



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología

**“Análisis de la interacción planta-microorganismo de  
Actinobacterias aisladas de la rizósfera de *Persea  
americana*.”**

Tesis que para obtener el grado de  
Químico Farmacobióloga

Presenta:

**P.Q.F.B. Lizbeidy Villaseñor Batatz**

Asesor de tesis


M. C. Karla Gabriela Domínguez González

Co-Asesor de tesis

Q.F.B. Kirán Rubí Jiménez Vázquez

Morelia, Michoacán, Marzo 2020





*Cree en ti mismo y en lo que eres. Se consciente que hay algo en tu interior que es más grande que cualquier obstáculo.*

**-Christian D. Larson**



**Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología bajo la asesoría de M. C. Karla Gabriela Domínguez González y en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la co-asesoría de Q.F.B. Kirán Rubí Jiménez Vázquez.**

## AGRADECIMIENTOS

**A mis padres:** Gracias infinitas por la confianza, apoyo y amor incondicional, gracias a su sacrificio y dedicación, son mi fortaleza e inspiración diaria. Javier Villaseñor Ruiz, gracias por tu esfuerzo para que nunca nos falte nada, por siempre ser mi ejemplo de trabajo y dedicación. Rosalía Bataz Fierros, por siempre escucharme, aconsejarme, cuidarme e impulsarme a ser mejor persona. Los amo.

**A mi hermano:** Francisco J. Villaseñor Bataz, por ser el mejor hermano mayor, por ser mi amigo, por siempre estar conmigo, por cuidarme y protegerme de cualquier peligro, te quiero mucho.

**A mi mejor amiga:** Blanca Y. Hernández, eres y serás mi persona favorita, te agradezco inmensamente por los momentos felices, tristes, vergonzoso y desastrosos que hemos vivido juntas, no fue fácil vivir lejos de nuestra familia, gracias por nunca abandonarme en mis momento difíciles, por siempre estar conmigo en cualquier situación, por ser mi otra mitad, mi hermana y por ser mi persona.

**A mis amigos:** Omar Mancilla, Blanca Hernández e Irene Núñez, son la familia que elegí, que siempre están en los buenos y en los peores momentos, que nunca me fallan, gracias por todo, mi familia foránea por siempre.

**A mis amigas de la carrera:** Arizbeth, Patricia, Rebeca y Sofía, gracias por hacer de la Universidad los mejores años de mi vida, gracias por sus enseñanzas, sus aventuras, sus locuras, por todo el tiempo que pasamos juntas, les deseo el mayor éxito en sus vidas, las quiero mis colegas.

**A mi compañera:** Patricia Torres Solórzano, por ser la mejor compañera de tesis y amiga, porque a pesar de los momentos de estrés que pasamos, nunca nos rendimos y siempre estuvimos para apoyarnos.

**A mi asesora:** MC. Karla Gabriela Domínguez González, por compartir sus conocimientos, experiencias y habilidades, por sus consejos y apoyo para ser una profesionalista, fue una excelente guía en el área de la investigación y en el desarrollo de este proyecto, gracias por incluirme en su equipo de trabajo.

**Al Químico Ricardo Soria:** Por su tiempo, enseñanzas, experiencias y por su apoyo siempre, gracias por permitirme estar en su equipo trabajo.

**A Kirán y Liz:** Por sus contribuciones y apoyo en este proyecto y por compartir sus conocimientos del mundo de las plantas.

**Al D. C. Héctor Eduardo Martínez Flores,** por fomentar la investigación en nuestra facultad y darnos la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

**Al D. C. José López Bucio,** por darme la oportunidad, espacio y herramientas para trabajar en su laboratorio.

**Al Ing. Andrés Ciprés Torres Coordinador de Inocuidad y a los trabajadores de la Junta Local de Sanidad Vegetal:** agradezco inmensamente, ya que sin su apoyo no se hubiera logrado este proyecto de investigación.

**A mi comité sinodal:** D. C. Jesús Salvador López Bucio, D. C. Héctor Eduardo Martínez Flores, MC. Elizabeth García Cárdenas, MC. Andrés Martínez Ramírez y QFB. Ricardo Giovanni Soria Herrera por su colaboración en la revisión del contenido de mi tesis.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>4</b>
2.1. Cultivo de <i>Persea americana</i> Mill.....	4
2.2. Agricultura orgánica.....	5
2.3. Rizósfera .....	5
2.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	9
2.5. Mecanismos de bioestimulación de las PGPR.....	9
2.5.1. Mecanismos directos .....	10
2.5.1.1. Solubilización de fosfato .....	10
2.5.1.2. Fijación biológica de nitrógeno .....	11
2.5.1.3. Producción de fitohormonas .....	12
2.5.1.3.1. Auxinas.....	12
2.5.1.3.2. Giberelinas .....	13
2.5.1.3.3. Citocininas.....	13
2.5.2. Mecanismos indirectos .....	14
2.5.2.1. Producción de sideróforos .....	14
2.5.2.2. Microorganismos como agentes de biocontrol .....	14
2.5.2.3. Resistencia sistémica inducida (ISR).....	15
2.6. Actinobacterias .....	16
2.6.1. Taxonomía .....	16
2.6.2. Morfología .....	17
2.6.3. Actinobacterias de suelo como PGPR .....	20
2.7. Modelo vegetal <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	20
<b>3. Justificación</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Objetivo general</b> .....	<b>22</b>
<b>6. Objetivos particulares</b> .....	<b>23</b>
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	<b>24</b>

7.1.	Esquema de trabajo.....	24
7.2.	Muestreo de rizósfera .....	25
7.2.1.	Análisis de pH de suelo .....	26
7.3.	Descontaminación de muestra.....	27
7.4.	Aislamiento de actinobacterias y pre-selección.....	27
7.4.1.	Conservación de cepas .....	28
7.5.	Selección de cepas.....	29
7.6.	Interacción planta-microorganismo .....	30
7.6.1.	Análisis de la arquitectura radical .....	33
7.6.2.	Tinción histoquímica de GUS .....	33
7.6.3.	Análisis con microscopía Nomarski .....	34
<b>8.</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>35</b>
8.1.	Muestras rizosféricas de cultivo de Aguacate .....	35
8.2.	pH de la rizósfera.....	36
8.3.	Descontaminación .....	37
8.4.	Caracterización fenotípica de actinobacterias.....	40
8.5.	Selección de cepas.....	45
8.6.	Co-cultivo <i>in vitro</i> de planta-bacteria.....	47
8.6.1.	La inoculación de algunas actinobacterias que reprimen el crecimiento vegetal	52
8.6.2.	Mecanismo dependiente de auxinas.....	56
<b>9.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>Expectativas.....</b>	<b>61</b>
<b>11.</b>	<b>Literatura citada.....</b>	<b>62</b>
<b>12.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>77</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Interacción planta-microorganismo en la rizósfera	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Secreciones de fitoquímicos bioactivos en la rizósfera	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema de una sección de raíz	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Arbol filogenético de vida	<b>17</b>
<b>Figura 5.</b> Filogenia bacteriana	<b>12</b>
<b>Figura 6.</b> Morfología macroscópica y microscópica de <i>Nocardia</i>	<b>19</b>
<b>Figura 7.</b> <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>21</b>
<b>Figura 8.</b> Esquema de trabajo	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b> Cultivo de <i>Persea americana</i>	<b>25</b>
<b>Figura 10.</b> Zona de muestreo	<b>26</b>
<b>Figura 11.</b> Mapa satelital de las unidades de producción.	<b>30</b>
<b>Figura 12.</b> Esquema de desinfección y preparación de medio.	<b>32</b>
<b>Figura 13.</b> Esquema de la interacción planta-microorganismo.	<b>33</b>
<b>Figura 14.</b> Tinción histoquímica de GUS en plátulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>35</b>
<b>Figura 15.</b> Mapa satelital de los sitios de muestreo.	<b>36</b>
<b>Figura 16.</b> Rango de Ph	<b>38</b>
<b>Figura 17.</b> Tratamiento de descontaminación de muestras.	<b>40</b>
<b>Figura 18.</b> La inoculación de actinobacterias que promueven el crecimiento vegetal.	<b>49</b>



<b>Figura 19.</b> Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>50</b>
<b>Figura 20.</b> Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>51</b>
<b>Figura 21.</b> Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>52</b>
<b>Figura 22.</b> La inoculación de actinobacterias que reprimen el crecimiento.	<b>53</b>
<b>Figura 23.</b> Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>54</b>
<b>Figura 24.</b> Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>55</b>
<b>Figura 25.</b> Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>56</b>
<b>Figura 26.</b> Expresión de <i>DR5:uidA</i> en la punta de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculada con las actinobacterias.	<b>58</b>
<b>Figura 27.</b> Respuesta de plántulas transgénicas <i>DR5:uidA</i> en la interacción con actinobacterias.	<b>59</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> pH de las muestras por unidad de producción.	<b>37</b>
<b>Tabla 2.</b> Ensayos de contaminación.	<b>39</b>
<b>Tabla 3.</b> Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de rizósfera <i>Persea americana</i> .	<b>41</b>
<b>Tabla 4.</b> Agrupación y selección de cepas.	<b>47</b>
<b>Tabla 5.</b> Porcentajes del efecto de las actinobacterias.	<b>56</b>

## Resumen

Las actinobacterias juegan un papel ecológico significativo en suelos naturales y agrícolas, debido a que degradan y reciclan moléculas orgánicas. Han sido consideradas Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR), por sus siglas en inglés, ya que coexisten, sobreviven y proliferan en la rizósfera e interactúan y colonizan las raíces de las plantas teniendo actividad en el mejoramiento de absorción de nutrientes, así como de incrementar la fertilidad del suelo y de producir compuestos bioactivos de acción directa o indirecta para biocontrol de organismos fitopatógenos.

En este proyecto mediante un muestreo de rizósfera de varios huertos orgánicos de *Persea americana* del municipio de Uruapan, Michoacán, se aislaron diferentes cepas de Actinobacterias con capacidad de PGPR para la bio-estimulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

**Palabras claves:** Actinobacterias, PGPR, rizósfera, *Persea americana*, *Arabidopsis thaliana*, crecimiento vegetal.

## Abstract

Actinobacteria play a significant ecological role in natural and agricultural soils, because they degrade and recycle organic molecules. They have been considered plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), because they coexist, survive and proliferate in the rhizosphere and interact and colonize the roots of plants having activity in the improvement of nutrient absorption, as well as to increase the fertility of the soil and to produce bioactive compounds of direct or indirect action for biocontrol of phytopathogenic organisms.

In this project, by means of a rhizosphere sampling of several organic gardens of *Persea americana* in the municipality of Uruapan, Michoacán, different strains of Actinobacteria with PGPR capacity were isolated for bio-stimulation of the development of *Arabidopsis thaliana*.

**Keywords:** Actinobacterias, PGPR, rhizosphere, *Persea americana*, *Arabidopsis thaliana*, plant growth.

## 1. Introducción

El sistema radicular de la plantas tiene funciones como la de fijar a la planta al sustrato, de absorber agua y nutrientes, de regular diferentes procesos de desarrollo así como de la interacción de la planta con los diferentes organismos de la rizosfera (Casanova *et al.*, 2007), uno de los organismos que se encuentran en la rizosfera son las rizobacterias comúnmente presentes en diversos ambientes tanto naturales como agrícolas, colonizando la raíz de la planta (Hernández y Escalona, 2003). Las rizobacterias se nutren con los exudados de las raíces que emiten las plantas, como azúcares, vitaminas, factores de crecimiento, ácidos orgánicos entre otros (McNear, 2013). Les permite aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas así como proteger de microorganismos del suelo que causan enfermedades (Strap, 2011).

Las Actinobacterias son esenciales en el suelo debido a las interacciones que tienen con las plantas. Según estudios realizados, las actinobacterias tienen bioactividades potencialmente beneficiosas (Palaniyandi *et al.*, 2013) como: sintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios que son beneficiosos para el huésped y son capaces de eliminar o disminuir el crecimiento de algunos patógenos, asimismo producen enzimas líticas con la capacidad de destruir la pared celular de los hongos fitopatógenos, tienen la capacidad para fijar nitrógeno en vida libre y algunas de ellas se han aislado del interior de nódulos de distintas leguminosas (Franco y Chavarro, 2016), tienen la capacidad de solubilizar el fósforo del suelo para el crecimiento de las plantas, producen sideróforos que mejoran la adquisición de hierro y el crecimiento vegetal y algunas Actinobacterias tienen la capacidad de producir fitohormonas (Palaniyandi *et al.*, 2013). Estas propiedades, entre otras, hacen que las Actinobacterias sean candidatos ideales para el desarrollo como inoculantes microbianos para su uso en la agricultura.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Cultivo de *Persea americana* Mill

El Aguacate (*Persea americana* Mill) cuyo nombre deriva del náhuatl (Ahuacatl), que significa “testículos del árbol, pertenece a la familia *Lauraceae* y su origen es mesoamericano (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015; SAGARPA, 2011). Es de alta importancia agroeconomica ya que tiene grandes aportaciones nutricionales, cosméticas y farmacéuticas (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010; Secretaría de economía, 2012), cuyo cultivo genera además beneficios entre los copartícipes del sistema de producción, como son productores, comercializadores, industrializadores y consumidores, asimismo trabajadores permanentes y eventuales de mano de obra para las labores del cultivo, cuidado y manejo pos-cosecha (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010) debido a que obtiene su fruto en porcentajes alto ya que es un producto perenne (SAGARPA, 2011).

Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), México es considerado el principal productor de aguacate y uno de los exportadores más importantes a nivel mundial, con una producción que se estima en 2, 184,663 toneladas en el 2019. El 82.7 % del valor de producción nacional del fruto corresponde a Michoacán, con un volumen de 1, 674,855 toneladas (SIAP, 2018) provenientes principalmente de los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, Los Reyes, Tacámbaro, Ario de Rosales y Zitácuaro (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2015; Chávez-León, 2012), así como calidad del suelo, la disponibilidad de agua, entre otros factores que convierten a esta región única a nivel mundial, que permite tener dos floraciones al año (Alcántar-Rocillo *et al.*, 1999)

El municipio de Uruapan del estado de Michoacán, ocupa el 1.73 % de la superficie de este estado con 16,303.69 has de cultivos de *Persea americana* y 5,906 unidades producción de las cuales solo 138 unidades de producción corresponde a producción orgánica (Junta Local de Sanidad Vegetal del Municipio, 2019).

La productividad del cultivo y la calidad del fruto dependen de diferentes factores como la variedad cultivada, la disponibilidad de agua y de nutrientes, así como las presencia de diferentes microorganismos que pueden causar enfermedades entre otros (Schaffer y Whinley, 2007). Los problemas fitosanitarios más frecuentes del árbol son provocados por diferentes especies de hongos como *Phytophthora*, *Cercospora purpurea* y *Colletotrichum spp* que causan la pudrición de la raíz, la enfermedad de la mancha negra y la antracnosis en los frutos respectivamente (Anguiano *et al.*, 2007; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2015).

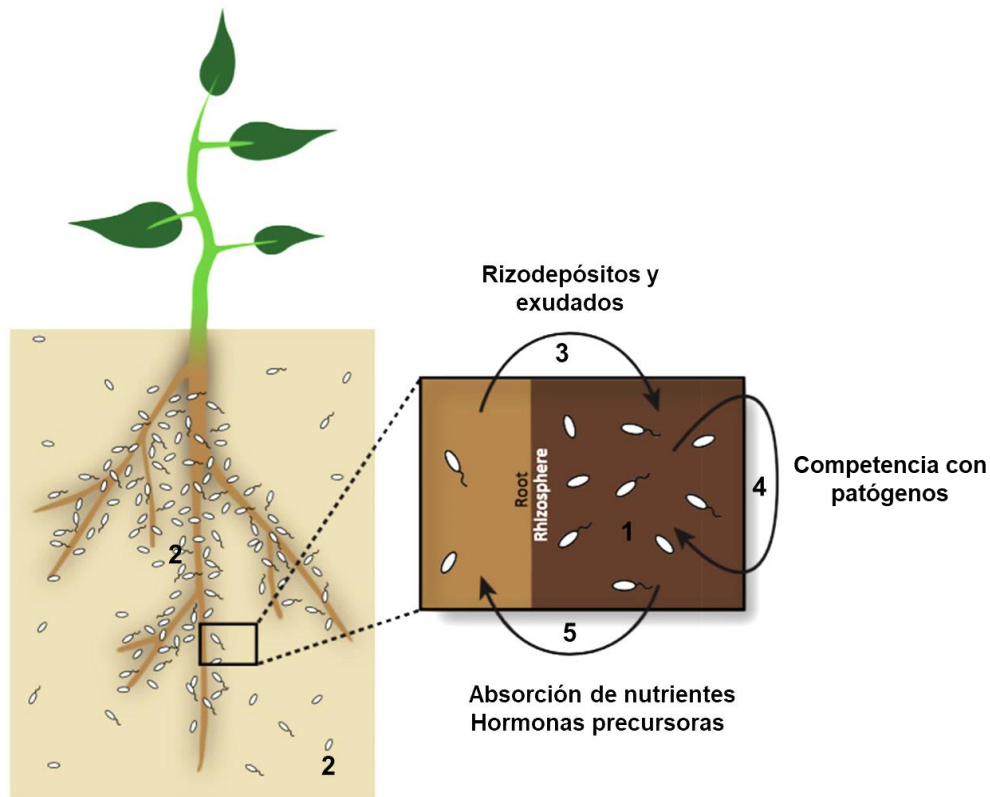
## 2.2. Agricultura orgánica

La agricultura orgánica es una estrategia que preconiza la disminución de agroquímicos que deterioran los organismos benéficos del suelo, agota los recursos no renovables y compromete la calidad del agua y el aire (Cussaianoviich, 2001). Lo que condujo al uso de desechos orgánicos en condiciones controladas de humedad y aireación en donde participan bacterias y hongos (Félix-Herrán *et al.*, 2008). La aplicación de abonos orgánicos en el suelo que es uno de los constituyentes para la fertilidad y productividad, ha sido recomendado en cultivos agrícolas debido a que ofrece ventajas que muy difícilmente puede ofrecer un fertilizante inorgánico, ya que mejora la estructura del suelo, aumenta la capacidad de retención de agua y la disponibilidad de los nutrientes, el efecto en el suelo varía según su procedencia, elaboración, edad, manejo y contenido de humedad (López-Martínez *et al.*, 2001).

## 2.3. Rizósfera

El término rizósfera fue definido por el científico Lorenz Hiltner en 1904 (Hartmann *et al.*, 2007), él describió como el suelo circundante de la raíz de una planta que está habitada por comunidades distintas de microorganismos (10 a 100 veces

mayor) en comparación a un suelo no enraizado, lo cuales están influenciados por los compuestos liberados por las raíces de las plantas (Fig. 1) (McNear, 2013). Estas poblaciones microbianas asociadas a la raíz, son conocidas como el segundo genoma de la planta (Berendsen *et al.*, 2012) al tener un equilibrio ecológico gracias a la acción sinérgica o comensal (Pérez-Vargas *et al.*, 2002).

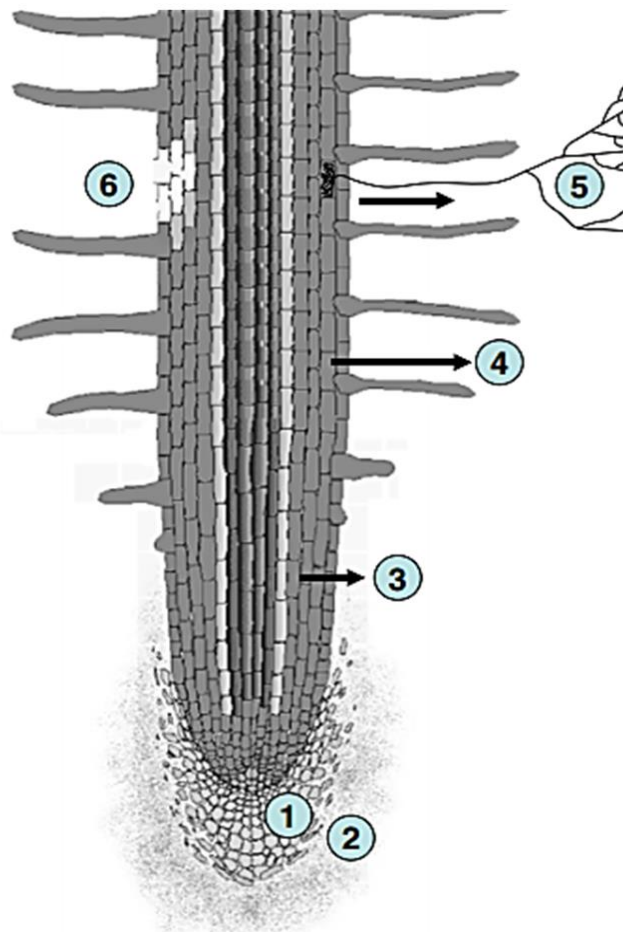


**Figura 1. Interacción planta-microorganismos en la rizósfera.** 1) La rizósfera es la delgada capa alrededor de la raíz que se ve afectada por los compuestos liberados por la planta. 2) Poblaciones más densas de microorganismos en comparación a un suelo a granel. 3) Los exudados influyen en la composición del microbioma. 4) Las rizobacterias compiten con los patógenos por espacio y nutrientes. 5) Las rizobacterias afectan el crecimiento de las plantas a través de muchos mecanismos. Recuperada y modificada (Verbon y Liberman, 2016).

En su extensa investigación, McNear en 2013 describió que la composición y cantidad de compuestos que la raíz libera está determinada por distintos factores como son el tipo de planta, las condiciones climáticas, los animales que se

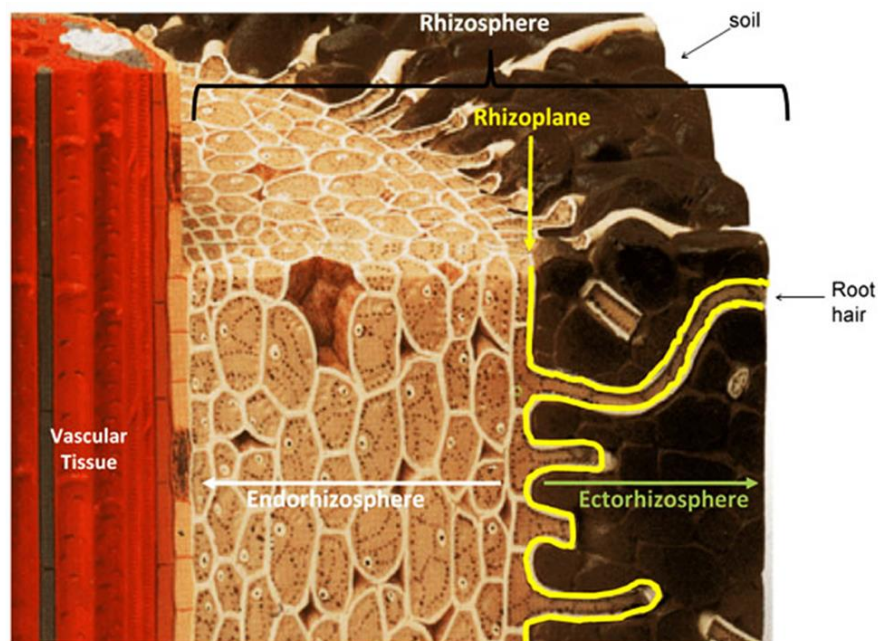


alimentan de plantas, la deficiencia o toxicidad de nutrientes y las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo circundante. Igualmente la diversidad en las comunidades microbianas depende del tipo del suelo y de la composición de los productos que secreta la raíz. Los productos que disponen son los rizodepósitos, exudados radiculares y las células del borde de la raíz (Verbon y Liberman, 2016; Hassan *et al.*, 2019). Los tres componentes que la raíz libera al suelo circundante interactúan sinérgicamente con las rizobacterias presentes, todos estos compuestos son importantes para la rizósfera (Fig. 2) (McNear, 2013; Jones *et al.*, 2009).



**Figura 2. Secreciones de fitoquímicos bioactivos en la rizósfera.** 1) Pérdida de células de capa y borde. 2) Pérdida de mucilago insoluble. 3) Pérdida de exudados de raíz solubles. 4) Pérdida de carbono orgánico volátil. 5) Pérdida de carbono a los simbiontes. 6) Pérdida de carbono debido a la muerte y lisis de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Recuperada y modificada (McNear, 2013).

Posteriormente, se clasificó a la rizósfera en tres zonas: la endorizósfera, rizoplano y ectorizósfera, las cuales se dividen en función a la raíz (Fig. 3) (McNear, 2013). La endorizósfera está compuesta por partes de la corteza y la endodermis, en el cual los microbios y cationes pueden ocupar el espacio apoplástico y colonizar las células superficiales de la raíz. El rizoplano es la zona que se encuentra próxima a la raíz, incluye la epidermis y el polisacárido mucilaginoso de la raíz, es aquí donde los microorganismos colonizan solo la superficie (Pérez-Vargas *et al.*, 2002). La ectorizósfera, es la zona externa de la rizósfera, donde se desarrolla el rizoplano hasta el suelo a granel. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas cambian radialmente y longitudinalmente la raíz, haciendo que la rizósfera no sea una región de tamaño y forma definible (McNear, 2013).



**Figura 3. Esquema una sección de raíz.** La rizósfera incluye tres zonas: endorizósfera, rizoplano y ectorizósfera, que están definidas en función de su cercanía e influencia de la raíz. Recuperada (McNear, 2013).

## 2.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

La rizósfera tiene una diversidad microbiana, que contiene hongos, arqueas, invertebrados y bacterias, interactuando con las raíces de las plantas, dicha interacción puede ser benéfica, neutral o perjudicial mediante el criterio de crecimiento y desarrollo vegetal (Hassan *et al.*, 2019). Entre las bacterias del suelo que pueden adaptarse y persistir en la rizósfera (Paredes y Espinosa, 2010), para colonizar con éxito la raíces de las plantas e impactar positivamente en el crecimiento vegetal están las llamadas Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Verbon y Liberman, 2016).

Unos de los grupos de bacterias poco estudiadas, pero con mayor importancia son las Actinobacterias, al desempeñar un papel ecológico crucial para el suelo, han sido consideradas en este grupo de PGPR (Franco y Chavarro, 2016).

## 2.5. Mecanismos de bioestimulación de las PGPR

Las rizobacterias ejercen un efecto positivo en las plantas al colonizar la raíz y estimular su crecimiento, esta acción la realizan mediante uno o más mecanismos, directos e indirectos (Santillana *et al.*, 2005). Los mecanismos directos tienen su acción dentro de la planta impactando su metabolismo y fisiología (Molina-Romero *et al.*, 2015), lo hacen sintetizando compuestos que le proporcionan a la planta como fitohormonas, nitrógeno, fosfatos, (Camelo *et al.*, 2011) e indirectamente, las rizobacterias permiten un mejor crecimiento de las plantas hospederas, por el secuestro de hierro mediante sideróforos, los cuales compiten por el nicho ecológico e inhiben a los fitopatógenos por la baja concentración de iones  $Fe^{+3}$  disponibles en el suelo, también reducen los efectos nocivos de los patógenos produciendo enzimas líticas, antibióticos y bacteriocinas en un mecanismo conocido como biocontrol (Molina-Romero *et al.*, 2015), además, ayudan a la planta a controlar las enfermedades a través de la resistencia sistémica inducida

por rizobacterias (ISR, por sus siglas en inglés), que se activa cuando hay un ataque de un agente patógeno (Kundan *et al.*, 2015).

## 2.5.1. Mecanismos directos

### 2.5.1.1. Solubilización de fosfato

La mayoría de los suelos cuentan con una deficiente de fósforo (P), ya que tienen un inadecuado suplemento para la nutrición de los cultivos (Patiño y Samclemente, 2014), siendo un indispensable macronutriente para todas las formas de vida e incluso para el crecimiento de las plantas (Franco y Chavarro, 2016), por lo que se ha requerido de la aplicación de fertilizantes químicos para mantener altos los niveles de fertilidad. Una de las muchas ventajas que tienen éstas bacterias conocidas como BSP (Bacterias Solubilizadoras de Fosfato) (Paredes y Espinosa, 2010) es la capacidad de solubilizar el fosfato (Fernández y Rodríguez, 2005) para que la planta lo pueda utilizar mejorando su crecimiento y productividad, logrando una reducción en el uso de agroquímicos (Beltrán Pineda, 2014). Las BPS representan el 40 % de los microorganismos presentes en el suelo con un contenido entre 1,5 % y 2,5 % de fósforo por peso seco (Beltrán Pineda, 2014) y el contenido de fósforo en los suelos varía entre 200 y 5000 mg/Kg<sup>-1</sup>, con un promedio de 600 mg/kg<sup>-1</sup> (Patiño y Samclemente, 2014).

Las formas orgánicas e inorgánicas del fósforo son las que se encuentran en el suelo (Oviedo e Iglesias, 2005), la distribución de las diferentes formas depende mucho del tipo de suelo, tipo de vegetación, actividad microbiana y aplicación de fertilizantes (Beltrán-Pineda, 2014), ya que las plantas absorben el fosfato únicamente en forma soluble, siendo dependientes también del pH (Patiño y Samclemente, 2014). El fosfato orgánico soluble disponible está en forma de ortofosfatos como H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> en suelos ácidos con un pH entre 4.0-6.0 y como ácido fosfórico HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> en suelos alcalinos con pH entre 8.0-10.0 (Paredes y Espinosa, 2010), los fosfatos pueden ser mineralizado por la acción de enzimas llamadas

fosfatasas que son producidas y secretadas por los microorganismos empleado para su nutrición (Franco y Chavarro, 2016). La materia orgánica originada de la degradación de restos de animales y vegetales es donde se encuentra presente el fósforo orgánico.

Las BPS pertenecen al grupo de PGPRs y son capaces de solubilizar el fosfato, están involucradas en muchos procesos que afectan la transformación de este mineral, para que pueda ser absorbido por las raíces y a cambio, las plantas liberan compuestos carbonados que son metabolizados para la proliferación microbiana (Beltrán-Pineda, 2014).

#### **2.5.1.2. Fijación biológica de nitrógeno**

Uno de los principales nutrientes para los cultivos es el nitrógeno (Benjumeda, 2017), es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que participa en el desarrollo de hojas y ramas, pero también se encuentra limitado por el uso de fuentes de nitrógeno que provoca efectos negativos en los recursos naturales (Córdova-Domínguez *et al.*, 2013). El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es la única reserva de nitrógeno que se encuentra en forma ilimitada en la atmósfera (Baca, Soto y Pardo, 2000) ocupando aproximadamente el 80 % (Mayz-Figueroa, 2004), pero al ser una molécula casi inerte no puede ser utilizada por la mayoría de las formas vivientes (Baca, Soto y Pardo, 2000), para que se lleve a cabo el aprovechamiento del nitrógeno en las plantas debe de ser reducido y luego fijado en formas inorgánicas, como es el amonio ( $NH_4$ ) (Franco y Chavarro, 2016) y nitratos ( $NO_3^-$ ) (Córdova-Domínguez *et al.*, 2013). El proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) es llevada a cabo mediante organismos fijadores que necesitan un requerimiento energético para el proceso (Franco y Chavarro, 2016) y actividad enzimática (Córdova-Domínguez *et al.*, 2013). Las bacterias fijadoras de nitrógeno son los microorganismos más importantes de la rizósfera (Camelo *et al.*, 2011), contienen una enzima llamada nitrogenasa que cataliza la reducción del nitrógeno

a amonio (Franco-Correa, 2009; Franco y Chavarro, 2016). Entre los microorganismos implicados en la fijación biológica de nitrógeno tenemos a las bacterias, las algas verde-azules (cianobacterias), las cuales lo realizan viviendo libremente o en asociaciones (Mayz-Figueroa, 2004).

### **2.5.1.3. Producción de fitohormonas**

Las fitohormonas son moléculas que regulan la expresión de genes involucrados en el crecimiento y desarrollo vegetal (Molina-Romero *et al.*, 2015). Algunas bacterias que se encuentran habitando en la rizósfera tienen la capacidad de producir fitohormonas y es uno de los mecanismos mayoritarios que pueden influir en el crecimiento del sistema radicular de la planta y el follaje (Ortiz *et al.*, 2012).

#### **2.5.1.3.1. Auxinas**

Las auxinas forman un grupo amplio de sustancias promotoras del crecimiento vegetal que activan varias respuestas a nivel fisiológico, bioquímico y metabólico en la célula vegetal (Camelo *et al.*, 2011), se sintetizan de forma natural en la planta y en algunos microorganismos (Magaña-Dueñas *et al.*, 2015).

Uno de los reguladores es el ácido indol-3-acético (AIA), la auxina más abundante en la naturaleza (Franco y Chavarro, 2016). La aplicación de estas moléculas regulan múltiples procesos: división y expansión celular, diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y a la gravedad (Vega-Calderón *et al.*, 2016), tienen un dominio en el crecimiento de las raíces laterales y pelos radiculares, las cuales participan en la captación de agua y nutrientes (Ortiz *et al.*, 2012). Las rizobacterias biosintetizan esta molécula por medio de tres rutas metabólicas donde el precursor fisiológico es el aminoácido triptófano (Camelo *et al.*, 2011), son fuentes naturales de exudados radicales hacia la microbiota rizosférica (Rojas-contreras *et al.*, 2010). La primera vía que es la de ácido indol-3-piruvato (IPA) que

ha sido referida especialmente en rizobacterias promotoras del crecimiento (Vega-Calderón *et al.*, 2016) mientras que la vía de ácido indol-3-acetamida (IAM) está presente en bacterias fitopatógenas.

#### **2.5.1.3.2. Giberelinas**

Las PGPR producen más de un tipo de fitohormas originando efectos específicos en la arquitectura vegetal, una de las cuales son las giberelinas, estas son moléculas complejas de di-terpeno tetracarboxílicos que son transportadas desde las raíces a las partes aéreas de la planta, son capaces de incrementar el crecimiento de los tallos, interrumpir el periodo de latencia de las semillas para germinar (Ramos *et al.*, 2018), la floración, el desarrollo del fruto y la altura de la planta (Molina-Romero *et al.*, 2015). Algunos ejemplos de especies bacterianas reportadas como productoras de giberelinas son: *G. diazotrophicus*, *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *Herbaspirillum seropedicea* y *R. phaseoli* (Ochoa *et al.*, 2010).

#### **2.5.1.3.3. Citocininas**

Las citocininas son compuestos químicos derivados de las amino purinas, producidas por las PGPR, las cuales son capaces de promover la división celular en la raíz, la elongación, diferenciación celular y el incremento del área de la raíz mediante la formación de raíces adventicias, además la formación de hojas (Camelo *et al.*, 2011). Algunos ejemplos de rizobacterias más conocidos en producir citocininas se encuentran: *Arthrobacter giacomelloi*, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus licheniformis*; *Paenibacillus polymyxa* en trigo; *Pseudomonas fluorescens* en soya, *Rhizobium leguminosarum* en lechuga (Molina-Romero *et al.*, 2015) y *Klebsiella sp*, *Xanthomonas* (Ramos *et al.*, 2018).

## 2.5.2. Mecanismos indirectos

### 2.5.2.1. Producción de sideróforos

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los organismos de las plantas y ellas lo obtienen del suelo, cuando el recurso es limitado, los habitantes de la rizósfera obtienen compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos los cuales ayudan a obtener este mineral (Camelo *et al.*, 2011). Los sideróforos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, solubles en agua y tienen alta afinidad por el  $\text{Fe}^{+3}$ , forman complejos y dejan disponible al  $\text{Fe}^{+2}$  para que sea utilizado por los microorganismos por ser de fácil absorción (Franco y Chavarro, 2016).

Según la investigación de Franco y Chavarro en 2016, los microorganismos más importantes que son capaces de producir sideróforos se encuentran en el filo de las actinobacterias. El género *Streptomyces* obtuvo los niveles más altos en producción.

### 2.5.2.2. Microorganismos como agentes de biocontrol

Habitualmente para el control de fitopatógenos se recurre al uso indiscriminado de agroquímicos tales como plaguicidas y fertilizantes; sin embargo, esto es más perjudicial que beneficioso, debido al uso excesivo de estos insumos y por ser un producto tóxico que afecta el costo de producción de cosecha y la calidad ambiental del suelo y agua (Beltrán Pineda, 2014), teniendo problemas importantes para el micro-ecosistema beneficioso autóctono, la flora, la fauna e incluso la vida humana (Reyes *et al.*, 2015).

La estimulación indirecta del crecimiento vegetal proviene de las PGPR, cuando inhiben o disminuyen de forma natural el efecto dañino de diversos fitopatógenos (bacterias, hongos e insectos) (Soler-Arango *et al.*, 2012) mediante la producción



de metabolitos secundarios, moléculas que son biodegradables que funcionan en mínima cantidad a diferencia de los agroquímicos que son resistentes a la degradación y se aplican en cantidades elevadas en los cultivos agrícolas para realizar su función (Molina-Romero *et al.*, 2015). Berendsen y colaboradores en 2012 mencionaron que para que un patógeno tenga éxito, dependerá de los habitantes de la comunidad microbiana del suelo donde se produce la infección. Hassan y colaboradores en 2019 reportaron que los exudados de las raíces pueden contribuir como biocontrol ya que repelen los patógenos de las plantas para evitar daño.

Se ha reportado que las actinobacterias se encuentran en la rizósfera y colonizan las raíces de las plantas; estimulan el crecimiento vegetal y además inhiben los patógenos. De las cepas reportadas con actividad biocontrol tenemos los géneros: *Actinomycete*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Thermobifida* y *Micromonospora* contra los hongos patógenos. Los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Dactylosporangium*, *Actinomadura*, *Streptosporangium* y *Nocardioform* presentaron una fuerte actividad contra los hongos fitopatógenos *Alternaria mali*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum f. sp. Cucumerinum* y *Rhizoctonia solani* (Hassan *et al.*, 2019).

### **2.5.2.3. Resistencia sistémica inducida (ISR)**

Las PGPR al interactuar con su planta hospedera puede reducir el número de enfermedades provocadas por fitopatógenos mediante un proceso de señalización que involucra las vías del ácido jasmónico y etileno de la planta mejorando la activación y capacidad de defensa vegetal contra los agentes agresivos (Molina-Romero *et al.*, 2015), a través de mecanismos como: el reforzamiento de la pared celular, la producción de fitoalexinas anti-microbianas, peroxidasas, quitinasas,  $\beta$ 1-3 glucanasas, fenilalilina amonio liasas, proteínas relacionadas con la patogénesis y producción de biosurfactantes (Gómez y Reis, 2011).

## 2.6. Actinobacterias

Las actinobacterias son organismos procariontas que se distribuyen ubicamente en ecosistemas acuáticos y terrestres, al ser consideradas uno de los grupos más abundantes de microorganismos del suelo (90 %) en un gramo de tierra fértil se han registrado hasta más de un millón de unidades formadoras de colonias (UFC) (Solans y Vobis, 2003), teniendo un rango aproximado de  $10^6$  y  $10^8$  células por gramo de suelo o bien aproximadamente 10 000 kg/ha, representando el 5 % del total de materia orgánica seca presente en el suelo (Calvo-Veléz *et al.*, 2008). Pertenecen a un grupo extenso y diverso de bacterias miceliales y juega un papel ecológico significativo en la degradación y reciclaje de biomateriales (Franco y Chavarro, 2016), por sus acciones beneficiosas en el suelo son participes en procesos de fertilización (Arenas, 2008; Franco y Chavarro, 2016). Estas bacterias han sido reconocidas durante mucho tiempo como productores prolíficos de enzimas, antibióticos y agentes anticancerosos (Ranjan y Jadeja, 2016), se dice que una cepa tiene la capacidad genética de producir de 15-25 metabolitos secundarios (Shivlata y Satyanarayana, 2017).

### 2.6.1. Taxonomía

Anteriormente las Actinobacterias estaban clasificadas en el reino Fungi debido a las similitudes que tiene en su morfología, sin embargo; actualmente son reconocidos dentro del dominio *Bacteria* (Franco-Correa, 2009) (Fig. 4), siendo una de las unidades más grandes entre los 18 linajes.

El filo Actinobacteria se divide en seis clases: *Actinobacterias*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacterias*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacterias* y *Termoleofilia* (Anexo 1). La clase *Actinobacteria* contiene 16 órdenes y 43 familias de 53 pertenecientes a este filo (Barka *et al.*, 2016).

Las actinobacterias tiene una amplia gamma morfológica a lo cual Goodfellow y Williams en 1983 describen que los diversos géneros se pueden asignarse a 8 grupos agregados: Actinobacteria, Actinoplanetes, Maduromycetes, Micropolysporas, Multilocular, Nocardioform, Streptomycetes, Thermomonosporas (Anexo 2).

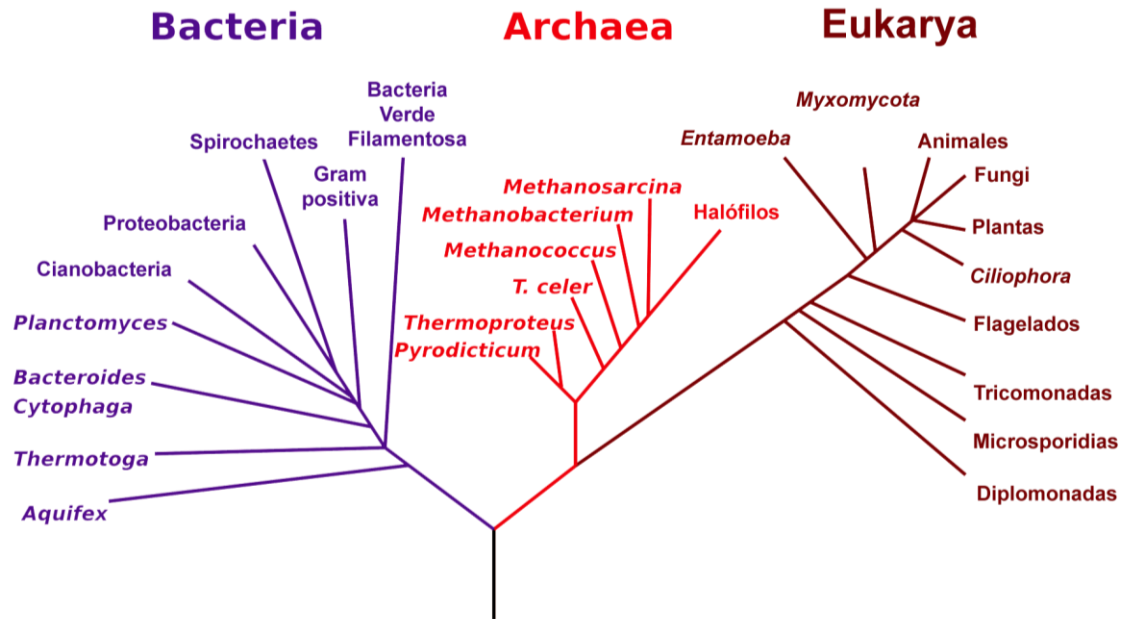
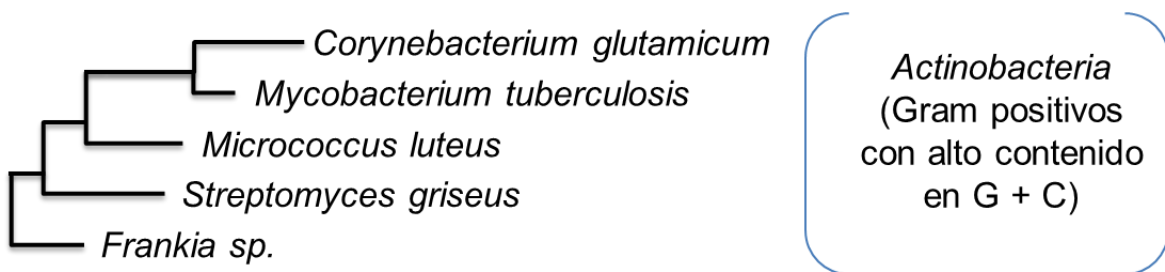


Figura 4. Árbol filogenético de la vida.

### 2.6.2. Morfología

Las actinobacterias es un grupo heterótrofo que utiliza una gran variedad de sustancias como fuente de carbono y nitrógeno (Parada *et al.*, 2017), proliferan en medio de gelosa a un pH neutro o ligeramente alcalino y tienen un olor característico a agua y suelo (Arenas, 2008). Son Gram positivas por tener una pared gruesa de peptidoglucano y en algunos géneros están presentes ceras y ácidos micólicos que le dan la propiedad de ácido-alcohol-resistencia (AAR) (Bonifaz, 2010), tienen un núcleo procarionte con el ADN distribuido en el

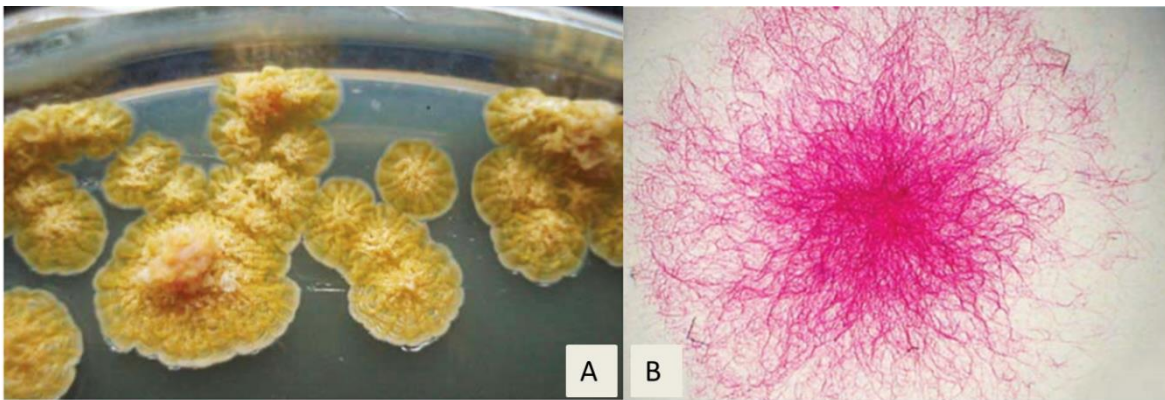
citoplasma (Arenas, 2008), además se caracterizan por tener un elevado contenido de bases de guanina (G) más citosina (C) en su ADN con un porcentaje mol por encima del 50-55 % (Fig. 5) (Goodfellow y Williams, 1983), a pesar de ello existe una variación considerable desde el punto de vista químico en las paredes celulares de las Gram positivas con alto contenido de (G) + (C) (Prescott *et al.*, 2002).



**Figura 5. Filogenia bacteriana.** El árbol se basa en las actinobacterias que están filogenéticamente relacionadas en comparaciones del rRNA 16S. Recuperada y modificado (Prescott *et al.*, 2002).

Las actinobacterias son de tamaño pequeño (menos de 1 micra) poseen la capacidad de formar hifas ramificadas en alguna etapa de su desarrollo (Goodfellow y Williams, 1983) además muchas de ellas producen un micelio que se reproduce por esporulación (Barka *et al.*, 2016) (Fig. 6b). Cuando se encuentran en un medio sólido se observa su crecimiento como colonias rígidas o fragmentadas con aspecto liso, polvoso o rugoso y producción de metabolitos secundarios como sustancias bioactivas y pigmentos difusibles en el medio de cultivo, que pueden ser de uso biotecnológico (Fig. 6a) (Medina y Evangelista, 2010). Uno de los metabolitos secundarios que las caracteriza es aquel que le da al suelo el olor a tierra mojada durante un día lluvioso, gracias a que producen una molécula llamada "geosmina", que es sintetizada por la mayoría de las especies de *Streptomyces* (Evangelista *et al.*, 2017).

La temperatura y el pH son factores importantes para la proliferación en el suelo. En el laboratorio la mayoría de las actinobacterias de suelo se comportan como mesófilas con una temperatura óptima de 25-37 °C (Goodfellow y Williams, 1983). Y también muestran su crecimiento óptimo en condiciones neutras y ligeramente alcalinas (Franco y Chavarro, 2016).



**Figura 6. Morfología macroscópica y microscópica de *Nocardia*.** a) Se observan colonias delimitadas en un medio de cultivo sólido, son de color amarillo con aspecto rugoso. b) Vista de 100X de una tinción Ziehl-Neelsen de donde se observan hifas microsifonadas de una actinobacteria. Tomada (Alexandro Bonifaz, 2010).

La mayoría de actinobacterias de suelo son aerobios estrictos y particularmente sensibles a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y bajas de O<sub>2</sub>, además tienen la capacidad de degradar biopolímeros complejos y recalcitrantes que se encuentran en el suelo y la basura vegetal, incluidos el almidón, la celulosa y la hemicelulosa, la lignina, la lignocelulosa, la pectina, la queratina, el humus y la quitina (Solans y Vobis, 2003; Goodfellow y Williams, 1983).

De acuerdo al dedicado trabajo realizado por Cardona y coparticipes en 2009 sobre colonias aisladas de suelo, indicaron que el mayor contenido de actinobacterias presentes en el suelo se encuentra a una profundidad de 20-30 cm, lo que indica que a esa distancia el suelo es rico en nutrientes importante para crecer y mantener estos microorganismos.

### 2.6.3. Actinobacterias de suelo como PGPR

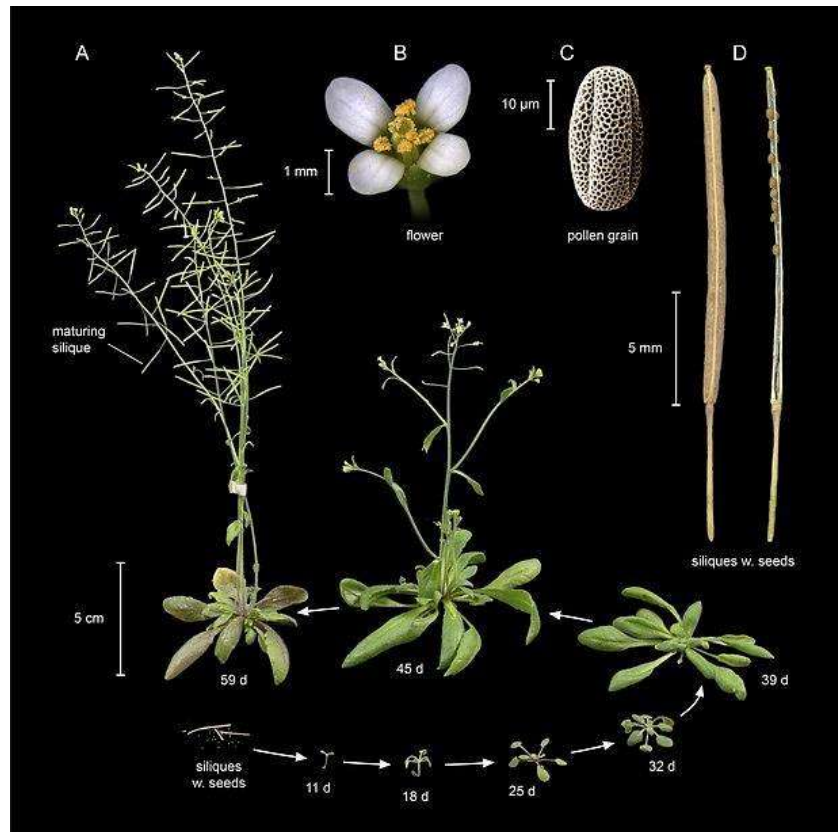
Las actinobacterias han sido consideradas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), ya que coexisten en la rizósfera interactuando con la planta (Franco y Chavarro, 2016), colonizando las raíces de éstas para estimular su crecimiento (Cardona *et al.*, 2009). Igualmente, las actinobacterias no contaminan el medio ambiente (Franco y Chavarro, 2016), las actividades que desempeñan en entornos naturales y agrícolas son para mejorar la disponibilidad de nutrientes y minerales, solubilidad de fosfato, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, equilibrio biótico del suelo, interacciones beneficiosas y sinérgicas con hongos micorrízicos, degradación de agroquímicos, control biológico de plagas en plantas y animales (Pedraza *et al.*, 2010; Cardona *et al.*, 2009).

Cardona y colaboradores en 2009 reportaron que las actinobacterias se encuentran habitando los suelos ricos en raíces en más del 40 % de la población y cerca del 21 % en suelos cultivados. *Streptomyces* y *Micromonospora* han sido los géneros más descritos, considerando al mayor productor (aproximadamente el 75 %) de sustancias naturales bioactivas al género *Streptomyces* (Franco y Chavarro, 2016).

### 2.7. Modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia Brassicaceae, posee varias propiedades que lo cobvieren en un organismo modelo al tener un tamaño, ciclo de vida corto y organización genómica que se recomienda para ciertos experimentos. La planta puede alcanzar los 30 o 40 cm, sus semillas son pequeñas, cada una pesa en promedio 20 mg, las flores son típicas de esta familia (Meyerowitz, 1987), el órgano principal que crece por debajo del suelo es la raíz, la

cual tiene una organización bastante simple, ya que en su punta se encuentra las células madre que dan origen a todas los tipos de células a través de divisiones, expansión celular y diferenciación (Scheres *et al.*, 2002).



**Figura 7. *Arabidopsis thaliana*.** A) *A. thaliana* de la accesión Columbia (Col) en diferentes etapas de su ciclo de vida, B) Una flor, C) Un grano de polen y D) Silicuas maduras. Tomado (Krämer, 2015).

### 3. Justificación

Las actinobacterias constituyen la mayor parte de microorganismos benéficos en la rizósfera. Su presencia se considera como un indicador de fertilidad en los suelos (Franco-Correa, 2009); estos microorganismos cumplen diferentes funciones, entre estas la de promotor del crecimiento vegetal por medio de diversos mecanismos, siendo uno de los principales la producción de fitohormonas.

El cambio de uso de suelo al monocultivo de aguacate modifica el equilibrio dinámico de la rizósfera, involucrando la pérdida y/o sustitución de muchos de estos microorganismos por lo que su recuperación y estudio nos ayudará a comprender su papel como promotoras del crecimiento vegetal para futuras aplicaciones biotecnológicas.

### 4. Hipótesis

Dentro de la rizósfera del cultivo orgánico de *Persea americana*, hay actinobacterias que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, a través de un mecanismo dependiente de auxinas.

### 5. Objetivo general

Determinar la capacidad como PGPR de un grupo de actinobacterias aisladas de la rizósfera de cultivo orgánico de *Persea americana* del Municipio de Uruapan, Michoacán a través de la bio-estimulación en *Arabidopsis thaliana in vitro*.



## 6. Objetivos particulares

1. Establecer un protocolo de descontaminación para el aislamiento de un grupo de actinobacterias presentes en la rizósfera de cultivos orgánicos de *Persea americana*.
2. Seleccionar un grupo de cepas que cumplan con las características fenotípicas de actinobacterias para realizar este experimento.
3. Analizar el comportamiento de estimulación de *Arabidopsis thaliana* en una interacción directa planta-microorganismo con el grupo de actinobacterias seleccionadas en este estudio.
4. Determinar si la vía de estimulación del crecimiento vegetal utilizada para su división y elongación celular es la vía auxínica.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Esquema de trabajo

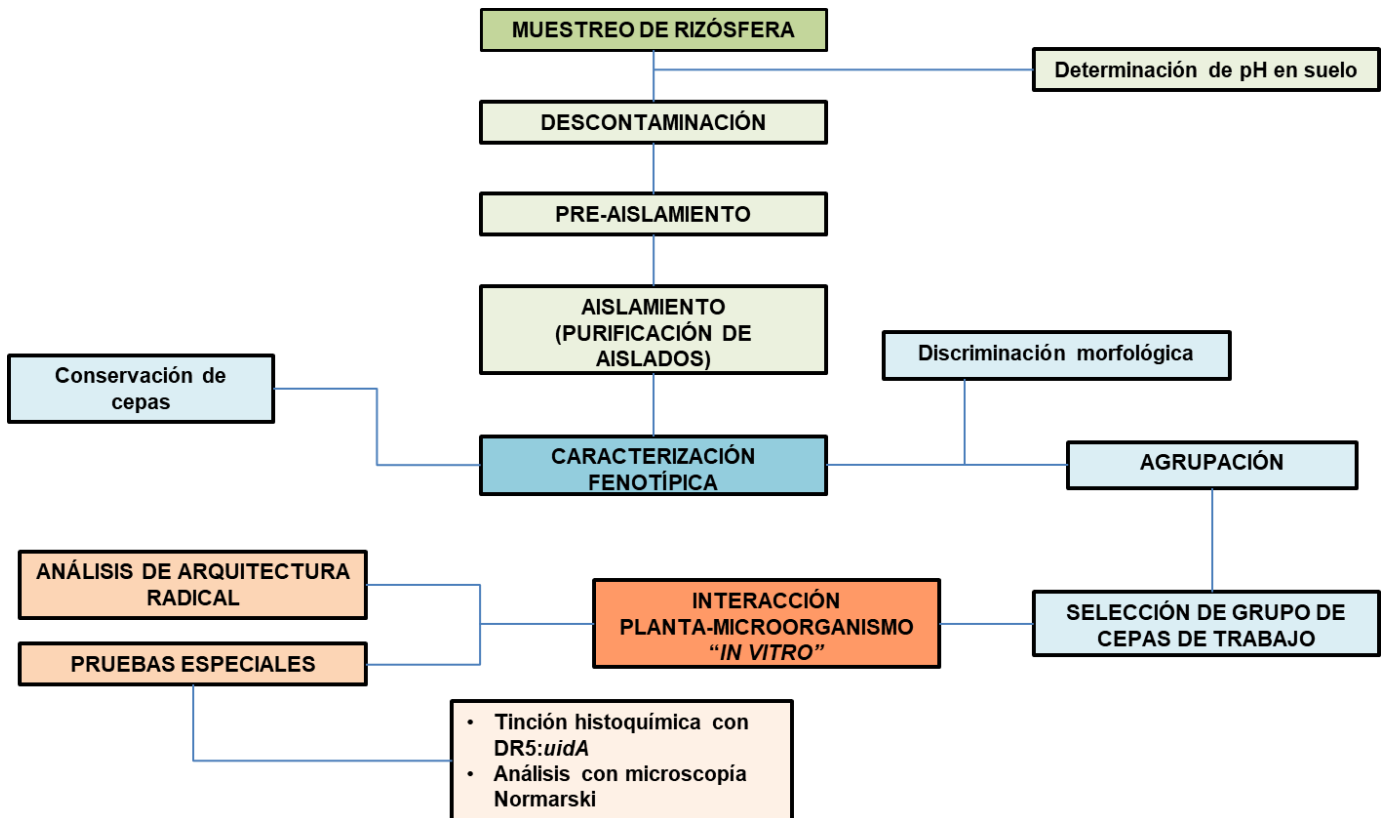


Figura 8. Esquema de trabajo

## 7.2. Muestreo de rizósfera

El muestreo de suelo se llevó a cabo en el Municipio de Uruapan, Michoacán en huertos orgánicos de *Persea americana* (Fig. 9). Se tuvo el apoyo del coordinador de Inocuidad el Ing. Andrés Ciprés Torres y de la Junta Local de Sanidad Vegetal (JLSV), la cual tienen registradas como producción orgánica a 138 unidades de producción (UP), se llevó a cabo una selección aleatoria de 30 UP para tratar de cubrir toda la zona del Municipio. Posteriormente se seleccionaron dos árboles representativos de cada UP, se hizo una perforación con una pala convencional limpia de 20-30 cm de profundidad (Fig. 10) aproximadamente, buscando la presencia de raíces secundarias, se tomaron 400 g aproximadamente y se colocaron en bolsas plásticas Ziploc® con cierre hermético y se transportaron en hielera para evitar la alteración de las muestras.



**Figura 9. Cultivo de *Persea americana*.** A) El fruto de *Persea americana* es una drupa en forma de pera con cáscara rugosa, de color verde claro a verde oscuro, tiene pulpa de color verde amarillento con un hueso grande central B) Unidad de producción orgánica representativa del municipio de Uruapan, Michoacán, en general los árboles son plantados a una distancia entre ellos que va de 7 a 12 metros. Las imágenes fueron proporcionadas por MC. Karla Gabriela Domínguez González.



**Figura 10. Zona de muestreo.** Perforación con una pala convencional de 20-30 cm de profundidad para las muestras rizosféricas de cultivo de *Persea americana*. Imágenes proporcionadas por MC. Karla Gabriela Domínguez González.

### 7.2.1. Análisis de pH de suelo

De acuerdo a Kloster y colaboradores en 2008 y según el Sistema de Apoyo Metodológico para Laboratorios de Suelos y Aguas (SAMLA), la medida del pH aporta información básica sobre el suelo, como conocer su potencial agrícola, estimar la disponibilidad de nutrientes esenciales y las condiciones necesarias para la supervivencia de las actinobacterias, para ello se llevó a cabo su determinación mediante el siguiente proceso: De cada una de las 60 muestras de suelo recolectadas, se pesaron 12 g de en un matraz erlemeyer de 250 mL por separado después se le añadió agua desionizada con un pH de 6.6, se agitó por 30 seg y se dejó la suspensión en reposo durante 1 h, por ultimo para la determinación se usó un potenciómetro marca HANNA instruments pH 210 Microprocessor pH Meter® y el electrodo se calibró con las soluciones estandarizadas de la misma casa comercial de la marca HANNA®, una vez transcurrido el tiempo de reposo se procedió a la medición del pH introduciendo el electrodo a la suspensión.

### 7.3. Descontaminación de muestra

Para el aislamiento de actinobacterias se realizó un proceso de descontaminación de microorganismos interferentes mediante una mezcla de detergente-protector, como sigue: Se colocó en un tubo de ensaye 2 mL de agua, adicionalmente en otro tubo limpio se midió el equivalente de tierra para cada una de las muestras, a cada tubo se le adicionó agua destilada hasta completar 10 mL para obtener una dilución primaria ( $10^{-1}$ ), por consiguiente se llevó a cabo una segunda dilución de la muestra ( $10^{-2}$ ), para la cual se tomaron 100  $\mu$ l de la solución de  $10^{-1}$  y se añadieron 900  $\mu$ l de una solución de extracto de levadura (YE) al (1 %, 2 %, 2 % y 2 %) y SDS al (1 %, 1.5 %, 1.5 % y 2 %). Para la dilución  $10^{-2}$  se homogenizó e incubó en baño con agitación constante durante (20 min a 40°C), (25 min a 40°C), (25 min a 43°C) y (25 min a 43°C), transcurrido el tiempo se tomaron 30  $\mu$ l de la dilución y se colocaron sobre placas de gelosa Infusión Cerebro Corazón (BHI) y medio gelosa Extracto de Malta (EM) modificado, para la inoculación se sembró masivamente y homogéneamente utilizando asas en “L”, una vez inoculadas las placas se incubaron a 37°C y las cuales se verificaron cada 24 h hasta completar 72 h para observar el desarrollo de cualquier colonia sugestiva a la morfología de las actinobacterias.

### 7.4. Aislamiento de actinobacterias y pre-selección

Después de tener las placas con crecimiento, se procedió a identificarlas mediante sus características de crecimiento macroscópicas tales como aspecto (rugoso, liso, polvoso), consistencia (rígida, fragmentada), color y pigmentos difusibles en el medio de cultivo o generación de metabolitos secundarios líquidos aspectos sugestivos de una colonia correspondiente de actinobacterias (Medina y Evangelista, 2010; Evangelista *et al.*, 2017; Goodfellow y Williams, 1983).

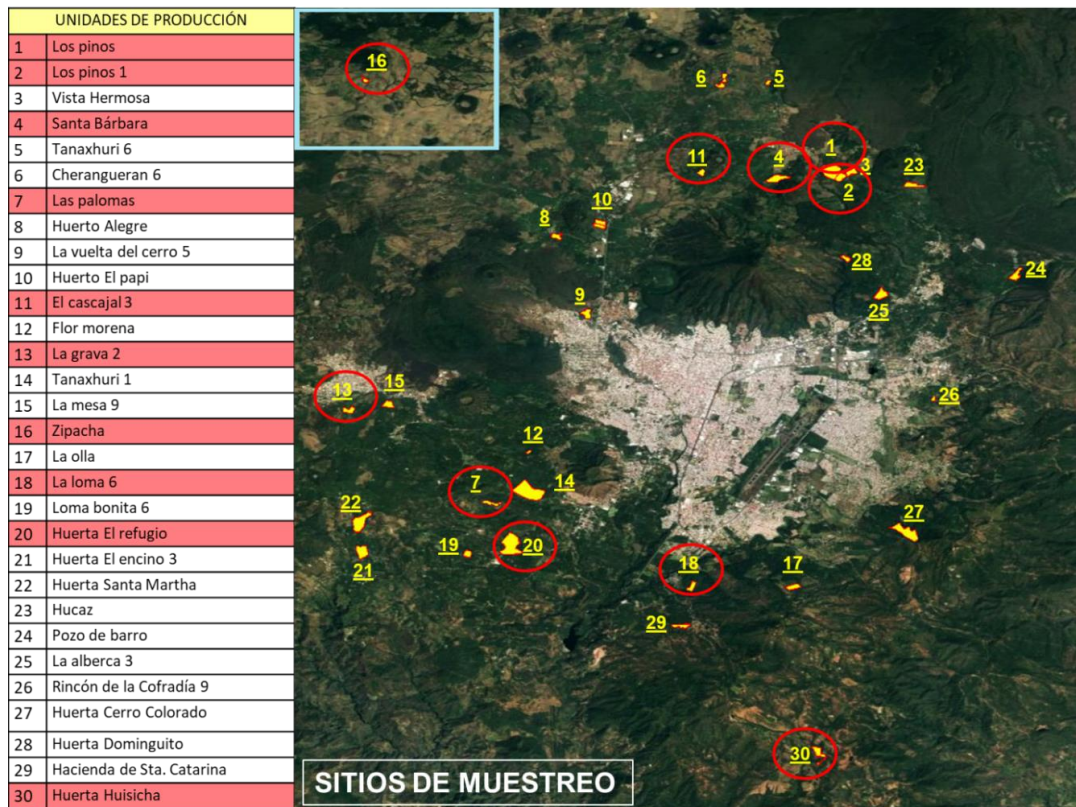
Se procedió a tomar una colonia sugestiva para llevar a cabo un reaislamiento en placas con agar BHI, con el fin de purificarlas y a su vez se realizó una tinción Gram para conocer su afinidad tintorial y características microscópicas propias de actinobacterias de manera que se seleccionaron las colonias con morfología particular de actinobacterias de las 60 muestras de suelo, se recuperaron un total de 1,583 aislados, después de ser purificados, se trasladaron a medio EM en tubo con tapón de rosca en plano inclinado para tenerlos disponibles para su uso en las siguientes pruebas, las cepas aisladas se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar oscuro para su conservación. Las actinobacterias se sometieron a un proceso de envejecimiento (fase estacionaria) donde por estrés metabólico, aumento de la población y disminución de nutrientes consiguen expresar otras características fenotípicas específicas como la formación de colores en superficie, presencia de pigmentos difusibles en el agar y metabolitos secundarios líquidos visibles, dado a estos criterios se deriva un proceso de agrupación y escrutinio de cepas con características morfológicas aparentemente iguales. Se redujeron los aislados de 1,583 a 541, agrupándolas por unidad de producción, es decir, se tienen 30 UP con diferencias en el total de cepas, se les nombro con la letra "A", el número que corresponde a la huerta y el número de la cepa (Ej. A1-1, A1-2, A1-3...).

#### **7.4.1. Conservación de cepas**

Después de haber reducido el número de aislados, se optó por el uso de un método de conservación de las mismas mediante un sistema de ultra congelación, en el cual se prepararon microviales eppendorf con una mezcla 80:20 de caldo BHI-Glicerol, con un asa bacteriológica se recuperó gran cantidad de biomasa bacteriana y se colocó en los viales con medio, repitiendo este paso según fue necesario.

## 7.5. Selección de cepas

Para realizar la selección final de cepas a utilizar en este proyecto, se decidió trabajar únicamente con 20 cepas. La selección de este grupo, se dio mediante un grupo representativo de las 30 UP que contaban con mayor número de aislados, quedándonos con 10 UP (Fig. 11), de las cuales sus aislados fueron sembrados e incubados a temperatura ambiente en placas MS 0.2x (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 0.6 % y Phytagar al 1 %, ajustándolo a pH 7. Se seleccionaron las de mejor adaptación y crecimiento al medio de cultivo, por el hecho que las plantas de *Arabidopsis* crecen adecuadamente en este medio diseñado para su crecimiento óptimo y así evitar futuros problemas de recuperación y/o crecimiento al momento de realizar el co-cultivo planta-bacteria.



**Figura. 11. Mapa satelital de las unidades de producción.** Se muestran las unidades de producción donde se muestreó rizósfera se resalta (color rosa) las 10 unidades donde se originaron las 20 cepas de trabajo. Imagen proporcionada por el Ing. Andrés Ciprés Torres de la Junta Local de Sanidad Vegetal (JLSV) (2019).

## 7.6. Interacción planta-microorganismo

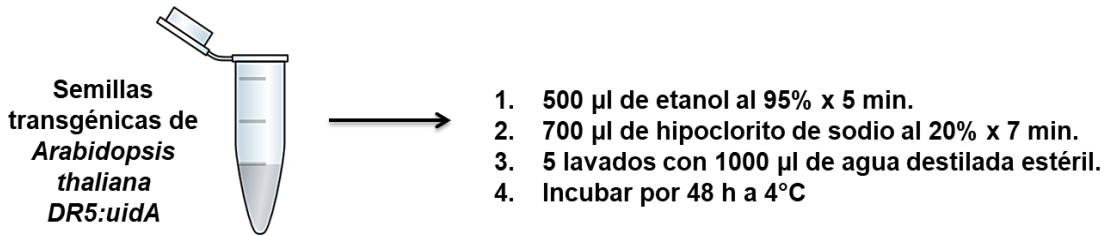
Este experimento “*in vitro*” se realizó en el laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal a cargo del D. C. José López Bucio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Se utilizó como organismo modelo a *Arabidopsis thaliana*, usando semillas transgénicas de respuesta a auxinas DR5:uidA (Ulmasov *et al.*, 1997), manejando un sistema de co-cultivo por contacto directo planta-bacteria, se les realizó el siguiente proceso: Primeramente se realizó la desinfección de las semillas, se colocaron las semillas en microviales eppendorf y se le adicionaron 500 µl de etanol al 95 % (v/v) durante 5 min, transcurrido el tiempo se descartó el etanol y se añadieron 700 µl de hipoclorito de sodio al 20 % (v/v) durante 7 min, se realizaron 5 lavados con 1000 µl de agua destilada estéril, finalmente se agregó agua destilada estéril y se incubaron por 48 h a 4°C.

Para el proceso de siembra, una vez pasado el tiempo de incubación se prepararon placas de Petri con medio MS 0.2x (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 0.6 % y Phytagar al 1 %, ajustándolo a pH 7, se desinfectó la cámara con etanol al 96 %, se sembraron las semillas en las placas, se sellaron y por ultimo se colocaron en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, una intensidad de luz de 100 µmoles/m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> en posición vertical a 22°C por 7 días (Fig. 12).

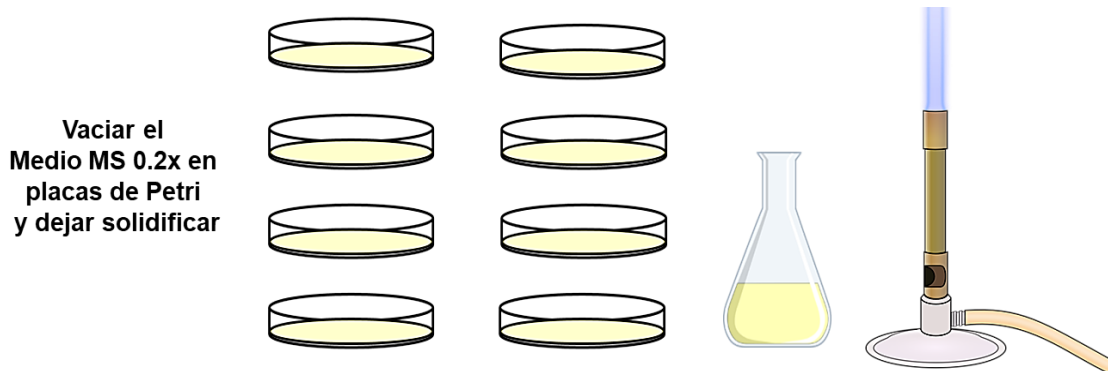
Transcurrido el tiempo de crecimiento se colocó un inóculo de bacteria en línea horizontal en el medio sólido MS 0.2x, después se transfirieron las plántulas de *Arabidopsis thaliana* para un contacto directo con el microorganismo, colocando las placas en posición vertical en la cámara de crecimiento a 22°C por 7 días, todos los experimentos se hicieron por triplicado con 6 plántulas de *Arabidopsis* por placa (Fig. 13).



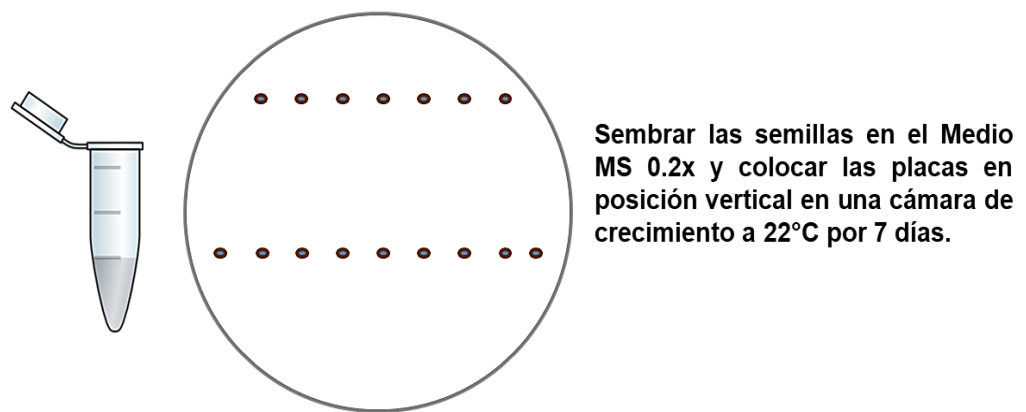
### a) Desinfección



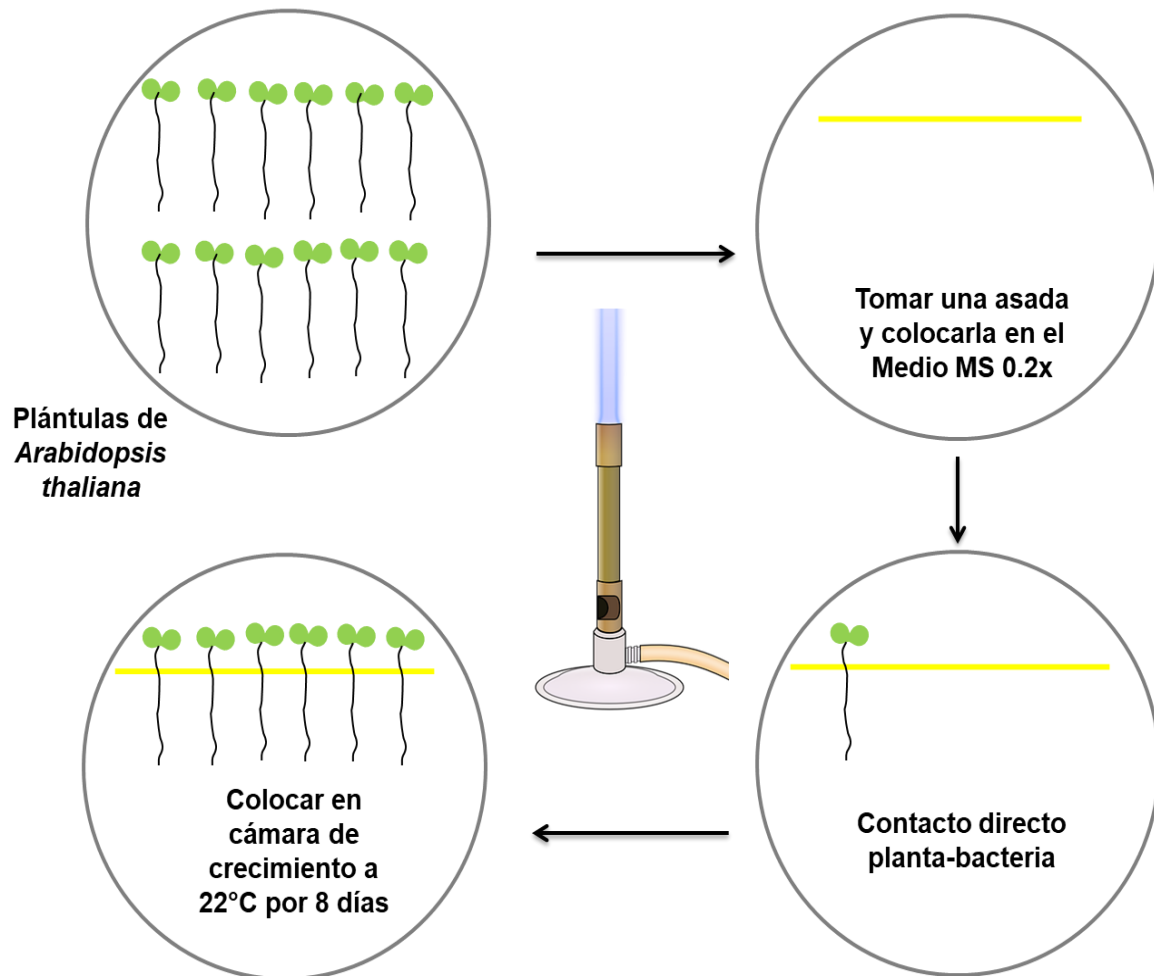
### b) Preparación de medios



### c) Siembra



**Figura 12. Esquema de desinfección y preparación de medio.** a) Se realiza desinfección de las semillas silvestres de líneas transgénicas *DR5:uidA* de *Arabidopsis thaliana* utilizando etanol al 95%, hipoclorito de sodio al 20 % y lavados con agua estéril. b) Se prepara medio MS 0.2x. c) Se siembran en placas con medio MS 0.2x.



**Figura 13. Esquema de la interacción planta-microorganismo.** Previamente se siembran las semillas en las placas con el medio MS 0.2x. La plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 7 ddg (días después de la germinación) se transfirieron a placas sobre inóculos bacterianos y las placas se colocaron en posición vertical en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, una intensidad de luz de  $100 \mu\text{moles/m}^2\text{s}^{-1}$  en posición vertical a 22°C por 7 días. Cada experimento se realizó por triplicado.

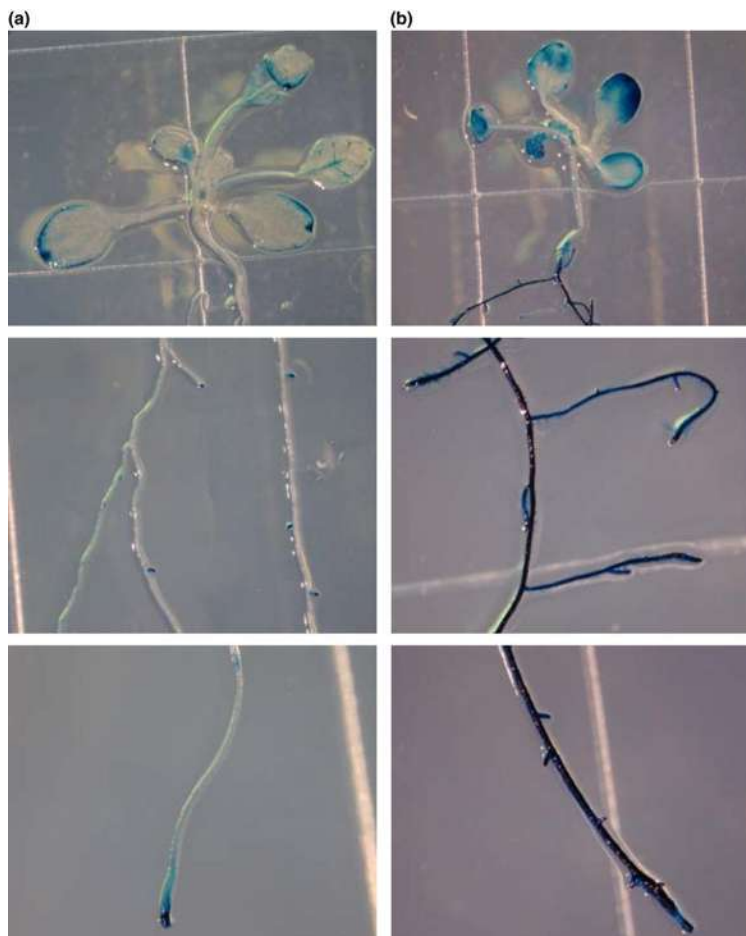
### 7.6.1. Análisis de la arquitectura radical

Posteriormente de haber concluido el tiempo de co-cultivo se midió la longitud de la raíz primaria con una regla de 30 cm de las 18 plántulas inoculadas con las bacterias, se cuantificaron las raíces laterales (RL) desde la punta de la raíz primaria hasta la transición de la raíz y el tallo con ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica MZ6) y se determinó la densidad de raíces laterales (DRL) dividiendo el número de raíces laterales sobre la longitud de la raíz primaria. Para el análisis estadístico de los datos derivados del experimento fueron analizados en el programa JMP versión 6 © SAS institute Inc.

### 7.6.2. Tinción histoquímica de GUS

Las plantas transgénicas con la construcción *DR5:uidA* en *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen reportero *uidA*, se utilizaron para analizar la participación de la vía auxínica en el efecto estimulante por las Actinobacterias. Primeramente el X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil,  $\beta$ -D glucurónido) al 1 % se descongeló en una incubadora, una vez listo se procedió a colocar las plantas transgénicas *DR5:uidA* en una placa de microtítulo con 300  $\mu$ l de X-Gluc como sustrato y se incubaron con agitación a 37°C por 24 h, transcurrido el tiempo, las plántulas se clarificaron, se retiró el X-Gluc y se añadió una solución de HCl 0.24 N y metanol 20 % v/v por 60 min a 62 °C, después se colocaron en una segunda solución de NaOH 7 % con etanol 60 % v/v por 30 min a temperatura ambiente, se efectuaron lavados con etanol al 40, 20 y 10 % por 20 min cada uno (Malamy y Benfey, 1997) y finalmente se le añadió glicerol al 50 % v/v.

Para entender cómo se observan los cambios morfológicos que se producen al aumentar la concentración interna de auxina en *Arabidopsis thaliana* al ser inoculada con una bacteria, se tomó un ejemplo de Spaepen *et al.*, 2014 donde se induce la expresión del gen en la raíz primaria y follaje al inocular *Azospirillum brasilense* en *Arabidopsis thaliana* (Fig. 14).



**Figura 14. Tinción histoquímica para la actividad GUS en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.** a) Control negativo, b) Expresión del marcador de auxinas *DR5:uidA* en la parte aérea de las plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con *Azospirillum brasilense*. Tomada (Spaepen *et al.*, 2014).

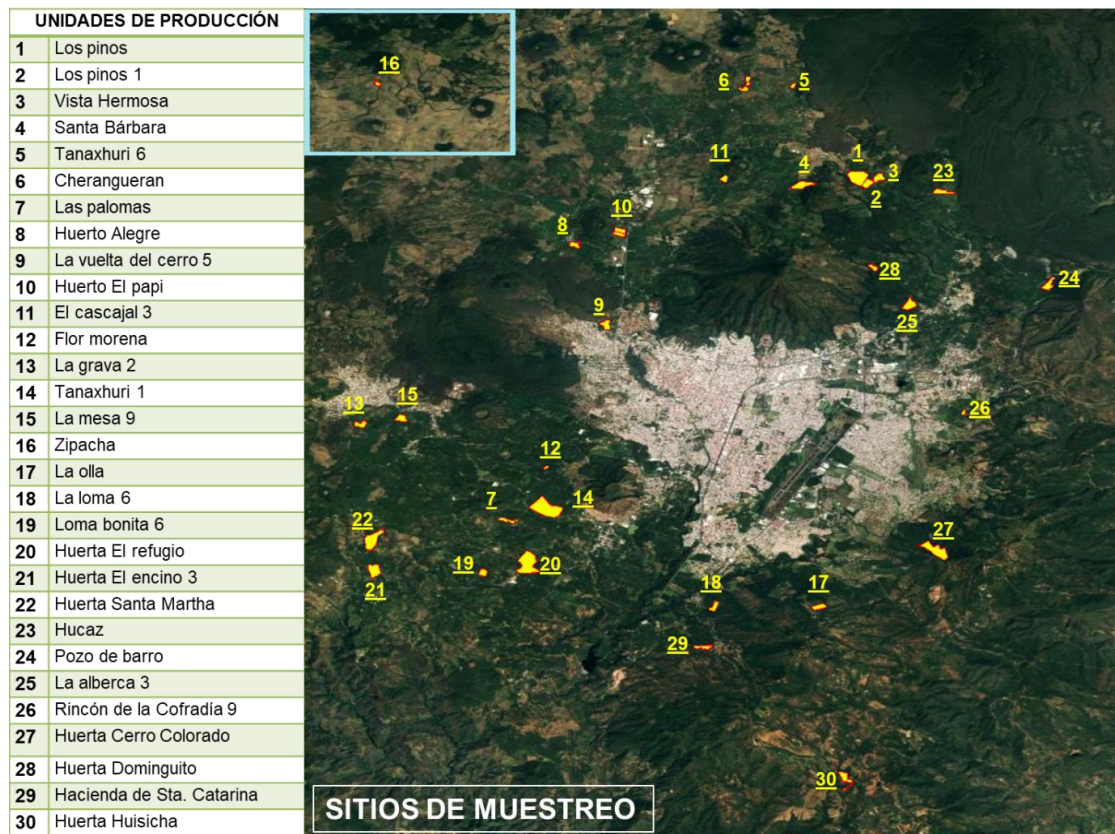
### 7.6.3. Análisis con microscopía Nomarski

Una vez que las plantas se encontraron en glicerol se capturaron fotos de los follajes y se observaron con los aumentos 10X y 40X. Posteriormente se montaron las plántulas en portaobjetos con glicerol al 50 % v/v para su análisis en un microscopio de campo claro con la óptica de Nomarski.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Muestras rizosféricas de cultivo de Aguacate

Michoacán es el estado con mayor valor de producción de aguacate, con un volumen de 1, 565,896 toneladas (SIAP, 2018), se eligió la zona del municipio de Uruapan, Michoacán, al ser una de las superficies de mayor extensión cultivadas de este monocultivo. Acorde a la JLSV se encuentran registradas como producción orgánica 138 UP, del total solo se muestrearon 30 UP. Se optó por la producción orgánica porque continúan con parte de la microbiota original de la rizósfera al estar libres de pesticidas y fertilizantes químicos que puedan alterarla y/o eliminarla.



**Figura 15. Mapa satelital de los sitios de muestreo.** Se muestran las unidades de producción donde se muestreó suelo rizosférico. Imagen proporcionada por el Ing. Andrés Ciprés Torres de la Junta Local de Sanidad Vegetal (JLSV) (2019).

En el mapa satelital (Fig. 15) se observa la distribución de las UP muestreadas, las cuales están cubriendo toda la zona del Municipio, teniendo un 22 % del total de la población orgánica, lo que sugiere que cada unidad muestreada representa a cinco de éstas.

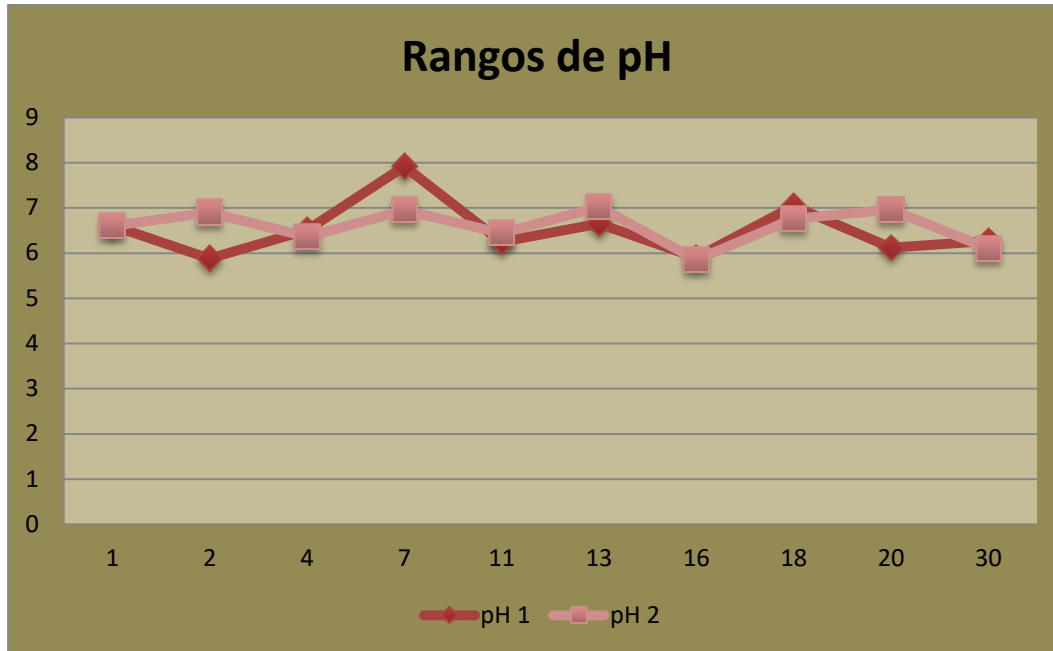
## 8.2. pH de la rizósfera

La medida del pH es una información básica de los suelos, nos da a conocer su potencial agrícola, disponibilidad de nutrientes, asimismo, nos informa las condiciones necesarias para la supervivencia de las actinobacterias y por lo tanto, el suelo para la plantación de aguacate oscila de un pH neutro o ligeramente ácido (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015). Las actinobacterias de suelo manifiestan preferencia de crecimiento entre los rangos de pH 5.0 y 9.0, con un óptimo cercano a la neutralidad (Goodfellow y Williams, 1983).

En la tabla 1 se presentan los valores de pH obtenidos de las 60 muestras rizosféricas correspondientes a 30 UP orgánicas muestreadas, se resaltan en color rosa las UP donde se originaron las cepas de trabajo.

**Tabla 1. pH de las muestras por UP.** Marcadas de color rosa las unidades producción donde se originaron las cepas de trabajo

Nº de unidad producción	Muestra 1	Muestra 2	Nº de unidad producción	Muestra 1	Muestra 2
1 Los pinos	6.61	6.6	16 Zipacha	5.9	5.85
2 Los pinos 1	5.88	6.9	17 La olla	6.6	7.7
3 Vista Hermosa	6.18	6.55	18 La loma 6	7.04	6.76
4 Santa Bárbara	6.51	6.21	19 Loma bonita 6	6.58	6.42
5 Tanaxhuri 6	6.83	6.63	20 Huerta El Refugio	6.12	6.96
6 Cherangueran	6.71	6.77	21 Huerta El encino 3	6.42	6.62
7 Las palomas	7.92	6.95	22 Huerta Santa Martha	6.66	6.18
8 Huerto alegre	6.82	6.9	23 Hucaz	6.66	5.38
9 La vuelta del cerro 5	7.1	6.49	24 Pozo de barro	6.55	7.26
10 Huerto al papi	6.12	6.25	25 La alberca 3	6.6	6.14
11 El cascajal 3	6.25	6.44	26 Rincón de la cofradía 9	6.43	6.87
12 Flor morena	6.8	6.65	27 Huerta Cerro colorado	6.05	6.21
13 La grava 2	6.65	7.02	28 Huerta Dominguito	6.37	6.07
14 Tanaxhuri 1	6.58	6.3	29 Hacienda de Sta. Catarina	7.2	6.04
15 La mesa 9	6.34	6.98	30 Huerta Huisicho	6.27	6.1



**Figura 16. Rango de pH.** 20 muestras correspondientes a 20 unidades de producción (marcadas de color rosa en la tabla 1), donde surgieron las cepas de trabajo.

Los resultados obtenidos indican (Fig. 16) que las zonas donde se obtuvieron las muestras cuentan con un pH dentro del rango establecido para el desarrollo y supervivencia de las actinobacterias, lo que nos asegura un 100 % de probabilidad de encontrar estos microorganismos si sólo se dependiera de este factor.

### 8.3. Descontaminación

El suelo de la rizósfera cuenta con diversas comunidades de microorganismos de  $10^{10}/g$  de suelo, que interactúan o no con las raíces de las plantas (McNear, 2013). Por esta razón, para tener un aislamiento de colonias sugestivas, primero se realizó el proceso de descontaminación de las muestras con una mezcla de un detergente-protector para eliminar transferencia y microorganismos indeseables como se muestra en la tabla 2, se realizaron 4 ensayos a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempo.

**Tabla 2. Ensayos de descontaminación.**

Ensayo	YE %	SDS %	Temperatura	Tiempo
1	1 %	1 %	40°C	20 min
2	2 %	1.5 %	40°C	25 min
3	2 %	1.5 %	43°C	25 min
4	2%	2%	43°C	25 min

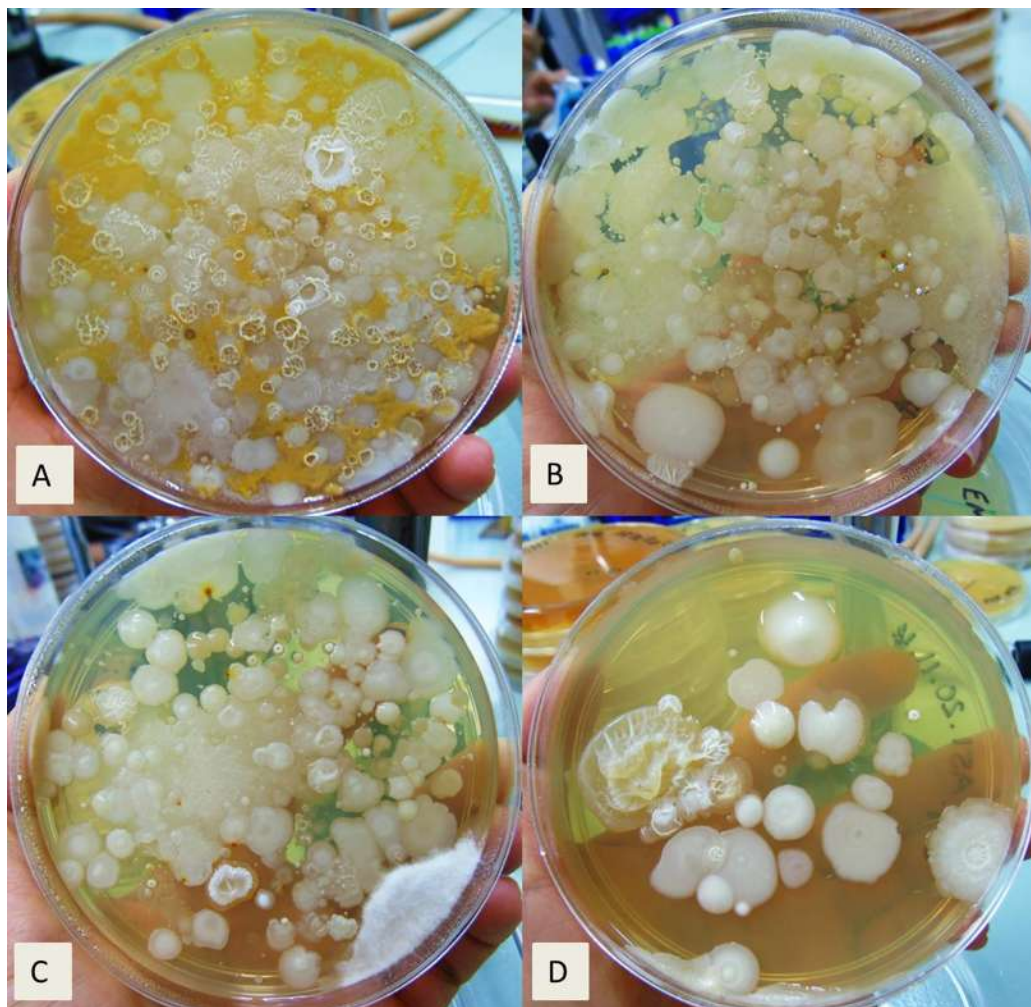
En la figura 17-A se observó el crecimiento posterior al usar el tratamiento de descontaminación del ensayo 1 utilizando SDS al 1 % y YE al 1 % a 40°C-20 min, donde se encontró un crecimiento masivo de microorganismos interferentes y no se observa ninguna colonia sugestiva de actinobacterias.

En la figura 17-B se observó el crecimiento después de utilizar el tratamiento de descontaminación del ensayo 2 utilizando SDS al 1.5 % y YE al 2 % a 40°C-25 min, en el cual hubo una reducción considerable de microorganismos interferentes.

En la figura 17-C se observó el crecimiento después de emplear el tratamiento de descontaminación del ensayo 3 utilizando SDS al 1.5 % y YE al 2 % a 43°C-25 min, en el cual hubo una reducción considerable de microorganismos interferentes, sin embargo no se pudo realizar un aislamiento adecuado de colonias de nuestro interés

En la figura 17-D, ensayo 4 se utiliza SDS al 2 % y YE al 2 % a 43°C-25 min, se observó una reducción significativa de éstas interferencias y tenemos colonias bien aisladas sugestivas de actinobacterias, con lo que ya se hace posible realizar un reaislamiento con el fin de purificarlas.





**Figura. 17. Tratamiento de descontaminación de muestras.** A) Ensayo 1: Conc. SDS al 1% y YE al 1% a 40°C por 20 min. B) Ensayo 2: Conc. SDS al 1.5 % y YE al 2% a 40°C por 25 min. C) B) Ensayo 3: Conc. SDS al 1.5 % y YE al 2% a 43°C por 25 min D) Ensayo 4: Conc. SDS al 2% y YE al 2% a 43°C por 25 min, se observa pocos microorganismos interferentes y crecimiento de colonias sugestivas de actinobacterias. Fotos proporcionadas por M. C. Karla Gabriela Domínguez González.

El tratamiento de descontaminación de las muestras tuvo mejores resultados en el ensayo 4, el cual redujo colonias contaminantes, teniendo placas con crecimiento de entre 50 a 300 UFC dentro de las cuales ya había mayor abundancia de colonias sugestivas de actinobacterias para una mejor selección de las mismas.

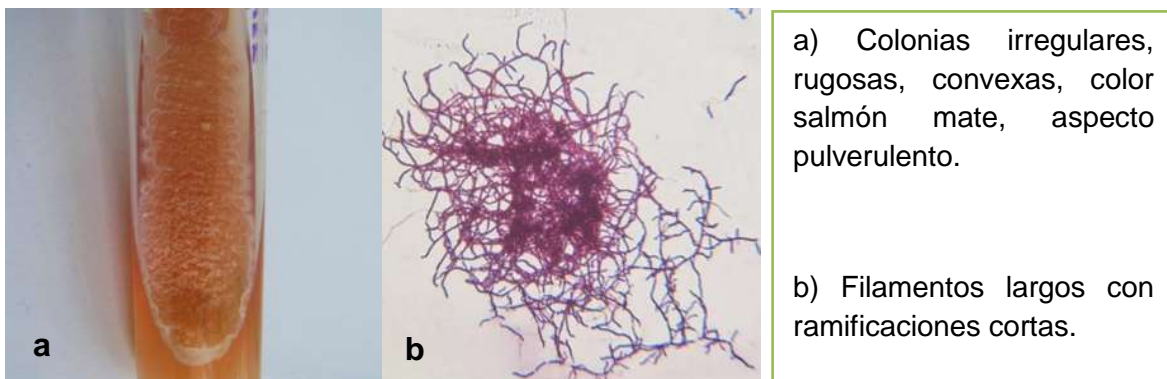
#### 8.4. Caracterización fenotípica de actinobacterias

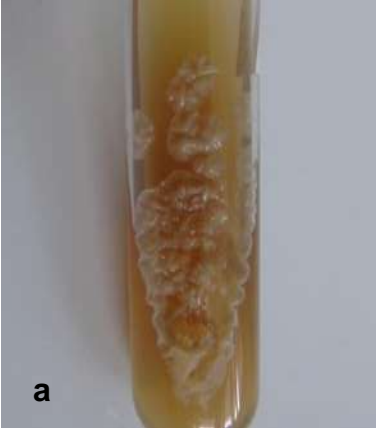
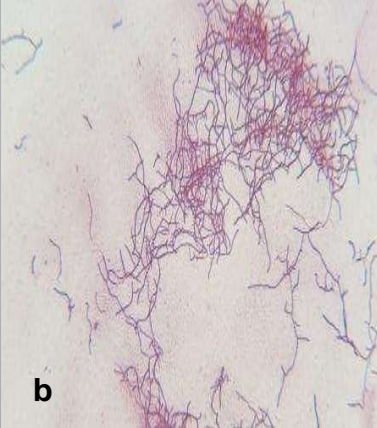
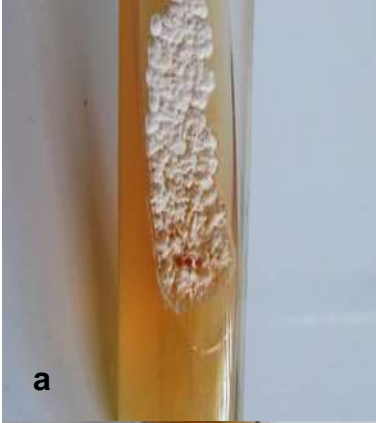
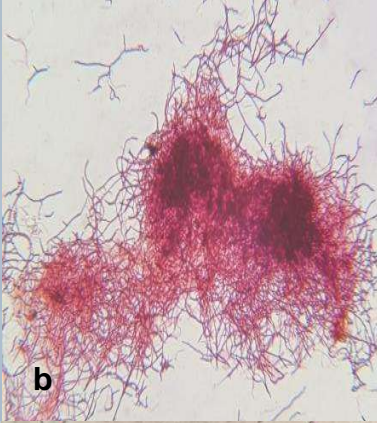
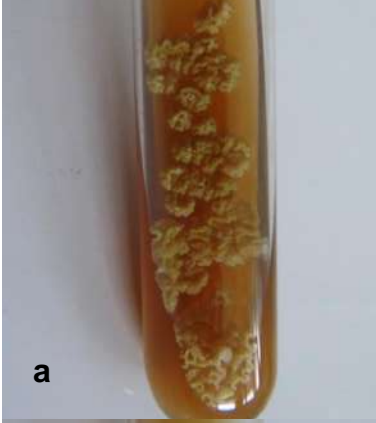
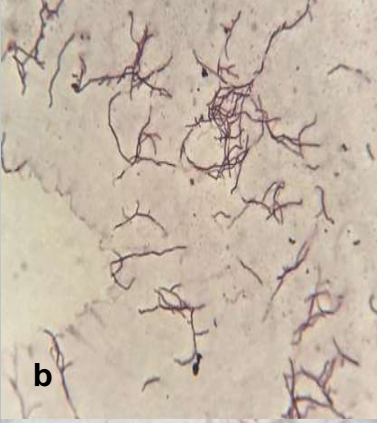
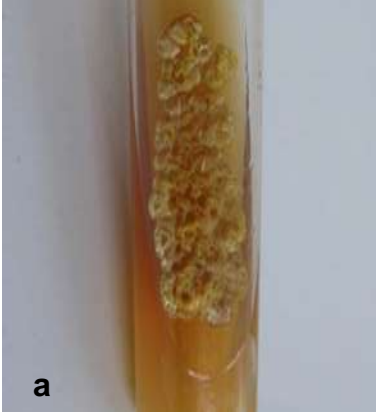
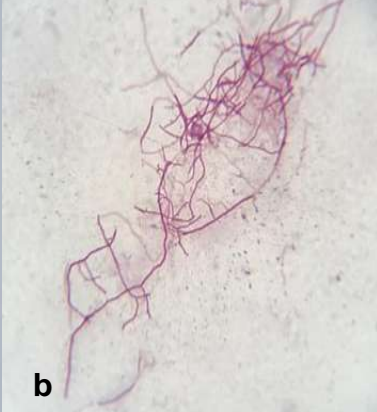
Las actinobacterias que se encuentran habitando en el suelo, es considerado uno de los grupos más importantes y abundantes de la población microbiana de estos (90 %) (Franco y Chavarro, 2016), se consiguió hacer una la caracterización fenotípica, primero, reaislándolas en medios de gelosa BHI y EM, con el fin de purificarlas. En total se recuperaron 1583 aislados de 60 muestras de rizósfera correspondientes a las 30 UP orgánicas.

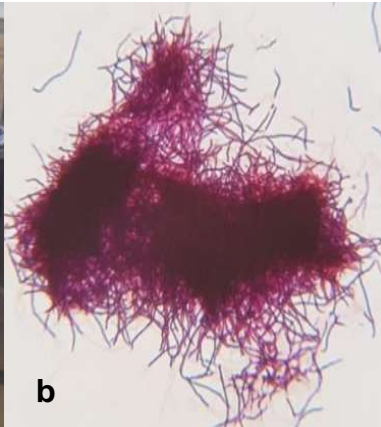
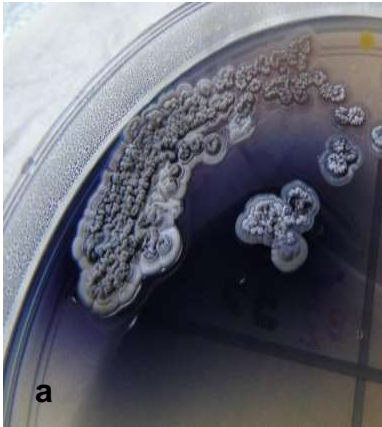
La tinción Gram nos ayuda a conocer su afinidad tintorial y características microscópicas propias. Estas características se observaron al microscopio (100X) como: finos filamentos microsifonados, algunos con segmentaciones y esporas, son Gram positivas debido a que su pared está conformada por derivados de ácido murámico que le confieren resistencia y capacidad de retener el colorante cristal violeta (Bonifaz, 2010) (Tabla 3).

Las cepas expresan otra característica fenotípica específica, así como la formación de pigmentos difusibles en el agar y metabolitos secundarios líquidos visibles en algunos casos ya que pasan por un proceso de estrés metabólico que causa el aumento de la población y disminución de nutrientes ayudando a adquirir estas nuevas características fenotípicas para su agrupación (Tabla 3).

**Tabla 3. Morfología macroscópica y microscópica representativas de las cepas aisladas de rizósfera *Persea americana*.** a) Morfología macroscópica. b) Morfología microscópica.

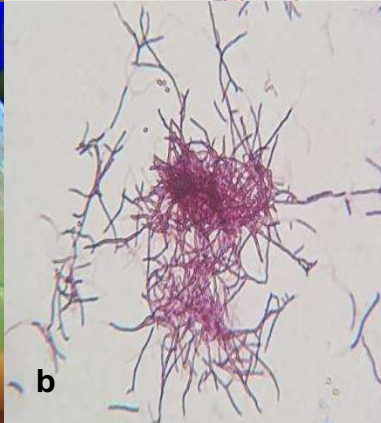
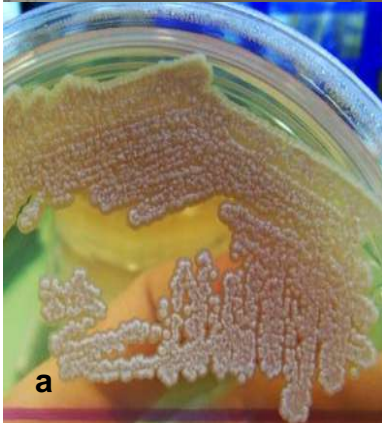


 <p><b>a</b></p>	 <p><b>b</b></p>	<p>a) Colonias grandes, color amarillo brillante, de aspecto crateriforme, con formación de pliegues, de consistencia rígida</p> <p>b) Finos filamentos, con ramificaciones cortas.</p>
 <p><b>a</b></p>	 <p><b>b</b></p>	<p>a) Colonias irregulares, rugosas, elevadas, de consistencia friable, color beige que con el tiempo se vuelven blancas</p> <p>b) Filamentos largos con ramificaciones cortas, aglomerados.</p>
 <p><b>a</b></p>	 <p><b>b</b></p>	<p>a) Colonias amarillas, elevadas, rugosas, de consistencia friable.</p> <p>b) Filamentos largos con ramificaciones cortas.</p>
 <p><b>a</b></p>	 <p><b>b</b></p>	<p>a) Colonias irregulares, rugosas, elevadas de consistencia friable, de color beige con pigmento café.</p> <p>b) Filamentos delgados, largos con ramificaciones cortas.</p>



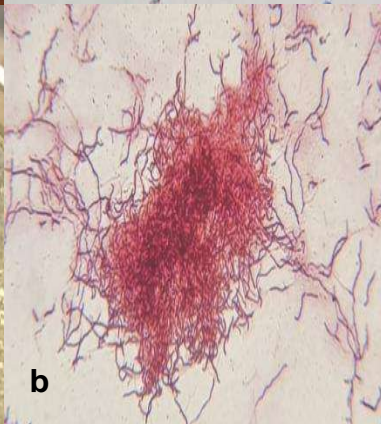
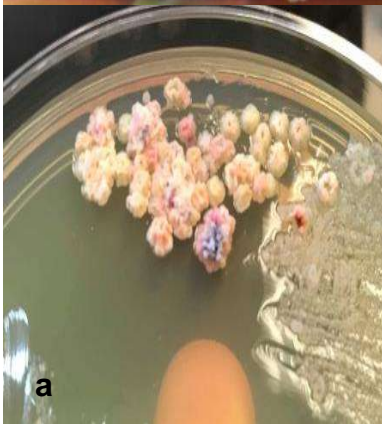
a) Colonias irregulares, azul rey brillante que con el tiempo se vuelven blancas, con aspecto crateriforme y pigmento azul.

b) Filamentos en acúmulos largos y cortos.



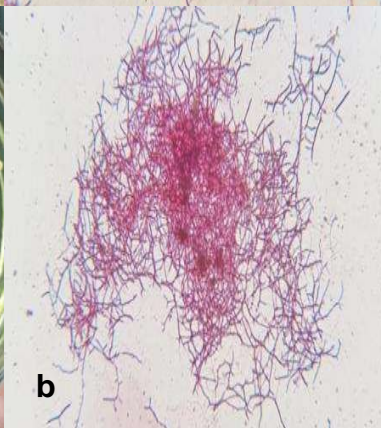
a) Colonias pequeñas convexas de borde entero, color naranja mate, de consistencia friable.

b) Filamentos cortos y largos, en acúmulos



a) Colonias crateriformes, con bordes irregulares, elevadas, rugosas, de color beige.

b) Filamentos aglomerados, cortos y largos.

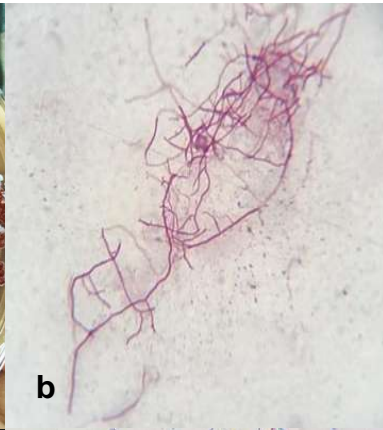


a) Colonias de bordes enteros, color naranja y de consistencia friable

b) Filamentos largos con ramificaciones cortas.



a



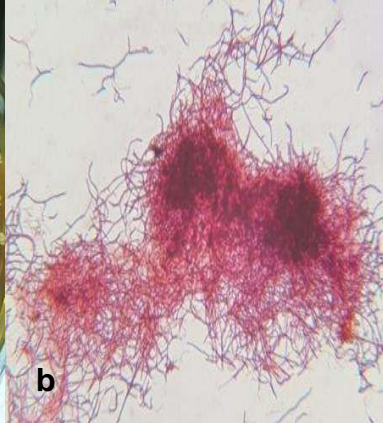
b

a) Colonias irregulares, porosa, de consistencia friable, de color blanco que con el tiempo se vuelve rojo ladrillo.

b) Filamentos largos con ramificaciones cortas.



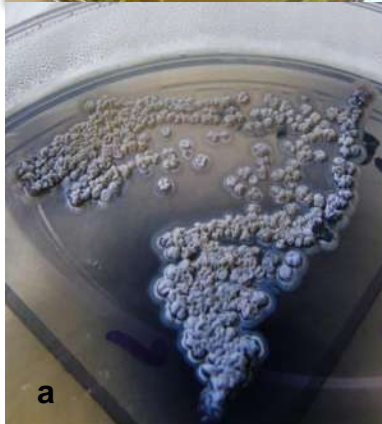
a



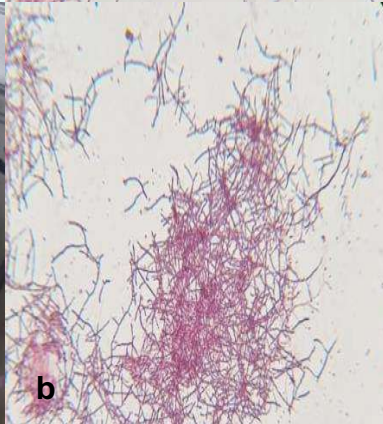
b

a) Colonias irregulares, rugosas, elevadas, de consistencia friable, de color amarillo.

b) Filamentos largos con ramificaciones.



a



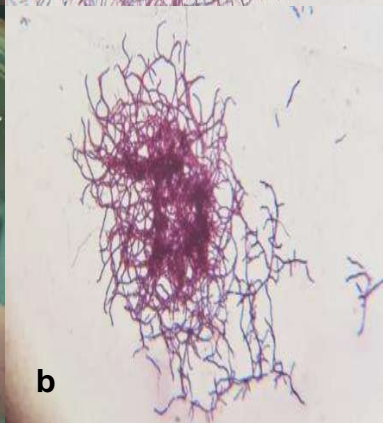
b

a) Colonias irregulares, rugosas, color azul que con el tiempo se vuelven de color blanco.

b) Filamentos largos con ramificaciones cortas.



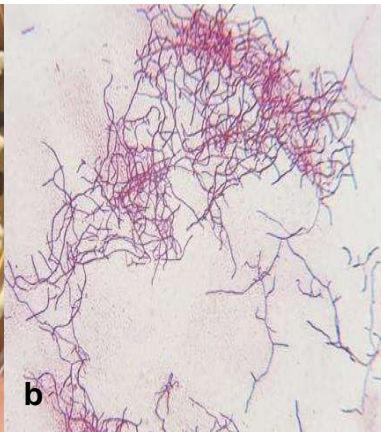
a



b

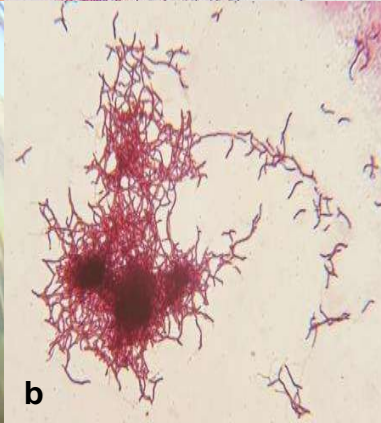
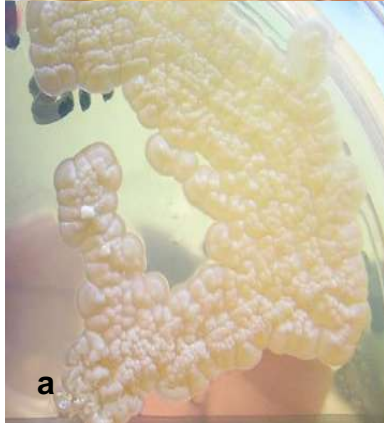
a) Colonias irregulares, crateriformes, blancas, friables

b) Filamentos delgados, largos con ramificaciones cortas.



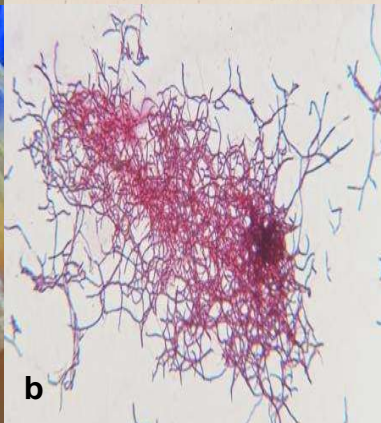
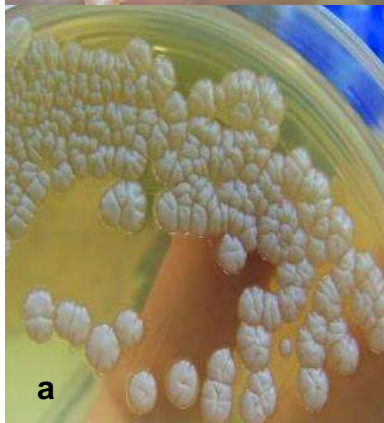
a) Colonias irregulares, color beige, seca de consistencia friable.

b) Filamentos largos con ramificaciones cortas.



a) Colonias blancas, irregulares, aspecto crateriforme de consistencia dura.

b) Filamentos largos y cortos, delgados, acumulados, ramificados.



a) Colonias convexas, lisas de color beige, con bordes enteros y de consistencia dura.

b) Filamentos largos, delgados y aglomerados.



a) Colonias irregulares, rugosas, aspecto crateriforme, de color beige que con el tiempo se vuelven blancas.

b) Filamentos largos con ramificaciones cortas.

De acuerdo a lo observado y a los resultados obtenidos en la microscopía de campo claro, podemos asegurar de acuerdo a las coincidencias fenotípicas expuestas por Goodfellow y Williams en 1983, Roberto Arenas en 2008 y Alexandro Bonifaz en 2010 con nuestro grupo de bacterias aisladas que, efectivamente pertenecen al filo de las actinobacterias y se encuentran como microbiota original habitando en la rizósfera de *Persea americana* de cultivos orgánicos, al ser un grupo importante y dominante en el suelo, que ha sobrevivido a pesar del cambio de uso de suelo de forestal a unidades de producción de este monocultivo para satisfacer la demanda; sin embargo, se tiene a su beneficio que estén libres de agroquímicos que pueden alterarla y/o eliminarla en su totalidad.

#### **8.5. Selección de cepas**

Antes de evaluar el sistema co-inoculación planta-bacteria, se seleccionaron las cepas de Actinobacterias de trabajo, primeramente se tomaron las huertas que cuentan con un mayor número de cepas aisladas como se muestra en la tabla 4. Posteriormente se caracterizó el crecimiento de los aislados en medio MS 0.2x, en vista que las plantas de *Arabidopsis* crecen adecuadamente en este medio diseñado para su crecimiento óptimo.

En la tabla 4 se observa que de las 541 que corresponde al total de los aislados (100 %), solo se trabajó con 20 cepas que corresponden al 4 % del total, lo que significa que quedó un 96 % de cepas sin analizar, desconociendo la actividad que tienen en el suelo.

**Tabla 4. Agrupación y selección de cepas.**

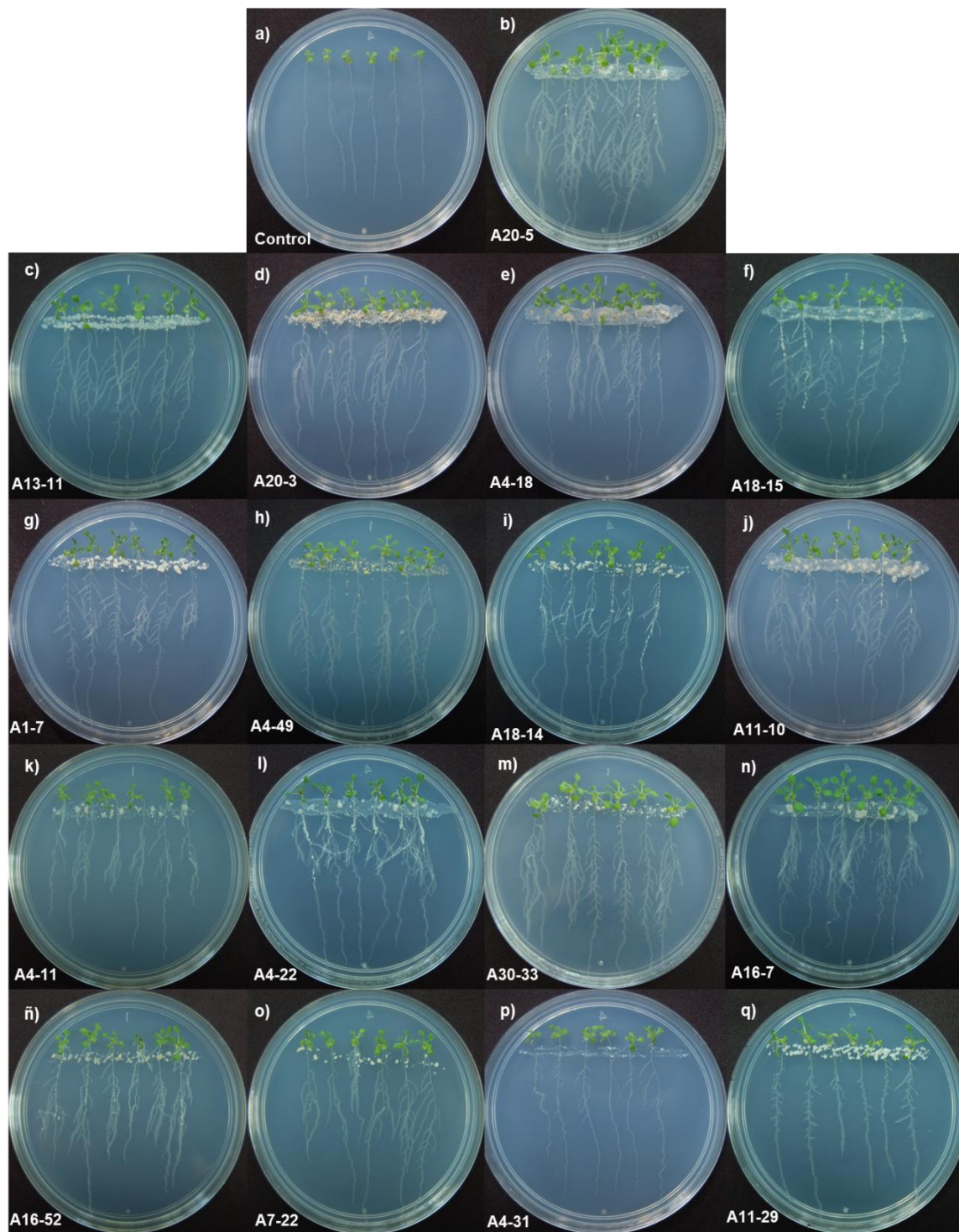
Nombre de las UP		Total de aislados	N° de aislados utilizados	Cepas
1	Los pinos	19	1	A1-7
2	Los pinos 1	11	1	A2-5
3	Vista Hermosa	0	0	
4	Santa Bárbara	48	5	A4-11, A4-18, A4-22, A4-31, A4-49
5	Tanaxhuri 6	13	0	
6	Cherangueran	13	0	
7	Las palomas	24	2	A7-3, A7-22
8	Huerto alegre	7	0	
9	La vuelta del cerro 5	9	0	
10	Huerto al papi	20	0	
11	El cascajal 3	54	2	A11-10, A11-29
12	Flor morena	11	0	
13	La grava 2	21	1	A13-11
14	Tanaxhuri 1	7	0	
15	La mesa 9	16	0	
16	Zipacha	79	2	A16-7, 16-52
17	La olla	9	0	
18	La loma 6	23	2	A18-14, A18-15
19	Loma bonita 6	14	0	
20	Huerta El Refugio	12	2	A20-3, A20-5
21	Huerta El encino 3	17	0	
22	Huerta Santa Martha	12	0	
23	Hucaz	7	0	
24	Pozo de barro	0	0	
25	La alberca 3	10	0	
26	Rincón de la cofradía 9	9	0	
27	Huerta Cerro colorado	12	0	
28	Huerta Dominguito	4	0	
29	Hacienda de Sta. Catarina	15	0	
30	Huerta Huisicho	33	2	A30-7, A30-33
<b>TOTAL</b>		<b>541</b>	<b>20</b>	



## 8.6. Co-cultivo *in vitro* de planta-bacteria

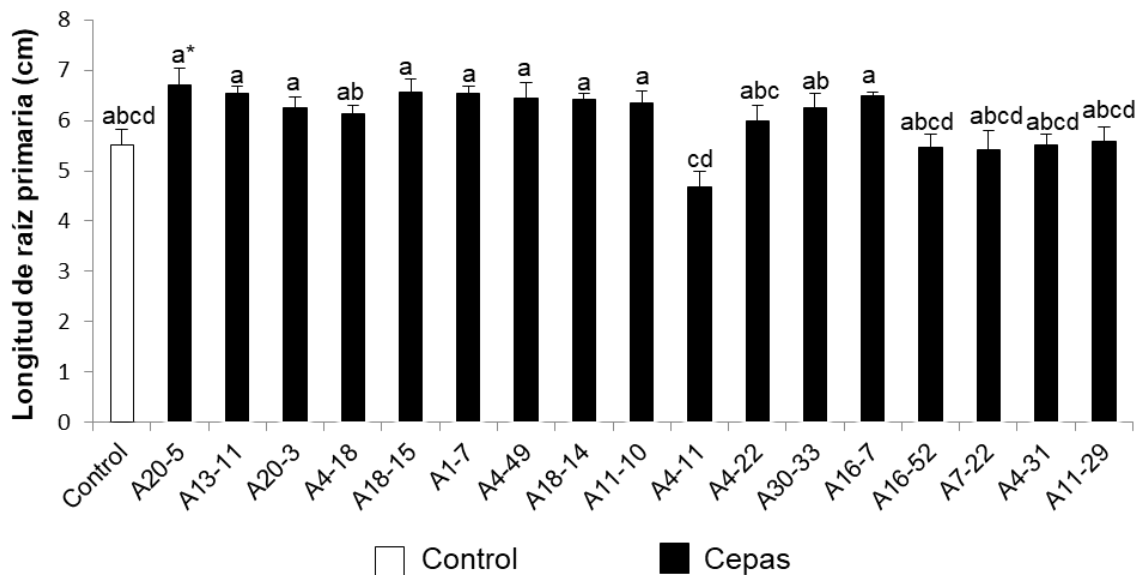
Las bacterias que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal en la rizósfera, son conocidas como PGPR; en este experimento se investigó la capacidad que tienen las Actinobacterias aisladas de la rizósfera de *Persea americana* para inducir cambios fenotípicos en *Arabidopsis* en co-cultivo de contacto directo planta-bacteria, los ensayos se llevaron a cabo por triplicado co-inoculando cada bacteria en placas de Petri conteniendo MS 0.2x, transfiriendo las plántulas con 7 ddg (días después de la germinación) en contacto directo con la bacteria y evaluando la arquitectura radicular de la planta a los 7 ddi (días después de la interacción planta-bacteria). Se utilizó *Arabidopsis thaliana* al ser un organismo modelo para el estudio de procesos de desarrollo post-embriionario por su buen tamaño, simplicidad en el tejido radicular y la posibilidad de crecerla “*in vitro*”.

Los resultados indican que de las 20 cepas seleccionadas para trabajar, solo 3 cepas mostraron un efecto represor (Fig. 22) y 17 cepas mostraron un efecto promotor (Fig. 18), induciendo cambios fenotípicos benéficos en *Arabidopsis*, incrementando la longitud de la raíz primaria, el número de las raíces laterales y la densidad de las raíces laterales, asimismo, en la parte aérea hubo una estimulación en el crecimiento del follaje. Las plántulas que crecieron en condiciones control, sin ser inoculadas con las bacterias, en promedio presentaron una longitud de la raíz primaria de 5.5 cm con 4 raíces laterales. El análisis estadístico evaluó las diferencias en las respuestas de crecimiento y desarrollo de la raíz, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza para establecer si hay diferencias significativas entre las medias del tratamiento con respecto al control de acuerdo a los métodos de Dunnett y Tukey. Se mostraron con distintas letras, las que indican la agrupación de similitudes y diferencias que existen entre los microorganismos con una alta significancia estadística en la prueba de Tukey y para la prueba de Dunnett se marcaron con un (\*) los valores con diferencias significativas a 5 % ( $p < 0.05$ ).



**Figura 18. Inoculación de Actinobacterias que promueven el crecimiento vegetal.** Cada experimento fue realizado por triplicado, se muestra placas representativas del co-cultivo. a) Plántulas control crecidas en medio MS 0.2x, b-q) Co-cultivo con plantas con inóculo de actinobacterias en un periodo de interacción de 7 días.

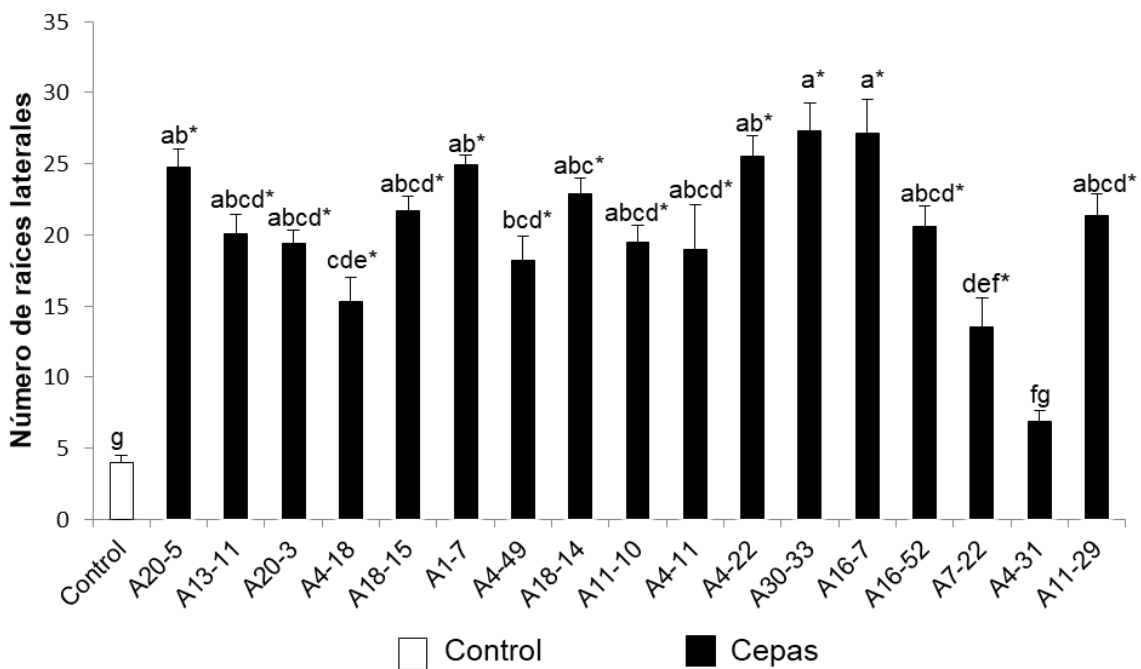
Al observar la gráfica de la figura 19, las cuales muestra los co-cultivos de contacto directo planta-bacteria de las 17 cepas, se destacan las plántulas inoculadas con la cepa A20-5, quienes mostraron un mayor efecto estimulador ya que aumentó sobresalientemente la longitud de la raíz primaria de acuerdo al método de Dunnett el cual muestra diferencias significativas con un p-valor ( $<0.05$ ), mientras que las plántulas inoculadas con las cepas A16-52, A7-22, A4-31, A11-29 (Fig. 18ñ-q) no mostraron cambios significativos en la longitud de la raíz primaria teniendo valores iguales al control. De acuerdo al análisis estadístico y las plántulas inoculadas con la cepa A4-11 reprimió un 15% el crecimiento de la raíz primaria al ser comparada con respecto al control teniendo un p-valor mayor a 0.05 (Fig. 19).



**Figura 19. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de *Arabidopsis thaliana*.** Longitud de la raíz primaria. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las letras y (\*) corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey y Dunnett ( $p < 0.05$ ). Barra de escala 1 cm.

Los co-cultivos de contacto directo planta-bacteria de las 17 cepas mostraron un aumento sobresaliente en el número de raíces laterales (Fig. 18). En la prueba de

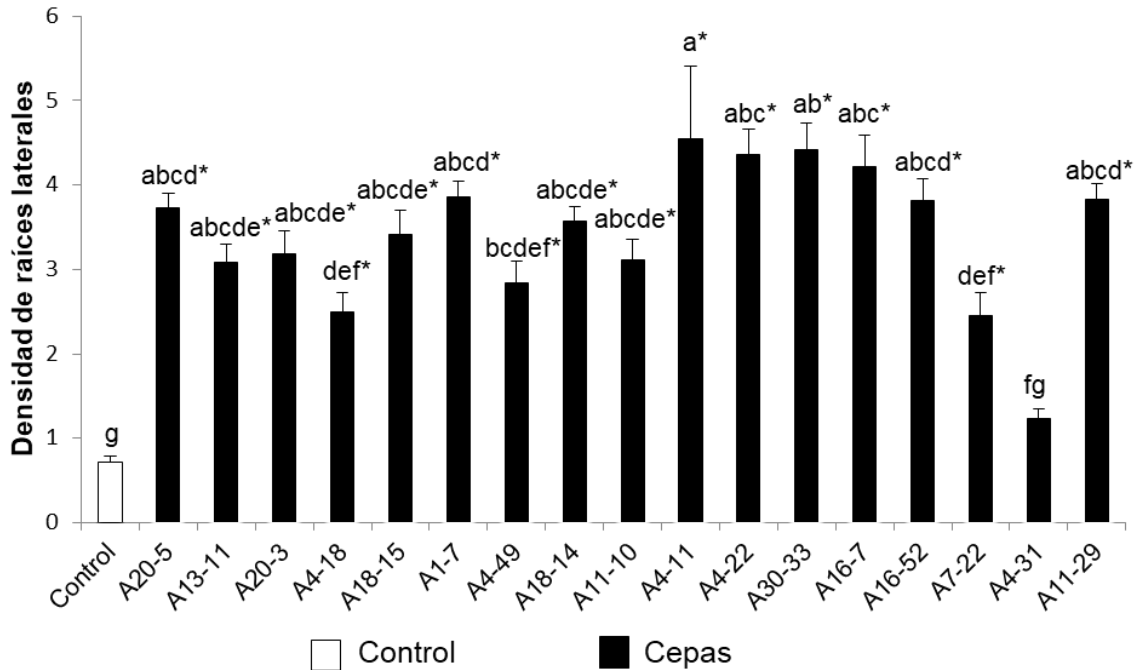
Dunnnett nos muestra diferencias significativas con valores de probabilidad menor a 0.05, en 16 cepas, la A4-31 fue la única cepa que tiene un valor mayor a ( $p < 0.05$ ). Para la prueba de Tukey las plántulas inoculadas con las cepas A30-33 y A16-7 (Fig. 18m-n) mostraron un aumento significativo de 581 % en el número de raíces laterales, teniendo medias con diferencias significativas con respecto al control, así como las plántulas inoculadas con la cepa A18-15, A11-29, A16-52, A13-11, A11-10, A20-3 y A4-11 mostraron similitudes entre ellas de acuerdo a la misma prueba.



**Figura 20. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre el número de raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*.** Número de raíces laterales. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las letras y (\*) corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey y Dunnnett ( $p < 0.05$ ). Barra de escala 1 cm.

En tanto la densidad de las raíces laterales de las plántulas inoculadas con la cepa A4-11, mostraron una media diferente con respecto al control de acuerdo a la prueba de Tukey. La prueba de Dunnnett nos muestra diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), en 16 cepas, de estas mostraron un aumento sobresaliente de 509 % en

las plantas inoculadas con las cepas A4-11, A30-33, A4-22, A16-7 (Fig. 18k-n) (Fig. 21).



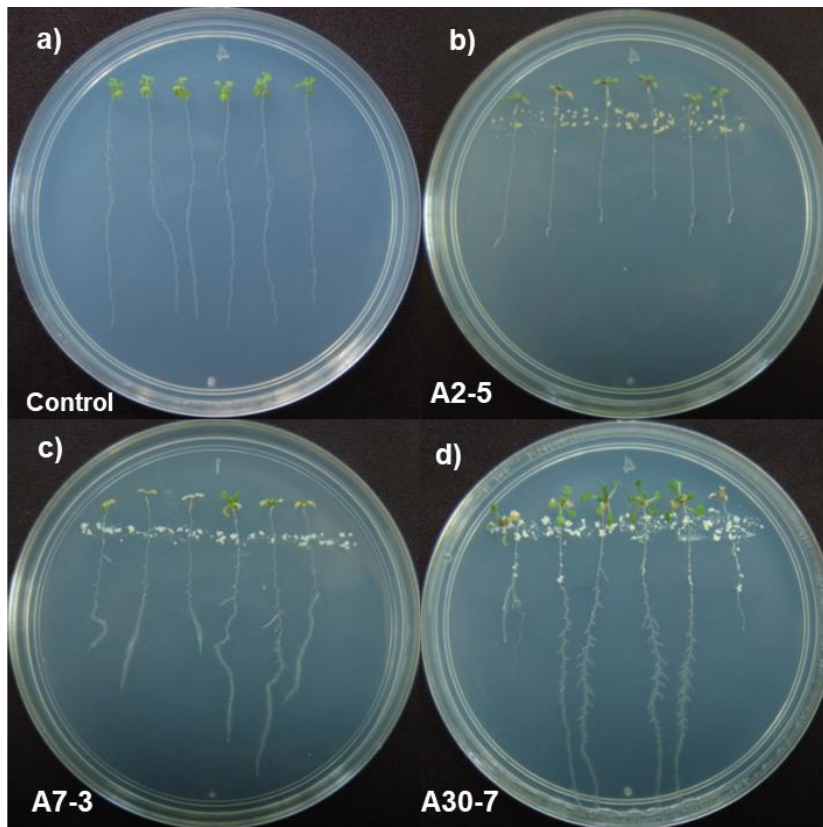
**Figura 21. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la densidad de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*.** Densidad de las raíces laterales. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las letras y (\*) corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey y Dunnett ( $p < 0.05$ ). Barra de escala 1 cm.

En comparación con las plantas control, las 17 cepas que promovieron el crecimiento vegetal en *Arabidopsis* por contacto directo, solo 12 de las cepas mostraron un aumento significativo de 16 % en el crecimiento de la raíz primaria que nos indica que hubo una mayor elongación de las células o una actividad mitótica aumentada; sin embargo, los 17 tratamientos incrementaron el número y densidad de las raíces laterales, esta modificación en su arquitectura radical representa una mejoría para la planta, ya que aumenta la exploración del suelo, anclaje, facilitando la adquisición de agua y nutrientes vitales (Martínez-Trujillo *et al.*, 2013). Al mismo tiempo, hubo un aumento significativo en el follaje: cotiledones y hojas verdaderas de gran tamaño con una mayor pigmentación verde, con estructuras de hipocótilo y epicótilo más largas, en comparación del

control que mostraron un follaje pequeño y estructuras cortas (Fig. 30). Además de mostrar un efecto promotor, las plántulas resistieron la carga bacteriana sin mostrar efecto represor en el crecimiento del follaje y algunas actinobacterias colonizaron el sistema radical sin mostrar un efecto represor en el crecimiento radical.

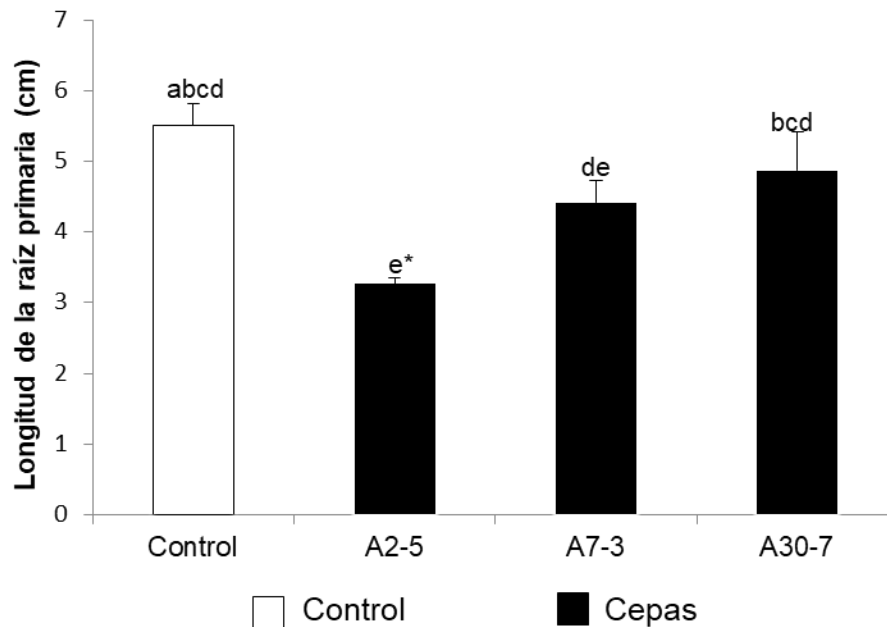
### 8.6.1. La inoculación de algunas actinobacterias que reprimen el crecimiento vegetal

Por otra parte, tres de las cepas A2.5, A7-3 y A30-7 aisladas de la rizósfera de *Persea americana* al estar en contacto directo con *Arabidopsis thaliana* mostraron un efecto contrario, reprimieron el crecimiento vegetal y algunas mostraron cambios en la pigmentación de los follajes como se observa en la figura 22.



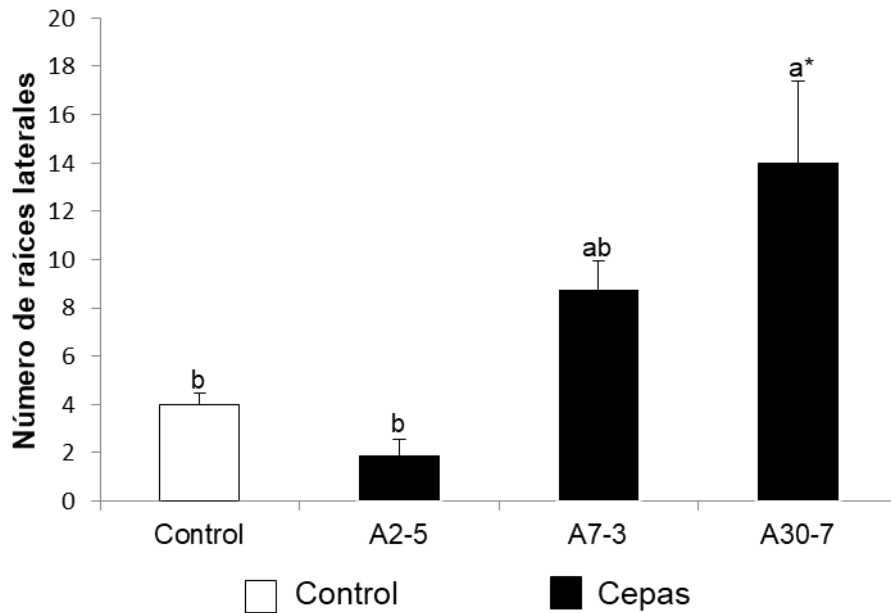
**Figura 22. La inoculación de actinobacterias que reprimen el crecimiento.** a) Plántulas control crecidas en medio MS 0.2x. b-d) Co-cultivo de plántulas con inóculo de actinobacterias en un período de interacción de 7 días. Se analizaron 6 plantas por tratamiento por triplicado.

Las cepas A2-5, A7-3 y A30-7 reprimieron el crecimiento de la raíz primaria, teniendo medias por debajo del control según la prueba de Tukey. La cepa A2-5 mostró un efecto represor sobresaliente en el crecimiento, obteniendo valores por debajo del control y mostrando una pigmentación café en el follaje (Fig. 22a), también reprimió un 40 % el crecimiento de la raíz primaria, mostrando diferencias significativas de acuerdo a las prueba de Dunnett (Fig. 23).



**Figura 23. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de *Arabidopsis thaliana*.** Longitud de la raíz primaria. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las letras y (\*) corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey y Dunnett ( $p < 0.05$ ). Barra de escala 1 cm.

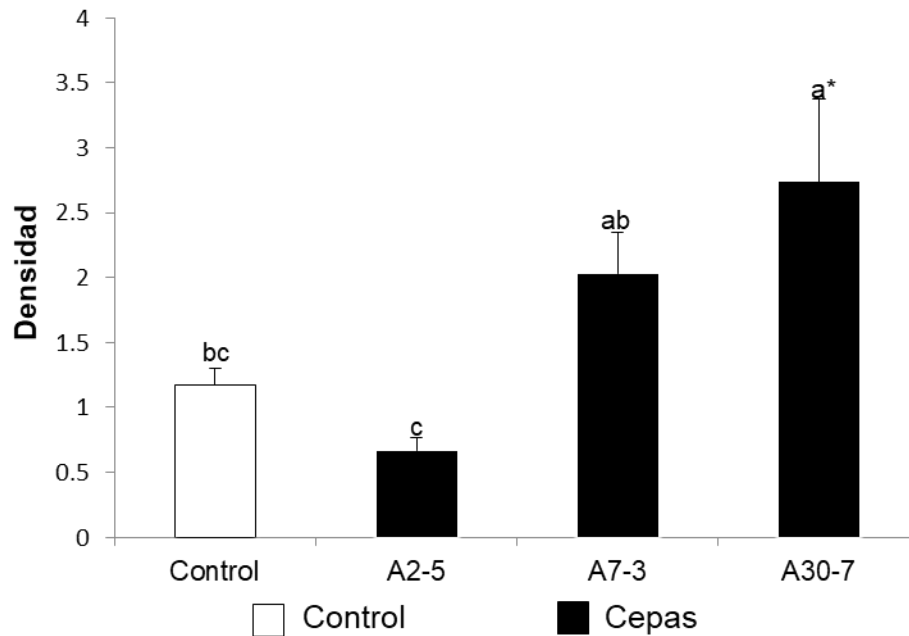
Para el número de raíces laterales solo se obtuvo represión al inocular la cepa A2-5 respecto al control de acuerdo a las pruebas de Dunnett y Tukey (Fig. 25). La cepa A30-7 mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la prueba de Dunnett, teniendo un aumento del 250 % en el número de las raíces laterales (Fig. 25). A pesar de que aumentó el número de raíces laterales, las cepas A7-3 y A30-7 fueron consideradas represoras por la modificación que presentan en la arquitectura de los follajes: tamaño pequeño y pigmentación café (Fig. 22 c, d).



**Figura 24. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de *Arabidopsis thaliana*.** Número de raíces laterales. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las letras y (\*) corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey y Dunnett ( $p < 0.05$ ). Barra de escala 1 cm.

Asimismo, para la densidad de las raíces laterales de acuerdo al análisis estadístico de Dunnett y Tukey, donde se muestra una diferencia significativa de p-valor de 0.0005 en el co-cultivo de contacto directo, la cepa A30-7 aumentó 3 veces su densidad.





**Figura 25. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura radical de *Arabidopsis thaliana*.** Densidad de las raíces laterales. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las letras y (\*) corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey y Dunnett ( $p < 0.05$ ). Barra de escala 1 cm.

Para conocer a mayor detalle los efectos de las actinobacterias en la arquitectura radical de *Arabidopsis thaliana*, se realizaron porcentajes del promedio de LRP, RL y DRL con respecto al control, como se muestra en la tabla 11.

**Tabla 5. Porcentajes del efecto de las actinobacterias.** Los colores muestran a las cepas sobresalientes: rosa (cepa represora), café y azul (cepas con mayor promoción).

	%LRP	%RL	%DRL
Control	100	100	100
A1-7	118.75	622.91	535.01
A2-5	59.30	47.916	79.66
A4-11	84.87	475	631.05
A4-18	111.34	383.33	346.20
A4-22	108.92	637.5	604.78
A4-31	100.15	170.83	170.46
A4-49	117.09	454.16	393.97
A7-3	80.18	218.75	281.96

A7-22	98.33	337.5	341.61
A11-10	115.27	487.5	432.91
A11-29	101.51	533.33	531.02
A13-11	118.75	502.08	428.37
A16-7	117.85	679.16	585.01
A16-52	99.09	514.58	530.72
A18-14	116.49	572.91	496.49
A18-15	119.06	541.66	473.80
A20-3	113.61	485.41	442.79
A20-5	121.78	618.75	517.77
A30-7	88.35	350	397.60
A30-33	113.46	683.33	614.64

Observando la tabla, los porcentajes marcados con color café muestran a las cepas con un efecto sobresaliente en la promoción del crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis*, siendo de las cepas más destacadas: la A20-5 para LRP, la A30-33 para RL y la A4-11 para la DRL. Los porcentajes marcados de color azul muestran a las cepas con efectos significativos y la de color rosa muestra a la cepa con efecto represor con valores por debajo del control. El co-cultivo con las actinobacterias nos dio a conocer los efectos que tienen en contacto directo con un modelo *“in vitro”* y la diversidad que se encuentra habitando en la rizósfera. En tal sentido que, del 100 % de las cepas trabajadas, solo el 85% tiene efecto promotor y por el contrario el 15 % mostró efecto represor.

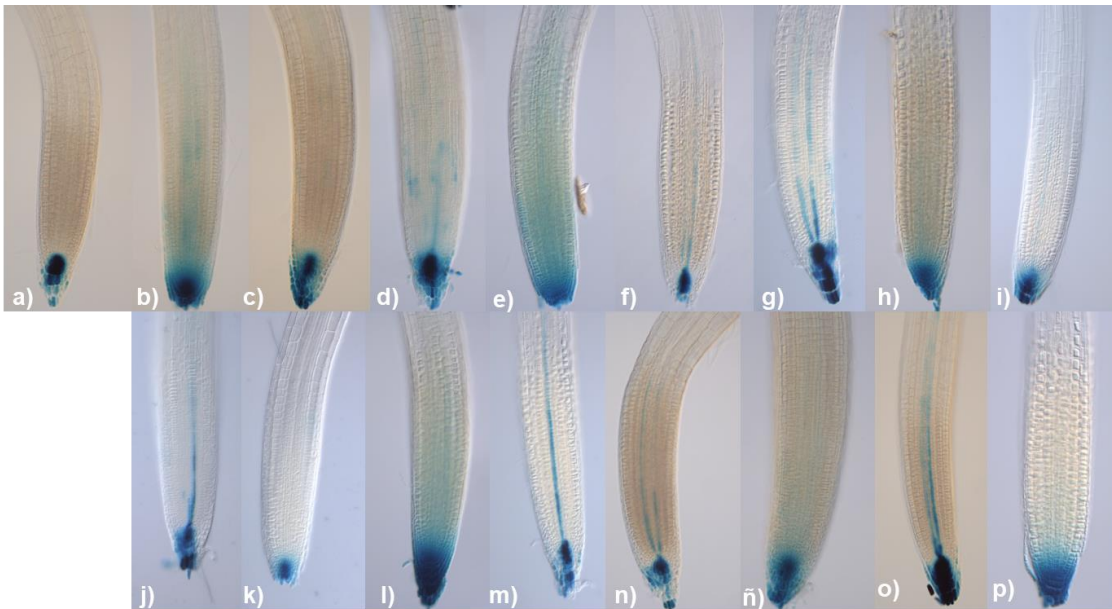
### 8.6.2. Mecanismo dependiente de auxinas

Las auxinas son fitohormonas, juegan un papel importante en el crecimiento de las plantas, están involucradas en la formación de raíces laterales y pelos radiculares, son moléculas pequeñas que se producen de manera natural en las plantas (Magaña *et al.*, 2015), no obstante es común encontrarlas en bacterias que habitan en la rizósfera (Ortiz-Castro *et al.*, 2012), las auxinas se sintetizan en el

follaje, hojas jóvenes y meristemo de la raíz, se redistribuyen a otros tejidos afectando el desarrollo vegetal (Magaña *et al.*, 2015).

Para determinar si el efecto promotor de las actinobacterias sobre la arquitectura de la raíz es producido por auxinas, se analizó la respuesta auxínica en plantas transgénicas que expresan el marcador inducible *DR5:uidA*.

En la figura 26 se muestra la actividad histoquímica GUS de las plantas transgénicas tratadas con actinobacterias, de las cuales obtuvieron una expresión basal semejante a las plantas sin inocular.



**Figura 26. Expresión de *DR5:uidA* en la punta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* con la inoculación de actinobacterias.** a) Expresión basal de plantas sin inocular, b-p) Expresión de plantas inoculadas con actinobacterias. Barra de escala 100  $\mu$ m

Asimismo, se observó una expresión basal del marcador de auxinas *DR5:uidA* en la parte aérea como se muestra en la figura 27. En comparación con las imágenes de la figura 14 en el apartado de materiales y métodos, donde se observa una

fuerte actividad de GUS en el follaje y la raíz primaria, podemos determinar que las actinobacterias no inducen la expresión del marcador inducible por auxinas, sugiriendo que el mecanismo promotor es independiente de auxinas en las respuestas de crecimiento de *Arabidopsis*. En este contexto, el estímulo puede ser por otra vía como la de las citocininas (Molina-Romero *et al.*, 2015), por la actividad solubilizadora de fósforo (Prieto-Correa, 2012) o por la emisión de compuestos orgánicos volátiles (Jiménez-Vázquez, 2018) que es la más utilizada por las actinobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

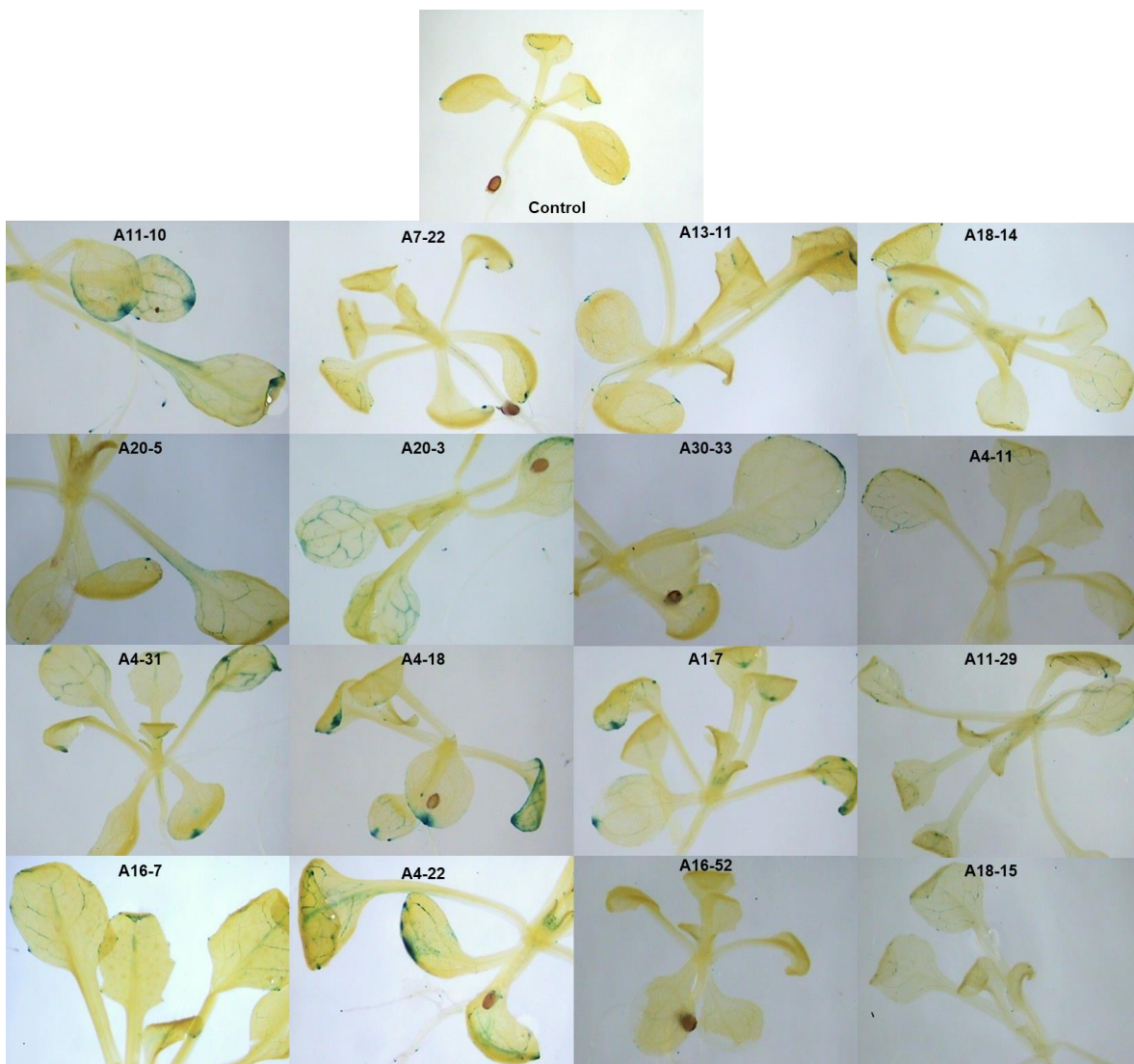


Figura 27. Respuesta de plántulas transgénicas *DR5:uidA* en la interacción con actinobacterias. Expresión en los follajes. Barra de escala 1 mm.

## 9. Conclusiones

1. La rizósfera es una zona que cuenta con una diversidad enorme de microorganismos, en este trabajo, se encontró una gran cantidad de actinobacterias presentes en suelos orgánicos que se recuperaron mediante un protocolo de descontaminación, resultando ser el tratamiento 4 el mejor.
2. El proceso de envejecimiento de las actinobacterias por estrés metabólico, aumento de la población y disminución de nutrientes es útil para que los microorganismos consigan expresar otras características fenotípicas específicas que ayudan como una prueba discriminante en la formación de grupos.
3. Las coincidencias fenotípicas de las cepas aisladas y utilizadas en el presente trabajo, nos mostraron la presencia de actinobacterias autóctonas en la rizósfera de cultivos con manejo orgánico de *Persea americana* del Municipio de Uruapan, Michoacán que tienen la capacidad de colonizar la raíz, contribuyendo entre otras cosas a la mejora del crecimiento de los árboles del cultivo, señalando que aún requieren de confirmación con pruebas moleculares para confirmar su pertenencia al grupo de las actinobacterias, así como su género y especie.
4. Las actinobacterias promueven en su mayoría el crecimiento vegetal y en muy pocos casos lo reprimen, algo que se comprobó en la interacción con *Arabidopsis thaliana* al estar en contacto directo y colonizar la raíz de la planta, lo que nos indica que esta es una de las funciones que cumple este grupo de bacterias en la rizósfera.
5. Se comprueba que, la destacada estimulación del crecimiento vegetal, así como la modificación en la arquitectura del follaje y la raíz por las actinobacterias no es inducido por auxinas, ya que no indujo la expresión del gen regulador de auxinas en la mutante *DR5:uidA* de *Arabidopsis thaliana* empleada en este estudio, por lo que se rechaza la hipótesis planteada y se sugiere el estudio de un mecanismo de regulación de crecimiento distinto.

6. Por las actividades benéficas en la rizósfera que se reportan en la literatura acerca del grupo de las actinobacterias y por los excelentes resultados obtenidos en este estudio con los microorganismos de prueba, se puede concluir que este estudio es la base para el empleo de estos microorganismos en aplicaciones biotecnológicas en el sector agrícola como lo es la formulación de bio-inoculantes, que coadyuven en la mejora de la producción y el crecimiento vegetal, de una forma más amigable al ambiente.

## 10. Expectativas

Michoacán es el estado con mayor superficie plantada de aguacate y al ser un cultivo perenne, que se cultiva todo el año, hace necesario ofrecer al agricultor nuevas estrategias ecológicas prometedoras empleando microorganismos promotores del crecimiento vegetal para así incrementar la producción de sus cultivos, debido a que cada día los suelos son menos fértiles, por ello la importancia de la composición e interacción de las comunidades microbianas en el suelo es irrefutable, de las actinobacterias que habitan, sobreviven y proliferan en la rizósfera de *Persea americana* de cultivo orgánicos del municipio de Uruapan, Michoacán, se espera conocer sus características genotípicas para determinar el género y especie de este grupo de actinobacterias, asimismo analizar el mecanismo en cual están involucradas para la promoción vegetal y al tener en cuenta las actividades que realizan, pueden considerarse como posibles biofertilizantes, fitoestimulantes y agentes biocontrol en insumos biológicos para incrementar el rendimiento de los cultivos y así eliminar el uso de agroquímicos que tienen efectos adversos para los alimentos, ambiente, flora, fauna e incluso para la vida humana, como también la aparición de agentes patógenos resistentes a los pesticidas, asimismo aumentaría las zonas de suelos fértiles teniendo mayor producción repercutiendo en la agricultura y en el medio ambiente.

## 11. Literatura citada

- **Aguilar, M., Melgarejo, L. M., y Romero, M. (2007).** Fitohormonas. *Departamento de biología. Universidad de Colombia. Bogotá.*
- **Alcántar-Rocillo J. J, Anguiano-Contreras J., Coria-Avalos V.B, Hernández-Ruiz G., Ruiz-Corral J.A., (1999).** Áreas potenciales para cultivo del aguacate (Persea americana cv. Hass) en el estado de Michoacán, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 151-154.
- **Anguiano C.J, Alcántar J.J, Toledo B.R, Tapia L. M. y Vidales-Fernández J.A. (2007).** Caracterización edafoclimática del área productora de aguacate de Michoacán, México. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 1, 11.
- **Arcos, J., y Zúñiga, D. (2016).** Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas con capacidad para mejorar la productividad en papa. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 20(1), 18-31.
- **Arenas Guzmán R. (2008).** Micología médica ilustrada (3ra edición). México: *Mc Graw Hill*.
- **Arriaga L. (2009)** Implicaciones del cambio de uso de suelo en la biodiversidad de los matorrales xerófilos: un enfoque multiescalar. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*, 1, 6-16.
- **Atlas Agroalimentario. (2017).** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Available at: <https://www.gob.mx/siap/videos/atlas-agroalimentario-2017-133699?idiom=es>



- **Baca Beatriz E., Soto Urzúa L., y Pardo Ruiz Ma. P. A. (2000).** Fijación biológica de nitrógeno. *Ciencia y cultura*, 7, 43-49.
- **Bakker A. H. M. Peter, Berendsen Roeland L., Doornbos Rogier F., Wintermans C. A. Paul, and Pieterse M. J. Corné. (2013).** The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4, 165.
- **Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., and van Wezel, G. P. (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(1), 1-43.
- **Bautista, L. X. C., & Gallardo, I. R. (2008).** Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. *Pontificia Universidad Javeriana*.
- **Beltrán Pineda M. E. (2014).** La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 15, 101-113.
- **Benjumbeda Muñoz D. (2017).** Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. *Departamento de Microbiología y Parasitología*, 1, 1-34.
- **Benkova E., y Bielach A. (2010).** Lateral root organogenesis-from cell to organ. *Curret Opinion in Plant Biology*, 13, 677-683.
- **Berendsen Roeland L., Pieterse Corné M.J and Bakker A.H.M Peter. (2012).** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, 8.

- **Bhattacharyya, PN y Jha, DK (2012).** Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR): aparición en la agricultura. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (4), 1327-1350.
- **Bonifaz, A. (2012).** Micología Médica Básica (4ta ed.). México: *Mc Graw Hill*
- **Bravo-Espinoza, M., Sánchez-Pérez, J., Vidales-Fernández, J. A., Sáenz-Reyes, J. T., Chávez-León, J. G., Madrigal-Huendo, S., & Muñoz-Flores, H. J. (2009).** Impactos ambientales y socioeconómicos del cambio de uso del suelo forestal a huertos de aguacate en Michoacán. México City: *INIFAP*.
- **Caballero-Mellado, J. (2006).** Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 154-161.
- **Calvo Vélez, P., Reymundo Meneses, L., y Zúñiga Dávila, D. (2008).** Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 141-148.
- **Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R. (2011).** Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia y tecnología agropecuaria*, 12(2), 159-166
- **Cantero García, I. (2018).** Aislamiento y selección de actinobacterias promotoras del crecimiento vegetal: efecto biofertilizante.
- **Cardona, G., Peña-Venegas, C., y Ruiz-García, M. (2009).** Amazonia colombiana: Abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Rev. Biol. Trop. J. Trop. Biol.*, 57, 1119-1139.

- **Carreño Acuña P. (2018).** El abecedario con que se comunican plantas y bacterias. *CIENCIAMX*, 1.
- **Casanova, F.; Ramírez, L.; Solorio, F. (2007)** Interacciones radiculares en sistemas agroforestales: mecanismos y opciones de manejo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 11, 41-52.
- **Chávez León J. G., y Sánchez Pérez J. de la L. (2009).** Biodiversidad. En impactos ambientales y socioeconómicos del cambio de uso del suelo forestal a huertos de aguacate en Michoacán. (90). México City: *INIFAP*.
- **Chávez-León G. (2012).** Descripción del área. En Impacto del cambio de uso de suelo forestal a huertos de aguacate (102). México City: *INIFAP*.
- **Córdova Domínguez A., Delgado García M., Hernández Castillo Francisco D., González V., Aguilar González Cristóbal N., Rodríguez Herrera R. (2013).** Microorganismos fijadores de nitrógeno: esenciales para la vida. *CienciAcierta*, 36, 1-44.
- **Cussaianoviich, P. (2001).** Una aproximación a la agricultura orgánica. *Agricultura orgánica*, 1, 23-26.
- **Dolan Liam, Janmaat Kees, Willemsen Viola, Linstead Paul, Poethig Scott, Roberts Keith and Scheres Ben. (1993).** Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *The Company of Biologists Limited*, 119, 71-84.
- **Evangelista Martínez Z., Quiñones Aguilar E. E., Rincón Enríquez G. (2017).** Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos

antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21, 39-51.

- **Fernández, M. T., y Rodríguez, H. (2005)** El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 27-34.
- **Franco-Correa M., y Chavarro-Anzola V. (2016)**. Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. En *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications* (337). *Croatia: Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang*.
- **Franco Correa, M. (2008)**. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas.
- **Franco-Correa M. (2009)**. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Rev. Perú. Biol*, 16, 239-242.
- **François Mas J., Lemoine-Rodríguez R., González R., López-Sánchez J., Piña-Garduño A., y Herrera-Flores E. (2017)**. Evaluación de las tasas de deforestación en Michoacán a escala detallada mediante un método híbrido de clasificación de imágenes SPOT. *Madera y Bosques*, 23, 2: 119-131. doi: 10.21829/myb.2017.2321472
- **Gómez, S. P. M., Berdugo, S. E. B., & Valencia, C. M. (2017)**. Bioprospección de hongos micorrízicos arbusculares como alternativa para el fortalecimiento del cultivo de aguacate (*Persea americana* Miller) en Colombia. *RIAA*, 8(1), 71-79.

- **González, H., y Fuentes, N. (2017).** Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17-31.
- **Goodfellow M. y Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. annual reviews inc. *all rights reserved*, 37, 189-216.
- **Guerra-Sierra, B. E. (2008).** Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Revista Tecnología en Marcha*, 21(1), pág-191.
- **Gutiérrez-Contreras, M., Lara-Chávez, Ma. B. N., Guillén-Andrade, H., ChávezBárceñas, A. T., (2010)** Agroecología de la franja aguacatera en michoacán, México. *Interciencia*, vol. 35, núm. 9, pp. 647-653
- **Gutierrez, R. T., Navarro, C. P., & Canino, N. S. (2003).** Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 30(2), 56.
- **Hartmann A., Rothballer M., y Schmid M. (2007).** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil*, 312, 7-14.
- **Hassan Mohammad K., McInroy John A., y Kloepper Joseph W. (2019).** The Interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: *A review. Agriculture*, 9, 142.
- **Hayakawa, M. (2008).** Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica*, 22(1), 12-19.
- **Hernández, M., García, C., Pascual, J., y Hernández, M. (2005).** Posible efecto fitohormonal de las bacterias fijadoras de nitrógeno. *Revista Agropecuaria*, 870, 62-66

- **Hernández Montiel, L. G., y Escalona Aguilar, M. Á. (2003)** Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR.
- **Herrán, J. A. F., Torres, R. R. S., Martínez, G. E. R., Ruiz, R. M., & Portugal, V. O. (2008).** Importancia de los abonos orgánicos. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 4(1), 57-68.
- **INEGI. (2005).** Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Uruapan, Michoacán de Ocampo. 2019, de INEGI Sitio web: <https://www.inegi.org.mx/temas/usosuelo/>
- **Jiménez Vázquez, K. R. (2018).** Tesis de Licenciatura: “Identificación de *Achromobacter sp.* 5B1 y estudio de su influencia sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, Michoacán. Morelia, Michoacán, México: Facultad de Químico Farmacobiología-UMSNH.
- **Jones D. L., Nguyen C. & Finlay R. D. (2009).** Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant Soil*, 321, 5-33.
- **Krämer, U. (2015).** The natural history of model organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife*, 4, e06100.
- **Kloster N. S., M. P. Azcarate, F. J. Babinec y A. Bono. (2008).** Comparación de técnicas de medición del pH del suelo: pH en pasta de saturación y en relación suelo: agua 1:2,5. *Asociación Argentina Ciencia del Suelo*, 1, 1-6.
- **Kumar, R. R., & Jadeja, V. J. (2016).** Isolation of actinomycetes: A complete approach. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 5, 606-18.

- **Kundan R., Pant G., Jadon N., Agrawal P. K., (2015)** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *Journal of Fertilizers & Pesticides* 6: doi:10.4172/2471-2728.1000155.
- **Lara, C. C., Oviedo, L., y Aleman, A. (2011).** Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. *Ingresar a la revista*, 9(1), 17-23.
- **López Martínez J. D., Díaz Estrada A., Martínez Rubin, E., Valdez Cepeda, R. D. (2001).** Abonos orgánicos y su efecto en propiedades físicas y químicas del suelo y rendimiento en maíz. *Terra Latinoamericana*, 19 (4). 293-299
- **Magaña-Dueñas V., López-Bucio J. y Beltrán-Peña E. (2015).** El transporte de auxinas y su impacto sobre el desarrollo vegetal. *Ciencia Nicolaita*, 64, 22-41.
- **Malamy Jocelyn E. y Benfey Philip N. (1997).** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
- **Martínez-Trujillo M., Solís-Guzmán G., Jiménez-Saragoz J. C., López-Hernández D., Carreón-Abud Y., y Ríos-Chávez P. (2013).** Respuestas morfogénicas de las raíces de *Arabidopsis thaliana* (Magnoliophyta: Brassicales) al estrés de Cr (VI). *Revista Chilena de Historia Natural*, 86, 207-219.
- **Mayz Figueroa J. (2004).** Fijación biológica de nitrógeno. *UDO agrícola*, 4, 1-20

- **McNear Jr., D. H. (2013)** The Rhizosphere - Roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge* 4(3):1
- **Medina Cuevas, H. M., y Evangelista Martínez, Z. (2010)**. Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. *Unacar tecnociencia*, 5, 72-78.
- **Meyerowitz Elliot M. (1987)**. Arabidopsis thaliana. *Annual Reviews Inc. All rights reserved*, 21, 93-111.
- **Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. D. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015)**. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17(2), 24-34.
- **Montiel-Aguirre, G., Krishnamurthy, L., Vázquez-Alarcón, A y Uribe-Gómez, M. (2008)**. Opciones agroforestales para productores de aguacate. *Tierra Latinoamericana*, 26, 85-90.
- **Murashige T., Skoog F., (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- **Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez E., Gallegos-Morales G., Cepeda-Siller M., Landeros-Flores, J., y Flores-Olivas A. (2015)**. Variabilidad patogénica de Phytophthora cinnamomi rands en Persea americana Mill de Michoacán, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(5), 211-215.



- **Ochoa, M. C., Madrigal, R. P., Martínez, M. T., & Carreón, A. (2010).** Plantas, hongos micorrízicos y bacterias su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
- **Ordoñez, J. A., de Jong, B. H., & Maser, O. (2001).** Almacenamiento de carbono en un bosque de *Pinus pseudostrobus* en Nuevo San Juan, Michoacán. *Madera y Bosques*, 7(2), 27-47.
- **Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2015).** Suelos y biodiversidad. 2019, de FAO Sitio web: <http://www.fao.org/3/a-i4551s.pdf>
- **Ortíz-Castro R, Campos García Jesús y López-Bucio J. (2012).** Comunicación planta-bacteria basada en ciclodipeptidos de origen microbiano con actividad auxínica. *Ciencia Nicolaita*, 56, 59-73.
- **Oviedo, M. E. e Iglesias, M. C. (2005).** Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás. Universidad Nacional del nordeste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 53, 1-3.
- **Palaniyandi, SA, Yang, SH, Zhang, L., y Suh, J.-W. (2013)** Efectos de las actinobacterias en la supresión de enfermedades de las plantas y la promoción del crecimiento. *Microbiología Aplicada y Biotecnología*, 97 (22), 9621-9636
- **Panorama Agroalimentario. (2019).** Servicio de Información Agroalimentaria.Pesquera.Availableat:[https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019)
- **Parada R. B., Marguet E. R., y Vallejo M. (2017).** Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad

antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 19, 2.

- **Paredes-Mendoza M., y Espinosa-Victoria D. (2010).** Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28, 61-70.
- **Patiño-Torres C. O., y Sanclemente-Reyes O. E. (2014)** Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10, 288-297
- **Pedraza, R. O., Teixeira, Kátia R.S., Fernández Scavino, A., García de Salamone, I., Baca, B. E., Azcón Rosario B., Vera L.D.; Bonilla, R. (2010)** Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión Corpoica. Ciencia y Tecnología Agorpecuaria*, 11,155-164
- **Pérez Álvarez, S., Ávila Quezada, G., Coto Arbelo, O. (2015)** El aguacatero (*Persea americana* Mill) *Cultivos Tropicales*, vol. 36, núm. 2, pp. 111-123.
- **Pérez Vargas J. García Esquivel. G y Esparza García F., (2002).** Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva*, 21, 297-300.
- **Petricka J. J., Winter C. M., Benfey P. N., (2012)** Control of Arabidopsis root development. *Annual Review of Plant Biology* 63: 563-590.
- **Prescott Lansing M, Harley John P y Klein Donald A. (2002).** Microbiología. Madrid: *Mcgraw-Hill-Interamericana*.

- **Ramos E., Bonilla B., y Aguilar M. (2018).** Interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Revista de ciencia tecnología sociedad y ambiente*, 10 (15), 23-31.
- **Ranjan Kumar R. y J. Jadeja Vasantba. (2016).** Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 5, 606-618.
- **Rebolledo. R, A., y Romero, M. A. (2011).** Avances en investigación sobre el comportamiento productivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) bajo condiciones subtropicales Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol. 12, núm. 2, pp. 113-120.
- **Reyes Tena A., Rincón Enríquez G., Evangelista Martínez Z., Quiñones Aguilar E., López Pérez L. (2015).** Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista digital universitaria*, 16, 1607-6079.
- **Rojas-Contreras A., Rodríguez Dorantes A. M., Montes Villafán S., y Pérez Jiménez S. (2010).** Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*, 29, 131-147.
- **Rubí-Arriaga, M.; Franco-Malvaíz, A. L.; Rebollar-Rebollar, S.; Bobadilla-Soto, E. E.; Martínez-De La Cruz, I.; Siles-Hernández, Y. (2013)** Situación actual del cultivo del aguacate (*Persea americana* mill.) en el estado de México, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 16, núm. 1, pp. 93-101.

- **Rueda Puente, E. O., López Elías, J., Huez López, M. A., y Martínez López, J. R. (2012).** Aplicaciones biotecnológicas de la promoción de crecimiento vegetal: microorganismos de rizosfera y rizoplaneo de zonas áridas. *XV Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas*, 1, 51-55.
- **SAGARPA (2011).** Monografía del Aguacate. Agosto, 2019, de La Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios.
- **Santillana N., Arellano C., y Zúñiga D. (2005).** Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4, 1-2.
- **Schaffer B., y Whinley AW. (2007).** Fisiología ambiental. El Palto. Botánica, Producción y Usos. *Ediciones Universitarias de Valparaíso*. Chile. pp. 133-154.
- **Scheres B., Benfey P., Dolan L., (2002)** Root development. The Arabidopsis Book doi: 10.1199/tab.0101.
- **Secretaría de Economía. (2012).** Mercado del aguacate. En monografía del sector aguacate en México: situación actual y oportunidades de mercado (21). México: *Dirección general de industrias básicas*.
- **Shivlata, L., & Satyanarayana, T. (2017).** Actinobacteria in Agricultural and Environmental Sustainability. *Agro-Environmental Sustainability*, 173–218.
- **Solans M., y Vobis G. (2003).** Actinomicetes saprofitos asociados a la rizósfera y rizoplaneo de *Discaria trinervis*. *Ecología Austral*, 13, 97-107.
- **Soler Arango, J., Posada Uribe, L. F., y Pérez Naranjo, J. C. (2012)** Distribución Diferencial de Bacterias con Potencial Biocontrolador de

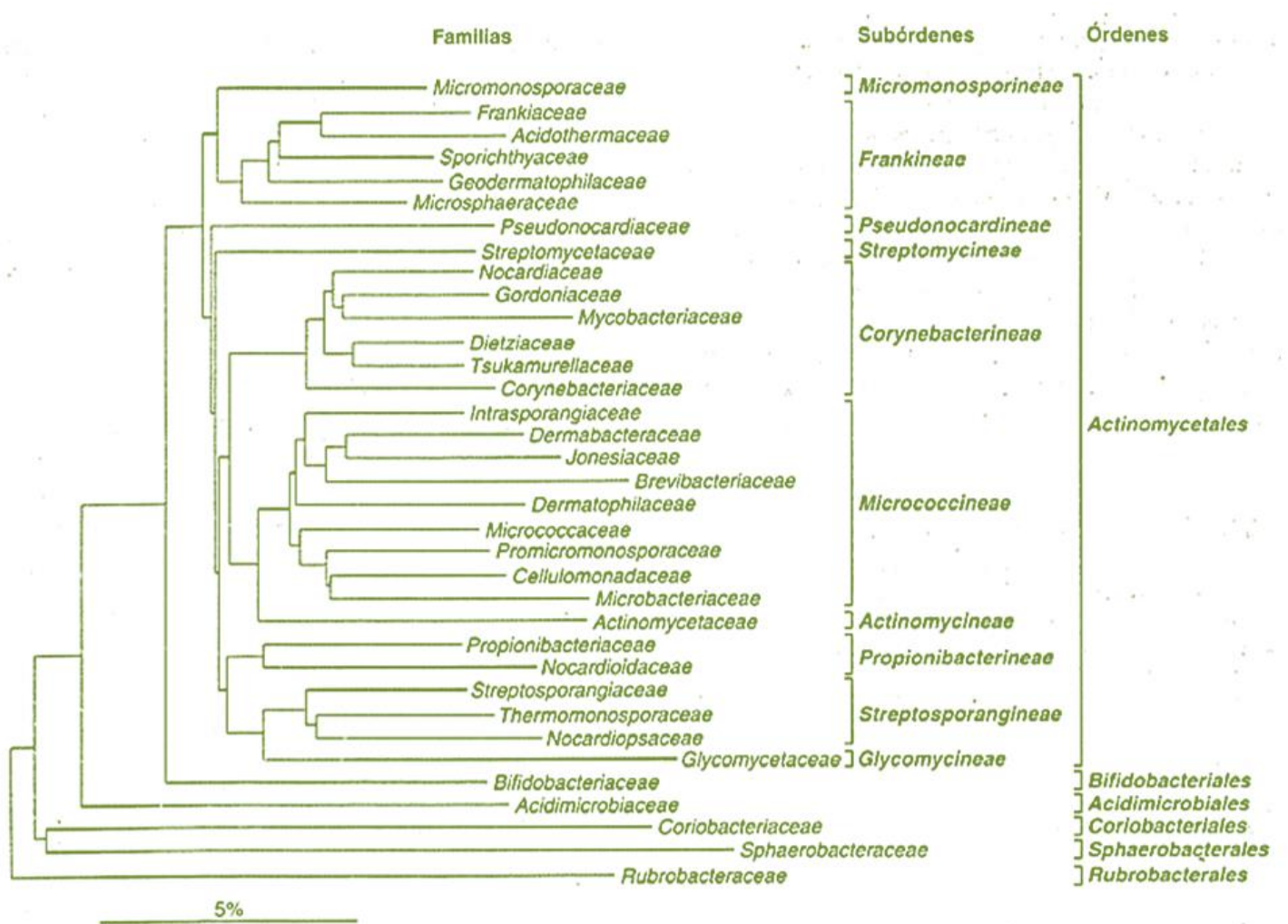
Spongospora subterranea en plantas de papa (*Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro). *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 65, núm. 1, 6337-6348

- **Spaepen S., Bossuyt S., Engelen K., Marchal K., y Vanderleyden Jos. (2014).** Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*, 210, 850-861.
- **Strap JL (2011).** Actinobacteria-Plant Interactions: A boon to agriculture. En: Maheshwari D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Springer, Berlín, Heidelberg
- **Ulmasov T, Murfett J, Hagen G y Guilfoyle T (1997).** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963-1971.
- **Vega-Celedón P., Canchignia Martínez H., González M., y Seeger M. (2016).** Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos tropicales*, 37, 33-39.
- **Verbon Eline H., y Liberman Louisa M. (2016).** Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in Plant Science*, 20, 12.
- **Vidales-Fernández J. A. (2009).** Contaminación por agroquímicos. En Impactos ambientales y socioeconómicos del cambio de uso del suelo forestal a huertos de aguacate en Michoacán. (90). México City: *INIFAP*.

- **Villanueva Tomas L., y Zepeda Anaya J. A. (2016).** La producción de aguacate en el estado de Michoacán y sus efectos en los índices de pobreza, el cambio del uso de suelo y la migración. *Revista Mexicana Sobre Desarrollo Local*, 2, 1-12.

## 12. Anexos

**Anexo 1.** Relaciones taxonómicas y filogenéticas de la clase Actinobacteria de Prescott (2002).



**Anexo 2.** Clasificación de Actinomicetos en base a Goodfellow y Williams en 1983.

<b>Grupos agregados</b>	<b>Características</b>	<b>Género</b>
Actinobacteria	Aeróbico, facultativamente anaerobio o anaerobio; ocurren como bacilos o cocos o forman filamentos ramificados que se fragmentan; sin micelio aéreo; composición de pared variable pero incluye quimiotipos I, II, V, VI, VII y VIII	<i>Actinomyces, Agromyces, Arachnia, Arcanobacterium, Arthrobacter, Brevibacterium, Cellulomonas, Curtobacterium, Microbacterium, Micrococcus. Oerskovia. Promicromonospora. Renibacterium. Rothi</i>
Actinoplanetes	Esporoactinomicetos aeróbicos; las esporas no móviles pueden estar encerradas dentro de las vesículas; sin micelio aéreo; quimiotipo de pared II; Los hidrolizados de todo el organismo contienen arabinosa y xilosa.	<i>Actinoplanes. Amorphosporangium. Ampullariella. Dactylosporangium. Micromonospora. Pilimelia</i>
Maduromycetes	Esporoactinomicetos aeróbicos; cadenas simples o cortas de esporas pueden ser transportadas en el micelio aéreo o formadas dentro de las vesículas; esporas móviles o no móviles; quimiotipo de pared III; Los hidrolizados de todo el organismo contienen madurosa (3-O-metil-D-galactosa)	<i>Actinomadura, Microbispora. Microtetraspora. Planobispora. Planomonospora. Spirillospora. Streptosporangium</i>
Micropolysporas	Esporoactinomicetos aeróbicos; cadenas simples o cortas de esporas pueden estar presentes en el sustrato y	<i>Actinopolyspora. Micropolyspora. Pseudonocardia, Saccharomonospora. Saccharopolyspora</i>



	<p>el micelio aéreo; quimiotipo de pared IV; No contienen ácidos micólicos.</p>	
Multilocular	<p>Aerobio a facultativamente anaerobio; el micelio se divide en todos los planos; sin hifas aéreas; quimiotipo de pared III.</p>	<p><i>Dermatophilus. Frankia. Geodermatophilus</i></p>
Nocardioform	<p>Aeróbico, puede ser ácido-alcohol rápido; ocurren como barras, cocos y filamentos ramificados o forman sustrato y micelio aéreo que fragmenta; quimiotipo de pared IV; Contiene ácidos micólicos.</p>	<p><i>Caseobacter. Corynebacterium. Mycobacterium. Nocardia. Rhodococcus</i></p>
Streptomyces	<p>Esporoactinomicetos aeróbicos; formar un sustrato ampliamente ramificado y micelio aéreo; esporas transportadas en el micelio aéreo, ocasionalmente en el micelio sustrato; quimiotipo de pared I.</p>	<p><i>Intrasporangium, Kineosporia, Kitasatoa, Nocardioides, Sporichthya, Streptomyces, Streptoverticillium</i></p>
Thermomonosporas	<p>Esporoactinomicetos aeróbicos; forman un sustrato ampliamente ramificado y micelio aéreo, los cuales pueden transportar esporas o cadenas de esporas; esporas móviles o no móviles; quimiotipo de pared III.</p>	<p><i>Actinosynnema. Nocardiosis. Streptoalloteichus. Thermomonospora</i></p>