



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
Programa Institucional de Doctorado en  
Ciencias Biológicas

**Hongos micorrícicos y endófitos asociados a arándano  
(*Vaccinium corymbosum*) y su efecto en el rendimiento vegetal.**

**T E S I S**

**Que como requisito para obtener el grado de:**

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS EN  
CONSERVACIÓN Y MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

Presenta:

**M. C. SANDRA ESTEFANIA GARCÍA RUEDA**

Director de tesis:

Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno

Co directora de tesis:

Dra. Ma. de los Ángeles Beltrán Nambo

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, FEBRERO DE 2024**



DR. OMAR CHASSIN NORIA  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Hongos micorrícicos y endófitos asociados a arándano (*Vaccinium corymbosum*) y su efecto en el rendimiento vegetal" presentado por la **M. C. Sandra Estefania García Rueda (Núm. de Matrícula 1160072G)** consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctora en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

Atentamente

Morelia, Michoacán, a 30 de enero 2024

COMITÉ SINODAL

  
\_\_\_\_\_

Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno  
(02000270)

Director de Tesis.

  
\_\_\_\_\_

Dra. Mariela Gómez Romero (06003753)

Presidente

  
\_\_\_\_\_

Dra. Ma. De los Ángeles Beltrán Nambo (93001410)

Co directora

  
\_\_\_\_\_

Dr. Juan Carlos Montero Castro (08003157)

Vocal 1

  
\_\_\_\_\_

Dr. Ángel Rebollar Alviter (12010071)

Vocal 2

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORIA DEL DOCTOR HÉCTOR JAVIER ANSELMO VILLEGAS MORENO Y LA COASESORIA DE LA DOCTORA MA. DE LOS ÁNGELES BELTRÁ NAMBO CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA Y LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA A TRAVÉS DEL PROYECTO 5873114/ 2021 Y 2022.

*Dedico este trabajo:*

*A mi madre, Berta, mi ángel, por educarme y dejar en cada parte de mí su esencia, por su sacrificio y entrega para estar para mí siempre. A mi padre, Juan, por inculcar en mí la responsabilidad que ha sido la base para lograr mis objetivos.*

*A mi esposo Francisco por ser siempre un pilar cuando mi mundo parece derrumbarse, por sus desvelos a mi lado y su amor incondicional.*

*La ciencia está hecha de errores, pero de errores  
útiles de cometer, pues poco a poco conducen a la  
verdad.*

*- Julio Verne -*

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial agradezco a la Dra. Yazmín Carreón Abud, quien me permitió conocerle como mi asesora, pero también como persona y amiga, por ser un apoyo para mí dentro y fuera de lo académico, un ángel que estuvo detrás de este trabajo con consejos siempre atinados, con mucho cariño.

Al Dr. Miguel Martínez Trujillo, por sus aportaciones clave en el desarrollo del proyecto y su singular manera de compartir su conocimiento, su paciencia y ejemplo como investigador y persona.

A la Dra. Ángeles Beltrán Nambo, por ser mi guía y una parte muy importante en este proyecto, por sus consejos y su ayuda incondicional, por su tiempo y su enseñanza de vida.

Al Dr. Villegas, por sus observaciones, recomendaciones y disponibilidad para mejorar este trabajo, por aceptarme como su alumna y confiar siempre en mi desempeño.

Al Dr. Montero, por su paciencia, sus atenciones y su interés por perfeccionar este trabajo y a la Dra. Mariela, por su disponibilidad para colaborar y por aportar siempre con amabilidad.

De manera muy especial a los chicos de voluntariado y servicio social con los que descubrí que la transmisión del conocimiento es mi pasión, gracias por su apoyo y sus ganas de aprender conmigo, por su paciencia y su compañía cuando todo parecía complicarse, a Ivette, con quien compartí muchas experiencias que nos llevaron a una amistad más allá de lo académico.

A todos, gracias infinitas.

## ÍNDICE GENERAL

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	10
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	19
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	23
2.1. <i>Vaccinium</i> sp.....	23
2.2. Composición nutricional del fruto del arándano .....	24
2.3. <i>Vaccinium</i> sp. y hongos endófitos .....	25
2.4. <i>Vaccinium</i> sp y hongos formadores de micorriza.....	25
2.5. Micorriza ericoide.....	26
2.6. <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo .....	27
2.6.1. Líneas reporteras de <i>A. thaliana</i> .....	28
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	30
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	36
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>6.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	37
<b>6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	37

<b>7. RESULTADOS</b> .....	38
<b>7.1. CAPITULO I. Aislamiento e identificación de microorganismos asociados a las raíces de Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>)</b> .....	<b>38</b>
Resumen .....	38
Abstract.....	39
I.1. Introducción .....	40
I.2. Metodología .....	41
Obtención de muestras.....	41
Obtención y purificación de microorganismos.....	41
Determinación molecular de aislados.....	42
Alineamiento y relaciones filogenéticas.....	43
Caracterización morfológica y microscópica de los aislados.....	43
Determinación de tasa de crecimiento de los aislados .....	44
I.3. Resultados .....	44
Aislamiento e identificación de microorganismos .....	44
Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los aislados.....	51
Tasa de crecimiento de los microorganismos aislados.....	56
I.4. Discusión.....	57
I.5. Conclusiones .....	59
I.6. Referencias.....	60
<b>7.2. CAPITULO II. Respuesta de <i>A. thaliana</i> (Col 0) a la inoculación con aislados provenientes de arándano (<i>V. corymbosum</i>) sobre su desarrollo vegetal y la estructura de su raíz</b> .....	<b>63</b>
Resumen .....	63
Abstract.....	64
II.1. Introducción .....	65
II.2. Metodología .....	66
Preparación de semillas de <i>A. thaliana</i> ecotipo silvestre (Col 0).....	66
Preparación de medios de cultivo en cajas Petri compartimentadas y no compartimentadas.....	66
Obtención de datos .....	67
II.3. Resultados .....	68
Efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) sobre el desarrollo vegetal de <i>A. thaliana</i> (Col 0).....	68
Efecto de compuestos difusibles y volátiles (caja Petri no compartimentada).....	68
Efecto de compuestos volátiles (caja Petri compartimentada) .....	70
II.4. Discusión.....	71
II.5. Conclusiones .....	73
II.6. Referencias.....	74

<b>7.3. CAPITULO III. Expresión de genes reporteros de actividad hormonal y de defensa implicados en la interacción directa e indirecta de <i>A. thaliana</i> – microorganismos aislados .....</b>	<b>77</b>
Resumen .....	77
Abstract.....	78
III.1. Introducción.....	79
III.2. Metodología.....	80
Propagación de líneas reporteras .....	80
Preparación de semillas de líneas reporteras de <i>A. thaliana</i> .....	81
Preparación de medios de cultivo en cajas Petri compartimentadas y no compartimentadas .....	81
Obtención de datos .....	82
III.3. Resultados.....	83
Expresión del gen reportero <i>DR5::GUS</i> .....	83
Expresión del gen reportero <i>ARR5::GUS</i> .....	84
Expresión del gen reportero <i>PRI::GUS</i> .....	84
Expresión del gen reportero <i>LOX2::GUS</i> .....	85
III.4. Discusión .....	86
III.5. Conclusiones.....	88
III.6. Referencias .....	89
<b>7.4. CAPITULO IV. Efecto de inoculación de los microorganismos aislados sobre el desarrollo vegetal de plantas de Arándano (<i>V. corymbosum</i>) en etapa de vivero.....</b>	<b>91</b>
Resumen .....	91
Abstract.....	92
IV.1. Introducción.....	93
IV.2. Metodología.....	94
Propagación de planta de arándano mediante esqueje.....	94
Pruebas de crecimiento de cepas fúngicas aisladas en sustrato .....	95
Inoculación de microorganismos aislados .....	96
Variables agrícolas .....	97
Variables micorrícicas .....	97
IV.3. Resultados .....	98
Propagación de planta de arándano mediante esqueje.....	98
Pruebas de crecimiento de cepas fúngicas aisladas en sustrato.....	98
Efecto de hongos sobre plantas de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) .....	99
Variables agrícolas .....	99
Variables micorrícicas .....	103
Estructuras fúngicas en las raíces de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) .....	104
IV.4. Discusión .....	107
IV.5. Conclusiones .....	111

IV.6. Referencias .....	113
<b>8. DISCUSION GENERAL .....</b>	<b>119</b>
<b>9. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>125</b>
<b>10. REFERENCIAS GENERALES.....</b>	<b>126</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>136</b>
11.1. Artículo de divulgación .....	136
11.2. Artículo de investigación.....	138

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados fúngicos obtenidos de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> ). Se indica el número de acceso asignado por Genbank así como el porcentaje de similitud. ....	44
Tabla 2. Aislados correspondientes a actinomicetos obtenidos de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> ) se indica el sitio de extracción. ....	51
Tabla 3. Características de crecimiento macroscópico de microorganismos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> ). ....	51

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> ) .....	23
Figura 2. Fruto maduro de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> ) .....	23
Figura 3. Estructuras típicas de la micorriza ericoide. ....	27
Figura 4. Imagen representativa de la planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	28
Figura 5. Imágenes representativas de genes reporteros. ....	29
Figura 6. Mapa del sitio de obtención de muestras de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> ). ....	41
Figura 7. Árbol filogenético de la región rDNA-ITS obtenida de <i>P. fortinii</i> aislado de <i>V. corymbosum</i> . ....	45
Figura 8. Árbol Filogenético de la región rDNA-ITS obtenida de <i>F. oxysporum</i> aislado de <i>V. corymbosum</i> . ....	46
Figura 9. Árbol filogenético de la secuencia de la región rDNA-ITS obtenida de <i>A. alternata</i> aislado de <i>V. corymbosum</i> . ....	47
Figura 10. Árbol filogenético de la región rDNA-ITS obtenida de <i>P. obovatum</i> aislado de <i>V. corymbosum</i> . ....	48
Figura 11. Árbol filogenético de la región rDNA-ITS obtenida de <i>M. alpina</i> aislado de <i>V. corymbosum</i> . ....	49
Figura 12. Árbol filogenético de la región rDNA-ITS obtenida de <i>B. cinerea</i> aislado de <i>V. corymbosum</i> .....	50
Figura 13. Fotografías representativas de la morfología de crecimiento de los microorganismos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ). ....	52
Figura 14. Fotografía representativa de actinomicetos aislados de raíz de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) .....	52
Figura 15. Características microscópicas del hongo <i>Phialocephala fortinii</i> aislado de raíz de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ).. ....	53

Figura 16. Características microscópicas del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> aislado de raíz de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ).....	54
Figura 17. Características microscópicas del hongo <i>Alternaria alternata</i> aislado de raíz de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ).....	54
Figura 18. Características microscópicas del hongo <i>Phialemonium obovatum</i> aislado de raíz de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ).....	55
Figura 19. Características microscópicas del hongo <i>Mortierella alpina</i> aislado de suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ).....	56
Figura 20. características microscópicas del hongo <i>Botrytis cinerea</i> aislado de raíz de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ).....	56
Figura 21. Tasa de crecimiento en días de hongos y actinomicetos aislados de la raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ).....	57
Figura 22. Configuraciones experimentales para evaluar el efecto de seis hongos y dos actinomicetos aislados de la raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) sobre plántulas de <i>A. thaliana</i> ecotipo silvestre (col 0).....	67
Figura 23. Imágenes representativas del efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) sobre el desarrollo vegetal de <i>A. thaliana</i> en cultivo in vitro mediante cajas Petri no compartimentadas.....	69
Figura 24. Variables de desarrollo vegetal de <i>A. thaliana</i> evaluadas por el efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) en cajas Petri no compartimentadas.....	69
Figura 25. Imágenes representativas del efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) sobre el desarrollo vegetal de <i>A. thaliana</i> en cultivo in vitro mediante cajas Petri compartimentadas.....	71
Figura 26. Variables de desarrollo vegetal de <i>A. thaliana</i> evaluadas por el efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) en cajas Petri compartimentadas.....	71
Figura 27. Proceso de propagación de semillas de líneas reporteras de <i>A. thaliana</i> .....	81
Figura 28. Configuraciones experimentales para evaluar el efecto de seis hongos y dos actinomicetos aislados de la raíz y suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) sobre líneas reporteras de <i>A. thaliana</i> .....	82

Figura 29. Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera <i>DR5::GUS</i> .....	83
Figura 30. Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera <i>ARR5::GUS</i> . .....	84
Figura 31. Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera <i>PRI::GUS</i> .....	85
Figura 32. Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera <i>LOX2::GUS</i> . .....	86
Figura 33. Proceso de propagación de plantas de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) por esqueje de tallo. ....	95
Figura 34. Recipientes con sustrato inoculado con dos hongos aislados de rizósfera de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ): <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> , así como dos hongos de referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr en condiciones de invernadero.....	96
Figura 35. Proceso de inoculación de dos hongos aislados de rizósfera de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ): <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> , así como dos hongos de referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr en condiciones de invernadero.. .....	97
Figura 36. Fotografía representativa del desarrollo de las primeras hifas del hongo <i>M. alpina</i> aislado de suelo rizosférico de arándano ( <i>V. corymbosum</i> ) a los 5 días de inoculación. ....	98
Figura 37. Altura de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr) en condiciones de invernadero.. .....	99
Figura 38. Número de tallos secundarios de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr) en condiciones de invernadero.. .....	100
Figura 39. Número de hojas de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr) en condiciones de invernadero.....	100
Figura 40. Inflorescencias de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr) en condiciones de invernadero.....	101

Figura 41. Contenido de clorofila (mg/m <sup>2</sup> ) en plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr) en condiciones de invernadero..	101
Figura 42. Biomasa aérea de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr) en condiciones de invernadero..	102
Figura 43. Biomasa radicular de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> Y HMEr) en condiciones de invernadero. ....	103
Figura 44. Porcentaje de colonización fúngica en plantas de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> , y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr).....	104
Figura 45. Porcentaje de hifas fúngicas presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> , y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr).....	104
Figura 46. Hifas fúngicas (señaladas con flechas) presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera a) <i>P. fortinii</i> y b) <i>M. alpina</i> , y dos hongos utilizados como referencia c) <i>S. vermífera</i> y d) HMEr. ....	105
Figura 47. Porcentaje de enrollamientos intracelulares presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> , y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr)..	106
Figura 48. Enrollamientos intracelulares (señalados con asteriscos) presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera a) <i>P. fortinii</i> y b) <i>M. alpina</i> , y dos hongos utilizados como referencia c) <i>S. vermífera</i> y d) HMEr. ....	106
Figura 49. Porcentaje de estructuras de resistencia presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: <i>P. fortinii</i> y <i>M. alpina</i> , y dos hongos utilizados como referencia ( <i>S. vermífera</i> y HMEr).....	107

## RESUMEN

Los microorganismos presentes en su entorno influyen en el crecimiento de las plantas y pueden ser mutualistas, como los hongos formadores de micorrizas o no mutualistas, como los hongos endófitos. En este trabajo se aislaron especies fúngicas de la raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivado en el estado de Michoacán, México con la finalidad de analizar su potencial como promotores de desarrollo vegetal (PGPF, por sus siglas en inglés). Seis cepas fúngicas fueron identificadas molecularmente mediante las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal, así como tres actinomicetos de manera morfológica. Se evaluó su capacidad de modificar el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col 0) mediante dos configuraciones experimentales (cajas Petri compartimentadas y no compartimentadas), para investigar la influencia de compuestos difusibles y volátiles sobre el fenotipo de la planta.

*Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina* y los tres actinomicetos (morfotipos 23, 24 y 28) promovieron el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, sobre todo en cajas compartimentadas, donde se observó un incremento de la longitud de raíz principal (2 cm) y el número de raíces laterales (34), sugiriendo que los compuestos volátiles son los responsables. Las especies promotoras de desarrollo vegetal seleccionadas y dos hongos utilizados como referencia: *S. vermifera*, un hongo micorrícico orquideoide y un hongo micorrícico ericoide (HMEr), se evaluaron mediante líneas reporteras, *ARR5::GUS* y *DR5::GUS PRI::GUS* y *LOX2::GUS*, para estimar la respuesta de genes a la acumulación de citocininas, auxinas, ácido salicílico y ácido jasmónico respectivamente en los tejidos vegetales. Los resultados indican que *P. fortinii*, *M. alpina*, *S. vermifera* y HMEr, activan diferencialmente los genes reporteros de las líneas evaluadas. Estos hongos se inocularon en plantas adultas de arándano. Los resultados obtenidos a los ocho meses de interacción, mostraron que *S. vermifera* aumentó la mayoría de las variables evaluadas a excepción de la altura en la cual no se observó influencia por ninguno de los hongos estudiados. Por su parte, *M. alpina*, inhibió el número de hojas por planta; mientras que HMEr destacó en el incremento de biomasa radicular. La inoculación con *P. fortinii* no demostró tener efectos significativos sobre las variables agrícolas evaluadas. La concentración de clorofila disminuyó de manera general con respecto a la medición inicial. Se observaron porcentajes de colonización fúngica de 35 – 40 %, siendo el más bajo *M. alpina*, el cual, no formó

ninguna estructura micorrícica particular; mientras que las plantas inoculadas con *P. fortinii*, *S. vermífera* y HMEr, mostraron estructuras similares a los enrollamientos intracelulares formados por micorrizas ericoides típicas. Los efectos de la colonización fueron neutros en el desarrollo de *V. corymbosum* sin embargo, se prevee que tienen potencial para promover el crecimiento vegetal de esta especie representando un recurso biológico con gran potencial para su uso como bioestimulantes en la agricultura actual.

**Palabras clave:** *Berries*, *Phialocephala fortinii*, *Mortierella alpina*, *S. vermífera*, *A. thaliana*, Actinomicetos, Hongos promotores del crecimiento vegetal.

## ABSTRACT

Microorganisms present in their environment influence plant growth and can be mutualistic, such as mycorrhizal-forming fungi, or non-mutualistic, such as endophytic fungi. In this work, fungal species were isolated from the root and rhizosphere soil of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivated in the state of Michoacán, Mexico with the purpose of analyzing their potential as plant development promoters (PGPF, for its acronym in English). Six fungal strains were identified molecularly using the internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA, as well as three actinomycetes morphologically. Its ability to modify the development of *Arabidopsis thaliana* (Col 0) seedlings was evaluated using two experimental configurations (compartmentalized and non-compartmentalized Petri dishes), to investigate the influence of diffusible and volatile compounds on the plant phenotype.

*Phialocephala fortinii* and *Mortierella alpina* and the three actinomycetes (morphotypes 23, 24 and 28) promoted the growth of *Arabidopsis thaliana*, especially in compartmentalized boxes, where an increase in the length of the main root (2 cm) and the number of roots was observed. laterals (34), suggesting that volatile compounds are responsible. The selected plant development promoting species and two fungi used as reference: *S. vermifera*, an orchid mycorrhizal fungus and an ericoid mycorrhizal fungus (HMEr), were evaluated using reporter lines, *ARR5::GUS*, *DR5::GUS*, *PR1::GUS* and *LOX2::GUS*, to estimate the response of genes to the accumulation of cytokinins, auxins, salicylic acid and jasmonic acid respectively in plant tissues. The results indicate that *P. fortinii*, *M. alpina*, *S. vermifera* and HMEr differentially activate the reporter genes of the lines evaluated. These fungi were inoculated into adult blueberry plants. The results obtained after eight months of interaction showed that *S. vermifera* increased most of the variables

evaluated except for height in which no influence was observed by any of the fungi studied. For its part, *M. alpina* inhibited the number of leaves per plant; while HMEr stood out in the increase in root biomass. Inoculation with *P. fortinii* did not demonstrate significant effects on the agricultural variables evaluated. The chlorophyll concentration generally decreased with respect to the initial measurement. Fungal colonization percentages of 35 – 40% were observed, the lowest being *M. alpina*, which did not form any particular mycorrhizal structure; while plants inoculated with *P. fortinii*, *S. vermifera* and HMEr showed structures similar to intracellular coils formed by typical ericoid mycorrhizas. The effects of colonization were neutral in the development of *V. corymbosum*; however, it is anticipated that they have the potential to promote the plant growth of this species, representing a biological resource with great potential for use as biostimulants in current agriculture.

**Key words:** *Berries*, *Phialocephala fortinii*, *Mortierella alpina*, *S. vermifera*, *A. thaliana*, Actinomycetes, Plant growth promoting fungi.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas mantienen una constante interacción con los microorganismos que se desarrollan a su alrededor mediante la cual, logran modular su crecimiento y defensa, asegurando con esto una mejor adaptación al ambiente. Esta relación se lleva a cabo mediante exudados vegetales que pertenecen a diferentes clases químicas dependiendo de su estructura (Yadav et al., 2017, 2018). La liberación de estos compuestos involucra una gran cantidad de genes que, a su vez, regulan la producción de compuestos vegetales como giberelinas, citocininas, brasinnosteroides, ácido abscísico, etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico y estrigolactonas, permitiéndole a la planta responder a las diferentes situaciones a las que se enfrentan durante su crecimiento; por lo tanto, se encuentran directamente relacionadas con el desarrollo, metabolismo y defensa vegetal (Agarwall et al., 2019). De manera interesante, las plantas no son las únicas encargadas de la producción de metabolitos, pues los microorganismos asociados a ellas también tienen esta capacidad, por lo que pueden alterar su fisiología (Piechulla et al., 2017; Wenke et al., 2019). Dichos compuestos, que pueden ser volátiles o difusibles median las interacciones entre plantas y microorganismos (Bouwmeester et al., 2019), permitiendo el establecimiento de relaciones que pueden clasificarse como asociativas, simbióticas, neutrales o patógenas (Haldar et al., 2015).

Muchas de estas interacciones, tienen lugar en la rizósfera y en gran parte son llevadas a cabo mediante hongos, los cuales tienen un rol imprescindible, ya que son considerados uno de los grupos taxonómicos más importantes junto con las bacterias (Devi et al., 2020). Es posible encontrar a los integrantes del reino Fungi asociados en tres diferentes regiones de las plantas: Dentro o en la superficie de sus hojas, tallos y raíces, teniendo un rol imprescindible en la protección ante patógenos o la promoción de desarrollo gracias a la producción de ácidos orgánicos, fitohormonas, compuestos orgánicos volátiles y/o difusibles, entre otros (Ghosh et al., 2018; Frac et al., 2018; Rana et al., 2019). Incluso, pueden modificar la arquitectura de la raíz mediante la producción de raíces laterales o pelos radiculares que, subsecuentemente, incrementan el acceso a nutrientes y agua (Wei et al., 2020).

Algunas especies vegetales se desarrollan en sitios carentes de nutrientes o en condiciones edáficas hostiles, por lo que se ven obligados a interactuar con microorganismos mutualistas, con los que coexisten en comunidades ecológicas complejas (Vandenkoornhuysen et al., 2015). El cultivo del arándano azul (*V. corymbosum*) nativo del noroeste de América (Camp, 1945), representa un potencial de desarrollo económico para México, ya que produce 36 700 toneladas al año de las cuales se exporta el 95.4 % al mercado estadounidense y a algunos países árabes y asiáticos, siendo los estados de Sinaloa, Jalisco y Michoacán los principales productores de esta frutilla (SADER, 2018). Desafortunadamente, para cumplir con la demanda actual, los productores han acudido al manejo intensivo de este cultivo que, como muchos otros, se basa en la utilización de productos químicos, afectando directamente la estructura y función de las comunidades de la rizósfera (Pérez-Jaramillo et al., 2018).

Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de alternativas para mejorar el rendimiento de los cultivos agrícolas, que disminuyan los efectos adversos al recurso suelo. Una opción prometedora es el aprovechamiento de las interacciones benéficas que se llevan a cabo de manera natural entre los hongos y las plantas. El género *Vaccinium*, tiene un amplio rango de interacciones entre sus raíces y hongos, en su mayoría ascomicetos, formando micorrizas del tipo ericoide que mejoran su nutrición mineral (Pearson y Read, 1973). Estos hongos endomicorrícicos incluyen a *Oidiodendron maius* (Wei et al., 2016; Casarrubia et al., 2016; Pescie et al., 2021), *Cadophra* sp., *Lachnum* sp. (Bizabani y Dames, 2015), *Pezicula ericae* (Deyu et al., 2021), entre otras. Además, también destaca su asociación con hongos endófitos septados oscuros como *Phialocephala fortinii* (Daghino et al., 2022), que tienen la capacidad de liberar enzimas que degradan compuestos orgánicos y ácidos que pueden disolver nutrientes insolubles como el fósforo (Spagnoletti et al., 2017). También se han reportado hongos de la división Basidiomycota en asociación con ericáceas, destacando el género *Serendipitina* (Sebacinales, Agaricomycetes), quienes también son habitantes comunes de las raíces de arándanos (Vohník et al., 2016).

Se ha documentado que los hongos tienen afinidad por ciertos géneros de plantas, mientras que otros estudios reportan que la preferencia es determinada por la planta hospedera, que selecciona taxones compatibles (HilleRisLambers et al., 2012), siendo

distintas las especies asociadas a *Vaccinium sp.*, e incluso las respuestas a la inoculación por especies de hongos como *Leohumicola sp.*, *Oidiodendron maius* y *Mielinomyces sp.* son distintas entre variedades (Bizabani et al., 2016). Esta preferencia es un mecanismo clave para que ambas especies coexistan, pues los socios fúngicos ofrecen beneficios diferentes que las plantas pueden aprovechar de acuerdo a sus recursos ambientales (Van Geel et al., 2020), reflejando con esto la especiación ecológica y la coevolución (Polme et al., 2018).

Desafortunadamente, el estudio de los mecanismos específicos involucrados en este tipo de interacciones microbianas en arándano (*V. corymbosum*) es limitado, por lo que es necesario mejorar la comprensión de la función del microbioma de la rizósfera, dando relevancia a la caracterización de las comunidades fúngicas asociadas para conocer su potencial en la agroecología moderna.

Por otra parte, algunas especies vegetales pueden ser utilizadas como organismos modelo de investigación; tal es el caso de *A. thaliana* (Yang et al., 2019), una planta que ha contribuido a dilucidar muchos procesos biológicos, gracias a sus características como planta modelo entre las que se encuentran un ciclo de vida corto, tamaño pequeño y un genoma ampliamente conocido (Provar et al., 2015). Estas características convierten a esta especie vegetal en una herramienta clave para la generación de conocimiento que permita la comprensión de procesos fisiológicos (Woodward y Bartel, 2018), sobre todo aquellos involucrados en las interacciones que se llevan a cabo en la rizósfera de cultivos de interés comercial. El amplio conocimiento del genoma de *A. thaliana*, ha permitido la generación de plantas con marcadores genéticos que permiten analizar la expresión de genes que son clave en diferentes vías de señalización; de esta forma, mediante la fusión de los promotores de los genes nativos fusionados a genes reporteros, es posible explorar las respuestas vegetales de diversos procesos fisiológicos (Méndez-Gómez et al., 2021).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto promotor de crecimiento vegetal de 6 hongos aislados de la raíz y rizósfera de arándano (*V. corymbosum*). Los ensayos *in vitro* se realizaron con plántulas del ecotipo Columbia 0 (Col 0) de *A. thaliana*, en contacto directo y en interacción indirecta mediante caja Petri dividida que evita el contacto físico planta-hongo, con la finalidad de identificar si el efecto es causado por

compuestos volátiles o difusibles. Se realizó una selección de los hongos promotores de desarrollo *P. fortinii*, *M. alpina* y tres actinomicetos (23, 24 y 28) además de dos hongos micorrícicos: *S. vermífera* y HMEr. Posteriormente, se utilizaron plántulas de las líneas reporteras *ARR5::GUS* y *DR5::GUS* de *A. thaliana* para identificar la actividad de citocininas y auxinas, respectivamente, involucradas en las mejorías fenotípicas de las plántulas; además de las líneas reporteras *PRI::GUS* y *LOX2::GUS* relacionadas con la actividad de ácido jasmonico y ácido salicílico, compuestos indicativos de respuestas de defensa vegetal. Por último, los hongos seleccionados se inocularon en plantas de arandano azul (*V. corymbosum*) en condiciones de invernadero, para evaluar sus efectos sobre variables agrícolas y sanidad vegetal.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Vaccinium* sp.

El género *Vaccinium* es un frutal perenne de la familia de las Ericáceas que comprenden 450 especies (Llerena et al., 2014; Hurkova et al., 2019). Las especies cultivadas de *Vaccinium* son originarias del hemisferio Norte (González et al., 2017), mientras que las especies silvestre de *Vaccinium* se encuentran en el neotrópico y distribuidas en los Andes de América del Sur (Coba-Santamaría et al., 2012; Chamorro y Nates, 2015). Se desarrollan entre los 1500 y 4700 m.s.n.m., en temperaturas entre 3 y 17 °C, suelos ácidos con un pH entre 4 y 5 (Camacho, 2013; Cobo et al., 2016; Ormazábal et al., 2020). Son arbustos ramificados que pueden medir hasta 2.5 metros y se caracterizan por tener hojas de nervadura pinnada y flores pequeñas, distribuidas en racimos axilares (Gutiérrez, 2014) (Figura 1). El fruto de esta planta es una baya de 5 a 8 mm de diámetro, con textura lisa y coloración azul (Coba-Santamaría et al., 2012) (Figura 2).



**Figura 1.** Flor de arándano (*Vaccinium corymbosum*).



**Figura 2.** Fruto maduro de arándano (*Vaccinium corymbosum*).

Los frutos tienen 15 a 60 semillas (Chaparro & Ramírez, 1993; Chaparro & Becerra, 1999; Buitrago et al., 2015) y tienen un elevado contenido de azúcares, antioxidantes, minerales y vitaminas (Coba-Santamaría et al., 2012). El mercado de frutos de arándano ha experimentado un incremento en la demanda en los últimos 10 años. Este aumento se debe a que las bayas son consideradas productos naturales y con muchos beneficios para la salud humana (Romero, 2016). A nivel mundial el arándano es la cuarta fruta de importancia económica debido a sus propiedades antioxidantes y su resistencia a condiciones climáticas desfavorables (FAO, 2017; Salgado et al., 2018). El cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) también representa un potencial de desarrollo económico para México, ya que de su producción total anual (66,482 toneladas) se exporta el 96.1 % al mercado estadounidense, siendo los estados de Jalisco, Michoacán y Sinaloa, los principales productores de esta frutilla con un total de 31, 912; 15, 490 y 9, 130 toneladas, respectivamente (SIAP, 2022).

## **2.2. Composición nutricional del fruto del arándano**

El género *Vaccinium* posee frutos que están compuestos principalmente de agua en un 80%, mientras que el 20% restante está compuesto de sólidos como proteínas, carbohidratos y lípidos (Coba-Santamaría et al., 2012; Franco et al., 2016). Las vitaminas presentes en el fruto son: niacina, tiamina, ácido ascórbico y los minerales que posee son el hierro y calcio (Coba-Santamaría et al., 2012; Zhang et al., 2019). El fruto es una gran fuente de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Arteaga & Arteaga, 2016; Coronel et al., 2019). Estos compuestos han sido reportados como preventivos de enfermedades en los seres humanos, principalmente cáncer y diabetes (Aldaba-Márquez et al., 2016; Anticono et al., 2016; Rodríguez-Daza et al., 2020). De acuerdo con varios estudios (Nagulsamy et al., 2015; Franco et al., 2016; Spínola et al., 2018; Kim et al., 2019; Tombozara et al., 2020), el género *Vaccinium* produce frutos con beneficios para la salud humana, lo que ha provocado un incremento en su consumo (Franco et al., 2016; Hernández et al., 2017).

### **2.3. *Vaccinium* sp. y hongos endófitos**

Las plantas del género *Vaccinium* interactúan con diversos microorganismos. Las interacciones con hongos pueden ser beneficiosas o perjudiciales para las plantas, dependiendo del tipo de hongo y la naturaleza de la asociación, permitiendo una gran diversidad de interacciones planta – hongo (Kogel et al., 2006). Algunos hongos patógenos pueden causar enfermedades y afectar negativamente su crecimiento y productividad. Por otra parte, también se llevan a cabo de manera natural algunas asociaciones con hongos endófitos tabicados oscuros (DSE, por sus siglas en inglés) (Mandyam and Jumpponen, 2005) los cuales, se han reportado en diferentes especies de Ericaceae (Hambleton and Currah, 1997) incluidos los arándanos; estos hongos tienen la capacidad de liberar enzimas que degradan los compuestos orgánicos y ácidos que disuelven los fosfatos insolubles (Spagnoletti et al., 2017).

Otros hongos pueden establecer relaciones simbióticas con las raíces de las plantas de *Vaccinium*, formando micorrizas, que son estructuras beneficiosas que ayudan en la absorción de nutrientes del suelo.

### **2.4. *Vaccinium* sp. y hongos formadores de micorriza**

Los arándanos desarrollan un sistema radical poco profundo con pocos pelos radiculares, lo que provoca cierta ineficiencia en la absorción de agua y nutrientes (Valenzuela et al., 2008). Sin embargo, las raíces normalmente están colonizadas por hongos micorrízicos (Waters et al., 2008), cuyas hifas contribuyen positivamente a la función de los pelos radiculares.

La micorriza representa una asociación formada entre las raíces de las plantas y las hifas de algunos hongos; dependiendo del tipo de hongo involucrado en esta asociación y de la integración morfológica hongo-raíz, la asociación se ha clasificado como: a) Micorrizas con manto fúngico y b) Micorrizas sin manto fúngico. En el primer caso, el manto, entra en contacto con las raíces de las plantas, las envuelve y las penetra intercelularmente a través de las células del córtex, a su vez, se han clasificado en: Ectomicorrizas, Micorriza arbutoide y Micorriza monotrofoide. Por su parte, una de las principales características de las las

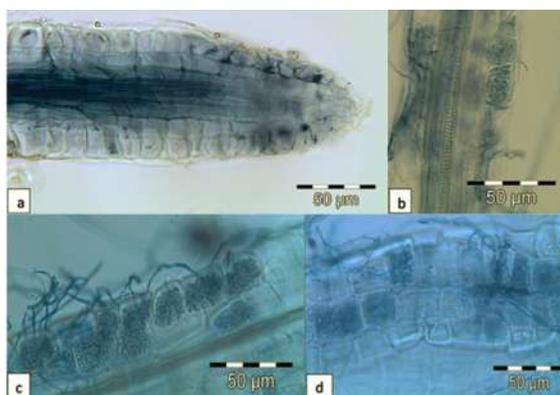
micorrizas sin manto fúngico, es que las hifas penetran la raíz de forma intracelular y éstas se han clasificado en: Micorriza arbuscular, Micorriza ericoide, y Micorriza orquideoide (Brundrett, 2004).

En ambos tipos de micorriza, las hifas se ramifican en el suelo, formando una extensa red capaz de interconectar subterráneamente a las raíces de plantas de la misma o de diferentes especies. Esta red de micelio permite, bajo ciertas condiciones, un libre flujo de nutrimentos hacia las plantas hospederas y entre las raíces de las plantas interconectadas ofreciendo a la planta hospedera y al ecosistema diferentes beneficios en términos de sobrevivencia y funcionamiento (Camargo-Ricalde et al., 2012).

En la naturaleza, cada tipo de micorriza se presenta en un ecosistema y ambiente edáfico particulares y en ocasiones, con familias de plantas específicas (Smith y Read, 1998). Por otro lado, los hongos micorrícicos asociados que, por su tamaño pueden clasificarse en micromicetos o macromicetos, pueden pertenecer a los Phylum Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota.

## **2.5. Micorriza ericoide**

De manera particular, *Vaccinium* se asocia con hongos como *Hymenoscyphus ericae*, *Oidiodendron griseum*, *Oidiodendron cerealis*, *Oidiodendron rhodogenum* (Couture et al., 1983; Sadowsky et al., 2012) entre otros, formando la micorriza ericoide; una micorriza especializada en plantas pertenecientes a la familia Ericaceae, como los arándanos (género *Vaccinium*). Se caracteriza por la presencia de enrollamientos de hifas intracelulares (Read, 1996), (Figura 3), encargadas de conferir beneficios como una mejor adquisición de nutrientes minerales (Pescie et al., 2023), el alivio de estrés por sequía (Mu et al., 2021) o mejorar su adaptación y desarrollo en sitios con condiciones de acidez (Scagel, 2005), entre otros.



**Figura 3.** Estructuras típicas de la micorriza ericoide. Colonización de *Vaccinium*, variedad Brightwell 60 semanas después de la inoculación (a) sin colonización en un control no inoculado. Estructuras de micorrizas ericoides en plantas inoculadas con (b) *Leohumicola* (Chem038), (c) *Oidiodendron maius* (CafRU082b) (d) *Meliniomyces* (ECRU075). Obtenido de Bizabani et al., 2016.

## 2.6. *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

*Arabidopsis thaliana* (L.) es una planta herbácea de la familia Brassicaceae, es de pequeño tamaño y de ciclo anual (Figura 4). Con el apoyo de análisis moleculares, se sabe que existen nueve especies de este género (Al-Shehbaz and O'Kane, 2002). Se ha empleado como organismo modelo y ha sido objeto de estudio en áreas de biología molecular, fisiología y genética de plantas a pesar de no tener un valor agronómico alto. Lo anterior se debe a que *A. thaliana* tiene ventajas valiosas para la investigación científica, entre las que destacan un genoma de tamaño pequeño organizado en cinco cromosomas (125 Mb), así como un ciclo de vida corto que consta de aproximadamente seis semanas desde su germinación, hasta la aparición de semillas maduras; además, esta planta puede trabajarse fácilmente en condiciones de laboratorio. Por último, *A. thaliana*, ha sido ampliamente estudiada permitiendo la generación de un gran número de líneas reporteras y mutantes (Cuesta y Cires 2011).



**Figura 4.** Imagen representativa de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Obtenida de Cuesta y Cires 2011.

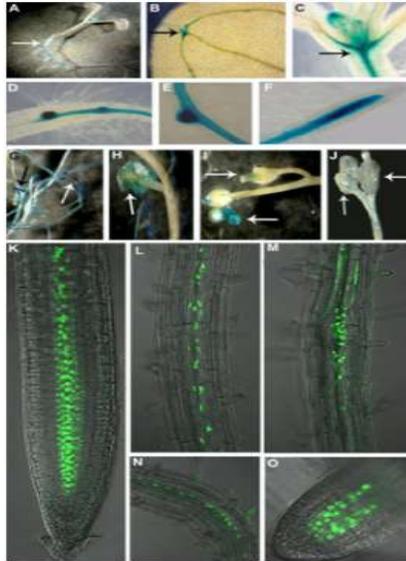
### **2.6.1. Líneas reporteras de *A. thaliana***

El conocimiento y la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *A. thaliana*, ha proporcionado las bases a la comunidad científica para la creación de técnicas y procedimientos para la manipulación de esta especie vegetal. *Arabidopsis* se ha convertido en una referencia para la obtención de colecciones de alteraciones genéticas, que proporcionan un mejor análisis funcional de genes individuales, mediante el estudio del fenotipo de genotipos en los que se han alterado genes específicos.

Un ejemplo de esto es la generación de transformantes que expresan genes informadores incluyendo el uso de  $\beta$  - glucuronidasa (GUS), como gen informador o reportero (Martin et al., 1992); con este sistema, los patrones de expresión temporal y espacial se caracterizan en detalle (Figura 5 A-J). Otro sistema importante es aquel que aprovecha la luciferasa y la proteína fluorescente verde (GFP) para el mismo fin (Millar et al., 1992; Spelig et al., 1996), monitorear la expresión de genes específicos durante los procesos de desarrollo vegetal (Figura 5 K-O).

Estos genotipos generados artificialmente proporcionan una herramienta importante para comprender mejor el control de procesos imprescindibles en las plantas. Lo anterior permite el establecimiento de comunidades de investigación con bastos recursos disponibles

(Meninke et al., 1988), para descubrir el comportamiento vegetal ante condiciones específicas de interacción.



**Figura 5.** Imágenes representativas de genes reporteros. A -J) Gen reportero GUS y K - O) Gen reportero GFP, en plantas transgénicas de *A. thaliana* (A) plántula de siete días, (B) cotiledón de una plántula de 7 días, (C) meristema apical del brote, (D) raíz primaria con primordio de raíz lateral, (E) raíz primaria con raíz lateral rama, (F) punta de la raíz primaria, (G) sistema de raíces con raíces secundarias de una plántula de 20 días de edad, (H) hoja verdadera de una plántula de 20 días de edad, (I) capullos florales, (J) brotes jóvenes flores, (K y L) raíz primaria, (M y N) primordios de raíz lateral y (O) raíz lateral emergente. Obtenida de Vassileva et al., 2015 con modificaciones.

### 3. ANTECEDENTES

El rendimiento y la calidad de cualquier cultivo agrícola, depende de factores como las propiedades del suelo, las prácticas agrícolas, las condiciones climáticas, la lixiviación, mineralización y la asimilación de los nutrientes. Éste último es en gran parte, llevado a cabo mediante una estimulación biológica en la que participa una amplia gama de microorganismos presentes en la rizósfera, los cuales, tienen la capacidad de liberar metabolitos entre los que destacan algunos difusibles y volátiles que logran modificar el entorno en el que se desarrollan, así como emitir señales para otros organismos.

Bruzone y colaboradores en el año 2016, realizaron un estudio para evaluar la abundancia del hongo micorrícico ericoide *Rhizoscyphus ericae* en dos bosques patagónicos argentinos; en sus resultados reportan que un 82.5 % de sus aislamientos pertenecían a Helotiales, dominando los hongos micorrícicos ericoides, seguidos por endófitos septados oscuros. Sus resultados sugieren que la distribución de *R. ericae* está influenciada, entre otros, por factores relacionados como el tipo de suelo y la presencia/ausencia y el tipo de vegetación vecina siendo el primer informe sobre *R. ericae* que coloniza las raíces de Ericaceae en el hemisferio sur.

Yang y colaboradores en el 2018, estudiaron la diversidad de hongos micorrícicos ericoides en *Vaccinium uliginosum*, a lo largo de un área de distribución silvestre en China. Obtuvieron un total de 280 aislamientos a partir de piezas de raíz, los cuales coincidieron con 16 géneros fúngicos, usando como base de comparación la secuencia del espaciador transcrito interno, así como sus caracteres morfológicos. Destacan en este trabajo algunos géneros como *Rhizoscyphus* y *Meliniomyces*, *Clavaria*, *Oidiodendron*, *Lachnum*, *Acephala* y *Phialocephala*. Por su parte, los autores reportan que los aislamientos de *Cryptosporiopsis ericae*, *Oidiodendron maius*, *Lachnum* sp., *Sordariomycetes* sp. y *Pleosporales* sp. formaron espirales de hifas ericoides. Además, los autores proponen la coexistencia entre hongos micorrícicos ericoides y endófitos septados oscuros, mediante un modelo putativo sugiriendo que, bajo cierto estrés ambiental, como bajas temperaturas y poca disponibilidad de nutrientes, las plantas ericoides pueden favorecer la co-colonización tanto por endófitos septados oscuros como por hongos formadores de micorriza ericoide.

Allen et al. (2003), compararon el ADN de cultivos fúngicos de 15 raíces de *Gaultheria shalon*, de la isla de Vancouver, Canadá. Filogenéticamente, entre los resultados destacó la

presencia de *Sebacina* spp. (Sebacinaceae, Basidiomycota), *Capronia* sp. y *Hymenoscyphus ericae* (Ascomycota); estos hongos formaron enrollamientos de hifas intracelulares en experimentos posteriores con *Gaultheria shalon* dirigiendo la atención a su función como hongos formadores de micorriza ericoide.

Baba y colaboradores en el 2016, evaluaron la colonización y la diversidad de hongos asociados a las raíces de *Vaccinium oldhamii*, con el objetivo de obtener información sobre sus propiedades micorrícicas. Los autores observaron con frecuencia hongos micorrícicos ericoides y endófitos septados oscuros siendo dominantes los ascomicetos en particular los hongos helotiales; a su vez, *Rhizoscyphus ericae* y *Oidiodendron maius* fueron los hongos detectados con mayor frecuencia.

*Phialocephala fortinii* es un hongo endófito, común de la raíz con una amplia distribución geográfica y poca o ninguna especificidad de huésped. Se sabe poco sobre su especificidad de hábitat, pero hay evidencia de que los niveles freáticos altos pueden restringir su presencia en los humedales. Addy y colaboradores en el 2000, probaron dicha hipótesis determinando la distribución de *P. fortinii* a lo largo de dunas de arena y humedales. Obtuvieron aislamientos de *P. fortinii*, identificados sobre la base de características culturales y morfológicas de las raíces de plantas vasculares, a través del gradiente de humedad. Los autores reconocieron tres grupos distintos entre los aislamientos, sin embargo, *P. fortinii*, no mostró especificidad de hábitat y se presentó tanto en sitios xéricos como hídricos.

En el año 2016, Wei y colaboradores, aislaron una nueva cepa de hongo micorrícico de pelos radiculares de *Rhododendron fortunei*, cultivado en la Provincia de Zhejiang, China. Los autores establecieron los métodos de cultivo de la cepa que denominaron Om19 perteneciente a *Oidiodendron maius* y evaluaron también su capacidad para formar micorrizas en *R. fortunei*. Sus observaciones microscópicas, permitieron detectar hifas hialinas en la superficie de los pelos radiculares y enrollamientos dentro de las celular corticales indicando una colonización exitosa. Otro de sus experimentos se basó en comparar el peso fresco y seco de *R. fortunei*, dos meses después de la inoculación con Om19, en sus resultados reportan datos mayores en plantas inoculadas que en plantas sin inocular, además, el nitrógeno total absorbido por las plantas inoculadas, también fue mayor en comparación con los controles. De acuerdo a sus resultados, los autores concluyen que la cepa Om19

representa una herramienta microbiana importante para mejorar la producción de plantas de *Rhododendron fortunei*.

Algunos autores confirman que los hongos micorrícicos ericoides, mejoran el crecimiento de las plantas que pertenecen a la familia Ericaceae, sin embargo, se sabe también que los resultados de estas asociaciones están influenciados por factores como el estado nutricional del suelo, las condiciones climáticas, la variedad de huésped y el hongo asociado.

Bizabani y colaboradores en el 2016, en Sudáfrica, realizaron un estudio en el que determinaron la formación de estructuras fúngicas simbióticas en las raíces de las variedades de arándanos Misty (*Vaccinium corymbosum*) y Brightwell (*Vaccinium ashei*), después de la inoculación con las especies fúngicas *Leohumicola*, *Oidiodendron maius* y *Meliniomyces*, además, evaluaron los efectos de la inoculación sobre el crecimiento. Observaron que todos los hongos probados formaron estructuras micorrícicas, características de la colonización ericoide en las raíces de ambas variedades, sin embargo, el porcentaje de colonización fue bajo obteniendo un 20.4% en Misty inoculado con *Oidiodendron maius*. En ambas variedades inoculadas con *Leohumicola* o *Meliniomyces*, no mejoraron el crecimiento y la biomasa de los brotes. Todas las especies de hongos mejoraron la biomasa de raíces en Misty, pero no en Brightwell. Los resultados indican que las respuestas a la inoculación con los hongos trabajados, varían entre las variedades de arándanos.

El crecimiento y desarrollo de las plantas, puede verse influenciado por microorganismos mutualistas y no mutualistas. Casarrubia y colaboradores en el 2016, investigaron la capacidad del hongo endomicorrícico ericoide *Oidiodendron maius*, para influir en el crecimiento y desarrollo de la planta no huésped *Arabidopsis thaliana*, utilizando diferentes configuraciones experimentales (placas compartimentadas y no compartimentadas), para investigar la influencia de las moléculas fúngicas solubles y volátiles en el fenotipo de la planta. *O. maius*, promovió el crecimiento de *A. thaliana* en todas las configuraciones experimentales, lo cual se observó con un fenotipo peculiar de raíces agrupadas, caracterizado por el acortamiento de la raíz primaria y por un aumento en la longitud y el número de raíces laterales, solo en las placas no compartimentadas, lo que sugiere que las moléculas solubles y difusibles son las responsables. La auxina fúngica no parece estar involucrada en la promoción del crecimiento de las plantas y en el fenotipo de raíces agrupadas, porque el cocultivo con *O. maius*, no cambió la acumulación de auxina en los

tejidos de las plantas, según lo evaluado en plantas que portaban la construcción reportera *DR5::GUS*.

El estudio de hongos endófitos, ha incrementado en las últimas décadas ya que es necesario entender su interacción con sus huéspedes, los tipos de relaciones que establecen y sus efectos potenciales. Los hongos endófitos septados oscuros, se han aislado de plantas sanas y se han observado que forman estructuras melanizadas en las raíces, incluidas hifas intracelulares y microesclerocios. Las características mencionadas, provocan una baja especificidad de huésped y a la vez, cubre un amplio rango geográfico. Muchas investigaciones han revelado los beneficios de las interacciones entre hongos endófitos septados oscuros y sus huéspedes, dentro de los cuales destacan un mejor crecimiento vegetal, mayor absorción de nutrientes, así como mayor resistencia al estrés biótico y abiótico. Otro beneficio reportado, es la capacidad de los hongos endófitos septados oscuros de mitigar los efectos negativos de las enfermedades de los cultivos, destacándolos como posibles agentes de biocontrol de enfermedades de plantas; debido a esto, algunos trabajos como el de Santos y colaboradores en el 2021, analizaron los hallazgos de un número cada vez mayor de estudios sobre estos hongos y sus interacciones, para evaluar su uso como herramienta en el manejo integrado de enfermedades de cultivos agrícolas.

Perotto y colaboradores en el 2022, recabaron datos de secuenciación del genoma microbiano de *Vaccinium myrtillus*. La base de su trabajo fue que si bien, los hongos micorrícicos ericoides, se asocian típicamente con las raíces de plantas ericáceas, nunca se ha investigado si también colonizan otros órganos de sus huéspedes naturales. Los autores aplicaron un enfoque de código de barras para describir la comunidad fúngica asociada con los diferentes órganos de *V. myrtillus*. En sus resultados reportan, que los taxones de Helotiales y Sebaciales, que se sabe que incluyen algunos hongos formadores de micorriza ericoide, caracterizan la endosfera de la raíz, junto con Agaricales y Lecanoromycetes, mientras que los tallos estaban enriquecidos con Agaricomycetes, Tremellomycetes y Pleosporales; las hojas estaban enriquecidas en Sordariomycetes, Hysteriales y las flores estaban enriquecidas con Dothideomycetes. Unidades taxonómicas operativas atribuidas a hongos endófitos septados oscuros y hongos formadores de micorriza ericoide, conocidos o putativos como *Pezoloma ericae*, *Meliniomyces* spp. y *Phialocephala fortinii*, se encontraron en todos los órganos de la planta. *Oidiodendron* sp.. rara vez se detectó en órganos distintos

de las raíces en muestras de campo. Este primer informe de hongos formadores de micorriza ericoide que colonizan los tejidos superficiales de la planta huésped, refleja su cercanía evolutiva con los endófitos y aumenta la lista de hongos que ocupan varios nichos.

Algunos hongos endófitos tienen la capacidad de degradar celulosa y promover con esto el desarrollo de las plantas como roles funcionales dobles. Surono y Narisawa en el 2021, investigaron la actividad de la celulasa y la capacidad del hongo endófito septado oscuro *Phialocephala fortinii*, para promover el desarrollo de plantas no micorrícicas. *Phialocephala fortinii* III.Pi.I8, CKG.II.10.1 y CKG.I.11 aumentaron el crecimiento de *Brassica oleracea* en 7.63, 92.5 y 47.7% y *Spinacia oleracea* en 58.5, 283 y 303%, respectivamente, en comparación con la planta control. Un alto porcentaje de colonización de *P. fortinii*, ocurrió tanto en *B. oleracea* como en *S. oleracea*. Este estudio demostró que, aunque *P. fortinii* tiene actividad de celulasa, no causó síntomas de enfermedad en plantas no micorrizas, por lo que potencialmente puede ser multifuncional como descomponedor de celulosa y promotor del crecimiento vegetal.

Los mismos autores (Surono y Narisawa) en el año 2018, seleccionaron cinco de ocho aislamientos fúngicos endófitos tabicados oscuros y evaluaron su capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en plantas de *Asparagus officinalis*. Demostraron que las plantas inoculadas lograron sobrevivir y crecer saludablemente sin ningún síntoma típico de enfermedad. El aislado de *Phialocephala fortinii* CKG.I.11 promovió de manera más efectiva el crecimiento de *A. officinalis*, después del desafío de la enfermedad de *Fusarium* con fuentes inorgánicas u orgánicas.

También se han dilucidado los efectos de *Phialocephala fortinii* en los mecanismos de tolerancia de Aluminio (Al) de *Miscanthus sinensis*. Haruma y colaboradores en el 2021, determinaron que en presencia de *P. fortinii*, *M. sinensis* produjo ácidos clorogénico, cítrico y málico, que podrían actuar para aliviar la toxicidad del Al en el suelo ácido provocado por restos de minas. Antes de la inoculación, los niveles de estos compuestos se redujeron, aunque se incrementó el crecimiento de las plántulas y la concentración de Mg en las raíces. La producción de AIA por parte del hongo, puede contribuir a mejorar el crecimiento de las plantas, mientras que un aumento en la absorción de Mg, podría reducir la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno bajo estrés por Al. Los autores refieren que estas acciones de

*P. fortinii* podrían promover el crecimiento y la supervivencia de *M. sinensis* en sitios contaminados por actividades mineras.

En un estudio realizado por Deyu y colaboradores en el 2021, se examinó el papel de los hongos micorrícicos ericoides (ERM, por sus siglas en inglés), para conferir resistencia a la sequía a las plántulas de arándanos de hoja aterciopelada de tierras altas y bajas. Las plántulas se inocularon con cuatro hongos ERM (*Pezicula ericae*, *Pezoloma ericae*, *Meliniomyces variabilis* y *Oidiodendron maius*) aislados de raíces de plantas ericáceas. Las plantas inoculadas y no inoculadas se sometieron posteriormente a tres ciclos de estrés por sequía retirando el riego. Las plantas de tierras bajas parecían beneficiarse relativamente más de la colonización de micorrizas, en comparación con las plantas de tierras altas. Después de tres semanas de tratamientos, los pesos secos de las plantas de tierras altas bien regadas no inoculadas, fueron más altos en comparación con las plantas de tierras bajas no inoculadas. Sin embargo, estas diferencias fueron compensadas por la inoculación de plantas con hongos ERM, algunos de los cuales también mejoraron significativamente las características de resistencia a la sequía de las plantas de tierras altas y bajas. No hubo diferencias importantes en los efectos de diferentes especies de hongos ERM, en las respuestas a la sequía de las plantas de tierras altas y bajas. De los hongos micorrícicos ericoides examinados, la inoculación con *Pezicula ericae* fue la más eficaz para conferir características de resistencia a la sequía a plántulas de tierras altas y bajas y ayudó a mantener mayores potenciales hídricos de los brotes, fotosíntesis neta y tasas de transpiración en plantas sometidas a estrés por sequía.

*Comarostaphylis arbutoides* (Ericaceae) forma micorrizas arbutoides con *Leccinum monticola*. Sin embargo, hasta ahora no se han descrito otros morfotipos. *C. arbutoides* comparte hongos ectomicorrícicos con especies de *Quercus*, siendo así un refugio para estos hongos tras la tala forestal de los robles. Huhdorf y colaboradores en el 2014, recolectaron micorrizas arbutoides de *C. arbutoides* del Cerro de la Muerte (Cordillera de Talamanca) en Costa Rica, donde crece junto con *Quercus costaricensis*. Los autores identificaron a *Sebacina* sp. después de secuenciar las regiones del ADNr del espaciador transcrito interno (ITS) y la subunidad grande (LSU) junto con sus análisis filogenéticos. Es así como algunos hongos como *Sebacina*, forman asociaciones de diferentes tipos; ectomicorrizas, arbutoides, ericoides y orquideoides con diversas especies de plantas.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El crecimiento de ericáceas como el arándano, se lleva a cabo con una estrecha interacción con microorganismos. La mayoría de los estudios se han basado en el estado de los hongos micorrícicos; su ecología, incidencia o características de colonización, pero se conoce muy poco sobre la identidad de géneros y especies o del rol que desempeñan cuando se alojan en sus raíces, por lo que es importante explorar dichas asociaciones en cultivos de interés económico como el arándano azul en el estado de Michoacán, México, debido a que son escasos los estudios al respecto. Para llevar a cabo este tipo de investigaciones, es necesario identificar a los organismos asociados y evaluar su función hormonal y de defensa vegetal, generando un especial enfoque en las estructuras que logran formar dentro de las raíces de esta frutilla, para identificar si estas interacciones favorecen su desarrollo vegetal. El resultado de estos estudios permitirá proponer métodos de manejo de estos microorganismos, así como establecer las herramientas básicas para su uso como promotores de crecimiento vegetal, representando una alternativa como bioestimulantes que mitiguen el uso indiscriminado de productos químicos en la agricultura actual, dirigiendo con esto la atención hacia un manejo más sustentable del arándano azul en el estado de Michoacán.

#### **5. HIPÓTESIS**

Los hongos micorrícicos y endófitos aislados de la rizósfera de arándano (*Vaccinium corymbosum*), promueven su desarrollo y sanidad vegetal, a través de mecanismos identificables en una planta modelo como *Arabidopsis thaliana*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de hongos micorrícicos y endófitos aislados de la rizósfera de arándano (*Vaccinium corybosum*), sobre el desarrollo y sanidad vegetal, así como elucidar los mecanismos involucrados, a través de una planta modelo (*Arabidopsis thaliana*).

### 6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Aislar y caracterizar morfológica y molecularmente a los hongos micorrícicos y endófitos aislados de la rizósfera de arándano (*Vaccinium corybosum*).
- 2.- Evaluar la respuesta de *A. thaliana* ecotipo silvestre (Col 0), a la inoculación con los aislados fúngicos provenientes de arándano (*Vaccinium corybosum*), sobre su desarrollo vegetal y la estructura de su raíz.
- 3.- Identificar los mecanismos fisiológicos implicados en la respuesta de *A. thaliana* a compuestos extracelulares fúngicos, mediante el uso de las líneas reporteras *ARR5::GUS*, *DR5::GUS*, *PRI::GUS* y *LOX2::GUS*.
- 4.- Determinar el efecto de inóculos fúngicos, sobre el desarrollo vegetal de plantas de Arándano (*Vaccinium corybosum*) en etapa de vivero.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. CAPITULO I. Aislamiento e identificación de microorganismos asociados a las raíces de Arándano (*Vaccinium corymbosum*)

#### Resumen

Los hongos asociados a las raíces de las plantas juegan un papel imprescindible para diferentes procesos involucrados en el desarrollo vegetal, desde su establecimiento, hasta la resistencia a estrés del tipo biótico y abiótico o el rendimiento vegetal. Los hongos presentes en el entorno de las plantas, pueden clasificarse como mutualistas; como los hongos formadores de micorrizas, o no mutualistas; como los hongos endófitos. En nuestro país es limitado el conocimiento acerca de la identidad de hongos que interactúan con especies del género *Vaccinium* y con esto también es desconocida su función sobre el crecimiento vegetal. El objetivo de este trabajo fue aislar, purificar, caracterizar e identificar molecularmente microorganismos, en especial aquellos pertenecientes al Reino Fungi asociados a las raíces y suelo rizosférico de plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum*) variedad Biloxi cultivado en el estado de Michoacán, México. Cinco cepas fúngicas fueron aisladas de raíz y una de suelo rizosférico, las cuales fueron identificadas molecularmente mediante las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de GenBank y tomando en consideración una similitud del 99-100% se identificaron como: *Phialocephala fortinii*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phialemonium obovatum*, *Botrytis cinérea* y *Mortierella alpina*. Las secuencias fueron registradas con número de acceso a GenBank. Además, también se aislaron tres cepas de actinomicetos identificados morfológicamente como MF23, MF24 y MF28.

**Palabras clave:** Micorriza ericoide, Hongos endófitos, Actinomicetos, Rizósfera, *Vaccinium corymbosum*.

## **Abstract**

Fungi associated with plant roots play an essential role in different processes involved in plant development, from their establishment to resistance to biotic and abiotic stress or plant performance. Fungi present in the plant environment can be classified as mutualistic; such as mycorrhizal, or non-mutualistic, fungi; such as endophytic fungi. In our country, knowledge about the identity of fungi that interact with species of the *Vaccinium* genus is limited and, with this, their function on plant growth is also unknown. The objective of this work was to isolate, purify, characterize and molecularly identify microorganisms, especially those belonging to the Fungi Kingdom associated with the roots and rhizospheric soil of blueberry plants (*Vaccinium corymbosum*) Biloxi variety cultivated in the state of Michoacán, Mexico. Five fungal strains were isolated from roots and one from rhizospheric soil, which were molecularly identified through the internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA. The sequences obtained were compared with the GenBank database and taking into consideration a similarity of 99-100% they were identified as: *Phialocephala fortinii*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phialemonium obovatum*, *Botrytis cinerea* and *Mortierella alpina*. The sequences were registered with GenBank accession number. In addition, three actinomycete strains identified morphologically as MF23, MF24 and MF28 were also isolated.

**Key words:** Ericoid mycorrhiza, Endophytic fungi, Actinomycetes, Rhizosphere, *Vaccinium corymbosum*.

## I.1. Introducción

En las plantas habitan millones de microorganismos parásitos, comensales y mutualistas, que coexisten en comunidades ecológicas complejas (Vandenkoornhuysen et al., 2015). Estas interacciones afectan el desarrollo, la salud, la productividad y la capacidad de las plantas para resistir al estrés abiótico y biótico. De manera específica, las plantas y el microbioma asociado a su raíz han evolucionado para utilizar su asociación en beneficio mutuo. La planta hospedera proporciona a los microorganismos de la rizósfera, un nicho rico en carbono (Bulgarelli et al., 2012, 2015; Badri et al., 2013). Por su parte, los habitantes de la rizósfera suministran a las plantas macro y micronutrientes, estimulan el desarrollo de órganos, suprimen patógenos y modulan los niveles de fitohormonas de estrés (Bulgarelli et al., 2015).

La composición y función del rizobioma, están influenciadas por factores como las propiedades del suelo y por la presencia y composición de los rizodepositos (Peiffer et al., 2013, Canarini et al., 2019). Los exudados de las raíces contienen una mezcla compleja de metabolitos de alto (lisados, mucílagos, proteínas) y bajo peso molecular (carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y grasos, fenoles, esteroides) que suministran a los microorganismos carbono, nitrógeno y energía para sus necesidades de crecimiento.

La capacidad de los microorganismos de la rizosfera para influir en la respuesta de las plantas a las enfermedades y al estrés hídrico, la salinización y la contaminación del suelo ha impulsado estudios detallados del microbioma en numerosas especies de cultivos (Raaijmakers et al., 2009; Edwards et al., 2015; Mahoney et al., 2017; Pfeiffer et al., 2017). Para el caso del arándano, se han empleado enfoques tradicionales basados en cultivos y se centran principalmente en la asociación de *Vaccinium* spp. con micorrizas ericoides.

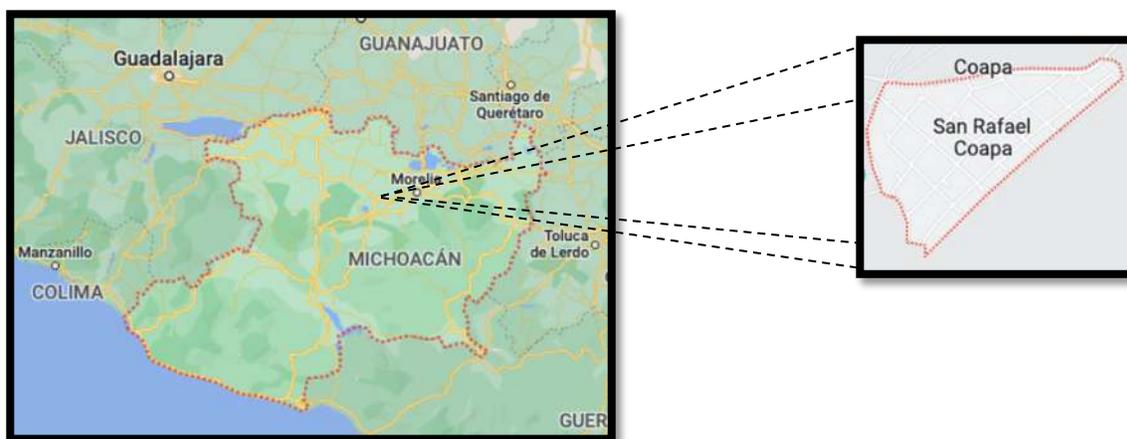
Algunos estudios integrales de microbiomas se centran en el estudio del efecto de las prácticas culturales en la estructura de las comunidades microbianas de la rizosfera de arándanos silvestres (Yurgel et al., 2017, 2018). Es por esto que, a pesar de tener una larga historia de uso comercial extensivo de esta frutilla, se sabe muy poco sobre la composición y función del rizobioma del arándano. De manera especial, en nuestro país es muy limitado el conocimiento sobre los hongos que interactúan con las raíces de los arándanos, así como su posible función como promotores de crecimiento. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue aislar, caracterizar e identificar molecularmente a los hongos asociados a las raíces y

suelo rizosférico de plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum*) variedad Biloxi, cultivado de manera convencional en el estado de Michoacán, México.

## I.2. Metodología

### Obtención de muestras

Se seleccionó un cultivo en producción de arándano, ubicado en San Rafael Coapa, Michoacán (Figura 6). Mediante un muestreo aleatorio se seleccionaron cinco plantas aparentemente sanas y vigorosas, de las cuales se obtuvieron muestras de raíces y suelo rizosférico, que se mantuvieron en frío hasta su procesamiento en el Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



**Figura 6.** Mapa del sitio de obtención de muestras de raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*).

### Obtención y purificación de microorganismos

De cada muestra de rizósfera, se realizaron cinco diluciones con agua destilada estéril. En la dilución  $1 \times 10^{-5}$  se observaron las hifas con un microscopio estereoscópico (marca Labomed, modelo Luxeo 4D, Fremont, CA, EE. UU.) y se tomó cada una para sembrarse en cajas Petri con medio de cultivo Agar Dextrosa Papa (PDA, por sus siglas en inglés, Bioxon). Las raíces se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en una dilución de cloro al 10%, seguido de una solución antibiótica de eritromicina al 2% y gentamicina al 1%

con enjuagues de agua destilada estéril (Ortega-Larrocea, 2008); se cortaron en segmentos transversales de 1 cm y se sembraron en medio de cultivo elaborado con 20 g de extracto malta (Sigma Aldrich), 1 g de peptona de caseína (BD, Bioxon), 20 g de agar nutritivo (BD, Bioxon) y 20 g de sacarosa comercial, obteniendo un total de tres réplicas por raíz que se mantuvieron en incubación a 25 °C durante 30 días. Posteriormente, se sembraron en agar agua 2% durante 24–36 h y se observó su crecimiento al microscopio en cámara de flujo laminar para seleccionar una hifa solitaria y transferirla a PDA obteniendo cultivos axénicos por punta de hifa (French y Teddy, 1980).

### **Determinación molecular de aislados**

Los aislados fúngicos se sembraron en papa dextrosa Broth (PDB), por sus siglas en inglés, (Sigma – Aldrich) y se mantuvieron en agitación a 50 rpm a 25 °C durante 15-30 días en un agitador en seco (marca Thermo Scientific, modelo MaxQ 4450, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Las hifas desarrolladas se transfirieron a membranas de diálisis (0.2 µm) montadas en una bomba de extracción al vacío para obtener el micelio fúngico, siguiendo el protocolo de Beltrán-Nambo *et al.* (2018) y utilizando aproximadamente 3 cm<sup>3</sup> de micelio de cada aislado. Para la extracción de ADN de los aislados correspondientes a actinomicetos se utilizaron muestras mediante raspado de aproximadamente 3 cm<sup>3</sup> de cada aislado. Ambos tipos de muestra se molieron en frío en un tubo de 2 ml y se siguió el protocolo establecido por Sambrook y Russel (2001), con modificaciones en el buffer de extracción (LiCl 0.4 M y SDS 1%, EDTA 25 mM, TrisHCl 200 mM). La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en un termociclador (marca Eppendorf, modelo AG 22331, Hamburgo, Alemania), utilizando en el caso de los hongos, los cebadores universales ITS 1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') (Gardes y Bruns, 1993) e ITS 4 (3' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-5') (White *et al.*, 1990) y para los actinomicetos la región 16S del rRNA mediante los cebadores 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1429R, (3' - GGTTACCTTGTTACGACTT-5') (Parada *et al.*, 2017), siguiendo en ambos casos el protocolo sugerido por Swarts *et al.* (2010), pero utilizando una ADN polimerasa de la compañía Invitrogen (Platinum Green Hot Start PCR 2x Master Mix). Los productos se

corrieron en gel de agarosa 1% y se observaron bajo luz UV en un transiluminador (marca High performance, modelo UVP 95-0429-02, Madrid, España). La secuenciación en ambas direcciones (5'-3' y 3'-5') se llevó a cabo por Macrogen (Seul, Korea).

### **Alineamiento y relaciones filogenéticas**

Las secuencias de los aislados fúngicos se editaron con el software Sequencher version 4.1.4 y la identificación de secuencias similares se llevó a cabo con la herramienta BLAST (por sus siglas en inglés) de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), considerando 99-100 % de similitud.

Por otra parte, se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas de los aislados de este estudio, con secuencias similares de la base de datos del National Center of Biotechnology (NCBI, por sus siglas en inglés), mediante la herramienta MUSCLE así como análisis filogenéticos para la construcción de árboles representativos de las relaciones genéticas de las especies fúngicas aisladas. Estos procedimientos se realizaron a través del método Neighbour-joining y con apoyo Bootstrap (n=1000 repeticiones), mediante el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA, por sus siglas en inglés) versión 11.0.13.

### **Caracterización morfológica y microscópica de los aislados**

Se determinó el color de la superficie de los cultivos a los 15 días, con las cartas de color para suelo Munsell (2000) y se analizaron otras características macroscópicas como: presencia de micelio aéreo, textura, margen, patrón de crecimiento, presencia de exudados y cambio de coloración en el medio. Con las características obtenidas, se elaboró una tabla de acuerdo a estados de carácter para su uso en el análisis de agrupación en morfotipos.

Para la caracterización microscópica se hicieron montajes en portaobjetos, tinción con azul de tripano y se hicieron mediciones de las estructuras características de cada microorganismo y formación de estructuras reproductoras, mediante un microscopio (marca Leica, modelo DM1000) y se obtuvieron fotografías representativas con una cámara integrada (marca Leica, modelo DFC295).

## Determinación de tasa de crecimiento de los aislados

Con la finalidad de conocer la duración de desarrollo de los microorganismos, se determinó la tasa de crecimiento mediante la técnica de Currah et al. (1987), la cual consiste en realizar mediciones del radio de crecimiento microbiano diarias en la parte inferior de las cajas Petri con medio de cultivo PDA. Este procedimiento se representa con los valores promedio de tres réplicas por microorganismo. Además, los datos de tasa de crecimiento serán útiles para dar ventaja de crecimiento correspondiente en los experimentos de interacción *A. thaliana* – microorganismo.

### I.3. Resultados

#### Aislamiento e identificación de microorganismos

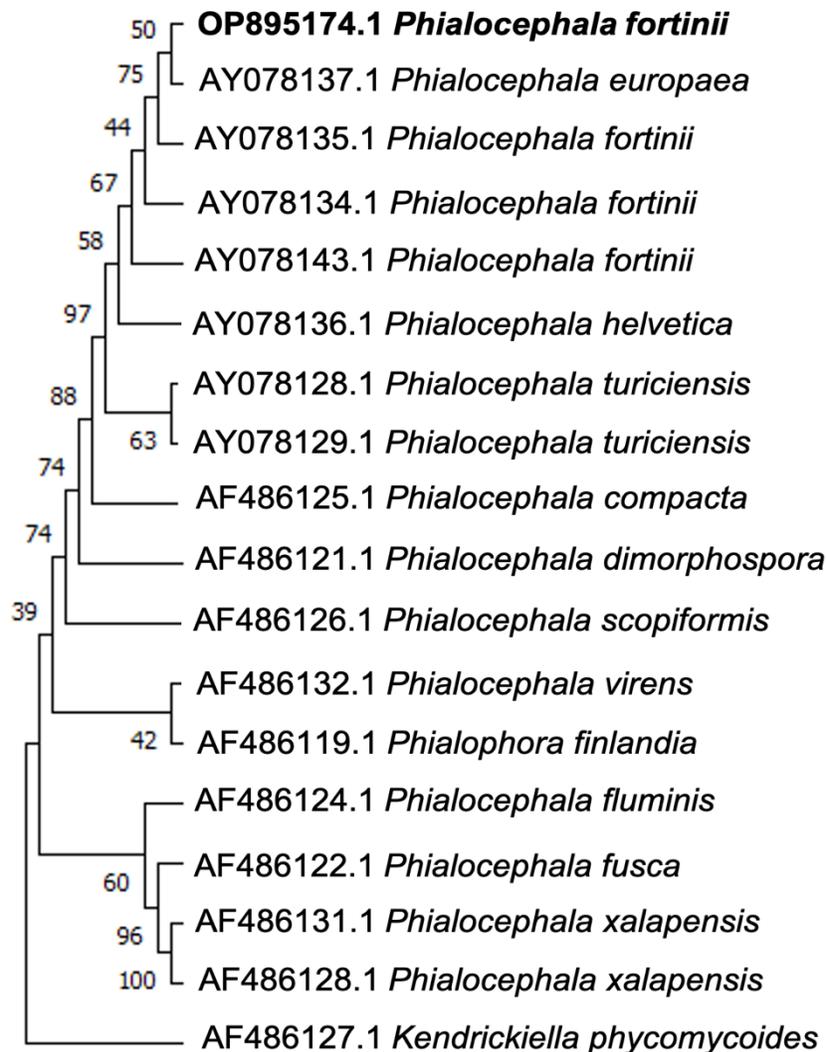
Se obtuvieron seis cepas fúngicas (cinco de raíz y uno de suelo rizosférico), de las cuales *Phialocephala fortinii*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phialemonium obovatum* y *Botrytis cinerea* pertenecen al Phylum Ascomycota, mientras que *Mortierella alpina* a la división Mucoromycota. Por su parte, *F. oxysporum*, *A. alternata* y *B. cinerea*, son patógenos de plantas (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013); *P. obovatum* y *M. alpina* son hongos saprófitos y *P. fortinii* es un hongo endófito septado oscuro, con alto potencial como formador de micorriza tipo ericoide. Los hongos identificados se registraron y el número de acceso se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Aislados fúngicos obtenidos de raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*). Se indica el número de acceso asignado por GenBank así como el porcentaje de similitud.

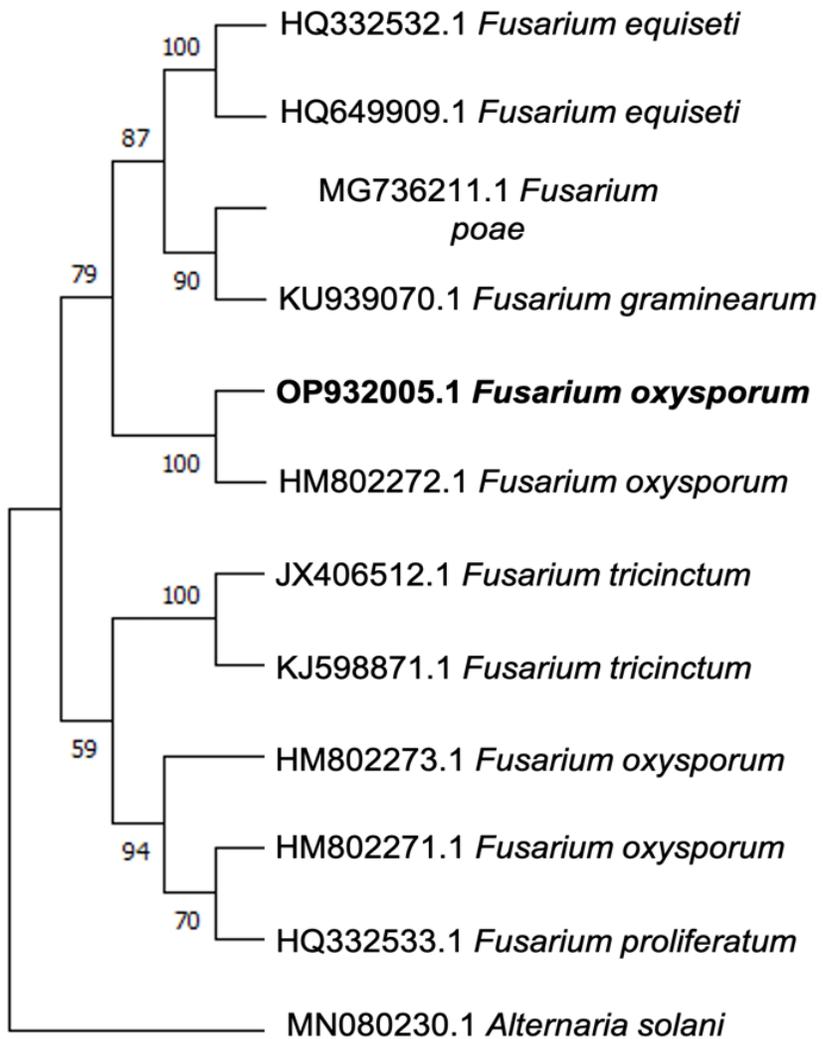
Especies fúngicas	Extracción	Número de acceso GenBank	% Similitud
<i>Phialocephala fortinii</i>	Raíz	OP895174	99.76
<i>Fusarium oxysporum</i>	Raíz	OP932005	100.00
<i>Alternaria alternata</i>	Raíz	OP932006	100.00
<i>Phialemonium obovatum</i>	Raíz	OP932009	99.79

<i>Mortierella alpina</i>	Rizósfera	OP912989	99.89
<i>Botrytis cinerea</i>	Raíz	OP932012	99.80

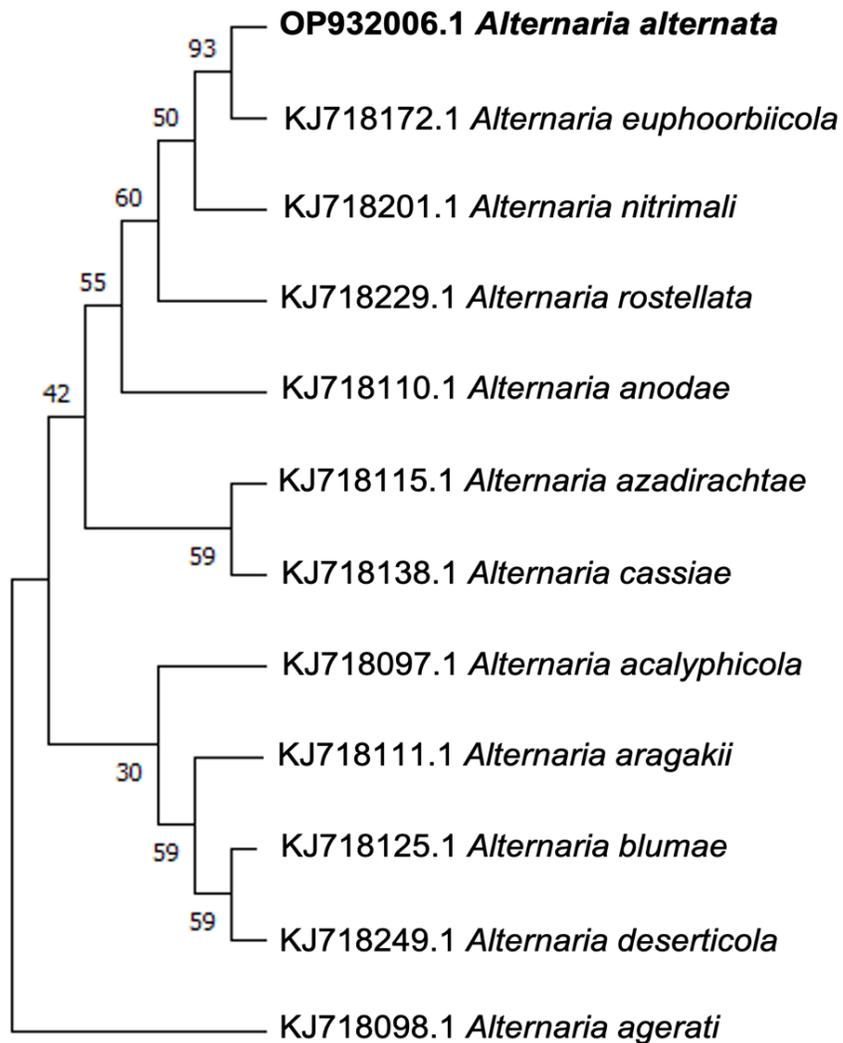
Los árboles filogenéticos de cada especie fúngica aislada de raíz y rizósfera de arándano se muestran a continuación (Figuras 7-12).



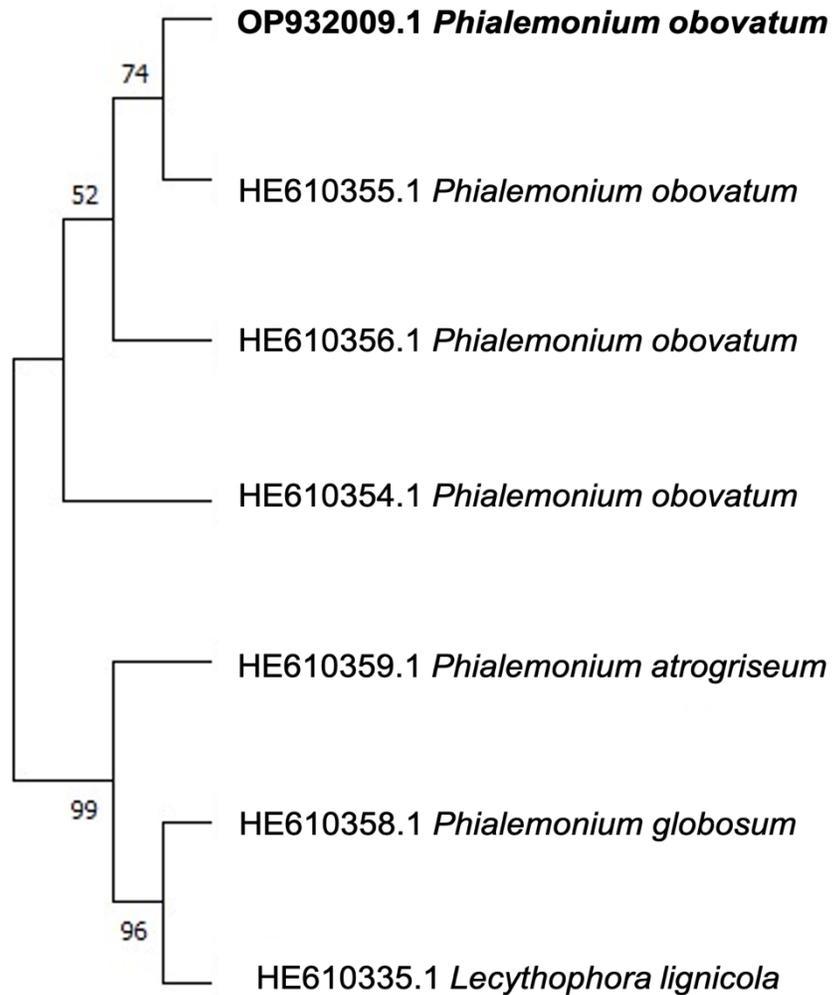
**Figura 7.** Árbol filogenético construido con base en el método Neighbour-joining de la secuencia de la región rDNA-ITS obtenida de *P. fortinii*, aislado de *V. corymbosum* en comparación con secuencias de referencia obtenidas del NCBI. Valores Bootstrap (n=1000 repeticiones).



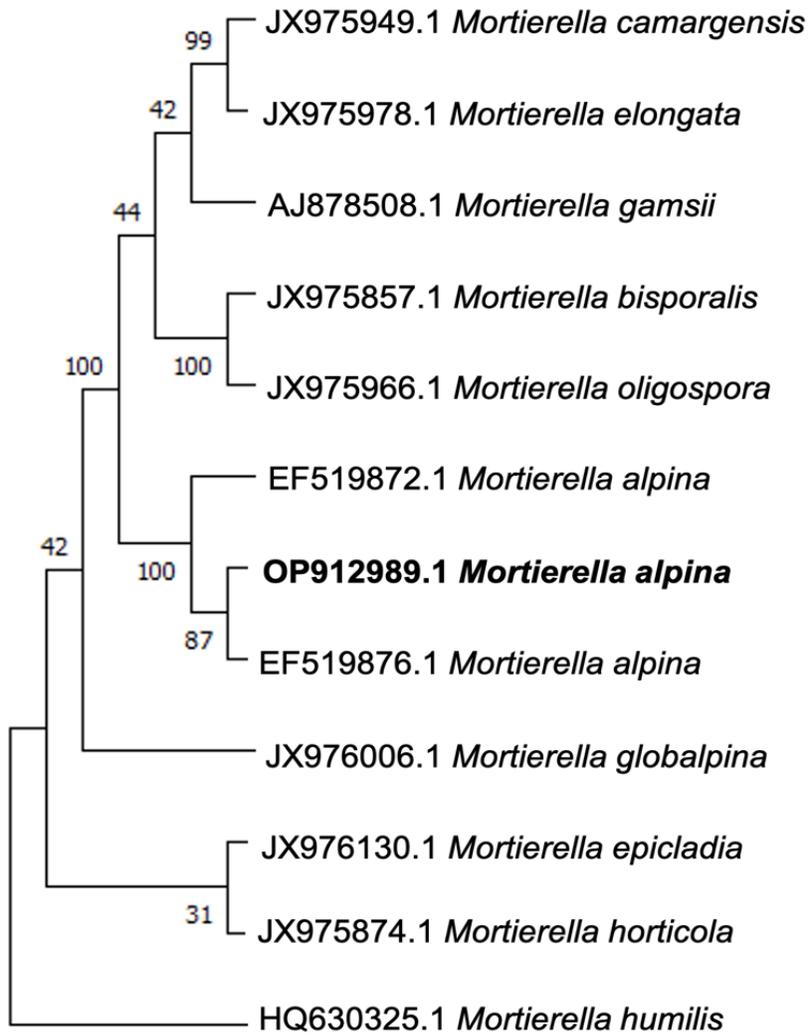
**Figura 8.** Árbol filogenético construido con base en el método Neighbour-joining de la secuencia de la región rDNA-ITS obtenida de *F. oxysporum*, aislado de *V. corymbosum* en comparación con secuencias de referencia obtenidas del NCBI. Valores Bootstrap (n=1000 repeticiones).



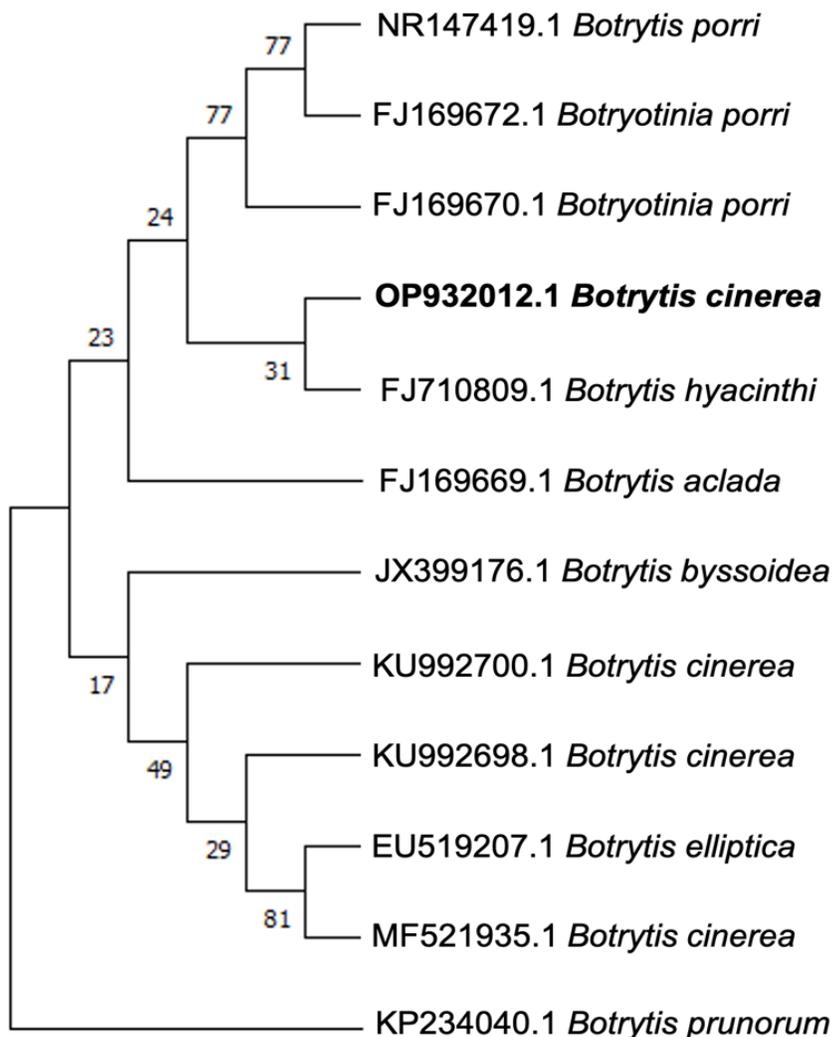
**Figura 9.** Árbol filogenético construido con base en el método Neighbour-joining de la secuencia de la región rDNA-ITS obtenida de *A. alternata*, aislado de *V. corymbosum* en comparación con secuencias de referencia obtenidas del NCBI. Valores Bootstrap (n=1000 repeticiones).



**Figura 10.** Árbol filogenético construido con base en el método Neighbour-joining de la secuencia de la región rDNA-ITS obtenida de *P. obovatum*, aislado de *V. corymbosum* en comparación con secuencias de referencia obtenidas del NCBI. Valores Bootstrap (n=1000 repeticiones).



**Figura 11.** Árbol filogenético construido con base en el método Neighbour-joining de la secuencia de la región rDNA-ITS obtenida de *M. alpina*, aislado de *V. corymbosum* en comparación con secuencias de referencia obtenidas del NCBI. Valores Bootstrap (n=1000 repeticiones).



**Figura 12.** Árbol filogenético construido con base en el método Neighbour-joining de la secuencia de la región rDNA-ITS obtenida de *B. cinerea*, aislado de *V. corymbosum* en comparación con secuencias de referencia obtenidas del NCBI. Valores Bootstrap (n=1000 repeticiones).

Además, se aislaron también tres microorganismos con características similares a los hongos, pero presentaron dificultad en la identificación de estructuras típicas de integrantes del Reino Fungi por lo que, usando la literatura como base, se analizaron microscópicamente y se agruparon en morfotipos distintos los cuales se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Aislados correspondientes a actinomicetos obtenidos de raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*), se indica el sitio de extracción.

<b>Actinomicetos aislados</b>	<b>Sitio de extracción</b>
<i>Morfotipo 23</i>	Raíz
<i>Morfotipo 24</i>	Raíz
<i>Morfotipo 28</i>	Raíz

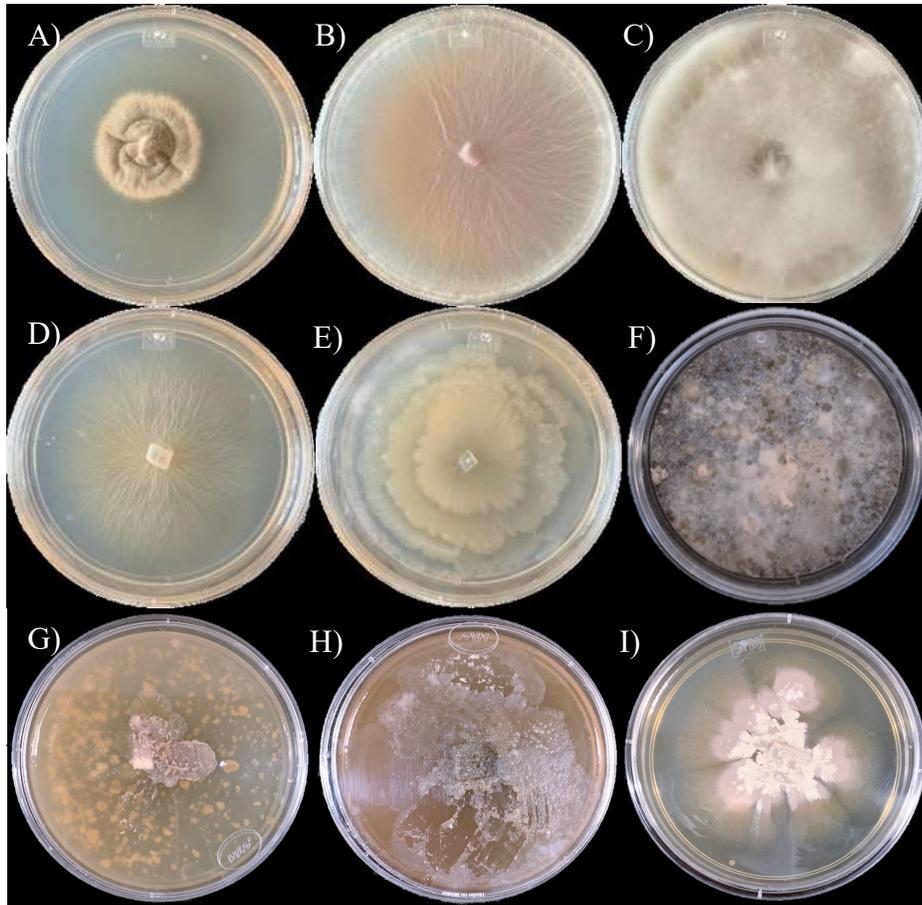
### **Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los aislados**

Las características de crecimiento de los aislados se concentraron y se muestran en la Tabla 3. Se tomaron fotografías representativas del crecimiento de acuerdo a la tasa de crecimiento respectiva de los hongos (Figura 13) y de los actinomicetos (Figura 14).

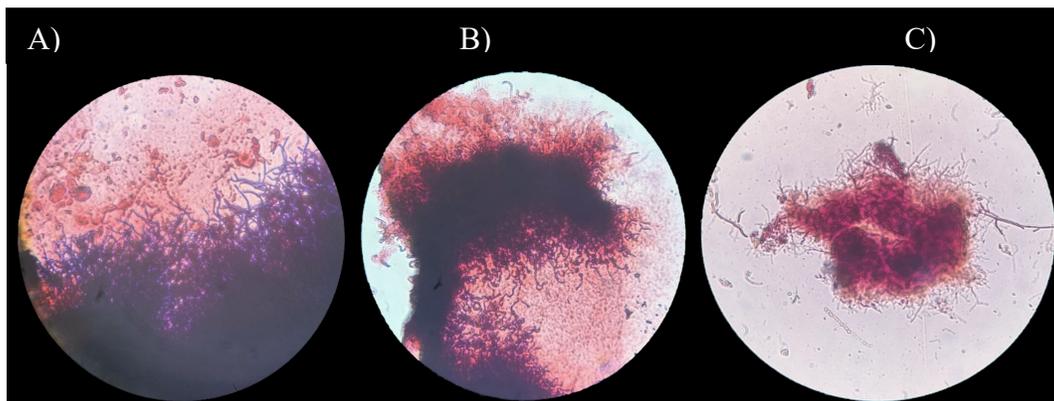
La observación de las estructuras microscópicas de los aislados se observa en las Figuras 15-20.

**Tabla 3.** Características de crecimiento macroscópico de microorganismos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*).

<b>Identidad</b>	<b>Color</b>	<b>Patrón de crecimiento</b>	<b>Márgen</b>	<b>Textura</b>	<b>Micelio aéreo</b>	<b>Exudados</b>
<i>Phialocephala fortinii</i>	Gley 1 6/5g	Radiado	Limitado	Aterciopelado	No	No
<i>Fusarium oxysporum</i>	10 R 5/3	Listones	Engrosado	Algodonoso	Ligero	No
<i>Alternaria alternata</i>	10YR 5/2	Zonificado	No delimitado	Algodonoso	Ligero	No
<i>Phialemonium obovatum</i>	2.5Y 8/1	Aracnoide	No delimitado	Cre moso	No	No
<i>Mortierella alpina</i>	5Y 8/2	Florido	Irregular	Cre moso	Ligero	No
<i>Botrytis cinerea</i>	Blanco	Zonificado	No delimitado	Algodonoso	No	No
<i>Actinomiceto 23</i>	5YR 6/4	Florido	Irregular	Crustáceo	No	No
<i>Actinomiceto 24</i>	5YR 8/2	Florido	Irregular	Crustáceo	No	No
<i>Actinomiceto 28</i>	7.5YR 7/1	Circular	Irregular	Arenoso	No	No



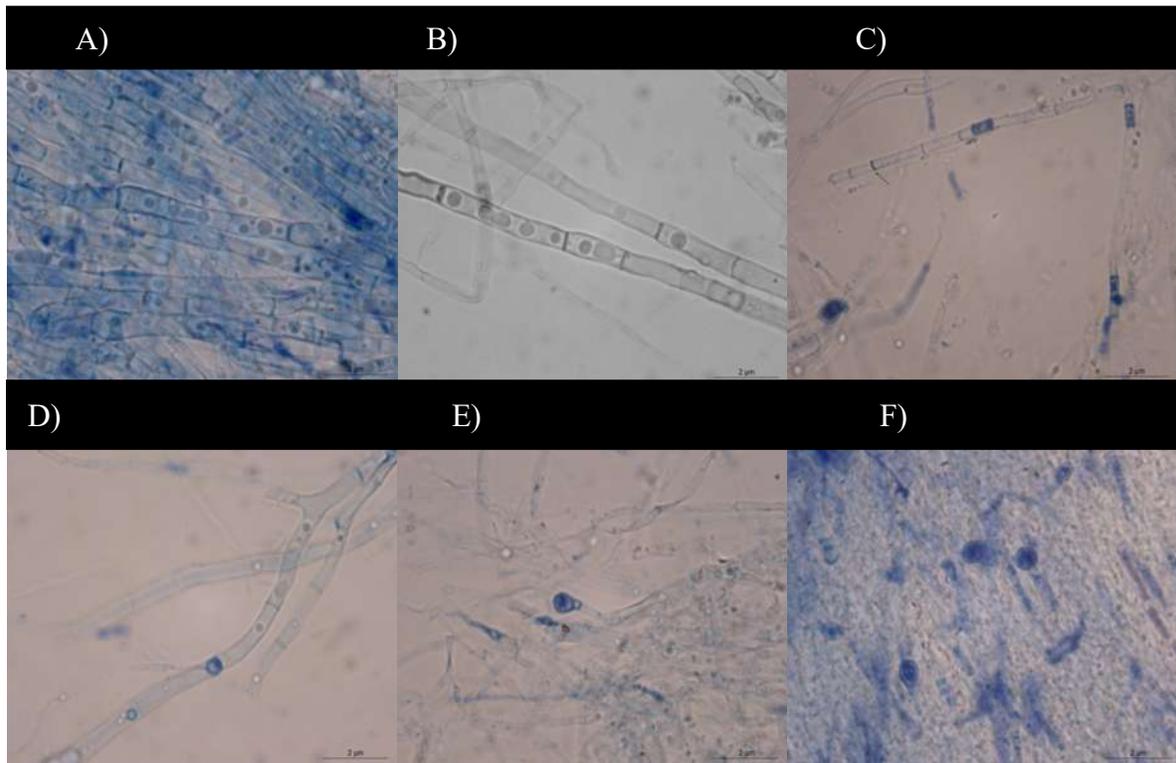
**Figura 13.** Fotografías representativas de la morfología de crecimiento de los microorganismos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) *Phialocephala fortinii*, B) *Fusarium oxysporum*, C) *Alternaria alternata*, D) *Phialemonium obovatum*, E) *Mortierella alpina*, F) *Botrytis cinerea*, G) Actinomiceto 23, H) Actinomiceto 24, I) Actinomiceto 28.



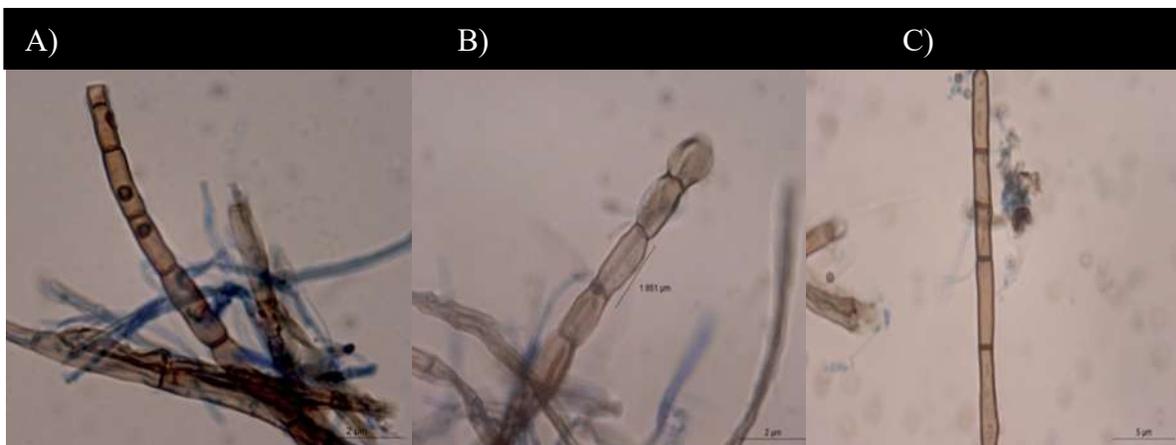
**Figura 14.** Fotografía representativa de actinomicetos aislados de raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum*) después de ser sometido a Tinción Gram donde se observa la presencia de filamentos ramificados con coloración indicativa de organismos Gram positivo. A) Actinomiceto 23, B) Actinomiceto 24 y C) Actinomiceto 28.



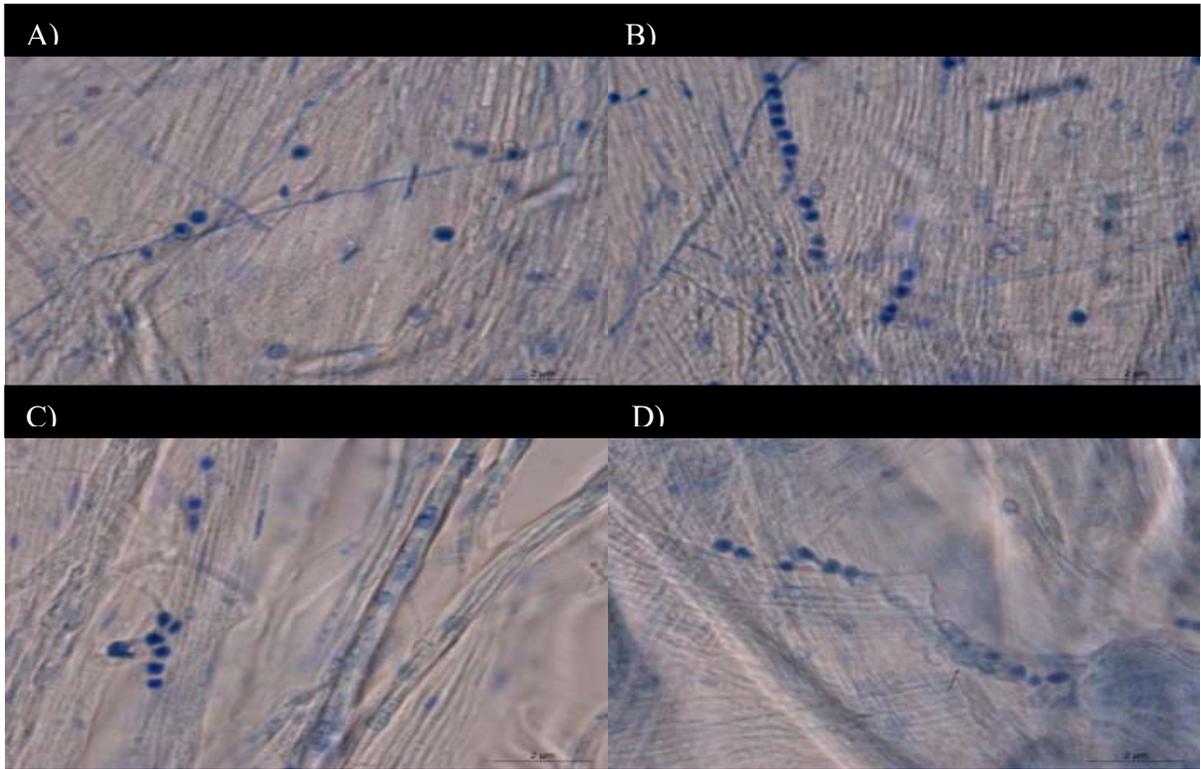
**Figura 15.** Características microscópicas del hongo *Phialocephala fortinii* aislado de raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) Hifas bifurcadas, B) Hifa solitaria con proyecciones verrugosas, C) Emergencia de nueva hifa (flecha), D) Cadena de conidios subglobosos en formación, E) Conjunto de hifas septadas y proyección circular (flecha).



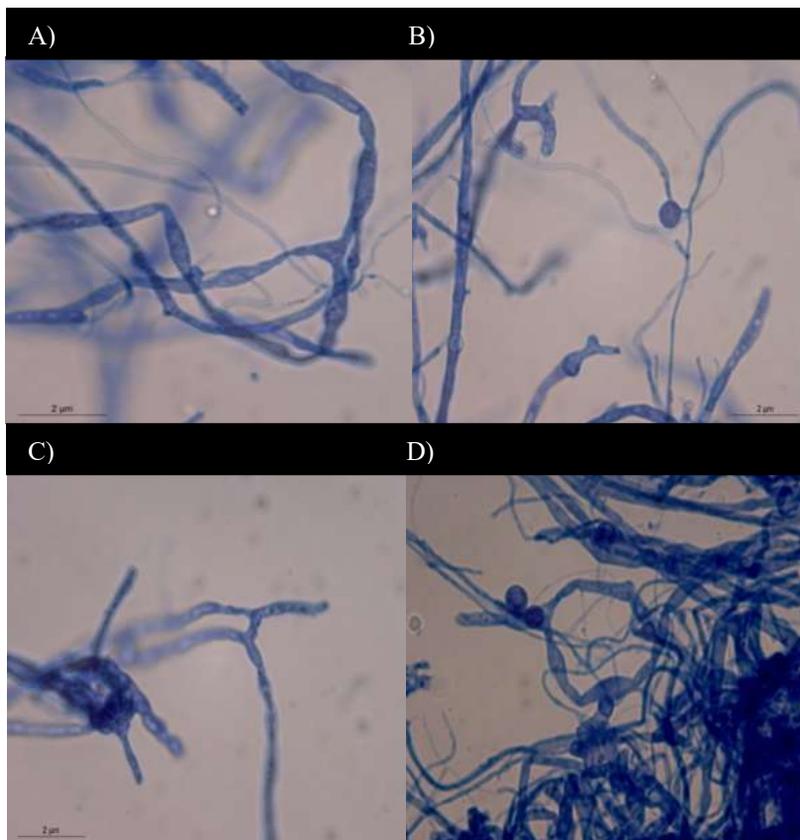
**Figura 16.** Características microscópicas del hongo *Fusarium oxysporum* aislado de raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) Conjunto de hifas, B) Hifas septadas y nucleadas, C) Septos en hifa (flecha), D) Hifa bifurcada, E) Clamidospora solitaria en la punta de una hifa, F) Clamidosporas producidas en conjunto.



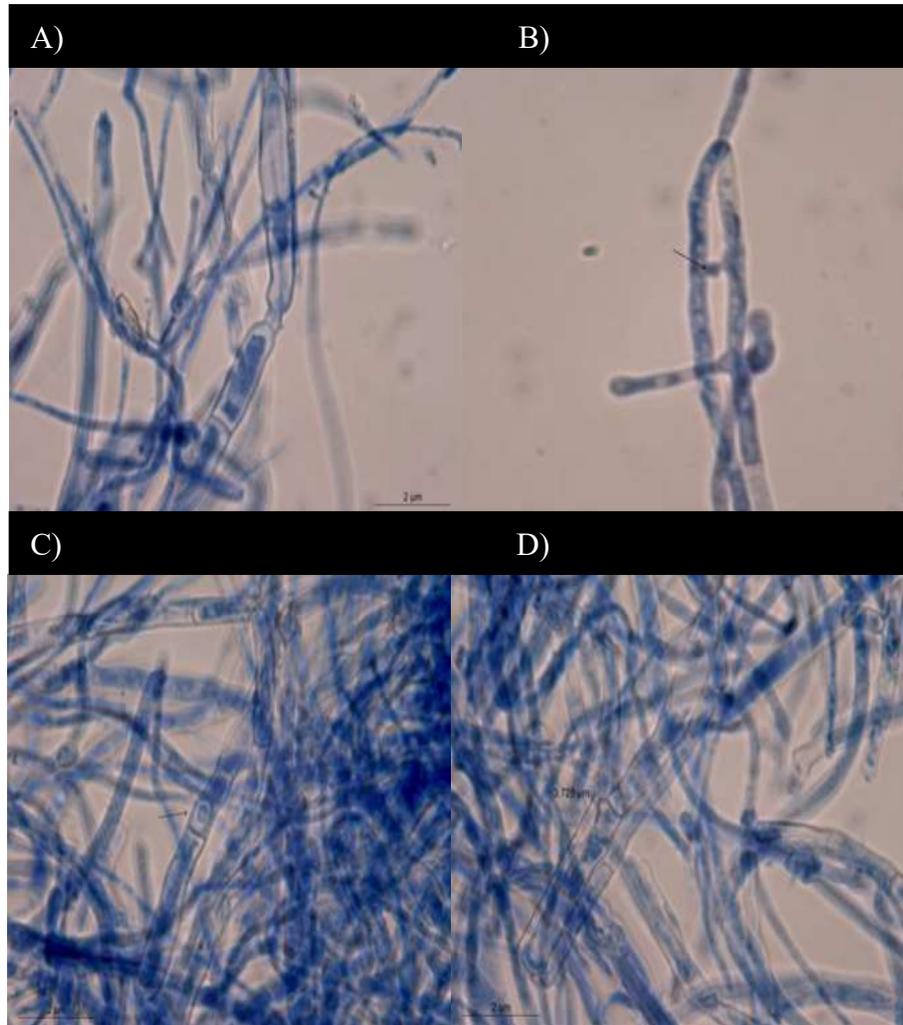
**Figura 17.** Características microscópicas del hongo *Alternaria alternata* aislado de raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) Hifa nucleada, B) Hifa con conidio joven de 1.851  $\mu\text{m}$  de longitud, C) Hifa septada.



**Figura 18.** Características microscópicas del hongo *Phialemonium obovatum* aislado de raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) Hifa con dos conidios, B) Hifa con grupo de siete conidios, C) Hifa cenocítica con núcleos y D) Conidióforo en forma de racimo (flecha).



**Figura 19.** Características microscópicas del hongo *Mortierella alpina* aislado de suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) Hifa bifurcada, B) Clamidospora intercalar, C) Hifas en anastomosis y E) Esporangióforos unidos a una hifa.

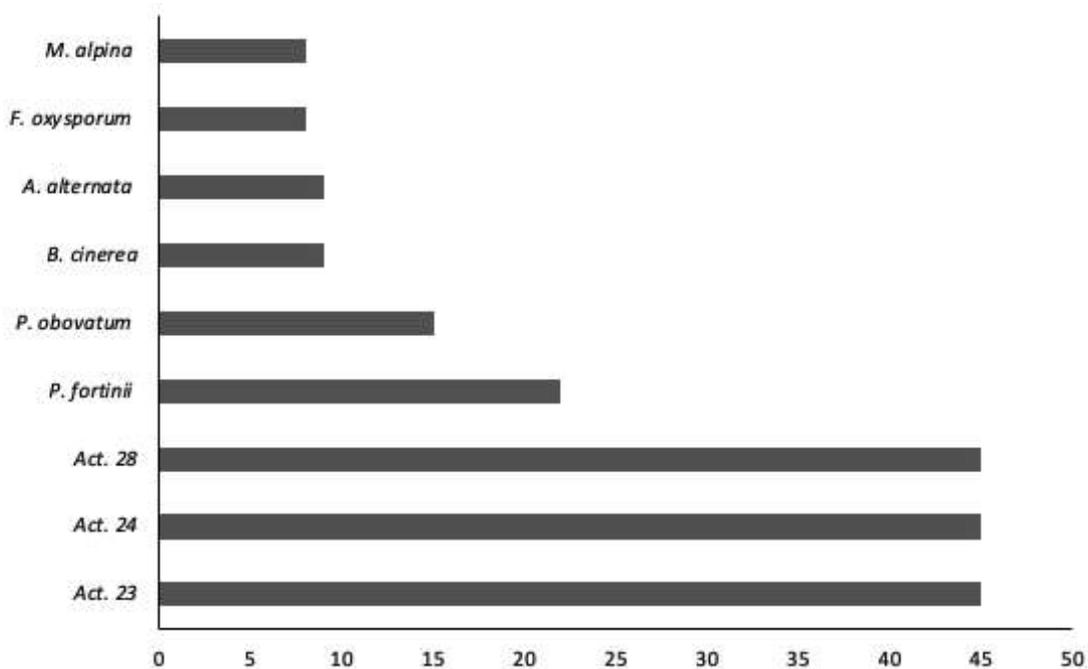


**Figura 20.** Características microscópicas del hongo *Botrytis cinerea* aislado de raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) Conjunto de hifas, B) Hifas en anastomosis, C) Hifa multinucleada y D) Hifa tabicada de 3.725 μm de longitud.

### Tasa de crecimiento de los microorganismos aislados

La determinación de tasa de crecimiento se reporta en la Figura 21. Se puede observar que los actinomicetos aislados (ACT 23, ACT 24 y ACT 28) pueden llenar una caja Petri en aproximadamente 45 días, mientras que los hongos *Phialemonium obovatum* y

*Phialocephala fortinii* lo hacen en 15 – 20 días. Por su parte, los hongos *Mortierella alpina*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*, lo hacen en un máximo de 10 días. La información obtenida con respecto a la tasa de crecimiento, fue una herramienta importante para los siguientes experimentos, ya que permitió identificar el tiempo de desarrollo en días para la inoculación en el experimento de interacción *Arabidopsis thaliana* – microorganismo aislado y con esto seleccionar los hongos y/o actinomicetos con potencial como bioestimulantes en la agricultura.



**Figura 21.** Tasa de crecimiento en días de hongos y actinomicetos aislados de la raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*).

#### I.4. Discusión

El suelo es un sistema complejo que se constituye de componentes orgánicos e inorgánicos, sin embargo, uno de los componentes orgánicos más esenciales son los microorganismos los cuales, tienen la capacidad de degradar compuestos y transformarlos en sustancias biodisponibles para las plantas y para otros organismos lo cual es un fenómeno

crucial para la agricultura. En el presente trabajo se aislaron cinco hongos de la raíz de arándano y otro de suelo rizosférico, así como tres actinomicetos de la raíz. Los hongos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, se han reportado con anterioridad asociadas a *Vaccinium* sp. sin embargo, se reportan como patógenos de plantas (Sánchez-Fernández et al., 2013). Resalta la identificación de *Mortierella alpina*, el cual pertenece a un género reportado con alta ocurrencia en distintos ambientes como rocas, minas, ríos, tejidos vegetales y suelo rizosférico (Nguyen et al., 2019; Held et al., 2020). Las especies patógenicas de este género son muy raras y esto conlleva, a que la mayoría de las especies se consideran como una fuente prometedora, al utilizarse como inoculantes promotores de crecimiento en la agricultura (Mehrotra y Bajjal, 1963).

*Mortierella alpina*, es una especie productora de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico (Rayaroth et al., 2017), reportado como inductor de resistencia en cultivos hortícolas ante la presencia de fitopatógenos (Zlotek y Wojcik 2014). Este hongo se aisló por primera vez en el año 2014 en Corea (Yadav et al., 2014). En México, este género se ha aislado de plantas de chile (Díaz-Aguilar et al., 2022) y de aguacate (Hernández et al., 2018) y en específico *Mortierella alpina* se aisló de suelo rizosférico de manzano en el estado de Chihuahua, por Mares-Ponce de León et al., (2018). Por lo anterior, su estudio en la agricultura es aún limitado, siendo este trabajo un avance importante de su aislamiento de suelo rizosférico de una planta ericácea, como el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*).

Los hongos endófitos septados oscuros, son habitantes comunes de plantas ericáceas (Vohník and Albrechtová, 2011; Gorzelak et al., 2012). *Phialocephala fortinii*, es otro hongo aislado en este trabajo, el cual es un endófito que comúnmente se encuentra en las raíces de plantas, sin reporte de especificidad y con un amplio rango de distribución geográfica.

Un estudio llevado a cabo por Yang y colaboradores en el año 2018, basado en enfoques meta-transcriptómicos, revela los cambios en la estructura y la actividad de los micobiotas de las raíces en suelos ácidos. Los autores indican el predominio de especies de endófitos septados oscuros, representantes del complejo *Phialocephala fortinii* sensu lato (s.l.)–*Acephala applanata* (PAC) lo cual se comprueba con este estudio al aislar e identificar a *P. fortinii* de raíces de arándano, una planta que se desarrolla en suelos con pH ácido donde generalmente, el acceso de la planta a nutrientes minerales es difícil. Este hongo es conocido por su capacidad de vivir asintóticamente en las raíces de diversas plantas como endófito

(Vohnik, 2020). Autores como Yang y colaboradores en el 2018, han situado a *P. fortinii* como un hongo formador de micorriza ericoide putativo, a la par de otros como *Oidiodendron*, *Lachnum*, *Phialocephala*, *Clavaria*, *Acephala* y *Meliniomyces*, después de encontrarlos en raíces de *V. uliginosum*.

Se han aislado hongos y actinobacterias de raíces y suelo rizosférico de *Calluna vulgaris* L., perteneciente a la familia de las ericáceas por Hamim y colaboradores en el año 2019. Los autores aplicaron un enfoque de secuenciación mediante la amplificación de la región ITS para hongos y 16S para actinobacterias y ellos reportan que la mayoría de los aislados de actinobacterias pertenecen al género *Streptomyces*, por lo que resultan necesarios estudios más detallados acerca de la identidad de los actinomicetos aislados en este trabajo para elucidar su funcionalidad en plantas de interés agrícola como el arándano azul.

## **I.5. Conclusiones**

Se aislaron cinco hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota y uno a Mucoromycota. *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina*, pueden visualizarse como potenciales promotores de crecimiento vegetal, de acuerdo a los reportes de otros autores debido a que el resto (*Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*), son considerados como patógenos de plantas; por su parte, *Phialemonium obovatum* es reportado como saprófito. El aislamiento de *Mortierella alpina*, es interesante debido a que existen pocos reportes en nuestro país y esto conlleva a que su identificación de suelo rizosférico de un frutal como el arándano, es un fenómeno poco estudiado y nuestro reporte representa una brecha para ampliar el conocimiento de su función. Por otro lado, *Phialocephala fortinii* que es un hongo ampliamente distribuido geográficamente y con una gran diversidad de plantas hospedadoras, incluyendo ericáceas como el arándano, su identificación en este trabajo, permite analizar las características de su interacción con plantas cultivadas en el estado de Michoacán, México.

## I.6. Referencias

- Beltrán-Nambo, M. A., M. Martínez-Trujillo, J. C. Montero-Castro, R. Salgado-Garciglia, J. T. Otero-Ospina y Y. Carreón-Abud (2018)** Fungal diversity in the roots of four epiphytic orchids endemic to Southwest México is related to the breadth of plant distribution. *Rhizosphere*. 7. 49-56.
- Currah, R. S., L. Sigler., S. Hambleton (1987).** New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany*. 65: 2473-2482.
- Díaz-Aguilar, R. J., G. Gallegos-Morales., F. D. Hernández-Castillo., C. A. Espinoza-Ahumada., S. Velarde-Félix (2022)** First report of *Mortierella* sp. un the cultivation of chili in Tamaulipas, México. *Scientia Fungorum*. 53:e1412.
- French E. and H. Teddy (1980)** Métodos de Investigación Fitopatológica.. Editorial IICA. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. 110 p.
- Gardes M. and T. D. Bruns (1993)** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2. 113-118.
- Gorzalak M. A., S. Hambleton., H. B. Massicotte (2012)** Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. *Fungal Ecol*. 5. 36–45.
- Held B. W., C. E. Salomon., R. A. Blanchette (2020)** Diverse subterranean fungi of an underground iron ore mine. *PLoS ONE*.15. e0234208.
- Hernández P. A., C. E. Cerna., J. C. Delgado., B. M. Beltrán., B. O. Hernández., L. M. Tapia., Y. M. Ochoa (2018)** Primer reporte de *Mortierella elongata* como patógeno del cultivo del aguacate en Michoacán, México. *Scientia Fungorum*. 48, 95-98.
- Mehrotra B. S. and U. Bajjal (1963)** Species of *Mortierella* from India-III. *Mycopathol. Mycol. Appl*. 20. 49–54.

**Nguyen T. T., S. W. Park., M. Pangging., H. B. Lee (2019)** Molecular and morphological confirmation of three undescribed species of *Mortierella* from Korea. *Mycobiology*. 47. 31–39.

**Ortega-Larrocea M. P. (2008)** Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafológica. Facultad de Ciencias. UNAM. Ciudad de México. 96 p.

**Rayaroth A., R. S. Tomar., R. K. Mishra (2017)** Arachidonic acid synthesis in *Mortierella alpina*: Origin, evolution and advancements. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences 87, 1053-1066.

**Sambrook J. and D. W. Russel (2001)** Molecular Cloning Laboratory Manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 373 p.

**Sánchez-Fernández R., B. L. Sánchez-Ortíz, Y. K. M. Sandoval-Espinoza, A. Ulloa-Benítez, B. Armendáriz-Guillen, M. C. García-Méndez y M. L. Macías-Rubalcava (2013)** Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 16:132-146.

**Swarts N. D., E. A. Sinclair, A. Francis and K. W. Dixon (2010)** Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology*. 19. 3226- 3242.

**Vohník M. and J. Albrechtová (2011)** The co-occurrence and morphological continuum between ericoid mycorrhiza and dark septate endophytes in roots of six European *Rhododendron* species. *Folia Geobot*. 46. 373–386.

**Vohník M. (2020)** Ericoid mycorrhizal symbiosis: Theoretical background and methods for its comprehensive investigation. *Mycorrhiza*.30. 671–695.

**White T. J., T. D. Bruns and L. S. Taylor (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. Academic Press, San Diego, California. 322 p.

**Young, E., M. Carey., A. A. Meharg., C. Meharg (2018)** Microbiome and ecotypic adaption of *Holcus lanatus* (L.) to extremes of its soil pH range, investigated through transcriptome sequencing. *Microbiome*. 6. 48.

**Zlotek U. and W. Wójcik (2014)** Effect of arachidonic acid elicitation on lettuce resistance towards *Botrytis cinerea*. *Scientia Horticulturae* 179, 16-20.

## 7.2. CAPITULO II. Respuesta de *A. thaliana* (Col 0) a la inoculación con aislados provenientes de Arándano (*Vaccinium corybosum*) sobre su desarrollo vegetal y la estructura de su raíz

### Resumen

*A. thaliana* es una planta que ha contribuido a dilucidar procesos biológicos gracias a sus características como planta modelo entre las que se encuentran un ciclo de vida corto, tamaño pequeño y un genoma ampliamente conocido. Estas características convierten a *A. thaliana* en una herramienta clave para la generación de conocimiento que permita la comprensión de procesos fisiológicos, sobre todo aquellos involucrados en las interacciones planta – microorganismo que se llevan a cabo en la rizósfera de cultivos de interés comercial. En este trabajo se analizó el efecto promotor de crecimiento vegetal de seis cepas fúngicas (*P. fortinii*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. obovatum*, *M. alpina* y *B. cinerea*) y tres actinomicetos clasificados morfológicamente como: Act. 23, Act. 24 y Act. 28 aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano (*V. corymbosum*). Se evaluó su capacidad de modificar el desarrollo de plántulas de *A. thaliana* (Col 0), mediante dos configuraciones experimentales: 1) cajas Petri compartimentadas y 2) cajas Petri no compartimentadas, para investigar la influencia de compuestos difusibles y volátiles sobre el fenotipo de la planta. *P. fortinii*, *M. alpina* y los tres actinomicetos promovieron el crecimiento vegetal, sobre todo en cajas compartimentadas, donde se observó un incremento de la longitud de la raíz principal (2 cm) y el número de raíces laterales (34 cm), sugiriendo que los compuestos volátiles son los responsables. Nuestros resultados representan alternativas prometedoras para la promoción del crecimiento vegetal inducido, por estas especies de hongos y actinomicetos.

**Palabras clave:** *Phialocephala fortinii*, *Mortierella alpina*, *Arabidopsis thaliana*, exudados fúngicos, hongos promotores del crecimiento vegetal.

## Abstract

*A. thaliana* is a plant that has contributed to elucidate biological processes due to its characteristics as a model plant, including a short life cycle, small size, and a widely known genome. These characteristics make *A. thaliana* a key tool for the generation of knowledge that allows the understanding of physiological processes, especially those involved in plant-microorganism interactions that take place in the rhizosphere of crops of commercial interest. In this work, the potential as Plant Growth Promoting of five fungal strains (*P. fortinii*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. obovatum*, *M. alpina* y *B. cinerea*) and three actinomycetes morphologically identified as: Act. 23, Act. 24 y Act. 28, isolated from the root and rhizospheric soil of blueberry (*V. corymbosum*) was analyzed. Its ability to modify the development of *A. thaliana* (Col 0) seedlings was evaluated using two experimental configurations: 1) compartmentalized Petri dishes and 2) non-compartmentalized Petri dishes, to investigate the influence of diffusible and volatile compounds on plant phenotype. *P. fortinii*, *M. alpina* and the three actinomycetes promoted plant growth, especially in compartmentalized Petri dishes, where an increase in the length of the main root (2 cm) and the number of lateral roots (34 cm) was observed, suggesting that the volatile compounds are the responsible. Our results represent promising alternatives for the promotion of plant growth induced by these species of fungi and actinomycetes.

**Key words:** *Phialocephala fortinii*, *Mortierella alpina*, *Arabidopsis thaliana*, fungal exudates, plant growth promoting fungi.

## II.1. Introducción

El uso indiscriminado de fertilizantes sintéticos en las actividades agrícolas, con la finalidad de mejorar la productividad ha aumentado en los últimos años (FAO, 2021) sin embargo, la biodiversidad del suelo se ve afectada negativamente por el uso de estos agroquímicos, por lo que existe una necesidad de desarrollar alternativas que mitiguen los efectos adversos al microbioma rizosférico. Una opción prometedora es el uso de microorganismos benéficos como hongos y bacterias promotoras de desarrollo vegetal y encargados de conferir resistencia a estrés del tipo biótico y/o abiótico a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles o difusibles, entre otros (Ghosh et al., 2017, 2019). A través del proceso de evolución, estos microorganismos han desarrollado mecanismos específicos para interactuar con una amplia gama de especies vegetales sin embargo, algunos procesos fisiológicos involucrados en la promoción de crecimiento vegetal o la habilidad de contrarrestar el estrés causado por fitopatógenos, es un tema por explorar.

Algunos autores como Gonzáles-Pérez y colaboradores en el año 2022, han evaluado la capacidad promotora de microorganismos tomando como base a la planta modelo *Arabidopsis thaliana*; estos autores reportan que la inoculación de tres cepas de *M. anisopliae* modifican el crecimiento de *Arabidopsis*, mediante un aumento en el desarrollo de la parte aérea y radicular. Un efecto similar se ha reportado con especies de *Trichoderma*, hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (Rai et al., 2008; Khan et al., 2012; Stefan et al., 2013; Suzuki et al., 2014; Chirini-Valle et al., 2016; Nieto-Jacobo et al., 2017).

Las relaciones que se llevan a cabo entre microorganismos y plantas, han sido de gran interés durante mucho tiempo. En la actualidad, se sabe que las plantas producen compuestos como azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas que los microorganismos utilizan como nutrientes o señales, convirtiéndose así en un fenómeno imprescindible para su desarrollo. A su vez, las poblaciones microbianas liberan fitohormonas y compuestos orgánicos volátiles o difusibles que regulan el crecimiento y la morfogénesis de las plantas (Ortiz-Castro et al., 2009).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial como promotores de desarrollo vegetal de seis cepas fúngicas y tres actinomicetos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano (*V. corymbosum*), mediante su capacidad de modificar el desarrollo de plántulas de *A. thaliana* (Col 0), mediante dos configuraciones experimentales para investigar la influencia de compuestos difusibles y volátiles sobre el fenotipo de la planta. Con el propósito de seleccionar del total de microorganismos aislados, aquellos con potencial para su uso en plantas de arándano en experimentos posteriores.

## **II.2. Metodología**

### **Preparación de semillas de *A. thaliana* ecotipo silvestre (Col 0)**

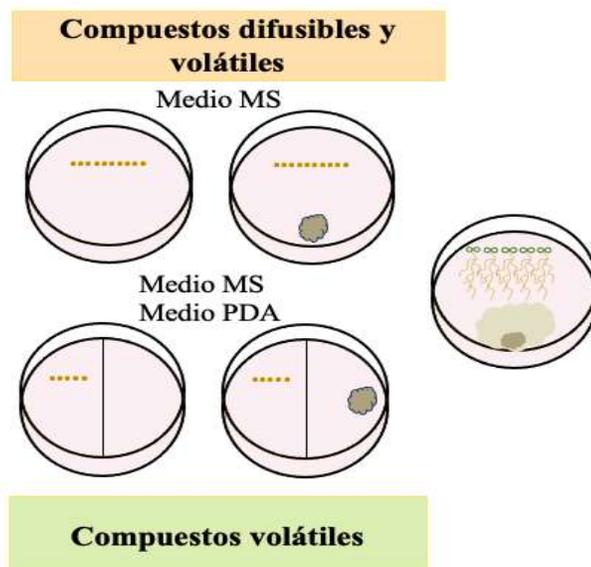
Se realizaron pruebas de germinación para asegurar la viabilidad de semillas de *A. thaliana* ecotipo silvestre Columbia (Col 0); se desinfectaron superficialmente con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y una solución de cloruro al 20 % por 7 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se refrigeraron a 4 °C durante 48 h.

### **Preparación de medios de cultivo en cajas Petri compartimentadas y no compartimentadas**

Con la finalidad de conocer si la respuesta de *A. thaliana* es provocada por compuestos involucrados en interacción directa (difusibles o volátiles) o indirecta (volátiles), se prepararon dos configuraciones experimentales: 1) cajas no compartimentadas que contenían medio de cultivo Murashige & Skoog (MS, Phytotechlab), en las cuales se sembraron 10 semillas en un extremo y se inoculó cada microorganismo en el extremo contrario y 2) cajas Petri compartimentadas, las cuales contenían en un compartimento medio de cultivo MS en donde se sembraron cinco semillas, y en el otro, medio de cultivo PDA, donde se colocó cada microorganismo aislado (Figura 22).

La siembra de semillas e inoculación, se realizaron de acuerdo a la tasa de crecimiento de cada hongo dando ventaja a la semilla para la germinación o en su caso, al hongo para iniciar el conteo de 14 días de interacción con tres réplicas por tratamiento.

Las cajas Petri se mantuvieron con una inclinación de 65° en una cámara de crecimiento (fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, humedad 89 % y temperatura 22 °C) durante 14 días.



**Figura 22.** Configuraciones experimentales para evaluar el efecto de seis hongos y dos actinomicetos aislados de la raíz y suelo rizosférico de arándano (*V. corymbosum*) sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre (Col 0).

### Obtención de datos

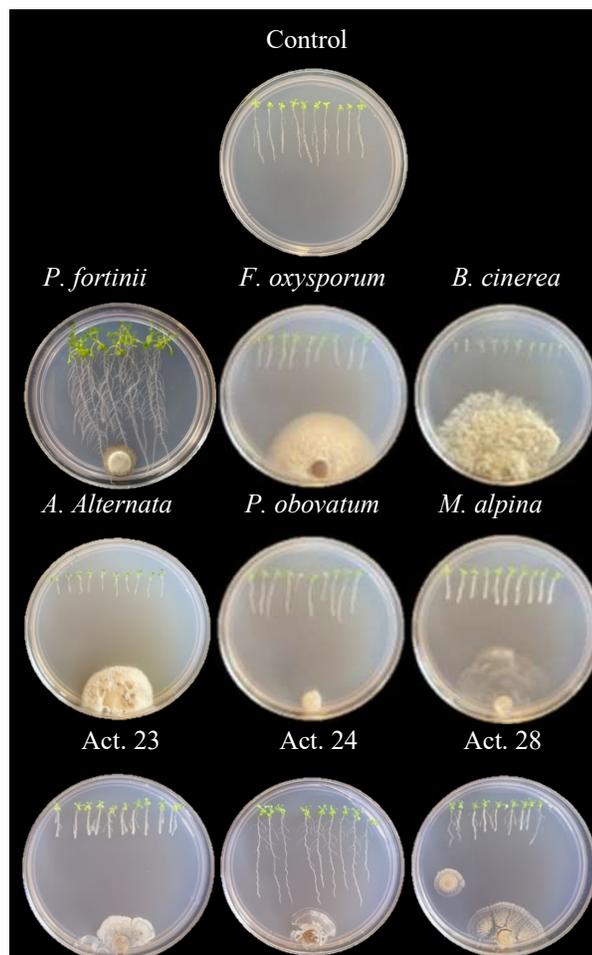
Se midió el crecimiento de la raíz primaria y se contaron las raíces laterales. Se midió la biomasa en peso fresco por tratamiento, utilizando una balanza analítica (marca Radwag, modelo AS 220.R2, EE. UU.). Se obtuvieron imágenes con una cámara digital (marca SONY modelo Carl Zeiss DSC-S75, Tokio, Japón). Los datos se analizaron con una prueba de ANDEVA y Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el software SPSS Statistics (IBM) Versión 28.0.1 para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos.

### II.3. Resultados

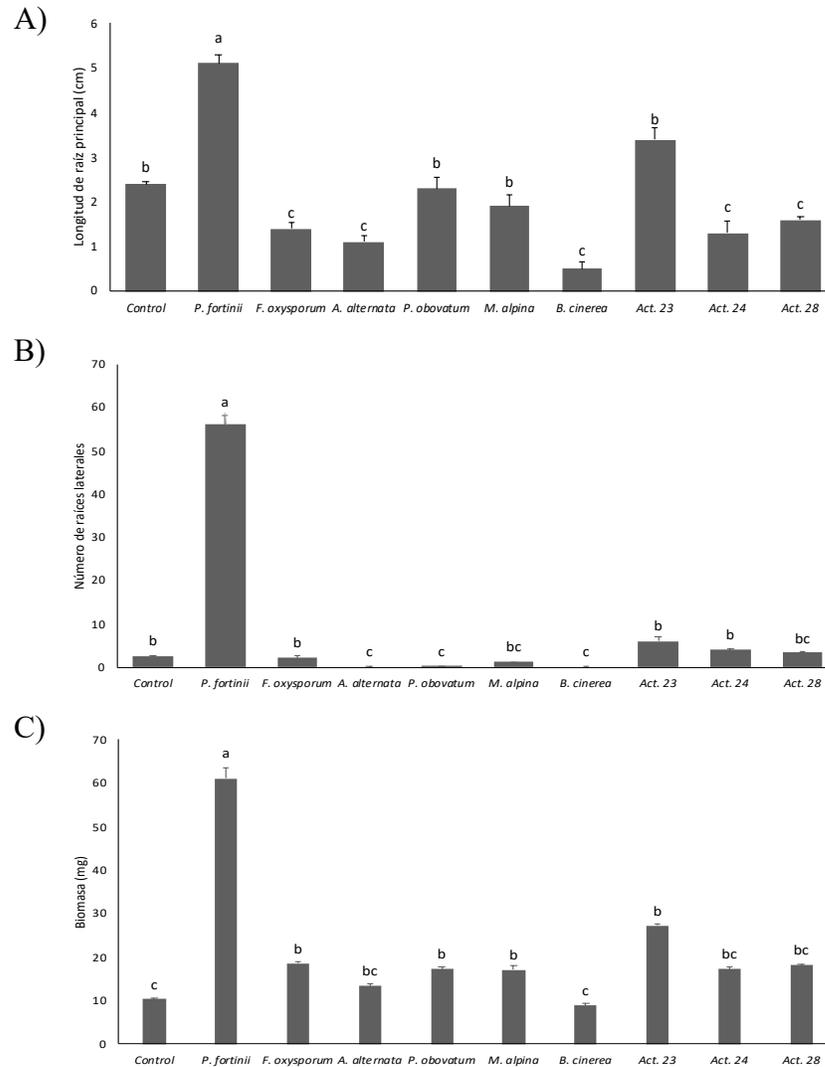
#### Efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano (*V. corymbosum*) sobre el desarrollo vegetal de *A. thaliana* (Col 0).

##### Efecto de compuestos difusibles y volátiles (caja Petri no compartimentada)

El tiempo de germinación de las semillas de *A. thaliana* fue de tres días. Por su parte, en cajas no compartimentadas, la mayoría de los hongos afectaron negativamente el crecimiento de las plantas, a excepción de los de *P. fortinii* y el actinomiceto 24, los cuales promovieron el desarrollo, indicando un efecto benéfico de su interacción directa (Figura 23). Se puede observar un aumento en la longitud de la raíz principal con ambos microorganismos (Figura 24A) y un aumento en el número de raíces laterales en especial con *P. fortinii* (Figura 24B) lo cual se vio reflejado también en la variable de biomasa en peso fresco (Figura 24C). Es importante mencionar que, en esta configuración experimental, además de los compuestos difusibles, se encuentran también compuestos volátiles.



**Figura 23.** Imágenes representativas del efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*) sobre el desarrollo vegetal de *A. thaliana* en cultivo in vitro mediante cajas Petri no compartimentadas.



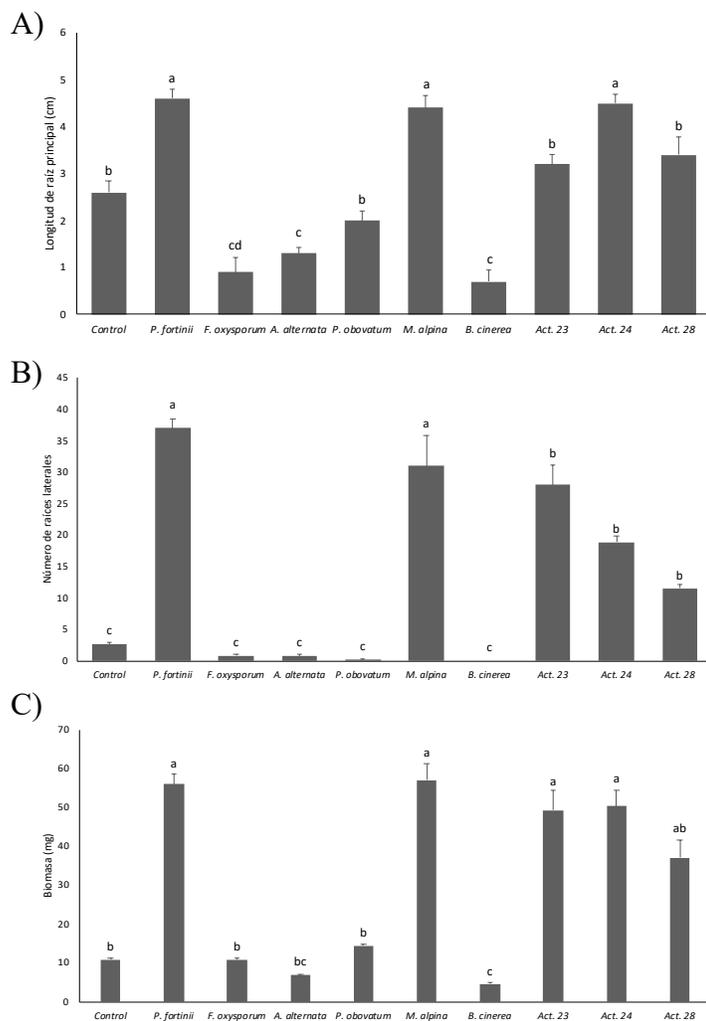
**Figura 24.** Variables de desarrollo vegetal de *A. thaliana* evaluadas por el efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano (*Vaccinium corymbosum*), en cajas Petri no compartimentadas. A) Longitud de raíz principal, B) Número de raíces laterales y C) Biomasa en peso fresco (mg). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

### Efecto de compuestos volátiles (caja Petri compartimentada)

En el caso de cajas compartimentadas, *P. fortinii*, *M. alpina* y los tres actinomicetos, promovieron el desarrollo vegetal (Figura 25), mejorando las tres variables de crecimiento analizadas (Figura 26). La longitud de la raíz principal se promovió de manera general, mediante los volátiles de estos microorganismos con respecto al control (Figura 26A). El número de raíces laterales se favoreció con las dos cepas fúngicas *P. fortinii* y *M. alpina*; las plantas control tuvieron tres en promedio, mientras que en las plantas en interacción con los hongos esta variable aumentó a más de 50 (Figura 26B); además, la biomasa incrementó de 10 mg en los controles a más de 50 mg con los tratamientos fúngicos y de actinomicetos (Figura 26C).



**Figura 25.** Imágenes representativas del efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum*) sobre el desarrollo vegetal de *A. thaliana* en cultivo in vitro mediante cajas Petri compartimentadas.



**Figura 26.** Variables de desarrollo vegetal de *A. thaliana*, evaluadas por el efecto de hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano (*Vaccinium corymbosum*), en cajas Petri compartimentadas. A) Longitud de raíz principal, B) Número de raíces laterales y C) Biomasa en peso fresco (mg). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

## II.4. Discusión

En este trabajo, la interacción *A. thaliana* – hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano (*Vaccinium corymbosum*), la configuración experimental de caja Petri

compartimentada, tuvo un mayor efecto sobre el desarrollo de las plántulas en comparación con la interacción en cajas no compartimentadas por lo que se infiere que la ausencia de compuestos difusibles y la presencia de compuestos volátiles producidos por los hongos y actinomicetos, durante la interacción promueven el desarrollo vegetal de esta especie vegetal. De acuerdo con nuestros resultados, los compuestos volátiles aumentaron el número de raíces y área foliar sugiriendo que la presencia de una barrera física, permite que estos compuestos desencadenen respuestas relacionadas con la división y elongación celular, estimulando el crecimiento. Las respuestas encontradas en cajas compartimentadas en este trabajo coinciden con los resultados de Coria-Arellano et al. (2023), quienes evaluaron el efecto de rizobacterias aisladas de *Suaeda* sp. sobre *A. thaliana*; los autores reportan que *Aneurinibacillus migulanus*, *Staphylococcus* sp. y *Bacillus cereus* mejoran el desarrollo vegetal. Nuestro trabajo sugiere que los hongos y actinomicetos evaluados sintetizan metabolitos secundarios que estimulan la divergencia de raíces como lo observado por Contreras-Cornejo et al. (2009), al evaluar el efecto de *Trichoderma virens* sobre de *A. thaliana*, donde los autores reportan que los efectos observados son el resultado de la presencia de compuestos fúngicos similares a las auxinas. Casarrubia et al. (2016), evaluaron la capacidad de *Oidiodendron maius* para influir en el crecimiento de *A. thaliana*, utilizando las mismas configuraciones experimentales para investigar la influencia de las moléculas fúngicas solubles y volátiles en el fenotipo de la planta; los autores reportan que *O. maius*, promovió el crecimiento en ambas configuraciones sin embargo, observaron un fenotipo peculiar caracterizado por el acortamiento de la raíz primaria y un aumento en la longitud y el número de raíces laterales, sólo en las placas no compartimentadas, por lo que sugieren que ambos tipos de moléculas son las responsables.

En algunos casos, se ha observado que el contacto directo de algunos microorganismos como *M. anisopliae* o *Trichoderma* con *A. thaliana*, inhiben el crecimiento de la raíz primaria. Autores como González-Pérez et al. 2022, atribuyen este comportamiento a la presencia de metabolitos secundarios secretados por los hongos, entre los que se encuentran la producción de peptaibol, el cual suprime la división y elongación celular, un efecto causado por gradientes de respuesta de auxina interrumpidos en las puntas de las raíces (Shi et al., 2016). Lo anterior, podría ser una explicación a lo observado en el presente trabajo, sobretodo, con la interacción de *A. thaliana* evaluada con hongos como *Fusarium oxysporum*, *Phialemonium obovatum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*.

Estudios recientes han demostrado que algunos compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias promotoras de crecimiento vegetal, pueden incrementar la absorción de nutrientes como el Hierro en plantas como *A. thaliana* (Zhang et al., 2009; Bailly and Weiskopf, 2012) por lo que es importante profundizar en estudios que permitan conocer los mecanismos implicados en este tipo de interacciones planta – microorganismo para mejorar su aprovechamiento.

## **II.5. Conclusiones**

Los resultados de este estudio, muestran que los hongos *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina*, así como los actinomicetos 23 y 24 tienen características que promueven el crecimiento vegetal de *A. thaliana* usada como organismo modelo. Esto pudo observarse mediante el incremento del desarrollo de la raíz primaria, el número de raíces laterales y la biomasa en peso fresco, por lo que se sugiere su uso como bioestimulentes en la agricultura, ampliando con esto el campo de estudio de los efectos de estos microorganismos en el crecimiento de especies vegetales de interés comercial, así como otros posibles beneficios que podrían otorgar, como el alivio de estrés o el desarrollo de mecanismos de defensa ante patógenos vegetales.

## II.6. Referencias

**Bailly A and L. Weisskopf (2012)** The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth, current knowledge and future challenges. *Plant Sig Behav* 7:79–85.

**Block A.K., M. M. Vaughan., E. A. Schmelz., S. A. Christensen (2019)** Biosynthesis and function of terpenoid defense compounds in maize (*Zea mays*). *Planta* 249 (1), 21–30.

**Bustos-Segura C and W. J. Foley (2018)** Foliar terpene chemotypes and herbivory determine variation in plant volatile emissions. *J. Chem. Ecol.* 44 (1), 51–61.

**Camargo-Ricalde S. M., N. M. Montaña., C. J. Rosa-Mera., S. A. Montaña (2012)** Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria.* 13:7. 13-19.

**Casarrubia S., S. Sapienza, H. Fritz, S. Daghino, M. Rosenkranz, J. P. Schnitzier, ... and E. Martino (2016)** Ecologically different fungi affect *Arabidopsis* development: contribution of soluble and volatile compounds. *Plos One.* 11:1-23,

**Cheng A.X., Y. G. Lou., Y. B. Mao., S. Lu., L. J. Wang., X. Y. Chen (2007)** Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *J. Integr. Plant Biol.* 49 (2), 179–186.

**Chirino-Valle I., D. Kandula., C. Littlejohn., R. Hill., M. Walker., M. Shields., S. Wratten (2016)** Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-service provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture. *Sci. Rep.* 6, 25109.

**Contreras-Cornejo H. A., L. Macías-Rodríguez, C. Cortés-Penagos and J. López Bucio (2009)** *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149:1579-1592.

**Coria-Arellano J. L., J. Sáenz-Mata, M. Frotis-Hernández, and M. A. Gallegos-Robles (2023)** Effect of rhizobacteria isolated from *Suaeda* sp. in the growth of

*Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* L (Sahariana). *Terra Latinoamericana*. 41:1-14.

**Ditengou F.A., A. Müller., M. Rosenkranz., J. Felten., H. Lasok., M. M. Van Doorn., A. Polle (2015)** Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nat. Commun.* 6, 6279.

**Ghosh D., Sen, S., Mohapatra (2017)** Modulation of proline metabolic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under water-stressed conditions by a drought-mitigating *Pseudomonas putida* strain. *Ann. Microbiol.* 67 (10), 655–668.

**Ghosh D., A. Gupta., S. Mohapatra (2019)** Dynamics of endogenous hormone regulation in plants by phytohormone secreting rhizobacteria under water-stress. *Symbiosis* 77 (3), 265–278.

**González-Pérez E., M. A. Ortega-Amaro., E. Bautista., P. Delgado-Sánchez., J. F. Jiménez-Bremont (2022)** The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances *Arabidopsis*, tomato, and maize plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*. 176. 34-43

**González-Pérez E., M. A. Ortega-Amaro., F. B. Salazar-Badillo., E. Bautista., D. Douterlugne., J. F. Jiménez-Bremont (2018)** The *Arabidopsis*-*Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Sci. Rep.* 8 (1), 1–14.

**Khan A.L., M. Hamayun., S.A. Khan., S. M. Kang., Z. K. Shinwari., M. Kamran., I. J. Lee (2012)** Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (4), 1483–1494.

**Lee S., M. Yap., G. Behringer., R. Hung., J. W. Bennett (2016)** Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Bio. Biotechnol.* 3 (1), 7.

**Nieto-Jacobo M.F., J. M. Steyaert., F. B. Salazar-Badillo., D. V. Nguyen., M. Rostás., M. Braithwaite., A. Mendoza-Mendoza (2017)** Environmental growth conditions of *Trichoderma spp.* affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Front. Plant Sci.* 8, 102.

**Ortiz-Castro R., H. A. Contreras-Cornejo., L. Macias-Rodriguez., J. Lopez-Bucio (2009)** The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 701-712.

**Rai M.K., S. Shende., R. J. Strasser (2008)** JIP test for fast fluorescence transients as a rapid and sensitive technique in assessing the effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in *Zea mays*: analysis of chlorophyll *a* fluorescence. *Plant Biosyst.* 142 (2), 191–198.

**Stefan M., N. Munteanu., V. Stoleru., M. Mihasan., L. Hritcu (2013)** Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Sci. Hortic.* 151, 22–29.

**Suzuki W., M. Sugawara., K. Miwa., M. Morikawa (2014)** Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *J. Biosci. Bioeng.* 118 (1), 41–44.

**Yamagiwa Y., Y. Inagaki., Y. Ichinose., K. Toyoda., M. Hyakumachi., T. Shiraishi (2011)** *Talaromyces wortmannii* FS2 emits  $\beta$ -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *J. Gen. Plant Pathol.* 77 (6), 336–341.

**Zhang H, Y. Sun., X. Xie., M. S. Kim., S. E. Dowd., P. W. Paré (2009)** A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency- inducible mechanisms. *Plant J* 58:568–577.

### 7.3. CAPITULO III. Expresión de genes reporteros de actividad hormonal y de defensa, implicados en la interacción directa e indirecta de *A. thaliana* – microorganismos aislados

#### Resumen

En este trabajo se investigó la influencia de los hongos *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina* y los actinomicetos 23, 24 y 28 aislados de raíz y rizósfera de arándano (*Vaccinium corymbosum*), sobre el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Además, se incluyeron también dos especies fúngicas como referencia: 1) un hongo micorrícico ericoide obtenido de manera comercial (HMEr) y 2) *Sebacina vermífera*, un hongo micorrícico orquideoide con amplia diversidad de plantas hospederas, incluidas plantas ericáceas como el arándano, aislado e identificado molecularmente en el Laboratorio de Genética y Microbiología (número de acceso GenBank JQ711842); estos últimos, utilizados como referencia. La evaluación se realizó en sistema in vitro mediante el uso de las líneas reporteras *ARR5::GUS*, *DR5::GUS*, *LOX2::GUS* y *PR1::GUS*, para estimar la respuesta de genes a la acumulación de citocininas, auxinas, ácido jasmónico y ácido salicílico respectivamente en los tejidos vegetales. Los resultados indican que *P. fortinii* promueve el desarrollo vegetal, mediante compuestos difusibles y volátiles que activan la producción de auxinas y citocininas. Contrario a *M. alpina* quien lo hace unicamente mediante compuestos volátiles. *S. vermífera*, promueve la producción de citocininas en las raíces, mediante ambos tipos de compuestos (difusibles y volátiles). Ningún microorganismo evaluado emite compuestos volátiles que desencadenen respuestas de defensa relacionadas con la producción de ácido salicílico sin embargo, la presencia de compuestos difusibles (caja Petri no compartimentada) liberados por *M. alpina* y el hongo micorrícico ericoide (HMEr) si activan este gen reportero en las raíces similar a lo observado con *P. fortinii*, en el área foliar de las plántulas. Todos los microorganismos liberan compuestos difusibles y volátiles que desencadenan mecanismos de defensa, relacionados con el ácido jasmónico en las raíces de las plantas, a excepción de *P. fortinii*, quien no provoca esta reacción con sus volátiles teniendo un comportamiento similar al control. La acción diferencial de los microorganismos evaluados sobre el crecimiento vegetal permite reconocer a *P. fortinii*, *M. alpina* y *S. vermífera* como un recurso biológico con gran potencial para su uso como bioestimulante en la agricultura actual, que se sugiere sea evaluado en cultivos de interés comercial como el arándano.

**Palabras clave:** *P. fortinii*, *M. alpina*, *S. vermifera*, líneas reporteras, fitohormonas.

## **Abstract**

In this work, the influence of the fungi *Phialocephala fortinii* and *Mortierella alpina* and the actinomycetes 23, 24 and 28 isolated from the root and rhizosphere of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) on the growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings was investigated. In addition, two fungal species were also included as reference: 1) a commercially obtained ericoid mycorrhizal fungus (HMEr) and 2) *Sebacina vermifera*, an orchidoid mycorrhizal fungus with a wide diversity of host plants including ericaceous plants such as the blueberry, isolated and molecularly identified in the Laboratory of Genetics and Microbiology (GenBank accession number JQ711842); the two latter, used as a reference. The evaluation was carried out in vitro system using the reporter lines *ARR5::GUS*, *DR5::GUS*, *LOX2::GUS* and *PRI::GUS*, to estimate the response of genes to the accumulation of cytokinins, auxins, jasmonic acid and salicylic acid respectively in plant tissues. The results indicate that *P. fortinii* promotes plant development through diffusible and volatile compounds that activate the production of auxins and cytokinins. Contrary to *M. alpina* who does it only through volatile compounds. *S. vermifera*. promotes the production of cytokinins in the roots through both types of compounds (diffusible and volatile). None microorganism evaluated emits volatile compounds that trigger defense responses related to the production of salicylic acid; however, the presence of diffusible compounds (non-compartmentalized Petri dish) released by *M. alpina* and the ericoid mycorrhizal fungus (HMEr) does activate this reporter gene in the roots similar to that observed with *P. fortinii* in the leaf area of the seedlings. All microorganisms release diffusible and volatile compounds that trigger defense mechanisms related to jasmonic acid in plant roots, with the exception of *P. fortinii*, which does not cause this reaction with its volatiles, having a similar behavior to the control. The differential action of the evaluated microorganisms on plant growth allows the recognition of *P. fortinii*, *M. alpina* and *S. vermifera* as a biological resource with great potential for use as a biostimulant in current agriculture that is suggested to be evaluated in crops of commercial interest such as blueberries.

**Key words:** *P. fortinii*, *M. alpina*, *S. vermífera*, Reporter line, Phytohormones.

### III.1. Introducción

El microbioma de la rizósfera, juega un rol imprescindible para el crecimiento y adaptación de las plantas pues estos microorganismos influyen en la producción de fitohormonas y mejoran la biodisponibilidad de nutrientes esenciales como el fósforo y/o nitrógeno, además de inducir mecanismos de defensa vegetal (Vacheron et al., 2013). Algunos microorganismos tienen la capacidad de promover el desarrollo vegetal, mediante la liberación de hormonas, compuestos difusibles o volátiles pero son pocos los estudios que caracterizan estos procesos, siendo desconocidos aun (Ryu et al., 2003, 2004; Kanchiswamy et al., 2015).

Por su parte, *Arabidopsis thaliana* es una planta modelo usada ampliamente en sistemas de crecimiento *in vitro* para estudiar los puntos clave en el reconocimiento y comunicación entre plantas y hongos y bacterias. Esta especie vegetal tiene un genoma que ha permitido tener disponible una extensa colección de mutantes y líneas transgénicas que sobreexpresan promotores fusionados con genes informadores que codifican proteínas fluorescentes o enzimas útiles para analizar los efectos de los microorganismos, sobre las plantas a un nivel específico de los tejidos vegetales (Andargie y Li, 2016). Lo anterior, permite un mejor acceso al conocimiento de las respuestas moleculares y bioquímicas que son clave para la regulación hormonal colocanco a *Arabidopsis*, como una planta modelo muy valiosa, si lo que se requiere es descifrar el diálogo molecular planta-microorganismo (Tahir et al., 2017).

Los efectos de microorganismos benéficos sobre las plantas, tienen como consecuencia la activación de metabolitos o la producción de hormonas imprescindibles para el desarrollo como las auxinas o citocininas, que son percibidos por las especies vegetales hospederas afectando el crecimiento vegetal (Contreras-Cornejo et al., 2015; Pelagio-Flores et al., 2017). De esta manera, los metabolitos fúngicos o bacterianos son participantes críticos en el establecimiento de interacciones planta – microorganismo.

Por otra parte, el éxito de infección de microorganismos patógenos en plantas depende de la emisión de metabolitos secundarios con capacidad de suprimir la inmunidad vegetal o

alterar respuestas fisiológicas, mediante vías de regulación hormonal (Presti et al., 2015; Chanclud and Morel, 2016). Frente a la presencia de patógenos, las plantas establecen un arsenal de respuestas bioquímicas y moleculares para defenderse lo cual incluye la producción de metabolitos de protección como las fitoalexinas, compuestos tóxicos para algunos patógenos o bien, el incremento de la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis para aumentar la inmunidad vegetal (Narasimhan et al., 2001). El ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico, son las principales fitohormonas involucradas en la inducción de mecanismos de defensa vegetal (Robert-Seilaniantz et al., 2011).

Las líneas transgénicas de *A. thaliana*, funcionan albergando un promotor sensible a alguna hormona de interés, por ejemplo la línea transgénica DR5::GUS, alberga un promotor sensible a auxina sintético que está fusionado con la secuencia codificante GUS, permitiendo una evaluación detallada de la respuesta específica de tejido e inducible por auxina a los metabolitos de los microorganismos que se encuentren en interacción con las plántulas.

El objetivo de esta investigación, fue analizar diferentes configuraciones experimentales de interacción Arabidopsis – microorganismos, aislados de raíz y rizósfera de arándano (*V. corymbosum*), que implican contacto directo (cajas Petri no compartimentadas) o indirecto (cajas Petri compartimentadas), influyen en los cambios morfológicos en las raíces y mejoran el crecimiento o activan mecanismos de defensa vegetal utilizando las líneas transgénicas *ARR5::GUS*, *DR5::GUS*, *LOX2::GUS* y *PRI::GUS*, reporteras de la actividad de citocininas, auxinas, ácido jasmónico y ácido salicílico respectivamente. Este trabajo tuvo como finalidad elucidar los mecanismos activados por los microorganismos aislados para conocer su comportamiento como posibles promotores de crecimiento vegetal que pudieran representar una alternativa al uso intensivo de fertilizantes sintéticos en la agricultura actual actuando como bioestimulantes.

## **III.2. Metodología**

### **Propagación de líneas reporteras**

Para asegurar la presencia del gen reportero correspondiente de cada línea reportera de *A. thaliana*, se propagaron las semillas existentes en un sustrato integrado por turba de la marca comercial peat moss, perlita y vermiculita en proporción 2:1:1. Se mantuvieron en riego a

capacidad de campo, en una cámara de crecimiento con condiciones controladas, hasta observar el desarrollo de las primeras hojas en las plántulas. Se colectó al menos una de estas para realizar una tinción histoquímica y asegurar la característica de tinción de los genes reporteros. Se eliminaron aquellas plántulas que no se tiñeron y aquellas de las cuales, si se obtuvieron hojas teñidas, se siguieron en cuidado continuo hasta la obtención de silicuas. Estas últimas se colectaron para obtener las semillas y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso (Figura 27).



**Figura 27.** Proceso de propagación de semillas de líneas reporteras de *A. thaliana*, para asegurar la presencia del gen reportero correspondiente. A) Desarrollo de plántulas en sustrato, B) Observación de tinción histoquímica para asegurar la presencia de genes reporteros, C) Recuperación de silicuas para obtención de semillas.

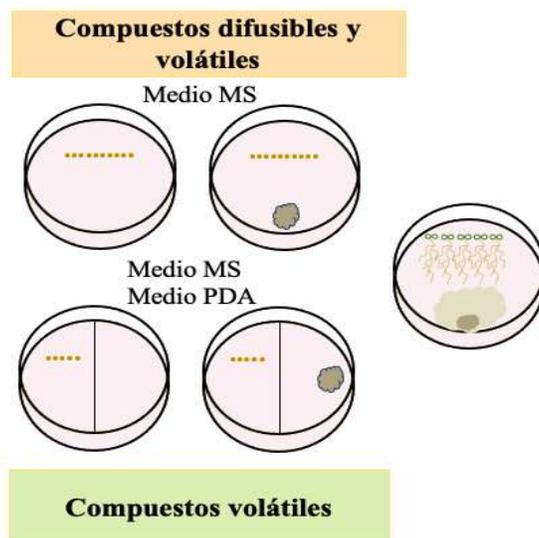
### **Preparación de semillas de líneas reporteras de *A. thaliana***

Se realizaron pruebas de germinación para asegurar la viabilidad de semillas de *A. thaliana* de cada una de las líneas reporteras (*ARR5::GUS*, *DR5::GUS*, *LOX2::GUS* y *PR1::GUS*). Se desinfectaron superficialmente con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y una solución de cloruro al 20 % por 7 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se refrigeraron a 4 °C durante 48 h.

### **Preparación de medios de cultivo en cajas Petri compartimentadas y no compartimentadas**

Con la finalidad de conocer si la respuesta de *A. thaliana*, es provocada por compuestos involucrados en interacción directa (difusibles o volátiles) o indirecta (volátiles), se prepararon dos configuraciones experimentales: 1) cajas no compartimentadas que contenían

medio de cultivo Murashige & Skoog (MS, Phytotechlab), en las cuales se sembraron 10 semillas en un extremo y se inoculó cada microorganismo en el extremo contrario y 2) cajas Petri compartimentadas, las cuales contenían en un compartimento medio de cultivo MS en donde se sembraron cinco semillas, y en el otro, medio de cultivo PDA donde se colocó cada microorganismo aislado (Figura 28). La siembra de semillas e inoculación se realizaron de acuerdo a la tasa de crecimiento de cada hongo dando ventaja a la semilla para la germinación o en su caso, al hongo para iniciar el conteo de 14 días de interacción con tres réplicas por tratamiento. Las cajas Petri se mantuvieron con una inclinación de 65° en una cámara de crecimiento (fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad, humedad 89 % y temperatura 22 °C) durante 14 días.



**Figura 28.** Configuraciones experimentales para evaluar el efecto de seis hongos y dos actinomicetos aislados de la raíz y suelo rizosférico de arándano (*V. corymbosum*) sobre líneas reporteras de *Arabidopsis thaliana*.

### Obtención de datos

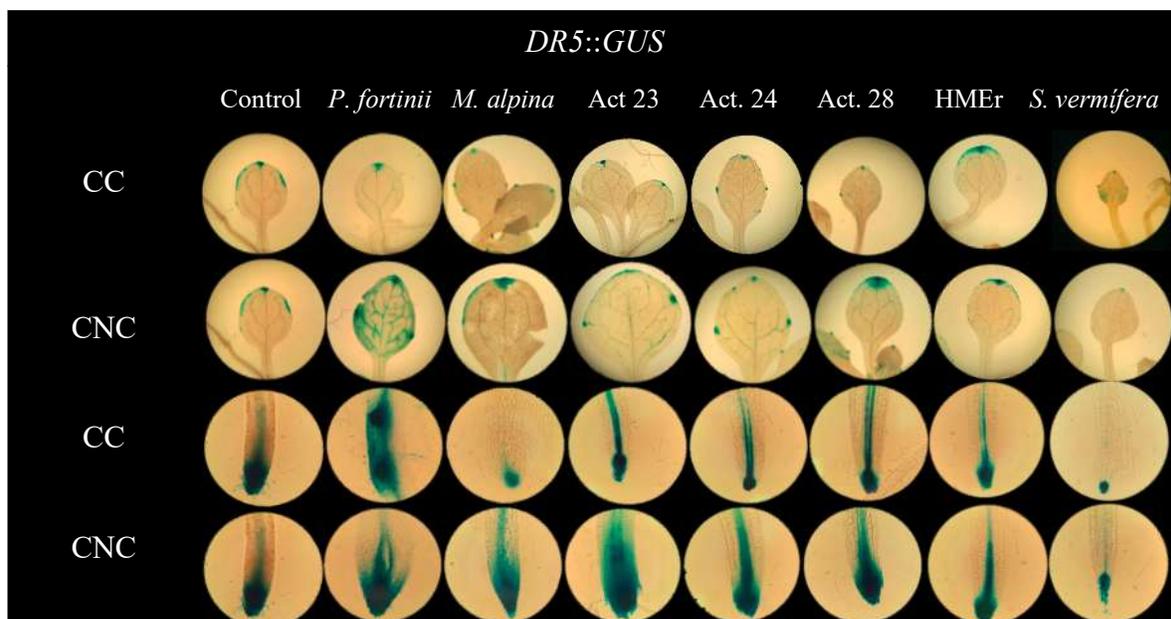
Se realizó un análisis histoquímico del gen reportero GUS, en el cual las plantas de *A. thaliana* se incubaron en X-Gluc {0.5 mg mL<sup>-1</sup> 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido al 0.1% en tampón fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M; pH 7), EDTA 10 mM 0,1% (v/v) Triton X-100 con ferrocianuro de potasio 2 mM y ferricianuro de potasio 2 mM} durante 12 h y se clarearon utilizando el método de Malamy y Benfey (1997). Las plantas procesadas se fijaron en porta objetos con glicerol 50% (v/v). Para cada línea

reportera, por cada tratamiento, se analizaron 15 plantas en un microscopio (marca Carl Zeiss, Modelo Axiostar plus, Göttingen, Alemania) y se tomaron fotografías representativas de los tejidos teñidos con una cámara digital (marca SONY modelo Carl Zeiss DSC-S75, Tokio, Japón).

### III.3. Resultados

#### Expresión del gen reportero *DR5::GUS*

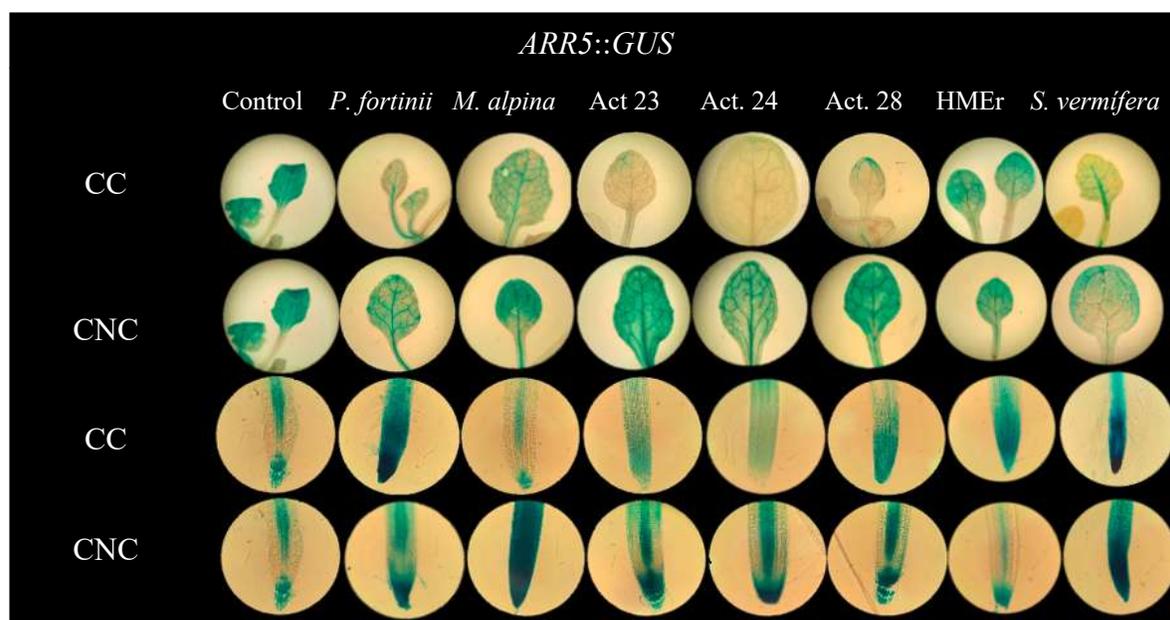
La concentración de auxinas en el área foliar de las plántulas, se vio favorecida con la presencia de los compuestos volátiles de *P. fortinii*, mientras que en la raíz aumentó la producción del gen reportero de la actividad de esta hormona, tanto con compuestos difusibles como volátiles. Por su parte *M. alpina*, provocó el aumento de auxinas únicamente en las raíces de plantas que se probaron en cajas compartimentadas, sugiriendo que los compuestos volátiles son los responsables (Figura 29).



**Figura 29.** Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera *DR5::GUS* indicativa de la actividad de auxinas en plantas de *A. thaliana*, después de 14 días de interacción directa [caja Petri no compartimentada (CC)] e indirecta [caja Petri compartimentada (CNC)] con hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano (*V. corymbosum*) y dos hongos de referencia (HMEr y *S. vermifera*).

### Expresión del gen reportero *ARR5::GUS*

La actividad del gen reportero de citocininas, no tuvo efecto en el área foliar de las plántulas, pero si en las raíces que estuvieron en contacto directo (caja Petri no compartimentada) con *P. fortinii* y también mediante los compuestos volátiles (caja Petri compartimentada) de *M. alpina*. Por su parte, ambas configuraciones experimentales aumentaron la presencia del gen reportero *ARR5::GUS* con el hongo micorrícico orquideoide *S. vermífera* (Figura 30).

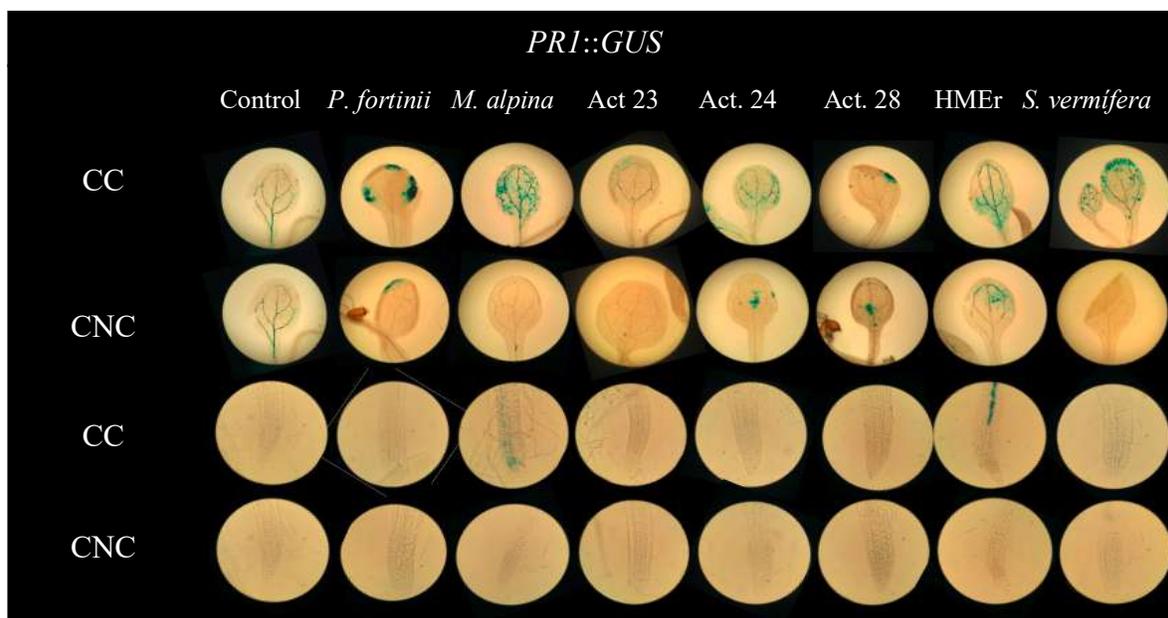


**Figura 30.** Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera *ARR5::GUS* indicativa de la actividad de citocininas en plantas de *A. thaliana*, después de 14 días de interacción directa [caja Petri no compartimentada (CC)] e indirecta [caja Petri compartimentada (CNC)] con hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano (*V. corymbosum*) y dos hongos de referencia (HMEr y *S. vermífera*).

### Expresión del gen reportero *PR1::GUS*

Con respecto a la actividad reportera de mecanismos de defensa, la producción de ácido salicílico aumentó únicamente en el área foliar de cajas Petri no compartimentadas (compuestos difusibles y volátiles) del hongo *P. fortinii*. En las raíces se observó un aumento

en la expresión de este gen reportero, con la presencia de compuestos volátiles y difusibles (caja Petri no compartimentada), liberados por *M. alpina* y el hongo micorrícico ericoide. Es importante mencionar que ninguno de los microorganismos evaluados liberó compuestos volátiles (cajas Petri compartimentadas), que provocara una diferencia en la expresión del gen reportero del ácido salicílico en las raíces de las plántulas de *A. thaliana* con respecto al control no inoculado (Figura 31).

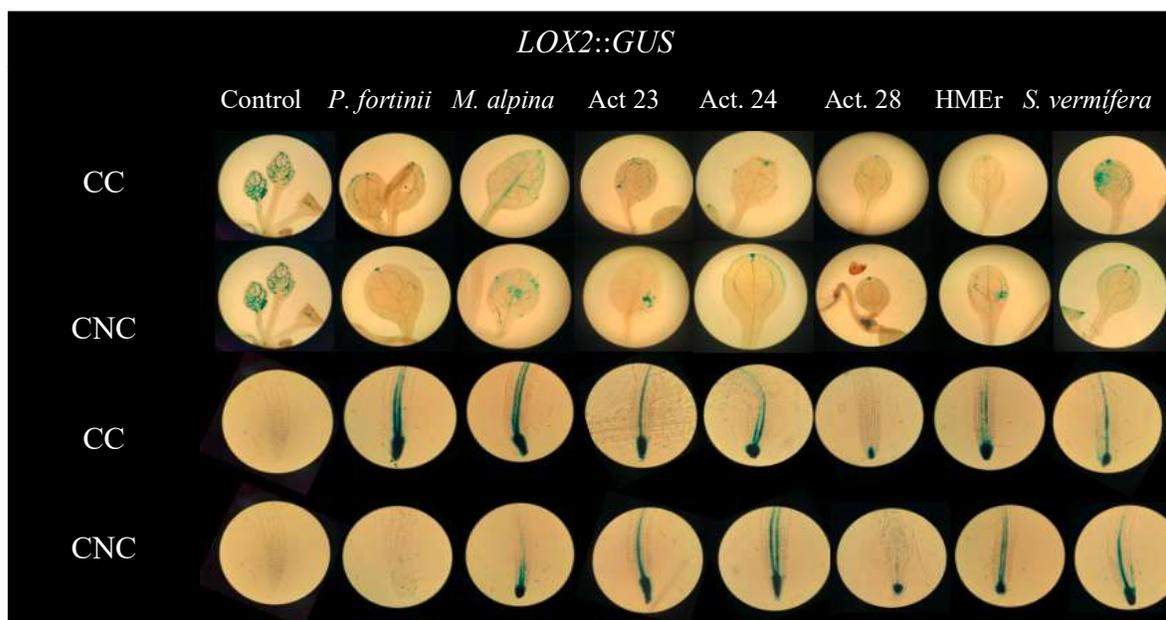


**Figura 31.** Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera *PRI::GUS* indicativa de la actividad del ácido salicílico en plantas de *A. thaliana*, después de 14 días de interacción directa [caja Petri no compartimentada (CC)] e indirecta [caja Petri compartimentada (CNC)] con hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano (*V. corymbosum*) y dos hongos de referencia (HMEr y *S. vermifera*).

### **Expresión del gen reportero *LOX2::GUS***

Los hongos y actinomicetos evaluados, no tuvieron influencia en la expresión del gen reportero de la actividad de defensa mediada por ácido jasmónico en el área foliar, sin embargo, la presencia de compuestos volátiles y difusibles (caja Petri no compartimentada) de todos los microorganismos, provocó mayor expresión del gen reportero *LOX2::GUS* en las raíces con respecto al control. Un efecto similar se observó en las raíces que no tuvieron contacto directo con los microorganismos (cajas Petri compartimentadas), a excepción del

hongo *P. fortinii*, quien tuvo un efecto similar al control no inoculado sugiriendo que los compuestos volátiles de este hongo, no provocan mecanismos de defensa relacionados con el ácido jasmónico en la planta modelo *A. thaliana* (Figura 32).



**Figura 32.** Fotografías representativas de la tinción histoquímica de la línea reportera *LOX2::GUS* indicativa de la actividad del ácido jasmónico en plantas de *A. thaliana*, después de 14 días de interacción directa [caja Petri no compartimentada (CC)] e indirecta [caja Petri compartimentada (CNC)] con hongos y actinomicetos aislados de raíz y rizósfera de arándano (*V. corymbosum*) y dos hongos de referencia (HMEr y *S. vermifera*).

### III.4. Discusión

Existen pocos trabajos que detallen los procesos bioquímicos involucrados en las respuestas vegetales, relacionadas con el desarrollo y defensa vegetal provocadas por la presencia de algunos microorganismos de la rizósfera. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo, caracterizar los efectos de dos hongos y tres actinomicetos aislados de la raíz y rizósfera de arándano (*V. corymbosum*), así como un hongo micorrízico aislado de orquidea y un hongo micorrízico ericoide, obtenido de manera comercial sobre el desarrollo y defensa de la planta modelo *A. thaliana*. Todos los microorganismos aislados tuvieron comportamientos diferenciales en la interacción.

Los resultados de este estudio, mostraron que *P. fortinii* promueve el crecimiento vegetal de *A. thaliana*, mediante mecanismos relacionados con la producción de auxinas y citocininas, con lo que se infiere que este hongo, tiene la capacidad de influir positivamente sobre mecanismos vegetales como la división y expansión celular (Himanen et al., 2002; Nishimura et al., 2004). Por su parte, *S. vermifera* influye en el desarrollo vegetal mediante la activación de mecanismos involucrados con las citocininas; estos resultados indican que no hay diferenciación en el efecto promotor de crecimiento vegetal mediante compuestos tanto difusibles como volátiles para estos hongos. De manera contraria, el hongo *M. alpina* promueve el desarrollo vegetal, únicamente mediante sus compuestos volátiles siendo el presente trabajo de las primeras investigaciones que reportan el comportamiento de este hongo con potencial, para su uso como bioestimulante agrícola. La capacidad de promover el crecimiento de las plantas por los hongos podría deberse a la producción de metabolitos secundarios como el ácido indol acético, algunas citocininas, etileno y otras sustancias promotoras de desarrollo (Tsavkelova et al., 2006; Contreras-Cornejo et al., 2009).

La regulación positiva de los genes involucrados en la síntesis de citocininas y auxinas, determinada por las líneas reporteras utilizadas en la interacción es de gran ayuda para conocer el proceso mediante el cual las plantas perciben a los microorganismos evaluados y la manera en que estos afectan la diferenciación y crecimiento vegetal.

Las plantas inducen procesos de resistencia cuando se ven atacados por patógenos (Pieterse et al., 2009); dichos mecanismos incluyen el reconocimiento y la activación de respuestas de hipersensibilidad para desencadenar la respuesta sistémica adquirida asociada a la producción de sustancias específicas como el ácido jasmónico o el ácido salicílico (Bostock, 2005).

Como se mencionó, los microorganismos tienen la capacidad de inducir múltiples señales en las plantas; estas señales interfirieron en las redes hormonales afectando directamente su crecimiento o defensa. En este trabajo se reporta que los volátiles de los microorganismos evaluados no desencadenan reacciones de defensa que involucren al ácido salicílico, pero los difusibles de *M. alpina*, HMEr y *P. fortinii* si lo hacen esto de acuerdo a lo observado con la línea reportera PRI1::GUS. La expresión del gen reportero de ácido jasmónico (LOX2::GUS), incrementa con la presencia de compuestos difusibles y volátiles de todos los microorganismos evaluados, con excepción de los compuestos volátiles de *P. fortinii*.

Es importante mencionar que la coordinación del crecimiento y defensa vegetal se lleva a cabo como una respuesta a la disponibilidad de recursos o bajo el estrés, causado por patógenos ocurriendo siempre con prioridad hacia los estímulos que reciben las plantas. La actividad hormonal de citocininas, auxinas, ácido jasmónico y ácido salicílico, desencadenada por los microorganismos aislados de raíz y rizósfera de arándano, representa una fuente de mediadores imprescindibles, tendiendo implicaciones en la adaptación y éxito de las plantas.

### **III.5. Conclusiones**

Nuestros resultados indican que los microorganismos evaluados actúan de manera versátil en la interacción con *A. thaliana*. La comprensión de la base molecular activada por los metabolitos de los hongos y actinomicetos seleccionados, proporciona la base para comprender las ventajas de las asociaciones de estos microorganismos con las plantas, permitiendo el desarrollo de estrategias que mejoren su aprovechamiento como bioestimulantes vegetales. Sin embargo, son necesarios estudios más detallados que abren la oportunidad de estudios futuros que evalúen la viabilidad de su uso en plantas de interés agrícola.

### III.6. Referencias

**Bent E (2006)** Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF), pp. 225-258. In S. Tuzun and E. Bent (eds.). *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer-Verlag, New York.

**Bostock R. M. (2005)** Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 545-580.

**Chanclud E., J. B. Morel (2016)** Plant hormones: a fungal point of view. *Mol Plant Pathol.* 17(8):1289–1297.

**Contreras-Cornejo H. A., L. Macías-Rodríguez., C. Cortés-Penagos., J. López-Bucio (2009)** *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 149:1579–1592.

**Himanen K., E. Boucheron, S. Vanneste, E. J. de Almeida, D. Inze, and T. Beeckman (2002)** Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339-2351.

**Narasimhan M. L., B. Damsz., M. A. Coca., J. I. Ibeas., D. J. Yun., J. M. Pardo., P. M. Hasegawa., R. A. Bressan (2001)** A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell.* 8(4):921–930.

**Nishimura C., Y. Ohashi, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, and C. Ueguchi (2004)** Genetic analysis of *Arabidopsis* histidine kinase genes encoding cytokinin receptors reveals their overlapping biological functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 1365-1377.

**Pelagio-Flores R., S. Esparza-Reynoso., A. Garnica-Vergara., J. López-Bucio., A. Herrera-Estrella (2017)** *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers Plant Sci.* 8(822).

**Pieterse J. M., C., A. Leon-Reyes., S. Van der Ent, and S. C. M. Van Wees (2009)** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5: 308

**Presti L., D. Lanver, G. Schweizer, S. Tanaka., L. Liang., M. Tollot., A. Zuccaro., S. Reissmann, R. Kahmann (2015)** Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol.* 66: 513–545.

**Robert-Seilaniantz A., M. Grant., J. D. Jones (2011)** Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol.* 49: 317–343.

**Ryu C. M., M. A. Farag., C. H. Hu., M. S. Reddy., J. W. Kloepper., P. W. Paré (2004)** Bacterial volatiles induced resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 134:1017–1026.

**Ryu C. M., M. A. Farag., C. H. Hu., M. S. Reddy., H. X. Wei., P. W. Paré., J. W. Kloepper (2003)** Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4927–4932.

**Tahir H. A. S., Q. Gu., H. Wu., W. Raza., A. Hanif., L. Wu, M. V. Colman., X. Gao (2017)** Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front Microbiol* 8:171.

**Tsavkelova E. A., S. Y. Klimova., T. A. Cherdyntseva, and A. I. Netrusov (2006)** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42: 117- 126.

**Vacheron J, G., Desbrosses., M. L. Bouffaud., B. Touraine.,Y. Moënné-Loccoz., D. Muller., L. Legendre., F. Wisniewski., C. Prigent-Combaret (2013)** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4:356.

**Pieterse J. M., C., A. Leon-Reyes., S. Van der Ent, and S. C. M. Van Wees (2009)** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5: 308-316.

#### 7.4. CAPITULO IV. Efecto de inoculación de los microorganismos aislados, sobre el desarrollo vegetal de plantas de Arándano (*Vaccinium corybosum*) en etapa de vivero.

##### Resumen

La raíces y rizósfera de plantas pertenecientes a la familia de las ericáceas como el arándano, albergan múltiples microorganismos, incluyendo taxones de hongos y bacterias que ofrecen ventajas ecológicas y fisiológicas. Algunos hongos forman asociaciones micorrícicas de tipo ericoide y se conocen por incrementar el desarrollo vegetal; otros hongos como los denominados endófitos, tienen funciones aún desconocidas en las plantas, sin embargo, algunos se han identificado con frecuencia en las raíces de esta familia. El objetivo de este trabajo, fue determinar la presencia de estructuras características de cuatro hongos en las raíces de plantas de arándano; dos de ellas: *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina* aisladas e identificadas de raíz y rizósfera de esta especie vegetal mediante técnicas morfológicas y moleculares así como un hongo micorrícico ericoide (HMEr), obtenido de manera comercial y un hongo micorrícico orquideoide: *S. vermífera* aislado e identificado molecularmente en el Laboratorio de Genética y Microbiología (número de acceso GenBank JQ711842); estos últimos, utilizados como referencia. Además, se planteó examinar los efectos de la inoculación fúngica. Se repropagaron plantas de arándano (*V. corymbosum*), mediante esquejes y se inocularon con los hongos respectivos. Después de ocho meses se evaluaron variables agrícolas como altura, número de tallos, número de hojas, capacidad fotosintética y área foliar. Los resultados indicaron que ninguno de los hongos inoculados mejoraron la altura, sin embargo, *S. vermífera* fue quien mejoró la mayoría del resto de las variables evaluadas. Por su parte, *M. alpina* inhibió el número de hojas por planta mientras que HMEr, promovió la biomasa radicular. La concentración de clorofila se vió disminuída por todos los hongos con respecto a la medición inicial. Se observó colonización fúngica de 25 - 40%; *M. alpina* no formó ninguna estructura micorrícica particular, mientras que las plantas inoculadas con *P. fortinii*, *S. vermífera* y HMEr, mostraron estructuras similares a las formadas por micorrizas ericoides típicas. Los efectos de la colonización fueron neutros en el desarrollo de *V. corymbosum* sin embargo, se prevee su potencial para promover el crecimiento vegetal de esta especie.

**Palabras clave:** *Vaccinium corymbosum*, *P. fortinii*, *M. alpina*, *S. vermifera*, HMEr, Endófito septado obscuro.

## **Abstract**

The roots and rhizosphere of plants belonging to the Ericaceae family, such as blueberries, harbor multiple microorganisms, including taxa of fungi and bacteria that offer ecological and physiological advantages. Some fungi form ericoid-type mycorrhizal associations and are known to increase plant development; other fungi, such as those called endophytes, have functions that are still unknown in plants; however, some have been frequently identified in the roots of this family. The objective of this work was to determine the presence of characteristic structures of four fungi in the roots of blueberry plants; two of them: *Phialocephala fortinii* and *Mortierella alpina* isolated and identified from the root and rhizosphere of this plant species using morphological and molecular techniques as well as an ericoid mycorrhizal fungus (HMEr), obtained commercially and an orchid mycorrhizal fungus: *S. vermifera* isolated and molecularly identified in the Laboratory of Genetics and Microbiology (GenBank accession number JQ711842); the two latter, used as a reference. In addition, it was proposed to examine the effects of fungal inoculation. Blueberry plants (*V. corymbosum*) were propagated using cuttings and inoculated with the respective fungi. After eight months, agricultural variables such as height, number of stems, number of leaves, photosynthetic capacity and leaf area were evaluated. The results indicate that none of the inoculated fungi improved height, however, *S. vermifera* was the one that improved most of the rest of the variables evaluated. For its part, *M. alpina* inhibited the number of leaves per plant while HMEr promoted root biomass. The chlorophyll concentration was decreased by all fungi with respect to the initial measurement. Fungal colonization of 25 - 40% was observed; *M. alpina* did not form any particular mycorrhizal structure, while plants inoculated with *P. fortinii*, *S. vermifera* and HMEr showed structures similar to those formed by typical ericoid mycorrhizae. The effects of colonization so far are neutral on the development of *V. corymbosum*; however, its potential to promote plant growth of this species is anticipated.

**Key words:** *Vaccinium corymbosum*, *P. fortinii*, *M. alpina*, *S. vermífera*, HMEr, Dark septate endophyte.

#### IV.1. Introducción

Los hongos micorrícicos y los hongos endófitos juegan un papel fundamental en las interacciones benéficas con las plantas, pues tienen la capacidad de promover su crecimiento y de proporcionar beneficios imprescindibles para su desarrollo como un mejor acceso a los nutrientes no disponibles o la resistencia ante patógenos, por lo que es necesario ampliar el conocimiento de su función y establecer herramientas de manejo que permitan su mejor aprovechamiento. Por su parte, el cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) representa un potencial de desarrollo económico para México, ya que de su producción total anual (66,482 toneladas) se exporta el 96.1 % al mercado estadounidense, siendo los estados de Jalisco, Michoacán y Sinaloa, los principales productores de esta frutilla con un total de 31, 912; 15, 490 y 9, 130 toneladas, respectivamente (SIAP, 2022). Para cumplir con la demanda actual, los productores se basan en el uso de productos sintéticos que afectan directamente a las comunidades microbianas de la rizósfera y disminuyen su diversidad, por lo que modifican la estructura y propiedades del suelo llevándolo a su degradación y pérdida de fertilidad (Swaroop et al., 2020). Por otro lado, el cultivo de arándanos se ve afectado por algunos desafíos como la disponibilidad de nutrientes, lo que ha llevado a un interés creciente en el estudio de las interacciones microbianas con esta planta.

*Vaccinium* tiene un amplio rango de relaciones, en su mayoría con ascomicetos que mejoran su nutrición mineral (Van Geel et al., 2020). *Oidiodendron maius* (Pescie et al., 2021), *Cadophora* sp., *Lachnum* sp. (Bizabani y Dames, 2015), se han identificado en las células rizodérmicas de plantas ericáceas sanas formando la micorriza ericoide, un tipo específico de micorrizas que se han identificado como simbioses cruciales para el desarrollo y crecimiento de plantas como el arándano, esta micorriza se caracteriza por la presencia de finos enrollamientos de hifas intracelulares (Read, 1996), encargadas de conferir beneficios como una mejor adquisición de nutrientes minerales como el fósforo y el nitrógeno (Pescie et al., 2023) y el alivio de estrés por sequía (Mu et al., 2021) entre otros, lo que hace que su presencia sea aún más relevante para la agricultura sostenible.

También destaca su asociación con hongos endófitos septados oscuros, los cuales se caracterizan por la producción de hifas septadas no hialinas; son microorganismos que habitan en los tejidos internos de las plantas, sin causar daño aparente a sus hospederos; algunos estudios han señalado su capacidad de sintetizar compuestos bioactivos, incluyendo sideróforos que pueden mejorar la absorción de Hierro. Un ejemplo de hongo septado oscuro es *Phialocephala fortinii*, un microorganismo que tiene la capacidad de liberar enzimas capaces de disolver nutrientes insolubles como el fósforo (Daghino *et al.*, 2022) o algunos hongos de la división Basidiomycota, destacando algunos Sebacinales (Vohník *et al.*, 2016).

La presencia de hongos micorrícicos y hongos endófitos en las raíces y rizósfera de plantas de arándano, se ha reportado con una serie de beneficios significativos para el crecimiento y desarrollo vegetal, entre los que también se incluyen una estimulación del crecimiento radical y un aumento en la protección contra patógenos. Su estudio es un campo en constante expansión y ofrece un amplio potencial para mejorar la producción agrícola y la sostenibilidad ambiental.

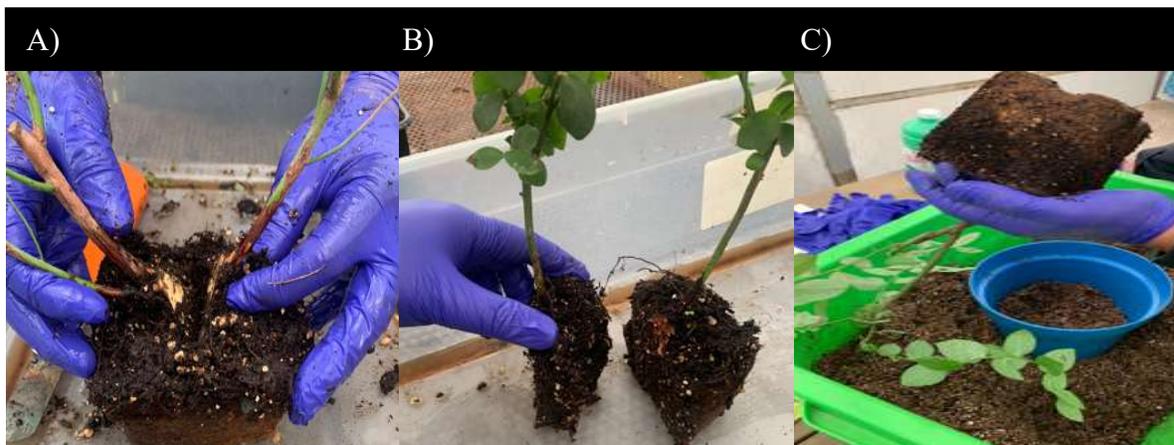
Por otro lado, desafortunadamente la identidad de los hongos asociados a *V. corymbosum* en México, es aún limitada, por lo que es necesario ampliar el conocimiento de su función y establecer herramientas de manejo, que permitan su mejor aprovechamiento conduciendo las prácticas agrícolas hacia un enfoque más amigable con el ambiente que a su vez, aumente la calidad y rendimiento de los cultivos de arándano brindando beneficios sustentables y económicos para la sociedad.

## **IV.2. Metodología**

### **Propagación de planta de arándano mediante esqueje**

Se obtuvieron de manera comercial un total de 70 plantas de arándano (*V. corymbosum*), de un año de edad, sin embargo, para contar con más unidades experimentales, se procedió a propagar estas plantas mediante esqueje de tallo. El procedimiento consistió en sacar cada planta de su maceta y seccionarlas en dos o tres esquejes con raíz, dependiendo de su tamaño. En el sitio de corte de cada esqueje, se colocaron unas gotas de enraizador líquido denominado Decoder Plus (marca Nutricional). Cada esqueje se trasladó a macetas limpias

y desinfectadas que contenían sustrato compuesto de peat moss – perlita y vermiculita en proporciones 2:1:1 con humedad a capacidad de campo (Figura 33). Los esquejes se mantuvieron en riego continuo y se eliminaron las plantas que mostraron características de marchitez considerándolas como muertas.



**Figura 33.** Proceso de propagación de plantas de arándano (*V. corymbosum*) por esqueje de tallo. A) Disección de plantas, B) Colocación de enraizador comercial y C) Acomodo de esquejes en macetas con sustrato (peat moss, perlita y vermiculita; 2:1:1).

### **Pruebas de crecimiento de cepas fúngicas aisladas en sustrato**

Los hongos a evaluar fueron: 1) *P. fortinii* y 2) *M. alpina*, aislados de raíz y rizósfera respectivamente de arándano (*V. corymbosum*) así como un hongo micorrícico ericoide (HMEr) obtenido de manera comercial y *S. vermifera* un hongo micorrícico aislado de raíces de las orquídeas mexicanas *Bletia purpurata* y *Habenaria flexuosa* e identificado molecularmente (número de acceso GenBank JQ711842) en un trabajo de investigación llevado a cabo por Beltrán-Nambo y colaboradores (2018) en el Laboratorio de Genética y Microbiología perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Con la finalidad de conocer el comportamiento de los hongos en sustrato, se realizó una prueba para asegurar su crecimiento en condiciones de invernadero. Se llenaron tres recipientes de capacidad de 500 g con el mismo sustrato de crecimiento de esquejes de arándano (Peat moss, perlita y vermiculita en proporciones 2:1:1) en los cuales, se inoculó aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de cada hongo.

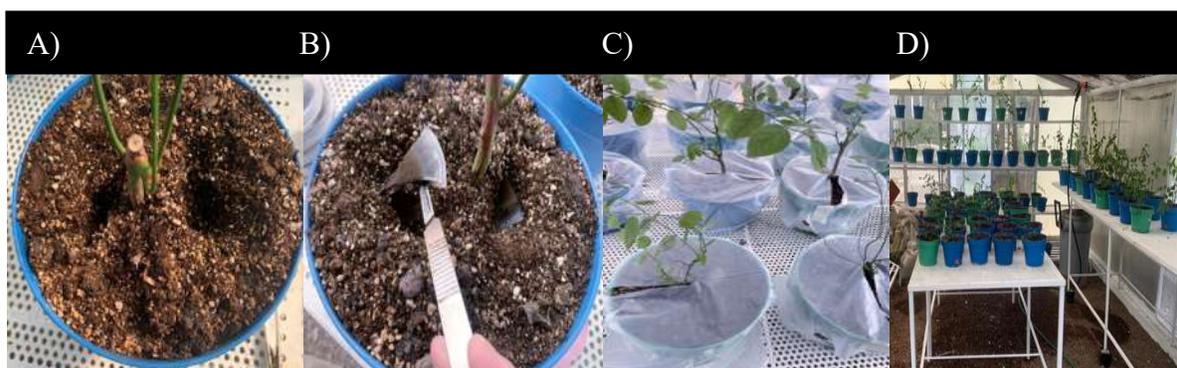
Los recipientes se regaron a capacidad de campo y se mantuvieron en invernadero para simular las condiciones reales donde se montaría el experimento. Se mantuvieron en monitoreo constante para reconocer el inicio de aparición de hifas fúngicas (Figura 34).



**Figura 34.** Recipientes con sustrato (peat moss, perlita y vermiculita; 2:1:1) inoculado con dos hongos aislados de rizósfera de arándano (*V. corymbosum*): *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina*, así como dos hongos de referencia (*S. vermífera* y HMEr) en condiciones de invernadero.

### **Inoculación de microorganismos aislados**

El montaje del experimento se inició realizando dos orificios en el sustrato cercanos al tallo y con una profundidad de 5 cm aproximadamente en cada maceta, para inocular en zonas cercanas a las raíces de plantas de arándano (*V. corymbosum*), que conformarían los sitios de inoculación. Posteriormente, se cortaron segmentos de aproximadamente 4 cm<sup>3</sup> del unóculo fúngico desarrollado en medio de cultivo Agar Dextrosa Papa (PDA, por sus siglas en inglés) y se colocaron en los orificios seleccionados que a continuación se cubrieron con sustrato. Finalmente, cada maceta se cubrió con poli papel durante las primeras dos semanas para conservar la humedad y asegurar el desarrollo fúngico (Figura 35). El experimento constó de cinco tratamientos incluyendo el control no inoculado (T1: Control, T2: *P. fortinii*, T3: *M. alpina*, T4: *S. vermífera* y T5: HMEr) cada uno con un total de 15 unidades experimentales que se acomodaron de manera aleatoria en un invernadero perteneciente al Laboratorio de Genética y Microbiología Miguel Martínez Trujillo perteneciente a la Facultad de Biología, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El experimento se mantuvo en riego continuo a capacidad de campo durante ocho meses.



**Figura 35.** Proceso de inoculación de dos hongos aislados de rizósfera de arándano (*V. corymbosum*): *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina*, así como dos hongos de referencia (*S. vermifera* y HMEr) en condiciones de invernadero. A) Selección de orificios, B) Inoculación de 4 cm<sup>3</sup> de cada hongo, C) Macetas cubiertas con poli papel y D) Acomodo aleatorio de macetas en condiciones de invernadero.

### **Variables agrícolas**

Después de ocho meses de interacción de las plantas de arándano con las cepas fúngicas seleccionadas, se tomaron datos de variables agrícolas como 1) Altura, 2) Número de tallos secundarios, 3) Inflorescencias y 4) Contenido de clorofila (mg/m<sup>2</sup>) mediante el equipo CCM – 300 (marca OptiScience). Los datos obtenidos se concentraron y se realizaron los análisis estadísticos correspondientes.

### **Variables micorrícicas**

Para conocer el estado de micorrización o interacción hongo – raíz, se realizó una tinción de acuerdo al procedimiento de Phillips & Hayman (1970), la cual consiste en obtener muestras de raíces y lavarlas con agua corriente para posteriormente, implementar el uso de Hidróxido de Potasio (KOH), para el proceso de clarificación de las raíces, seguido de una acidificación con ácido clorhídrico (HCl) y el uso de azul de tripano como colorante. Las raíces teñidas se colocaron en una caja Petri con lactoglicerol, se cortaron en segmentos de 2 cm de largo y se colocaron en portaobjetos, obteniendo un total de tres laminillas por planta. Las raíces montadas se observaron en microscopio óptico a 40X y se realizaron 100 observaciones por planta. El porcentaje de colonización fúngica total se calculó dividiendo el número de campos

colonizados entre el número total de campos observados y multiplicado por 100 (Hernández-Cuevas et al., 2008). Con base a este dato se determinó también el porcentaje de estructuras fúngicas en las raíces; los datos se analizaron con una prueba de ANDEVA y comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el software SPSS Statistics (IBM) Versión 28.0.1 para establecer diferencias significativas entre los tratamientos.

### IV.3. Resultados

#### Propagación de planta de arándano mediante esqueje

De 70 plantas iniciales se obtuvieron 150 plantas después de la propagación mediante esqueje, sin embargo, después de un mes de monitoreo y cuidados en invernadero, se observó una mortalidad por necrosamiento de hojas y tallos del 50% del total de plantas propagadas, quedando un total de 75 plantas disponibles para el montaje del experimento.

#### Pruebas de crecimiento de cepas fúngicas aisladas en sustrato

Las condiciones de invernadero establecidas para el desarrollo de los hongos aislados de arándano, así como para los hongos micorrícicos utilizados como referencia resultaron favorables para su propagación. El monitoreo constante de los recipientes de crecimiento, permitió observar las primeras hifas fúngicas de *M. alpina*, HMEr, *P. fortinii* y *S. vermífera*, sobre el sustrato al cabo de cinco, siete, diez y veintitrés días respectivamente (Figura 36).

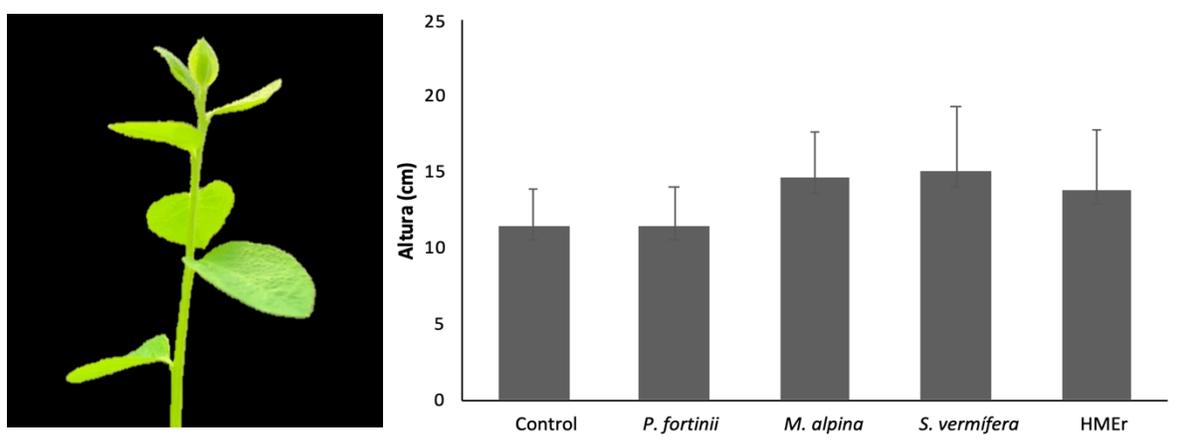


**Figura 36.** Fotografía representativa del desarrollo de las primeras hifas del hongo *M. alpina*, aislado de suelo rizosférico de arándano (*V. corymbosum*), sobre sustrato (peat moss, perlita y vermiculita; 2:1:1) a los 5 días de inoculación.

## Efecto de hongos sobre plantas de arándano (*V. corymbosum*)

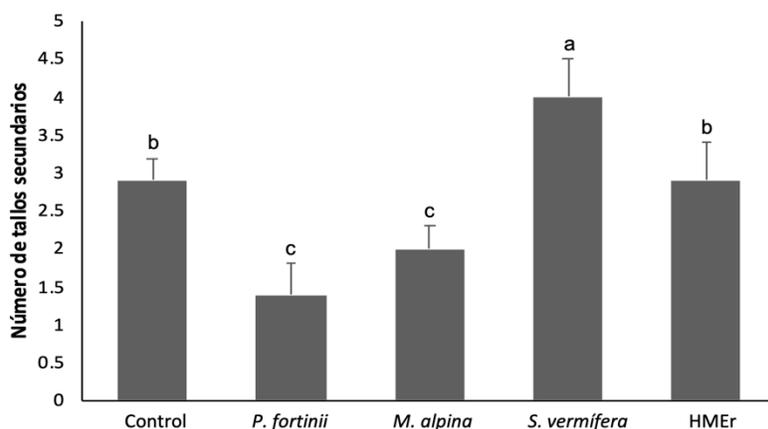
### Variables agrícolas

Los resultados de las variables agrícolas de las plantas de arándano, indican que la altura no se vio mejorada con los hongos evaluados, todos tuvieron un comportamiento similar al control (Figura 37).



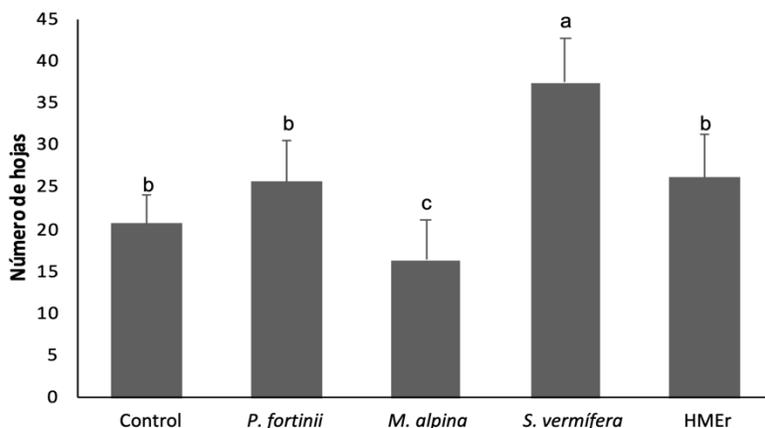
**Figura 37.** Altura de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii*, *M. alpina* y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr), en condiciones de invernadero.

Por su parte, el hongo micorrícico orquideoide *S. vermifera*, aumentó el número de tallos secundarios ( $\leq 4$ ), mientras que el hongo micorrícico ericoide (HMEr), tuvo un comportamiento similar al control. Por su parte, los hongos *P. fortinii* y *Mortierella alpina*, disminuyeron esta variable ( $\leq 2.9$ ), con un número menor de tallos secundarios que el control no inoculado (Figura 38).



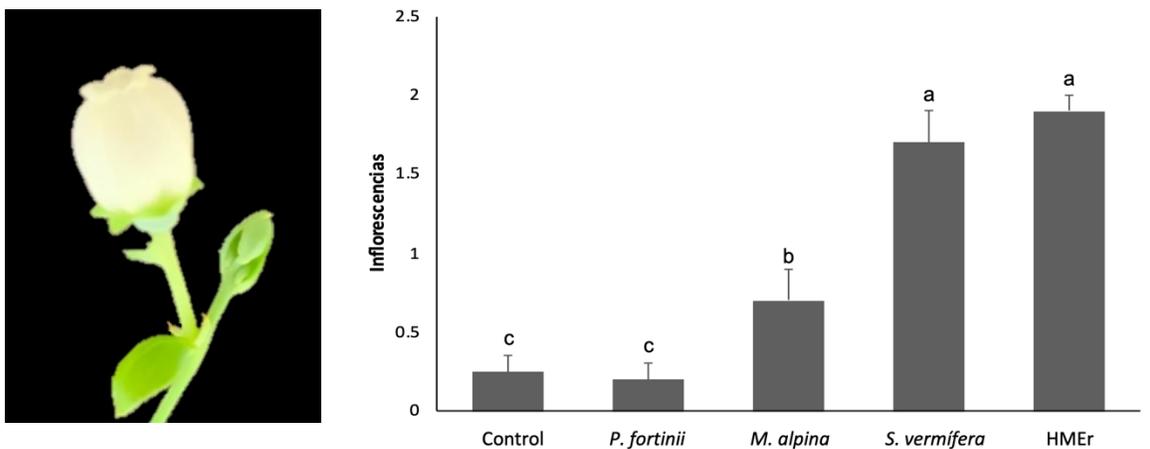
**Figura 38.** Número de tallos secundarios de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii* y *M. alpina* y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr) en condiciones de invernadero. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

El número de hojas se incrementó de manera considerable por la inoculación del hongo micorrícico orquideoide *S. vermifera* ( $\leq 35$ ). Las plantas de arándano inoculadas con los hongos *P. fortinii* y HMEr no afectaron positivamente el número de hojas ( $\leq 25$ ) al igual que el tratamiento control. Por su parte, *M. alpina*, inhibió el desarrollo de hojas teniendo un efecto negativo en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 39).



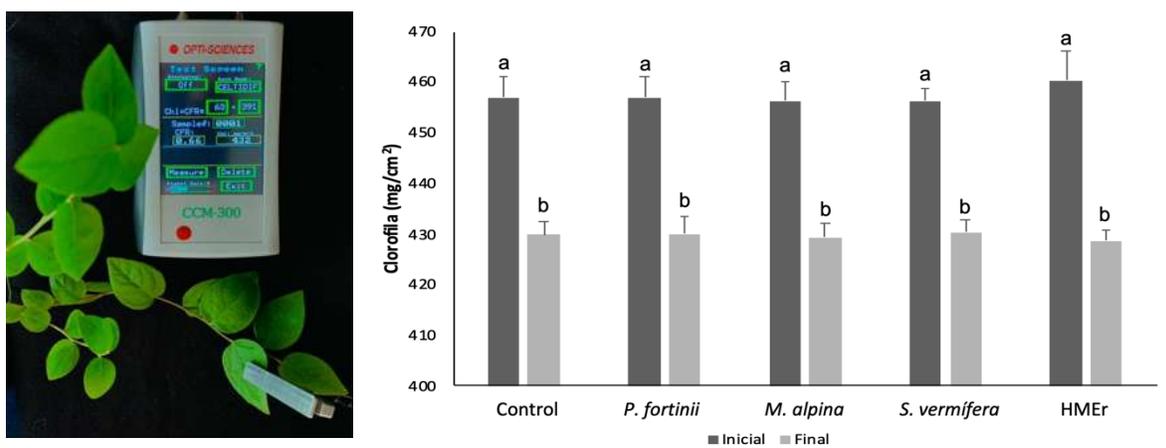
**Figura 39.** Número de hojas de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii* y *M. alpina* y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr) en condiciones de invernadero. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

A pesar de que durante el experimento el número de inflorescencias fue bajo (de dos a tres flores por planta), esta variable se observó favorecida por los hongos usados como referencia: *S. vermífera* y HMEr ( $\leq 2$ ), seguido por el hongo *M. alpina*, mientras que en las plantas inoculadas con *P. fortinii*, se reportan con un comportamiento similar al control no inoculado (Figura 40).



**Figura 40.** Inflorescencias de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii* y *M. alpina* y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermífera* y HMEr) en condiciones de invernadero. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

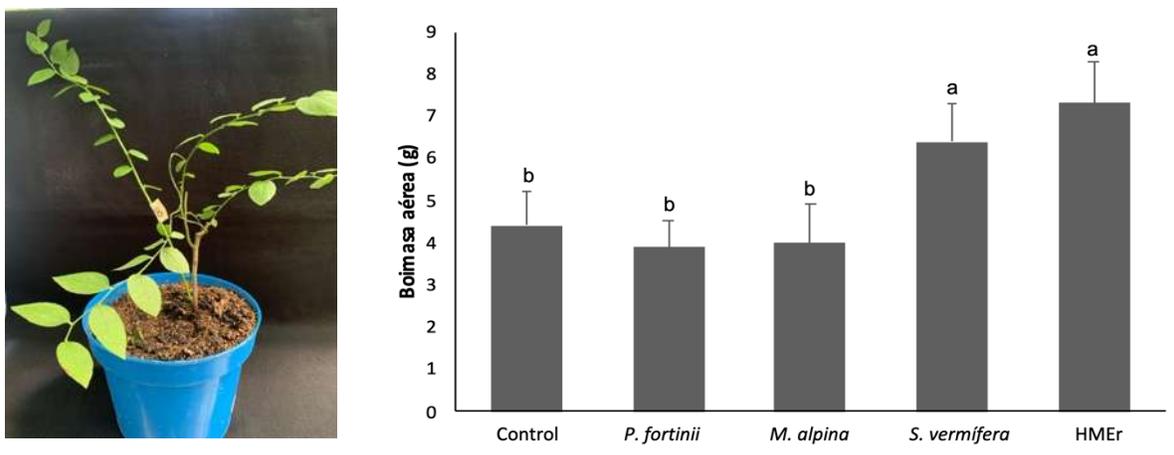
El contenido de clorofila de las plantas de arándano fue menor ( $\leq 430 \text{ mg/cm}^2$ ), de manera general después de los ocho meses de interacción planta-hongo, con respecto a la primera medición hecha al inicio de la interacción ( $\leq 455 \text{ mg/cm}^2$ ), (Figura 41).



**Figura 41.** Contenido de clorofila ( $\text{mg/m}^2$ ) en plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii* y *M. alpina* y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermífera*

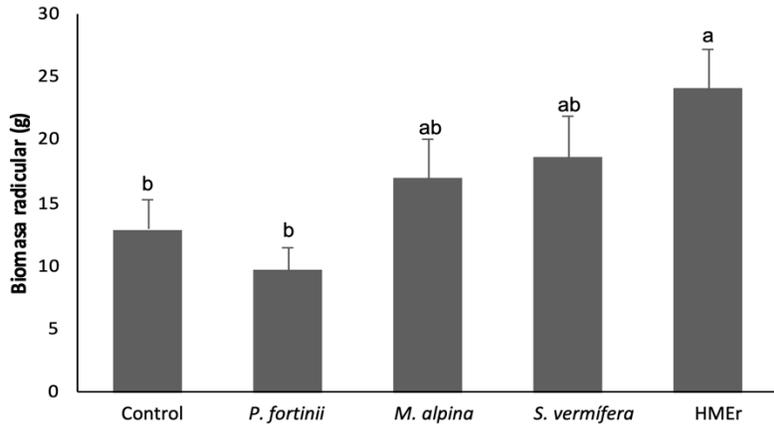
y HMEr) en condiciones de invernadero. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

Los hongos aislados de la rizósfera de arándano (*V. corymbosum*) *P. fortinii* y *M. alpina*, no incrementaron el desarrollo de la biomasa aérea de las plantas, con respecto al control no inoculado, sin embargo, los hongos utilizados como referencia en este experimento (*S. vermífera* y HMEr) si lo hicieron (Figura 42).



**Figura 42.** Biomasa aérea de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii*, *M. alpina* y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermífera* y HMEr) en condiciones de invernadero. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

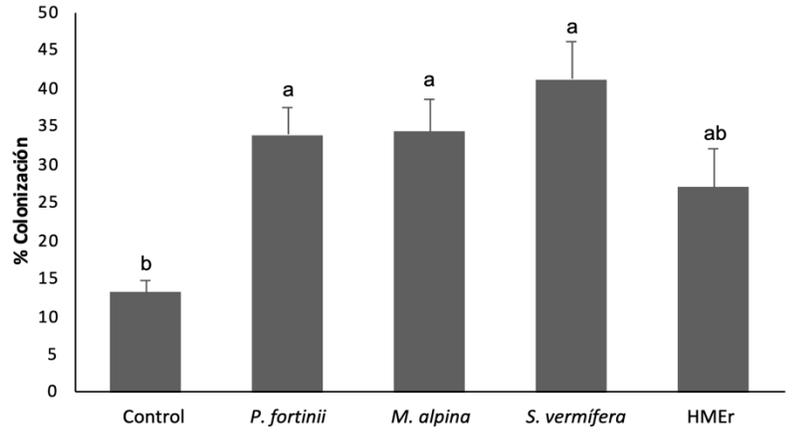
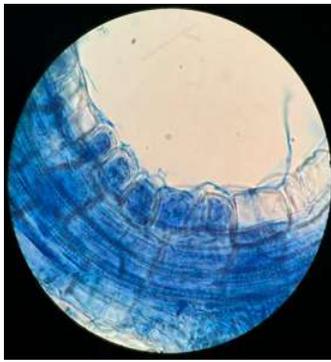
El HMEr, tuvo un efecto positivo sobre la biomasa radicular de las plantas de arándano en las cuales, se reporta un peso 11 g mayor al control. Por otra parte, la inoculación de *M. alpina* y *S. vermífera* tuvo efectos neutrales en esta variable mientras que *P. fortinii* no tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo de raíces por lo que se observan mediciones similares a las de plantas no inoculadas ( $\leq 12$  cm) (Figura 42).



**Figura 43.** Biomasa radicular de plantas de arándano inoculadas con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii* y *M. alpina* y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr) en condiciones de invernadero. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

### VARIABLES MICORRÍICAS

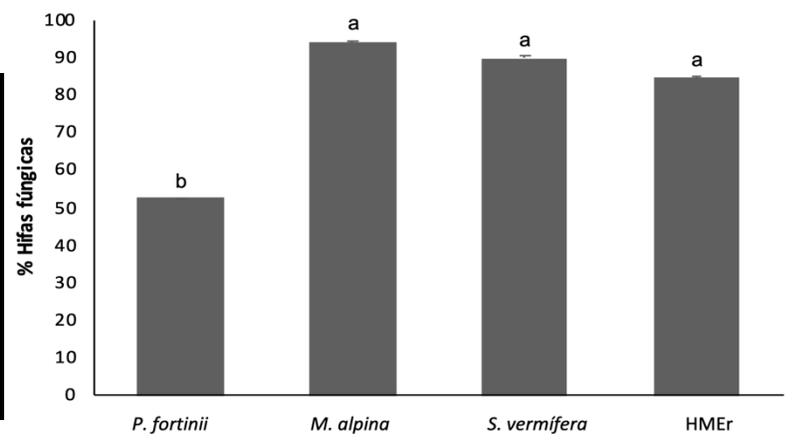
El estado de colonización fúngica mostró que todos los hongos evaluados habían colonizado las raíces a los ocho meses con porcentajes de entre 30 y 40 %, siendo HMEr el hongo con menor colonización ( $\leq 26.9$  %), con respecto al resto de los hongos evaluados (Figura 44). De manera particular, se reporta una colonización del 11% en las plantas control (no inoculadas), debido a que la obtención de las plantas fue desde un invernadero comercial, donde existe la probabilidad de que los sustratos utilizados contengan microorganismos de manera natural.



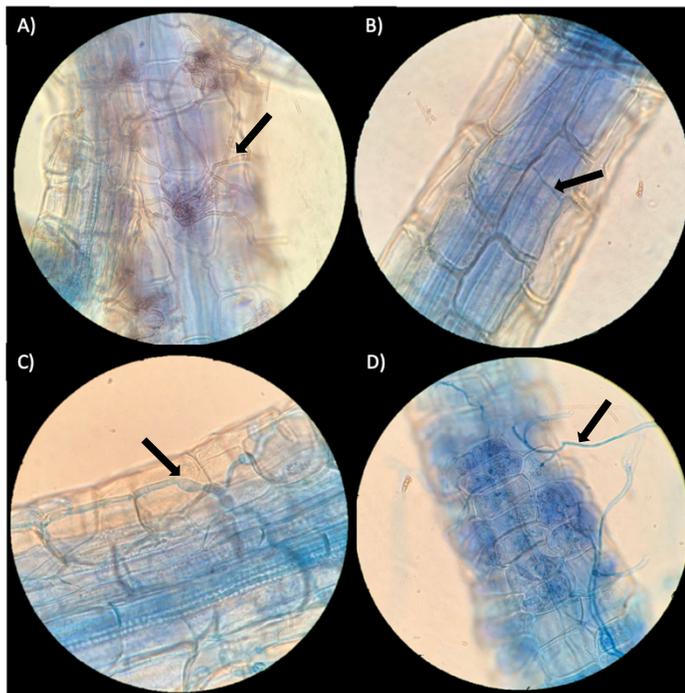
**Figura 44.** Porcentaje de colonización fúngica en plantas de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii* y *M. alpina*, y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

### Estructuras fúngicas en las raíces de arándano (*V. corymbosum*)

El desarrollo de hifas fúngicas en forma de micelio intra y extraradicular se puede observar en la Figura 45, donde es notable que mayoría de las raíces inoculadas con los hongos evaluados presentaron dicha estructura ( $\leq 90\%$ ), con excepción de las plantas inoculadas con *P. fortinii*, el cual es el hongo con menor presencia de hifas fúngicas ( $\leq 50\%$ ). Las características de las hifas de acuerdo al hongo evaluado se pueden observar en la Figura 46.

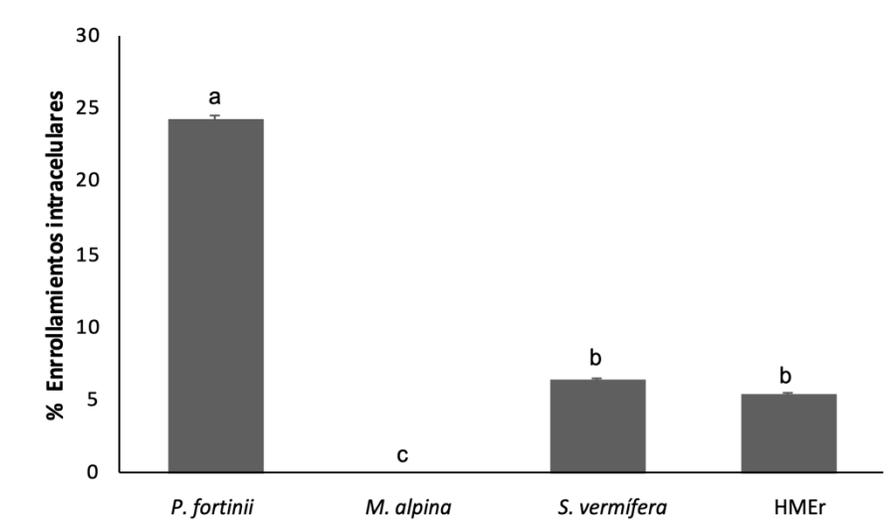


**Figura 45.** Porcentaje de hifas fúngicas presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii*, *M. alpina*, y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

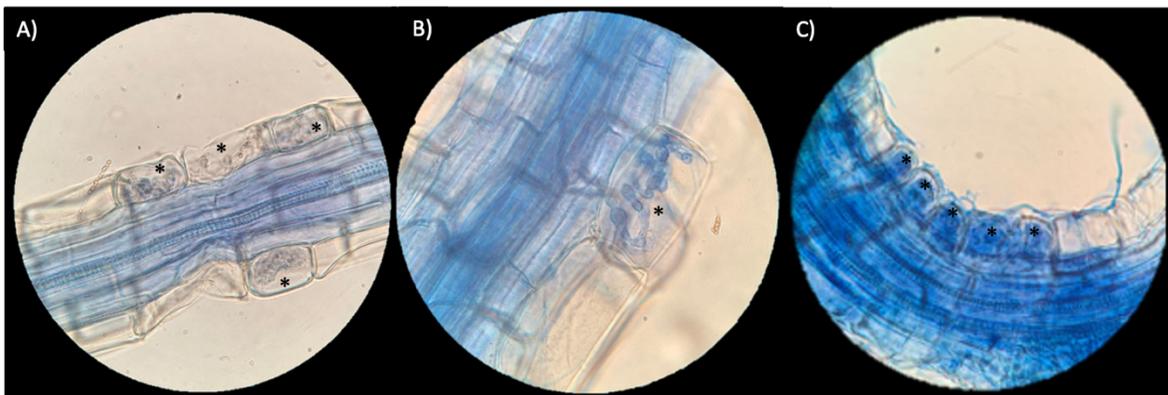


**Figura 46.** Hifas fúngicas (señaladas con flechas) presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera A) *P. fortinii* y B) *M. alpina*, y dos hongos utilizados como referencia C) *S. vermifera* y D) HMEr.

La presencia de estructuras características de una colonización micorrícica como lo son los enrollamientos intracelulares, se observa en la Figura 47. *P. fortinii*, es el hongo que presentó mayor cantidad de esta estructura ( $\leq 25\%$ ). Por su parte, los hongos evaluados como referentes (*S. vermifera* y HMEr) presentaron cerca del 6% mientras que, en los datos obtenidos, resalta *M. alpina*, quien no presentó esta característica en las raíces evaluadas. Fotografías representativas de cada tipo de enrollamiento presentado por los hongos evaluados se puede observar en la Figura 48.

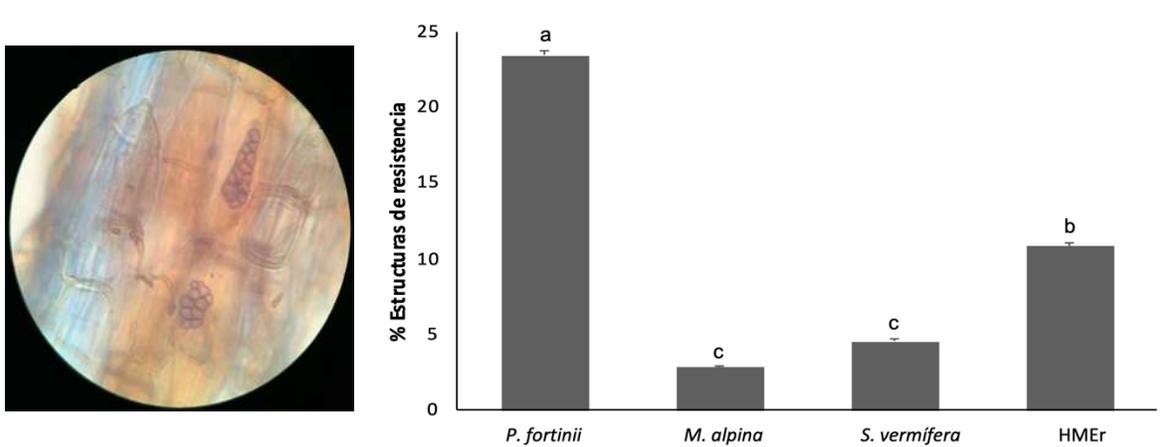


**Figura 47.** Porcentaje de enrollamientos intracelulares presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii* y *M. alpina*, y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).



**Figura 48.** Enrollamientos intracelulares (señalados con asteriscos) presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera A) *P. fortinii* y dos hongos utilizados como referencia B) *S. vermifera* y C) HMEr.

La presencia de estructuras de resistencia como microesclerocios o vesículas en las raíces de las plantas de arándano, también fue una característica evaluada en este experimento. El hongo *P. fortinii*, tuvo una cantidad considerable de dichas estructuras ( $\leq 25\%$ ), mientras que en las raíces inoculadas con HMEr, *S. vermifera* y *M. alpina* se observó un 10.8%, 4.6% y 2.8% respectivamente (Figura 49).



**Figura 49.** Porcentaje de estructuras de resistencia presentes en raíces de arándano inoculado con dos hongos aislados de su rizósfera: *P. fortinii*, *M. alpina*, y dos hongos utilizados como referencia (*S. vermifera* y HMEr). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

#### IV.4. Discusión

Los hongos capaces de formar colonización micorrícica ericoide, son conocidos por mejorar el crecimiento de las plantas de la familia Ericaceae, sin embargo, los resultados de la asociación raíz-hongo en esta familia se ven influenciados por múltiples factores como el estado nutricional, las prácticas de cultivo, las condiciones climáticas, la variedad de plantas hospederas, los patrones de colonización, entre muchos otros. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de estructuras fúngicas de dos hongos aislados de la rizósfera de arándano (*P. fortinii* y *M. alpina*) y dos hongos usados como referencia: un micorrícico aislado de plantas de orquidea (*S. vermifera*) y un micorrícico ericoide, obtenido de manera comercial (HMEr) en las raíces de plantas de arándano propagado mediante esqueje de tallo. Además, se examinaron los efectos de dicha inoculación fúngica después de ocho meses de interacción.

Ericaceae comprende alrededor de 3000 especies acomodadas en 100 géneros, entre los que se encuentran algunas especies potencialmente invasivas como *Gaultheria shallon*, algunas plantas con valor ornamental como *Rhododendron*, así como plantas con valor comercial por su cultivo como *Vaccinium corymbosum*. La obtención de plantas como el arándano azul, generalmente se lleva a cabo mediante semilla, injertos, propagación in vitro y estaca; este último procedimiento puede verse afectado por la capacidad de enraizamiento,

el tipo de sustrato, reguladores de crecimiento, nutrición, tipo de estaca, condiciones climáticas e incluso la condición fisiológica de la planta madre, por lo que es muy frecuente observar altos porcentajes de mortandad de plantas cuando se elige este método (Castro-Garibay et al., 2019). Lo anterior permite una explicación de los resultados reportados en este trabajo, donde solo el 50 % de las plantas propagadas sobrevivieron.

En la naturaleza, los hongos micorrízicos ericoides, mantienen relaciones simbióticas con las ericáceas permitiendo que la raíz huésped acceda a nutrientes orgánicos, mediante una transferencia que se ve facilitada a través de actividades enzimáticas fúngicas extracelulares que son generalmente, secretadas por los hongos (Cairney and Meharg, 2003). En los resultados reportados de este trabajo de investigación, se observó una baja colonización en las plantas control la cual, podría haber surgido de propágulos de hongos que se encuentran de manera natural en el abono de corteza, utilizado comúnmente como sustrato de crecimiento de berries en viveros. Lo anterior, coincide con trabajos como el de Scagel y colaboradores (2005), quienes reportan colonización micorrízica ericoide en porcentajes menores al 5% en plantas de arándano no inoculadas, sugiriendo que el uso de sustrato no esterilizado puede representar un potencial bajo de inóculo.

El estudio de *Vaccinium corymbosum*, inoculado con los hongos *P. fortinii* y *M. alpina* aislados de su rizósfera así como de *S. vermífera* y HMEr obtenidos de plantas de orquideas y de forma comercial respectivamente, mostró porcentajes de colonización entre el 25 y 50%, después de ocho meses de interacción; estos datos resultan favorables en comparación a los reportados por otros autores quienes mencionan rangos de 14 al 20% de colonización micorrízica en plantas inoculadas con hongos micorrízicos ericoides como *Leohumicola*, *Oidiodendron maius* y *Meliniomices* (Bizabani et al., 2016), por lo que encontrar bajos porcentajes de colonización es común en variedades de arándano azul, que crecen bajo condiciones de invernadero comercial (Yand et al., 1998; Scagel and Yang, 2005).

La colonización fúngica también puede verse influenciada por el estado nutrimental del sustrato de crecimiento, en este trabajo de investigación, el experimento en etapa de invernadero no fue enmendado con nutrientes minerales, sin embargo, algunos estudios realizados en condiciones controladas demuestran que los niveles bajos de nitrógeno aumentan la colonización de hongos micorrízicos ericoides (Goulart et al., 1996). Por su

parte, el uso de nutrientes orgánicos puede mejorar este tipo de colonización (Vohnik et al., 2008; Sadowski et al., 2012).

De acuerdo con Tapia-Goné y colaboradores (2010), la capacidad de los hongos micorrícicos de promover el crecimiento de las plantas tiene como base dos factores principales: la infectividad y la efectividad. Mientras que la infectividad es la capacidad del hongo para penetrar e invadir la raíz y explorar el suelo, la efectividad se determina por el efecto del hongo sobre el desarrollo la planta hospedera. Ambos conceptos no siempre están relacionados por lo que, la presencia de colonización micorrícica en altos porcentajes (80-90%) no necesariamente inducirá mayores efectos benéficos sobre la planta, así también, colonizaciones de 15-40% pueden provocar excelentes efectos en la nutrición y desarrollo vegetal (Bago et al., 2000). Un efecto similar a lo anterior se observó en el presente trabajo para el caso del hongo micorrícico orquideoide *S. vermífera*, con el cual se observaron porcentajes de colonización  $\leq 40\%$  sin embargo, ésta especie fúngica tuvo mayor efectividad sobre las variables agrícolas evaluadas en comparación con el resto de los hongos probados.

La variable agrícola de la cantidad de clorofila en las plantas de arándano, muestra una disminución significativa con el paso del tiempo en el experimento, si bien, este comportamiento está ligado al desarrollo vegetativo de las plantas, es importante mencionar que la disminución de la capacidad fotosintética está relacionada con la disponibilidad de carbono, el cual es un elemento indispensable para mantener la simbiosis (Smith et al., 2009), por lo tanto, esta también podría ser una explicación de la baja colonización observada.

El efecto positivo de la inoculación de HMEr sobre la variable de biomasa radicular, sugiere que este hongo promueve la elongación de raíces, lo cual implica que las plantas tengan una mayor superficie para lograr eficientar el proceso de absorción de nutrientes del suelo (Abdalla et al., 2023).

El estado de micorrización tipo ericoide de algunos hongos como *Leohumicola*, *Oidiodendron* y *Meliniomyces* se ha estudiado con anterioridad en distintas plantas ericáceas hospederas (Vega et al., 2009; Villarreal-Ruiz et al., 2012; Grunewaldt-Stocker et al., 2013); estos estudios han reportado su presencia en sitios que van desde ecosistemas quemados, hasta cultivos comerciales de arándano azul (Nguyen and Seifert, 2008) pero de manera desafortunada, los roles funcionales de la mayoría de la mayoría de este tipo de hongos permanece incierto.

En la actualidad, los hongos formadores de micorriza ericoide reconocidos, incluyen un rango taxonómico delimitado y estrecho dentro de Ascomycota y algunos Sebaciales pertenecientes al Phylum Basidiomycota. Durante mucho tiempo, las micorrizas ericoides han permanecido en gran medida como un dominio de ascomicetos (Read, 1983; Kron et al., 2002), considerando a las asociaciones de ericáceas con basidiomicetos como casuales (Leake and Read, 1991). Sin embargo, dicho paradigma revolucionó después de que autores como Berch y colaboradores (2002), Allen y colaboradores (2006), reportaran que la mayoría de los pelos radiculares de plantas ericáceas bajo estudio, contenían ADN de Sebaciales Basidiomicetos.

Posteriormente, se realizaron más estudios con base molecular, que confirmaron que *Sebacina* spp. son el principal taxón de Basidiomicetos detectado en raíces de plantas capaces de formar micorriza ericoide (Bougore et al., 2007; Selosse et al., 2007; Ishida and Nordin, 2010; Walker et al., 2011); en el año 2006, Setaro y colaboradores demostraron que *Sebacinaceae* formó ectendomicorriza cavendishioide. En el presente trabajo de investigación, se corrobora la asociación de *S. vermifera* y una planta ericácea como el arándano azul, además de ser uno de los hongos evaluados que mejoró significativamente la mayoría de las variables agrícolas. Por lo tanto, resulta importante realizar estudios que detallen la asociación para establecerla como micorrícica del tipo ericoide.

Un hongo aislado de arándano (*V. corymbosum*), evaluado en este trabajo fue *P. fortinii*, un endófito septado oscuro (DSE por sus siglas en inglés), habitante de raíces de una gran variedad de plantas; este tipo de hongos tienen una distribución mundial y representan un grupo que interactúa funcional y ecológicamente con otros microorganismos del suelo (Jumponen and Trappe, 1998). De manera particular, *P. fortinii* es el DSE más estudiado y del cual se ha reportado que muy posiblemente, reemplaza a los hongos micorrícicos en sitios con condiciones climáticas y edáficas extremas (Haselwandter and Read, 1980; Read and Haselwandter, 1981; Wang and Wilcox, 1985).

La asociación de las raíces de una planta con DSE, también varían de negativas a neutrales y positivas de acuerdo al desarrollo de las plantas hospederas y para el caso de *P. fortinii*, su colonización se describió principalmente en coníferas sin embargo, diversos autores reportan su aislamiento de las raíces de ericáceas como Rododendros aunque es

necesaria la apertura de estudios morfológicos más específicos (Hambleton and Currah, 1997; Currah et al., 1993).

Tomando en cuenta la amplia distribución del DSE *P. fortinii*, se puede esperar que se encuentre presente en especies ericoides de interés comercial. Lo anterior se confirmó con el presente estudio, además de su capacidad de formar estructuras características de una micorriza ericoide, como los enrollamientos intracelulares reportados, sin embargo, es necesario indagar más acerca de su funcionalidad en plantas de gran interés como el arándano azul así como realizar estudios morfológicos y fisiológicos de dicha asociación.

Las respuestas de la inoculación fúngica varían desde lo neutral a lo positivo; en el caso particular de este trabajo de investigación, la inoculación de plantas de arándano (*V. corymbosum*) con los hongos *P. fortinii* y *M. alpina* aislados de su rizósfera no tuvo influencia significativa sobre las variables agrícolas de altura, tallos secundarios, hojas, inflorescencias y biomasa aérea y radicular sin embargo, la inoculación de los hongos usados como referencia (*S.vermífera* y HMEr), si provocó cambios significativos en la mayoría de las variables a excepción de la altura. Estos resultados coinciden con los reportados por Starret (2003) y Scagel (2005), en los que destaca que la colonización micorrícica no siempre tiene una correspondencia positiva de las respuestas de crecimiento en todas las variedades de arándano azul.

Por lo anterior, resulta interesante el estudio del efecto de estos hongos sobre otras variedades de esta especie vegetal. Por otra parte, es necesario llevar a cabo experimentos de mayor duración para observar efectos notables sobre el crecimiento vegetal de plantas como el arándano incluyendo evaluaciones continuas durante varias temporadas de crecimiento.

#### **IV.5. Conclusiones**

El hongo *P. fortinii* aislado de rizósfera de *V. corymbosum*, así como los hongos utilizados como referencia (el hongo micorrícico orquideoide *S. vermífera* y el hongo micorrícico ericoide HMEr obtenido de manera comercial), participan en asociación micorrícica con plantas de arándano cultivado en el estado de Michoacán, México. Los efectos de inoculación se ven afectados por diversos factores y las respuestas sobre el desarrollo vegetal son diferenciales, sin embargo, el mejoramiento de variables agrícolas como la biomasa aérea,

biomasa radicular, hojas, tallos secundarios e inflorescencias indica que la inoculación de *S. vermífera* y HMEr, puede ser beneficiosa. Es necesario evaluar los efectos de la inoculación de estos hongos en arándanos, en estudios a largo plazo que también midan el rendimiento y la calidad de los frutos.

Por su parte, es imprescindible realizar estudios más detallados que confirmen la función como micorriza ericoide del endófito septado oscuro *P. fortinii*, con la finalidad de elucidar su funcionalidad en plantas de interés agrícola como el arándano azul.

#### IV.6. Referencias

- Abdalla M., Bitterlich M., Jansa, J., Puschel, D., Ahmed, M. A (2023)** The role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in improving plant water status under drought. *Journal of Experimental Botany* 74: 4808-4824.
- Allen TR, Millar T, Berch SM, Berbee ML (2003)** Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytol* 160: 255–272.
- Bago B., Pfeffer, P. E., Schachar-Hill, Y (2000)** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizal. *Plant Physiology* 124:949-958.
- Berch SM, Allen TR, Berbee ML (2002)** Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244: 55–66.
- Bizabani C. and J. Dames (2015)** Effects of inoculation of *Lachnum* and *Cadophora* isolates on the growth of *Vaccinium corymbosum*. *Microbiological Research* 181:68-74.
- Bizabani C., S. Fontanela., J. Dames (2016)** Ericoid fungal inoculation of blueberry under commercial production in South Africa. *Scientia Horticulturae* 209:173-177.
- Bougoure DS, Parkin PI, Cairney JWG, Alexander IJ, Anderson IC (2007)** Diversity of fungi in hair roots of Ericaceae varies along a vegetation gradient. *Mol Ecol* 16: 4624–4636.
- Cairney J.W.G. and A. A. Meharg (2003)** Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *Eur. J. Soil Sci.* 54 (4), 735–740.
- Castro-Garibay, S., Villegas-Monter, A., Contreras-Maya, R. (2019)** Rooting of cuttings in three blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) *Agroproductividad* 12(3), 63–68.
- Currah R.S. and Tsuneda A. (1993)** Vegetative and reproductive morphology of *Phialocephala fortinii* (*Hyphomycetes*, *Mycelium radialis atrovirens*) in culture. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 34: 345–356.

- Daghino S., E. Martino, S. Voyron and S. Perotto (2022)** Metabarcoding of fungal assemblages in *Vaccinium myrtillus* endosphere suggest colonization of above-ground organs by some ericoid mycorrhizal and DSE fungi. *Scientific Reports* 12:1-12.
- Goulart, B.L., Demchak, K., Yang, W.Q. (1996)** Organic matter and nitrogen level effects on mycorrhizal infection in ‘Bluecrop’ highbush blueberry plants. *J. Small Fruit Vitic.* 3 (4), 151–164.
- Grunewaldt-Stöcker, G., von den Berg, C., Knopp, J., Von Alten, H. (2013)** Interactions of ericoid mycorrhizal fungi and root pathogens in Rhododendron: In vitro tests with plantlets in sterile liquid culture. *Plant Root* 7 (0), 33–48.
- Hambleton S. & Currah R. S. (1997)** Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal *Ericaceae*. *Canad. J. Bot.* 75: 1570–1581.
- Haselwandter K. & Read D.J. (1980)** Fungal associations of roots of dominant and subdominant plants in high-alpine vegetation systems with special reference to mycorrhiza. *Oecologia* 45: 57–62.
- Hernández-Cuevas L. V., P. Guadarrama-Chávez., I. Sánchez-Gallen., J. Ramos-Zapata (2008)** Micorriza arbuscular: colonización intraradical y extracción de esporas. En: Álvarez-Sánchez, J., A. Monroy-Ata. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. Pp. 1-13
- Ishida TA, Nordin A (2010)** No evidence that nitrogen enrichment affect fungal communities of *Vaccinium* roots in two contrasting boreal forest types. *Soil Biol Biochem* 42: 234–243.
- Jumpponen A. and Trappe J.M. (1998)** Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root – colonizing fungi. *New Phytol.* 140: 295–310.
- Kron KA, Judd WS, Stevens PF, Crayn DM, Anderberg AA, et al. (2002)** Phylogenetic classification of Ericaceae: Molecular and morphological evidence. *Bot Rev* 68: 335–423.

**Leake JR, Read DJ (1991)** Experiments with ericoid mycorrhiza. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK, editors. *Methods in Microbiology* Vol. 23. London, UK: Academic Press, p 435–459.

**Mu D., N. Du and J. J. Zwiazek (2021)** Inoculation with ericoid mycorrhizal associations alleviates drought stress in lowland and upland velvetleaf blueberry (*Vaccinium myrtilloides*) seedlings. *Plants* 10:2786.

**Nguyen, H.D.T., Seifert, K.A. (2008)** Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States. *Persoonia: Mol. Phylogeny Evol. Fungi.* 21, 57.

**Pescie M. A., M. Fradkin, R. S. Lavado and V. M. Chiocchio (2021)** Endophytic fungi in blueberry cultivars, in the production areas of Argentina. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 115:101662.

**Pescie M. A., M. Montecchia, R. Lavado and V. Chiocchio (2023)** Inoculation with *Oidiodendron maius* BP improves nitrogen absorption from fertilizer and growth of *Vaccinium corymbosum* during the early nursery stage. *Plants.* 12:1-8.

**Phillips J. & Hayman D (1970)** Improved procedures for clearing roots and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of the infection. *Transactions of the British Mycological Society.* 55: 158-161.

**Read DJ (1983)** The biology of mycorrhiza in the Ericales. *Can J Bot* 61: 985– 1004.

**Read D. J. (1996)** The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany.* 77:365-374.

**Read D.J. & Haselwandter K. (1981)** Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytol.* 88: 341–352.

**Sadowsky, J., Hanson, E.J., Schilder, A.M.C. (2012)** Root colonization by ericoid mycorrhizae and dark septate endophytes in organic and conventional blueberry fields in Michigan. *Int. J. Fruit Sci.* 12, 1–3.

**Scagel, C.F. (2005)** Inoculation with ericoid mycorrhizal fungi alters fertilizer use of highbush blueberry cultivars. *HortScience* 40 (3), 786–794.

**Scagel, C.F., Yang, W.Q. (2005)** Cultural variation and mycorrhizal status of blueberry plants in NW Oregon commercial production fields. *Int. J. Fruit Sci.* 5 (2), 85–111.

**Selosse MA, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C, et al. (2007)** Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytol* 174: 864–87.

**Setaro S, Weiss M, Oberwinkler F, Kottke I (2006)** Sebaciniales form ectendomycorrhizas with *Cavendishia nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytol* 169: 355–365.

**SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2022)** Panorama Agroalimentario 2022. Ciudad de México. <https://drive.google.com/file/d/1jVWS4EFKK7HGwQOBpGeljUyaDT8X8Iyz/view> (Junio 2023)

**Smith F. A., Grace, E. J., Smith, S. E (2009)** More than carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 182: 347-358.

**Starret, M.C. (2003)** Initial shoot growth and development of micropropagated blueberry plants following inoculation with and ericoid mycorrhizal isolate. *Acta Hort.* 626, 191–197.

**Swaroop R., S. Kumar, R. Datta, R. Lal, V. Vijayakumar, M. Brtnicky, M. P. Sharma... and T. Danso (2020)** Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: a review. *Land.* 9:1-21.

**Tapia-Goné J. J., Ferrera.Cerrato, R., Varela-Fregoso, L., Rodríguez-Ortíz, J. C., Soria-Colunga, J. C., Tiscareño-Iracheta, M. A., Loreto-Osti, C., Alcalá-Jauregui, J., Villar-Morales, C (2010)** Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista Mexicana de Micología* 31: 69-74.

**Van Geel M., H. Jacquemyn, G. Peeters, K. Van Acker, O. Honnay and T. Ceulemans (2020)** Diversity and community structure of ericoid mycorrhizal fungi in European bogs and heathlands across a gradient of nitrogen deposition. *New Phytologist* 228:1640-1651.

**Vega, A.R., Garciga, M., Rodríguez, A., Prat, L., Mella, J. (2009)** Blueberries mycorrhizal symbiosis outside of the boundaries of natural dispersion for ericaceous plants in Chile. *Acta Hort.* 810, 665–672.

**Villarreal-Ruiz, L., Neri-Luna, C., Anderson, I.C., Alexander, I.J. (2012)** In vitro interactions between ectomycorrhizal fungi and ericaceous plants. *Symbiosis* 56 (2), 67–75.

**Waters, E.K., Scagel, C.F., McLean, C. (2008)** A survey of *Vaccinium* cultural practices in Australia emphasizing implications for mycorrhizal infection. *Int. J. Fruit Sci.* 8 (1–2), 109–124.

**Vohník M., M. Pánek, J. Fehrer and M. A. Selosse (2016)** Experimental evidence of ericoid mycorrhizal potential within Serendipitaceae (Sebacinales). *Mycorrhiza* 26:831-846.

**Walker JF, Aldrich-Wolfe L, Riffel A, Barbare H, Simpson NB, et al. (2011)** Diverse Helotiales associated with the roots of three species of Arctic Ericaceae provide no evidence for host specificity. *New Phytol* 191: 515–527.

**Wang C.J.K. & Wilcox H.E. (1985)** New species of ectendomycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi: *Phialophora finlandia*, *Chloridium paucisporum* and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia* 77: 951–958.

**Yang, W.Q., Goulart, B.L., Demchak, K. (1998)** Mycorrhizal infection and plant growth of highbush blueberry in fumigated soil following soil amendment and inoculation with mycorrhizal fungi. *HortScience* 33 (7), 1136–1137.

## 8. DISCUSION GENERAL

El uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, es una de las principales alternativas al uso de productos sintéticos en la agricultura actual, que encamina hacia la producción de alimentos con un enfoque de protección del medio ambiente (Calvo et al., 2014). Teniendo en cuenta el actual aumento de la población mundial, se hace imprescindible la necesidad de una agricultura sostenible con la capacidad de preservar el futuro de la humanidad. Por otro lado, el mundo enfrenta grandes desafíos con respecto a la productividad de los cultivos, por lo que la degradación del suelo y otros recursos naturales están cada vez más en riesgo.

El uso y aplicación de inoculantes biológicos en sistemas agrícolas, ha sido ampliamente examinado. En el presente trabajo de investigación, se identificaron hongos patógenos como: *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *A. alternata* que con frecuencia se han aislado de arándano (Moya-Elizondo et al., 2019; Wang et al., 2021; Ramos-Bell et al., 2022), así como *Phialemonium obovatum*, un hongo saprófito oportunista de importancia clínica (Gams y McGinnis, 1983).

Los hongos endófitos septados oscuros, son habitantes comunes de plantas ericáceas (Vohnik and Albrechtova, 2011). *Phialocephala fortinii*, otro hongo aislado en este trabajo, pertenece a dicha clasificación que comúnmente se encuentra en las raíces de plantas con un amplio rango de distribución geográfica y con capacidad de mejorar la absorción de nutrientes (Surono y Narisawa, 2021). De acuerdo a Yang y colaboradores (2018), existe predominancia de especies de endófitos septados oscuros representantes del complejo *Phialocephala fortinii* sensu lato (s.l.)–*Acephala applanata* (PAC) en micobiotas de raíces que se desarrollan en suelos ácidos, lo cual se comprueba con el presente estudio donde se aisló a *P. fortinii* de raíces de arándano, una planta que se desarrolla en suelos con pH de 4.5 a 5.2 donde generalmente, el acceso de la planta a nutrientes minerales es complicado.

Por otro lado, el aislamiento de *P. fortinii* de raíz de *V. corymbosum* cultivado en México, coincide con un estudio realizado por Yang y colaboradores (2018), en el cual, los autores investigaron la diversidad de hongos micorrícicos ericoides en *Vaccinium*

*uliginosum*, en China, en el cual reportan además de *P. fortinii*, a otros hongos de importancia micorrízica como *Clavaria*, *Oidiodendron*, *Lachnum*, *Acephala* y *Phialocephala*. Adicionalmente, proponen un modelo putativo para la coexistencia entre hongos formadores de micorriza ericoide y hongos endófitos septados oscuros en las raíces de *V. uliginosum* sugiriendo que, bajo estrés ambiental, como bajas temperaturas y poca disponibilidad de nutrientes, las plantas ericoides pueden favorecer la co-colonización de ambos tipos de hongos.

*Mortierella alpina* también es un hongo aislado en este trabajo; perteneciente a un género con muy rara presencia de especies patógenas, lo que conlleva a que la mayoría de las especies se consideran como una fuente prometedora al utilizarse como inoculantes promotores de crecimiento vegetal (Mehrotra y Bajjal, 1963). Este hongo aislado en el año 2014 por Yadav y colaboradores (2014) en Corea y de manera más reciente de plantas de Chile, aguacate y manzano (Hernández et al., 2018; Mares-Ponce de León et al., 2018; Díaz-Aguilar et al., 2022) ha sido poco estudiado por lo que este trabajo representa un avance importante de su aislamiento de suelo rizosférico de una planta ericácea como el arándano azul (*V. corymbosum*). De acuerdo al reporte de Wang y colaboradores (2022), es interesante analizar su potencial para aliviar los síntomas de enfermedad causados por patógenos como *F. oxysporum* y aumentar el contenido de nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo, disponibles en el suelo de la rizosfera.

En la actualidad, se han reportado una gran variedad de microorganismos como candidatos para considerarse como agentes de biocontrol, entre los que destacan los actinomicetos gracias a su capacidad de producir un espectro amplio de antibióticos como metabolitos secundarios (Nishimura et al., 2002). Existen trabajos que reportan el aislamiento de actinomicetos de plantas ericáceas como *Calluna vulgaris*, lo cual coincide con los resultados de este estudio en el cual, se aislaron tres actinomicetos clasificados únicamente de manera morfológica. Hamin y colaboradores (2019), indican que la mayoría de estos microorganismos presentes en *C. vulgaris*, pertenecen al género *Streptomyces*, por lo tanto, es importante realizar estudios detallados para clasificar a los actinomicetos asociados a *V. corymbosum*, cultivado en Michoacán con la finalidad de conocer su funcionalidad en el desarrollo vegetal de esta planta de interés agrícola.

La interacción entre microorganismos y plantas, ha sido de gran interés durante mucho tiempo, ya que las plantas producen compuestos como azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas que los microorganismos utilizan como nutrientes o bien participan como señales bioquímicas que son útiles para su asociación. A su vez, estas poblaciones de microorganismos que pueden ser bacterias u hongos, liberan hormonas y compuestos orgánicos que regulan el crecimiento y la morfogénesis de las plantas (Ortiz-Castro et al., 2009).

*Arabidopsis thaliana* se ha utilizado ampliamente como planta modelo para la investigación de los efectos de las señales ambientales en el crecimiento de las plantas. Anteriormente, se ha reportado que diferentes microorganismos que han causado diversos efectos sobre *A. thaliana*, entre los que destaca su influencia favorable en su desarrollo (López-Bucio et al., 2006; Palacio-Rodríguez et al., 2017). Gutiérrez-Luna y colaboradores (2010), informaron aislamientos de *Bacillus* sp., con la capacidad de aumentar el desarrollo de plantas y sus raíces a través de compuestos orgánicos volátiles. En nuestra investigación, también se demostró que *P. fortinii* y *M. alpina* favorecieron el desarrollo vegetal de *A. thaliana*, mediante la emisión de compuestos volátiles con lo que se puede comprobar que en muchos de los mecanismos que utilizan los microorganismos para interactuar con las plantas y promover su desarrollo vegetal, la emisión de compuestos orgánicos volátiles tienen un rol crucial.

Los resultados de este trabajo, sugieren que la presencia de una barrera física que evita el contacto directo hongo-planta permite que los compuestos volátiles desencadenen respuestas que promueven la división y elongación celular, con lo que se logra estimular su crecimiento. Esto coincide con trabajos como los de Coria- Arellano y colaboradores (2023) y Contreras-Cornejo y colaboradores (2009), donde se reporta que los efectos observados son el resultado de la presencia de compuestos fúngicos similares a las auxinas. En nuestro estudio, no se determinaron los compuestos liberados por los hongos, sin embargo, se conoce que algunas especies del género *Mortierella* sintetizan fitohormonas como ácido indolacético y ácido giberélico, colocándolos en un lugar importante como hongos promotores de desarrollo vegetal (Ozimek et al., 2018). Por lo anterior, es importante llevar a cabo estudios que profundicen en la identidad de los compuestos sintetizados en las interacciones planta-

hongo para abrir una brecha hacia el mejor aprovechamiento de los beneficios de inóculos biológicos sobre el cultivo de berries como el arándano azul.

Contrario a lo observado por Casarrubia y colaboradores (2016), quienes utilizaron las mismas configuraciones experimentales y observaron una promoción de crecimiento de *A. thaliana* en cajas Petri no compartimentadas, sugiriendo que tanto las moléculas volátiles como difusibles, son responsables de la respuesta vegetal, en nuestro estudio no se observó promoción de crecimiento en cajas no compartimentadas por lo que es posible que el contacto directo planta-hongo desencadene mecanismos donde se involucran compuestos reportados como inductores de defensa vegetal como el ácido jasmónico, ácido salicílico y/o otros metabolitos que suprimen el desarrollo vegetal (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2016).

*Arabidopsis thaliana* también cuenta con una extensa colección de mutantes y líneas de sobreexpresión de genes relacionados con la homeostasis hormonal. Actualmente está disponible un número cada vez mayor de líneas que expresan promotores inducibles fusionados a genes indicadores, que codifican proteínas o enzimas fluorescentes que pueden usarse para investigar a nivel de tejido específico los efectos de aislados de hongos seleccionados. Este tipo de experimentos llevados a cabo *in vitro*, permiten investigar los primeros pasos en la comunicación y el reconocimiento planta-hongo (Mendoza-Vazquez *et al.*, 2019). Los resultados de este estudio mostraron que existe una regulación positiva de los genes involucrados en la síntesis de citocininas y auxinas la cual, permite ampliar el conocimiento acerca del proceso mediante el que las plantas perciben a los microorganismos evaluados. Mientras que *P. fortinii*, promueve el crecimiento vegetal de *A. thaliana*, mediante mecanismos relacionados con la producción de auxinas y citocininas, *S. vermifera* influye en el desarrollo vegetal mediante la activación de mecanismos involucrados con las citocininas.

La generación de información acerca de los mecanismos activados por la presencia de compuestos volátiles, emitidos por *M. alpina* que promueven el desarrollo vegetal de *A. thaliana* reportada en el presente trabajo, puede considerarse como uno de los principales en evaluar la respuesta de la planta modelo en interacción con este hongo y los demás evaluados, por lo que se les pueden atribuir características potenciales como bioestimulantes vegetales.

Así como es posible que los microorganismos mejoren el desarrollo de las plantas, también son capaces de inducir en ellas procesos de defensa cuando dicho microorganismo representa una amenaza. Estos procesos activan respuestas que desencadenan la síntesis de sustancias como el ácido jasmónico o ácido salicílico (Bostock, 2005), con la finalidad de mejorar sus posibilidades de desarrollo. Los resultados de este trabajo permiten identificar las respuestas vegetales de defensa, que involucran la producción de ácido salicílico únicamente cuando las plantas de *A. thaliana* se encuentran en contacto directo con los hongos *M. alpina*, HMEr y *P. fortinii*. Por otro lado, la expresión del gen reportero del ácido jasmónico, se observa incrementado en contacto directo e indirecto con la mayoría de los hongos evaluados a excepción de los compuestos volátiles de *P. fortinii*. Estos resultados demuestran la importancia de los mediadores genéticos que involucran la síntesis de fitohormonas como citocininas, auxinas, ácido jasmónico y ácido salicílico desencadenada por los microorganismos aislados de raíz y rizósfera de arándano y que tienen implicaciones directas en la adaptación y supervivencia de las plantas.

Otra opción de las plantas para mejorar su éxito es su asociación con microorganismos benéficos. En el caso del arándano, los hongos que se asocian a él, son capaces de formar colonización micorrícica ericoide para mejorar el crecimiento vegetal, sin embargo, los resultados de la asociación raíz-hongo en esta familia se ven influenciados por múltiples factores. La inoculación de *P. fortinii* en este estudio, permitió comprobar su capacidad de formar estructuras características de una micorriza ericoide, como los enrollamientos intracelulares sin embargo, es necesario indagar más acerca de su funcionalidad en plantas de gran interés como el arándano azul, así como realizar estudios morfológicos y fisiológicos de dicha asociación. Lo anterior resulta importante debido a que algunos autores como Yang y colaboradores (2018), han situado a *P. fortinii* como un hongo formador de micorriza ericoide putativo, a la par de otros como *Oidiodendron*, *Lachnum*, *Phialocephala*, *Clavaria*, *Acephala* y *Meliniomyces* después de encontrarlos en raíces de *V. uliginosum*. Es por esto que los resultados de esta investigación representan un antecedente más para la confirmación del estado micorrícico ericoide de *P. fortinii*, aunque claramente son necesarios estudios más detallados de esta asociación entre los que destaca la determinación del intercambio bidireccional de carbono y nitrógeno así como otras pruebas específicas que involucren sistemas de señalización en el proceso de reconocimiento planta-microorganismo.

A pesar de que la inoculación de *M. alpina* no mostró la capacidad de formar estructuras micorrícicas, pueden analizarse otras opciones de aprovechamiento de este aislado. Por otra parte, el estudio de los efectos de un hongo micorrícico orquideoide como *S. vermífera*, perteneciente al llamado "clado B" dentro de las Sebaciniales (recientemente reclasificadas como Serendipitaceae), (Ray y Craven, 2016), sobre el crecimiento de una planta ericácea, llevado a cabo en este trabajo, también abre una brecha para dilucidar su potencial como formador de micorrizas en plantas ericáceas. Sus efectos sobre las variables agrícolas evaluadas, permite plantear numerosas preguntas de investigación básica, sobre la evolución de las simbiosis micorrícicas y colocan a este hongo como uno de los principales promotores de crecimiento de plantas de arándano. Por lo anterior, los resultados de este estudio pueden atribuirle a *S. vermífera*, un potencial agrícola que no ha sido estudiado ampliamente.

Adicionalmente, es importante mencionar que el uso de *A. thaliana* como modelo de predicción para la selección de microorganismos benéficos de la rizósfera de arándano, resultó favorable. Sin embargo, los efectos de los hongos en condiciones de invernadero con plantas de arándano se reportan diferenciales, lo cual puede atribuirse a la variedad de factores que intervienen en el establecimiento de este tipo de experimentos; aun así, la modularidad de la planta modelo es funcional para estudiar el efecto de microorganismos de la rizósfera. Con respecto a lo anterior, es importante analizar el efecto de los hongos seleccionados sobre otras variedades de arándano, así como llevar a cabo experimentos de mayor duración, que incluyan evaluaciones continuas durante varias temporadas de crecimiento, así como establecer criterios detallados que aseguren en estado micorrícico ericoide de los aislados, que en este trabajo fueron capaces de formar estructuras típicas de esta asociación.

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

El presente estudio es un aporte importante acerca de la identidad de las especies fúngicas asociadas con *Vaccinium corymbosum* en el estado de Michoacán, México; sin embargo, son necesarios estudios más detallados que amplíen el panorama acerca de la diversidad fúngica, asociada a las diversas variedades cultivadas en el estado.

La estimulación de crecimiento de plantas de *A. thaliana* (Col 0), otorgada por los hongos *P. fortinii* y *M. alpina*, permite visualizar a estos hongos con potencial al usarse como promotores de desarrollo vegetal. A pesar de que los efectos no sean tan notables al evaluarse en plantas de arándano en condiciones de invernadero, los resultados reportados logran ser un antecedente importante para ampliar el conocimiento acerca del estado micorrícico ericoide de *P. fortinii* y la funcionalidad de *M. alpina*, de lo cual existen pocos reportes a la fecha. La evaluación de hongos referentes como *S. vermífera* y HMEr, resultó benéfica para el desarrollo vegetal y comprobó la capacidad de formar estructuras micorrícicas en plantas de interés agrícola en el estado de Michoacán, como lo es el arándano azul. Es necesario evaluar los efectos de la inoculación de estos hongos en arándanos en estudios a largo plazo que también midan el rendimiento y la calidad de los frutos.

La expresión de genes de respuesta hormonal y de defensa, sugiere que la promoción del crecimiento se lleva a cabo mediante compuestos volátiles que de ser estudiados con más detalle en experimentos posteriores, representarán un gran avance para explotar los beneficios que estos hongos otorgan a las plantas colocando a estos hongos como un recurso biológico imprescindible para estimular el crecimiento de especies cultivables.

## 10. REFERENCIAS GENERALES

**Addy H. D., S. Hambleton., R. S. Currah (2000)** Distribution and molecular characterization of the root endophyte *Phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta. *Mycology Research*. 104 (10):1213-1221.

**Al-Shehbaz I. A., S. L. O’Kane (2002)** Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). See Ref. 149a, pp. 22

**Allen T. R., T. Millar., S. M. Berch., M. Berbee (2003)** Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *The New Phytologist*. 60-1:255-272.

**Alarcón-Barrera K. S., D. S. Armijos-Montesinos., M. García-Tenesaca., G. Iturralde and J. M. Alvarez-Suarez (2018)** Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage. *Journal of Berry Research*, 8, 223-236.

**Aldaba-Márquez J., V. Concha-Herrera., V. Enciso-Muñoz., J. Carranza- Concha (2016)** Funcionalidad del arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 423-428.

**Anticona M., A. M. Frígola., y M. J. Esteve (2016)** Determinación de poli fenoles totales en arándanos y productos derivados. *UCV-Scientia*, 8, 13- 14.

**Arteaga A and H. Arteaga (2016)** Optimización de la capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y capacidad de rehidratación en polvo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulado con mezclas de hidrocoloides. *Scientia Agropecuaria*, 7, 191-200.

**Arteaga M., M. J. Andrade and C. Moreno (2014)** Relación del Desarrollo del Color con el Contenido de Antocianinas y Clorofila en Diferentes Grados de Madurez de Mortiño (*Vaccinium floribundum*). *Enfoque UTE*, 5(2), 14- 28.

**Baba T., D. Hirose., N. Sasaki., N. Watanabe., N. Kobayashi., N. Kurashige and T. Ban (2016)** Mycorrhizal formation and diversity of endophytic fungi in hair roots of *Vaccinium odhamii* Miq. in Japan. *Microbes and Environments*. 31(2) 186-189.

**Bizabani C., S. Fontanela., J. F. Dames (2016)** Ericoid fungal inoculation of blueberry under commercial production in South Africa. *Scientia Horticulturae*. 209:173-177.

**Bruzzone M. C., J. Fehrer., S. Fontanela., M. Vohnik (2017)** First record of *Rhizoscyphus ericae* in Southern Hemisphere's Ericaceae. *Mycorrhiza*. 27:147-163.

**Buitrago C., M. Rincón., H. Balaguera y G. Ligarreto (2015)** Tipificación de Diferentes Estados de Madurez del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7521- 7531.

**Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014)**. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1- 2), 3-41. <http://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>

**Camacho M (2013)** Los Páramos Ecuatorianos: Caracterización y Consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible. *Anales de la Universidad Central del Ecuador* 1, (372), 78-92.

**Casarrubia S., S. Sapienza., H. Fritz., S. Daghino., M. Rosenkranz., J. Schnitzler., F. Martin., S. Perotto., E. Martino (2016)** Ecologically different fungi affect Arabidopsis development: contribution of soluble and volatile compounds. *Plos One*. 1-13.

**Chamorro F. y G. Nates (2015)** Biología Floral y Reproductiva de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) en los Andes Orientales de Colombia. *Biología Tropical*, 63(4), 1197-1212.

**Chaparro M y F. Ramírez (1993)** Notas sobre la morfología, anatomía y germinación del agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*, 10(2), 151-159

**Chaparro M y N. Becerra (1999)** Anatomía del fruto de *Vaccinium floribundum* (Ericaceae). *Acta biológica Colombiana*, 4(1), 47-60.

**Coba-Santamaría P., D. Coronel, K. Verdugo., M. F. Paredes y L. Huachi (2012)** Estudio Etnobotánico del Mortiño (*Vaccinium floribundum*) como Alimento Ancestral y Potencial Alimento Funcional. *La Granja, Revista de Ciencias de la Vida*, 16(2), 5-7.

**Cobo M. M., B. Gutiérrez., A. F. Torres and M. L. Torres (2016)** Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical Systematics and Ecology*, 64, 14-21.

**Cordero, I., Balaguer, L., Rincón, A., & Pueyo, J. J. (2018).** Inoculation of tomato plants with selected PGPR represents a feasible alternative to chemical fertilization under salt stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 181(5), 694-703. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700480>

**Coronel L., J. B. Pérez y N. León (2019)** Influencia de diferentes agentes encapsulantes en la retención de vitamina C en el zumo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) atomizado. *Agroindustrial Science*, 9(1), 47-52.

**Couture M., J.A. Fortín, Y. Dalpe (1983)** *Oidiodendron griseum* Robak: an endophyte of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium* spp, *New Phytol.* 95:375–380.

**Cuesta C. y E. Cires (2011)** *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en biología. *Biol. Cien. Nat.* 52: 175-178.

**Deyu M., D. Ning., J. J. Zwiazek (2021)** Inoculation with ericoid mycorrhizal associations alleviates drought stress in lowland and upland velvetleaf blueberry (*Vaccinium myrtilloides*) seedlings. *Plants*. 10(2786). 1-14.

**Fan M., W. Lian., T. Li., Z. Rao and L. Wang (2020)** Characterization of promising natural blue pigment from *Vaccinium bracteatum* thunb. leaves: Insights of the stability and the inhibition of  $\alpha$ -amylase. *Food Chemistry*, 126962.

**FAO (2017)** *Identificación de Cultivos de Importancia Económica Impactados por la Zoopolinización*. FAO. Roma, Italia.

**Franco Y., B. Rojano., A. F. Alzate., C. E. Restrepo y M. E. Maldonado Celis (2016)** Efecto del Tiempo de Almacenamiento Sobre Propiedades Fisicoquímicas y Antioxidantes de Productos Derivados del Fruto Agraz. *Vitae*, 23, 184-193.

**González A., J. Riquelme., A. France., H. Uribe y C. Becerra (2017)** *Manual de manejo agronómico del arándano*. INIA. Santiago, Chile. 98 pp.

**Gutiérrez M. E. (2014)** *Vaccinium floribundum*. Catálogo virtual de flora de Alta Montaña. Disponible en: <https://catalogofloraaltamontana.eia.edu.co/species/36>.

**Gutiérrez-Luna, F. M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., Reyes-de la Cruz (2010)** Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 51(1):75-83

**Hambleton S., R. S. Currah (1997)** Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae, *Can. J. Bot.* 75 (1997) 1570–1581.

**Haruma T., K. Yamaji., H. Masuya (2021)** *Phialocephala fortinii* increases aluminium tolerance in *Miscanthus sinensis* growing in acidic mine soil. *Letters in applied microbiology*. 73(3). 300-307.

**Hernández I., P. B. Bautista and N. Arellanes (2017)** Evaluación de la calidad de fruta de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) var. Biloxi, en dos regiones de Oaxaca. *Unica*, 6, 258.

**Huhdorf K., B. Munzengerger., D. Begerow., C. Karasch-Wittmann., J. Gómez-Laurito., R. F. Huttl (2014)** *Sebacina* sp. Is a mycorrhizal partner of *Comarostaphylis arbutoides* (Ericaceae). *Mycol Progress*. 13:733.744.

**Hurkova K., L. Uttl., J. Rubert., K. Navratilova and J. Hajslova (2019)** Cranberries versus lingonberries: A challenging authentication of similar *Vaccinium* fruit. *Food Chemistry*, 284, 162-170.

**Jiménez V and A. Abdelnour (2018)** Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Tecnología en Marcha*, 31(1), 144–159.

**Kim H. N., J. K. Baek., S. Park., J. D. Kim and J. B. Jeong (2019)** Anti-inflammatory effect of *Vaccinium oldhamii* stems through inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK/ATF2 signaling activation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 291-297

**Kogel K.H., P. Franken., R. Huckelhoven (2006)** Endophyte or parasite – what decides? *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 358–363.

**Llerena W., I. Samaniego., M. Ramos y B. Brito (2014).** Caracterización Físicoquímica y Funcional de Seis Frutas Tropicales y Andinas Ecuatorianas. *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 22(2), 13-22.

**López-Bucio, J., Acevedo-Hernandez, G., Ramirez-Chavez, E., Molina-Torres, J., & Herrera-Estrella, L. (2006).** Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 523-529. [https:// doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.002](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.002)

**Lujan M. E., C. I. Ayala., E. F. Castillo., C. Pinedo and C. Durand (2018)** Desarrollo de un gel de fruto de *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) con actividad regeneradora de tejido dérmico. *Arnaldoa*, 25(2), 529-538.

**Mandyam K., A. Jumpponen (2005)** Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi, *Stud. Mycol.* 53 (2005) 173–189.

**Martin T., R. Schmidt., T. Altmann and W. B. Frommer (1992)** Nondestructive assay systems for detection of  $\nu$ -glucuronidase activity in higher plants. *Plant Mol. Biol. Repr.* 10, 37:46.

**Meinke D. W., J. M. Cherry., C. Dean., S. D. Rounsley., M. Koornneef (1998)** *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282:662–82.

**Mendoza-Vazquez, M. A., Espinoza-Madrigal, R. M., Muñoz-Parra, E., Flores-García, A., Huerta-Venegas, P. I., Ruíz-Herrera, L. F., Martínez-Pacheco, M., López-Bucio, J. (2019)** Growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings in interaction with fungi isolated from stem-end rot of avocado fruits. *Achieves of pathology and plant protection* 52 (7-8): 681-697.

**Millar A. J., S. R. Short., N. H. Chua and S. A. Kay (1992)** A novel circadian phenotype based on luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4, 1075:1087.

**Mora-Ruiz, M. R., Alexandre-Colomo, C., Ledger, T., Gonzalez, B., Orfila, A., & Rossello-Mora, R. (2018).** Non-halophilic endophytes associated with the euhalophyte *Arthrocnemum macrostachyum* and their plant growth promoting activity potential. *FEMS Microbiology Letters*, 365(19), 1-11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny208>

**Mu D., N. Du and J. J. Zwiazek (2021)** Inoculation with ericoid mycorrhizal associations alleviates drought stress in lowland and upland velvetleaf blueberry (*Vaccinium myrtilloides*) seedlings. *Plants* 10:2786.

**Nagulsamy P., R. Ponnusamy and P. Thangaraj (2015)** Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer properties of *Vaccinium leschenaultii* Wight: A therapeutic supplement. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 376-386.

**Ormazábal Y., C. Mena., J. Cantillana y G. Lobos (2020)** Caracterización de Predios Productores de Arándanos (*Vaccinium corymbosum*), Según Nivel Tecnológico. El caso de la Región del Maule-Chile. *Información tecnológica*, 31(1), 41-52.

**Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macias-Rodriguez, L., & Lopez-Bucio, J. (2009).** The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 701-712. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>

**Palacio-Rodríguez, R., Coria-Arellano, J. L., López-Bucio, J., Sánchez-Salas, J., Muro-Pérez, G., Castañeda-Gaytán, G., & Sáenz-Mata, J. (2017).** Halophilic rhizobacteria from *Distichlis spicata* promote growth and improve salt tolerance in heterologous plant hosts. *Symbiosis*, 73, 179-189. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0481-8>

**Parada R., E. Marguet., M. Vallejo (2017)** Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 19(2): 15-23.

**Perotto S., S. Daghino., E. Martino., S. Voyron (2022)** Metabarcoding reveals diverse endophytic fungal communities in *Vaccinium myrtillus* plant organs and suggest systemic distribution of some ericoid mycorrhizal and DSE fungi. Research Square.

**Pescie M. A., M. Montecchia, R. Lavado and V. Chiochio (2023)** Inoculation with *Oidiodendron maius* BP improves nitrogen absorption from fertilizer and growth of *Vaccinium corymbosum* during the early nursery stage. *Plants.* 12:1-8.

**Racines-Oliva M., R. Hidalgo-Verdezot and W. Vasquez-Castillo (2016)** Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) domestication: Andean fruit with high food industry potential. *Agronomía Colombiana Suplemento*, (1), S51- S53.

**Read D. J. (1996)** The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany.* 77:365-374, <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0044>

**Reyes I. Y., C. E. Villacres., S. G. Santacruz., M. R. Castro and A. C. Armas (2019)** Efecto antibacteriano y antioxidante de frutos rojos ecuatorianos sobre streptococcus mutans: estudio in vitro. *Odontología Vita,l* 31, 23-30.

**Rodríguez-Daza M. C., L. Daoust., L. Boutkrabt., G. Pilon and Y. Desjardins (2020)** Wild blueberry proanthocyanidins shape distinct gut microbiota profile and influence glucose homeostasis and intestinal phenotypes in high-fat high-sucrose fed mice. *Scientific Reports*, 10(1), 2217.

**Romero C (2016)** *El Arándo en el Perú y el Mundo*. Ministerio de Agricultura y Riego. Lima, Perú. 43 pp.

**Sadowsky J.J., E.J. Hanson., A.M. Schilder (2012)** Root colonization by ericoid mycorrhizae and dark septate endophytes in organic and conventional blueberry fields in Michigan, *Int. J. Fruit Sci.* 12:167–187.

**Salgado C., P. Sánchez., H. V. Volke y M. T. B. Colinas (2018)** Respuesta Agronómica de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) al Estrés Osmótico. *Agrociencia*, 52(2), 231-239.

**Santos M., I. Cesanelli., F. Diáñez., B. Sánchez-Montesinos., A. Moreno-Gavira (2021)** Advances in the role of dark septate endophytes in the plant resistance to abiotic and biotic stresses. *Journal of Fungi.* 7(939): 2-15.

**Scagel C (2005)** Inoculation with ericoid mycorrhizal fungi alters fertilizer use of highbush blueberry cultivars, *Hortscience* 40:786–795.

**SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2022)** Panorama Agroalimentario 2022. Ciudad de México.  
<https://drive.google.com/file/d/1jVWS4EFKK7HGwQOBpGeljUyaDT8X8lyz/view>  
(Junio 2023)

**Spagnoletti F.N., N.E. Tobar., A. Fernández Di Pardo., V. M. Chiochio., R. S. Lavado (2017)** Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates, *Appl. Soil Ecol.* 111:25–32.

**Spellig T., A. Bottin and R. Kahmann (1996)** Green Fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 503-509.

**Spínola V., J. Pinto and P. C. Castilho (2018)** Hypoglycemic, Anti-glycation and Antioxidant In Vitro Properties of Two *Vaccinium* Species From Macaronesia: A Relation to Their Phenolic Composition. *Journal of Functional Foods*, 40, 595-605.

**Surono y Narisawa (2018)** The inhibitory role of dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* against *Fusarium* disease on the *Asparagus officinalis* growth in organic source conditions. *Biological control.* 121. 159-167.

**Surono y Narisawa (2021)** The cellulolytic activity and symbiotic potential of dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* to promote non-mycorrhizal plants growth. Earth and Environmental Science. 648:012165.

**Tombozara N., D. Donnoc., Z. Razafindrakotoa., D. Randriamampiononaa and G. Beccaro, (2020)** The first assessment on antioxidant and antidiabetic activities of leaves and stems of *Vaccinium secundiflorum* Hook. (Ericaceae), an endemic plant of Madagascar. *South African Journal of Botany*, 130, 422-429.

**Torrenegra M. E., O. L. Villalobos., E. A. Castellar., G. León and M. Caro (2016)** Evaluación de la Actividad Antioxidante de las Pulpas de *Rubus glaucus* B, *Vaccinium floribundum* K y *Beta vulgaris* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-8.

**Valenzuela L.R., V. Vera-Caraballo., L.E. Ruth., D. Eissenstat (2018)** Root anatomy, morphology, and longevity among root orders in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae), Am. J. Bot. 95:1506–1514.

**Vohnik M (2020)** Ericoid mycorrhizal symbiosis: theoretical background and methods for its comprehensive investigation. *Mycorrhiza*. 30: 671-695.

**Vohník M., J. Albrechtová (2011)** The co-occurrence and morphological continuum between ericoid mycorrhiza and dark septate endophytes in roots of six European *Rhododendron* species. *Folia Geobot* 46:373–386

**Wang, Y., Wang, L., Suo, M., Qiu, Z., Wu, H., Zhao, M., Yang, H. (2022)** Regulating root fungal community using *Mortierella alpina* for *Fusarium oxysporum* resistance in *Panax ginseng*. *Front. Microbiol* 13: 850917.

**Waters E., C. Scagel., C. McLean (2008)** A survey of *Vaccinium* cultural practices in Australia emphasizing implications for mycorrhizal infection, *Int. J. Fruit Sci.* 8 109–124.

**Wei X., J. Chen., C. Zhang., D. Pan (2016)** A new *Oidiodendron maius* strain isolated from *Rhododendron fortunei* and its effects on Nitrogen uptake and plant growth. *Frontiers in Microbiology*. 7(1327): 1-11.

**Wei X., J. Chen., C. Zhang., Liu H., Zheng X and J. Mu (2020)** Ericoid mycorrhizal fungus enhances microcutting rooting of *Rhododendron fortunei* and subsequent growth. *Horticulture Research* 7(140): 1-11.

**Yang H., X. Zhao., C. Liu., L. Bai., M. Zhao (2018)** Diversity and characteristics of colonization of root- associated fungi of *Vaccinium uliginosum*. *Scientific Reports*. 8-15283.

**Zhang L., G. Wu., W. Wang., J. Yue., and X. Gao (2019)** Anthocyanin profile, color and antioxidant activity of blueberry (*Vaccinium ashei*) juice as affected by thermal pretreatment. *International Journal of Food Properties*, 22, 1035.

## 11. ANEXOS

### 11.1. Artículo de divulgación



**Saber Más:** Revista de Divulgación  
Año 12  
Revista con Arbitraje y Comité Editorial  
Registro ISSN: 2007-7041

Morelia, Michoacán a 24 de julio de 2023

#### A QUIEN CORRESPONDA

Por este medio se extiende la **CONSTANCIA DE PUBLICACIÓN** del **ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA** titulado:

**“Hongos endófitos”**

Siendo autoras **Sandra Estefanía García-Rueda y Yazmín Carreón-Abud**, a quienes se les conservan y respetan sus derechos intelectuales de autor, y son responsables del contenido del artículo publicado en el **Número 69 (Año 12: 25-28)** de la revista de divulgación **SABER MÁS**, con fecha de publicación del **26 de junio de 2023** (Registro ISSN: 20077041).

La Revista de divulgación Saber Más de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se distribuye en forma electrónica en diversos formatos digitales, en una periodicidad bimestral y no tiene fines de lucro.

Se extiende la presente **CONSTANCIA** para los fines legales que convengan a las autoras correspondientes.

  
**Dr. Horacio Cano Camacho**  
Editor

**REVISTA DE DIVULGACIÓN Saber Más**, ES UNA REVISTA SIN FINES DE LUCRO. LAS EXPRESIONES SON RESPONSABILIDAD DE LOS AUTORES. **COMITÉ EDITORIAL:** DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA (DIRECTOR), DR. HORACIO CANO CAMACHO (EDITOR), DR. JESÚS CAMPOS GARCÍA, DR. CEDERIK LEÓN DE LEÓN ACUÑA, DRA. EK DEL VAL DE GORTARI, M.C. ANA CLAUDIA NEPOTE GONZÁLEZ, DR. LUIS MANUEL VILLASEÑOR CENDEJAS Y DR. JUAN CARLOS ARTEAGA VELÁZQUEZ.

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

Edificio C2 \* Ciudad Universitaria \* C.P. 58030 \* Morelia, Michoacán \* [www.sabermas.umich.mx](http://www.sabermas.umich.mx)  
[sabermasumich@gmail.com](mailto:sabermasumich@gmail.com) \* Tel. (443) 322 3500

## ARTÍCULO

### Hongos endófitos

Sandra Estefanía García-Rueda y Yazmín Carreón-Abud



[https://pixabay.com/es/photos/search/plantas%20suelo/?manual\\_search=1&page=1](https://pixabay.com/es/photos/search/plantas%20suelo/?manual_search=1&page=1)

*Sandra Estefanía García-Rueda.* Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción Conservación y Manejo de Recursos Naturales, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

[11600729@umich.mx](mailto:11600729@umich.mx)

*Yazmín Carreón-Abud.* Profesora-Investigadora del Laboratorio de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

[yazmin.carreon@umich.mx](mailto:yazmin.carreon@umich.mx)

**E**n el suelo de todos los ecosistemas naturales agrícolas, hortícolas y forestales, existe un gran número de organismos microscópicos que solo pueden ser vistos por el ojo humano con la ayuda de una herramienta: el microscopio, de allí el nombre de microorganismos, dentro de los cuales podemos mencionar a las bacterias, los virus y los hongos, siendo estos últimos en los que nos enfocaremos en este artículo. **Los hongos** se caracterizan por tener células con núcleo, es decir, **son organismos eucariontes** que además se constituyen por filamentos o «hilos» microscópicos conocidos como hifas, las cuales pueden formar ramificaciones al crecer. Otra de sus características es su pecu-

## 11.2. Artículo de investigación

Artículo Científico



Rev. Fitotec. Mex. Vol. 46 (3): 263-271, 2023

### HONGOS RIZOSFÉRICOS AISLADOS DE ARÁNDANO Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana* L.

### RHIZOPHERIC FUNGI ISOLATED FROM BLUEBERRY AND THEIR EFFECT ON THE DEVELOPMENT OF *Arabidopsis thaliana* L.

Sandra Estefanía García-Rueda<sup>1</sup>, María de los Ángeles Beltrán-Nambo<sup>1</sup>, Héctor Javier Anselmo Villegas-Moreno<sup>2</sup>, Angel Rebollar-Alviter<sup>3</sup>, Miguel Martínez-Trujillo<sup>1</sup> y Yazmin Carreón-Abud<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Facultad de Biología, Morelia, Michoacán, México. <sup>2</sup>UMSNH, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Morelia, Michoacán, México. <sup>3</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Centro Occidente, Morelia, Michoacán, México.

\*Autor de correspondencia (yazmin.carreon@umich.mx, ycabud@gmail.com)

#### RESUMEN

Los microorganismos presentes en su entorno influyen en el crecimiento de las plantas y pueden ser mutualistas, como los hongos formadores de micorrizas, o no mutualistas, como los hongos endófitos. En este estudio se aislaron especies fúngicas de la raíz y suelo rizosférico de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivado en el estado de Michoacán, México con la finalidad de analizar su potencial como promotores de desarrollo vegetal. Seis cepas fúngicas fueron identificadas molecularmente mediante las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal. Se evaluó su capacidad de modificar el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Col 0) mediante dos configuraciones experimentales (cajas Petri compartimentadas y no compartimentadas), para investigar la influencia de compuestos difusibles y volátiles sobre el fenotipo de la planta. *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina* promovieron el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, sobre todo en cajas compartimentadas, donde se observó un incremento de la longitud de raíz principal ( $\geq 2$  cm) y en el número de raíces laterales ( $\geq 34$ ), sugiriendo que los compuestos volátiles son los responsables de estos incrementos. Las especies promotoras de desarrollo vegetal seleccionadas se evaluaron mediante líneas reporteras ARRS::GUS y DRS::GUS para estimar la respuesta de genes a la acumulación de citoquininas y auxinas en los tejidos vegetales. Los resultados indican que *Phialocephala fortinii* y *Mortierella alpina* actúan diferencialmente sobre el crecimiento de las plantas y representan un recurso biológico con gran potencial para su uso como bioestimulantes en la agricultura actual.

**Palabras clave:** *Mortierella alpina*, *Phialocephala fortinii*, *Vaccinium corymbosum*, exudados fúngicos, hongos promotores del crecimiento vegetal.

#### SUMMARY

Microorganisms present in their environment influence plant growth and can be mutualists, such as mycorrhizal-forming fungi, or nonmutualists, such as endophytic fungi. In this study, fungal species from the root and rhizospheric soil of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivated in the state of Michoacán, México were isolated in order to analyze their potential as promoters of plant development. Six fungal strains were molecularly identified by the internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA. Its ability to modify the development of *Arabidopsis thaliana* (Col 0) seedlings was evaluated through two experimental configurations (compartmentalized

and non-compartmentalized Petri dishes), to investigate the influence of diffusible and volatile compounds on plant phenotype. *Phialocephala fortinii* and *Mortierella alpina* promoted growth of *Arabidopsis thaliana* especially in compartmentalized dishes, where an increase in the main root length ( $\geq 2$  cm) and in the number of lateral roots ( $\geq 34$ ) was observed, suggesting that volatile compounds are responsible for these increases. The selected plant-development promoter species were evaluated by ARRS::GUS and DRS::GUS reporter lines to estimate the response of genes to the accumulation of cytokinins and auxins in plant tissues. Results indicate that *Phialocephala fortinii* and *Mortierella alpina* act differentially on plant growth and represent a biological resource with great potential for use as biostimulants in current agriculture.

**Index words:** *Mortierella alpina*, *Phialocephala fortinii*, *Vaccinium corymbosum*, fungal exudates, plant-growth promoting fungi.

#### INTRODUCCIÓN

Las plantas mantienen una constante interacción con los microorganismos que se desarrollan a su alrededor, mediante procesos bioquímicos como la señalización del regulador maestro TOR (por sus siglas en inglés: Target of Rapamycin), el cual funciona como receptor de señales ambientales regulando el crecimiento y metabolismo de eucariontes (Corona et al., 2018). En dichas interacciones interviene también la liberación de compuestos volátiles o difusibles como terpenos, compuestos sulfurados y sideróforos, entre otros (Cantúa et al., 2020; Hernández-León et al., 2015); a su vez, participan en el establecimiento de relaciones que pueden clasificarse como asociativas, simbióticas, neutrales o patógenas (Bouwmeester et al., 2019; Yadav et al., 2018); es por esto que las asociaciones planta-microorganismo están directamente relacionadas con la modulación del desarrollo, metabolismo y defensa vegetal (Agarwall et al., 2019; Wenke et al., 2019).

El cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

Recibido: 01 de marzo de 2023

Aceptado: 16 de julio de 2023

DOI: <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.3.263>