



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Químico-Farmacobiología



## **TESIS**

# **BACTERIAS ENDÓFITAS CULTIVABLES EN PLANTAS DE ARÁNDANO (*Vaccinium* sp. var. *Biloxi*) CON ACTIVIDADES PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL**

Como requisito para obtener el grado de  
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

Presenta:

**Magdalena Alejandra Ortiz Galeana**

Asesor:

D.C. Gustavo Santoyo Pizano

Morelia., Michoacán. Julio 2016

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a dios por haberme dado la oportunidad de llegar a la universidad y formarme como profesional.

A mi familia

A Mario Ramón Ortiz Flandes, mi padre, agradecerte por darme la vida y por permitirme tener una vida llena de dicha, por todo el esfuerzo que has puesto en que siempre tenga lo mejor, me has dejado la mejor herencia que un padre le pudiera dejar a un hijo, te amo infinitamente papá.

A María Alejandra Galeana, mi madre, agradecerte por darme la vida, no hay mejor mamá que tú. Por tus palabras reconfortantes en los días más difíciles, por esos consejos que orientan mi camino y por todo ese esfuerzo que haces día a día para darme una mejor vida, te amo mamita de mi corazón.

A ti mi Palomita aunque ya no estemos juntas, siempre creíste en mí, especialmente para ti va este logro. Te amo abuelita.

A ti hermano Edson Ortiz, aunque nuestras vidas tengan caminos muy distintos, siempre tuviste palabras de aliento para mí, por darme la dicha de ser tía, tus dos angelitos también formaron parte de este camino, te amo hermano.

A ti Javier Radilla, mi persona, por estar al pie de cañón en esos días tan difíciles, por no desesperarte, por sacar la mejor de mis sonrisas, te amo Javier.

A la facultad de Químico Farmacobiología

Por ser una institución comprometida con la preparación continua de sus estudiantes, y por el apoyo real y sincero de todos mis maestros que formaron parte de esta gran aventura.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH

Por las facilidades otorgadas para la realización de los trabajos experimentales en el laboratorio de Diversidad Genómica.

A mis amigos

Miguel, July, Cristina, Dani, Benjamín, Chio, Elizabeth y Pedro por haberme brindado todo su apoyo a lo largo de estos últimos meses, muchas gracias sus consejos, sus críticas, pero sobre todo su buen humor, fue muy grato para mi poder estar con ustedes.

A Cristina Torres, Erick, Ani, Química Ofe gracias por formar parte de mi vida, por compartir su tiempo conmigo, son increíbles personas.

### Reconocimientos

Al Doctor Gustavo Santoyo por su asesoría, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, pero sobre todo por su paciencia y comprensión sin su ayuda este sueño no hubiera sido posible doctor.

Al comité tutorial: DC. Raúl Cortés Martínez, DC. Daniel Godínez, DC. Miguel Trujillo Martínez, DC. Eduardo Valencia Cantero y a la QFB. Guadalupe Eréndira Mosqueda.

¡Gracias a todos!

## INDICE

I.	RESUMEN.....	i
II.	ABSTRACT.....	ii
1.	Introducción.....	1
2.	Marco teórico.....	4
2.1.	Introducción al mundo de las berries.....	4
2.2.	El arándano ( <i>Vaccinium</i> sp.).....	4
2.2.1.	Taxonomía.....	7
2.2.2.	Morfología.....	7
2.2.3.	Composición química del fruto.....	8
2.2.4.	Necesidades de los cultivares.....	9
2.3.	Panorama de la producción de arándanos.....	9
2.3.1.	Producción de arándanos en México.....	10
2.4.	Importancia económica del arándano a nivel mundial.....	12
2.5.	Importancia económica del arándano a nivel nacional.....	12
2.6.	Importancia económica del arándano en el estado de Michoacán.....	13
2.7.	Plagas y enfermedades.....	13
2.8.	El uso de fertilizantes en la agricultura y su impacto en el medio ambiente.....	15
2.9.	Interacción planta-microorganismo y el impacto en la planta hospedadora el crecimiento, la absorción de nutrientes y su rendimiento.....	15
2.10.	Bacterias endófitas.....	15
2.11.	Vías de entrada y procesos de colonización de las bacterias endófitas.....	16
2.12.	Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB).....	17
2.13.	Interacciones de las bacterias endófitas-planta por diferentes mecanismo.....	17
2.13.1.	Fijación biológica del nitrógeno.....	19
2.13.1.1.	Estrategias de protección contra el oxígeno.....	19
2.13.2.	Síntesis de sideróforos.....	20
2.13.3.	Producción de fitohormonas.....	22
2.13.3.1.	Ácido 3-indol acético.....	23
2.13.3.2.	Vías de biosíntesis de IAA .....	23
2.13.4.	Enzimas catalíticas.....	25
2.14.	Biofilms bacterianos.....	26
2.14.1.	Definición de biofilm.....	26
2.14.2.	Regulación del proceso de formación del biofilm.....	27

2.14.3. Etapas en el proceso de formación del biofilm.....	27
3. Antecedentes.....	28
3.1. Estudio de las comunidades microbianas en ambientes naturales.....	28
3.1.1. Métodos dependientes de cultivo.....	29
3.1.1.1. Procedimientos para la detección, aislamiento y cultivo de bacterias endófitas.....	29
3.1.1.2. Técnicas de desinfección superficial para la obtención de cultivos puros de bacterias endófitas.....	30
3.1.2. Métodos independientes de cultivo.....	30
3.1.2.1. Identificación de microorganismos utilizando métodos moleculares.....	31
3.1.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	32
3.2. Construcción de árboles filogenéticos.....	33
4. Justificación.....	35
5. Hipótesis.....	36
6. Objetivos.....	37
6.1. General.....	37
6.2. Particulares.....	37
7. Estrategia experimental general.....	38
8. Material y métodos.....	38
8.1. Recolección de plantas de arándano ( <i>Vaccinium sp. var. Biloxi</i> ).....	38
8.2. Corte y desinfección superficial.....	39
8.3. Extracción de bacterias endófitas de las plantas de arándano.....	40
8.4. Extracción del DNA genómico y amplificación del gen 16S ribosomal.....	40
8.5. Secuenciación y análisis filogenético.....	42
8.6. Análisis de la producción de indoles totales.....	42
8.7. Análisis de la producción de biofilm.....	42
8.8. Análisis de la producción de sideróforos.....	43
8.9. Análisis de la producción de proteasas.....	43
9. RESULTADOS.....	44
9.1. Extracción de bacterias endófitas de la planta de arándano ( <i>Vaccinium sp. var Biloxi</i> ).....	44
9.2. Secuenciación del gen ribosomal 16S de los aislados de bacterias endófitas.....	44
9.3. Análisis tipo BLAST en base a las secuencias del gen rDNA 16S.....	45
9.4. Divisiones bacterianas endófitas asociadas al arándano ( <i>Vaccinium sp. var. Biloxi</i> ).....	48
9.5. Análisis filogenético de las bacterias endófitas asociadas a las planta de arándano ( <i>Vaccinium sp. var. Biloxi</i> ).....	48
9.6. Géneros de bacterias endófitas asociadas a <i>Vaccinium sp. var Biloxi</i> .....	50

9.7. Búsqueda de las actividades de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal.....	51
9.7.1. Producción de indoles totales.....	51
9.7.2. Producción de biofilm.....	53
9.7.3. Producción de sideróforos.....	53
9.7.4. Producción de proteasas.....	53
10. DISCUSIÓN .....	56
11. RESUMEN DE RESULTADOS.....	60
12. CONCLUSIÓN.....	61
13. PERSPECTIVAS.....	62
14. BIBLIOGRAFÍAS.....	63

## INDICE DE FIGURAS

Figura.1 Descripción de la planta de planta de arándano ( <i>Vaccinium sp.</i> ).....	5
Figura 2. Filogenia <i>Vaccinium sp. cv. Biloxi</i> (Spiers <i>et al.</i> , 2002).....	11
Figura 3. Enfermedades más frecuentes con las que se enfrentan los cultivos de arándano (Weyens <i>et al.</i> , 2013).....	14
Figura 4. Bacterias endófitas (Santoyo <i>et al.</i> , 2012).....	16
Figura 5. Interacción planta – bacterias endófitas (Santoyo <i>et al.</i> , 2012).....	18
Figura 6. Estrategias de protección contra el oxígeno por bacterias fijadoras del nitrógeno (Baca, 2001).....	20
Figura 7. Diferentes vías para la síntesis de IAA en bacterias y plantas (Stijn, 2007).....	24
Figura 8. Métodos moleculares para la identificación de bacterias endófitas (Rodicio, 2004).....	32
Figura 9. Estrategia general para la determinación de bacterias endófitas en los tejidos de arándano ( <i>Vaccinium sp. cv. Biloxi</i> ).....	38
Figura 10. Plantas de arándano ( <i>Vaccinium sp. var. Biloxi</i> ).....	39
Figura 11. Planta de arándano después de la desinfección superficial.....	39
Figura 12. Bacterias endófitas aisladas de los tejidos de arándano, cultivadas en agar nutritivo.....	43
Figura 13. Purificación y amplificación del gen ribosomal 16S.....	44
Figura 14. Imagen representativa de la secuenciación de bacterias endófitas PEV1.....	45
Figura 15. Árbol filogenético.....	49
Figura 16. Imagen representativa de la producción de sideróforos en medio CAS S; imagen representativa de la producción de proteasas en medio de cultivo Skim Milk.....	55

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales cultivares de arándano (Rubio, 2011).....	6
Tabla 2. Clasificación taxonómica del arándano ( <i>Vaccinium sp.</i> ).....	7
Tabla 3. Composición nutricional por cada 100 g de arándano fresco (Base de datos Nacional del departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2004).....	8
Tabla 4. Producción de arándano en México según la OEIDRUS en 2011.....	12
Tabla 5. Efectos en la planta por reguladores de crecimiento vegetal (Luckwill, 1994).....	22
Tabla 6. Resultado del análisis tipo BLAST.....	45
Tabla 7. Especies aisladas de los tejidos de arándano ( <i>Vaccinium sp. var. Biloxi</i> ).....	50
Tabla 8. Cepas con una mayor producción de índoles totales.....	52



## INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Superficie mundial de cultivares de arándano en el año 2010 (Rubio, 2013).....	10
Gráfica 2. Superficie de cultivares de arándano en Europa en el año 2010 (Rubio, 2013).....	9
Gráfica 3. Producción histórica de arándanos en EE.UU. (USDA).....	12
Gráfica 4. Divisiones bacterianas encontradas en los tejidos de arándano ( <i>Vaccinium sp. var Biloxi</i> ).....	48
Gráfica 5. Gráfica de pastel que muestra el porcentaje de géneros endófitos encontrados en los tejidos de arándano ( <i>Vaccinium sp. var. Biloxi</i> ).....	50
Gráfica 6. Indoles totales sintetizados por bacterias endófitas del arándano ( <i>Vaccinium sp.</i> ).....	53
Gráfica 7. Resultados de la síntesis de biofilm por bacterias endófitas asociadas el arándano ( <i>Vaccinium sp. var Biloxi</i> ).....	54
Gráfica 8. Resultados de la síntesis de sideróforos.....	54
Gráfica 9. Resultados de la producción de proteasas a las 48 hrs.....	55

## I. RESUMEN

El arándano (*Vaccinium sp.*) representa una de las especies de más reciente domesticación, la industria mexicana de arándano es relativamente nueva y se está convirtiendo en un actor importante en la producción mundial, siendo el estado de Michoacán uno de los principales productores. Es imprescindible encontrar nuevas herramientas que potencialicen el desempeño de los cultivos y mejoren la utilización de nutrientes con un adecuado margen de seguridad alimentaria y ambiental para satisfacer el creciente aumento de la población humana.

El uso de inoculantes biológicos como bacterias endófitas en lugar de fertilizantes químicos nitrogenados es una estrategia que disminuye el impacto ambiental causado por los agroquímicos y estimula el crecimiento de la planta mediante el uso de mecanismos directos e indirectos.

El objetivo de este trabajo fue identificar la diversidad de bacterias endófitas asociadas a la planta de arándano (*Vaccinium sp. var. Biloxi*) mediante el análisis filogenético de los genes de DNAr 16S, así como determinar algunas actividades que están implicadas en la promoción del crecimiento vegetal.

Se obtuvieron 120 aislados en total de los tejidos de las plantas de arándano. Fueron analizados 92 aislados mediante la extracción de DNA genómico, amplificación y secuenciación de los genes ribosomales 16S en cada uno de los aislados.

De acuerdo a las búsquedas de homologías tipo BLAST y posterior análisis filogenético, se identificaron 24 especies distintas distribuidas en 3 filos diferentes, tales como: Actinobacterias, Firmicutes y Proteobacterias, siendo la agrupación de Proteobacterias la que registró un mayor número de cepas.

Estas bacterias presentan características promotoras del crecimiento vegetal, se encontró que 26 cepas producen índoles totales, 8 producen sideróforos, 5 tienen actividad proteolítica y 3 cepas presentaron una mayor producción de biofilm a las 72 horas.

Sin duda que las bacterias endófitas que residen en los tejidos internos de plantas de arándano (*Vaccinium sp. var. Biloxi*) son una fuente con potencial para aislar nuevos agentes bioestimulantes que mejoren el desarrollo vegetal.

Palabras clave: bacterias endófitas, PGTB, *Vaccinium sp. var. Biloxi*, Biocontrol, mecanismo directo e indirecto.

## II. ABSTRACT

The blueberry (*Vaccinium spp.* var. Biloxi) is one of the most recent domesticated plants. Mexican blueberry industry is relatively new and is becoming an important world product, being the Michoacan state one of the main national producers. Thus, it is essential to find new biostimulant agents that promote crop production and plant protection. The use of biological inoculants such as endophytic bacteria, instead of agrochemicals fertilizers or fungicides, is a eco-friendly strategy that reduces the health and environmental negative impacts.

The objective of this study was to identify the diversity of endophytic bacteria associated with blueberry plants (*Vaccinium sp.* Var. Biloxi) by analysis of their 16S DNAr gene sequences and determine traits involved in promoting plant growth.

A total of 120 isolates were obtained from *Vaccinium spp.* plant tissues, while 92 isolates were analyzed by genomic DNA extraction, amplification and sequencing of 16S ribosomal genes from each isolated.

According to BLAST searches, homologies and subsequent phylogenetic analysis, 24 different species were detected, distributed in 3 different phyla, such as Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria, with the group of Proteobacteria with higher abundance.

In regard to plant growth-promoting traits, it was found that 26 strains produced total indoles, 8 produced siderophores, 5 isolates showed proteolytic activity and 3 strains exhibited excellent biofilm production.

No doubt the endophytic bacteria residing in the inner tissues of blueberry plants (*Vaccinium sp.* Var. Biloxi) are a potential source to isolate new bioestimulant agents that improve plant growth.

## 1. INTRODUCCIÓN

El creciente aumento de la población humana ha obligado a los países a utilizar estrategias para producir alimento a grande escala, para satisfacer las necesidades a nivel mundial. En la actualidad, existe una demanda de producción de alimentos que utilice tecnologías menos contaminantes para el ambiente, la cual incluye reducción del uso de fertilizantes químicos y búsqueda de alternativas a través de microorganismos benéficos para las plantas (Miliute *et al.*, 2015).

Prácticamente todas las plantas están colonizadas por una diversidad de bacterias conocidas como endófitas. Estas bacterias endófitas pueden ser detectadas en un momento particular dentro de los tejidos de plantas aparentemente sanos (Schulz & Boyle, 2006). La mayoría de las endófitas colonizan diferentes compartimentos de la planta como apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes de las células y vasos del xilema. Algunas de ellas son capaces de colonizar los órganos reproductores de las plantas, por ejemplo, flores, frutos y semillas (Stone *et al.*, 2000).

En los últimos años, ha despertado interés cada vez mayor en aspectos relacionados con la composición, la estructura y la función de comunidades bacterianas y en particular las unidades fundamentales de las cuales están compuestas (Ward, 2006).

Estudios realizados sugieren que los microorganismos endófitos pudieron haber desarrollado un sistema genético que les permiten transferir información entre ellas y la planta hospedera (Borges *et al.*, 2008). Además del largo tiempo de coexistencia con su hospedero ha resultado en un proceso co-evolutivo de los cuales esos microorganismos han adquirido una interesante capacidad transformadora. Algunos endófitos son capaces de sintetizar sustancias biológicamente activas similares a los metabolitos secundarios producidos por la planta hospedera. Estas propiedades, si son adecuadamente utilizadas por la biotecnología pueden producir innumerables beneficios (Pizón, 2009).

Los bioinoculantes, son insumos compuestos por microorganismos que se caracterizan por tener la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante procesos directos (biofertilizantes) o indirectos (biocontroladores). Su uso en la agricultura tiene como objetivo disminuir el uso de fertilizantes químicos, o incrementar la eficiencia de los mismos para mejorar el crecimiento de las plantas, bien sea por aplicación única del inóculo o en conjunto con la fertilización tradicional (Adesemoye & Kloepper, 2009).

Todas aquellas bacterias que habitan en las raíces de las plantas y que influyen sobre el crecimiento de éstas de manera positiva, indirecta o directamente, por cualquier mecanismo, se denominan bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPB (por sus siglas en inglés, Plant Growth-Promoting Bacteria) (Ahmad *et al.*, 2008; Arshad & Frankenberger, 1998; Kloepper *et al.*, 1986).

Los mecanismos de biocontrol por las PGPB involucran múltiples interacciones que resultan en efectos positivos en el crecimiento y desarrollo vegetal (Jolles y Muzzarelli, 1999; Benítez *et al.*, 2004; Gohel *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2012; Hernández-Salmerón *et al.*, 2014; Martínez-Absalón *et al.*, 2014; Santoyo *et al.*, 2016); por ello, el aislamiento de bacterias capaces de promover el crecimiento juega un papel muy importante a futuro.

Generalmente, estas bacterias influyen significativamente en el crecimiento vegetal por la adquisición de recursos como el hierro al producir sideróforos, la solubilización de fosfatos y minerales esenciales; junto con la modulación de los niveles de fitohormonas, que inducen las modificaciones en la pared celular como la deposición de pectina, celulosa y compuestos fenólicos, todo esto mediante mecanismos directos; o indirectamente, por la disminución de los efectos de diversos patógenos en el crecimiento y desarrollo de la planta como la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato, ácido cianhídrico (HCN), la producción de amoníaco, la actividad de la nitrogenasa (Glick, 2012 ; Ahemad, 2012). Otro de los mecanismos comunes de la repuesta de las plantas colonizadas con endófitos es la inducción de proteínas relacionadas con la defensa como la peroxidasa, quitinasa y  $\beta$ -1,3 gluconasa (Fishal *et al.*, 2010). Lo más probable es que exista una combinación de varios mecanismos de biocontrol exhibido por muchas bacterias endófitas.

La utilización biotecnológica de estos microorganismos benéficos requiere de su caracterización fisiológica previa, con la finalidad de seleccionar aquellas cepas con mayor potencial de uso en las plantas con las cuales se asocian (Szilagyi *et al.*, 2014).

En los últimos 25 años, el estudio de los microorganismos ha experimentado una gran transformación, ya que se ha modificado la forma clásica de estudiarlos , dicho esto nos remontamos al pasado, al tiempo en el que se requería forzosamente del cultivo puro de los microbios y aquellos a quienes no fue posible cultivarlos simplemente no fueron considerados.

Una de las herramientas más útiles para conocer la diversidad procariota de diferentes ambiente son las técnicas moleculares. Una de ellas es la amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) de los genes ribosomales 16S. Esto ha permitido no solo conocer la diversidad de organismos cultivables, sino también de aquellos que no se han podido cultivar en el laboratorio. Los genes ribosomales son un excelente marcador filogenético por diversas razones: (I) forma parte de la maquinaria de la síntesis de proteínas de todos los organismos eucariotas y procariotas, (II) la secuencia de nucleótidos es altamente conservada, además de contener regiones variables que permiten distinguir entre las diferentes especies, (III) la tasa de mutación espontanea es baja, (IV) y la transferencia horizontal no afecta de manera relevante en la construcción de filogenias. Además de auxiliar en la reconstrucción de las filogenias con los genes ribosomales 16S se puede incluso inferir propiedades fenotípicas (Ward *et al.*, 1998).

Hasta el momento se han identificado millones de secuencias de DNAr 16S de diversos microorganismos endófitos cultivables y no cultivables. Los cuales son reportados en la base de datos como el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y el *ribosomal database project* (RDP) cuya información crece frecuentemente.

Una vez que se obtienen las secuencias ribosomales, los análisis comparativos de homología toman relevancia para reconstruir filogenias. Se denomina filogenia a la historia evolutiva de un grupo (Freeman y Herron, 2002). Un árbol filogenético es para un grupo particular de especies, un diagrama ramificado que muestra las relaciones de parentesco entre las especies (Ridley, 2004). El árbol describe los patrones de divergencia así como en algunos casos el momento de la misma, además de la secuencia de las ramificaciones y por ende la relación entre los microorganismos en cuestión (Freeman y Herron, 2002).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. LAS BERRIES EN EL MUNDO

Las berries en español significan bayas, frutillas o frutos del bosque, se refiere originalmente a las diversas frutas de diferentes grupos botánicos, que se caracterizan por su reducida vida de anaquel. Tienden a ser pequeñas, dulces, aciduladas, jugosas y con colores brillantes, que las hacen muy atractivas para ser consumidas. Crecieron originalmente en forma silvestre en la región norte de Europa, Asia y América (Rodríguez, 2008).

Sus intensos colores las hacen muy llamativas para su consumo por la fauna silvestre. En forma natural las berries se producen durante un corto tiempo, principalmente en la temporada de verano. Antes de su domesticación su aprovechamiento era mediante su recolección en amplias extensiones para su consumo en fresco, así como la elaboración de conservas, postres, bebidas y otros productos. En Europa Oriental y en especial Rusia sigue una fuerte tradición de recolección de berries silvestres que es comercializada en fresco o para la elaboración de diversos productos. Debido a los colores que las berries derivan de la síntesis natural por la planta, se ha tenido un especial interés en las investigaciones médicas enfocadas en las propiedades para la prevención de enfermedades gracias a su contenido de polifenoles, pigmentos tales como flavonoides, antocianinas y taninos entre otros fitoquímicos encontrados principalmente en la piel y semillas. Por otro lado, la investigación se ha enfocado a la introducción a los estudios que contribuyan al conocimiento de la ecología de los microorganismos endófitos.

Las propiedades biológicas de los pigmentos de las berries por su capacidad antioxidante, esto es por su gran capacidad de absorber radicales libres, se han considerado en los últimos años dentro de la categoría de alimentos funcionales llamados “superfrutas” lo cual ha sido un factor para el rápido crecimiento de su comercialización a nivel mundial (Rodríguez, 2008).

En este mismo sentido, en esta investigación se trabajó con especies vegetales de *Vaccinium sp.* var. Biloxi, plantas que fueron donadas por la Facultad de Agrobiología de la ciudad de Uruapan Michoacán

### 2.2. EL ARÁNDANO (*Vaccinium sp.*)

El arándano (*Vaccinium sp.*) es una frutilla (Fig. 1) perteneciente al género *Vaccinium*, de las familias de las Ericáceas, se trata de arbustos erectos o rastreros, con altura variable según la especie (0.3 a 7.0 m), de hojas alternas, caducas o perennes y de una gran longevidad (Sudzuki, 1983).

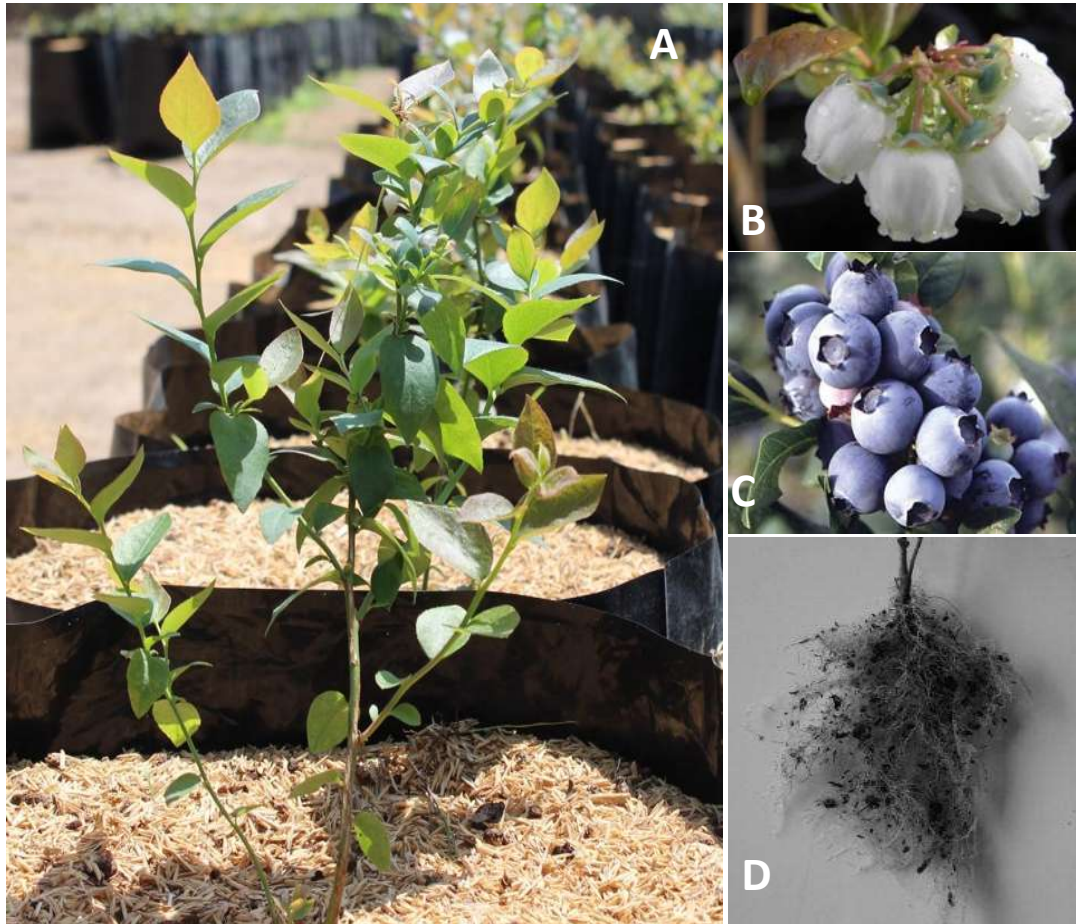


Fig.1 Descripción de la planta de arándano (*Vaccinium sp.*). A) Planta caduca, perenne con hojas simples, alternadas y ligeramente nevadas por el envés. B) Flores en racimo, con corola tubular y acampanada, de color blanca con pétalos fusionados. C) Frutos en racimo, con diámetro de 0.3 - 1.5 cm de diámetro. D) Sistema radicular fasciculado, con raíces finas y fibrosas, carente de pelos radiculares.

De las 30 especies que contribuyen el género de *Vaccinium* sólo un pequeño grupo de ellas tienen importancia comercial. Destacan *V. corymbosum* L., que representa aproximadamente el 80% de la superficie cultivada, seguido en importancia por *V. ashei* Reade con un 15% aproximadamente. Entre el 5% restante destacan *V. angustifolium* Aiton y algunos híbridos de *V. angustifolium* con *V. corymbosum* L. (Tabla 1).

Tabla 1. Principales cultivares de arándano (Rubio, 2011).

Los arándanos representan una de las especies de más reciente domesticación, ya que los primeros programas de selección de arbustos y de técnicas de propagación iniciaron en



<b>h/f</b>	<b>Variedades cultivadas</b>	<b>Especies principales</b>	<b>Características</b>
Altos requerimientos (más de 800 h/f):	“highbush” del Norte	<i>V. corymbosum</i> L.	Nativo del S.E. y E. de Norte América. Maduración temprana del fruto. Mide entre 1,5 y 2,5 metros.
	“lowbush”	<i>V. angustifolium</i> Aiton y <i>V. myrtilloides</i> Michx	Se localizan en el N.E y Centro de Norte América. Maduración temprana. Adaptación a un pH alto.
Requerimientos medios (400-600 h/f):	“Rabbiteye”	<i>V. ashei</i> Reade	Nativo del S.E de Norte América. Tolerancia a sequías. Maduración tardía.
Bajos requerimientos (menos de 400 h/f):	“highbush” del Sur	Cruzamiento entre: <i>V. corimbosum</i> L. <i>V.darrowi</i> Camp <i>V. ashei</i> Reade.	Nativo del S.E. de Norte América. Producción de fruta temprana. Adaptación a un pH alto. Algunas variedades de este grupo son: Misty, Starp blue, Biloxi, Milenium.

Norteamérica a finales del siglo XIX, comienzos del siglo XX. Todos los cultivares obtenidos hasta la actualidad se han desarrollado a partir de las formas silvestres.

Las variedades cultivadas necesitan estar sometidas a bajas temperaturas por un período de tiempo variable para romper la dormancia, o época de reposo de las plantas. Estas necesidades de horas-frío (h/f, número de horas por debajo de los 7 °C) vienen determinada genéticamente, siendo una de las características que separan los grupos agronómicos establecidos. A continuación nos vamos a referir básicamente a las especies que tienen más importancia desde el punto de vista económico (García, 2010).

### 2.2.1. TAXONOMÍA

Bañados (2007) determinó la clasificación taxonómica de la siguiente manera (Tabla 2):

REINO	<i>Plantae</i>
SUBREINO	<i>Tracheobionta</i>
SUPER DIVISIÓN	<i>Spermatophyta</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
SUB CLASE	<i>Dicotyledonae</i>
ORDEN	<i>Ericales</i>
FAMILIA	<i>Ericaceae</i>
SUB FAMILIA	<i>Vaccinioideae</i>
TRIBU	<i>Vaccinieae</i>
GÉNERO	<i>Vaccinium</i>
ESPECIE	<i>Vaccinium sp.</i>

Tabla 2. Clasificación taxonómica del arándano (*Vaccinium sp.*)(Bañados, 2007).

### 2.2.2. MORFOLOGÍA

**RAÍZ.** La mayor parte del sistema radical es superficial, situándose el 80% de éste en los primeros 40cm, tienen raíces finas y fibrosas que se caracterizan por la ausencia de pelos absorbentes. Estas tienen un diámetro de hasta 75 micrones y contienen hasta tres corridas de células epidermales, sin embargo, la mayoría de estas tiene solo una corrida. Entre las raíces y la parte aérea se encuentra la corona, que tiene la capacidad de emitir nuevos brotes (Bañados, 2007).

**HOJAS.** Simples, alternas, cortamente pediceladas, forma elíptico-lanceoladas de unos 5 cm de longitud y varía de 1 a 8 cm en el largo caducas, de color verde pálido a muy intenso según el cultivar, ligeramente dentadas y finamente nerviadas por el envés. Es típica la coloración rojiza que adquiere en otoño.

**FLORES.** Axilares o terminales, en racimos de 6 a 10 en cada yema, sépalos persistentes, corola acampanada blanca con tonos rosas en algunos cultivares, formada por 4-5 pétalos fusionados, de 8-10 estambres con anteras aristadas o no, prolongadas en tubos terminales con una abertura en el ápice, un pistilo simple, ovario ínfero, de 4-10 lóculos. El número de yemas de flor que pueden desarrollarse en una rama de un arbusto de arándano parece estar relacionado con el grosor de la rama, con el cultivar, así como por la influencia de varios reguladores de crecimiento (García, 2010).

**FRUTO.** Es una falsa baya esférica de 1 a 3 cm de diámetro, con un peso de 0.4 a 0.5 g y varias semillas en su interior de 20 a 100, cuyo número está relacionado de manera positiva

con el tamaño del fruto, los frutos a medida que maduran, pasan por diferentes estados de color, adquiriendo el tono azul característico al finalizar la maduración. A su vez, la epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva. Los frutos más cercanos a las ramas son más grandes que los distales, y su tamaño también se ha relacionado con el vigor de la rama, es decir, rama más vigorosa generalmente produce frutos mayores. Dos características comercialmente relevantes del fruto son: la cicatriz que queda al desprenderse el pedúnculo debe ser pequeña y seca a fin de dificultar la acción de los patógenos y la firmeza, que está muy relacionada con el grosor de la epidermis (Muñoz, 2005).

### 2.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FRUTO

Gran parte de la aptitud de las berries para diferentes procesos está determinada por su composición química. El contenido de azúcares totales (fructosa y galactosa, principalmente) oscilan en un rango de entre 10 y 14 % de los cuales cerca de un 95% corresponde a azúcares reductores. El principal ácido orgánico presente es el ácido cítrico seguido del ácido málico. El balance entre azúcares y ácidos es muy importante en la calidad del sabor de las frutas (Dinamarca *et al.*, 1986). La cantidad de pectina es relevante en cuanto a la textura de la fruta. Las antocianinas que pueden estar localizadas en la piel o en la pulpa de la fruta son responsables del color (Shahidi y Naczki, 2004), estas frutas además tiene una baja cantidad de carotenoides y el contenido fenólico puede ser tan alto como 0.40% (Dinamarca *et al.*, 1986). La composición química del arándano se detalla en el siguiente tabla 3.

<b>NUTRIENTE</b>	<b>POR 100g</b>	<b>NUTRIENTE</b>	<b>POR 100g</b>
Valor energético	57 Kcal	Hierro	0.28 mg
Proteínas	0.74 g	Magnesio	6 mg
Grasas totales	0.33 g	Manganeso	0.34 mg
Carbohidratos	14.49 g	Fosforo	12 mg
Fibra alimentaria	2.4 g	Potasio	77 mg
Cenizas	0.24 g	Selenio	0.1 mg
Agua	84.21 g	Sodio	1 mg
Calcio	6 mg	Zinc	0.16 mg
Cobre	0.06 mg	Vitamina c	9.7 mg
Tiamina	0.04 mg	Vitamina B6	0.05 mg
Riboflavina	0.04 mg	Fólico	6 µg
Niacina	0.42 mg	Vitamina A	54 IU

Tabla 3. Composición nutricional por cada 100 g de arándano fresco (Base de datos Nacional del departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2004)

#### 2.2.4. NECESIDADES DE LOS CULTIVARES

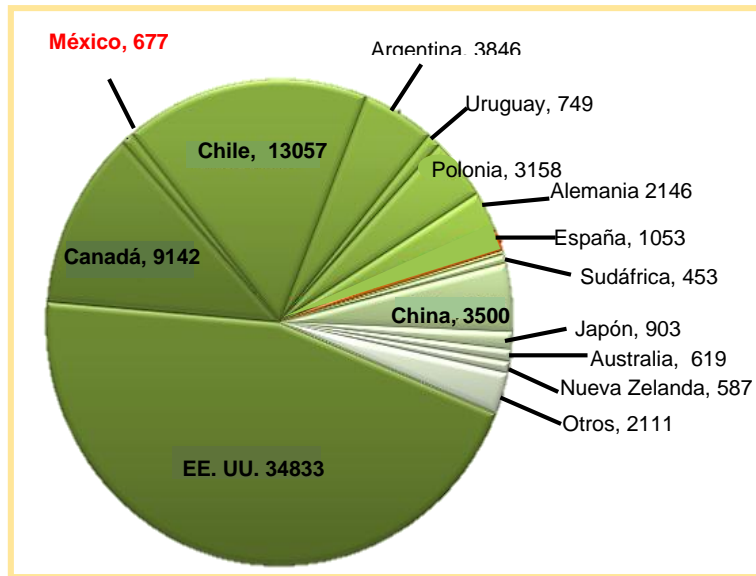
Como se ha indicado, la acumulación de horas-frío es un factor determinante para decidir si el cultivo de arándanos puede producirse comercialmente en un área. No obstante, la oferta es variada, de tal manera que en la actualidad permite desarrollar cultivos de arándanos en zonas climáticas muy diferentes (Ciordia, 2007).

**CLIMA.** El arándano puede llegar a soportar temperaturas muy bajas (-30°C), no presentando grandes riesgos en las heladas primaverales, debido a que su floración comienza a finales de marzo, según variedades, exposición y altitud sobre el nivel del mar. Por otro lado las temperaturas altas, superiores a 28 a 30 °C, pueden afectar negativamente al fruto al ocasionar arrugamiento y quemaduras. Los vientos fuertes dominantes, sobre todo en los primeros años de vida de la planta perjudican el crecimiento de esta, provocando daños en el follaje, afectando a la floración y a la polinización por insectos.

**SUELOS.** Estos deben de ser de textura ligera, buen drenaje y abundante materia orgánica, que permite mantener la retención de humedad necesaria para el óptimo desarrollo del sistema radical. El pH del suelo es limitante para su cultivo, exigiendo valores ácidos inferiores a 5.5, situándose el intervalo óptimo de 4.5 a 5.5. Los suelos ricos en calcio no son recomendables. Con un manejo adecuado puede ampliarse la zona de producción.

#### 2.3. PANORAMA DE LA PRODUCCIÓN DE ARÁNDANOS

Constituyen un grupo de especies ampliamente distribuidas por el Hemisferio Norte, América del norte (EEUU y Canadá) es la mayor productora mundial de arándanos cultivados, con 223 miles de kg sobre una superficie de casi 44,000 hectáreas (Ha) a continuación está Chile, donde a pesar de ser un cultivo de reciente introducción, a principios de los 80's, se ha situado en poco tiempo como segundo productor mundial, con algo más de 13,000 Ha y una producción en torno a los 50 mil de kg, que represente el 90% de la producción de América del sur, donde, en menor significación, también se cultiva, en Argentina, Uruguay y Perú (Gráfica 1). Otras zonas productoras en el hemisferio sur son África del Sur, Australia y Nueva Zelanda (Rubio, 2013).



Gráfica 1. Superficie mundial de cultivos de arándano en el año 2010 (Rubio, 2013).

En Europa los principales países productores son, por este orden, Polonia, Alemania, España, Francia, Italia, Reino Unido, Países Bajos y Portugal. Y también se cultiva en Ucrania, Rumania, Austria, Suiza, Suecia, Dinamarca e Irlanda.

México ha estado creciendo a un ritmo elevado, aunque a partir de una superficie de baja adición de un estimado de 857 acres.

### 2.3.1. LA PRODUCCIÓN DE ARÁNDANO EN MÉXICO

La industria mexicana de arándano es relativamente nueva y se está convirtiendo en un actor importante de la producción mundial. Está experimentando un gran impulso, debido principalmente por las ventajas comparativas y competitivas que ofrece para la producción de este cultivo, alguna de sus principales ventajas (Bascopé, 2013):

- ✓ Costo de mano de obra relativamente bajo comparado con otros países productores.
- ✓ Cercanía con los mercados de exportación, principalmente EE.UU.
- ✓ Condiciones de suelo y climas óptimos para el cultivo.
- ✓ Época de producción en los meses de altos precios (noviembre-marzo).

En México, se tiene una gran diversidad de microclimas, ocasionados por las diferentes condiciones de relieves y precipitación, muchos de ellos son ideales para la producción de frutales: tal como es el caso de las frutillas (berries) o moras cuya producción ha cobrado gran importancia en los últimos años. El arándano es una de las especies más representativas de este grupo. Los principales estados productores son Jalisco, Colima y Michoacán (SIAP, 2012).

En el 2003 se introdujeron a Michoacán variedades del tipo arbusto alto del Sur, estableciéndose pequeñas parcelas comerciales a partir del 2005, con el interés de extender su oferta de productos en el rubro de frutillas, en una región consolidada en la producción de zarzamora localizada en el Municipio de Los Reyes.

Entre las variedades evaluadas en esta región se tiene a “Misty”, “Sharpeblue”, “Star”, y “Biloxi”, siendo esta última de mayor importancia (Escalera-Villanueva, 2009).

Biloxi es un arándano tetraploide, denominado arbusto alto del sur (*highbush southern*) y fue desarrollado por el servicio de Investigación Agrícola del Departamento de EE.UU de la cruce entre Sharpeblue y US329 (Fig. 2). Los tallos son rectos, vigorosos y productivos. La fruta madura temprano, con tamaño mediano, buen color, firmeza y sabor. Este cultivar de bajo requerimiento de frío fue lanzado en el año 1998 para la producción en las llanuras costeras del Suroeste de Estados Unidos y para facilitar su polinización requiere de otros arándanos del mismo tipo como cv. Climax y Misty, entre otras. Los frutos de la variedad Biloxi tiene un peso medio de 1.47 g, contenido de sólidos solubles 13.4 %, pH 3.2, acidez titulable de 0.97%, la relación contenido de sólidos solubles / acidez titulable es igual a 13.97 y la antocianina (ACY) presentó valores de 90 (Spiers *et al.*, 2002).

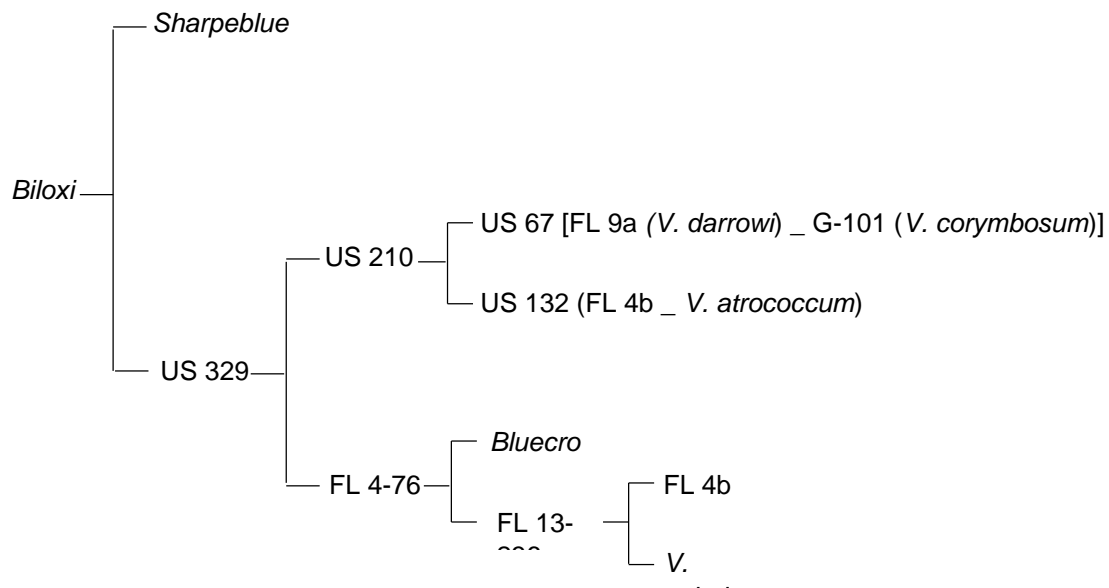
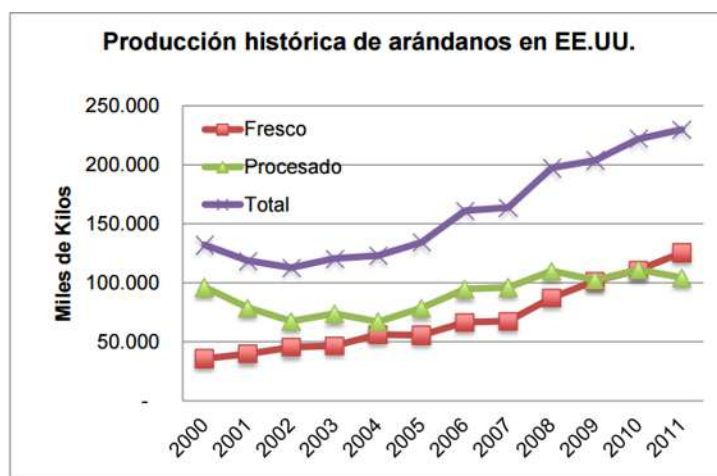


Figura 2. Filogenia *Vaccinium sp. cv. Biloxi* (Spiers *et al.*, 2002).

## 2.4. IMPORTANCIA ECÓNOMICA DEL ARÁNDANO A NIVEL MUNDIAL

La producción y consumo de arándanos en la última década ha tenido un crecimiento espectacular, tanto en América del Norte, donde ya había una gran tradición debido a la gran disponibilidad de estos frutos procedentes de poblaciones silvestres. Hace 30 años la comercialización en fresco de los arándanos se restringía a los periodos de producción en América del Norte y muy poco en Alemania, hoy en día la panorama mundial ha cambiado, esto es debido por un lado a su gran expansión tanto del hemisferio Norte como del Sur (Rubio, 2013).

EE.UU. es el mayor productor a nivel mundial de arándanos con una producción de 230 miles de kilos en el 2011 (Gráfica 4). Entre variedades comerciales (“*highbush*”) y silvestres (“*lowbush*”) con un valor comercial de 860 millones, siendo el segundo grupo Berry en importancia económica del país (Rubio, 2013).



Gráfica 3. Producción histórica de arándanos en EE.UU. La mayor cantidad de kilos totales se registró en el año 2011 con aproximadamente 240,000 mil kilos (USDA).

## 2.5. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL ARÁNDANO A NIVEL NACIONAL

La superficie cultivada en México no es significativa comparada con la de los principales países productores. Se estima que la superficie total plantada es cercana a 1.500 ha concentrada en un 75% en los estados de Jalisco y Michoacán.

En cuanto a la producción, esta alcanzó 6,900 toneladas en 2011, según la Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS, 2011), como se muestra en la tabla 4:

ESTADO	SUP. PLANTADA (HA)	SUP. COSECHADA (HA)	PRODUCCIÓN (Ton)	RENDIMIENTO (Ton/HA)	PRECIO POR TONELADA (US\$/ ton)	VALOR TOTAL US\$
Baja California	160	160	394	4.92	10,154	1,998.277
Jalisco	518	391	5709	14.60	1,342	7.663.488
México	11	11	22	4.30	6.654	106.731
Michoacán	600	500	3380	5.63	5.409	2.985.923
Puebla	76	56	224	4.00	1.154	258.462
Sinaloa	96	65	180	2.77	3.333	600.000

Tabla 4. Producción de arándano en México según la OEIDRUS en 2011.

## 2.6. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL ARÁNDANO EN EL ESTADO DE MICHOACÁN

Michoacán se consolidó como el productor número uno de México en las frutillas (fresa, zarzamora, arándano y frambuesa), con 340 mil 932 toneladas producidas, lo que representa 6 mil 281 millones 337 mil 281 pesos en valor de producción, de acuerdo a la información más reciente de muestra de la Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS, 2011).

Con respecto al Arándano, se informó que es un cultivo con gran potencial de crecimiento en Michoacán, ya que cada vez más productores están volteando los ojos a esta frutilla; esto se refleja en aumento en la producción de 31 por ciento con respecto al año 2011.

Michoacán es el cuarto mejor productor nacional de Arándano con 572 toneladas, con un valor de producción de 44 millones 863 mil 60 pesos, siendo los municipios de Los Reyes, Peribán y Tangancícuaro los mejores productores del Estado (Vega, 2013).

## 2.7. PLAGAS Y ENFERMEDADES

El cultivo de arándano ha tenido un crecimiento importante desde su introducción. Sin embargo, este crecimiento no ha estado exento de problemas, entre los que se encuentran los sanitarios. La introducción, la multiplicación y la diseminación de la planta ha sido acompañada, en muchos casos, por organismos indeseables que afectan la productividad de la fruta y longevidad de las plantaciones (Cisternas, 2009).

**PLAGAS.** Las plagas más problemáticas para cualquiera que cultive arándanos son los pájaros que comen frutos (Trehane, 2004). Algunos insectos reducen seriamente la producción y otros afectan la calidad del fruto disminuyendo su valor; no se ha detectado



hasta el momento grandes problemas de plagas. Básicamente, se han observado casos puntuales de ataques de cochinillas, orugas y pulgones (Rubio, 2011).

**ENFERMEDADES.** La enfermedad puede comenzar desde el vivero, donde se observa muerte de brotes, necrosis de la base de la estaca y que progresa en forma ascendente por el tallo. Si no se controla el patógeno produce bolsones de plantas muertas o debilitadas. Las plantas enfermas tienen mayor aborto floral y producen fruta más pequeña o no producen. El sistema radicular puede presentar necrosis parciales o extensión de raíces, las que progresan hasta dejarlas completamente negras (Cisternas, 2009)

Las enfermedades más importantes son (Fig. 2):

- *Phytophthora cinnamoni* o pudrición de la raíz, favorecida por exceso de agua y temperaturas altas del suelo.
- *Botrytis cinerea* o moho gris en la flor, destruye las flores en periodos de lluvia.
- *Pucciniastrum vaccinii* o roya, causa hojas con manchas amarillas al inicio y si la enfermedad es severa, la hoja muere eventualmente al tornarse necrótica. Hojas infectadas caen prematuramente y la defoliación severa puede reducir la siguiente producción de fruta. No hay fungicidas actualmente registrados para su control (Caruso & Ramsdell, 2007).

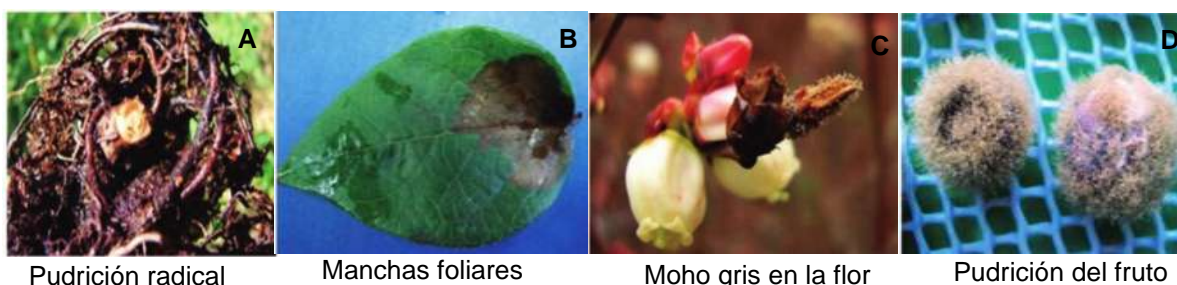


Imagen 2. Enfermedades más frecuentes con las que se enfrentan los cultivos de arándano (*Vaccinium sp.*). A) Pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamoni*. B) Manchas foliares provocadas por *P. cinnamoni*, *Botrytis cinérea*, *Pucciniastrum vaccinii*. C) Moho gris en la flor a causa de *B. cinerea*. D) Pudrición del fruto a causa de *B. cinerea*.

Se necesitan sistemas para mantener la productividad agrícola y proteger el medio ambiente. A pesar de los efectos negativos la cantidad de fertilizantes usados en el mundo se prevé que va en aumento debido a la necesidad de producir más alimento para abastecer a una población mundial cada vez mayor, a través de agricultura intensiva que requiere grandes cantidades de fertilizantes (Frink *et al.* 1999). Una característica distintiva de la agricultura intensiva es su dependencia de los plaguicidas y fertilizantes químicos especialmente los que contienen nitrógeno. Desde 1960, la tasa mundial de aplicación de fertilizantes nitrogenados ha aumentado siete veces en cuanto a toneladas de nitrógeno al año (Tilman, 1998).

Los inoculantes microbianos son componentes prometedores para la integración de soluciones a los problemas agro-ambientales, ya que éstos poseen la capacidad para promover el crecimiento de las plantas, mejorar la disponibilidad de nutrientes y la absorción, y apoyar en la salud de las plantas (Barea *et al.*, 1998 ; Adesemoye *et al.*, 2008 ).

Históricamente, inoculantes microbianos se han utilizado para lograr control biológico o promoción de crecimiento vegetal, sin que se vea afectado el medio ambiente.

## 2.8. USO DE FERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA Y SU IMPACTO EN EL MEDIO AMBIENTE.

Los avances tecnológicos en la agricultura están ayudando a cumplir las necesidades de alimentos de una población mundial cada vez mayor. Sin embargo, los informes han demostrado que el uso continuo de fertilizantes están agravando los problemas ambientales y el impacto suele ser a largo plazo y de alcance mundial (Vitousek *et al.*, 1997 ; Rabalais *et al.*, 1998 ).

Algunos de los fenómenos ambientales que se han relacionado con el uso de fertilizantes son la lixiviación de nitrato, contaminación de aguas subterráneas, eutrofización de los ecosistemas acuáticos y los cambios en la red alimentaria (Rabalais *et al.* 1998 ), reducción de la biodiversidad, producción de gases efecto invernadero, el calentamiento global y la lluvia ácida, anormal cambio en el pH del suelo, y los cambios en la concentración de sal de los suelos (Mosier *et al.*, 1996 ; Tilman, 1998).

## 2.9. INTERACCIONES PLANTA-MICROBIO Y EL IMPACTO SOBRE LA PLANTA HOSPEDERA EL CRECIMIENTO, LA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES Y EL RENDIMIENTO.

Las plantas viven en asociación íntima con microorganismos, cumplen funciones importantes en ecosistemas agrícolas mediante las supresiones de enfermedad, mejora de absorción de nutrientes, la fijación de nitrógeno atmosférico y promover el crecimiento de las plantas (Smith & Goodman, 1999).

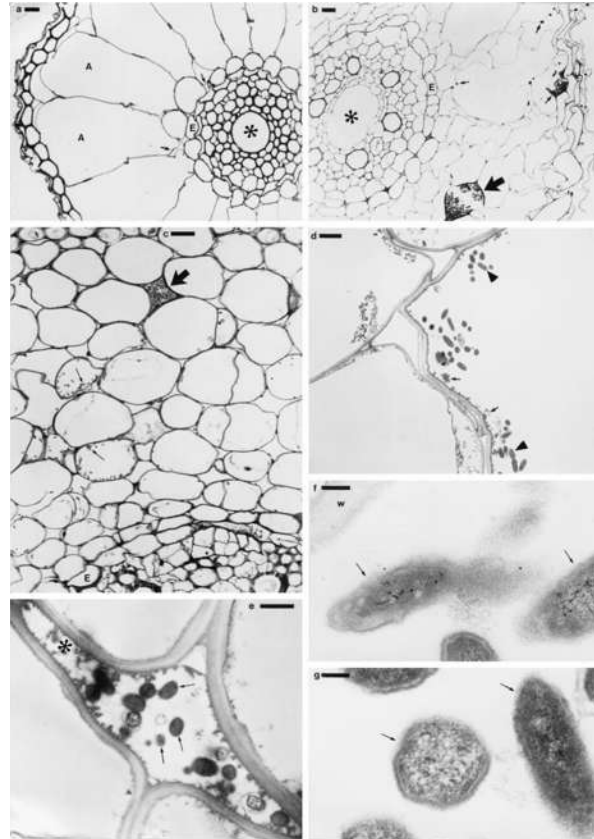
Las bacterias pueden existir en forma de vida libre, unidas a la superficie de las raíces (rizoplano), y pueden establecer relaciones simbióticas dentro de las plantas, es decir, bacterias endófitas (Smith & Goodman, 1999).

## 2.10. BACTERIAS ENDÓFITAS

Las bacterias endofíticas se definen como aquellas bacterias que colonizan el tejido interno de la planta sin causar signo externo visible de infección (Fig. 3). Dado que estas bacterias pueden proliferar en el tejido interno de la planta, es probable que interactúen estrechamente con su anfitrión, éstas enfrentan menos competencia por los nutrientes y

están más protegidas de los cambios adversos en el medio ambiente que las bacterias de la rizósfera o de la endósfera (Weyens *et al.*, 2013).

Figura 3. Bacterias endófitas. Microfotografía de luz en azul de toluidina al 1%. A) sección transversal de una raíz de arroz. B, C) bacterias visibles dentro de los espacios intercelulares (flechas) en las secciones transversales de las raíces, C) mayor aumento que muestra las bacterias dentro de las células corticales (pequeñas flechas), así como una densa colonia de bacterias intercelulares (flecha grande). Electrónica de transmisión (D a G) muestran micrografías de secciones de las raíces; (D) bacterias (puntas de flecha) la colonización de una célula cortical, tenga en cuenta que el citoplasma de acogida está intacto y existen sólo como fragmentos (flechas pequeñas). Las bacterias han colonizado espacios intercelulares y aerénquima (flechas pequeñas), a veces muy denso (flecha grande), pero ninguno ha penetrado en la endodermis. (E) Las bacterias que colonizan el espacio intercelular en la corteza. (F y G) micrografías electrónicas de transmisión. D y E) Las bacterias en estas secciones (flechas) se marcaron inmunoelectrónica con un anticuerpo primario dirigido contra GUS. (F) Las bacterias que muestran inmunomarcaje interna (flechas), lo que indica la expresión de la proteína GUS, la pared celular vegetal. (G) Las bacterias sin inmunomarcaje interna significativa (Weyens *et al.*, 2013).



### 2.11. VÍAS DE ENTRADA Y PROCESO DE COLONIZACIÓN DE LAS BACTERIAS ENDÓFITAS

A excepción de las bacterias transmitidas por semillas, las potenciales endófitas deben colonizar inicialmente la superficie externa del tejido vegetal, principalmente las raíces, para después penetrar, se considera que lo hacen por medio de quimiotaxis, electrotaxis o por encuentro casual en los primeros contactos (McInroy & Kloepper, 1995).

Las principales vías de entrada de las bacterias endófitas son las heridas que ocurren de manera natural como resultado del crecimiento de la planta o a través de los pelos radiculares y espacios intercelulares de la epidermis de la planta (Sprent y De Faria, 1987; Santoyo *et al.*, 2016).

Al parecer las bacterias endofíticas que colonizan las raíces son reclutadas de las poblaciones rizosféricas; la zona radicular ofrece el sitio más oportuno para la entrada de las bacterias endofíticas, por la abundancia de bacterias en la rizósfera. La parte aérea ofrece también entradas naturales fáciles de penetrar. También se cree que otras aberturas

naturales como las estomas son vías de entrada para las bacterias endófitas (Lodewyckx *et al.*, 2002; Santoyo *et al.*, 2016).

Una vez que las bacterias entran en los tejidos de las plantas se pueden mantener ubicadas en ciertos tejidos específicos o distribuirse en forma sistémica en toda la planta por transporte o migración activa a través de los elementos conductores del apoplasto (James, 2000). El hecho de que las bacterias tengan la capacidad de colonizar y establecerse en el interior de las plantas puede representar una ventaja ecológica con respecto a las bacterias del rizoplasma o filoplasma. Se considera que en el interior de los tejidos vegetales se provee de un ambiente protector a las endófitas tanto de factores ambientales adversos como de la competencia con otros microorganismos o la depredación por protozoarios en el suelo (Lodewyckx *et al.*, 2002; Santoyo *et al.*, 2016).

#### 2.12. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPB)

Las bacterias endófitas han demostrado tener varios efectos beneficiosos sobre su planta huésped, incluyendo la actividad promotora de crecimiento vegetal, la modulación del metabolismo de la planta y la señalización de hormonas que conduce a la adaptación del medio ambiente biótico o abiótico, a estas bacterias se les conocen como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB) (Miliute *et al.*, 2015).

Los beneficios para las plantas a partir de las interacciones planta-PGPB se han demostrado e, incluyen aumentos en la tasa de germinación de la semilla, el crecimiento de la raíz, rendimiento en área foliar, contenido de clorofila, la absorción de nutrientes, contenido de proteína, actividad hidráulica, la tolerancia al estrés abiótico, pesos de tallo y la raíz, control biológico, y la senescencia retardada (Raaijmakers *et al.*, 1997 ; Bashan *et al.* 2005 ; Mantelin & Touraine, 2004 ; Yang *et al.*, 2008; Santoyo *et al.*, 2012; Hernández-León *et al.*, 2015; Martínez-Abasalón *et al.*, 2014).

Otros efectos beneficiosos incluyen la mejora de la disponibilidad de fósforo (Rodríguez y Fraga, 1999 ); la fijación de nitrógeno atmosférico (Bashan *et al.*, 2005 ); secuestrantes de hierro por los sideróforos (Raaijmakers *et al.*, 1997 ; Bakker *et al.*, 2007 ); la producción de hormonas vegetales, tales como giberelinas, citocininas, auxinas y la síntesis de la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que disminuye los niveles de etileno (Glick *et al.*, 2007; Santoyo *et al.*, 2016).

#### 2.13. INTERACCIONES DE LAS BACTERIAS ENDOFÍTICAS POR DIFERENTES MECANISMOS

Las interacciones planta-PGPB son fenómenos complejos que implican una combinación de mecanismos directos e indirectos (Fig. 5). Las sustancias químicas secretadas en el suelo por las raíces se conocen ampliamente como exudados de las raíces. A través de la exudación de una amplia variedad de compuestos, las raíces pueden regular la comunidad

microbiana del suelo en sus inmediaciones, hacer frente a los herbívoros, animar a las simbiosis beneficiosas, cambiar las propiedades químicas del suelo. La composición de estos exudados depende del estado fisiológico y especie de la planta y microorganismos (Walker, 2003). Una fracción de estas pequeñas moléculas de origen vegetal es metabolizada por los microorganismos en el entorno como fuentes de carbono y nitrógeno, algunas moléculas orientadas a los microbios, posteriormente se vuelven a absorber para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los mecanismos directos que utilizan los microorganismos para promover el crecimiento vegetal, son aquellos que facilitan la adquisición de los siguientes recursos, nitrógeno, fósforo y minerales o modulación de los niveles de hormonas de las plantas, a través de su propio metabolismo, afectando el metabolismo de la planta, mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a que otros microorganismos benéficos actúen de mejor manera en la planta. Por otro lado los mecanismos indirectos son aquellos por los cuales las bacterias promueven el crecimiento vegetal al suprimir fitopatógenos (Santoyo, 2016).

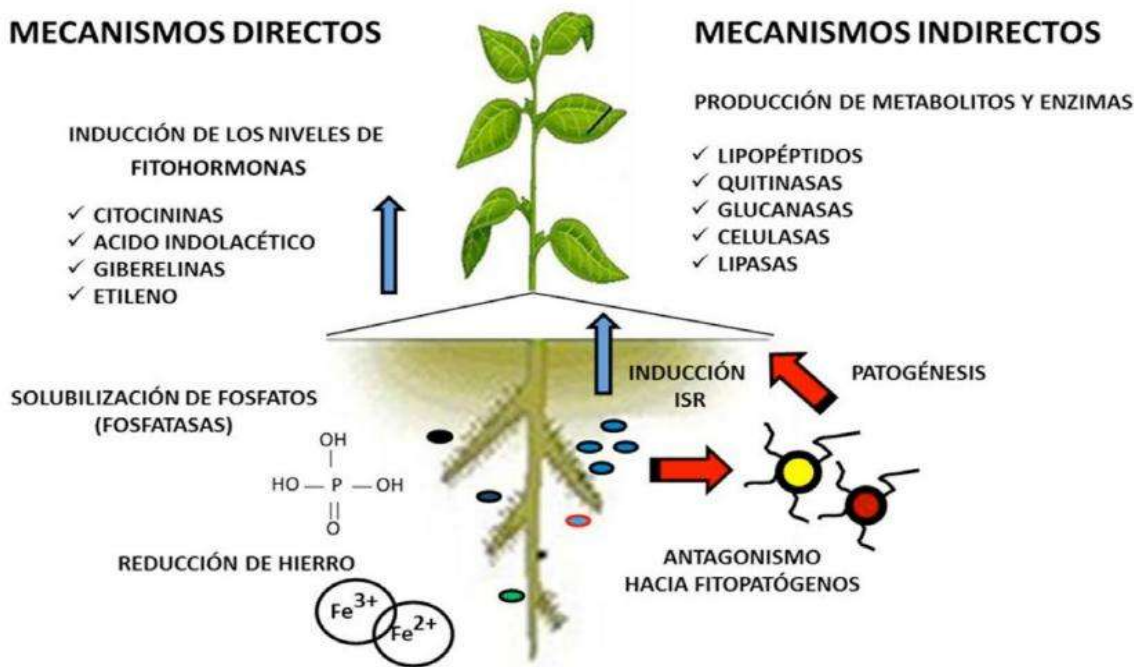


Figura 5. Interacción planta-bacteria por mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos estimulan armoniosamente el crecimiento de la planta mediante la solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, síntesis de sideróforos; los mecanismos indirectos estimulan el crecimiento de la planta suprimiendo el crecimiento de fitopatógenos (Santoyo *et al.*, 2012)

### 2.13.1. FIJACIÓN DEL NITROGENO

El nitrógeno molecular es la única reserva de nitrógeno en la biosfera, prácticamente ilimitada. El nitrógeno es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. Para que el  $N_2$  pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido. Los únicos seres capaces de realizar esta reacción, son las bacterias por el proceso denominado fijación biológica del nitrógeno (FBN). Las bacterias FN presentan una amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos vida y de asociación con los vegetales, las más eficaces son aquellas que se asocian con las plantas por medio de estructuras diferenciadas producidas por la planta hospedera, llamados “nódulos”, localizados en la raíz de las leguminosas o de plantas actinorizas. En el interior de estas estructuras se localizan los microorganismos, desarrollando una verdadera simbiosis con la planta; esta simbiosis representa un modelo biológico experimental muy interesante para su estudio y desde el punto de vista económico, ha abierto un campo sumamente prometedor para la agricultura (Sang *et al.*, 2014).

La simbiosis Rhizobium-leguminosas es el resultado de una interacción muy específica entre bacteria y la planta. La organogénesis del nódulo es un procesos inducido por un “intercambio de señales” entre los dos participantes de la interacción, el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta). Es esencial la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta. Las sustancias con efecto nitrógeno (factores de nodulación) son sintetizadas a partir de los genes de nodulación del microsimbionte (Genes *nod*), en respuesta a la excreción de la planta de sustancias de tipo flavonoides. Se promueve la penetración de la bacteria, formando un hilo de infección, en el interior del cual se desarrollan los microorganismos, estos continúan hasta llegar al corte radical. La infección conduce a la formación del meristemo nodular. La producción de factores de nodulación induce a la división celular (Mayz-Figueroa, 2004).

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso que requiere de un aporte considerable de ATP, que debe ser generado por la fosforilación oxidativa, que a su vez exige la disponibilidad y consumo de importantes cantidades de oxígeno, así como del complejo enzimático responsable de la reducción del N: Nitrogenasa (Nasa), sea una enzima que fácilmente se intoxica por  $O_2$  (Fernández-Pascual, 2002).

La Nasa está constituida por dos componentes: la hierro proteína o dinitrogenasa reductasa y el hierro-molibdeno proteína o dinitrogenasa (Mayz-Figueroa, 2004).

#### 2.13.1.1. ESTRATEGIAS DE PROTECCIÓN CONTRA EL OXÍGENO

Los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias para esta aparente paradoja. En teoría un microorganismo puede proteger a su Nasa del  $O_2$  por más de un mecanismo (Fig.5) (Baca, 2001):

1. Evasión del O<sub>2</sub> y desarrollo en ambientes anaeróbicos.
2. Generación de barreras físicas de protección que impidan la difusión del O<sub>2</sub> hacia la Nasa; sin embargo, en aerobios obligados, estas barreras no excluyen completamente el O<sub>2</sub>; la composición de la barrera es importante, ya que no debe afectar la difusión del sustrato N<sub>2</sub> al sitio activo del complejo enzimático.
3. Eliminación metabólica del O<sub>2</sub> para reducir su concentración a niveles aceptables cerca del complejo enzimático.
4. Modificación de la Nasa, de tal manera que sea resistente a la inactivación.
5. Síntesis de novo de la Nasa alterando el equilibrio entre la inactivación y la síntesis (Baca, 2001).

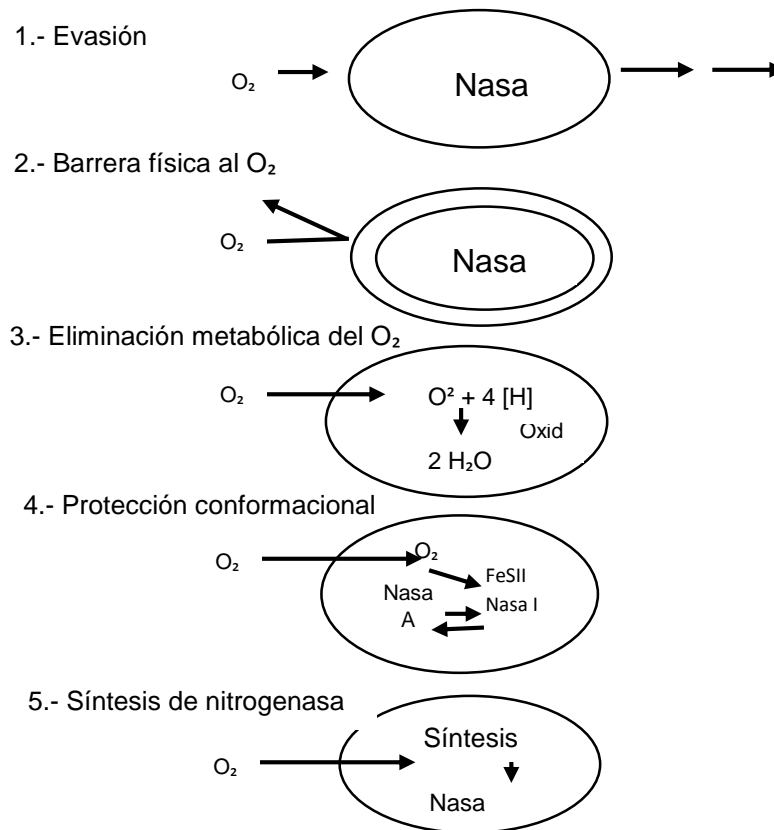


Figura 6. Estrategias de protección contra el oxígeno por bacterias fijadoras de nitrógeno (Baca, 2001).

### 2.13.2. SINTESIS DE SIDERÓFOROS

El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los microorganismos, plantas y animales porque está implicado en procesos biológicos como son la síntesis y reparación de ácidos nucleicos, respiración, transporte fotosintético, reducción de nitratos, fijación de nitrógeno o desintoxicación de radicales libres. En estos procesos, el hierro participa como

cofactor de muchas enzimas del metabolismo y proteínas reguladoras, al existir en dos estados de oxidación, ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Venturi *et al.*, 1995)

A pesar de la relativa abundancia de hierro en la corteza terrestre, su disponibilidad para ser absorbido por microorganismos es baja debido a la poca solubilidad de los compuestos de  $\text{Fe}^{3+}$  (hierro férrico, estado de oxidación mayoritario en la biosfera; el oxígeno atmosférico produce la oxidación). Además de la baja disponibilidad de  $\text{Fe}^{3+}$ , otro punto importante a tener en cuenta es que el estado reducido  $\text{Fe}^{2+}$  (mayoritario en ambientes anóxicos), aunque se encuentra soluble y disponible, resulta tóxico para la célula ya que reacciona con el oxígeno provocando la formación de radicales hidroxilos.

Como consecuencia, los seres vivos se han visto obligados a desarrollar diferentes estrategias para satisfacer la necesidad de las plantas. Estas estrategias consisten en la utilización de ligandos con elevada afinidad por el hierro que permiten captar, transportar, almacenar y/o secuestrar dicho elemento.

Sideróforos es un término que proviene del griego: "portadores de hierro", son pigmentos extracelulares, fluorescentes o no, con un peso molecular relativamente bajo y solubles en soluciones acuosas a pH neutros; muestran una coloración característica de acuerdo a la estructura química que posean y una gran afinidad por el  $\text{Fe}^{3+}$  (Dybas *et al.*, 1995).

Son agentes quelantes específicos de ión férrico elaborados por bacterias y hongos que crecen debajo de la tensión baja de hierro. El papel de estos compuestos es secuestrar el hierro del medio ambiente y para hacer que el mineral, que es casi siempre esencial, esté a la disposición de la célula microbiana (Neilands, 1995).

Su estructura química es variada y pueden contener un pequeño péptido. Casi todos los sideróforos que han sido identificados contienen como grupos enlazadores de hierro: ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos, catecolatos, hidroxamatos y mixtos. Las especies del género *Pseudomonas* producen sideróforos del tipo hidroxamato entre los que se encuentran el ferribactín y el pseudobactín, particularmente *P. Fluorescens Migula* produce formas denominadas pioverdinas del tipo catecol. Se ha demostrado que *Burkholderia cepacia Palleroni* y *Holmes* produce piochelin (Sokol, 1986), cepabactin (Meyer *et al.*, 1989) y ornibactin (Meyer *et al.*, 1995).

Tales compuestos desempeñan un papel en el control de hongos fitopatógenos que provocan enfermedades en diferentes cultivos de importancia económica. En condiciones de escasez de hierro, las bacterias producen y excretan los sideróforos al medio. Una vez secuestrado el hierro por los sideróforos, el complejo es reconocido por receptores de membrana específicos, atravesando la misma por un sistema de transportadores activos. En el interior celular, el metal es depositado en un sitio específico por un proceso que involucra un intercambio de ligandos que puede estar precedido o no por la reducción del hierro III o por la hidrólisis del sideróforo. Cuando el sideróforo se acopla con el hierro, éste último se hace inaccesible para los microorganismos patógenos que no posean los



receptores proteicos específicos para reconocer al complejo y que además no tengan mecanismos propios tan efectivos de adquisición de hierro (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006).

### 2.13.3. PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS

Las hormonas son sustancias orgánicas sintetizadas por los microorganismos y plantas, que tiene la capacidad de modificar los procesos biológicos, se clasifican en cinco grandes grupos que son: auxinas, giberelinas, citocinas, etileno, y los inhibidores de crecimiento vegetal (Tabla 5). Éstas son utilizadas en la agricultura para mejorar las cosechas y manipular algunas respuestas fisiológicas de las plantas. La eficiencia de estas hormonas de origen biológico ha sido comprobada en diversos estudios en los que se ha demostrado que su aplicación produciendo un aumento en el rendimiento y calidad de las cosechas.

Tipo de regulador de crecimiento	Efecto en la planta	Ejemplo
Auxinas	Inducen la producción de raíces adventicias y el enraizamiento de esquejes, inducen el crecimiento de tallos y coleóptilos, regulan la dominancia apical	Ácido indol acético. Ácido indol butírico. Ácido naftilacético
Giberelinas	Promueven la floración, estimulan la germinación de las semillas y estimulan el crecimiento del tallo de las planta	Ácido giberélico GA <sub>4</sub> y GA <sub>7</sub>
Citocinas	Estimulan la retención de la clorofila, promueven la división celular, promueven el desarrollo de los cloroplastos y la expansión celular.	6 Bencilaminopurina. Furfuril-aminopurina. Zeatina.
Compuestos que generan Etileno.	Se utilizan para promover la abscisión y de este modo facilitar la cosecha mecanizada especialmente en cítricos, el etileno induce la expansión celular lateral, rompe la dormancia de algunas semilla	Ácido 2-cloroetilfosfórico.
Inhibidores de transporte hormonal.	Provocan efectos en el crecimiento y la morfogénesis por ejemplo al bloquear el movimiento de la auxina desde la yema terminal, provoca que se formen las ramas laterales	Ácido N-m-tolileftalminico. Ácido 2,3,5-triidobenzoico

Tabla 5. Efectos en la planta por los reguladores de crecimiento vegetal (Luckwill, 1994).

El mecanismo más significativo en la promoción de crecimiento radical por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal es la producción de ácido indol-3-acético (IAA); se tiene como hipótesis que existen múltiples mecanismos que operan simultáneamente o en sucesión y que pueden explicar el efecto de la promoción del crecimiento de las plantas por las bacterias (Santoyo *et al.*, 2012).

### 2.13.3.1. ACIDO INDOL ACÉTICO

En 1880 Charles Darwin propuso que algunas respuestas de crecimiento de las plantas están regulados por “una cuestión que transmite sus efectos de una parte de la planta a otra”. Varias décadas después, esta “materia”, llamada auxinas (proviene del griego que significa crecer), fue identificada como ácido IAA y desde entonces está implicado prácticamente en todos los aspectos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Teale *et al.*, 2006).

Curiosamente, el descubrimiento del AIA como regulador del crecimiento vegetal coincidió con la primera indicación de que los mecanismos moleculares están implicados en la tumorigenesis inducida por *Agrobacterium*. Los tumores inducidos por *Agrobacterium* demostraron ser fuente de Ácido Indol-3-Acético. Más tarde se descubrió que no solo la planta sino también las bacterias y hongos son capaces de sintetizar AIA (Stijn, 2007).

Evidentemente, el IAA también actúa como una molécula de señalización recíproca que afecta a la expresión génica en varios microorganismos. En consecuencia juega desempeña una participación muy importante en las interacciones planta-bacteria. En general, afecta la división celular vegetal, la extensión y la diferenciación, estimula la germinación de semillas y tubérculos, aumenta la tasa de xilema y desarrollo de las raíces; controla los procesos de crecimiento vegetativo, inicia la formación de raíces laterales y adventicias, media las respuestas a la luz, la gravedad y el florecimiento, afecta a la fotosíntesis, la formación de pigmento, la biosíntesis de varios metabolitos y la resistencia a condiciones de estrés.

Por otra parte, AIA producido por bacterias aumenta el área de superficie de la raíz y la longitud, por lo tanto proporciona a la planta un mayor acceso a los nutrientes del suelo, además aflojan paredes celulares de la planta y, como resultado facilita una creciente cantidad de exudado de la raíz que proporciona nutrientes adicionales para apoyar el crecimiento de las bacterias de la rizosfera (Glick, 2010).

### 2.13.3.2. VIAS DE BIOSÍNTESIS DE IAA EN LAS BACTERIAS ENDÓFITAS

Los estudios moleculares sobre las vías bioquímicas de síntesis de IAA bacteriano y su regulación han proporcionado algunas pistas sobre los posibles resultados de las interacciones entre plantas y bacterias promotoras de AIA, que van desde la patogénesis a la fitoestimulación. Se ha observado un alto grado de similitud entre las vías de biosíntesis de AIA de las plantas y las bacterias (fig. 6). El triptófano se ha identificado como el precursor principal para las vías de síntesis del AIA en las bacterias. La identificación de los compuestos intermedios condujo a la identificación de cinco vías diferentes utilizando triptófano como precursor (Stijn, 2007).

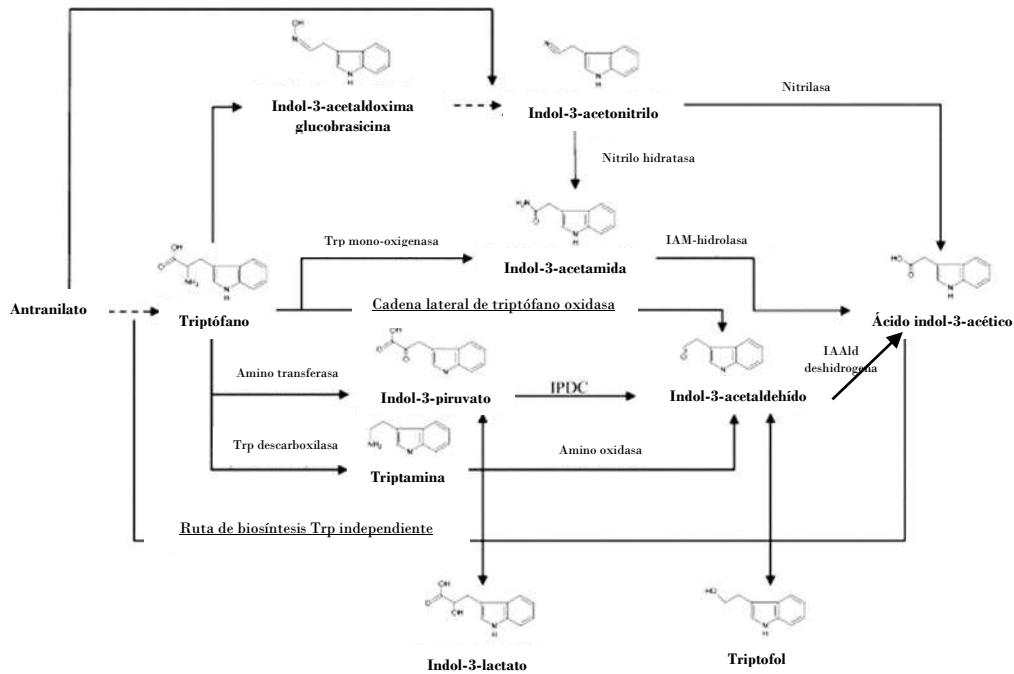


Figura 7. Diferentes vías para la síntesis de AIA en bacterias y plantas. En el intermedio se hace referencia al nombre de la vía: IAALD, Indol-3-Acetaldehído; IAM, Indol-3-Acetamida; PIDC, Descarboxilasa Indol-3-Piruvato; Trp, Triptófano Independiente (Stijn, 2007).

**VÍA INDOL -3-ACETAMIDA (IAM).** La vía indol-3-acetamida (IAM) es la mejor caracterizada en las bacterias. En esta vía el triptófano primero se convierte a IAM por la enzima triptófano-2-monooxigenasa (iaam), codificada por el gen *iaam*. En el segundo paso el indol-3-acetamida se convierte a AIA por una hidrolasa IAM (AICH) codificada por el gen *AICH*. Los genes relacionados con el IAM se han detectado en cromosoma del género *Pseudomonas*, así como en plasmidos de *P. Agglomerans* (Stijn, 2007).

**VÍA INDOL-3-PIRUVATO (IPyA).** Se piensa que es la vía principal para la biosíntesis de AIA en las plantas. Sin embargo los genes claves implicados no han sido identificados aún en las plantas. En el primer paso de esta vía el triptófano es convertido a indol-3-piruvato por una aminotransferasa; **IPyA** se descarboxila a Indol-3-acetaldehído (IAALD) por la descarboxilasa Indol-3-piruvato (PIDC). En el último paso IAALD se oxida a IAA (Stijn, 2007).

**VÍA TRIPTAMINA (TAM).** En las bacterias la vía de la triptamina se ha identificado en *Bacillus cereus* por la actividad de una descarboxilasa de triptófano. En las plantas, la triptamina fue identificada como un compuesto endógeno y los genes que codifican para las descarboxilasas de triptófano han sido clonados y caracterizados a partir de diferentes plantas, lo que indica una ruta biosintética del IAA a través de la triptamina en plantas.

**VÍA INDOL-3- ACETONITRÍLO (IAN).** Esta vía ha sido ampliamente estudiada en plantas, el primer paso de esta vía es la conversión de IAN A IAA por un nitrilasa; los pasos que conducen a la formación de IAN a partir de triptófano son todavía un tema de debate. Recientemente se sugieren dos vías para esta formación: uno a través de glucosinolatos indólicos (glucobrasicina) y otro a través de indol-3-acetaldoxima.

**VÍA TRIPTÓFANO INDEPENDIENTE.** Análisis de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para la biosíntesis se triptófano reveló mayores niveles de conjugados IAA, que condujeron a la propuesta de una vía triptófano independiente para la biosíntesis de AIA (Ultima *et al.*, 1991), sin embargo ninguna enzima de esta vía ha sido caracterizada, actualmente está siendo reexaminado el sistema de esta vía (Stijn, 2007).

#### 2.13.4. ENZIMAS CATALÍTICA

Las enzimas son polímeros de aminoácidos que dirigen su actividad catalítica a distintos sistemas biológicos gracias a su capacidad de acelerar reacciones químicas; siendo las proteasas el grupo de enzimas de mayor importancia.

Las enzimas poseen una capacidad de catálisis asombrosa, estos compuestos están sujetos a las mismas leyes que rigen el comportamiento de otras sustancias en la naturaleza, a la vez, estos compuestos presentan algunas diferencias, como llevar a cabo reacciones biológicas a altas velocidades, actuar bajo condiciones suaves de reacción, es decir, temperaturas por debajo de los 100°C, actúan a pH's neutros, poseen un alto grado de especificidad por el sustrato y el tipo de catálisis que se lleva a cabo varía en respuesta a la concentración de otras sustancias diferentes al sustrato, es decir, tienen capacidad de regulación catalítica. En resumen, las enzimas sobresalen por poseer tres características distintivas: poder catalítico, especificidad y regulación, lo cual facilita los diferentes procesos biológicos en todo tipo de vida, al igual que en diferentes procesos industriales (Lamas, 2015).

Las bacterias endófitas pueden ser usadas como agentes de biocontrol mediante la producción de enzimas como hidrolasas. Las hidrolasas actúan sobre las moléculas de protoplasma, tales como las de grasas, de glicógeno y de proteínas. El acto de catalizar es realizado en la escisión de los enlaces de los átomos de nitrógeno y carbono o bien, de carbono y oxígeno. Al mismo tiempo se adquiere la hidrólisis de las moléculas de agua de la que devienen las moléculas de hidrógeno y oxidrilo, que se unen a las moléculas resultantes de la ruptura de enlaces de las moléculas mencionadas. Dentro de estas enzimas se encuentran proteínas como la quimiotripsina, la tripsina y la pepsina que son esenciales en la digestión ya que son las que hidrolizan enlaces estéricos, glucosídicos y péptidicos (Chet, 2002)

Las enzimas hidrolíticas también proveen a la bacteria de fuentes de carbono y energía rompiendo los polímeros del hospedero en azúcares y aminoácidos de bajo peso molecular. A pesar del hecho de que las enzimas hidrolíticas producidas por bacterias causan daño a

los tejidos, dichas enzimas no son clasificadas como toxinas porque generalmente no matan a las células del hospedero o no causan un daño metabólico identificable (Fairbairn, 1986).

Enzimas proteolíticas. Son enzimas que catalizan la degradación de proteínas al hidrolizar los enlaces peptídicos, éstas enzimas se clasifican en grupos dependiendo de la reacción que catalicen. Originalmente, las proteasas se clasificaron como endopeptidasas o exopeptidasas, indicando que el enlace peptídico blanco de hidrólisis es interno a la proteína o próximo al extremo amino-terminal (aminopeptidasas) o carboxilo-terminal (carboxipeptidasas), respectivamente. A su vez, existe una clasificación basada en sus mecanismos catalíticos que permite distinguir entre cuatro clases principales de proteasas: a) serín-proteasas; b) cisteín-proteasas; c) proteasas aspárticas; d) metalo-proteasas (Fairbairn, 1986).

## 2.14. BIOFILMS BACTERIANOS

### 2.14.1. DEFINICIÓN DE BIOFILMS

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o aun tejido vivo, no estructurados. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales estables todos los microorganismos son capaces de formar biofilm (Lasa *et al.*, 2005).

El estudio sobre la naturaleza de los biofilms se inicio desde hace un largo tiempo, cuando A. Van Leeuwenhoek (s. XVII) determinó la presencia de microorganismos sobre la superficie dental. Sin embargo, no fue hasta 1978 cuando J. W. Costerton describió una comunidad bacteriana en forma de matriz glucoprotica sobre superficie en contacto con el agua (Maestre & Vera, 2004).

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema de estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total (Lasa *et al.*, 2005). En menor cantidad están compuesto por polisacáridos, proteínas y algunas veces pueden contener lípidos, ácidos nucleicos y otros biopolímeros que permiten la formación de micro-nichos y el mantenimiento de gradientes químicos (Gordon, 2016). Su formación se considera como un proceso dinámico y complejo. La adhesión de los microorganismos a las diferentes superficies está influenciada por diversas variantes que incluyen la especie de la bacteria, la composición de la superficie celular, la naturaleza de las superficies, la disponibilidad de nutrientes, la hidrodinámica y la comunicación célula-célula (Venegas *et al.*, 2009).

Una característica distintiva del biofilm también llamadas biopelículas es que las bacterias dentro de ellas muestran una mayor resistencia a los antibióticos y al estrés ambiental, haciéndolos particularmente problemáticos en entornos clínicos e industriales (Vlamakis *et al.*, 2008)

#### 2.14.2. REGULACIÓN DEL PROCESO DE FORMACIÓN DEL BIOFILM

Estudios recientes otorgan un papel primordial en el control de la formación de biofilm a un sistema de comunicación entre los microorganismos llamado *quorum-sensing* que actúa como un lenguaje auténtico a través de señalizaciones químicas. Este sistema funciona de modo de “acuerdo” (*quorum*) entre las células bacterianas, para la activación o represión de genes específicos (entre ellos los reguladores de la expresión de biofilm), mediante la liberación y la detección de ciertas sustancias llamada “autoinductores” (Maestre & Vera, 2004), son llamados de esta manera debido a que la inducción causada por compuestos producidos por las mismas células bacterianas (Gordon, 2016).

Para la formación un biofilm se requiere la expresión génica coordinada de las células individuales. Se ha demostrado que para un número creciente de bacterias utilizan una estrategia, llamada detección de quorum. La célula bacteriana produce más de un compuesto de bajo peso molecular que son transportados fuera de la célula. Al mismo tiempo, las bacterias miden la concentración de estos compuestos en el medio circundante, si la concentración es considerable alcanzando un umbral máximo, el compuesto desencadena en las células bacterianas una cascada de señalización que conduce a la inducción de varios genes formadores de biopelículas. Los autoinductores N-acil homoserina lactonas, son probablemente la mejor clase estudiada de ellos, sin embargo, se conocen varias clases más de autoinductores para la detección de quorum; estos autoinductores no solo se coordinan para iniciar la formación de biopelículas, sino además tienen un papel importante para el mantenimiento de éstas ya establecidas. Para la mayoría de las especies que han sido estudiadas se han detectado no solo uno, sino varios inductores producidos en varias cantidades, probablemente para el ajuste fino de las respuestas celulares (Gordon, 2016).

#### 2.14.3. ETAPAS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOFILM

El primer paso para la formación de biofilm es la asociación entre microorganismos por un proceso denominado “congregación” consiste en el reconocimiento célula a célula, de tal forma que las bacterias que lo constituyen puedan reconocerse y adherirse a otras mediante adhesinas. Estas estructuras, junto con los fenómenos de hidrofobicidad, las fuerzas electrostáticas y de Van der Waals sobre las superficies celulares y del material, favorecen la unión a las proteínas, las glucoproteínas o los receptores de polisacáridos sobre las superficies del huésped o de los biomateriales (Maestre & Vera, 2004). En bacterias Gram negativas se ha visto que los flagelos y las fimbrias son importantes para la adherencia primaria. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y a contrarestar

las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso de adherencia no parece ser un requisito esencial muchas bacterias Gram positivas son capaces de formar biofilm (Lasa *et al.*, 2005).

Una vez que las bacterias se han adherido a la superficie, comienzan a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. En una etapa posterior, la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición de exopolisacáridos es diferente para cada bacteria y varía desde alginato, celulosa, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa, poly-N-acetilglucosamina, etc, (Lasa *et al.*, 2005).

Dentro de un biofilm se produce un alto grado de organización espacio temporal. Algunos estudios han propuesto que las biopelículas comprenden poblaciones heterogéneas que son distintas de las que se observan en las poblaciones dispersas. Y finalmente las células que comprendían la matriz extracelular en última instancia se diferencian a células esporuladas, es particularmente interesante el efecto de esporulación. La base molecular de esta diferenciación no se conoce, pero una hipótesis es que la energía requerida para la producción de la matriz crea microambientes dentro de la biopelícula en la que los nutrientes se agotan severamente (Vlamakis *et al.*, 2008)

Estos tipos de células se pueden distinguir mediante el control de la expresión génica; *hag* codifica la flagelina y es esencial para la motilidad, el operón *yqxm* codifica el componente de proteína principal de la matriz extracelular y *SSPB* codifica una pequeña proteína soluble en ácido se encuentra sólo en las células en esporulación (Vlamakis *et al.*, 2008)

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN AMBIENTES NATURALES

En particular el análisis de una comunidad bacteriana busca entender cuál es la estructura de los ensamblajes biológicos, cuál es su función y como cambian espacialmente y temporalmente; entendiéndose que una comunidad microbiana es un conjunto de especies múltiples, en el que los microorganismos viven juntos en un ambiente contiguo e interactúan entre sí (Allan, 2009). El análisis de las comunidades microbianas involucran varios elementos relacionados con la determinación de:

- \* Diversidad taxonómica: Es el inventario de una muestra discreta, ésta tiene dos importantes componentes, la riqueza de cada taxón y la abundancia relativa de los diferentes taxones en una comunidad.
- \* Determinación de características funcionales: involucra conocer las actividades químicas y bioquímicas de cada microorganismo
- \* Interacciones microbianas: busca determinar la dinámica de las comunidades microbianas específicas con otros ecosistemas.

- \* Redundancia funcional: que proporciona la capacidad de responder rápidamente a cambios ambientales.

A continuación se describen algunas herramientas tanto independientes de cultivo como dependientes de cultivo usadas para el estudio de las comunidades microbianas en ambientes naturales.

### 3.1.1. MÉTODOS DEPENDIENTES DE CULTIVO

Tradicionalmente los estudios para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes se basan en la suposición de que las técnicas de cultivo permiten recuperar la mayor parte de los microorganismos en una muestra. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación. Sin embargo, únicamente entre 0.1 y 10% de las bacterias en el ambiente son ahora cultivables. Para explicar este fenómeno se ha sugerido que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos en su ambiente natural. Además, hay poca información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana (Escalante, 2009).

A pesar de estas limitaciones, el aislamiento de microorganismos propios de ambientes naturales sigue siendo una herramienta útil para el estudio de la fisiología, bioquímica y genética microbiana. Por tanto, con el fin de obtener cultivos puros de los microorganismos más abundantes en la naturaleza, se han hecho continuos esfuerzos para aumentar la probabilidad de aislamiento mediante la realización de medios con baja concentración de nutrientes y largos periodos de incubación, mediante la adición de fuentes de nutrientes no tradicionales, de moléculas señal o de compuestos inhibitorios para evitar el crecimiento de los microorganismos no deseados y mediante el aislamiento por extinción de cultivo, que consiste en diluir la muestra de interés hasta que muy pocos microorganismos permanezcan y posteriormente incubar la muestra diluida en presencia o ausencia de pequeñas cantidades de substratos orgánicos.

#### 3.1.1.1. PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE BACTERIAS ENDÓFITAS.

Los procedimientos más comunes para la obtención de bacterias endófitas combinan técnicas de esterilización de los tejidos seguidas, ya sea de maceración del tejido vegetal que es la más eficiente y su posterior siembra en medio de cultivo (Hallmann, 1997).



### 3.1.1.2. TÉCNICAS DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE BACTERIAS ENDÓFITAS

Las técnicas de desinfección son el punto clave en la obtención de bacterias endófitas puesto que la propia definición de este tipo de microorganismos lleva implícita la aplicación de técnicas de desinfección. En teoría las técnicas de desinfección debe ser lo suficientemente fuertes como para eliminar cualquier microorganismo de la superficie del tejido sin dañar el tejido vegetal y las endófitas, existen procedimientos generales para la desinfección de los tejidos que involucran (Hallmann, 1997):

- 1) Riguroso lavado del tejido vegetal con agua corriente para eliminar, en el caso de las raíces, partículas del suelo adheridas al tejido de interés.
- 2) Desinfección (con agitación) para eliminar los colonizadores remanentes sobre la superficie del tejido, los agentes desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio, etanol, peróxido de hidrogeno, los tiempos de desinfección son variables porque dependen del grado de lignificación del tejido a desinfectar. En general, los tiempos para el hipoclorito de sodio a bajas concentraciones (1-3.5%) oscilan entre 1-6 minutos, para el etanol se maneja concentraciones mayores a 70% y tiempos máximos de 1 minuto.
- 3) Enjuagues con soluciones de lavado estéril bajo condiciones de esterilidad, estos son llevados a cabo después de la aplicación de los agentes desinfectantes.
- 5) Verificación del procedimiento de desinfección, es inoculando alícuotas del último lavado en medio de cultivo.

Entre los medios más utilizados para el cultivo de bacterias endófitas se encuentran agar soya tripticasa, el cual soporta un amplio rango de bacterias o caldo nutritivo (Zinniel *et al*, 2002), medio SC, útil para bacterias difíciles de crecer y medios más específicos como medio King para *Pseudomonas*. Entre los medios selectivos, los medios libres de nitrógeno son utilizados para el aislamiento de endófitas diazotróficas (Fernández *et al.*, 2002).

### 3.1.2. MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

A finales de los años 90's, los enfoques moleculares abrieron nuevas fronteras en la comprensión de la ecología microbiana. Estos métodos, llamados habitualmente como independientes de cultivo, son capaces de detectar e identificar microorganismos directamente en el sistema sin cultivarlos ni aislarlos, ya que analizan su DNA o RNA. La novedad se basa en la extracción de los ácidos nucleicos directamente de las matrices, los cuales son analizados posteriormente por métodos capaces de poner de relieve la diversidad microbiana. Estudiando el DNA, es posible definir cuántas y cuáles son las especies microbianas presentes en una muestra específica, mientras que el estudio del RNA permite entender cuál es la parte metabólicamente activa de la población (Cocolin, 2010).

Las relaciones evolutivas entre los organismos (que por lo general no es posible obtener mediante el análisis de las características fenotípicas) constituyen una base más natural para clasificarlos. Estas relaciones podrían ser establecidas idealmente comparando las secuencias nucleotídicas de sus genomas; sin embargo el análisis a esta escala sería impráctico, pero pueden ser inferidas mediante la comparación de secuencias de genes individuales. Se utilizan entonces ciertas macromoléculas que funcionan como cronómetros evolutivos (indicadores de cambios evolutivos). Se puede medir la distancia evolutiva entre dos organismos por diferencias en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de macromoléculas homólogas aisladas de ellos. Esta molécula debe estar distribuida universalmente en el grupo que se desea estudiar y debe ser funcionalmente homóloga en cada organismo. Para comparar secuencias es necesario alinear las moléculas, por lo que deben contener regiones con similitud significativa además de las que difieren en sus secuencias y éstas deben cambiar a una velocidad proporcional a la de la distancia evolutiva medida, pero los genes que codifican para el RNA ribosomal son los más utilizados (Días, 2003).

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: *Eubacteria* y *Archaeobacteria*, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos. Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución (Rodicio, 2004).

#### 3.1.2.1. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS UTILIZANDO MÉTODOS MOLECULARES

En la microbiología la identificación molecular basada en el DNAr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuyo reconocimiento mediante otro tipo de técnicas resulta imposible o requiere de mucho tiempo. A la fecha se han desarrollado diversas metodologías para el estudio de las comunidades bacterianas (fig. 8); sin embargo, todos los métodos tienen sus ventajas y desventajas. Además, la aplicación de las técnicas de biología molecular modernas para el estudio de la diversidad en ecosistemas complejos, es una herramienta altamente eficaz para la identificación de microorganismos presentes en ellos (Gaona, 2012).



Figura 8. Métodos moleculares para la identificación de bacterias endófitas (Rodicio, 2004).

### 3.1.2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

En los últimos años, los avances en la microbiología molecular han esclarecido algunos aspectos que se demostraban históricamente problemáticos. La disponibilidad de herramientas moleculares ha permitido identificar más precisamente a las cepas bacterianas, disminuyendo la confusión acerca de sus identidades (Reinheimer & Zalazar, 2006).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que facilita la amplificación *in vitro* de fragmentos específicos de DNA. Utiliza el mismo principio de la DNA polimerasa en la síntesis de una cadena complementaria de DNA en la dirección 5'-3', pero emplea dos primers (secuencia de nucleótidos de 20-25 bp) cada uno complementario a las cadenas de la región del DNA de los extremos, que se ubicarán una vez desnaturalizado el DNA por calor, y dirigen la síntesis del DNA hacia el otro primer.

Los requerimientos de la reacción: deoxinucleótidos para proveer energía y nucleósidos para la síntesis de DNA, DNA polimerasa, primers, DNA molde y buffer. Para permitir la

amplificación selectiva es necesario obtener información de la secuencia de DNA y así diseñar los dos primers que son específicos para la secuencia del DNA a flanquear (Castro, 2005).

En general la PCR consiste en una serie de ciclos constituidos por tres reacciones sucesivas:

1. Desnaturalización: 92-95°C, separación de las cadenas de DNA
2. Alineamiento de los primers: 50-70°C, ubicación de los amplimeros a la cadena molde de DNA por complementariedad.
3. Elongación: 70-75°C, la DNA polimerasa sintetiza la cadena.

Luego de amplificar y secuenciar el fragmento, la secuencia obtenida se compara con aquellas depositadas en bases de datos públicas. Para el alineamiento de secuencias están disponibles programas como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) que permiten la comparación de secuencias *on line* (Poggi et al., 2009).

La comparación entre especies (o taxones de orden superior) es una de las herramientas metodológicas más ampliamente utilizadas en el ámbito de la biología evolutiva, incluyendo aspectos tan variados como el estudio de los ciclos vitales, la abundancia y a distribución de los microorganismos. En particular las comparaciones interespecíficas permiten comprender cómo la herencia ancestral y la selección natural, es decir, los dos grandes temas de la biología evolutiva desde Darwin, que han ido moldeando los rasgos que observamos en las especies actuales. Además, los estudios comparativos revelan con frecuencia regularidades sorprendentes en los datos que sirven de punto de partida para nuevas preguntas (Días, 2003).

### 3.2. CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

La filogenia es considerada la ciencia encargada de estimar la evolución de las especies, genes o genoma, en donde específicamente la filogenia molecular hace uso de la secuencias de DNA o proteínas para realizar las comparaciones evolutivas aprovechando las dependencias que existen desde el punto de vista estadístico entre las secuencias (Harvey y Nee, 1993).

La comparación de las secuencias de DNA permite establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos procariotas. Esta ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que, que a su vez ha permitido la identificación rápida y precisa, tanto de procariotas como de eucariotas. La amplificación del gen 16S permite su posterior secuenciación y este proceso comienza preferentemente del DNA extraído de un cultivo puro bacteriano, aunque también puede conseguirse de una muestra proveniente de distintos tipos de fuentes (Rodicio, 2004).

La reconstrucción filogenética se sustenta en el concepto darwiniano de "descendencia con modificación", de forma que los caracteres que se observan en las distintas especies, heredados a partir de un ancestro común, son indicativos de una relación genealógica. El

postulado del que se parte es que la semejanza puede ser interpretada de forma racional bajo la óptica de una ascendencia común. Por lo tanto, el problema que plantea la reconstrucción filogenética es el de la inferencia del ancestro a partir de la observación de caracteres que presentan los taxones terminales (Spivak, 2006).

Los árboles filogenéticos nos permiten esquematizar dichas relaciones. Estos árboles constan de nodos unidos entre sí por ramas, las longitudes de estas ramas pueden significar la distancia evolutiva que hay entre nodos. Los árboles agrupan los organismos, de manera de que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado que se origina de un único ancestro común y por lo tanto puede poseer rasgos comunes. Éstos se pueden construir a partir de alineamientos de múltiples secuencias (Baldauf, 2003). Existen diversos métodos para la construcción de los árboles filogenéticos como lo son los métodos basados en distancias (se pueden subdividir en métodos basados en agrupamientos (calculan el árbol usando una matriz de distancias e iniciando por los pares de secuencias más similares) y el método de pares no ponderados utilizando media aritmética (UPGMA y Neighbor-Joining son ejemplos de este algoritmo), métodos basados en optimalidad (comparan muchas topologías alternativas de árboles y seleccionan el que tenga el mejor ajuste entre las distancias estimadas en el árbol y las distancias evolutivas reales (Fitch-Margoliash y Evolución Mínima son ejemplos de estos algoritmos) y métodos basados en caracteres (están basados directamente en el análisis de los caracteres que forman las secuencias y no de las distancias entre los pares de estas), estos métodos cuentan los eventos de mutación acumulados en las secuencias y pueden por lo tanto eliminar la pérdida de información que se da cuando los caracteres son transformados a distancias y de esta manera se puede estudiar la dinámica evolutiva de cada una de ellos e inferir secuencias de ancestros; los métodos más comunes son el método de Máxima Parsimonia (selecciona el árbol que tiene el mínimo número de cambios evolutivos, “en igualdad de condiciones la solución más sencilla es probablemente la correcta”) y el método de Máxima Verosimilitud (emplea modelos probabilísticos para seleccionar el mejor árbol, es un método exhaustivo que busca todas las posibles topologías y considera cada posición en un alineamiento, no solo sitios informativos).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La aplicación de químicos para estimular el crecimiento vegetal y controlar plagas ocasionando problemas de contaminación ambiental es cada vez mayor. Por tal motivo, es necesario emplear nuevas estrategias que no causen efectos dañinos al ambiente y la a salud humana. En este sentido, el uso de bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal se ha convertido en una excelente propuesta para optimizar la producción de cultivos y su protección contra fitopatógenos. Por lo tanto, es importante descubrir nuevos agentes microbianos con actividades benéficas para las plantas, explorando aquellas donde la diversidad del microbioma es aún desconocido, tal es el arándano (*Vaccinium* sp. Var. Biloxi).

## 5. HIPOTESIS

En los tejidos internos de las plantas de arándano, especie *Vaccinium sp.* var. Biloxi, residen bacterias endófitas con actividades directas de promoción del crecimiento vegetal.

## 6. OBJETIVO

### 6.1. GENERAL

Determinar la diversidad de bacterias endófitas cultivables en plantas de arándano (*Vaccinium* sp. var. Biloxi) así como sus actividades de promoción de crecimiento vegetal.

### 6.2. PARTICULARES

- Aislar bacterias endófitas cultivables de plantas de arándano.
- Amplificar y secuenciar el gen ribosomal 16S de los aislados obtenidos.
- Realizar un análisis filogenético de los genes ribosomales 16S.
- Determinar la producción de índoles totales, sideróforos, proteasas y biofilm en los aislados endófitos.







Figura 10. Plantas de arándano (*Vaccinium sp. var. Biloxi*).

Posterior a la recolección de las plantas estas fueron llevadas al laboratorio de Diversidad Genómica del IIQB de la UMSNH para realizar los cortes, desinfección, macerado y aislamiento de bacterias endófitas de los diferentes tejidos de la planta.

## 8.2. CORTE Y DESINFECCIÓN SUPERFICIAL

Una vez en el laboratorio se tomaron y mezclaron muestras de tejido de 4 plantas por repetición (3 independientes). Se procedió a la extracción de bacterias endófitas de toda la planta de arándano, una vez seleccionadas se hicieron los cortes para tomar en total 1 g de tejido por planta y poder proceder con la desinfección.

Para desinfectar los tejidos superficiales y asegurar así la eliminación de las bacterias de la rizosfera se realizaron lavados con cloro y alcohol como a continuación se describe (Fig. 11):

- Se colocaron los cortes de la planta en solución de alcohol al 70%, se agitaron durante 30 segundos para eliminar la tierra de las raíces.
- Se pasaron los tejidos a una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%, se agitaron durante 5 minutos.
- Posteriormente se enjuagaron con etanol al 70% por 30 segundos.
- Finalmente se lavaron con agua estéril, repitiendo este lavado por 5 veces.

Como control se plaquearon 100µL del último lavado, incubando por 72 horas, en los cuales no debe presentarse ningún crecimiento de colonias bacterianas, con lo que se garantizó la eliminación de las bacterias superficiales



Figura 11. Planta de arándano después de la desinfección superficial.

### 8.3. EXTRACCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE LAS PLANTAS DE ARÁNDANO

Para obtener a unidades formadoras de colonias (UFC) se tomaron los cortes de la planta de arándano desinfectada y se maceraron en morteros estériles, posterior a su trituration se hicieron las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ . Enseguida se tomaron 100 $\mu$ L de cada dilución para plaquearlos en cajas de agar nutritivo al 20%, las cuales se incubaron por 72 horas a 30°C, realizando conteos periódicos de las UFC, se seleccionaron los aislados para purificarlos en base a la morfología colonial (color, tamaño, consistencia, altura y forma de la colonia) tratando de obtener la mayor diversidad posible.

Una vez seleccionados los aislados fueron identificados con un código alfanumérico único para cada uno de los mismos, el código consta de dos partes fundamentales: PEV + número consecutivo.

Una vez que los aislados son identificados se resguardan en glicerol para evitar la pérdida de los mismo y así tener el banco de bacterias endófitas de plantas de arándano.

### 8.4. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S

El protocolo de extracción de DNA genómico que se siguió es una modificación del protocolo de Mahuku (Mahuku, 2004), el cual consta de los siguientes pasos:

- Se tomó una asada de suspensión bacteriana del aislado, se resuspendió y disolvió en un tubo eppendorf que contenía 300 $\mu$ L de buffer TES.
- Vortex de 1 minuto para homogenizar las células.

- Se adicionaron 200µL de buffer TES y 1 µL de proteinasa K (con una concentración final de 50µg/mL, esto se logró agregando 1.3µL de proteinasa K con una concentración de 20 µg/mL) y se agitó suavemente.
- Se incubó en thermoblock a 65°C durante 30 minutos dando un vortex fuerte de 1-3 segundos cada 5 minutos.
- Se adicionaron 250 µL de acetato de amonio 7.5 M y se agitó suavemente.
- Se incubó la muestra en hielo por 10 minutos.
- Se adicionó un volumen de cloroformo isoamílico (750 µL).
- Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Se adicionó un volumen de 450 µL de isopropanol frío.
- Se incubó a -20°C por una hora.
- Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos.
- Se desechó sobrenadante, posteriormente se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70% frío.
- Se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos.
- Se desechó sobrenadante e incubó a 37°C hasta evaporar todo el etanol.
- Se adicionaron 50 µL de buffer TE mezclando con la micropipeta y se dió un vortex posterior para resuspender el DNA.
- Se transfirió la solución a un tubo nuevo.
- Se adicionó 1 µL de RNasa dejando incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- El DNA se resguardó de -20 a -70°C.

Una vez obtenido el DNA genómico, mediante el uso de la técnica molecular de PCR se amplificó el gen 16S DNAr con la siguiente reacción de PCR:

- 6.5 µL de agua libre de DNasa
- 10 µL de Master Mix
- 1.5 µL de cada oligo (**FD1\_5'**-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'; **RD1\_5'**-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
- 1 µL DNA genómico

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

- Temperatura inicial de 105°C.
- 1 ciclo:
  - 95°C / 4 minutos.
- 30 ciclos:
  - 95°C/1 minuto.
  - 55°C/1 minuto.
  - 72°C/2 minutos.

- Extensión final 72°C / 10 minutos.

Una vez amplificado el gen ribosomal 16S se corrió un gel al 1% de agarosa para confirmar la presencia del producto, con la banda correspondiente a las 1500 pb.

#### 8.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Una vez que se obtuvieron los productos purificados del gen ribosomal 16S, estos fueron llevados para su secuenciación a Molecular Research LP, Texas, US. Posteriormente se analizaron las secuencias ribosomales (>1200bp) para identificar el género y la especie a la que corresponden.

Para realizar los análisis filogenéticos lo primero que se realizó fue el análisis tipo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para así obtener las homologías de nuestras secuencias con la base de datos, para poder realizar los alineamientos de secuencias múltiples se usó el método Mucle, utilizando el programa Seaview y método PhyML para crear el árbol filogenético, con una confianza estadística estimada en 1000 bootstrap (Edgar, 2004).

#### 8.6. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE INDOLES TOTALES

Para la determinación de indoles totales se utilizó el método colorimétrico basado en el uso del reactivo de Salkowsky (Salkowsky E, 1885). El reactivo de Salkowsky es ampliamente utilizado para establecer la presencia del grupo indol mediante una reacción de oxidación que produce el ácido sulfúrico a las moléculas de indol, generando una coloración que va de la gama de los rosados a fucsia, evidenciando la presencia de moléculas con grupo indol presumibles como compuestos auxínicos, el cual consta de los siguientes pasos:

- Las cepas se sembraron en 3 mL caldo nutritivo adicionado con 1% de triptófano.
- Se incubaron a 30°C con agitación constante, se midió el crecimiento a una longitud de onda de 540 nm hasta alcanzar la D.O. de 1.
- Se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 minutos.
- En una celda de cuarzo se colocaron 500 µL de sobrenadante y 1000 µL de reactivo de Salkowsky (FeCl<sub>3</sub> 0.4058 g/L y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mL) que se incubaron por 30 minutos protegidas de la luz.
- Se realizó la lectura en espectrofotómetro a 540 nm, tomando como blanco caldo nutritivo adicionado con triptófano sin inóculo.

El experimento se realizó por triplicado.

Una vez obtenidos los valores de absorbencia se convierten a µg/mL usando una curva de calibración estándar, preparando soluciones de IAA a concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 µg/mL leyendo a 540 nm (Glickmann & Dessaux, 1995).

## 8.7. ANÁLISIS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM

Para realizar el ensayo de biofilm se seleccionaron las cepas con mayor producción de AIA, para ello se realizó el siguiente procedimiento:

- Se pusieron a crecer las cepas en 3 mL de caldo nutritivo en agitación constante a 30°C, transcurrido el tiempo se mide a una longitud de onda de 540 nm hasta llegar a la D.O de 1.
- Se hicieron diluciones 1:100 con cada muestra utilizando agua destilada estéril.
- Se tomaron 500 µL de la dilución que se transfirieron a un tubo eppendorf.
- Se mantuvieron estos tubos a 30°C hasta un tiempo de interés, para medir a producción de biofilm, estos son, 24, 48 y 72 horas.
- Pasado cada tiempo se procedió a teñir las células con cristal violeta al 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Después de dicho tiempo se decantaron los tubos y se lavaron con agua destilada estéril.
- Posteriormente, se utilizó etanol al 95% para solubilizar las células que quedaron adheridas al tubo y que por lo tanto tuvieron la capacidad de producir biofilm.
- Por último, las células que fueron solubilizadas con ayuda del etanol fueron leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda a 570 nm.

El experimento se realizó por triplicado.

## 8.8. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

Para determinar la producción de sideróforos se utilizó el medio de cultivo descrito por Alexander y Zuberer en 1991. Este medio contiene Cromo Azuroil S (CAS), al cual se encuentra unido el hierro formando parte del complejo Fe-CAS. Partiendo de las cepas puras, se sembraron en medio CAS usando palillos estériles, posteriormente se incubaron a 30°C por 72 horas, midiendo el cambio de color del medio de azul a amarillo cada 24 horas, lo cual indica la producción de sideróforos. Los experimentos se realizaron por triplicado

## 8.9. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS

La actividad proteolítica es indicada por la degradación de la caseína. Para determinar la producción de proteasas de los aislados puros de endófitos de arándano se utilizó el medio Skim-Milk usando palillos estériles, posteriormente se incubaron a 30°C por 24 horas midiendo la formación de un halo transparente en el medio que es de color blanco. Este halo indica la producción de proteasas (Fairbairn & Law, 1986). Los experimentos se realizaron por triplicado

## 9. RESULTADOS

### 9.1. EXTRACCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE LAS PLANTAS DE ARÁNDANO

En el presente trabajo se determinó la diversidad de bacterias endófitas cultivables de plantas de arándano *Vaccinium sp. var. Biloxi*, (raíz, tallo Y hojas juntos), se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) logrando un conteo de  $11 \times 10^1$  UFC/g de toda la planta como promedio de 4 extracciones realizadas Como se observa en la Fig. 12. Del total de las UFC's se obtuvieron 120 aislados puros de los cuales se realizó la extracción de DNA.

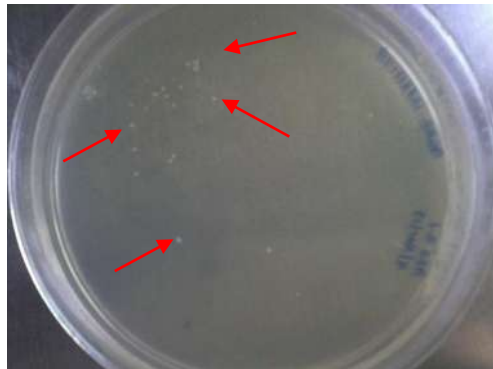


Figura 12. Bacterias endófitas aisladas de los tejidos de arándano, cultivadas en agar nutritivo.

### 9.2. SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S DE LOS AISLADOS DE BACTERIAS ENDÓFITAS

Se amplificó y purificó el gen ribosomal 16S, la fig. 13 es representativa del resultado obtenido.

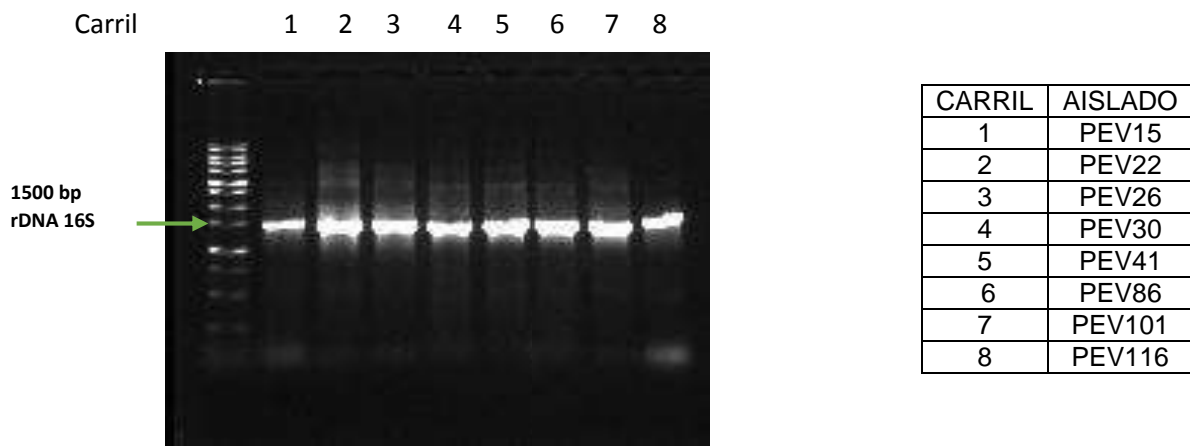


Figura 13. Purificación y amplificación del gen ribosomal 16S. Gel de agarosa al 1% en donde se observa la amplificación del gen ribosomal 16S, de lado izquierdo, tabla de identificación de aislados cargados en cada carril del gel de agarosa.

Los productos purificados se secuenciaron en el laboratorio de Molecular Research LP, Texas, US. de donde se nos proporcionaron los archivos con las respectivas secuencias como se muestra en la (fig. 14)

>1.\_PEV1

```

TGTTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCCGGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAACGCTAGTTGAATAA
GCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGA
GGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGACCACCGCTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTA
GTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCGCGA
GGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGA
GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGG

```

Figura 14. Imagen representativa de la secuenciación de bacterias endófitas\_PEV1.

### 9.3. ANÁLISIS TIPO BLAST EN BASE A LAS SECUENCIAS DEL GEN rDNA 16S

Con dichas secuencias se realizaron búsquedas BLAST en la base de datos, obteniendo homologías por arriba de un 95% con diversos géneros, véase en la tabla 6, cabe mencionar que se realizó la búsqueda de cada secuencia, lo que equivale a 92 búsquedas BLAST en la base de datos. Por otra, parte se tuvo que hacer un análisis filogenético para lograr un resultado más específico y detallado.

No. en caja	SECUENCIA IDENTIFICADA		bp.	% identidad	No. De identidad
1	PEV1	<i>Bacillus thuringiensis Bt407</i>	1236	99%	NR_102506.1
2	PEV2	<i>Bacillus anthracis str. Ames</i>	1502	99%	NR_074453.1
3	PEV3	<i>Bacillus toyonensis BCT-7112</i>	1544	99%	NR_121761.1
4	PEV4	<i>Streptomyces rimosus NBRC 12907</i>	1120	100%	NR_112332.1
5	PEV5	<i>Streptomyces rimosus JCM 4667</i>	980	99%	NR_024762.1
6	PEV6	<i>Streptomyces rimosus NBRC 12907</i>	683	99%	NR_112332.1
7	PEV7	<i>Streptomyces abikoensis NBRC 13860</i>	1180	100%	NR_118286.1
8	PEV8	<i>Streptomyces griseocarneus DSM 40004</i>	1357	99%	NR_026355.1
9	PEV10	<i>Streptomyces griseocarneus DSM 40004</i>	1147	99%	NR_026355.1
10	PEV11	<i>Streptomyces griseocarneus DSM 40004</i>	1027	99%	NR_026355.1



11	PEV12	<i>Streptomyces griseocarneus</i> DSM 40004	1026	99%	NR_026355.1
12	PEV13	<i>Streptomyces griseocarneus</i> DSM 40004	929	99%	NR_026355.1
13	PEV14	<i>Streptomyces abikoensis</i> NBRC 13860	766	99%	NR_118287.1
14	PEV15	<i>Streptomyces griseocarneus</i> DSM 40004	1133	99%	NR_026355.1
15	PEV16	<i>Streptomyces griseocarneus</i> DSM 40004	1117	99%	NR_026355.1
16	PEV17	<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	1506	99%	NR_115714.1
17	PEV19	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> IFO 15077	732	99%	NR_112002.1
18	PEV20	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1542	99%	NR_074740.1
19	PEV22	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1417	99%	NR_074740.1
20	PEV23	<i>Pantoea agglomerans</i> NBRC 102470	1337	99%	NR_114111.1
21	PEV24	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	1334	99%	NR_103927.1
22	PEV26	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	1140	99%	NR_103927.1
23	PEV27	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	1227	99%	NR_103927.1
24	PEV29	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	1399	99%	NR_074453.1
25	PEV30	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	1218	99%	NR_041577.1
26	PEV31	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	886	99%	NR_074875.1
27	PEV32	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578	1325	99%	NR_044931.1
28	PEV33	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	775	99%	NR_074875.1
29	PEV35	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> IFO 15077	716	99%	NR_112002.1
30	PEV37	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	901	99%	NR_041577.1
31	PEV38	<i>Azoarcus evansii</i> KB740	1498	99%	NR_029266.1
32	PEV39	<i>Burkholderia lata</i> 383	1385	99%	NR_102890.1
33	PEV40	<i>Burkholderia lata</i> 383	1314	99%	NR_102890.1
34	PEV41	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	1137	99%	NR_104978.1
35	PEV42	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	1127	99%	NR_104978.1
36	PEV43	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	1103	99%	NR_104978.1
37	PEV44	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	1330	99%	NR_104978.1
38	PEV45	<i>Burkholderia cepacia</i> NBRC 14074	1223	99%	NR_113645.1
39	PEV47	<i>Burkholderia cepacia</i> LMG 1222	871	99%	NR_118057.1
41	PEV49	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	1120	99%	NR_104978.1
42	PEV51	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	1012	99%	NR_104978.1
43	PEV52	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	1126	99%	NR_104978.1
44	PEV55	<i>Azoarcus evansii</i> KB740	1420	99%	NR_029266.1
45	PEV54	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	1531	100%	NR_074599.1
46	PEV55	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	1458	99%	NR_074599.1
47	PEV56	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	1514	100%	NR_074599.1
48	PEV57	<i>Azoarcus evansii</i> KB740	1310	99%	NR_029266.1
49	PEV58	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	1447	100%	NR_074599.1
50	PEV59	NO SE ENCONTRÓ SIMILITUD ALGUNA			
51	PEV60	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> IFO 15077	689	99%	NR_112002.1
52	PEV61	<i>Microbacterium pumilum</i> KV-488	1049	99%	NR_041331.1
53	PEV62	<i>Microbacterium terrae</i> A-1	1179	99%	NR_036760.1
54	PEV63	<i>Devosia insulae</i> strain DS-56	1186	99%	NR_044036.1
55	PEV64	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	1103	99%	NR_074829.1

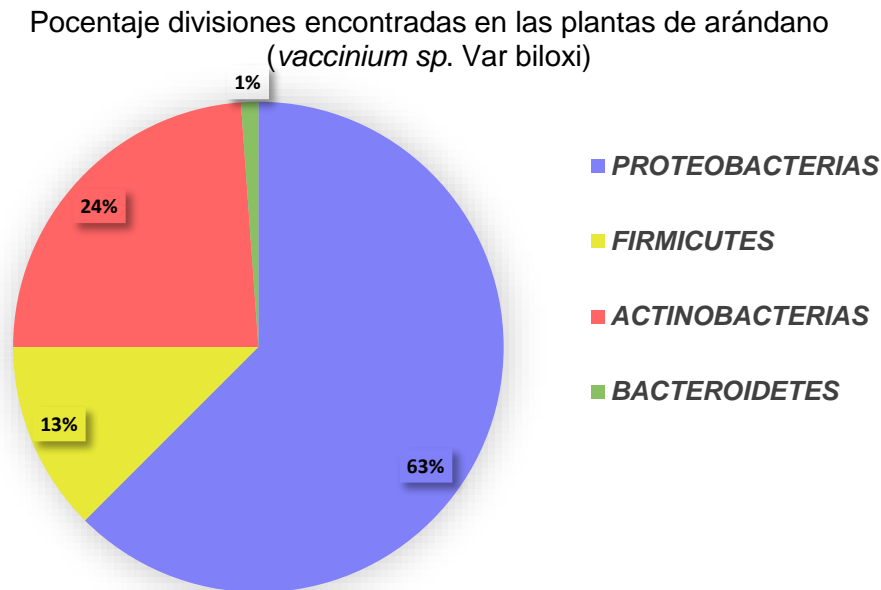
56	PEV66	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	968	99%	NR_074829.1
57	PEV67	<i>Sphingopyxis taejonensis</i> JSS-54	904	98%	NR_024999.1
58	PEV68	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> NBRC 15033	1246	99%	NR_113720.1
59	PEV69	<i>Sphingopyxis indica</i> DS15	1389	99%	NR_108185.1
60	PEV70	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA SIMILITUD	928		
61	PEV71	<i>Bacillus cytotoxicus</i> NVH 391-98	1188	99%	NR_074914.1
62	PEV72	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA SIMILITUD			
63	PEV74	<i>Bacillus pseudomycooides</i> NBRC 101232	905	100%	NR_113991.1
64	PEV75	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA SIMILITUD			
65	PEV76	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> VKPM B-7519	1321	99%	NR_116536.1
66	PEV77	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> VKPM B-7519	1115	99%	NR_116536.1
67	PEV78	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> VKPM B-7519	1303	99%	NR_116536.1
68	PEV79	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	1403	100%	NR_074599.1
69	PEV80	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	1532	100%	NR_074829.1
70	PEV81	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	1288	99%	NR_103927.1
71	PEV82	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	1462	100%	NR_074829.1
72	PEV83	<i>Streptomyces griseocarneus</i> DSM 40004	1093	99%	NR_026355.1
73	PEV84	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1320	99%	NR_074740.1
74	PEV85	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112	1103	99%	NR_121761.1
75	PEV86	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1378	99%	NR_074740.1
76	PEV87	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1322	99%	NR_074740.1
77	PEV88	<i>Streptomyces rimosus</i> NBRC 12907	923	99%	NR_112332.1
78	PEV89	<i>Streptomyces griseocarneus</i> DSM 40004	966	99%	NR_026355.1
79	PEV93	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1320	99%	NR_074740.1
80	PEV94	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1322	99%	NR_074740.1
81	PEV95	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1271	99%	NR_074740.1
82	PEV96	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A; BAA-978	1470	99%	NR_074598.1
83	PEV97	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A; BAA-978	1413	99%	NR_074598.1
84	PEV98	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A; BAA-978	1408	99%	NR_074598.1
85	PEV99	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	1465	100%	NR_074325.2
86	PEV100	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	1432	99%	NR_074740.1
87	PEV101	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A; BAA-978	1533	99%	NR_074598.1
88	PEV102	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A; BAA-978	1528	99%	NR_074598.1
89	PEV103	<i>Flavobacterium acidificum</i> LMG 8364	1251	99%	NR_104962.1
90	PEV104	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	1330	100%	NR_074325.2
91	PEV105	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	2767	100%	NR_074325.2

92	PEV10 6	<i>Burkholderia xenovorans LB400</i>	1398	100%	NR_074325.2
----	------------	--------------------------------------	------	------	-------------

Tabla 6. Resultado del análisis tipo BLAST.

#### 9.4. DIVISIONES BACTERIANAS ASOCIADAS AL ARÁNDANO (*Vaccinium sp. var. Biloxi*)

Con respecto al resultado de las búsquedas BLAST, Como se muestra en la grafica 4, se registró un mayor porcentaje de proteobacterias con un 62.5 %, siguiendole las actinobacterias con un 23.9 % y los firmicutes con un 12.5 % , por último se encontró una mucho menor cantidad de bacteroidetes registrando un 1.1%



Gráfica 4. Divisiones encontradas en los tejidos de arándano (*Vaccinium sp. var Biloxi*). Gráfica de paste con las distintas divisiones encontradas en el arándano.

#### 9.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A PLANTAS DE ARÁNDANO (*Vaccinium sp. var. Biloxi*).

La construcción del árbol filogenético se realizó mediante el uso del programa Seaview, con alineación por el método Muscle y la estimación del método Máxima Verosimilitud (**PhyML**) con un bootstrap de 1000. Este árbol muestra las relaciones filogenéticas entre los aislados endófitos y las cepas de referencia resultantes de las búsquedas BLAST (Fig. 15).

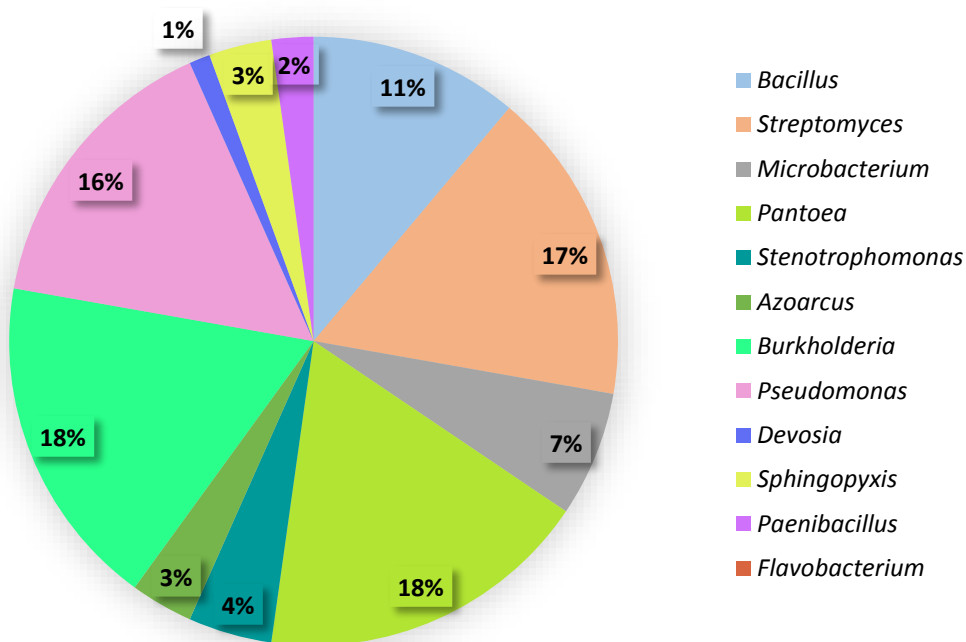


El análisis filogenético de nuestras bacterias endófitas nos permitió reforzar las identidades previamente identificadas en búsquedas BLAST, pues el fundamento de este tipo de análisis está basado en las relaciones evolutivas y ancestros comunes de cada especie, tanto vivientes como extintos. por la cual ahora se le manejará como cepas de ahora en adelante.

#### 9.6. GÉNEROS DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A *Vaccinium sp.* var. Biloxi.

En total se obtuvieron 11 géneros distintos de las 91 cepas, encontrando una mayor cantidad en los géneros *Burkholderias* y *Pantoeas* seguida de *Streptomyces*, y *Pseudomonas*. Se puede observar una gráfica representativa (Gráfica 5).

**GÉNEROS DE BACTERIAS ENDÓFITAS ENCONTRADAS EN LAS PLANTAS DE ARÁNDANO (*vaccinium sp.* Var biloxi)**



Gráfica 5. Gráfica de pastel que muestra el porcentaje de géneros endófitos encontrados en los tejidos de arándano (*Vaccinium sp.* var. Biloxi).

Podemos ver que hubo especies con un mayor número de representantes, tal es el caso de la especie *Pantoea agglomerans*, se observa en la tabla 7, un listado de las especies encontradas y a que cepa corresponden.

<b>Especies endófitas de <i>Vaccinium sp.</i></b>	<b>CEPA</b>	<b>Especies endófitas de <i>Vaccinium sp.</i></b>	<b>CEPA</b>
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	PEV75	<i>Devosia insulae</i>	PEV63,
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	PEV76,PEV77	<i>Sphingopyxis taejonensis</i>	PEV67
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	PEV72, PEV74	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	PEV68
<i>Bacillus cytotoxicus</i>	PEV70, PEV71	<i>Sphingopyxis panaciterrulae</i>	PEV69
<i>Bacillus anthracis</i>	PEV29, PEV2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PEV37, PEV31, PEV30, PEV33
<i>Bacillus cereus</i>	PEV17, PEV1, PEV84, PEV3	<i>Azoarcus evansii</i>	PEV38, PEV57, PEV53
<i>Burkholderia xenovorans</i>	PEV98, PEV105, PEV106, PEV103	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	PEV16, PEV88, PEV12, PEV82, PEV13, PEV8, PEV11,PEV10, PEV15
<i>Microbacterium oxydans</i>	PEV32	<i>Burkholderia cepacia</i>	PEV48, PEV45, PEV47, PEV44
<i>Microbacterium pumilum</i>	PEV61	<i>Burkholderia contaminans</i>	PEV39, PEV42, PEV41, PEV43, PEV51, PEV40, PEV52, PEV49
<i>Microbacterium terrae</i>	PEV62	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PEV66, PEV64 PEV81, PEV79
<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	PEV35, PEV19, PEV60	<i>Pseudomonas protegens PF-5</i>	PEV78, PEV58, PEV56, PEV55, PEV54, PEV101, PEV96, PEV100, PEV97, PEV95
<i>Streptomyces rimosus</i>	PEV4, PEV6, PEV5, PEV87	<i>Pantoea agglomerans</i>	PEV23, PEV80, PEV89, PEV24, PEV93, PEV83, PEV94, PEV27, PEV86, PEV26, PEV104, PEV22, PEV99, PEV102, PEV20, PEV85
<i>Streptomyces abikoensis</i>	PEV14, PEV7		

Tabla 7. Especies aisladas de los tejidos de arándano (*Vaccinium sp.* var. Biloxi).

9.7. BUSQUEDA DE ACTIVIDADES DE BIOCONTROL Y PROMOCIÓN DE CREMIENTO VEGETAL

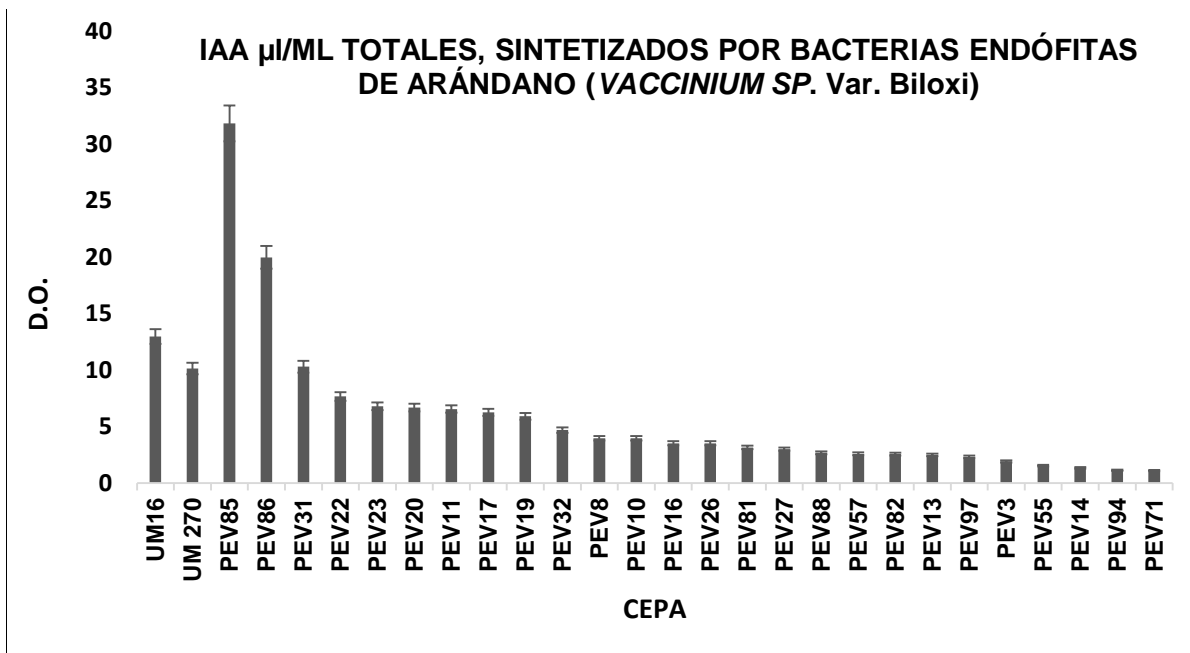
9.7.1. PRODUCCIÓN DE INDOLES TOTALES

El método colorimétrico que utiliza el reactivo de Salkowski determina indoles totales; para conocer la concentración de IAA que nos interesa, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones conocidas de ácido-3-indol acético. Las D.O. obtenidas de la medición de cada una de las cepas (indoles totales) fueron extrapoladas en dicha curva, de esta manera el resultado obtenido es  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de AIA.

Se realizó el experimento con las 92 cepas de las cuales 26 cepas resultaron mayor e igual que  $1\mu\text{L}/\text{mL}$ . Se observó que la cepa con mayor producción de indoles totales fue *Pantoea agglomerans* PEV85, seguida por *Stenotrophomonas maltophilia* PEV31, se puede observar en la fig. 15

<b>CEPA</b>	<b>AIA <math>\mu\text{L}/\text{mL}</math></b>	<b>CEPA</b>	<b>AIA <math>\mu\text{L}/\text{mL}</math></b>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12.98	<i>Streptomyces griseocarneus</i> PEV16	3.53
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10.13	<i>Pantoea agglomerans</i> PEV26	3.53
<i>Pantoea agglomerans</i> PEV85	31.84	<i>Pseudomonas stutzeri</i> PEV81	3.15
<i>Pantoea agglomerans</i> PEV86	19.98	<i>Pantoea agglomerans</i> PEV27	3.00
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> PEV31	10.30	<i>Streptomyces griseocarneus</i> PEV88	2.68
<i>Pantoea agglomerans</i> PEV22	7.67	<i>Azoarcus evansii</i> PEV57	2.59
<i>Pantoea agglomerans</i> PEV23	6.81	<i>Streptomyces griseocarneus</i> PEV82	2.57
<i>Pantoea agglomerans</i> PEV20	6.68	<i>Streptomyces griseocarneus</i> PEV13	2.50
<i>Streptomyces griseocarneus</i> PEV11	6.55	<i>Pseudomonas protegens</i> PEV97	2.33
<i>Bacillus cereus</i> PEV17	6.25	<i>Bacillus cereus</i> PEV3	1.91
<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> PEV19	5.91	<i>Pseudomonas protegens</i> PEV55	1.54
<i>Microbacterium oxydans</i> PEV32	4.69	<i>Streptomyces abikoensis</i> PEV14	1.35
<i>Streptomyces griseocarneus</i> PEV8	3.98	<i>Pantoea agglomerans</i> PEV94	1.13
<i>Streptomyces griseocarneus</i> PEV10	3.96	<i>Bacillus cytotoxicus</i> PEV71	1.11

Tabla 8. Cepas con una mayor síntesis de indoles totales.



Gráfica 6. Indoles totales (IAA) sintetizados por bacterias endófitas de arándano (*Vaccinium sp.* var. Biloxi).

#### 9.7.2. PRODUCCIÓN DE BIOFILM

La determinación de biofilm se les realizó a las cepas que registraron una mayor cantidad de indoles totales. Básicamente, la producción de biofilm representa una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza, el crecimiento se probó sobre una superficie inerte, utilizando como control positivo a la cepa UM270.

Las cepas que producen una mayor cantidad de biofilm que el control positivo son las que se muestra en la gráfica 7.

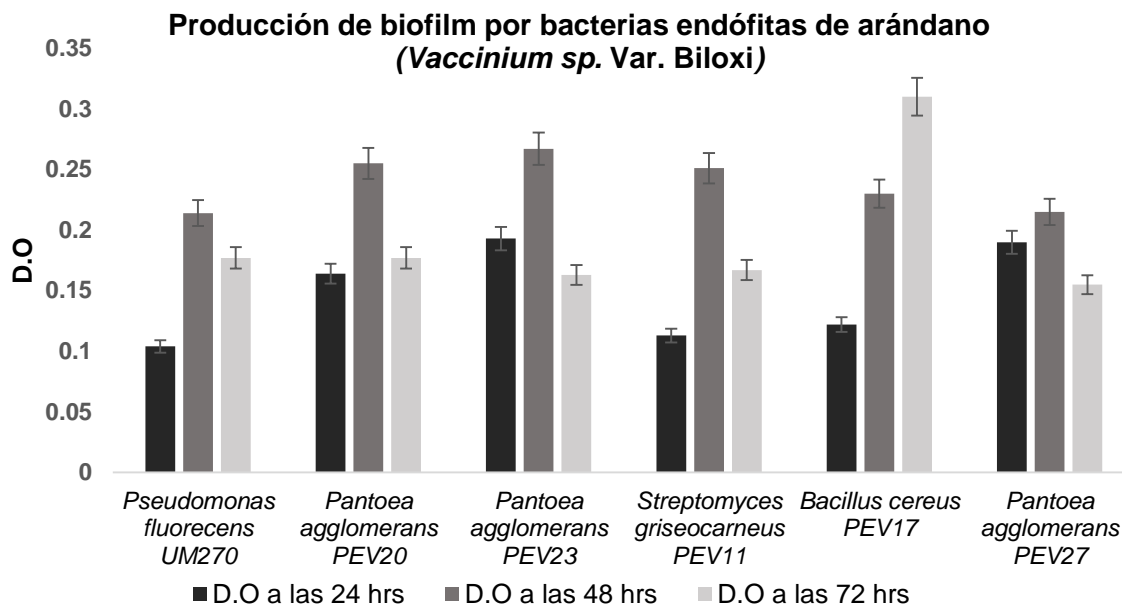
#### 9.7.3. PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

Se analizó la capacidad que tiene las bacterias endofitas de la planta de arándano para sintetizar sideróforos, el resultado se muestra en la gráfica 8.

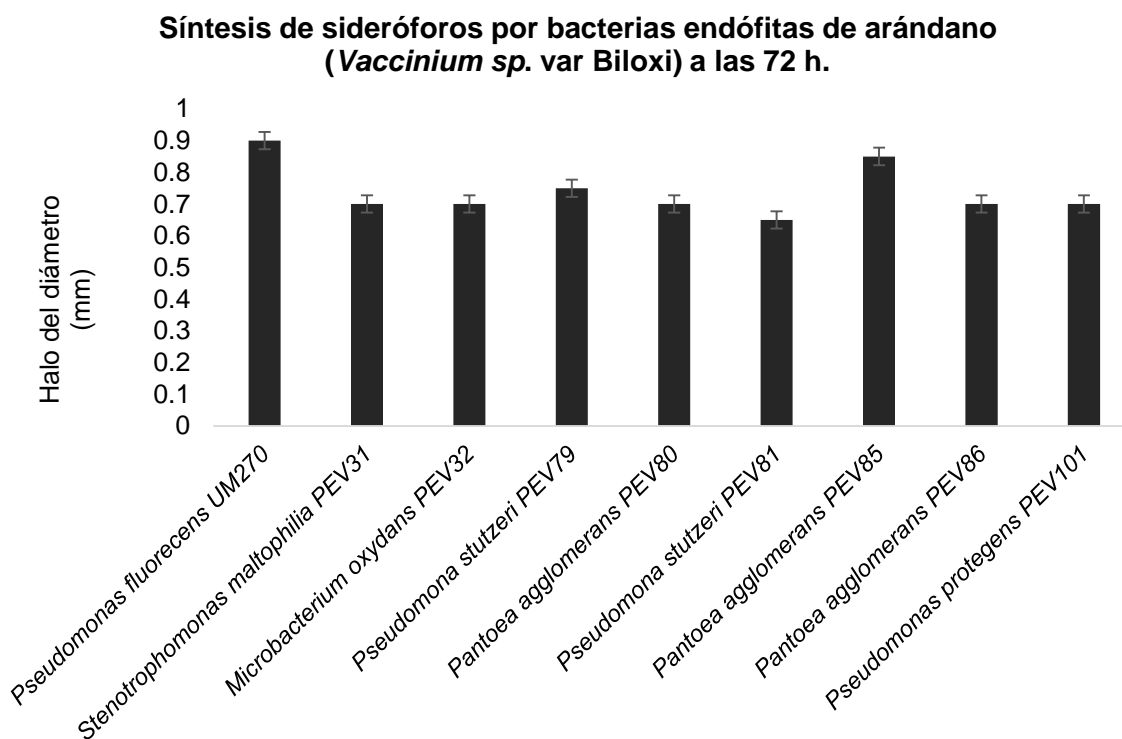
#### 9.7.4. PRODUCCIÓN PROTEASAS

Se analizó la capacidad que tienen las bacterias endófitas de la planta de arándano (*Vaccinium sp.* var Biloxi) de producir enzimas líticas del tipo proteasas a las 48 horas. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica 9.

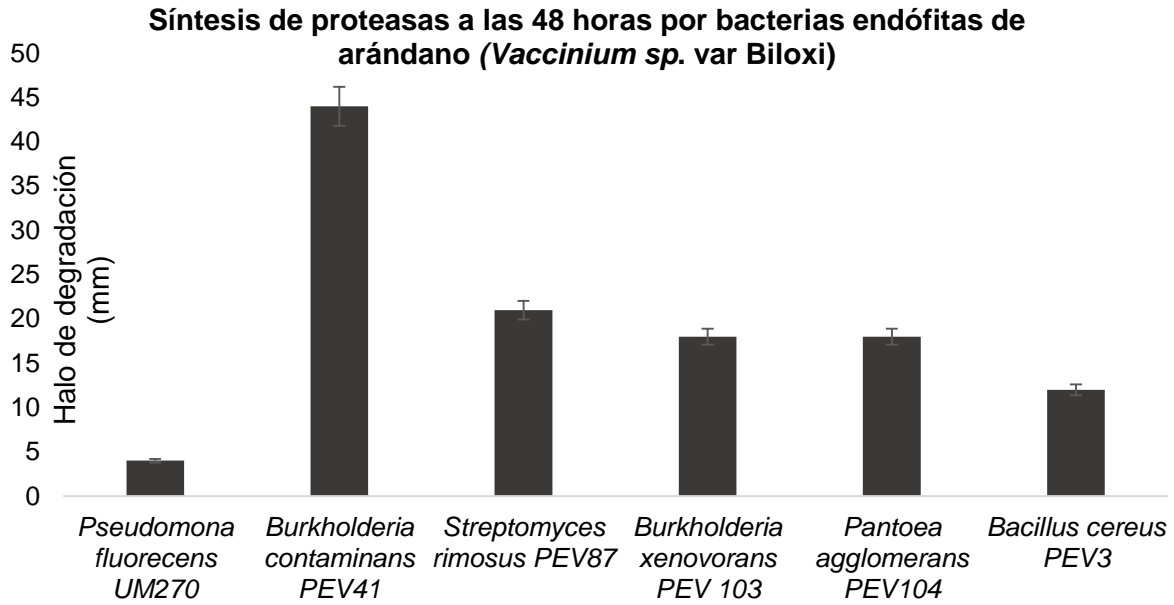




Gráfica 7. Producción de biofilm por bacterias endófitas de arándano (*Vaccinium sp. var Biloxi*). Únicamente se gráfican las cepas con mayor producción de biofilm con respecto al control positivo *Pseudomonas fluorescens* UM270, *Pantoea agglomerans* PEV23 muestra la mayor producción de biofilm a las 48 hrs.



Gráfica 8. Resultados de la síntesis de sideróforos. Se utilizó como control positivo a la cepa UM270 que mostró un halo con un diámetro de 0.9 mm, la cepa que le sigue *Pantoea agglomerans* PEV85 que mostró un halo con un diámetro de 0.85 mm. La cepa que mostró un menor diámetro 0.65 mm fue *Pseudomona stutzeri* PEV81.



Gráfica 9. Resultados de la producción de enzimas líticas tipo proteasas a las 48 horas por las bacterias endófitas de arándano (*Vaccinium sp. var. Biloxi*). Se utilizó como control positivo la cepa UM270, la cepa con una producción mucho mayor fue *Burkholderia contaminans* PEV41 con un halo de degradación del medio de 43 mm.

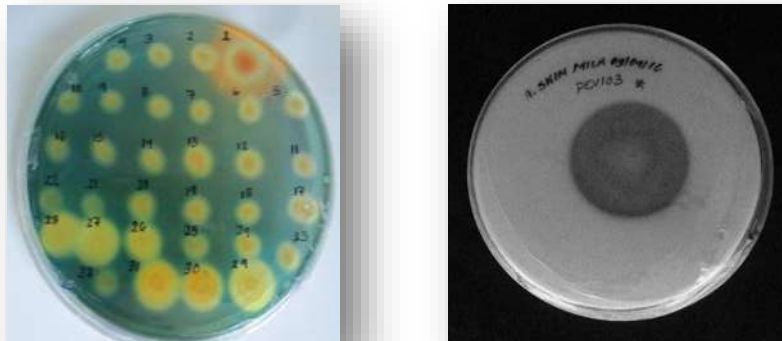


Fig 16. Imagen representativa de la producción de sideróforos en medio CAS S; imagen representativa de la producción de proteasas (enzimas lítica) en el medio de cultivo Skim milk.

## 10. DISCUSIÓN

En México, se tiene una gran diversidad de microclimas, ocasionados por las diferentes condiciones de relieves y precipitación, muchos de ellos son ideales para la producción de frutales, tal como es el caso de las frutillas (berries) o moras cuya producción ha cobrado gran importancia en los últimos años. El arándano es una de las especies más representativas de este grupo. Los principales estados productores son Jalisco, Colima y Michoacán (SIAP, 2012). En el 2003 se introdujeron a Michoacán variedades del tipo arbusto alto del Sur, estableciéndose pequeñas parcelas comerciales a partir del 2005, con el interés de extender su oferta de productos en el rubro de las frutillas. El estudio acerca de los mecanismos implicados en la promoción de crecimiento y el biocontrol son de especial interés para mejorar la calidad de estos cultivos. Por tal motivo en este trabajo se analizó la diversidad de bacterias cultivables aisladas en los tejidos de las plantas de arándano (*Vaccinium sp. var Biloxi*).

De todas las interacciones que se dan entre la planta y microorganismos son de nuestro interés aquellas que se llevan a cabo con las bacterias endófitas, es decir aquellas bacterias que pueden penetrar y sobrevivir dentro de los tejidos vegetales sin causar daño alguno. Se puede decir que las bacterias endófitas están un paso adelante de aquellas que habitan en la rizósfera ya que pueden interactuar de forma más estrecha y directa con la planta teniendo una mayor influencia en su desarrollo (Glick, 2015). El número y tipo de bacterias endófitas se ven influenciadas por los distintos tipos de planta así como también por las diferentes condiciones del suelo.

Se han aislado bacterias endófitas de diversos cultivos como son el maíz (Araujo *et al*, 2002), la papa (Azevedo *et al*, 2008), la caña (Jiménez- Salgado, 1997), el tomate (Márquez-Santacruz *et al*, 2010) por mencionar algunos, sin embargo, no existe reporte previo de trabajos realizados con bacterias endófitas de los tejidos de arándano, por lo que es relevante continuar con estos estudios para ampliar los conocimientos que se tienen de las comunidades endófitas.

Una de las técnicas más recientes para la identificación de comunidades microbianas es explorar las características del gen DNAr, que junto con la bioinformática y análisis estadísticos, son consideradas herramientas valiosas para los estudios de estructura y caracterización en diferentes ambientes. La secuenciación del gen DNAr 16S es considerado uno de los métodos moleculares más apropiados para explorar la diversidad de una comunidad microbiana, debido a que es un gen altamente conservado y existen amplias bases de datos actualizadas con las que se pueden realizar comparaciones que nos ayuden a la identificación de las especies, es una herramienta básica de búsqueda por alineamiento local mejor conocida como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

En nuestro trabajo se generó un banco de 120 aislados puros de bacterias endófitas de arándano (*Vaccinium sp. var. Biloxi*), de los cuales se logró la amplificación del gen ribosomal 16S de 92 aislados. Seguido a esto se realizó la identificación de dichos aislados en la base

de datos NCBI BLAST en línea, mostrando 98-100% de similitud; el estudio se complementó con análisis filogenético. En el análisis molecular filogenético se agruparon a los 92 aislados bacterianos en 24 taxones distintos *Paenibacillus mucilaginosus*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium oxydans*, *Microbacterium pumilum*, *Microbacterium terrae*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces abikoensis*, *Streptomyces griseocarneus*, *Devosia insulae*, *Sphingopyxis taejonensis*, *Sphingopyxis macrogoltabida*, *Sphingopyxis panaciterrulae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Azoarcus evansii*, *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia contaminans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas protegens*, *Pantoea agglomerans*; estos divididos en 3 grupos principales, a saber, *Firmicutes*, *Actinobacterias* y *Proteobacterias*. El estudio filogenético tiene como propósito estudiar la historia evolutiva de los organismos basada en el uso de métodos matemáticos para deducir el pasado de las especies, cualquier análisis filogenético requiere de un alineamiento previo para poder comparar sitios homólogos entre las secuencias a estudiar, a lo largo de la evolución las secuencias descendientes van acumulando diversos tipos de mutaciones puntuales o reorganizaciones genómicas, que pueden involucrar inserciones, deleciones, inversiones, translocaciones o duplicaciones, por lo que un análisis comparativo como este, ofrece información detallada en relación con los eventos evolutivos que originaron su divergencia, lo que sugiere que un estudio filogenético añadido a las búsquedas BLAST hace mucho más confiable los resultados obtenidos.

Una vez identificadas las bacterias endófitas presentes en los tejidos de arándano (*Vaccinium sp.* var. *Biloxi*) se realizaron búsquedas en la literatura sobre los posibles papeles que estén llevando a cabo estos géneros de interacción con la planta. Principalmente con la intención de conocer que especies de aislados habían sido ya reportadas.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) estimulan directamente el crecimiento de las plantas, proporcionando a éstas nitrógeno, fosfatos y nutrientes solubles; hierro secuestrado por sideróforos microbianos, estimulan el crecimiento de las mismas a través de la producción de hormonas de las plantas, tales como el ácido indol-3-acético. Indirectamente, estas bacterias estimulan el crecimiento de las plantas inhibiendo el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Lyngwi *et al*, 2016). A pesar de la todavía limitada comprensión de las interacciones PGPB de plantas, un número de estas bacterias se utilizan comercialmente como adjuntos a la práctica agrícola. Algunas cepas comercializadas incluyen: *Paenibacillus mucilaginosus*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Streptomyces griseoviridis* debido a sus propiedades promotoras de crecimiento vegetal que implican metabolismo del fósforo, potasio, así como la fijación del nitrógeno (Mingchao *et al.* 2012)

La mayoría de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* (Lyngwi *et al*, 2006), *Pseudomonas* (Sharma, 2015) y *Pantoeas* (Feng, 2006) han demostrado una gran producción de fitohormonas, como el IAA que ayuda a la estimulación de la planta para su

crecimiento (Lyngwi *et al*, 2016), afectando la división celular, la extensión y la diferenciación; estimula la germinación de semillas y tubérculos; aumenta la tasa de xilema y desarrollo de las raíces; controla los procesos de crecimiento vegetativo; inicia la formación de raíces laterales y adventicias (Glick, 2012). La mayoría de las bacterias que sintetizan el AIA a partir del triptófano lo hacen a través de la ruta indol-3-piruvico (IPya) donde la indol piruvato descarboxilasa (*ipdc*) es una de las enzimas más importantes de esta vía. Los aislados endófitos de arándano *Pantoea agglomerans* PEV85, PEV86, PEV22, PEV23, PEV20, PEV97, PEV26, PEV27 Y PEV95; *Bacillus cereus* PEV17, PEV3 y *Pseudomonas stutzeri* PEV81, PEV97 Y PEV55 son cepas que coinciden con los reportes ya mencionados, por lo que mostraron efectos importantes en la producción de índoles totales, teniendo como precursor al triptófano.

Algunos estudios revelan que la producción de sideróforos microbianos pueden estimular el crecimiento de la planta directamente al aumentar la disponibilidad del hierro en el suelo que rodea a las raíces o indirectamente inhibiendo competitivamente el crecimiento de los patógenos, uno de los sideróforos importantes secretados por *Bacillus spp* es petrobactin, que es un sideróforos de tipo catecol (Lyngwi *et al*, 2016). Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos para ejercer un efectivo control biológico, algunas investigaciones sobre la producción de sideróforos por la especie *Pseudomonas* han demostrado su relación con la competencia por el hierro mediada por sideróforos en el control con fitopatógenos, las pioverdinas o pseudobactinas son la clase prevalente de sideróforos producidos por las cepas de *Pseudomonas* (Mercado-Blanco *et al.*, 2007). Por otro, lado el uso de la tecnología microbiana en la agricultura se está expandiendo rápidamente con la identificación de nuevas cepas eficientes para la promoción del crecimiento de las plantas tal es el caso de *Pantoea agglomerans* que mejora el crecimiento de las plantas por medio de los mecanismos de solubilización de fosfatos, producción de auxinas, así como de sideróforos (Chérif, 2012). En el presente trabajo se observaron bacterias endófitas productoras de sideróforos que coinciden con cepas ya reportadas, como *Pantoea agglomerans* PEV80, PEV85 y PEV86; *Pseudomonas stutzeri* PEV79 y PEV81; *Pseudomona protegens* PEV101 y *Stenotrophomonas maltophilia* PEV31. Es importante resaltar que no existen reportes de *Microbacterium oxydans* PEV32 como productoras de sideróforos, para esto es necesario realizar el estudio de qué tipo de sideróforo se encuentra en esta bacteria.

Algunas bacterias endófitas producen enzimas líticas capaces de lisar paredes celulares de hongos, entre las cuales se encuentran celulasas, glucanasas y proteasas. Se observó que 5 de las 92 cepas secuenciadas sintetizan enzimas líticas de tipo proteasas, las especies que posees mayor producción a las 48 horas (halo mayor de 3.5 cm) son *Burkholderia contaminans* PEV41; *Burkholderia xenovorans* PEV103; *Streptomyces rimosus* PEV87 y *Pantoea agglomerans* PEV104. Estudios anteriores nos dicen que el género *Burkholderia* y

*Streptomyces* han sido reportadas como bacterias con capacidades antagónicas esto debido a la producción de enzimas extracelulares como las celulasas y proteasas. Muchas especies que pertenecen al género *Burkholderia* tienen la capacidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana y potencialmente pueden ser utilizados como agentes de control biológico de los hongos fitopatógenos (Compant *et al.*, 2008)

Por último en este trabajo se analizó la producción de biofilm de 15 cepas. Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos presentes en ambientes naturales formada por asociaciones de una o múltiples especies, su formación se considera un proceso dinámico y complejo, la adhesión de los microorganismos a las superficies está influenciada por diferentes variables, que incluyen la especie de la bacteria, composición de la superficie celular, naturaleza de las superficies, disponibilidad de nutrientes, hidrodinámica y comunicación célula-célula (Venegas *et al.*, 2009). Las bacterias parecen iniciar la formación de estas biopelículas en respuesta a señales ambientales específicas, tales como la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. La formación de biopelículas por *Bacillus subtilis* y especies relacionadas, permiten el control de infecciones en plantas causada por el estrés ambiental (Morikawa, 2006). Los resultados de nuestro análisis, indica que la cepa *Bacillus cereus* PEV17 tuvo la mayor síntesis de biofilm seguido de *Streptomyces griseocarneus* PEV8 al tiempo máximo estimado de 72 horas y a las 48 horas *Pantoea agglomerans* PEV23 Y PEV20; *Streptomyces griseocarneus* PEV11 lograron formar biofilm, incluso más que el control positivo.

Finalmente se puede concluir que la biodiversidad de bacterias endófitas arándano (*Vaccinium* sp. var. Biloxi) es altamente comparable con otras comunidades endófitas de plantas como el maíz (Araujo *et al.* 2002), papa (Azevedo *et al.* 2008), tomate (Márquez, 2010) por mencionar algunos. Adicionalmente fue interesante encontrar especies no reportadas con actividades de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal, esto nos indica que falta mucho por conocer y analizar los posibles papeles ecológicos que llevan a cabo en los tejidos internos de las plantas, por último, en base a nuestros resultados los aislados puros de bacterias endófitas de las plantas de arándano representan ser excelentes candidatas potencialmente útiles en la agricultura para futuros trabajos como agentes promotores del crecimiento vegetal.

## 11. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se generó un banco de 120 aislados de bacterias endófitas de arándano (*Vaccinium* sp. var. *Biloxi*).
- Se amplificó y secuenció el gen ribosomal 16S de 92 aislados.
- Se realizó análisis filogenético, se encontraron 3 filos diferentes Firmicutes, Actinobacterias y Proteobacterias, con un 13%, 24% y 63% de abundancia, respectivamente.
- Las bacterias endófitas de los tejidos de la planta de arándano (*Vaccinium* sp. var. *Biloxi*), sintetizan compuestos que podrían inducir el desarrollo vegetal a través de mecanismos directos e indirectos.
- Los aislados con mayor potencial para futuros análisis fueron *Pantoea agglomerans* PEV86, PEV85 son capaces sintetizar una cantidad considerable de IAA y sideróforos, además las cepas *Pseudomonas stutzeri* PEV79 que sintetiza una buena cantidad de sideróforos, así como también las cepas *Pantoea agglomerans* PEV23, PEV20, PEV27, *Bacillus cereus* PEV17 y *Streptomyces griseocarneus* PEV11 que tienen la capacidad de formar biopelículas mayores que la del control positivo.

## 12. CONCLUSIÓN

En las plantas de arándano existe una gran diversidad de especies bacterianas endófitas con actividades directas e indirectas que benefician a su huésped, además de mostrar un alto potencial para ser agentes biopromotores y bioprotectores.



### 13. PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas de antagonismo con diferentes hongos fitopatógenos.
- Realizar pruebas de promoción de crecimiento vegetal en invernadero (Interacción planta-microorganismo).
- Comparar la diversidad de bacterias endófitas de raíz con las del tallo y hojas.

#### 14. BIBLIOGRAFÍAS

- Adesemoye, A. O. (2009). Interacciones plantas-microorganismos en una mayor eficiencia del uso de fertilizantes. *Biotechnol.*, 1-12.
- Adesemoye, A. T. (2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can J Microbiol*, 876-886.
- Admad, M. A. (1995). Effect of L-Tryptophan on the growth and yield of potato. *International Journal of Agriculture & Biology.*, 30-32.
- Admad, R. K. (2008). Comparative efficiency of auxin and its precursor applied through compost for improving growth and yield of maize. *Park. J. Bot.*, 1703-1710.
- Ahemad, M. (2012). Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation. *Review, IIOABJ*, 39-46.
- Alexander, D. Z. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils*, 259-270.
- Allan, K. (2009). What is microbial community ecology ? *The ISME Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 1223-1230.
- Allende, J. (2005). *Análisis comercial y visión general del arándano en Chile*. Santiago de Chile.: Asociación de exportadores de Chile.
- Araujo, W. M. (2002). Diversity on endophytic bacteria populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol*, 4906-4914.
- Arshad, M. F. (1998). Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv. Agron.*, 46-51.
- Azevedo, P. S. (2008). Evapotranspiration of "Superior" grapevines under intermittent irrigation. *Agric Watter Manage*, 301-308.
- Baca, L. (2001). Mecanismos de protección de la nitrógenasa a la inactivación por oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 37-49.
- Bakker, J. T. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extract of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 1325-1333.
- Baldauf, S. (2003). The deep roots of eukaryotes. *Science* 300, 1702-1706.
- Bañados, P. (2007). Claves para la poda de arándanos en temporada de invierno. *Agronomía y forestal UC*, 28-31.
- Barea, J. M. (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 2304-2307.

- Bascope, J. A. (2013). Realidad productiva del arándano en EE.UU y México. *Agrimundo. Inteligencia competitiva para el sector agroalimentario.*, 1-30.
- Bashan, Y. d. (2005). Plant growth promoting. Encyclopedia of soil in the enviroment. *ELSEIVER*, 103-115.
- Benítez, T. R. (2004). Biocontrol mechanisms of trichoderma strains. *International Microbiology*, 249-260.
- Bhattacharyya, P. J. (2012). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR); aparición en la agricultura. *Mundial J. Microbiol Biotechnol.*, 1327-1350.
- Borges, A. R. (2008). Net ecosystem production and carbon dioxide fluxes in the Scheldt estuarine plume. *BMC Ecol*, 8-15.
- Brazelton, C. (2011). *World blueberry acreage y production*. EE.UU.
- Caruso, F. R. (2007). *Blueberry Compendium and cranberry diseases*. APS PRESS. St. Paul.
- Castro, J. (2005). *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. Mérida Yucatán, México.: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Chérif H, S. S. (2012). Isolation and characterization or plant growth promoting traits of a rhizobacteria *Pantoea agglomerans* Imaz. *Pak J Biol Sci*, 67-76.
- Chet, I. C. (2002). *Biocontrol, microbial agents in soil*. New York: G. Bitton.
- Ciordia, M. G. (2007). *El cultivo del arándano*. Ediciones Oviedo.
- Cisternas, E. (2009). *Manual de campo, plagas, enfermedades y desórdenes fisiológicos del arándano en Chile*. Chillán, Chile.: TRAMA.
- Cocolin, L. D. (2010). Métodos independientes de cultivo para estudiar y caracterizar la ecología microbiana en la fermentación vínica. *ACENOLOGÍA*, 1-8 .
- Compant, S. N. (2008). La diversidad y la aparición de *Burkholderia spp.* en el medio natural. *FEMS, Microbiol. Rev.*, 607-626.
- Días, R. G. (2003). Métodos para el estudios de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología.*, 30-40.
- Dinamarca, P. P. (1986). *Aspectos técnicoeconómicos en la producción de berries*. Santiago de Chile: Departamento agroindustrial N° 16.
- Dybas, M. T. (1995). Localization and characterization of the carbon tetra chloide transformation activity of *Pseudomonas sp.* strain K.C. *Appl environ microbiol*, 758-762.
- Edgar, R. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32 (5): 1792-1797.
- Escalante, E. (2009). Ecología molecular en el estudio de comunidades de bacteria. *La ecología molecular de los microorganismos* , 393-424.

- Escalera, V. (2009). *Propagación vegetativa de blueberry (Vaccinium corymbosum L.)*. Morelia, Michoacán.
- Fairbairn, D. L. (1986). Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J Dairy Res*, 77-139.
- Feng, Y. S. (2006). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* Y519 promotes host plant growth and affects allocations. *Journal of Applied Microbiology*, 938-945.
- Fernandez, M. F. (2006). Molecular and functional diversity of endophytic bacteria from leaves of there rice varieties. *Eleventh international symposium on microbial ecology*, 20-25.
- Fernández, P. M. (2002). Figación biológica del nitrógeno: factores limitantes. *Ciencia y medio ambiente.*, 195-202.
- Fernández, V. (1995). Capacidad fijadora del nitrógeno in vitro en las cepas de *Azospirillum* en plantas de caña de azucar. *Tesis presentada para obtener el titulo de Master genetica*. Colegio de posgrados.120 p.
- Fishal, E. M. (2010). Induction of tolerance to *Fusarium* wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible Berangan Banana preinoculem with *Pseudomona sp.* (UPMP3) and *Burkholderia sp.* (UPMB3). *Agricul. Sci. China*, 1140-1149.
- Fiske, S. C. (2007). Universal dimensions of social cognition warmth then competence. *Trends in cognitive Science.*, 77-83.
- Freeman, S. H. (2002). *Análisis evolutivo*. Madrid, España.: Pearson Educacion.
- Freeman, S. y. (s.f.). *Análisis evolutivo*.
- Frink, C. R. (1999. ). Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1175-1180.
- Gaona, L. G. (2012). Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. *CIENCIACIERTA*, 1-8.
- García, R. (2010). *SERIDA*. Obtenido de <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=5192&anyo=>
- Glick, B. (2010). El uso de las bacterias del suelo para facilitar la fitorremediación. *Biotechnología*, 367-374.
- Glick, B. (2012). Plant growth-promoting bacteria. *Mechanisms and applications.*, 1-16.
- Glick, B. (2015). Beneficial plant bacterial interaction. *Springer Publishing, Switzerland*, 223-243.
- Glickman, E. D. (1994). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolie compounds produced by phytopatogenic bacteria. *Appl enviroim microbiol*, 793-796.
- Gohel, V. S. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr J Biotechnol.*, 54-72.
- Gordon, R. (2016). Yendo más allá del control de la percepción de quórum de lucha, contra infecciones productoras de biofilms. *Antibiotics*, 289-295.

- Gwathmey C.O., M. C. (2009). Potassium uptake and partitioning relative to dry matter accumulation in cotton cultivars differing in maturity. *Agronomy Journal*, 1479-1488.
- Hallmann, J. H. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. . *Can J Microbiol*, 895-914.
- Hallmann, A. V. (2009). Plant-driven selection of microbes. In: P Lemanceau , Rhizosphere, a major place of interactions. *Springer*.
- Harvey, P. N. (1993). New uses new phylogenies. *European Review*, 11-19.
- Hernández, L. R. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81: 83-92.
- Hernández, R. H. (2006). Perspectivas de empleo de Rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42-49.
- Hernández, S. P. (2014). Isolation and characterization of the genetic variability in bacteria with Beta-hemolytic and antifungal activity from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. *Genetics and Molecular Research*, 13 (3), 4967-4975.
- James, E. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis . *Field crop research*, 198-210.
- Jiménez, S. T. (1997). *Coffea arabica* L. a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 76-83.
- Jolles, P. M. (1999). Chitin and Chitinases. Basel: Birkhauser Verlag. 17-24.
- Kloepper, J. S. (1986). *Emergence promoting rhizobacteria: descriptions and implications for agriculture*. New York: Plenum.
- Lamas, L. Y. (2015). Partial purification of proteolytic enzymes and characterization of trypsin from *Merluccius hubbsi* by-products. *International Journal of food and nutritional sciences*, 120-130.
- Lasa, I. D. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *An sist sanit Navar*, 163-175.
- Lodewyck, L. V. (2002). Endophytic bacterial and their potential application. *Crit Rev Plant Sci*, 583-606.
- Lukwill, L. (1994). Growth regulators in crop production. *Ed ikus-Tau*, 54.
- Lyngwi, A. N. (2016). Bioprospecting of plant growth promoting Bacilli and related genera prevalent in soils of pristine sacred groves. *Biochemical and Molecular Approach*, 1-13.
- Maestre, V. J. (2004). Biofilm. Modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap*, 26-28.
- Mahuku, G. (2004). A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant Mol Biol*, 71-81.

- Mantelin, S. T. (2004). Plant growth-promoting bacterial and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp Bot*, 27-34.
- Marquez, S. H. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 2372-2380.
- Martínez, A. O. (2012). Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 11: 2665-2673.
- Martínez, A. R. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science & Technology*, 24: (12) 1349-1362 .
- Mayz, F. J. (2004). Fijación biológica del nitrógeno. *Revista UDO Agrícola.*, 1-20.
- Mcloy, A. K. (1995). Survey of indigenous bacteria endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, 337-342.
- Mercado, B. B. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas spp*: exploiting bacteria traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 367-389.
- Meyer, J. H. (1989). Cepabactin from *Pseudomonas cepacia* a new type of siderophore. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1479-1487.
- Meyer, J. T. (1995). Ornibactin production and transport properties in strain of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (Formally *Pseudomonas cepacia*). *Biometals.*, 309-317.
- Miliute, Buzaitė, O., Baniulis, D., & Stanis, V. (2015). Endofitos bacterianos en cultivos agrícolas y su papel en la tolerancia al estrés. *Zemdirbyste-Agricultura*, Vol.102 ,No.4 , pp.465-478.
- Mingchao, M. W. (2012). Complete genome sequence of *Paenibacillus mucilaginosus* 3016 a bacterium functional as microbial fertilizer. *J. Journal of Bacteriology*, 2777-2778.
- Morikawa, M. (2006). Beneficial Biofilms formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Review J Biosci Bioeng*, 101: 1-8.
- Mosier, A. D. (1996). Nitrous oxide emissions from agricultural fields: assessment, measurement and mitigation. *Plant Soil*, 95-108.
- Muñoz, L. M. (2005). Análisis de antocianina en arándanos del Noa. *Departamento de ingeniería de procesos y gestión industrial.*, 98-146.
- Neilands, J. (1995). Siderophores: structure and minireview. *The journal of biological chemistry.*, 2623-2626.
- Nele, W. H. (2013). Plant-associated bacteria and their role in the success or failure of metal phytoextraction projects: first observations of a field-related experiment. *Microb Biotechnol*, 288-299.

- OEIDRUS. (2011). SAGARPA. Obtenido de OEIDRUS JALISCO: <http://www.oeidrus-jalisco.gob.mx/agricultura/anuarios/>
- Pizón, A. L. (2009). Role of cranberry on bacteria adhesion forces and implications for *Escherichia coli*-Uroepitheal. *Uroepithelial Cell Attachment J Med Food* , 259-270.
- Poggi, M. G. (2009). "PCR universal de amplio espectro": Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Rev. Med. Chile*, 1122-1125.
- Raaijmakers, J. W. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas spp* in natural environments. *Applied Environmental Microbiology*, 881-887.
- Rabalais, A. T. (1998). Consequences of the 1993 Mississippi river flood in the Gulf of México. *Regul Rivers Res Mgmt*, 161-177.
- Reinheimer, J. C. (2006). *Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos*. Santa Fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral.
- Ridley, M. (2004). Ecological influences on the form of a species are shown by the phenomenon of character displacement. *Malden.*, 366-367.
- Rodicio, M. R. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación de ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol.*, 38-45.
- Rodríguez, G. (2008). "Sistema de inteligencia de mercados". *La red de valor de la Zarcamora; El cluster de los Reyes, Michoacán un ejemplo de la reconversión competitiva*. Morelia, Michoacán México.: Fundación produce Michoacán.
- Rubio, J. (2010). Situación actual del cultivo de arándano en el mundo. *Tecnología agroalimentaria.*, 5-8.
- Rubio, J. C. (2011). El cultivo de arándano en Asturias. *Tecnología Agroalimentaria*, N°9. pp. 13-20.
- Ruiz, A. V. (2005). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Buenos Aires, Madrid: Panamericana.
- Salkowski, E. (1885). Uber das Verhalten der Skatolcarbonsäure im organismus. *Z Physid Chem*, 23-33.
- Sang, J. H. (2014). Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas diazotróficas promotoras del crecimiento vegetal desde cultivares de arroz coreanos. *ELSEVIER*, 83-98.
- Santoyo, G. M.-H. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183: 92-99.
- Santoyo, P. O. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacteria species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science & Technology*, 22: 855-872.
- Schulz, B. B. (2006). *¿Cuáles son los endófitos?* Berlín, Alemania: Springer-Verlag.

- Shahidi, F. N. (1995). *Food phenolics sources, chemistry, effects, applications*. EE.UU.: Technomic publishing.
- Shahidi, F. N. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals. *CRC Press*, 1-16.
- Sharma, T. K. (2015). Diversity of culturable bacteria endophytes of saffron in kashmir, India. *Springer Plus.*, 1-13.
- SIAP-SIACON. (2012).
- Smith, K. &. (1999). Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology.*, 473-491.
- Sokol, P. (1986). Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of clinical Microbiology*, 560-562.
- Spiers, J. S. (2002). "Biloxi" southern highbush blueberry. *Acta Horticulturae*, 153-155.
- Spivak, E. (2006). El árbol de la vida. *Una representación de la evolución de una representación.*, 10-24.
- Sprent, J. S. (1989). Structure and function of root nodules from woody legumes. In: Advances in legume biology. Monographs in systematic botany from the Missouri. *Botanic Garden.*, 559-578.
- Stijn, S. V. (2007). Ácido indol-3-acético en la señalización de microbios y microorganismos en las plantas. *Microbiology Reviews FEMS.*, 425-448.
- Stone, J. B. (2000). *An overview of endophytic microbes endophytism defined*. New York: Marcel Dekker.
- Sudzuki, F. (1983). *Arándanos y arándanas. IN: Cultivo de frutales menores*. Santiago, Chile.: Editorial Universitaria.
- Szilagyi, Z. I. (2014). Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zeamays L.*) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express a Springer Open Journal.*, 1-9.
- Teale, W. P. (2006). La auxina en acción: la señalización, el transporte, el control de crecimiento y el desarrollo de las plantas. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 487-492.
- Tilman, D. (1998). The greening of the green revolution. *Nature*, 211-212.
- Trehane, J. (2004). Moras, arándanos y otras *Vacciniums*. *Cambridge: Timber Press*, 256.
- Ultima, R. B. (1991). Mutantes triptófano en *Arabidopsis*, la secuencia de los genes beta sintetasa de triptófano duplicadas. *Plant Cell*, 345-358.
- Vega, R. (2013). *Se consolida Michoacán como principal productor de frutillas en México*. Morelia, Michoacán: Quadratin.
- Venegas, L. C. (2009). Antibiotic resistance of bacteria isolated from biofilms in a food processing plant. *Rev MVZ*, 1677-1683.



- Venturi, V. O. (1995). Alginate regulatory and biosynthetic gene homologs in *Pseudomonas putida* WCS358: correlation with the siderophore regulatory gene pfrA. *Gene*, 83-88.
- Vessey, K. J. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers plant and soil. *Springer*, 571-586.
- Vitousek, P. J. (1997). Technical Report: Human Alteration of the global nitrogen cycle. *Ecological Applications*, 737-750.
- Vlamakis, H. A. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Cold spring Harbor Laboratory*, 945-953.
- Walker, T. S., Pal, H. B., & Vivanco, E. G. (2003). La exudación de la raíz y la biología de la rizosfera. *Fisiología Vegetal*, Vol.132 No. 44-51.
- Ward, A. (2006). A microbiological perspective on microbial species. *Microbe*, 269-278.
- Ward, R. L. (1998). A conserved functional domain of drosophila coracle is required for localization at the septate ans has membrane-organizing activity. *J Cell Biol*, 1463-1473.
- Weyens, N. H. (2013). Plant-associated bacteria and their role in the success or failure of metal phytoextraction projects: first observations of a fiel-related experiment. *Microb Biotechnol.*, 288-299.
- Yan, Y. Y. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* AI501. *Proc Natl Acad Sci USA*, 4-9.
- Zinniel, K. D. (2002). Aislamiento y caracterización de bacterias colonizadoras endófitas de cultivos agronómicos y plantas de la pradera. *Applied and Environmental Microbiology*, 2198-2208.