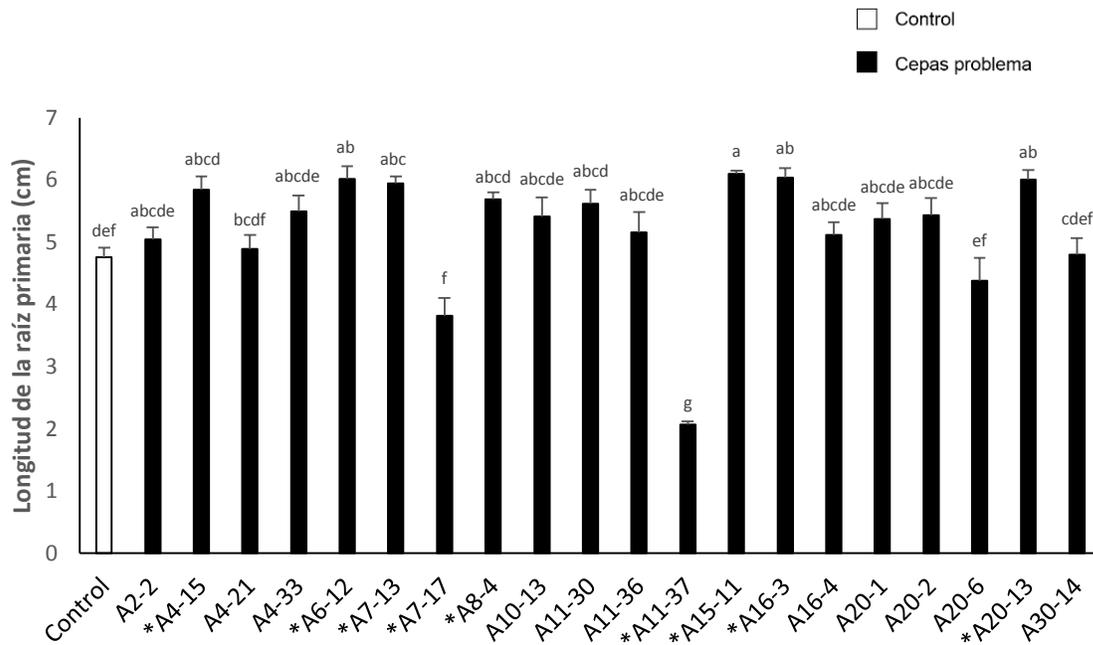


Figura 20. Efecto de las bacterias en la elongación de la raíz primaria de *Arabidopsis*. Se analizaron 6 plantas por tratamiento (por triplicado) y se registraron las medias. Las barras representan el error estimado entre las medias de las tres repeticiones por tratamiento en función a la longitud de la raíz primaria. Las letras indican la agrupación de similitudes y diferencias que existen entre los microorganismos significancia estadística en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los asteriscos corresponden a las medias que son estadísticamente diferentes respecto al control con la prueba de Dunnett.

Tabla 4. Análisis estadístico de la longitud de la raíz primaria con el método de Dunnett y el método de Tukey. JMP de SAS®

Nivel	DUNNETT	TUKEY	
	p-valores	Media	
A15-11	0.0006*	6.0944444	A
A16-3	0.0013*	6.0388889	A B
A6-12	0.0018*	6.0111111	A B
A20-13	0.0020*	6.0000000	A B
A7-13	0.0038*	5.9444444	A B C
A4-15	0.0112*	5.8444444	A B C D
A8-4	0.0491*	5.6888889	A B C D
A11-30	0.0887	5.6172222	A B C D

A4-33	0.2142	5.4944444	A B C D E
A20-2	0.3121	5.4333333	A B C D E
A10-13	0.3541	5.4111111	A B C D E
A20-1	0.4477	5.3666667	A B C D E
A11-36	0.9269	5.1500000	A B C D E
A16-4	0.9678	5.1111111	A B C D E
A2-2	0.9967	5.0388889	A B C D E
A4-21	1.0000	4.8888889	B C D E F
A30-14	1.0000	4.8000000	C D E F
CONTROL	1.0000	4.7500000	D E F
A20-6	0.9529	4.3722222	E F
A7-17	0.0491*	3.8111111	F
A11-37	0.0000*	2.0611111	G
Alfa = 0.05 Los valores marcados (*) muestran pares de medias que son significativamente diferentes.		Alfa = 0.05 Los niveles no conectados por la misma letra, son significativamente diferentes (extremos, ver Fig. 20)	

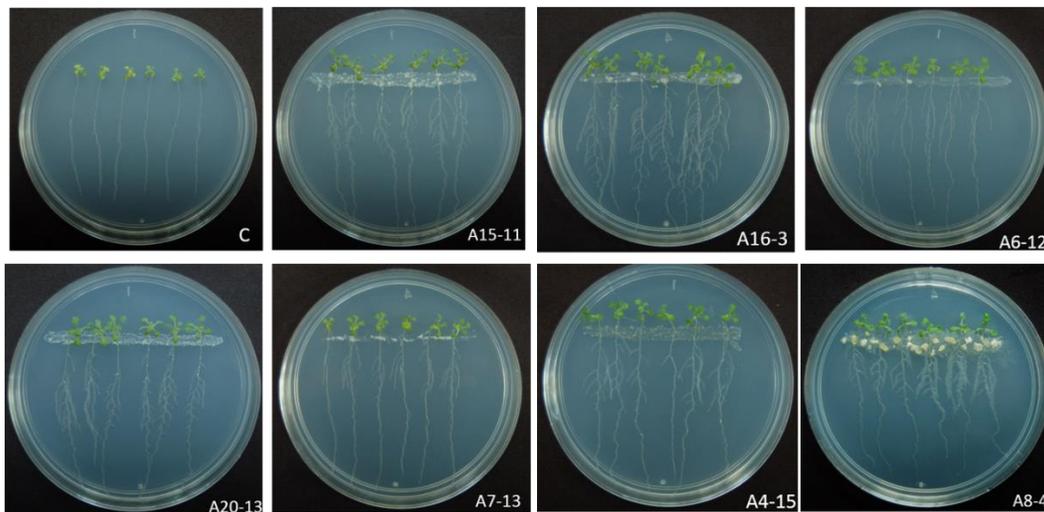


Figura 21. Estimulación en el crecimiento de la raíz principal inducida por actinobacterias. C) Plantas sin inocular. Las cepas se encuentran ordenadas de forma descendente con respecto a la media de elongación en cm.

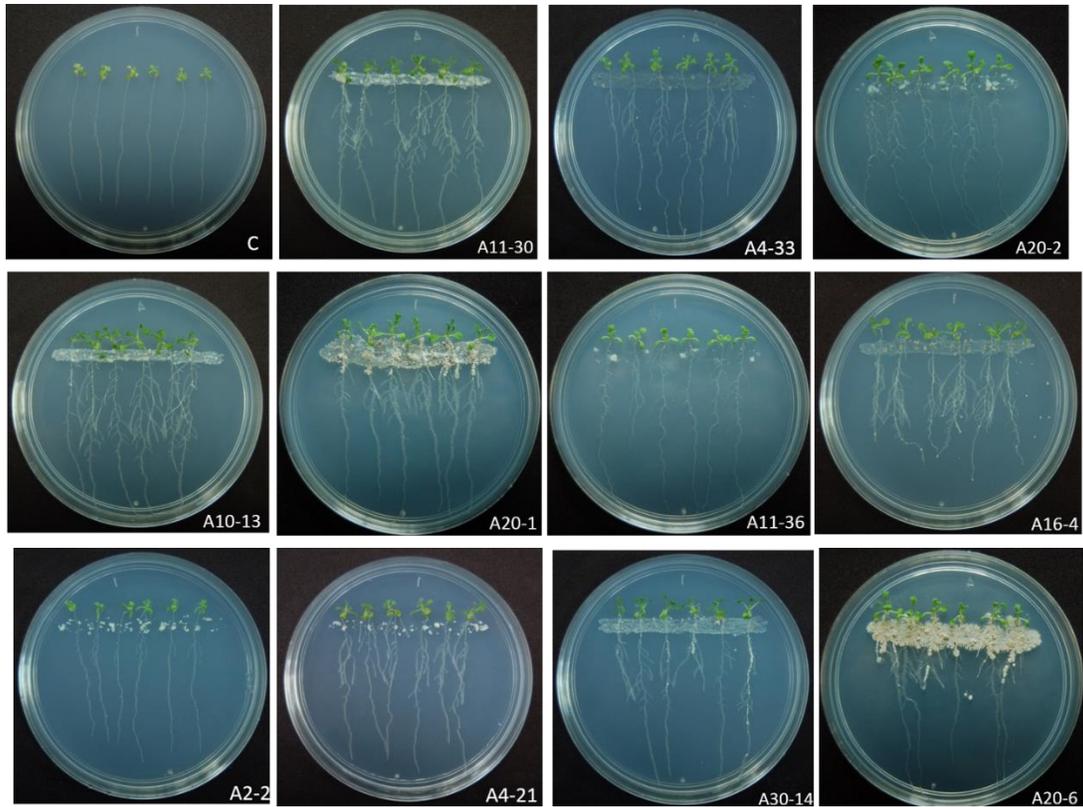


Figura 22. Estimulación en el crecimiento de la raíz principal sin diferencia significativa inducida por las actinobacterias. C) Plantas sin inocular. Ordenadas en forma descendiente con base al valor las medias en cm.



Figura 23. Represión en el crecimiento de la raíz principal inducida por las actinobacterias. C) Plantas sin inocular. Ordenadas en forma descendiente con base al valor las medias en cm.

El análisis del crecimiento de la raíz primaria nos permitió identificar aquellas actinobacterias con mayor capacidad de estimular su elongación, siendo A15-11, A16-3, A6-12, A7-13, A20-13, A4-15 y A8-4 las que lograron incrementar significativamente su

longitud; sin embargo; de forma contraria, la cepa A11-37 reprimió totalmente su crecimiento al estar en contacto con la bacteria, en este caso particular, no solo la raíz resultó afectada, sino también su follaje que presentó signos de marchites. La cepa A7-17 también reprimió su crecimiento, aunque en grado mucho menor comparada con la descrita anteriormente, y el follaje de la planta presentó un ligero color café, que indicó daño por parte de la bacteria. El crecimiento de la raíz primaria de una planta mejora su anclaje al suelo y le confiere estabilidad ante estímulos externos, además, esta elongación pudiera ser debida a la producción de fitohormonas que participan directamente en su regulación (Magaña-Dueñas *et al.*, 2015).

8.5.3 Efecto de la inoculación de actinobacterias en *Arabidopsis thaliana* sobre la arquitectura radicular

Al evaluar el efecto de las actinobacterias sobre la formación de raíces laterales en *Arabidopsis*, mostraron un incremento en el número con marcadas diferencias entre cada interacción, a excepción de A11-37 que todo su desarrollo presentó represión. Los resultados se muestran en la Fig. 24, junto con los resultados del análisis estadístico con el método de Dunnett y el método de Tukey (Tabla 5).

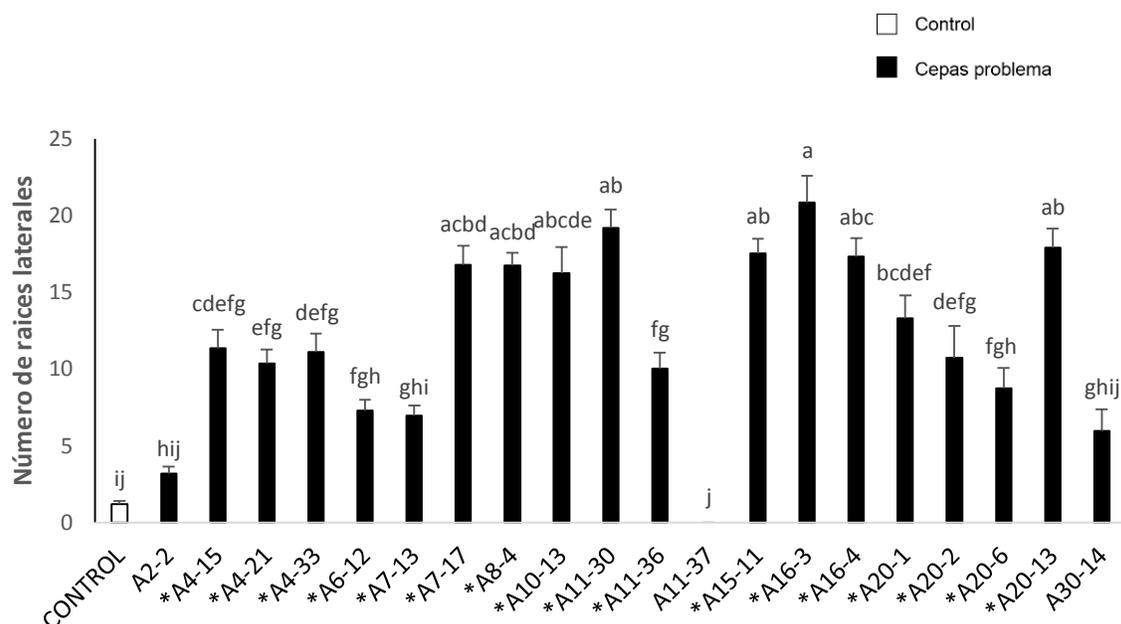


Figura 24. Efecto de promoción por actinobacterias en la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*. Las barras indican el error estimado entre las medias de las tres repeticiones por tratamiento en función a la formación de raíces laterales. Las letras indican la agrupación de similitudes y diferencias que existen entre los microorganismos con una alta significancia estadística en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los asteriscos en las cepas sobre el eje de las “x” corresponden a las medias que son estadísticamente diferentes respecto al control con la prueba de Dunnnett.

Tabla 5. Análisis estadístico del número de raíces laterales con el método de Dunnnett y el método de Tukey. JMP de SAS®

Nivel	DUNNETT	TUKEY	
	p-valores	Media	
A16-3	0.0000*	20.833333	A
A11-30	0.0000*	19.166667	A B
A20-13	0.0000*	17.888889	A B
A15-11	0.0000*	17.500000	A B
A16-4	0.0000*	17.333333	A B C
A7-17	0.0000*	16.777778	A B C D
A8-4	0.0000*	16.722222	A B C D
A10-13	0.0000*	16.222222	A B C D E
A20-1	0.0000*	13.277778	B C D E F
A4-15	<.0001*	11.333333	C D E F G
A4-33	<.0001*	11.111111	D E F G

A20-2	<.0001*	10.722222	D E F G
A4-21	<.0001*	10.333333	E F G
A11-36	<.0001*	10.000000	F G
A20-6	0.0002*	8.722222	F G H
A6-12	0.0058*	7.277778	F G H
A7-13	0.0113*	6.944444	G H I
A30-14	0.0655	5.944444	G H I J
A2-2	0.9520	3.166667	H I J
CONTROL	1.0000	1.166667	I J
A11-37	0.9999	0.000000	J
Alfa = 0.05 Los valores marcados (*) muestran pares de medias que son significativamente diferentes.		Alfa = 0.05 Los niveles no conectados por la misma letra, son significativamente diferentes (extremos, ver Fig. 24)	

Las bacterias se separaron en dos grupos de acuerdo a su capacidad de estimular la formación de raíces laterales: el primero (Fig. 25), mostró un efecto sobresaliente, destacando A16-3 con un promedio de 20 raíces laterales, dispuestas a lo largo de toda la raíz principal en contraste con el control que presento, en promedio, 1 raíz lateral. Un caso particular se presentó en la cepa 7-17, que a pesar de formar gran número, eran muy cortas y algunas se elevaban de la superficie del medio, además de que el follaje presentó ligeros signos de marchités. De forma interesante, las plantas en interacción con A20-1 y A20-6, quienes colonizaron la raíz, toleraron la carga bacteriana generando raíces laterales a cierta distancia del meristemo de la raíz principal y presentaron un considerable aumento en la biomasa del follaje. En la cepa A20-13, las raíces se desarrollaron principalmente en la parte central de la raíz primaria.

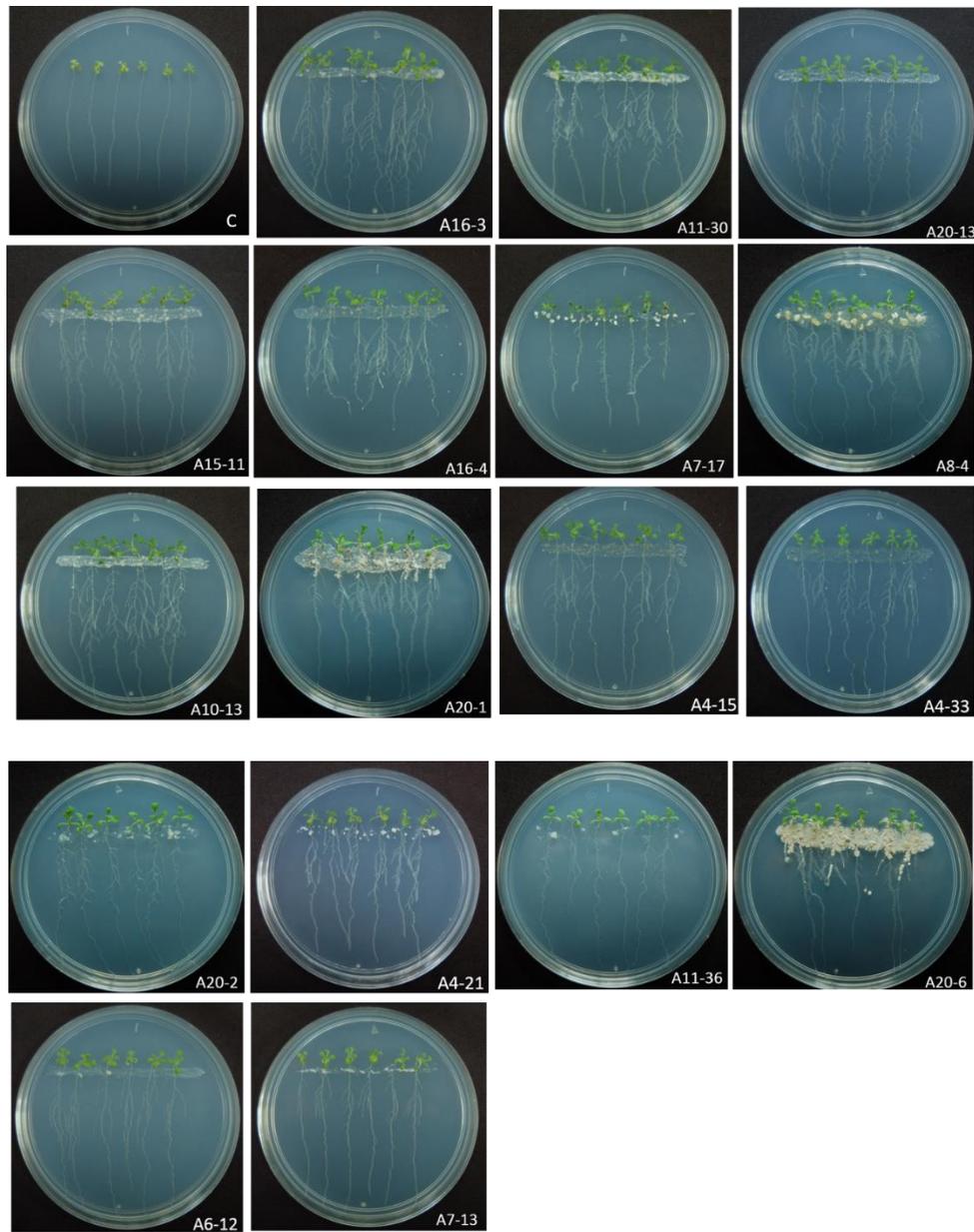


Figura 25. Efecto en arquitectura radicular de *Arabidopsis* por inoculación de actinobacterias.

C) Plantas sin inocular. Actinobacterias ordenadas de manera descendiente con respecto a la media del número de raíces laterales formadas tras la interacción directa.

El segundo grupo se conformó por las bacterias que lograron una baja o nula estimulación (Fig. 26); el número de raíces generadas en A30-14 y A2-2 fueron muy escasas, sin diferencias significativas respecto al control, mientras que en la cepa A11-37 no se cuantificó ninguna.

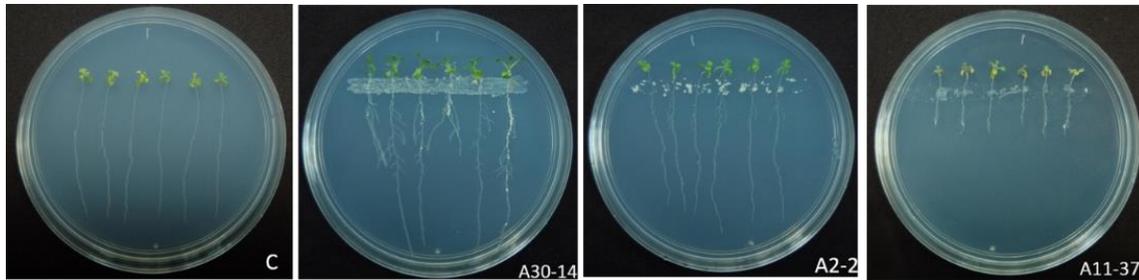


Figura 26. Efecto de baja o nula estimulación en la arquitectura radicular por la inoculación de actinobacterias en *Arabidopsis*. C) Plantas sin inocular. Actinobacterias ordenadas de manera descendiente con respecto a la media del número de raíces laterales formadas tras la interacción directa.

En general, las actinobacterias lograron un marcado efecto en la bioestimulación de raíces laterales, adquiriendo un fenotipo típico de respuesta a auxinas (Spaepen *et al.*, 2013), con diferencias entre cada interacción en cuanto al número, longitud y disposición a lo largo de la raíz primaria, generando diferentes patrones en la arquitectura radicular que se pudieran asemejar a los descritos por López-Bucio *et al.* en 2003 en función de la disponibilidad de nutrientes. Independientemente de la disposición, un incremento en el número de raíces laterales se refleja en un aumento del potencial de exploración en el suelo circundante por parte de la planta para la mejor obtención y absorción de agua y nutrientes.

8.5.4 Cálculo de la densidad de raíces

La densidad es el cociente del número de raíces laterales y la longitud de la raíz primaria; en la Fig. 27, se presentan los cálculos de las densidades de cada interacción analizados mediante el método de Dunnett y el método de Tukey (Tabla 6), destacando de manera sobresaliente A7-17, que presentó gran número de raíces laterales en una longitud de la raíz primaria corta. En general, la mayoría presentó diferencias significativas respecto al control, exceptuando A2-2, A6-12, A7-13 y A30-14, que se mantuvieron cercanos, mientras que A11-37, al no generar raíces laterales, tuvo un valor de cero.

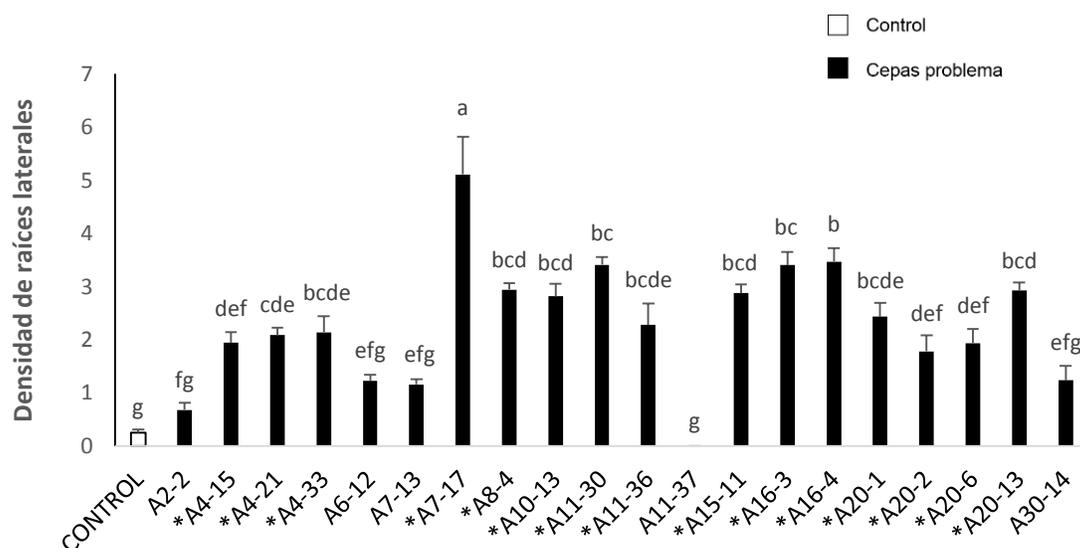


Figura 27. Gráfico de densidad de raíces laterales. Las barras representan el error estimado entre las medias de las tres repeticiones por tratamiento en función a la densidad. Las letras indican la agrupación de similitudes y diferencias que existen entre los microorganismos con una alta significancia estadística en la de Tukey ($p < 0.05$). Las cepas marcadas con “*”, señalan las que son estadísticamente diferentes con la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Tabla 6. Análisis estadístico de la densidad de raíces laterales con el método de Dunnett y el método de Tukey JMP de SAS®

Nivel	DUNNETT	TUKEY	
	p-valores	Media	
A7-17	0.0000*	5.1035827	A
A16-4	0.0000*	3.4666570	B
A11-30	0.0000*	3.4032468	B C
A16-3	0.0000*	2.9364591	B C
A8-4	0.0000*	2.9237554	B C D
A20-13	0.0000*	2.8713439	B C D
A15-11	0.0000*	2.8713439	B C D
A10-13	<.0001*	2.8128970	B C D
A20-1	<.0001*	2.4283165	B C D E
A11-36	<.0001*	2.2743715	B C D E
A4-33	<.0001*	2.1390418	B C D E
A4-21	<.0001*	2.0837609	C D E
A4-15	0.0001*	1.9390700	D E F

A20-6	0-0001*	1.9343325	D E F
A20-2	0.0008*	1.7786745	D E F
A30-14	0.1037	1.2302109	E F G
A6-12	0.1081	1.2239492	E F G
A7-13	0.1680	1.1534567	E F G
A2-2	0.9631	0.6746651	F G
CONTROL	1.0000	0.2502977	G
A11-37	0.9999	0.0000000	G
Alfa = 0.05 Los valores marcados (*) muestran pares de medias que son significativamente diferentes.		Alfa = 0.05 Los niveles no conectados por la misma letra, son significativamente diferentes (extremos, ver Fig. 27)	

La evaluación de la densidad de raíces en *Arabidopsis*, nos permitió observar la capacidad de las actinobacterias como promotoras del crecimiento vegetal relacionando ambos parámetros, ya que, en algunos casos, como en A7-13, que resultó dentro de los que aumentaron significativamente la longitud de la raíz primaria, su capacidad en la formación de raíces laterales fue baja, por lo que presentó una densidad relativamente baja. En cambio, A7-17 reprimió el crecimiento de la raíz principal, pero generó un gran número de raíces laterales, por lo tanto, su densidad fue muy alta. El análisis de la densidad indica que mientras más alto sea el valor de la densidad, mayor fue la capacidad de las actinobacterias para promover el crecimiento vegetal, sin embargo; es necesario tomar en cuenta los aspectos visibles generales de la planta, como fue el caso de A7-17, que, a pesar de tener el valor más alto de densidad, sus follajes mostraron signos de afectación.

8.6. Expresión del marcador *DR5:uidA* en interacción con actinobacterias

La formación de órganos y tejidos ocurre por interacciones entre fitorreguladores del crecimiento. Se ha descrito que las auxinas interactúan con las citocininas para regular el crecimiento de la raíz primaria, la formación de pelos radiculares y de las raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2003), también se ha descrito que, entre los mecanismos a través de los cuales las rizobacterias estimulan el crecimiento de las plantas, se incluye la producción de fitohormonas como parte de su metabolismo, específicamente IAA que pertenece al grupo de las auxinas (Vega-Cedelón *et al.*, 2016), por lo que se podría suponer que la

estimulación inducida por las actinobacterias sobre el sistema de raíces de *Arabidopsis thaliana* pudiera ser consecuencia de la estimulación de esta vía.

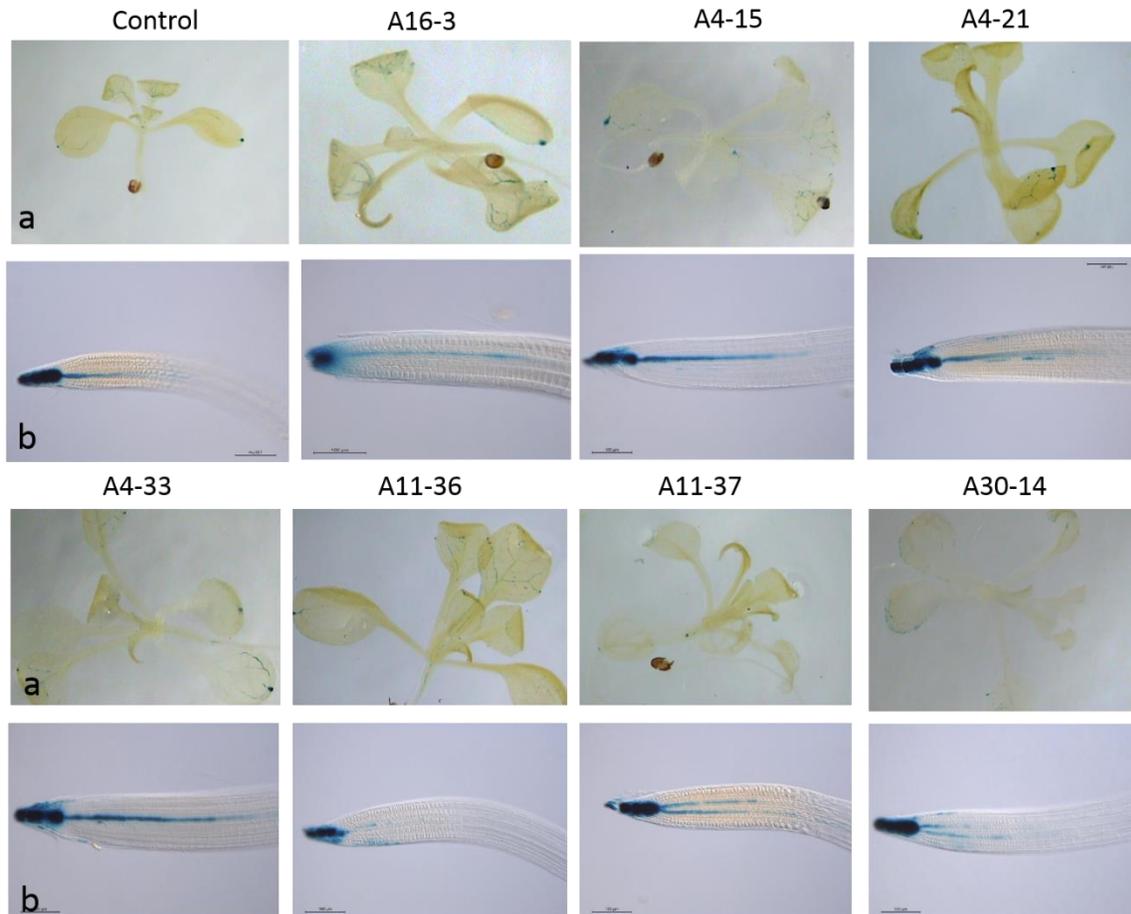
En *Arabidopsis thaliana*, la formación de hojas y flores también es un proceso dependiente de auxinas (Magaña-Dueñas *et al.*, 2015), las imágenes tomadas (Fig. 28a) permitieron ver la expresión del gen reportero en las hojas, así como el aumento de la superficie del follaje, el cual genera una mayor superficie de captación de energía solar que es aprovechada por las plantas para sus funciones vitales y desarrollo.

Se evaluó si la estimulación observada en las raíces de *Arabidopsis* fue debido al aumento de niveles endógenos de auxinas inducido por las actinobacterias, mediante la expresión del marcador *DR5:uidA*. Los resultados se compararon con el efecto inducido por auxinas de *Azospirillum brasiliense* en la expresión génica de *Arabidopsis* reportado por Spaepen *et al.* (2013) (Fig. 28).

Las cepas A2-2, A4-15, A4-21, A4-33, A11-36, A11-27 y A30-14 no presentaron cambios significativos al compararlas con el control de plántulas sin inocular en cuanto a la expresión del marcador en ninguno de los dos tejidos. En las bacterias A7-17 y A6-12, la expresión fue muy ligera en la punta de las hojas y un poco menos en las nervaduras. Las cepas A6-12 y A16-3, incrementaron notoriamente el diámetro de la raíz primaria en comparación con la del control, lo cual significa un aumento de la superficie de absorción de nutrientes, sin embargo; no mostraron aumento en la expresión del marcador. En A20-2, A20-1 y A20-6, DR5:GUS presentó un ligero incremento en las nervaduras de las hojas, mientras que en las dos últimas también se presentó en la zona meristemática, especialmente la A20-6. En todos los tratamientos se observó un considerable incremento del área foliar, especialmente en A20-6, A20-1, A11-30, A8-4 y A10-13, lo cual garantiza una mayor superficie para la absorción de luz que será utilizada por la planta para sus funciones vitales de desarrollo.

En general, el patrón de la tinción de los tejidos vegetales inoculados con las bacterias corresponden a los sitios de alta producción de auxinas (punta de las hojas y punta de la raíz) y puede ser comparable con el control sin inoculación, además, el resultado tiene un gran contraste al ser comparado con respecto a la expresión que logra *Azospirillum brasiliense* en *Arabidopsis*, al inducir el aumento de auxinas endógenas (Fig. 4), donde el marcador es expresado en toda la raíz y en el follaje. En este contexto se sugiere que las

bacterias probadas modificaron el sistema radicular de *A. thaliana* por medio de un mecanismo independiente a la producción de auxinas.



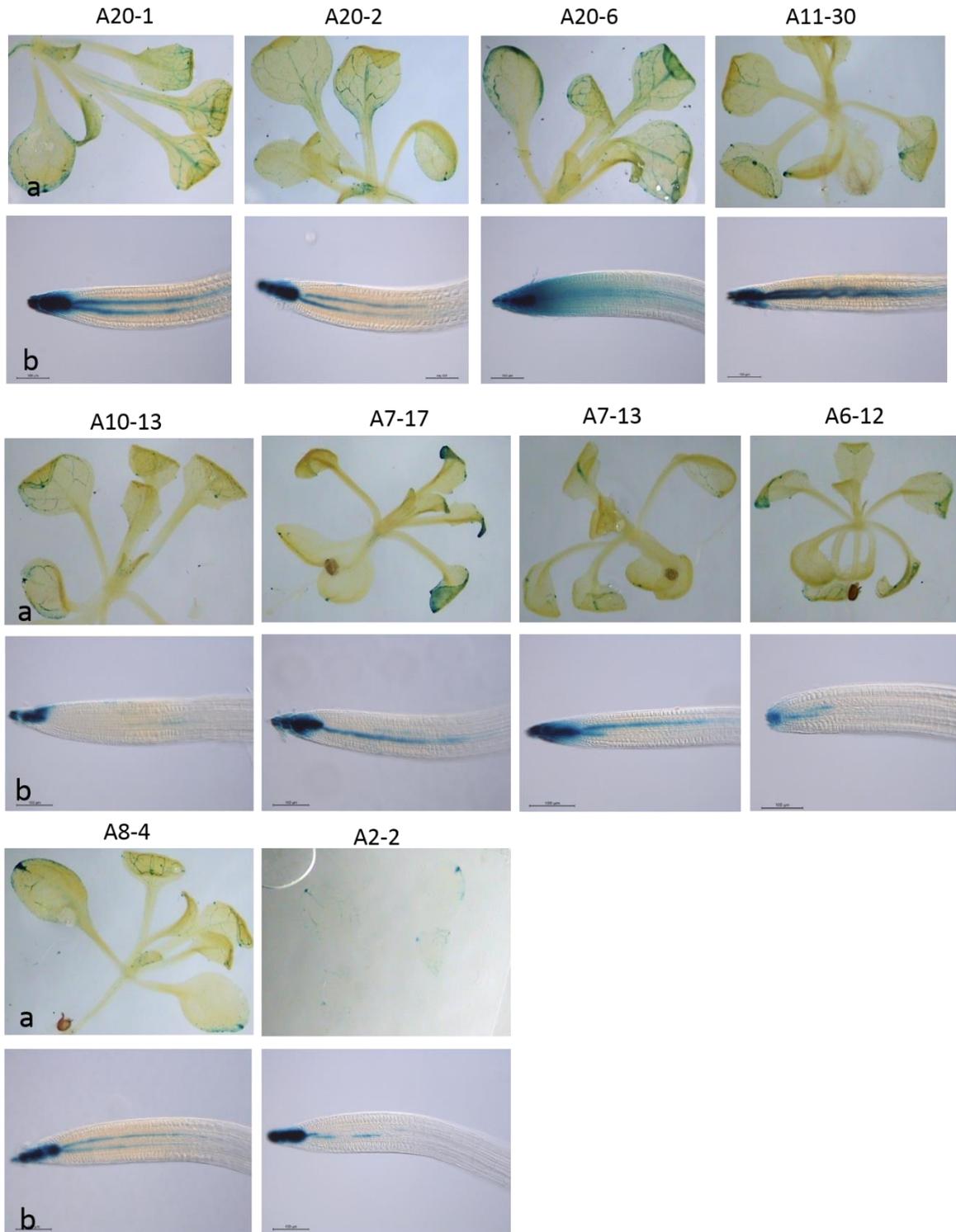


Figura 28. Expresión del marcador DR5:uidA en interacción con actinobacterias. a) Expresión del marcador en follaje de la planta control y de las plantas inoculadas con cepas problema, señaladas con sus respectivas claves. b) Expresión del marcador en meristemo de la raíz de plantas control y de plantas inoculadas con cepas problema.

9. CONCLUSIONES

1. La estandarización del método para descontaminación de muestras de suelo empleado por Masayuki en 1983, permite un crecimiento cuantificable de colonias facilitando así su aislamiento.
2. El suelo de cultivos de *Persea americana* del municipio de Uruapan, que están bajo condiciones de nutrición orgánica, conserva un gran número de especies bacterianas nativas presuntivas de actinobacterias por sus características fenotípicas, sin embargo; su identificación debe ser confirmada por métodos moleculares.
3. Las actinobacterias autóctonas de rizósfera de *P. americana* tienen la capacidad de promover el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, ya que generan un aumento en la biomasa del follaje y modifican la arquitectura radicular al aumentar la longitud de la raíz primaria e incrementar de manera sobresaliente el número de raíces laterales.
4. La bio estimulación del crecimiento vegetal por las bacterias aisladas no es dependiente de la producción de auxinas. Otros mecanismos no fueron evaluados, por lo que se desconoce cuál fue la vía utilizada por las actinobacterias que resultó en beneficio para las plantas y, al observar la diversidad de los patrones de crecimiento entre las distintas interacciones, se pudiera estar hablando de incluso más de un mecanismo involucrado dentro del grupo de bacterias evaluado, lo que deja un campo abierto en la investigación.

10. EXPECTATIVAS

La productividad de los cultivos está determinada por la fertilidad del suelo, y ésta fertilidad, está dada por diferentes factores, entre ellos, las poblaciones de microorganismos que conforman la microfauna, ya que participan en el ciclo y disponibilidad de los nutrientes. Sin embargo; el uso de técnicas para la producción intensiva de cultivo ha provocado que cada vez, sea más necesaria la aplicación externa de nutrientes, donde la mayoría de productos, al ser de carácter químico, también participan en la reducción de especies microbianas benéficas que intervienen en el desarrollo de las plantas. Al conocer la capacidad de las actinobacterias en la estimulación del crecimiento vegetal, les otorga un uso potencial como bioinoculantes o biofertilizantes, pudiendo incluirlas en formulaciones agrícolas aplicables directamente la suelo, lo cual permita explotar su capacidad para proveerlas de micronutrientes o su capacidad de biocontrol contra microorganismos fitopatógenos gracias a los metabolitos secundarios que producen, y así, considerarlas como un alternativa económica y ecológica en las técnicas de agricultura, es decir, procurar un incremento en la productividad de los cultivos sin provocar efectos negativos al ecosistema.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Bach-Álvarez, T., & Díaz, M.** (2008). Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. *Agricultura orgánica*, 1, 35-38
- 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*, Vol. 57(1), pp. 233–266
- Bais, H., Loyola-Vargas, V., Flores, H. & Vivanco, J.** (2001). Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, Vol. 37(6), pp. 730–741.
- Baldwin, I.** (2006). Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: “Talking Trees” in the Genomics Era. *Science*, Vol. 311, pp. 812–815.
- Barea, J., Pozo, M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C.** (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, pp. 1761–1778.
- Barker, D., Bianch, S., Blondon, F., Dattde, Y, et al.** (1990). *Medicago truncatula*, a Model Plant for Studying the Molecular Genetics of the *Rhizobium* Legume Symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 8 (1), pp. 40-49.
- Barrer, S.** (2009). El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, Vol. 7(1), pp. 123-132.
- Barrientos Priego, A. F.** (2010). El aguacate. CONABIO. Biodiversitas, 88:1-7
- Bayer de México S.A. de C.V.** (2016). Resumen Para Consulta Pública de la Solicitud de Permiso de Liberación al Ambiente de Organismos Genéticamente Modificados. Octubre, 2019, de Información Sobre el Organismo Genéticamente Modificado Sitio web: https://www.gob.mx/cms/file/1-ResumenParaConsultaP_blica011_2016
- Berg, G. & Smalla, K.** (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 68(1), pp. 1–13.

- Bernal, E. Londoño, M., Díaz, C., Carbalí, A., Osorio, C., Tamayo, A. & Sandoval, A.** (2014). Actualización Tecnológica y Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Cultivo del Aguacate. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuario-Corpoica.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D.** (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 28, pp. 1327-1350.
- Bhattarai, A., Bhattarai, B. & Pandey, S.** (2015). Variation of Soil Microbial Population in Different Soil Horizons. *Journal of Microbiology & Experimentation*, Vol. 2(2)
- Bolívar-Anillo, H. J., Garrido, C., & Collado, I. G.** (2019). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*.
- Bonifaz, A.** (2012). Propiedades generales de los actinomicetos. En *Micología Médica Básica* (pp. 34-38). México: Editorial: McGRAW-HILL INTERAMERICANA.
- Calvo-Vélez, P., Reymundo-Meneses, L., & Zúñiga-Dávila, D.** (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas Altoandinas. Septiembre 2019, de Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Sitio web: <http://www.scielo.org.pe/>
- Cano, M.** (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14 (2), pp.15 - 31.
- Cardona, G., Peña-Venegas, C. & Ruiz-García, M.** (2009). Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Revista de Biología Tropical*, Vol. 57 (4), pp. 1119-1139.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandber, G. & Bennett, M.** (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *TRENDS in Plant Science*, Vol. 4(8), pp.165-171
- Castillo, P., Molina, R., Andrade, A., Vigliocco, A., Alemanno, S., & Cassán, F. D.** (2015). Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. *Handbook for Azospirillum*, pp. 115–138.
- CEDRSSA.** (2017). Reporte: Caso de Exportación de Aguacate. Obtenido de: <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/54Exportaci%C3%B3n%20aguacate.pdf>

- Ciancio, A., Pieterse, C. & Mercado-Blanco, J.** (2019). Editorial: Aprovechamiento de microorganismos útiles de la rizósfera para el biocontrol de patógenos y plagas - Segunda Edición. *Frente. Microbiol., Vol. 10.*
- Contreras-Cornejo, H.** (2010). Tesis de grado. "Caracterización de las respuestas de defensa inducidas por hongos del género *Trichoderma* en *Arabidopsis thaliana*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- DANE.** (2016) Cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill; *Persea nubigena* var. *Guatemalensis* x *Persea americana* var. *drymifolia*), plagas y enfermedades durante la temporada de lluvias. Boletín mensual Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria, Núm. 50
- Evangelista-Martínez, Z., Quiñones-Aguilar, E., & Rincón-Enríquez, G.** (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología, Vol. 21(63), pp 39 - 51.*
- Franco-Correa, M.** Tesis de grado. (2008)."Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas" Universidad de Granada, España.
- Franco-Correa, M., & Chavarro-Anzola, V.** (2016). Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. X., & Barea, J.-M.** (2010). Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology, Vol. 45(3), pp. 209–217.*
- García-Cárdenas, E.** Tesis de grado. (2017). "Identificación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y su relación con la respuesta a auxinas en *Arabidopsis*" Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- Glinwood, R., Pettersson, J., Ahmed, E., Ninkovic, V., Birkett, M. & Pickett, J.** (2003). Change in acceptability of barley plants to aphids after exposure to allelochemicals from couch-grass (*Elytrigia repens*). *J Chem Ecol. Vol. 29(2), pp. 261-274.*

- González-González, G. L., Figueroa-Sánchez, C. I., Perdomo-Ortiz, M. F., & Ardila-Rojas, X. A.** (2018). Producción de aguacate hass una alternativa para el departamento del huila. *Creceer Empresarial: Journal of Management and Development*. Vol. 02, pp. 7-15.
- Goodfellow, M. & Willams, S. T.** (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbial*, Vol. 37, pp.189-216.
- Goralski, M., Sobieszczanska, P., Obrepalska-Stepłowska, A., Swiercz, A., Zmienko, A. & Figlerowicz, M.** (2016). A gene expression microarray for *Nicotiana benthamiana* based on de novo transcriptome sequence assembly. *Plant Methods*, Vol. 12(18)
- Guerrieri E, Poppy GM, Powell W, Rao R, Pennacchio F.** (2002). Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *J. Chem. Ecol.* Vol.28. pp. 1703–1715
- Hartmann, A., Roothballer, M. & Schmid, M.** (2008). Lorentz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Journal Plant Soil*, Vol. 312, pp. 7-14.
- Hawes, M., Gunawardena, U., Miyasaka, S. & Zhao, X.** (2000). The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science*, Vol. 5(3), pp. 128-133.
- Huang, X., Chaparro, J., Reardon, K., Zhang, R., Shen, Q. & Vivanco, J.** (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities1. *Botany*, Vol. 92(4), pp. 267-275.
- INAFED.** (2010). Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. SEGOB Secretaría de Gobernación. Sitio web: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM16michoacan/index.html>
- INEGI.** (2009) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Sitio web: <https://www.inegi.org.mx/>
- INEGI.** (2017) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Sitio web: <https://www.inegi.org.mx/>
- INIFAP,** (2017). Agenda Técnica Agrícola de Michoacán: Aguacate. Obtenido de: <https://www.inifap.gob.mx>

- Iyer-Pascuzzi, A., Simpson, J., Herrera-Estrella, L., & Benfey, P. N.** (2009). Functional genomics of root growth and development in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 12(2), pp. 165–171.
- Jaramillo, D.** (2002). Las propiedades bio orgánicas del suelo. En *Introducción a la ciencia del suelo* (376-413). Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Jiang, Q. & Gresshoff, P.** (1996). Classical and Molecular Genetics of the Model Legume *Lotus japonicus*. *The American Phytopathological Society Publications*, Vol. 10(1), pp. 59-68.
- JLSV.** (2019). Junta Local de Sanidad Vegetal de Uruapan
- Jog, R., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S.** (2016). Enhancing Soil Health and Plant Growth Promotion by Actinomycetes. *Plant Growth Promoting Actinobacteria*, pp. 33–45.
- Kalia, V. C.** (2014). Microbes: The Most Friendly Beings? Quorum Sensing Vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight, 1–5.
- Kamal, R., Singh-Gusain, Y. & Kumar, V.** (2014). Interaction and symbiosis of AM fungi, Actinomycetes and Plant Growth Promoting Rhizobacteria with plants: Strategies for the improvement of plants health and defense system. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, Vol. 3(7), pp. 564-585.
- Karcher, S.** (2002). Blue Plants: Transgenic Plants With The Gus Reporter Gene. *Tested studies for laboratory teaching*, Vol. 23, pp. 29-42.
- Kloepper, J. & Schroth, M.** (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Plant. Path. Bact.*, Vol. 2, pp. 879-882.
- Kloster N. S., Azcarate, M. P., Babinec, F. J. & Bono, A.** (2008). Comparación de técnicas de medición del ph del suelo: ph en pasta de saturación y en relación suelo: agua 1:2,5. Septiembre, 2019, de Asociación Argentina Ciencia del Suelo Sitio web: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_comparacion_de_tecnicas_de_medicion_del_ph_del_suelo_-_kloster_et_al_2008.pdf
- Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., Janda, W., Allen, S. & Winn, W.** (2008). Actinomicetos aerobios. En *Koneman Diagnóstico microbiológico*

Texto y Atlas en color (pp. 817-835). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

- Latif, S., Chiapusio, G., & Weston, L. A.** (2017). Allelopathy and the Role of Allelochemicals in Plant Defence. *How Plants Communicate with Their Biotic Environment*, pp. 19–54.
- LinKun, W., XiangMin, L. & WenXiong, L.** (2014). Advances and perspective in research on plant-soil-microbe interactions mediated by root exudates. *Chinese Journal of Plant Ecology*, Vol. 38(3), pp.298-310.
- Lobo, A. P.** (2012). La rizósfera: un “criptoecosistema” vital. Congreso Nacional del Medio Ambiente. San Pablo, España: Universidad CEU San Pablo.
- López-Alcocer, J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D., Rodríguez-Macias, R., López-Alcocer, E. & Olalde-Portuga, V.** (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Rev. Fitotec. Mex*, Vol. 40 (1), pp. 73 - 81.
- López-Bucio, J. & Ruiz-Herrera, L.** (2016). Las aportaciones de *Arabidopsis thaliana* a la biología de las plantas. En avances en las ciencias químico biológicas (pp. 91-104). México D.F.: Editorial Fontamara.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L.** (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 6(3), pp. 280–287.
- Magaña-Dueñas, V. López-Bucio, J. & Beltrán-Peña, E.** (2015). El transporte de auxinas y su impacto sobre el desarrollo vegetal. *Ciencia Nicolaita*, Vol. 64, pp. 22-41.
- Martín, M., Martínez-Granero, F. & Rivilla, R.** (2011). Colonización de la rizósfera por *Pseudomonas*. En Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. (pp.333-344). España: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)
- Mas, J., Lemoine-Rodríguez, R., González, R., López-Sánchez, J., Piña-Garduño, A. & Herrera-Flores, E.** (2017). Evaluación de las tasas de deforestación en Michoacán a escala detallada mediante un método híbrido de clasificación de imágenes SPOT. *Madera y Bosques*, Vol. 23(2), pp. 119-131.

- Masayuki Hayakawa, H. N.** (1989). A New Method for the Intensive Isolation of Actinomycetes from Soil. *Actinomycetologica*, pp. 95-10
- McNear Jr., D. H.** (2013). The Rhizosphere-Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge Vol. 4(3)*
- Megías, M., Molist, P. & Pombal, M.** (2018). Órganos vegetales: Raíz. En Atlas de Histología Vegetal y Animal. España: Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M.** (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 37(5), pp. 634–663.
- Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguezandrade, O. y Elizabeth, Y.** (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Revista de La DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, Vol. 17(2), pp. 24-34.
- Mommer, L., Kirkegaard, J., & van Ruijven, J.** (2016). Root–Root Interactions: Towards A Rhizosphere Framework. *Trends in Plant Science*, Vol. 21(3), pp. 209–217.
- Moreno, A., García, V., Reyes, J., Vásquez, J. & Cano, P.** (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Rev. Colomb. Biotecnol.* , Vol. 10(1), pp. 68-83.
- Murashige, T. & SKOOG, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, Vol. 15, pp. 473-497.
- Oliveros-Bastidas, A., Macías, F., Carrera-Fernández, C., Marín, D. & Molinillo, J.** (2009). Root exudates and their relevance to the allelopathic interactions. Septiembre, 2019, de Química Nova Sitio web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000100035
- Ortiz-Castro, R. & López-Bucio, J.** (2013). Small Molecules Involved in Transkingdom Communication between Plants and Rhizobacteria. En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. New Jersey. pp. 295-307.
- Ortiz-Castro, R.** (2008). Tesis de grado. “Regulación del desarrollo post-embriionario de la raíz de *A. thaliana* por *N*-acil-L-homoserina lactonas, una clase de compuestos

moduladores de la proliferación celular en bacterias” Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H., Macías-Rodríguez, L. & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, Vol. 4(8), pp. 701-712.

Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., & López-Bucio, J. (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling & Behavior*, Vol. 3(4), pp. 263–265.

Peña, L., Rebollar, S., Juárez, N., Hernández, J. & Gómez, G. (2015). Análisis de viabilidad económica para la producción comercial de aguacate hass. *Revista Mexicana de Agronegocios*, Vol. 36, pp. 1325-1338

Pérez, S., Ávila, G. & Coto, O. (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, Vol. 36(2), pp. 111-123.

Petricka, J. J., Winter, C. M., & Benfey, P. N. (2012). Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 63(1), pp. 563–590.

Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2013). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, Vol. 13(1), pp. 63–77.

Quiñones-Aguilar, E., Evangelista-Martínez, Z., Rincón-Enríquez, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*, Vol. 101, pp. 59-64.

Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, Vol. 321(1-2), pp. 341–361.

Ramírez, M. & Rodríguez, A. (2012). Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: a review. *Biotecnología*. Vol. 14(1), pp. 271-284.

Rojas, M. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Rev. Colomb. Biotecnol*, Vol. 13(2), pp.135.143.

Sánchez, L. L. & Corrales, R. L. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, Vol. 3(4), pp. 21-29.

- Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K., & Vanderleyden, J.** (2013). Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*, Vol. 201(3), pp. 850–861.
- SAGARPA**, (2011). Monografía de cultivos: aguacate. Obtenido de: www.sagarpa.gob.mx
- SAGARPA**, (2017). Planeación Agrícola Nacional: Aguacate Mexicano. Obtenido de: www.sagarpa.gob.mx
- Salazar-García, S., Medina-Carrillo, R. & Álvarez-Bravo, A.** (2016). Evaluación inicial de algunos aspectos de calidad del fruto de aguacate 'Hass' producido en tres regiones de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, Vol. 7(2)
- Samaniego-Gómez, B., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O. & Tun-Suárez, J.** (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus spp.* *Rev. Protección Veg.*, Vol. 31(1)
- Saraf, M., Pandya, U. & Thakkar, A.** (2014). Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol Res*, Vol. 169), pp. 18-29.
- Shin-Young, H., Joon-Seo, P., Moon-Sik, Y., Xiang, F. & Chung-Mo, P.** (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology*, Vol. 8(112).
- Shusei-Sato**, (2008). Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, Vol. 15 (4), pp. 227–239.
- SIAP**. (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sitio web: <https://www.gob.mx/siap>
- SIAP**. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sitio web: <https://www.gob.mx/siap>
- Singh, J., Chandra, V. & Singh, D.** (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Vol. 140, pp.339-353

- Steinauer, K., Chatzinotas, A., & Eisenhauer, N.** (2016). Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms?. *Ecology and Evolution*, Vol. 6(20), pp. 7387–7396.
- Tapia, L., Larios, A., Hernández, A. & Guillén, H.** (2014). Nutrición orgánica del aguacate cv. “Hass” y efecto nutrimental y agronómico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol 5(3), pp. 463-472.
- Tolosa, D. y Lizarazo, L.** (2014). Poblaciones microbianas asociadas a la rizósfera y filósfera de plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista de Ciencias*, Vol. 18(2), pp. 27-38.
- Torres-Guerrero, C., Etchevers, J., Fuentes-Ponce, M., Govaerts, B., De León-González, F. & Herrera, J.** (2013). Influencia de las raíces sobre la agregación del suelo. *Terra Latinoamericana*, Vol. 31 (1), pp. 71-84.
- Transati SL.** (2014). BEST LIFE – ENVIRONMENT PROJETS
- Tsegaye, Z. Assefa, F. & Beyene, D.** (2017). Properties and Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Int. J. Curr. Trend. Pharmacobiol. Med. Sci.*, Vol. 2(1), pp.30-43.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. & Prigent-Combaret, C.** (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Vargas-Rojas, G.** (2011). La raíz: anclaje, absorción, almacenamiento y conducción en la planta. En *Botánica General: desde los musgos hasta los árboles* (pp. 201-203). Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M. & Seeger, M.** (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, Vol. 37 (1)
- Verbon, E. H., & Liberman, L. M.** (2016). Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*, Vol. 21(3), pp. 218–229.

Vieira-Velloso, C. (2019) Tesis de grado “Caracterização de cepas de bacillus e avaliação do seu potencial de promoção de crescimento em genótipos de milho” Universidade Federal de São João del-Rei. BRASIL

Walker, T., Pal-Bais, H., Grotewold, E., & Vivanco, J. (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. Septiembre, 2019, de Plant Physiology Sitio web: <http://www.plantphysiol.org/content/132/1/44>

12. ANEXOS

Anexo 1

Características de la pared celular de las actinobacterias (Prescott, 2002).

Tipos de pared celular	Isómero de ácido diamio-pimelico	Glicina en el puente interpeptídico	Azúcares característicos	Grupos representativos
I	L –L	+	NA	<i>Nocardioides</i> <i>Streptomyces</i>
II	Meso	+	NA	<i>Micromonospora</i>
III	Meso	-	NA	<i>Actinomadura</i> <i>Frakia</i>
IV	Meso	-	Arabinosa, galactosa	<i>Saccharomonospora</i> <i>Nocardia</i>

Columna 1: ubicación del aminoácido en la posición 3 de la cadena lateral del tetrapéptido.

Columna 2: presencia de glicina en los puentes interpeptídicos.

Columna 3: tipo de azúcares que tiene el peptidoglicano.

Anexo 2

Clasificación de actinobacterias (Goodfellow & Willams, 1983).

GRUPO	CARACTERÍSTICAS	GÉNERO
Actinobacteria	Aeróbico, facultativamente anaeróbico o anaeróbico; ocurren como bacilos o cocos o forman filamentos ramificados que fragmentan; sin micelio aéreo; composición de pared variable pero incluye quimiotipos I, II, V, VI, VII y VIII.	<i>Actinomyces</i> , <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> . <i>Oerskovia</i> . <i>Promicromonospora</i> . <i>Renibacterium</i> . <i>Rothia</i>
Actinoplanetes	Esporoactinomycetos aeróbicos; las esporas no móviles se	<i>Actinoplanes</i> .

	pueden cerrar dentro de las vesículas; sin micelio aéreo; quimiotipo de pared II; Los hidrolizados de todo el organismo contienen arabinosa y xilosa.	<i>Amorphosporangium</i> . <i>Ampullariella</i> . <i>Dactylosporangium</i> . <i>Micromonospora</i> . <i>Pilimelia</i>
Maduromycetes	Esporoactinomicetos aeróbicos; cadenas simples o cortas de esporas pueden nacer en el micelio aéreo o formarse dentro de las vesículas; esporas móviles o no móviles; quimiotipo de pared III; Los hidrolizados de todo el organismo contienen madurosa (3-O-metil-D-galactosa)	<i>Actinomadura</i> , <i>Microbispora</i> . <i>Microtetraspora</i> . <i>Planobispora</i> . <i>Planomonospora</i> . <i>Spirillospora</i> . <i>Streptosporangium</i> .
Micropolysporas	Esporoactinomicetos aeróbicos; cadenas simples o cortas de esporas pueden estar presentes en el sustrato y el micelio aéreo; quimiotipo de pared IV; No contienen ácidos micólicos.	<i>Actinopolyspora</i> . <i>Micropolyspora</i> . <i>Pseudonocardia</i> , <i>Saccharomonospora</i> . <i>Saccharopolyspora</i> .
Multilocular	Aerobio a facultativamente anaerobio; el micelio se divide en todos los planos; sin hifas aéreas; quimiotipo de pared III	<i>Dermatophilus</i> . <i>Frankia</i> . <i>Geodermatophilus</i> .
Nocardioform	Aeróbico, puede ser ácido-alcohol resistentes; ocurren como bacilos, cocos y filamentos ramificados o forman sustrato y micelio aéreo que fragmenta; quimiotipo de pared IV; Contiene ácidos micólicos.	<i>Caseobacter</i> . <i>Corynebacterium</i> . <i>Mycobacterium</i> . <i>Nocardia</i> . <i>Rhodococcus</i>
Streptomyces	Esporoactinomicetos aeróbicos; formar un sustrato ampliamente ramificado y micelio aéreo; esporas transportadas en el micelio aéreo, ocasionalmente en el micelio sustrato; quimiotipo de pared I	<i>Intrasporangium</i> , <i>Kineosporia</i> , <i>Kitasatoa</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Sporichthya</i> , <i>Streptomyces</i> . <i>Streptoverticillium</i>
Thermomonosporas	Esporoactinomicetos aeróbicos; forman un sustrato ampliamente ramificado y micelio aéreo, los cuales pueden transportar esporas o cadenas de esporas; esporas móviles o no móviles; quimiotipo de pared III.	<i>Actinosynnema</i> . <i>Nocardiosis</i> . <i>Streptoalloteichus</i> . <i>Thermomonospora</i>