



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

Caracterización de Actinobacterias de zonas
áridas y su efecto promotor de crecimiento en
Arabidopsis thaliana y *Zea mays*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

LIC. EN BIOL. JUAN MANUEL GARCÍA PORTALES.

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ KESSLER

CO-DIRECTOR:

DR. PABLO DELGADO SÁNCHEZ



SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

22 de Julio del año 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

Caracterización de Actinobacterias de zonas
áridas y su efecto promotor de crecimiento en
Arabidopsis thaliana y *Zea mays*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

LIC. EN BIOL. JUAN MANUEL GARCÍA PORTALES.

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ KESSLER

CO-DIRECTOR:

DR. PABLO DELGADO SÁNCHEZ

SINODALES:

PRESIDENTE:

Dra. Margarita Rodríguez Y Domínguez Kessler

SECRETARIO:

Dr. Pablo Delgado Sánchez

VOCAL:

Dra. Catalina Arenas Huertero



SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P

Julio del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS
Av. Chapultepec #1570 Priv. Pedregal
San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78295, México



San Luis Potosí, SLP., 8 de julio de 2021.

Comité Académico del Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

P R E S E N T E.-

Por este conducto, hacemos de su conocimiento que la Tesis llevada a cabo por el **Biol. Juan Manuel García Portales**, estudiante de maestría del Programa de Posgrado en Ciencias en Bioprocesos, cuyo título es: **“Caracterización de actinobacterias de zonas áridas y su efecto promotor de crecimiento en *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*”**, ha sido concluida y aprobada por su comité tutorial para dar inicio a los trámites de titulación, la cual tendrá lugar el 22 de julio de 2021 a las 13:00 h en el Auditorio Chico (G203) de la Facultad de Ciencias Químicas.

Atentamente.-

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler (Fac. de Ciencias, UASLP) _____

Co-Directora de Tesis

Dr. Pablo Delgado Sánchez (Fac. de Agronomía, UASLP) _____

Co-Director de Tesis

Dra. Catalina Arenas Huertero (Fac. de Ciencias, UASLP) _____

Asesor

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio de Interacción Planta - Microorganismo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la co-dirección de la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y el Dr. Pablo Delgado Sánchez.

Se agradece:

- El financiamiento obtenido por parte del proyecto FORDECYT, Titulado: Evaluación y optimización de los recursos hídricos en el nexo agricultura-sociedad-industria en tres zonas del país: árida, bajío y tropical, hacia un modelo de transferencia y política pública, con número de registro: 297525.
- El apoyo por la beca recibida durante mis estudios de maestría por parte del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), beca – tesis (CVU / Becario; 886614 / 704255).

“El programa de Maestría en Ciencias de Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT con registro 000588 (nivel consolidado).



Caracterización de Actinobacterias de zonas áridas y su efecto promotor de crecimiento en *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* por García Portales Juan Manuel se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Dedicatoria.

A todos los seres vivos...

Agradecimientos personales.

Agradezco en primer lugar a la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler, por su apoyo, enseñanzas y sus buenos consejos.

Agradezco a mis sinodales, el Dr. Pablo Delgado Sánchez y a la Dra. Catalina Arenas Huertero por llevar a cabo la revisión del trabajo y ayudarme a mejorar mi manera de redactar.

A mi familia: a mis padres y hermanos, Rufino García Guzmán y María Mercedes Portales Ramos, Valeria García Portales, Jesús Alfredo García Portales y mi novia Alma Liliana Espinosa Puente por su apoyo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Nasho Jasso, por ayudarme cuando tengo alguna duda y a tirarle carrilla a la Laurita cuando más lo necesito. A todos los Catalinos: Byanca Nieves, Jesus Nieto, Susana Vargas, Gabriela Rodríguez, al Dany y al Jaime por las risas que dan energía; y otro agradecimiento especial; a Laura Estrada por siempre adaptar sus tiempos a mis tiempos, aunque yo a veces no adapte mis tiempos a los suyos. También agradezco a los Margaritos: Araceli y Mariana por ayudarme cuando me faltaban manos en algunos experimentos, Emmanuel y Capuchino...

Por ultimo a mis mejores amigos, por el simple hecho de ser mis amigos y estar conmigo en las buenas y en las malas, hasta que la muerte nos separe: Alan Araujo Sotelo, Jose García, Uriel Nájera Torres, Jorge Miguel Dueñas Sánchez, Laura Estrada Martínez, Fernando Reynoso García y Samuel Presas Quintana.

ÍNDICE

I. Abreviaturas.	1
II. Resumen.	2
III. Summary.	3
IV. Marco teórico.	4
4.1. <i>Microbiota del suelo.</i>	4
4.2. <i>Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR).</i>	5
4.2.1. Biodisponibilidad de nutrientes.	5
4.2.2. Producción de fitohormonas y otros metabolitos	8
4.2.3. Biorremediación mediada por bacterias	11
4.2.4. Interacción bacteria-planta contra factores de estrés abiótico.	11
4.2.5. Interacción bacteria-planta contra factores de estrés biótico.	16
4.3. <i>Generalidades de las Actinobacterias.</i>	18
4.4. <i>Biofertilizantes.</i>	20
4.4.1. La historia del consumo de fertilizantes en México y el mundo.	20
4.4.2. Fertilizantes químicos.	21
4.4.3. Tipos de biofertilizantes.	23
4.5. <i>Arabidopsis thaliana, un organismo modelo para la caracterización de PGPR.</i>	25
4.6. <i>Zea mays L.</i>	26
V. Justificación.	28
VI. Hipótesis.	28
VII. Objetivos.	29
7.1. <i>Objetivo general.</i>	29
7.2. <i>Objetivos específicos.</i>	29
VIII. Materiales y métodos.	30
8.1. <i>Material biológico.</i>	30
8.1.1. Microorganismos.	30
8.1.2. Material vegetal.	30
8.2. <i>Condiciones de crecimiento y preservación del material biológico.</i>	30
8.3. <i>Identificación de bacterias.</i>	31
8.4. <i>Desinfección de la semilla.</i>	31

8.5.	<i>Preparación del inóculo bacteriano y modo de inoculación.....</i>	32
8.6.	<i>Características de la morfología bacteriana, hemólisis bacteriana y solubilización de fosfatos.</i>	32
8.7.	<i>Evaluación de la promoción de crecimiento y desarrollo en Arabidopsis thaliana ecotipo silvestre Columbia (Col-0).</i>	33
8.8.	<i>Análisis histoquímico.....</i>	34
8.9.	<i>Microscopía óptica.....</i>	34
8.10.	<i>Evaluación de la promoción de crecimiento y desarrollo en Zea mays L.....</i>	34
IX.	Resultados y discusión.....	35
X.	Conclusión.....	36
XI.	Perspectivas.	36
XII.	Bibliografía.....	38
XIII.	Anexos.	53

I. Abreviaturas.

ABA	Ácido abscísico
ABARE	ABA responsive elements
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
APX	Ascorbato peroxidasa
ATP	Adenosín trifosfato
bHLH	Basic helix–loop–helix
CAT	Catalasa
COI	Proteína insensible a la coronatina
CTR1	Constitutive triple response1
DAPG	2,4- diacetilfloroglucinol
dpi	Días post inoculación
DREB	Dehydration-responsive element binding
EIN	Ethylene insensitive
ERF	Factor de transcripción de respuesta a etileno
ETI	Inmunidad mediada por efectores
FAO	Food and Agriculture Organization
FIT	Fe-deficiency-induced-transcription
FRO	Ferric reductase
GPX	Glutati3n peroxidasa
GR	Glutati3n reductasa
GyrB	Gyrase B subunit
HMA	Hongos micorrízicos arbusculares
IAA	Ácido indol-3-acético
IAM	Indol-3-acetamida
IAN	Indol-3-acetonitrilo
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IPA	Indol-3- piruvato
ISR	Resistencia sistémica inducida
LEA	Late embryogenesis abundant
MnSOD	Manganeso superoxido dismutasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHX	Sodium/hidrogen exchanger
NO	Óxido nítrico
OPR	Oxophytodienoic acid reductase
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
POD	Peroxidasa
PTI	Inmunidad mediada por PAMPs
RH	Respuesta hipersensible
ROS	Reactive oxygen species
RpoB	β -subunit of RNA polymerase
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SOD	Superoxido dismutasa
SOS	Salt overly sensitive
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
WRB	World Reference Base for Soil Resources

II. Resumen.

La amplia diversidad y distribución bacteriana en los suelos, desempeña papeles esenciales en los ciclos biogeoquímicos y las funciones de los ecosistemas. Las Actinobacterias son una de las bacterias Gram positivas más diversas e importantes en los suelos, y representan del 10 al 33% de la comunidad bacteriana total. Muchos miembros de las Actinobacterias pueden solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno y producir diferentes compuestos como sideróforos, fitohormonas y antibióticos. Estas características son deseables en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, debido a que mejoran el desarrollo de las plantas, la fotosíntesis y la tolerancia al estrés biótico y abiótico. El presente trabajo describe la identificación molecular y caracterización de cepas bacterianas pertenecientes a suelos áridos del estado de San Luis Potosí. De estas cepas, se seleccionaron siete para evaluar su efecto sobre la promoción del crecimiento vegetal en *Arabidopsis thaliana*, determinando principalmente el peso fresco de la raíz y de la roseta. Además, se realizaron pruebas de solubilización de fosfatos para identificar cepas que favorezcan la nutrición vegetal al incrementar la biodisponibilidad del fosfato y pruebas de hemólisis en agar sangre para identificar cepas inocuas para el ser humano, y de esta manera encontrar candidatos que pudieran ser evaluados en una especie de interés comercial. Se eligieron dos cepas bacterianas (*Streptomyces ambofaciens* y *Streptomyces pratensis*), que mostraron un efecto positivo en *A. thaliana* y se caracterizaron con mayor detalle midiendo diferentes parámetros para evaluar el crecimiento y desarrollo. Para indagar en los mecanismos moleculares de promoción de crecimiento vegetal, se evaluaron líneas reporteras de ciclo celular y de respuesta a auxinas. Finalmente, se realizaron pruebas en maíz para evaluar el potencial que tienen las bacterias seleccionadas para ser aplicadas en la agricultura. Las Actinobacterias, *S. ambofaciens* y *S. pratensis* estimularon el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* de manera positiva en diferentes parámetros evaluados (una mayor densidad de raíces laterales, área de roseta, biomasa y número de hojas); además, en *Zea mays* también se vio estimulado el crecimiento de parte aérea y de raíz. Imágenes de microscopía óptica, mostraron una colonización a lo largo de la raíz, donde se observó una gran cantidad de estructuras miceliales que conviven en armonía con la planta. Ninguna de las bacterias evaluadas tuvo una hemólisis tipo beta, y *S. ambofaciens* demostró su capacidad de solubilización de fosfatos. Finalmente, las diferentes líneas reporteras indicaron una posible participación de las auxinas en los procesos moleculares que desencadenaron estos efectos positivos.

Palabras clave: PGPRs, Actinobacterias, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, promoción de crecimiento.

III. Summary.

The wide bacterial diversity and distribution in the soil, plays essential roles in biogeochemical cycles and ecosystem functions. Actinobacteria are one of the most diverse and important Gram positive bacteria in soil, representing 10 to 33% of the total bacterial community. Many members of the Actinobacteria can solubilize phosphates, fix nitrogen, and produce different compounds such as siderophores, phytohormones, and antibiotics. These characteristics are desirable in plant growth-promoting bacteria (PGPR) because they improve plant development, photosynthetic health, and tolerance to biotic and abiotic stress.

The present work describes the molecular identification and characterization of bacterial strains belonging to arid soils in the state of San Luis Potosí. Of these strains, 7 were selected to evaluate their effect on the promotion of plant growth in *Arabidopsis thaliana*, mainly determining the fresh weight of the root and rosette. In addition, phosphate solubilization tests were carried out to identify strains that favor plant nutrition by increasing the bioavailability of phosphate and hemolysis tests on blood agar to identify inoffensive strains for humans, and thus find candidates that could be evaluated in a species of commercial interest. Two bacterial strains (*Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces pratensis*), which showed a positive effect on *A. thaliana*, were chosen and characterized by measuring different parameters to assess growth and development. To investigate the molecular mechanisms of plant growth promotion, cell cycle reporter lines and response to auxins were evaluated. Finally, tests were carried out on corn to evaluate the potential of the selected bacteria to be applied in agriculture.

Actinobacteria, *S. ambofaciens* and *S. pratensis* stimulated the growth and development of *A. thaliana* in a positive way in different evaluated parameters (a higher density of lateral roots, rosette area, biomass and number of leaves). Furthermore, in *Zea mays* the growth of the aerial part and the root was also stimulated. Optical microscopy images showed colonization along the root, where a large number of mycelial structures that coexist in harmony with the plant were observed. None of the bacteria evaluated had a beta-type hemolysis, and *S. ambofaciens* demonstrated its ability to solubilize phosphates. Finally, the different reporter lines indicated a possible participation of auxins in the molecular processes that triggered these positive effects.

Key words: PGPRs, Actinobacterias, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, growth promotion.

IV. Marco teórico.

4.1. Microbiota del suelo.

Según la WRB (World Reference Base for Soil Resources) de 1998, el suelo se define como:

"... un cuerpo natural continuo el cual tiene tres dimensiones espaciales y una temporal. Las tres características principales que rigen al suelo son:

- *Está formado por constituyentes minerales y orgánicos e incluye fases sólida, líquida y gaseosa.*
- *Los constituyentes están organizados en estructuras, específicas para el medio edafológico. Estas estructuras constituyen el aspecto morfológico de la cubierta del suelo, equivalente a la anatomía de un ser vivo. Son el resultado de la historia de la cobertura del suelo y de sus dinámicas y propiedades actuales. El estudio de las estructuras de la cubierta del suelo facilita la percepción de sus propiedades físicas, químicas y biológicas; esto permite comprender el pasado y el presente del suelo y predecir su futuro.*
- *El suelo está en constante evolución, dando así al suelo su cuarta dimensión, el tiempo."*

El suelo es la superficie de la corteza terrestre en donde interactúan una gran cantidad de especies diferentes de organismos. Plantas, animales y microorganismos del suelo forman este ecosistema altamente complejo. El crecimiento y desarrollo de las plantas depende en gran medida de las interacciones que se dan en el suelo (por ejemplo; simbiosis, mutualismo o parasitismo) y el entendimiento de estas relaciones es de gran importancia para mejorar la agricultura.

La diversidad de especies que participan en el equilibrio de este ecosistema e independientemente del reino al que pertenezcan es amplia, muchas especies tienen un papel muy importante para el equilibrio ecológico y, por ende, son utilizados en aplicaciones para optimizar la agricultura. Por ejemplo, del reino Animalia, uno de los más importantes es la lombriz de tierra, que acelera la descomposición de la materia orgánica, el cual es un proceso biológico crucial para el reciclado de nutrientes; es capaz de procesar hasta 250 toneladas del suelo al año por hectárea y provoca efectos positivos sobre las comunidades vegetales (Domínguez *et al.*, 2009). Por otro lado, los microorganismos del suelo como protozoos, hongos y bacterias también desempeñan papeles

importantes para la vida en este ecosistema ya que muchas especies vegetales dependen de las interacciones que establecen (Rousk y Bengtson, 2014). De los microorganismos existentes en el suelo, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR, por sus siglas en inglés), son a los cuales se les ha descrito una mayor cantidad de estrategias que favorecen el crecimiento de las plantas, razón por la cual son utilizados para realizar biofertilizantes. Los HMA dependen totalmente de la planta para obtener carbohidratos y ayudan a la absorción de diferentes minerales como N, K, Ca, Mg, Fe, Mn, así como el fósforo que se considera un nutriente limitante en la mayoría de los suelos (Abud *et al.*, 2010).

Las comunidades bacterianas tienen una amplia diversidad y distribución en la mayoría de los ecosistemas y desempeñan papeles biológicos importantes en todos los ciclos biogeoquímicos, en particular en los ciclos del nitrógeno, del azufre y del fósforo, cruciales para el bienestar de todo nicho ecológico (Grossman *et al.*, 2009; Rousk y Bengtson, 2014). Se estima una concentración bacteriana aproximada de 10^9 células/ gramo de suelo y una amplia variedad de especies cercana a 10^4 especies diferentes por gramo de suelo (Cavaletti *et al.*, 2006). Todas estas bacterias son importantes para el equilibrio ecológico; sin embargo, las PGPR tienen la capacidad de potenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas características en las cuales se enfoca este trabajo de investigación. Las PGPR pueden modular la nutrición y modificar la arquitectura de la planta con ayuda de diferentes estrategias; por ejemplo, mejoran la biodisponibilidad de nutrientes, producen fitohormonas y metabolitos, pueden generar un efecto de biorremediación, y pueden ayudar a controlar factores de estrés biótico y abiótico (Dimkpa *et al.*, 2009; Abud *et al.*, 2010; Vacheron *et al.*, 2013). Dado el enfoque del presente trabajo de investigación, todas estas estrategias de promoción de crecimiento en plantas se discutirán con mayor detalle en el siguiente apartado.

4.2. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR).

4.2.1. Biodisponibilidad de nutrientes.

Generalmente se cree que la absorción de nutrientes está altamente relacionada al aumento en el tamaño del sistema radicular que provocan las PGPR; sin embargo, va más relacionado a: 1) la demanda de nutrientes de la planta y/o 2) efectos que modifican la absorción de nutrientes de las plantas (como la solubilización de fosfatos). Las bacterias promotoras de crecimiento pueden

incrementar la absorción de nutrientes de ambas formas, tanto estimulando el transporte de iones a la raíz, como, suplementando la rizósfera directamente con nutrientes (Vacheron *et al.*, 2013).

El primer punto se refiere al transporte de nutrientes, el cual depende principalmente de la demanda de nutrientes que la planta necesita, y está regulado por distintos autores moleculares, como los transportadores que a su vez están controlados por distintos procesos regulatorios (Vacheron *et al.*, 2013). Por ejemplo, la demanda de nitrógeno se refiere a la cantidad de nitrógeno necesaria para mantener en la planta una tasa de crecimiento óptimo (Imsande y Touraine, 1994). En *A. thaliana*, Nazon *et al.*, (2003) demostraron que el transportador de nitratos *NRT2.1* puede ser inducido por nitratos, pero también puede llegar a ser reprimido por aminoácidos como Asn, Asp, Gln, Glu, Ala; y sus análisis sugieren que estos procesos regulatorios pueden estar relacionados con la regulación de la absorción de nitratos (Vacheron *et al.*, 2013).

Se sabe que las PGPR tienen la capacidad de estimular los sistemas de transporte iónico en la raíz, por lo que también pueden alterar la nutrición de las plantas a este nivel y tener efectos positivos en el desarrollo. Por ejemplo, plantas de canola inoculadas con una cepa de *Achromobacter sp.* mostraron una mayor tasa de influjo de NO_3^- y K^+ (Bertrand *et al.*, 2000). Además, del efecto en el flujo de iones, existen reportes en los que se indican cambios a nivel de la transcripción de algunos genes que codifican a diversos transportadores; por ejemplo, plantas de *A. thaliana* inoculadas con una cepa de *Bacillus subtilis* mostraron cambios en los patrones de expresión del gen que codifica al transportador HKT1 el cual participa en la homeostasis del Na^+ y K^+ (Zhang *et al.*, 2008).

Para el segundo punto, se describen a continuación algunos ejemplos importantes:

a. Fijación de nitrógeno.

Es el proceso de reducción del nitrógeno diatómico del aire a amoníaco llevado a cabo por la enzima nitrogenasa presente en microorganismos de vida libre y simbióticos (de Bruijn, 2015).

El nitrógeno es muchas veces una limitante para el crecimiento de las plantas, ya que es un elemento medular, integrando biomoléculas como aminoácidos, ácidos nucleicos, entre otros; de ahí la importancia de este proceso biológico. Algunos ejemplos de bacterias que fijan nitrógeno son el género *Rizobium*, bacterias que tienen la capacidad de formar nódulos en las raíces de diferentes leguminosas y es la interacción más importante en cuanto a fijación de nitrógeno se refiere (de Bruijn, 2015). El género *Frankia*, establece simbiosis actinorrizicas en las raíces de 25 géneros de plantas, aunque no es una interacción tan distribuida como la de

Rizobium-leguminosa, las plantas actinorrizicas pueden llegar a presentar mayor tasa de fijación de nitrógeno que las leguminosas (Bautista y Valdés, 2008). Las cianobacterias son una de las principales especies encargadas de la fijación de nitrógeno en el océano; sin embargo, también realizan este proceso en el sistema terrestre (de Bruijn, 2015).

b. Captación de hierro.

El hierro es un nutriente de vital importancia para la vida de la mayoría de los seres vivos ya que es utilizado como cofactor de muchas enzimas y es el autor de procesos biológicos de suma importancia como el transporte de oxígeno (Aguado *et al.*, 2012); sin embargo, para las plantas se encuentra en su gran mayoría de manera inaccesible en el suelo, en forma de hidróxidos insolubles y oxihidróxidos con su valencia de Fe^{+3} (Rajkumar *et al.*, 2010). Existen dos estrategias por parte de las plantas para la captación de hierro; 1.- consiste en la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} e importación de Fe^{+2} , para este proceso participan genes como *FIT1* (Fe-deficiency-induced-transcription, por sus siglas en inglés), *IRT1* (Iron-regulated transporter 1) y *FRO2* (Ferric reductase) y 2.- con la producción de fitosideróforos, donde el Fe^{+3} puede transportarse directamente a la raíz sin su reducción debido a la presencia de transportadores específicos en plantas (Fincheira *et al.*, 2018). Los sideróforos son compuestos de baja masa molecular (generalmente <10 000 Da) que tienen la capacidad de facilitar el transporte de hierro dentro de la planta (Vala *et al.*, 2006). Existen sideróforos sintetizados por microorganismos y fitosideróforos sintetizados por la planta; sin embargo, existen diferencias entre ambos tipos de sideróforos. Los fitosideróforos presentan una menor afinidad por el hierro y además en algunos casos no quelan de manera específica al hierro, por lo que los sideróforos producidos por los microorganismos del suelo compiten exitosamente y quelan en mayor proporción que los fitosideróforos. Además, se ha visto que en ciertas circunstancias las plantas poseen la capacidad de aprovechar los sideróforos microbianos; por lo tanto, las plantas capaces de utilizar estos complejos Fe^{+3} – sideróforos aumentan la posibilidad de supervivencia en diferentes tipos de suelo (Aguado *et al.*, 2012). Se han descrito alrededor de 500 sideróforos diferentes, que se dividen en hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos y amfilílicos. Los catecolatos son comunes de bacterias, los hidroxamatos predominan en hongos de la división Ascomycota y Basidiomycota, y los carboxilatos en la Zygomycota (Vala *et al.*, 2006; Haselwandter y Winkelmann, 2007).

Los sideróforos no solamente sirven para suplementar a la planta del hierro necesario para su correcto desarrollo; sino también, indirectamente la competencia que genera la captación de hierro por parte de rizobacterias benéficas juega un papel importante en el control de microorganismos fitopatógenos reduciendo el hierro disponible para su crecimiento (Aguado *et al.*, 2012).

c. Solubilización de fosfatos.

Aunque el fósforo no suele escasear en el suelo, las plantas no pueden obtenerlo si no se encuentra en una forma soluble, por lo que los microorganismos solubilizadores de fosfatos son de gran importancia. Existen dos procesos diferentes por los cuales algunas PGPR logran solubilizar los fosfatos que no están disponibles para las plantas, el primero es la acidificación del medio gracias a la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico, el ácido 2-cetoglucónico, el ácido glicólico, el ácido oxálico, el ácido propionico, entre otros (Duff y Webley 1954; Chen *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2010) y la producción de enzimas como las fosfatasas, C-P liasas y fitasas que hidrolizan formas orgánicas (Vacheron *et al.*, 2013).

4.2.2. Producción de fitohormonas y otros metabolitos

Una de las principales estrategias por parte de las PGPR es la producción de diferentes metabolitos y fitohormonas que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, dentro de las fitohormonas que se han reportado se encuentran las auxinas, giberellinas y citocininas, las cuales juegan un papel importante en la interacción planta-microorganismo. Varios géneros de Actinobacterias se han reportado con capacidad de producir fitohormonas; por ejemplo, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Spirillospora*, *Micromonospora* y *Rhodococcus* (Tsavkelova *et al.*, 2005; Khamna *et al.*, 2010; Shutsrirung *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2018).

La producción de citocininas se ha reportado en diferentes especies bacterianas; por ejemplo, *Azospirillum brasilense* y *Bacillus licheniformis* (Cassan *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2009). Las citocininas estimulan la división celular, controlan la diferenciación celular e inducen la proliferación de pelos radicales; sin embargo, inhiben la formación de raíces laterales y la elongación de la raíz principal (Vacheron *et al.*, 2013). Por otro lado, las giberelinas son importantes también en la regulación de la elongación de la raíz principal (Yaxley *et al.*, 2001), han sido reportadas en diferentes especies bacterianas como *Pseudomonas koreensis* (Kang *et al.*, 2020).

Una de las auxinas producidas por bacterias mejor caracterizadas es el ácido indol-3-acético (IAA, por sus siglas en inglés), es una fitohormona importante debido a que controla procesos de crecimiento y desarrollo esenciales para las plantas; bajas concentraciones de IAA estimula la elongación de la raíz principal y altas concentraciones incrementa la cantidad de pelos radicales y aumenta la densidad de raíces laterales, pero afecta la elongación celular (Gutiérrez *et al.*, 2003; Vacheron *et al.*, 2013).

El IAA es sintetizado a partir de dos vías: 1) dependiente de triptófano y 2) independiente de triptófano. Las bacterias sintetizan el IAA a partir de la vía dependiente de triptófano, y existen 4 rutas principales: i) mediante el indol-3- piruvato (IPA), ii) mediante la triptamina (TPM), iii) mediante el indol-3-acetonitrilo (IAN) y iv).- mediante el indol-3-acetamida (IAM), de las cuales, las rutas de síntesis a partir de indol-3-acetamida y triptamina son las principales utilizadas; sin embargo, existen bacterias que pueden presentar múltiples vías de síntesis (Zhang *et al.*, 2019).

El incremento en la concentración de IAA no solamente puede deberse a la síntesis directa por parte de la bacteria, también puede ser estimulada la síntesis de IAA en la planta de manera indirecta con ayuda de otros estímulos bacterianos (Vacheron *et al.*, 2013); por ejemplo, a partir de óxido nítrico (NO), que está involucrado en la vía de señalización de auxinas (Molina-Favero *et al.*, 2008) y el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) que puede interferir con la vía de señalización dependiente de auxinas (Brazelton *et al.*, 2008).

Las fitohormonas no son las únicas moléculas sintetizadas por las bacterias que ayudan a un mejor desarrollo de las plantas, podemos encontrar diferentes compuestos como los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés), las enzimas y los antibióticos.

Los VOCs son compuestos lipofílicos derivados de diferentes vías metabólicas con un bajo peso molecular ($< 300 \text{ g mol}^{-1}$) y un bajo punto de ebullición, se pueden encontrar en forma de alcoholes, cetonas, compuestos de azufre, furanos y terpenos. Estos compuestos pueden actuar como moléculas señal a corta y larga distancias (Fincheira *et al.*, 2018).

Se han reportado diferentes VOCs en diferentes especies bacterianas que pueden llegar a inducir el crecimiento de las plantas mediante 4 principales mecanismos; i) modulación de nutrientes; por ejemplo, Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013 reportó evidencia sobre la adquisición de Fe en *M. truncatula* después de la exposición a volátiles liberados por *A. agilis*; ii) equilibrio hormonal; por ejemplo, Hao *et al.*, 2016 indicó que plantas de *A. thaliana* expuestas a volátiles emitidos por una cepa de *B.*

amyloliquefaciens indujo una expresión diferencial en genes asociados con hormonas vegetales; iii) modulación del metabolismo; por ejemplo, Zhang *et al.*, 2007 en plántulas de *A. thaliana* expuestas a VOCs de una cepa de *B. subtilis* encontraron una expresión diferencial de genes asociados con el metabolismo; y iv) regulación de la concentración de azúcares (Fincheira *et al.*, 2018).

La síntesis de VOCs depende en gran medida de las condiciones de crecimiento de la bacteria e inclusive puede depender del medio de cultivo donde se crezca; por ejemplo, el medio RMPVA ha sido utilizado para potenciar la producción de 3-hidroxi-2-butanona y 3-butaneidol (Fincheira *et al.*, 2018). Algunos ejemplos de diferentes VOCs que se han encontrado en bacterias y que tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas son; 2-pentilfurano; dimetilhexadecilamina; 3-hidroxi-2-butanona; índol; 2-metil-n-1-trideceno y 2, 3-butanodiol (Zou *et al.*, 2010; Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Ann *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2016).

Por otro lado, las enzimas producidas por diferentes microorganismos en el suelo cumplen un papel bioquímico crucial en la descomposición de la materia orgánica, ayudando al reciclado de nutrientes; por ejemplo, la celulasa, la invertasa y la fitasa (Jog *et al.*, 2016). Además, algunas enzimas pueden controlar el crecimiento de fitopatógenos; por ejemplo, quitinasas y proteasas que pueden degradar y romper las paredes celulares de los hongos (Abud *et al.*, 2010; Brzezinska *et al.*, 2013; Suthindhiran *et al.*, 2014).

Los antibióticos son otras de las estrategias que pueden ayudar a las plantas, controlando a diferentes fitopatógenos. Las Actinobacterias son un grupo de bacterias que producen una gran diversidad de antibióticos, y la mayoría de los que se han descrito hasta el momento pertenecen a este grupo (Pandey *et al.*, 2018). El género *Streptomyces* es uno de los más importantes y desempeña un papel crucial al inhibir los patógenos vegetales transmitidos por el suelo en la rizósfera (Jog *et al.*, 2016). Los antibióticos son uno de los metabolitos secundarios más importantes producidos por las bacterias debido a sus aplicaciones y principalmente a su importancia económica, algunos antibióticos producidos por las Actinobacterias son, por ejemplo, antibióticos de glicopéptidos, macrólidos, antibióticos poliénicos, aminoglicósidos, antraciclinas, antibióticos poliéter, antibióticos glucosídicos, estreptotricinas y actinomicinas (Pandey *et al.*, 2018).

4.2.3. Biorremediación mediada por bacterias

Algunas PGPR ayudan a tolerar diferentes tipos de estrés abiótico, incluyendo la contaminación por diferentes compuestos, como por ejemplo los metales pesados. Los metales pesados contaminantes más comúnmente encontrados son Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Ni y son una problemática tanto para la salud humana como para la agricultura (Jing *et al.*, 2007). Existen 3 maneras principales por las que los metales pesados pueden causar efectos negativos en el crecimiento de las plantas; por el desplazamiento de otros compuestos esenciales, bloqueo de funciones biológicas, y por la modificación de la estructura de diferentes proteínas (Ochiai, 1995). Las plantas tienen diferentes estrategias para tolerar el estrés por metales pesados, por ejemplo, el secuestro de metales como Ag(I), AsO₃(-III), Cd(II), Co(II), Cu(II), Hg(II), y Ni(II) que son atrapados por residuos de cisteína, inactivación en vacuolas, precipitación de exudados radicales, reducción de la absorción del metal por la membrana, quelación del metal por fitolectinas, entre otras estrategias (Meagher, 2000; González y Zapata, 2008). Sin embargo, muchas bacterias tienen diferentes estrategias por las cuales ayudan a la inactivación de compuestos tóxicos, estas estrategias se enfocan a la inmovilización, movilización o transformación de metales pesados (Tak *et al.*, 2013). Por ejemplo, una cepa de *Pseudomonas maltophilia* catalizó la transformación y precipitación de diferentes cationes metálicos tóxicos y oxianiones; selenito, telurito, iones mercurícos y ácido cloroáurico fueron reducidas a sus respectivas formas elementales (Blake *et al.*, 1993).

4.2.4. Interacción bacteria-planta contra factores de estrés abiótico.

A lo largo de la evolución, las diferentes formas de vida existentes han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar las condiciones ambientales adversas que puedan interrumpir su correcto desarrollo o inclusive llevarlos a una muerte inminente. El estrés abiótico hace referencia a las condiciones ambientales que alteran los procesos fisiológicos de la planta, algunos ejemplos de condiciones de estrés abiótico puede ser estrés hídrico, estrés salino, estrés nutricional, estrés oxidativo y estrés por metales pesados. Cuando hablamos de agricultura, estas condiciones ambientales adversas se convierten en problemas económicos de alto impacto; por ejemplo, el estrés hídrico que siempre ha estado relacionado a la pobreza, causó una pérdida económica entre 2005 y 2015 de 96 mil millones de dólares y según datos de la FAO, la sequía fue la causa de un tercio de las pérdidas globales de producción agrícola (Nuñez y Verbist, 2018).

Las plantas tienen distintos mecanismos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos para contrarrestar las condiciones de estrés abiótico (Basu *et al.*, 2016); por ejemplo, un gran desarrollo del sistema radicular y cutículas gruesas (características morfológicas); pérdida de follaje durante épocas de sequía y capacidad de sobrevivir en estado de anhidrobiosis (características fisiológicas); activación del sistema antioxidante y producción de osmolitos compatibles como la glicina betaína, prolina y algunos azúcares como glucosa o trehalosa (características bioquímicas) (Rzedowski, 1968; Yakushiji *et al.*, 1996; Lutts *et al.*, 1999; Medrano, 2012). Sin embargo, además de los mecanismos que las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución para sobrevivir ante diferentes condiciones ambientales, la interacción con diferentes bacterias benéficas ha mostrado ser una excelente estrategia para potenciar la tolerancia a diferentes tipos de estrés (Dimkpa *et al.*, 2009).

Anteriormente se discutieron mecanismos por los cuales las PGPR ayudan a las plantas a mejorar el crecimiento y desarrollo, pero estos mecanismos también ayudan indirectamente a las plantas a tolerar de mejor manera el estrés biótico y abiótico; por ejemplo, la producción de sideróforos bacterianos ayuda a la asimilación de hierro de las plantas pero indirectamente también disminuye la propagación de fitopatógenos debido a la competencia que se genera por el metal (Aguado *et al.*, 2012); por otro lado, existen mecanismos por los cuales de manera más directa y específica pueden ayudar a las plantas a tolerar diferentes condiciones ambientales, y algunos ejemplos se discutirán a continuación.

a. Estrés hídrico.

El estrés hídrico puede llegar a ser sumamente agresivo para los cultivos agrícolas, dependiendo de la duración y severidad del estrés, de manera general lo que sucede es lo siguiente: primero, se induce el cierre parcial de los estomas debido a que la turgencia de la célula se afecta; posteriormente, se puede inducir el cierre total de los estomas cuando existe una señalización mediada por ácido abscísico (ABA), esto impide el intercambio de gases, generando una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan la actividad de carboxilación en la enzima RuBisCO. Por otro lado, la cadena de transporte de electrones también es afectada, por lo que se obstruye la síntesis de ATP, disminuyendo el crecimiento y el desarrollo y finalmente se puede llegar a la muerte de la planta (Farooq *et al.*, 2009; Lichtfouse *et al.*, 2011).

Diferentes microorganismos de la rizósfera han demostrado tener la capacidad de ayudar a tolerar las condiciones de déficit hídrico. Algunas bacterias producen osmolitos compatibles, que pueden ayudar a contrarrestar la falta de agua, aumentando la osmolaridad

citoplasmática; algunos ejemplos de osmoprotectores producidos por bacterias que se han reportado son la glicina betaina, el ácido glutámico, la prolina, y algunos azúcares como la sacarosa y la trehalosa (Yuwono *et al.*, 2005).

Existen genes implicados en la respuesta a estrés abiótico que se regulan de manera diferencial en las plantas como mecanismo de defensa ante diferentes condiciones ambientales, tal es el caso del factor de transcripción DREB (Dehydration-responsive element binding, por sus siglas en inglés). Su regulación positiva a nivel transcripcional ha demostrado ser importante para tolerar diferentes condiciones de estrés (Tiwari *et al.*, 2016; Jan *et al.*, 2017). Se ha reportado que diferentes bacterias benéficas regulan de manera positiva al gen *DREB* ayudando a aliviar las condiciones de estrés hídrico (Tiwari *et al.* 2017; Vaishnav y Choudhary, 2019). Algunos otros ejemplos de genes que son regulados de manera diferencial en las plantas inoculadas con bacterias benéficas son *PIPs* y *TIPs* (acuaporinas implicadas en el transporte de agua), *LEA* (Late embryogenesis abundant) y *CTR1* (constitutive triple response1), el cual es un regulador de la vía de señalización del etileno que modula los cambios relacionados con el estrés en las plantas (Tiwari *et al.*, 2017; Barnawal *et al.*, 2017; Vaishnav y Choudhary, 2019).

Uno de los principales mecanismos que implementan las plantas ante el estrés hídrico es la acumulación de ABA que ayuda a mantener el contenido de agua mediante un cierre estomático, se ha demostrado que cepas bacterianas tienen la capacidad de potenciar la acumulación de ABA en la planta durante el estrés hídrico ayudando a mejorar el contenido de agua (Park *et al.*, 2017; Vaishnav y Choudhary, 2019). Además, se han encontrado bacterias que tienen la capacidad de producir precursores de ABA; por ejemplo, Gowtham *et al.*, 2020 reportó que una cepa de *Bacillus marisflavi* con la capacidad de producir xantoxina y ácido xantoxico.

En las secciones anteriores se describieron varias estrategias por las que el crecimiento y desarrollo de las plantas es estimulado por las PGPR, algunas, tenían un efecto sobre la arquitectura de la raíz como es el caso de diferentes fitohormonas. La arquitectura de la raíz es importante en condiciones de estrés hídrico; por ejemplo, en el caso de bacterias productoras de IAA, generan un aumento en la densidad de raíces laterales y una mayor cantidad de pelos radicales por lo que generan una mayor área de contacto para optimizar la captación de agua (Vacheron *et al.*, 2013; Maurel y Nacry, 2020).

b. Estrés salino.

El estrés salino es otra problemática para la agricultura a nivel mundial, la cual ha ido aumentando a través de los años, generando pérdida en rendimientos de cultivo. El estrés salino se refiere a una cantidad elevada en sales que provoca un efecto tóxico y una disminución en el potencial osmótico del suelo causado principalmente por cloruros y sulfatos de Na^+ , Ca^{2+} , y Mg^{2+} (por ejemplo, Na_2SO_4 , MgSO_4 , CaSO_4 , MgCl_2 , Na_2CO_3 y la principal causa de suelos salinos, el NaCl), la acumulación de estas sales en los suelos es provocada en gran parte por un mal riego y un drenaje inadecuado (McWilliam, 1986; Forni *et al.*, 2017). La respuesta inicial que tienen las plantas ante el estrés salino es muy parecida a la que se da en estrés hídrico ya que en primer lugar desencadena un déficit hídrico independientemente de la concentración de sales en los brotes, por lo que la acumulación de ABA es de las primeras respuestas que realiza la planta; sin embargo, además de esto, se ocasiona un efecto tóxico por parte del Na^+ y Cl^- que puede causar necrosis y senescencia temprana de hojas, un desbalance nutricional debido a que la entrada de sales compite con la entrada de otros minerales como K^+ , Ca^{2+} , y Mn^{2+} y un incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (Piedra y Cepero, 2013; Almeida *et al.*, 2017).

La entrada y salida de sales está regulada por bombas, transportadores y canales que en su conjunto mantienen la homeostasis iónica. El principal objetivo de estas proteínas de membrana frente al estrés salino es mantener una alta relación de K^+/Na^+ en el citosol ya que el Na^+ compite con el K^+ en múltiples procesos metabólicos, por lo que la expresión y actividad de estas proteínas de membrana debe estar sumamente regulada en estas condiciones de estrés (Leidi y Pardo, 2002).

Existen transportadores encargados del influjo del potasio; por ejemplo, los transportadores KCO, KUP/HAK/KT y HKT (Véry y Sentenac, 2003); sin embargo, en condiciones de estrés salino la alta afinidad que tienen por el K^+ se puede ver afectada (Leidi y Pardo, 2002). Otros transportadores se encargan de almacenar Na^+ en la vacuola para disminuir su concentración en el citosol; por ejemplo, NHX; y algunos transportadores ayudan a disminuir el flujo excesivo de sodio al xilema evitando la acumulación de sales en los brotes; por ejemplo, HKT1. Por otro lado, la principal estrategia que tienen las plantas para disminuir la entrada de sodio a la raíz es su expulsión, la cual se da por medio de transportadores como SOS1 (Salt overly sensitive 1), muchos de estos transportadores necesitan de un gradiente electroquímico por

lo que diferentes ATPasas tanto en membrana plasmática como en tonoplasto son importantes (Almeida *et al.*, 2017).

Se han propuesto diferentes estrategias por medio de las cuales las PGPR ayudan a tolerar el estrés salino, en primer lugar, las estrategias que mejoran el crecimiento de las plantas, como la producción de diferentes fitohormonas, la disminución de altos niveles de etileno (gracias a la actividad ACC deaminasa) y la mejora en la asimilación de nutrientes (Dimkpa *et al.*, 2009; Forni *et al.*, 2017). En múltiples trabajos se ha relacionado la tolerancia al estrés hídrico y salino de diferentes cultivos con cepas bacterianas productoras de IAA y citocininas, así como a la actividad ACC deaminasa (Egamberdieva *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012; Egamberdieva *et al.*, 2015; Forni *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2007; Aamir *et al.*, 2013; Zafar *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015).

A nivel transcripcional, se han reportado bacterias benéficas que modifican la expresión de genes relacionados a la tolerancia al estrés salino; por ejemplo, Bharti *et al.*, 2016 correlacionó la tolerancia de plantas de trigo inoculadas con *Dietzia natronolimnaea* con la expresión de genes como *TaST* (*T. aestivum* salt-tolerant, un gen inducido por sales encargado de mantener la relación K^+/Na^+), genes involucrados en cascadas de señalización del ABA (*ABARE* y *OPR1*), genes implicados en la homeostasis del Na^+ como *SOS1*, *SOS4* (*Salt overly sensitive 4*, el cual codifica a una piridoxal quinasa y además regula la homeostasis de Na^+ y K^+) y *NHX1* (sodium/hidrogen exchanger 1), genes de distintas enzimas antioxidantes como APX (ascorbato peroxidada), MnSOD (manganeso superóxido dismutasa), CAT (catalasa), POD (peroxidasa), GPX (glutación peroxidasa) y GR (glutación reductasa).

c. Estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas señal de gran importancia en múltiples procesos regulatorios; sin embargo, cuando el equilibrio redox es afectado, estas ROS se convierten en moléculas dañinas para la célula. Cuando existe una sobre producción de ROS y un desequilibrio en el sistema antioxidante comienza el estrés oxidativo, el cual afecta principalmente a macromoléculas como lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (Calderón-Peña *et al.*, 2019).

Varias ROS se producen como consecuencia del metabolismo celular; por ejemplo, el radical superóxido (O_2^- , generado por el fotosistema I y en la membrana plasmática por NADPH oxidasas), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , generado en el peroxisoma por la superóxido

dismutasa), el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$, producido por medio de reacciones de Fenton a partir de H_2O_2) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$, se puede llegar a producir en fotosistema II) (Møller *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo es generalmente una consecuencia de otros tipos de estrés (biótico y abiótico), por lo que la activación del sistema antioxidante es esencial para la tolerancia ante estas condiciones de estrés (Moran *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2004 Møller *et al.*, 2007; Ramírez-Serrano *et al.*, 2008; Masood *et al.*, 2012). Diferentes bacterias tienen la capacidad de potenciar la activación del sistema antioxidante bajo diferentes condiciones ambientales; por ejemplo, Mukherjee *et al.*, 2018, reportó un consorcio de endófitos que aumentaron la defensa antioxidante de *Solanum nigrum* en condiciones altas de arsénico, la actividad de enzimas como GR, POD y APX incrementó en las plantas inoculadas con los consorcios bacterianos en raíz y/u hojas. Bharti *et al.*, (2016), reportó que *Dietzia natronolimnaea* potenció la expresión de genes de distintas enzimas antioxidantes (APX, MnSOD, CAT, POD, GPX y GR) en plantas de trigo sometidas a estrés salino. Tiepo *et al.*, 2020 reportó la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Bacillus sp.* en *Cecropia pachystachya* y *Cariniana estrellensis* en condiciones de estrés hídrico encontrando una mayor actividad de APX, SOD y/o POD.

4.2.5. Interacción bacteria-planta contra factores de estrés biótico.

Las plantas siempre han estado expuestas a factores de estrés biótico, debido a la existencia de diversos fitopatógenos, por lo cual, han desarrollado a lo largo de la evolución un sistema de defensa para contrarrestar estos ataques, se conocen dos respuestas sistémicas por las cuales las plantas adquieren inmunidad ante diferentes fitopatógenos, i) la resistencia sistémica adquirida (SAR, inducida por diferentes patógenos como hongos, virus, bacterias e insectos) y ii) la resistencia sistémica inducida (ISR, inducida por medio de bacterias no patógenas) (Camarena-Gutiérrez *et al.*, 2007; Pieterse *et al.*, 2008).

La inmunidad innata de las plantas es mediada ya sea por medio de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), o por medio de efectores. La inmunidad mediada por PAMPs (PTI), se basa en el reconocimiento de moléculas que forman parte de microorganismos patógenos y no patógenos por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs); sin embargo, muchos microorganismos han desarrollado la habilidad de esquivar la PTI por medio de efectores que

intervienen en este reconocimiento, por lo que las plantas también han desarrollado la inmunidad mediada por efectores (ETI) la cual se basa en el reconocimiento directo o indirecto de estas moléculas efectoras (De Vleeschauwer y Höfte, 2009). Tanto PTI como ETI pueden provocar SAR; sin embargo, SAR es principalmente inducida por ETI (Mishina y Zeier, 2007).

Se ha observado, que el ataque de algún patógeno al cual la planta sobrevive, “inmuniza” a la planta y la prepara contra ataques posteriores de dicho patógeno, esta capacidad de repeler ataques subsiguientes de patógenos se le llama resistencia sistémica adquirida (SAR) (Camarena-Gutiérrez *et al.*, 2007). En la SAR, después que se reconoce un fitopatógeno, se genera una muerte celular programada asociada a la restricción del crecimiento del fitopatógeno la cual se llama respuesta hipersensible (RH) (Sanzón y Zavaleta, 2011). En las células adyacentes al sitio donde se llevó a cabo la RH comienza una respuesta local que permite un engrosamiento de las paredes celulares debido a la incorporación de lignina, deposición de callosa y síntesis de fitoalexinas. Por otro lado, a distancia, las células no infectadas inducen la síntesis de proteínas asociadas a la patogénesis (proteínas PR) (Camarena-Gutiérrez *et al.*, 2007). Las proteínas PR desempeñan un papel importante contra diferentes fitopatógenos gracias a que pueden tener una actividad glucanasa, quitinasa, o ser inhibidores de proteínasa (Kauffmann *et al.*, 1987; Legrand *et al.*, 1987; Richardson *et al.*, 1987).

Por otro lado, existe una respuesta sistémica mediada por bacterias no patógenas, conocida como resistencia sistémica inducida (ISR). La principal diferencia entre ambas respuestas sistémicas es que ISR es regulada por las vías del ácido jasmónico y el etileno, mientras que la SAR es dependiente de la vía del ácido salicílico. Estas vías se pueden considerar vías antagónicas (Camarena-Gutiérrez *et al.*, 2007); sin embargo, pueden existir una comunicación cruzada entre ambas respuestas sistémicas (Pieterse *et al.*, 2008).

En la señalización regulada por etileno participan receptores que sensan a dicha molécula, estos son capaces de activar cascadas de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), cuya señal es transmitida al gen insensitivo a etileno-2 (*EIN2*) y esto provoca la acumulación del factor de transcripción del gen insensitivo a etileno-3 (*EIN3*) y promueve al factor de transcripción de respuesta a etileno (*ERF1*), el cual regula la expresión génica en respuesta a patógenos; por otro lado, en la señalización por jasmonatos, se activa la expresión de genes de defensa en plantas; por ejemplo, el gen de la proteína insensible a la coronatina (*COI1*) que es un regulador central de la vía de

señalización del ácido jasmónico y se requiere para las respuestas de defensa de las plantas (Samaniego *et al.*, 2017).

Existen diferentes moléculas inductoras que son reconocidas para la activación de ISR; por ejemplo, lipopolisacáridos, biosurfactantes, lactonas N-acil-homoserina, bencilaminas N alquiladas, antibióticos, exopolisacáridos y uno de los principales PAMPs que se ha estudiado en la activación de ISR, la flagelina (De Vleeschauwer y Höfte, 2009). Los primeros trabajos acerca de ISR se realizaron en plantas dicotiledóneas en interacción con bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia* (Van Loon *et al.*, 1998), y con el paso del tiempo se han reportado ya una gran cantidad de géneros bacterianos con capacidad de generar ISR; por ejemplo, bacterias del género *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Lysobacter*, y diferentes Actinobacterias endófitas (Kloepper *et al.*, 2004; Conn *et al.*, 2008; Phi *et al.*, 2010; Zagier y Alfadhil, 2017; Kusajima *et al.*, 2018; Laborda *et al.*, 2020).

4.3. Generalidades de las Actinobacterias.

De los distintos Phyla de bacterias existentes, las Actinobacterias constituyen uno de los grupos más diversos del dominio Bacteria. Las Actinobacterias son bacterias filamentosas que morfológicamente son parecidas a hongos, de ahí su nombre “Actinomicetes” que significa “hongo en forma de rayo de sol”. Son bacterias Gram positivas con un alto contenido de G y C en su DNA, de las cuales pueden encontrarse diferentes estilos de vida; desde terrestres hasta marinos, siendo habitantes del suelo, patógenos, simbioses o comensales de plantas y animales (Ventura *et al.*, 2007; Goodfellow *et al.*, 2012). La mayoría son bacterias heterótrofas aerobias, pero también las hay anaeróbicas, y el tamaño de la población bacteriana depende principalmente del tipo del suelo, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente (Franco-Correa, 2009; Ortiz *et al.*, 2016). Una de las características más curiosas es su olor a tierra mojada debido a la producción de geosmina (Gerber *et al.*, 1979).

La clasificación de las actinobacterias ha ido evolucionando a través del tiempo, encontrándose un sinfín de técnicas para su identificación. Por ejemplo, métodos basados en quimiotaxonomía (análisis de los componentes de la pared celular), características fenotípicas, y métodos moleculares. Diferentes genes como *23S*, *RpoB*, *RecA*, *DnaK*, *GrpE*, *GyrB*, *GroEL*, *YchF*, *RpoB*, y *SecY* han sido utilizados para realizar relaciones filogenéticas; sin embargo, el gen 16S del rRNA bacteriano es el más utilizado para realizar taxonomía molecular de Actinobacterias (Ventura *et al.*, 2007;

Mohammadipanah y Dehghani, 2017). El Phylum Actinobacteria está compuesto por 6 clases (*Rubrobacteria*, *Thermoleophilia*, *Coriobacteriia*, *Acidimicrobiia*, *Nitriliruptoria*, y *Actinobacteria*), 5 subclases, 6 ordenes, 14 subordenes; y mientras 43 familias se encuentran dentro de la clase *Actinobacteria*, las otras 10 familias se encuentran distribuidas en las otras 5 clases (Mohammadipanah y Dehghani, 2017).

El crecimiento actinobacteriano es lento, se observa en medio sólido alrededor de los 3 a 4 días; sin embargo, el micelio maduro y la esporulación se da entre los 7 a 14 días de crecimiento y para algunas cepas hasta más de 1 mes de incubación (Correa, 2008). Las Actinobacterias neutrofilicas crecen en rangos de pH de 5 a 9 (6.5 a 8 es el óptimo), mientras que las acidófilas entre 1.8 y 4; por otro lado, las Actinobacterias que crecen en condiciones alcalinas crecen en un pH de entre 6 y 11; para el caso de las condiciones de temperatura, la mayoría de las Actinobacterias crecen entre 25 a 35°C (aunque se han descrito Actinobacterias psicrófilas que crecen entre 0 y 20°C y Actinobacterias termófilas obligadas que pueden llegar a crecer entre 60 a 70°C) (Mohammadipanah y Dehghani, 2017).

El grupo de las Actinobacterias destaca por su gran importancia a nivel ecológico, ocupando entre el 10% y el 33% de la comunidad bacteriana total presente en el suelo, siendo los géneros *Streptomyces* y *Nocardia* los más abundantes (Pandey *et al.*, 2018). Por otro lado, fuera de su papel ecológico, su importancia biotecnológica también es grande; ya que, alrededor del 61% de los metabolitos microbianos activos se han extraído de este Phylum de bacterias y tienen un futuro prometedor en el descubrimiento de nuevos metabolitos (Singh *et al.*, 2018).

De los metabolitos secundarios de mayor importancia que se han extraído de las Actinobacterias, están los antibióticos, constituyendo más del 70% de los antibióticos descubiertos hasta el momento en este grupo de bacterias. (Pandey *et al.*, 2018). Una gran variedad de actinobacterias tienen la capacidad de solubilizar fosfatos, producir sideróforos y fitohormonas, fijar nitrógeno y muchas tienen la capacidad de biodegradar contaminantes como hidrocarburos y metales pesados (Yandigeri *et al.*, 2012; Saif *et al.*, 2014; Pandey *et al.*, 2018). Todas estas características de las Actinobacterias, como ya se describió en secciones previas, confieren ventajas a las plantas que interactúan con estas bacterias mejorando su desarrollo, salud fotosintética, y tolerancia a estrés biótico y abiótico. Por lo anterior, es fácil imaginar las aplicaciones que llegan a tener en la agricultura, utilizándose como biocontroladores, biofertilizantes y biorremediadores.

4.4. Biofertilizantes.

La historia del consumo de los fertilizantes en México funge como uno de los principales antecedentes del presente trabajo, debido a que el objetivo final de caracterizar PGPRs es el utilizarlas en algún bioinoculante; además, es importante considerar la importancia que tienen este tipo de trabajos en el sector agrícola. La crisis en el sector agrícola de México fue en gran parte generada a partir de problemáticas económicas que rodean al consumo de los fertilizantes químicos. El impacto negativo generado en este sector de la economía es debido a diferentes eventos históricos que se irán discutiendo a continuación, crearon una necesidad para la búsqueda de alternativas que pudieran remplazar los fertilizantes químicos. Muchos de estos hechos contribuyeron a que se pusiera gran atención en estudios relacionados a los bioinoculantes y a ser extensivamente utilizados en México a partir de 1999.

4.4.1. La historia del consumo de fertilizantes en México y el mundo.

De los primeros biofertilizantes que se conocen datan del 287 a.C., Teofrasto sugería mezclar el suelo donde se habían cultivado leguminosas para proporcionar fuerza a otras plantas, y para el siglo XVIII antes de que el término micorriza existiera, ya se utilizaba la inoculación de hongos en plántulas de encino para la producción de trufas (Grageda *et al.*, 2012). Sin embargo, no fue hasta 1895 en que se registró la primera patente por Nobbe y Hiltner para la inoculación del género *Rhizobium* spp., el cual comercialmente llamaron “Nitragin” (Hirsch y Spokes, 1988).

La urbanización demandó una gran cantidad de productos agrícolas; sin embargo, la principal solución a esta problemática no fueron los biofertilizantes, sino los fertilizantes químicos que se comenzaron a fabricar extensivamente desde 1950 y desde entonces la agricultura es altamente dependiente de su consumo (Grageda *et al.*, 2012; Aguado *et al.*, 2012).

En 1970 se generó una crisis energética, que terminó por afectar el consumo de todos los derivados del petróleo, incluyendo los fertilizantes químicos y los estudios relacionados a biofertilizantes avanzaron en varios países; sin embargo, en México se puso mayor énfasis en el estudio de los bioinoculantes hasta que fue afectada la producción interna de los fertilizantes químicos. México era un exportador competitivo a nivel mundial de fertilizantes químicos y contaba con las mejores tecnologías de su época hasta 1970; por lo tanto, el gobierno federal tenía la capacidad de ofrecer diferentes apoyos al sector agrícola (Ávila, 2001; Grageda *et al.*, 2012).

Pero entonces, ¿cómo fue que la agricultura en México se vio afectada por la baja en el consumo de fertilizantes si era uno de los países exportadores más competitivos del principal insumo agrícola? De los años de 1987 a 1997, fue el tiempo donde se dan las principales problemáticas que afectaron el consumo de fertilizantes en México.

En 1987, México sufrió una sobrevaluación del peso mexicano respecto al dólar estadounidense, esto estimuló las importaciones e inhibió las exportaciones, desembocando en una menor producción nacional de fertilizantes, encareciendo los fertilizantes producidos internamente e inclinándose a favor del consumo de fertilizantes importados (Díaz, 1994; Ávila, 2001).

La dificultad de importar fertilizantes en México antes de 1990 era debido principalmente a los complejos requisitos necesarios para tramitar permisos y a los altos costos de aranceles; sin embargo, los agricultores recibían algunos apoyos para disponer de ellos; por ejemplo, el subsidio sobre precios de fertilizantes. En 1990, incrementó el gas natural y el amoníaco, el gobierno federal vendió a la iniciativa privada el sistema de producción y distribución de fertilizantes, así como también se retiró la mayoría de los subsidios y en 1992 Fertimex se privatizó; y aunque la política de apertura comercial a nivel internacional eliminó los permisos necesarios de importación de muchos productos (incluyendo fertilizantes); esto causó una problemática en el consumo de los fertilizantes, principalmente en los productos fabricados en México (Ávila, 2001; Grageda *et al.*, 2012).

Finalmente, los biofertilizantes comenzaron a ser utilizados extensivamente en México a partir de 1999 en diferentes cultivos de interés comercial por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y se siguen incrementando la búsqueda de nuevas bacterias potenciales para desarrollar nuevos bioinoculantes (Garza *et al.*, 2003).

Como conclusión, diferentes eventos históricos generaron un encarecimiento de los fertilizantes químicos en México, una disminución en su consumo y, por lo tanto, se generó una reducción en la productividad agrícola, así como una pérdida en las ganancias para el agricultor; por lo tanto, los agricultores se vieron obligados a adoptar otras alternativas tecnológicas para amortiguar los efectos negativos generados en la productividad.

4.4.2. Fertilizantes químicos.

Otro tema importante para tratar que antecede a todos los trabajos enfocados a la búsqueda de microorganismos que potencien el crecimiento de plantas, son las problemáticas ecológicas del uso

de fertilizantes químicos, que nos deja ver claramente la importancia de estas líneas de investigación para enfoques sustentables. Como ya se mencionó, los fertilizantes han sido utilizados desmesuradamente desde 1950; sin embargo, no fue hasta 50 años después que se puso atención en los posibles efectos negativos sobre el ambiente. Los fertilizantes químicos comúnmente utilizados son los nitrogenados y fosfatados; cada uno de ellos puede afectar de distintas formas el medio ambiente como se discutirá a continuación.

El nitrógeno es un nutriente muy importante que se adiciona en la mayoría de los cultivos agrícolas para asegurar mayor producción y calidad. Los fertilizantes nitrogenados son los más utilizados a nivel mundial; y se aplican en forma de amoníaco, que es generado industrialmente por la técnica Haber-Bosch; esta técnica ha sido de suma importancia a lo largo de la historia para poder abastecer la creciente demanda de alimentos (Smil, 2001; Stewart *et al.*, 2005). Sin embargo, gran parte del nitrógeno que se utiliza para fertilizar se pierde en el ambiente ya sea por dinitrificación o lixiviación (Erisman *et al.*, 2008; G. Katz, 2019).

Las emisiones de nitrógeno reactivo han incrementado con el paso de los años en la atmósfera (Vgr. NO y NH₃), muchas veces estos compuestos son depositados en ecosistemas terrestres que por naturaleza carecen de nitrógeno, esta fertilización accidental puede llevar a una pérdida de biodiversidad (Erisman *et al.*, 2008). Por otro lado, similar a esto, cuando diferentes nitratos son arrastrados a ecosistemas costeros pueden promover la generación de algas que afectan la vida de muchas especies circundantes (Camargo, 2007).

La lixiviación puede arrastrar los nitratos directamente a mantos acuíferos y esto puede causar acidificación del agua, además puede llegar a ser perjudicial para los animales (incluyendo a los humanos) que se abastecen del agua contaminada con nitratos y nitritos; altos niveles nitratos pueden llegar a ser mucho más graves para los lactantes llegando a causar metahemoglobinemia, por lo que el consumo de fertilizantes debe ser bien controlado (Camargo, 2007; Basulto *et al.*, 2014). Según la organización mundial de la salud, valores superiores de 50 mg/L de nitratos y arriba de 3 mg/L de nitritos pueden ser perjudiciales para la salud humana (WHO, 2008).

Los fertilizantes fosfatados son menos utilizados que los nitrogenados; sin embargo, su generación puede llegar a ser una fuente potencial de contaminación, ya que algunos residuos de su fabricación como el fosfoyeso puede contener As, Se, Cd, Pb, Cr, Ni, Hg, U, Cu, y/o Zn por lo que las propiedades de este subproducto deben analizarse para su aprovechamiento y evitar contaminación (Al-Masri *et al.*,

2004; Jacomino et al 2009). Muchos de estos elementos traza persisten como impurezas en los fertilizantes fosfatados comerciales, y al ser utilizados en un tiempo prolongado pueden llegar a acumularse en los suelos; sin embargo, difícilmente alcanzan niveles superiores a la norma, pero es algo que se debe controlar para que no suceda (Zubillaga *et al.*, 2002). Además, la aplicación excesiva de fertilizantes fosfatados puede afectar inclusive la microbiota de los mismos cultivos, por ejemplo, reduciendo el funcionamiento micorrízico para la absorción de Zn (Lambert *et al.*, 1979). Por lo anterior es necesario buscar alternativas para la disminución del uso de fertilizantes químicos y buscar un equilibrio sustentable en su uso.

4.4.3. Tipos de biofertilizantes.

Un biofertilizante es un producto que contiene microorganismos y que al ser inoculados pueden vivir en simbiosis con la planta y proporcionar diferentes estrategias benéficas que ayudan a su crecimiento, desarrollo y tolerancia a diferentes tipos de estrés (Vessey, 2003). Los microorganismos que se han caracterizado con capacidad de entablar una interacción benéfica con las plantas y realizar biofertilizantes son los hongos y las bacterias.

Los **biofertilizantes compuestos a partir de hongos** se basan en la dependencia que tienen las plantas a las relaciones micorrízicas (Varma, 2012). Las micorrizas mantienen un sistema de reciclaje de nutrientes y ayudan a dar estructura y estabilidad al suelo por medio de la formación de micelio y sustancias adherentes; estas características ayudan no solo a evitar que la planta carezca de nutrientes, sino también, contrarresta los efectos de erosión del suelo y ayudan a una menor necesidad de fertilizantes químicos (Lozano *et al.*, 2015).

Algunas de las ventajas nutricionales que proporcionan los hongos micorrízicos a las plantas son: el reciclaje de nutrientes, la solubilización de algunos minerales no asimilables por las plantas como los fosfatos, incrementan el área de superficie para la captación de nutrientes ya que el micelio de las micorrizas actúa como una extensión de las raíces, y algunos otros hongos no micorrízicos también tienen la capacidad de producir diferentes reguladores de crecimiento de plantas, además de que muchos tienen la capacidad antagónica contra patógenos (Cardoso *et al.*, 2003; Cardoso y Kuyper, 2006; Grageda *et al.*, 2012). Muchas de estas características son similares a las proporcionadas por los **biofertilizantes compuestos a partir de bacterias**, y que además ya se mencionaron con mayor detalle en la introducción.

Los biofertilizantes comerciales más importantes a nivel mundial están compuestos principalmente por micorrizas, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma*; y en México, son generados mayoritariamente por el INIFAP (Grageda *et al.*, 2012; Aguado y Moreno, 2012).

Particularmente para México, se comenzó a adoptar la tecnología de los biofertilizantes por medio del “programa de Validación de Biofertilizantes” en 1999, apoyado por el Gobierno Federal y el INIFAP. En este programa se comenzaron a utilizar fertilizantes constituidos por los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum* y por esa razón son los géneros más altamente evaluados en México. Otra de las líneas de investigación del INIFAP con las que se comenzó, es el desarrollo de fertilizantes con micorrizas, en donde se logró la producción de alrededor de 600 000 kg de micorriza anuales y finalmente el INIFAP se enfocó también a la búsqueda de nuevos microorganismos promotores de crecimiento en diferentes zonas agroecológicas del país (Aguado y Moreno, 2012). Diferentes biofertilizantes bacterianos se han comercializado y han tenido gran éxito. El biofertilizante bacteriano “INI2709” realizado por INIFAP a partir de diferentes cepas de *Pseudomonas* es un ejemplo, este ha demostrado efectos positivos en diferentes cultivos de interés comercial y en maíz de temporal demostró reducir la necesidad de dosis de fertilizantes químicos en un 50% (Aguado *et al.*, 2009; Aguado y Moreno, 2012).

Existen infinidad de ejemplos de bioinoculantes exitosos en diferentes especies de plantas que se han descrito con potencial para realizar biofertilizantes comerciales. En frijol, Aguirre *et al.*, 2005, documentó un incremento en materia seca con ayuda de la inoculación de *Rhizobium etli*, *Azospirillum brasiliense* y *Glomus intraradices* en condiciones de estrés hídrico. Angulo *et al.*, 2014 identificaron y caracterizaron diferentes cepas aisladas (de los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus*) de *Eucalyptus nitens* con capacidad de producir ácido indolacético (AIA), solubilizar fosfato y expresar la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa y ayudaron a la promoción de crecimiento de la misma planta en invernadero. Diferentes cepas del género *Streptomyces*, fueron propuestas por Condori *et al.*, 2019, como candidatos para ser utilizados como agentes de biofertilización en cultivos de ajos, por las diferentes ventajas proporcionadas a las plantas como la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos.

Una gran cantidad de biofertilizantes se han comercializado, y los ejemplos de trabajos relacionados a la búsqueda, identificación y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal son interminables. Sin embargo, aunque existan ya caracterizados diferentes microorganismos benéficos

para las plantas; siempre es importante optimizar y/o realizar nuevos biofertilizantes que mejoren la calidad de los cultivos con una menor necesidad de fertilizantes químicos. Además, es importante tomar en cuenta que existen diversos factores (físicos, químicos y ambientales) por los cuales los microorganismos pueden llegar a fracasar en el desarrollo de la simbiosis con la planta, por lo que se necesitan más alternativas que puedan utilizarse en diferentes condiciones (Grageda *et al.*, 2012). En el presente trabajo nos enfocamos a la búsqueda de bacterias que están adaptadas a condiciones de baja disponibilidad de agua y por tanto, pudieran ejercer una tolerancia al estrés hídrico.

4.5. *Arabidopsis thaliana*, un organismo modelo para la caracterización de PGPR.

La caracterización de PGPRs lleva en un futuro a la elaboración de bioinoculantes, y para ello, se utilizan diferentes cultivos de importancia económica para analizar la interacción y sus beneficios; por ejemplo, en maíz y arroz (Gholami *et al.*, 2009; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Sin embargo, muchos trabajos también se enfocan en investigar la interacción de PGPRs con plantas consideradas organismos modelo, como es el caso de *A. thaliana* (Rahmoune *et al.*, 2017; Agarwal *et al.*, 2019). Para el caso particular de las Actinobacterias se han publicado recientemente muchos trabajos enfocados a la búsqueda de bacterias benéficas, tanto en cultivos de interés comercial como en *A. thaliana* (Sathya *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Worsley *et al.*, 2020; Qi *et al.*, 2021). La ventaja de realizar este tipo de trabajos en *A. thaliana* es la alta caracterización que se tiene de la planta.

Arabidopsis thaliana es el organismo modelo mejor investigado en biología vegetal, es una planta pequeña con un periodo de vida muy corto, una sencilla y alta producción de semilla, principales razones para ser considerada organismo modelo (Koorneef y Meinke, 2010); *A. thaliana*, como en cualquier tipo de maleza, no tiene ninguna importancia agronómica y no fue más que un organismo insignificante durante mucho tiempo incluyendo en el ramo de la ciencia (Leonelli, 2007). El primer trabajo experimental con *A. thaliana* fue en 1907 por Friedrich Laibach y además en 1943, Laibach presentó un caso claro de la facilidad de *A. thaliana* para estudios genéticos (Rédei, 1992; Koorneef y Meinke, 2010). Sin embargo, hasta finales de 1970 fue que esta planta tomó más atención en el área experimental y con el paso del tiempo fue tomando fuerza hasta la actualidad, lográndose en mayor medida la comprensión de diferentes procesos; por ejemplo, una mejor comprensión de los

mecanismos moleculares para la floración y el desarrollo de las raíces, la recepción de la luz, el metabolismo y la resistencia a las enfermedades (Leonelli, 2007).

Los estudios de interacción planta–microorganismo realizados en *A. thaliana* son abundantes, y específicamente hablando de la caracterización en interacción con PGPRs ha sido utilizado, en especial en los últimos años; ya que, además de ser de fácil manejo en el laboratorio, es muy útil gracias a la existencia de diferentes líneas reporteras y mutantes que se han utilizado para este tipo de estudios, y todo gracias a la comprensión que se tiene de *A. thaliana*. Por ejemplo, la línea reportera *DR5::GUS* la cual induce la expresión de la enzima β -glucuronidasa en presencia de auxinas, ayuda a evaluar la presencia de esta fitohormona en tejidos de plantas (Ulmasov *et al.*, 1997), por lo que es posible ver espacio temporalmente la producción de auxinas en presencia de una interacción con una PGPR; de manera similar otras líneas reporteras ayudan a evaluar otros parámetros; como *TIR1::GUS* que muestra la expresión espacio temporal del receptor TIR1 (Greay *et al.*, 1999); *CyCB1;1::GUS* el cual un indicador de proliferación celular, que indica de manera puntual los sitios de división celular en la raíz (Colón-Carmona *et al.* 1999), la línea mutante *rhd6* es otro ejemplo, esta tiene un defecto en la diferenciación celular del pelo radical, y el fenotipo se restaura con aplicación de auxinas (Masucci y Schiefelbein 1994), por lo que es de ayuda para identificar PGPR productoras de auxinas. Múltiples trabajos han utilizado alguna de estas líneas reporteras y/o mutantes o inclusive otras que no se mencionan para caracterizar la interacción de *A. thaliana* con alguna PGPR (Ortiz-Castro *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020; Méndez-Gómez *et al.*, 2020; Jiménez-Vázquez *et al.*, 2020; Méndez-Gómez *et al.*, 2021).

Por lo anterior, el uso de este organismo modelo es interesante para la caracterización de PGPRs y se decidió utilizar *A. thaliana* en el presente trabajo, sin dejar atrás el utilizar alguna especie de interés comercial, ya que siempre es el objetivo final, en este caso se utilizó la variedad criolla de maíz cacahuazintle para algunos experimentos.

4.6. *Zea mays* L.

El maíz, además de ser muy importante social y culturalmente hablando, es el alimento básico en México, principalmente consumido en forma de tortilla, el maíz representa la mitad del volumen total de alimentos consumidos cada año, proporciona cerca de la mitad de las calorías y la tercera parte de las proteínas consumidas por la población mexicana (Massieu y Lechuga, 2002). La demanda del maíz

va en aumento y es debido a que muchos productos alimenticios para consumo humano y pecuario dependen del maíz para su elaboración (mas de 4 mil productos); por ejemplo, harina de maíz nixtamal, almidones, fructosa, botanas, cereales y alimentos balanceados; sin embargo, también se ha generado una alta demanda el maíz debido a algunos productos no alimenticios; por ejemplo, la elaboración de bioetanol (Palacio Legislativo de San Lázaro, 2007; Massieu y Lechuga, 2002). En Estados Unidos se utiliza el maíz como una de las principales plantas para la elaboración de bioetanol, esto hace que sea uno de los principales productores de maíz a nivel mundial y en 2004 utilizó el 12% de su cosecha para la elaboración de este biocombustible y ha ido en aumento cada año (Palacio Legislativo de San Lázaro, 2007).

La demanda de maíz en México es muy alta y la producción muy defisitaria, claro, para la cantidad requerida, ya que México es de los principales productores; por ejemplo, en 2006 la producción de maíz fue de 21.3 millones de toneladas, mientras que la demanda fue de 26.2 millones de toneladas, por lo que cerca de 5 millones de toneladas se tuvieron que importar (similar a lo que se ha importado en otros años), algunas de las razones de la baja producción respecto a la demanda de maíz en el país es por ejemplo, a la falta de acceso al crédito por parte de los productores de este cultivo, la limitada infraestructura de riego, los limitados subsidios que otorga el Gobierno a este sector comparado con los que se otorgan a los productores de otros países europeos y Estados Unidos pero también a la escasa investigación científica en este campo (Palacio Legislativo de San Lázaro, 2007).

Diferentes estudios han evaluado los efectos de PGPRs en diferentes variedades de maíz; por ejemplo, con *Klebsiella spp.*, *Azospirillum spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Azotobacter spp.* (Carcaño *et al.*, 2006; Rangel-Lucio *et al.*, 2011; Shahzad *et al.*, 2013; León *et al.*, 2015). Sin embargo, en capítulos anteriores ya se planteó la importancia de la búsqueda de una gran variedad de PGPRs y en este capítulo se plantea la importancia de utilizar maíz para evaluar el efecto de actinobacterias.

La variedad que se utilizó fue maíz cacahuazintle, las áreas más importantes de producción comercial de esta variedad criolla de maíz se localizan en el Valle de Toluca del Estado de México, donde se siembran un aproximado de 20 000 hectáreas para la producción de elote y 10 500 hectáreas para consumo de grano, donde el rendimiento por hectárea varía entre 2500 a 6500 kg/ha (González *et al.*, 2006). Esta variedad criolla tiene una gran importancia cultural, se utiliza para la elaboración de un platillo típico llamado “pozole” y se comercializa en un precio mayor que el del maíz blanco (Arellano *et al.*, 2010).

V. Justificación.

En los últimos años se ha puesto gran atención en el uso de bioinoculantes para mejorar el crecimiento de cultivos de interés, sustituyendo fertilizantes químicos que causan daños al medio ambiente, así como contrarrestar varios tipos de estrés biótico y abiótico.

Las bacterias de la rizósfera han sido empleadas para generar aplicaciones importantes en la agricultura; sin embargo, por la gran biodiversidad que no se ha explorado, se estima una gran cantidad de bacterias (endófitas y de la rizósfera) que pudieran tener un potencial benéfico en el desarrollo vegetal y en la resistencia a diferentes tipos de estrés que pudieran servir para disminuir el uso de fertilizantes químicos. Dentro del dominio de las bacterias, las Actinobacterias no han sido totalmente caracterizadas y en estudios recientes se ha demostrado su capacidad de producción de hormonas y metabolitos diversos que modulan el desarrollo vegetal.

VI. Hipótesis.

Rizobacterias de zonas áridas promoverán el crecimiento vegetal de *A. thaliana* y *Zea mays* a través de diferentes mecanismos como la solubilización de fosfatos y la modulación de la respuesta hormonal.

VII. Objetivos.

7.1. Objetivo general.

Identificar y caracterizar Actinobacterias de diferentes zonas áridas de San Luis Potosí que promuevan el crecimiento vegetal.

7.2. Objetivos específicos.

- 1.- Identificar molecularmente cepas bacterianas aisladas de zonas áridas por medio de la secuenciación de un fragmento del gen 16S rRNA bacteriano.
- 2.- Identificar Actinobacterias con capacidad de solubilizar fosfatos.
- 3.- Emplear líneas reporteras de *Arabidopsis thaliana* para identificar Actinobacterias que activen vías de señalización hormonal.
- 4.- Evaluar el efecto de las Actinobacterias aisladas en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.
- 5.- Evaluar el crecimiento y desarrollo de cultivos de la variedad criolla de maíz cacahuazintle inoculados con Actinobacterias.

VIII. Materiales y métodos.

8.1. Material biológico.

8.1.1. Microorganismos.

Las bacterias identificadas molecularmente en este trabajo fueron aisladas de distintos sitios en el estado de San Luis Potosí e incluyen aislados del sedimento en suelo de Salinas de Hidalgo, bacterias asociadas a *Opuntia megarrhiza* procedentes de suelo, raíz, o cladodio en Sierra de Álvarez y Cerro de San Pedro. Estas bacterias fueron aisladas y proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (Tabla suplementaria 1).

8.1.2. Material vegetal.

Todos los ensayos *in vitro* de promoción de crecimiento y desarrollo con Actinobacterias fueron realizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col-0; esto con el objetivo de facilitar la búsqueda de las bacterias benéficas debido a su fácil manejo en el laboratorio. Para la identificación de Actinobacterias que activen vías de señalización hormonal se emplearon diferentes líneas reporteras: 1- la línea reportera *DR5::GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997), que ayudó a la evaluación de la producción espacio temporal de auxinas, 2- la línea reportera *CyCB1;1::GUS* (Colón-Carmona *et al.* 1999), la cual es un indicador de proliferación celular y 3- la línea reportera *TIR1::GUS* (Greay *et al.*, 1999) que permite observar los cambios en los patrones de expresión del receptor de auxinas. Finalmente se utilizó una variedad criolla de maíz (*Zea mays*) cultivar cacahuazintle en ensayos de promoción de crecimiento en interacción con Actinobacterias.

8.2. Condiciones de crecimiento y preservación del material biológico.

Se utilizaron dos medios de cultivo diferentes para el crecimiento de las bacterias, 1- el medio sólido “agar harina de soya-manitol” (MSF) y 2- el medio líquido Luria Bertani (LB) con 0.5% de NaCl ajustado a un pH 7.0. Las bacterias se incubaron a una temperatura de 28°C en oscuridad y en agitación constante a 250 rpm (para cultivos líquidos). Para la preservación de las cepas se realizaron stocks en glicerol de esporas (50% de glicerol y 50% de un lavado de esporas en medio LB) y se almacenaron a -80°C.

Las plántulas de *A. thaliana* fueron crecidas *in vitro* en medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) 0.5X en una cámara de crecimiento “RTOP - 800D” en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e intensidad lumínica ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad y de igual manera para *Zea mays* a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

8.3. Identificación de bacterias.

La identificación bacteriana se realizó de forma molecular, utilizando los oligonucleótidos 27F (5'- AGA GTTTGA TCM TGG CTC AG -3') y 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT -3') para amplificar por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región conservada de aproximadamente 1500 pb que codifica al rRNA 16S bacteriano. Primero, cada cepa fue crecida en medio MSF sólido y las colonias fueron raspadas y recuperadas de la placa en medio LB líquido para ser posteriormente empastilladas y así obtener la biomasa bacteriana que se utilizó para extraer el DNA molde.

La extracción del DNA se realizó con el buffer CTAB 2X (Clarke J *et al.*, 2009), y la recuperación del amplicón se realizó obteniendo la banda de 1500pb (generada por la PCR) a partir de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y purificada con el kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit”, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las bandas purificadas con una concentración mínima de 20ng/ μL fueron enviadas para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA). Las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Posteriormente, se obtuvieron las secuencias consenso mediante alineamientos de las secuencias sentido y antisentido en el programa “Geneious 4.8.5” y finalmente estas secuencias se utilizaron para realizar un análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos NCBI.

8.4. Desinfección de la semilla.

En todos los experimentos se utilizaron semillas de *A. thaliana* previamente desinfectadas como se describe a continuación; las semillas se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 800 μL etanol al 90% durante 2 min, se retiró el etanol y se agregaron 800 μL de hipoclorito de sodio al 30% y se mantuvieron en agitación a 1000 rpm durante 7 min; posteriormente se retiró el hipoclorito de sodio y se realizaron 10 lavados con agua destilada estéril (cada lavado en agitación a 1000 rpm durante 1 min). Por otro lado, para el caso de la desinfección de la semilla de maíz se realizó agitando

las semillas durante 30 min a 200 rpm en hipoclorito de sodio al 50% y posteriormente se retiró el hipoclorito de sodio mediante varios lavados con agua destilada estéril, utilizándose un aproximado de 2 L de agua estéril para 30 a 60 semillas.

8.5. Preparación del inóculo bacteriano y modo de inoculación.

Para tener un control en todos los experimentos que involucraron la inoculación de las bacterias (incluyendo los experimentos de morfología bacteriana, solubilización de fosfatos y hemólisis bacteriana), se generó un inóculo bacteriano preparado justo al momento de cada experimento a una concentración de 1×10^6 esporas/mL y se llevó a cabo inoculando un volumen de 5 μ L de la solución bacteriana en la punta de la raíz de las plántulas de *A. thaliana* y para el caso de los ensayos de solubilización de fosfatos y hemólisis se colocaron los 5 μ L en el centro de la placa del medio de cultivo (más detalles de los experimentos se describen más adelante). Para la preparación del inóculo se crecieron las bacterias en medio SMF hasta su esporulación (entre los 7 y 14 días de crecimiento), las esporas fueron recolectadas con lavados con agua destilada y cuantificadas en una cámara de Neubauer para posteriormente ajustar la concentración deseada. Para el caso de la inoculación de las semillas germinadas de maíz, éstas fueron inoculadas en la base del hipocótilo y alrededor de la semilla plantada en tierra con 1 mL de inóculo bacteriano a una concentración de 1×10^7 esporas/mL.

8.6. Características de la morfología bacteriana, hemólisis bacteriana y solubilización de fosfatos.

La característica del crecimiento bacteriano se evaluó inoculando 5 μ L de la solución bacteriana a una concentración de 1×10^6 esporas/mL en el centro de la placa en los medios de cultivo MS (Murashige-Skoog), MSF (Soya-Manitol), ASC (agar sangre de carnero) y PVK (Pikovskaya) en donde los resultados se evaluaron a los 3 días de crecimiento, a excepción del crecimiento en el medio PVK que se evaluó a los 14 días de crecimiento en la placa.

Las pruebas de hemólisis bacteriana se realizaron en el medio de cultivo agar sangre, en donde los resultados se registraron como hemólisis alfa (una hemólisis parcial alrededor de la colonia), hemólisis

beta (cuando se presenta un halo totalmente clarificado alrededor de la colonia bacteriana) y hemólisis gamma (sin presencia de hemólisis) los resultados se evaluaron a los 3 días de haber sido inoculadas en el medio.

Las pruebas de solubilización de fosfatos se realizaron utilizando el medio PKV, el cual está compuesto de extracto de levadura (0.5 g/L), dextrosa (10 g/L), fosfato de calcio (5 g/L), sulfato de amonio (0.5 g/L), cloruro de potasio (0.2 g/L), sulfato de magnesio (0.1 g/L), sulfato de manganeso (0.0001 g/L), sulfato ferroso (0.0001 g/L) y agar (15 g/L) (Pikovskaya, 1948). Se considera un microorganismo con capacidad de solubilizar fosfatos cuando se genera un halo clarificado (halo de solubilización) en la periferia de la colonia, a los 14 días de haber sido inoculadas se evaluó el resultado.

8.7. Evaluación de la promoción de crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Columbia (Col-0).

Todos los ensayos de promoción y crecimiento en *A. thaliana* (densidad de raíces laterales, longitud de raíz principal, peso fresco de raíces y de parte aérea y área de la roseta) se realizaron con los mismos tiempos de crecimiento e inoculación como se describe a continuación; **1-** se sembraron las semillas desinfectadas en placas de Petri (10 a 12 semillas por placa) y se sincronizaron durante 3 días a 4°C en obscuridad; **2-** se pusieron a luz en condiciones controladas (16h luz/ 8h oscuridad a una temperatura de 22±2°C) durante 7 días; **3-** al cumplir 7 días de crecimiento en luz, se inocularon con las Actinobacterias en la punta de la raíz de cada plántula (como se describió anteriormente) y **4-** a los 7 días post inoculación (dpi) se evaluaron las diferencias estadísticas entre plántulas inoculadas con las Actinobacterias y plántulas control sin inocular por medio del análisis ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett con el programa Graphpad prism 6, se utilizó un diseño completamente al azar y a continuación se especifican las “n” de cada experimento.

Para la densidad de raíces laterales, se cuantificaron el número de raíces laterales y se dividió entre la longitud de la raíz principal utilizando una n = 90. Para la longitud de raíz principal se realizaron mediciones en el programa “image pro plus 4.5” utilizando una n = 90 para el análisis estadístico. En el peso fresco de raíces y peso fresco de parte aérea se separaron las raíces de la parte aérea e inmediatamente se pesaron en bloques de 10 plantas en una balanza analítica n= 90 en los experimentos con *S. ambofaciens* y *S. pratensis* (y una n=80 en el caso del experimento donde se evaluaron *S. albidoflavus*, *S. cyaneofuscatus* y *S. badius*). Las mediciones del área de la roseta se

realizaron en el programa "image pro plus 4.5" midiendo su forma irregular utilizando una n= 90 para el análisis estadístico.

8.8. Análisis histoquímico.

La expresión del gen reportero de la beta glucuronidasa (*GUS*) en cada una de las líneas reporteras de *A. thaliana* utilizadas (*DR5::GUS*, *CyCB1;1::GUS*, *TIR1::GUS*) se analizó por medio de una determinación histoquímica de *GUS* siguiendo el protocolo estándar de Jefferson, 1987. Se compararon las diferencias visuales de los resultados de las tinciones de *GUS* de las plántulas control no inoculadas contra las de los dos tratamientos (plántulas inoculadas con *S. ambofaciens* e inoculadas con *S. pratensis*), utilizando un duplicado con una n = 10. Todos los ensayos histoquímicos se realizaron con los mismos tiempos de crecimiento e inoculación que se describieron anteriormente para los ensayos de crecimiento de *A. thaliana* Col-0 (3 días de estratificación de la semilla, 7 días de crecimiento en luz, y 7 días en interacción con las bacterias inoculadas), la única diferencia fue que los resultados cualitativos de las líneas reporteras no solo se evaluaron a los 7 días post inoculación (dpi) sino también a los 3 dpi.

8.9. Microscopia óptica.

Plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 de 10 días de edad fueron inoculadas en la punta de la raíz con 10^6 esporas por mL de cada bacteria. A los 7 dpi, las raíces de estas plantas fueron fotografiadas en un microscopio óptico (Leica) empleando el objetivo 40x. Se obtuvieron al menos 10 observaciones por tratamiento. Para algunas observaciones se realizaron tinciones con safranina diluida 1:10 y por otro lado, otras observaciones se obtuvieron con safranina sin diluir y un posterior lavado con etanol 96% y finalmente lavadas con agua destilada antes de montarlas al microscopio.

8.10. Evaluación de la promoción de crecimiento y desarrollo en *Zea mays* L.

El ensayo de peso seco de parte aérea y peso seco de raíz se realizó de la siguiente manera; **1-** se pusieron a sincronizar las semillas desinfectadas a 4°C durante 2 días en oscuridad; **2-** se pasaron a una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ aún en oscuridad para su germinación; **3-** posteriormente se sembraron e inocularon (como se describió anteriormente) en condiciones controladas (16h luz/ 8h oscuridad a una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$) y **4-** a los 14 dpi se separó la parte aérea de la raíz y se

realizó el peso seco de ambas partes, se evaluaron las diferencias estadísticas por medio de un ANOVA de una vía entre plántulas inoculadas con las Actinobacterias y plántulas control sin inocular utilizando una $n=10$.

IX. Resultados y discusión.

X. Conclusión.

En el presente estudio se encontraron dos cepas de Actinobacterias del género *Streptomyces* (*S. ambofaciens* y *S. pratensis*) con capacidad de promover el crecimiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, las cuales fueron probadas también en una planta de interés comercial (*Zea mays*) con resultados prometedores. Ambas cepas (*S. ambofaciens*, *S. pratensis*) promovieron el desarrollo de la raíz incrementando el número de raíces laterales e incrementaron la biomasa de la raíz; de igual forma contribuyeron a un incremento en la biomasa de la roseta. Debido a esto, se buscaron a través de diferentes líneas reporteras, *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997); *CyCB1;1::GUS* (Colón-Carmona et al. 1999) y *TIR1::GUS* (Greay et al., 1999) posibles mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de *A. thaliana* en interacción con estas Actinobacterias; todos los ensayos realizados indicaron una posible respuesta a través de vías dependientes de auxinas. Los experimentos realizados tanto en medio de cultivo MS como en maceta, indican que muy posiblemente serán de fácil manejo en experimentos de campo; además, las pruebas de hemólisis indicaron que ninguna de las bacterias empleadas en los experimentos muestran un riesgo potencial para la salud, ya que no se detectaron bacterias beta hemolíticas.

XI. Perspectivas.

Los resultados mostraron una posible respuesta dependiente de auxinas; sin embargo, esto abre panoramas para profundizar en los mecanismos moleculares de promoción de crecimiento que ayuden a elucidarlos con mayor detalle; particularmente la respuesta a auxinas, por ejemplo, mediante la determinación de la expresión de genes que se activen en la respuesta a estas hormonas y realizar pruebas mediante el reactivo de Salkowski que ayuden a determinar de manera más directa si las cepas aisladas producen auxinas. Por otro lado, además de profundizar en vías de señalización, sería bueno identificar metabolitos producidos por las bacterias seleccionadas que pudieran estar relacionados con la promoción del crecimiento.

El fenotipo de las plantas inoculadas en comparación del control sin inocular, aparentaron ser más grandes, con mayor densidad de raíces laterales y presentaron un color verde más intenso que las plantas no inoculadas, por lo que también se propone realizar mediciones del contenido de clorofila, así como parámetros fisiológicos relacionados al proceso de fotosíntesis.

Una de las observaciones interesantes del trabajo fue encontrar la asociación/colonización de la bacteria a lo largo de toda la raíz, existe la posibilidad de que la bacteria internaliza dentro de la raíz; por lo que se proponen análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para visualizar cortes longitudinales y transversales de la raíz en busca de un crecimiento bacteriano intra o intercelular.

De las Actinobacterias que se crecieron en medio Pikovskaya, *S. ambofaciens* fue la única que mostró tener la capacidad de solubilizar fosfatos, este es un resultado importante debido a que las plantas necesitan ayuda de este proceso para poder asimilar fuentes de fósforo; por lo que se propone como perspectiva cuantificar la capacidad de solubilización y comparar este resultado con el de otras bacterias solubilizadoras de fosfato.

Dado los resultados positivos tanto en medio de cultivo (con *A. thaliana*), como en maceta (en maíz), una de las perspectivas a corto plazo es realizar experimentos en campo. Además, hay que considerar que la mayoría de las bacterias fueron aisladas de suelos áridos, por lo que deberían caracterizarse con pruebas de estrés hídrico. De manera general todos los resultados apuntan a que se deben realizar estudios encaminados para la elaboración de un bioinoculante con las Actinobacterias, *S. ambofaciens* y *S. pratensis*.

XII. Bibliografía.

- Aguado G.A. y Moreno B. (2012). Biofertilizantes bacterianos desarrollados por el INIFAP. In: Aguado-Santacruz, G.A. (1a ed). Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. INIFAP/SAGARPA. México, 1: pp. 15-170
- Aamir M, Aslam A, Khan MY, Jamshaid MU, Ahmad M, Asghar HN, Zahir ZA (2013) Co-inoculation with Rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under field condition of semi-arid climate. *Asian J Agric Biol* 1: pp 7–12
- Abud, Y. C., Ochoa, M. S., Trujillo, M. M., & Pedraza, R. M. (2010). Plantas, hongos micorrizicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 12(1): pp 65-71.
- Agarwal, P., Singh, P. C., Chaudhry, V., Shirke, P. A., Chakrabarty, D., Farooqui, A., Nautiyal, C. S., Sane, A. P., & Sane, V. A. (2019). PGPR-induced OsASR6 improves plant growth and yield by altering root auxin sensitivity and the xylem structure in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 240: 153010.
- Aguado G.A.; Rascón Q. y Luna A. 2012. Impacto Económico y Ambiental del Empleo de Fertilizantes Químicos. In: Aguado-Santacruz, G.A. (1a ed). Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. INIFAP/SAGARPA. México, 1: pp. 1-22.
- Aguirre J.F., Kohashi J., Trejo C., Acosta J.A., Cadena J., & Peña A. (2005). Inoculación de *Phaseolus vulgaris* L. con tres microorganismos y su efecto en tolerancia a sequía. *Agricultura Técnica en México*, 31(2): pp 125-137.
- Al-Masri, M. S., Amin, Y., Ibrahim, S., & Al-Bich, F. (2004). Distribution of some trace metals in Syrian phosphogypsum. *Applied Geochemistry*, 19(5): pp 747-753.
- Almeida, D. M., Oliveira, M. M., & Saibo, N. J. (2017). Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genetics and molecular biology*, 40(1): pp 326-345.
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista argentina de microbiología*, 46(4): pp 338-347.
- Ann, M. N., Cho, Y. E., Ryu, H. J., Kim, H. T., & Park, K. (2013). Growth Promotion of Tobacco Plant by 3-hydroxy-2-Butanone from *Bacillus vallismortis* EXTN-1. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 17(4): pp 388–393.
- Arellano J. L., Gámez A. J., & Ávila M. A. (2010). Potencial agronómico de variedades criollas de maíz Cacahuacintle en el Valle de Toluca. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(4): pp 37-41.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, A., Islam, M. Z., Shahidullah, S. M., & Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7): pp 1247-1252
- Ávila, J. (2001). El mercado de los fertilizantes en México/Situación actual y perspectivas. *Problemas Del Desarrollo*, 32(127): pp 189-207.

- Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2017). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Physiologia plantarum*, 161(4): pp 502-514.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5, 1554
- Basulto, J., Manera, M., & Baladia, E. (2014). Ingesta dietética de nitratos en bebés y niños españoles y riesgo de metahemoglobinemia. *Pediatría Atención Primaria*, 16(61): pp 65-69.
- Bautista, G. H., & Valdés, M. (2008). Frankia y la simbiosis actinorrízica. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3-4): pp 90-102.
- Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (2000). Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 46(3): pp 229-236.
- Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K., & Kalra, A. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific reports*, 6(1): pp 1-16.
- Blake, R. C., Choate, D. M., Bardhan, S., Revis, N., Barton, L. L., & Zocco, T. G. (1993). Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 12(8): pp 1365-1376.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7): pp 1499-1510.
- Brazelton, J. N., Pfeufer, E. E., Sweat, T. A., Gardener, B. B. M., & Coenen, C. (2008). 2, 4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(10): pp 1349-1358.
- Brian G. (2019) Chapter 91 - Nitrate contamination in karst groundwater, Editor(s): William B. White, David C. Culver, Tanja Pipan, *Encyclopedia of Caves (Third Edition)*, Academic Press. pp 756-760,
- Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., & Walczak, M. (2013). Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84: pp 104-110.
- Calderón A., Aspajo C., & Pretel O. (2019). Estrés oxidativo y especies reactivas. *REBIOL*, 38(2): pp 53-65.
- Calvo, P., Zebelo, S., McNear, D., Kloepper, J., & Fadamiro, H. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria induce changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression of nitrate and ammonium uptake genes. *Journal of Plant Interactions*, 14(1): pp 224-231.
- Camarena G., & De la Torre R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2): pp 157-162.

- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2): pp 98-110
- Carcaño M. G., Ferrera R., Pérez J., Molina J. D., & Bashan, Y. (2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*, 24(4): pp 493-502.
- Cardoso, I. M., & Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, ecosystems & environment*, 116(1-2): pp 72-84.
- Cardoso, I. M., Boddington, C., Janssen, B. H., Oenema, O., & Kuyper, T. W. (2003). Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. *Agroforestry systems*, 58(1): pp 33-43.
- Cassan, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil biology*, 45(1): pp 28-35.
- Cavaletti, L., Monciardini, P., Bamonte, R., Schumann, P., Rohde, M., Sosio, M., & Donadio, S. (2006). New lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6): pp 4360-4369.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1): pp 33-41.
- Cheng, Z., Park, E., & Glick, B. R. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7): pp 912-918.
- Clarke J. D. (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. Cold Spring Harbor protocols, pdb.prot 5177.
- Colón A, You R, Haimovitch-Gal T, Doermer P (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 20: pp 503–508
- Condori S. J., Fernández P. R., & Valderrama M. R. (2019). Aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp rizosféricos promotores del crecimiento vegetal. *Idesia (Arica)*, 37(2): pp 109-116.
- Conn, V. M., Walker, A. R., & Franco, C. M. M. (2008). Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2): pp 208-218.
- Contreras H. A., Macías L., Cortés C., & López J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3): pp 1579-1592.
- Correa, M. F. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores De Micorrizas (Tesis doctoral). Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. Universidad de Granada.

- de Bruijn F. (2015) Biological Nitrogen Fixation. In: Lugtenberg B. (eds) Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer, Cham. pp 215-224
- de la Vega, M., Santalla, M., & Marsolais, F. (Eds.). (2017). Prospects: The Importance of Common Bean as a Model Crop. In: The Common Bean Genome. Compendium of plant genomes . Springer International Publishing. pp 289-295
- De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2009). Chapter 6 Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. Advances in Botanical Research, 51: pp 223–281.
- Díaz, E. L. (1994). El peso mexicano 1982-1993 ¿Está sobrevaluado?. CIENCIA ergo-sum, 1(1): pp 12-20.
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, cell & environment, 32(12): pp 1682-1694.
- Domenico, P. (2020). Optimised fertilisation with zeolites containing Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in *Ranunculus asiaticus*. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 10(1): pp 96-102.
- Domínguez, J., Aira, M., & Gómez-Brandón, M. (2009). El papel de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes. Revista Ecosistemas, 18(2): pp 20-31
- Duff, R. B., & Webley, D. M. (1959). 2-Ketogluconic acid as a natural chelator produced by soil bacteria. Chemistry and industry, pp 1376-1377.
- Egamberdieva, D. (2009). Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. Acta Physiologiae Plantarum, 31(4): pp 861-864.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., & Hashem, A. (2015). *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. Saudi journal of biological sciences, 22(6): pp 773-779.
- Erisman, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z., & Winiwarter, W. (2008). How a century of ammonia synthesis changed the world. Nature Geoscience, 1(10): pp 636-639.
- FAO. 1998. World Reference Base for Soil Resources, by ISSS–ISRIC–FAO. World Soil Resources Report No. 84. Rome.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: Sustainable agriculture. Springer, Dordrecht. pp. 153-188
- Fincheira, P., & Quiroz, A. (2018). Microbial volatiles as plant growth inducers. Microbiological research, 208: pp 63-75.
- Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. Plant and Soil, 410(1-2): pp 335-356.
- Franco M. (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. Revista Peruana de Biología, 16(2): pp 239-242.

- Garza, M. B. I., Vázquez, P. V., García, D. G., Tut, C., Martínez, I. R., Campos, A. T & Cabrera, O. G. (2003). Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México. *Agricultura Técnica en México*, 29(2): 213-225.
- Gerber, N. N. (1979). Volatile substances from actinomycetes: their role in the odor pollution of water. *CRC critical reviews in microbiology*, 7(3): 191-214.
- Gerhardson, B., Alström, S., & Rämert, B. (1985). Plant reactions to inoculation of roots with fungi and bacteria. *Journal of phytopathology*, 114(2): 108-117.
- Gholami, A., Shahsavani, S., & Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49: pp 19-24.
- González H A, J Sahagún C, D de J Pérez L, A Domínguez L, R Serrato C, V Landeros F, E Dorantes C (2006) Diversidad fenotípica de maíz cacahuacintle en el Valle de Toluca. México. *Rev. Fitotec. Mex.* 29: pp 255-261.
- González D., & Zapata O. (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82: pp 53-61.
- Goodfellow, M. 2012. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. in: Goodfellow, M., P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig & W. B. Whitman (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: 2nd ed*, Springer, New York..., Vol. 5 (The Actinobacteria), pp. 33-34.
- Gowtham, H. G., Duravadivel, P., Ayusman, S., Sayani, D., Gholap, S. R., Niranjana, S. R., & Hariprasad, P. (2020). ABA analogue produced by *Bacillus marisflavi* modulates the physiological response of host-plant under drought stress. *bioRxiv*. p 159.
- Grageda, O. A., Díaz, A., Peña J. J., & Vera, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6): pp 1261-1274.
- Grant, C., Bittman, S., Montreal, M., Plenchette, C., & Morel, C. (2005). Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1): pp 3-14.
- Gray, W. M., del Pozo, J. C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T & Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin–ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development*, 13(13) pp 1678-1691.
- Grossman, A. R., Gonzalez-Ballester, D., Shibagaki, N., Pootakham, W., & Moseley, J. (2009). Responses to macronutrient deprivation. In *Abiotic Stress Adaptation in Plants* Springer, Dordrecht. pp. 307-348
- Gupta, R., SINGAL, R., SHANKAR, A., KUHAD, R. C., & SAXENA, R. K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(3): pp 255-260.
- 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): p 56.

- Han, H., Zhang, S., & Sun, X. (2009). A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. *African Journal of Biotechnology*, 8 (3): pp 348-353
- Han, Y., Wang, R., Yang, Z., Zhan, Y., Ma, Y., Ping, S., ... & Yan, Y. (2015). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas stutzeri* A1501 facilitates the growth of rice in the presence of salt or heavy metals. *J Microbiol Biotechnol*, 25(7): pp 1119-1128.
- Hao, H. T., Zhao, X., Shang, Q. H., Wang, Y., Guo, Z. H., Zhang, Y. B & Wang, R. Y. (2016). Comparative digital gene expression analysis of the *Arabidopsis* response to volatiles emitted by *Bacillus amyloliquefaciens*. *PloS one*, 11(8): pp 1-24
- Haselwandter K., Winkelmann G. (2007) Siderophores of Symbiotic Fungi. In: Varma A., Chincholkar S.B. (eds) *Microbial Siderophores*. Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg. 12: pp 91 - 103
- Hirsch, P. R., & Spokes, J. R. (1988). *Rhizobium leguminosarum* as a model for investigating gene transfer in soil. In: Klingmuller W. *Risk Assessment for Deliberate Releases* (1a Ed.). Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 10-17
- Hussain, A., & Hasnain, S. (2009). Cytokinin production by some bacteria: its impact on cell division in cucumber cotyledons. *African Journal of Microbiology Research*, 3(11): pp 704-712.
- Imsande, J., & Touraine, B. (1994). N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant physiology*, 105(1): p 3.
- IUSS Working Group WRB, (2015). Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. *Informes sobre recursos mundiales de suelos 106*. FAO, Roma
- Jacomino, V. M. F., Oliveira, K. A. P. D., Taddei, M. H. T., Siqueira, M. C., Carneiro, M. E. D. P., Nascimento, M. R. L. & Mello, J. W. V. D. (2009). Radionuclides and heavy metal contents in phosphogypsum samples in comparison to cerrado soils. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33(5): pp 1481-1488.
- Jan, A. U., Hadi, F., Midrarullah, A. A., & Rahman, K. (2017). Role of CBF/DREB Gene Expression in Abiotic Stress Tolerance. A Review. *Int. J. Hortic. Agric.*, 2: pp 1-12.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol* 5: pp 387–405
- Jiménez, K. R., García, E., Barrera, S., Ortiz, R., Ruiz, L. F., Ramos, B. P & López, J. (2020). The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution. *The Plant Journal*, 103(5), pp 1639-1654.
- Jing, Yd., He, Zl. & Yang, Xe. (2007) Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B*, 8: pp 192–207.
- Jog, R., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S. (2016). Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. In: Subramaniam G., Arumugam S., Rajendran V. (eds). *Plant growth promoting actinobacteria* Springer, Singapore. pp 33-45.

- Kalita, M., Bharadwaz, M., Dey, T., Gogoi, K., Dowarah, P., Unni, B. G & Saikia, I. (2015). Developing novel bacterial based bioformulation having PGPR properties for enhanced production of agricultural crops. 53: pp 56-60
- Kang, S. M., Adhikari, A., Lee, K. E., Park, Y. G., Shahzad, R., & Lee, I. J. (2020). Gibberellin producing rhizobacteria *Pseudomonas koreensis* mu2 enhance growth of lettuce (*Lactuca sativa*) and Chinese cabbage (*Brassica rapa, chinensis*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2020: pp 166-170.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., & Fritig, B. (1987). Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1, 3- β -glucanase activity. *The EMBO journal*, 6(11): pp 3209-3212.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4(1): pp 23-32.
- Kloepper, J. W. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France. 2: pp. 879-882.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11): pp 1259-1266.
- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6): pp 909-921.
- Kusajima, M., Shima, S., Fujita, M., Minamisawa, K., Che, F. S., Yamakawa, H., & Nakashita, H. (2018). Involvement of ethylene signaling in *Azospirillum* sp. B510-induced disease resistance in rice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 82(9): pp 1522-1526.
- Laborda, P., Chen, X., Wu, G., Wang, S., Lu, X., Ling, J., ... & Liu, F. (2020). *Lysobacter gummosus* OH17 induces systemic resistance in *Oryza sativa* 'Nipponbare'. *Plant Pathology*, 69(5): pp 838-848.
- Laibach, F. (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot. Archiv*, 44: pp 439-455.
- Laibach, Friedrich. Zur Frage nach der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich... Diss. Bonn., 1907.
- Lambert, D.H., Baker, D.E., Cole, H.J.R., 1979. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper, and other elements. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: pp 976-980.
- Lamz P, A., & González M. C. (2013). La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos tropicales*, 34(4): pp 31-42.
- Lee, S., Trĩnh, C. S., Lee, W. J., Jeong, C. Y., Truong, H. A., Chung, N & Lee, H. (2020). *Bacillus subtilis* strain L1 promotes nitrate reductase activity in *Arabidopsis* and elicits enhanced growth performance in *Arabidopsis*, lettuce, and wheat. *Journal of plant research*, 133(2): pp 231-244.

- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., & Fritig, B. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(19): pp 6750-6754.
- Leidi, E. O., & Pardo, J. M. (2002). Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. 2: pp 60-90
- León, L. H., & Rojas, L. M. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter* spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*, 6(4): pp 247-257.
- Leonelli, S. (2007). Growing weed, producing knowledge an epistemic history of *Arabidopsis thaliana*. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 29 (2): pp 193-223.
- Lichtfouse E., Hamelin M., Navarrete M., Debaeke P., Henri A. (2011) Emerging Agroscience. In: Lichtfouse E., Hamelin M., Navarrete M., Debaeke P. (eds) *Sustainable Agriculture* Springer, Dordrecht. 2: pp 3-14
- Liu, Y., Xu, Y., Liu, X., Zhu, Y., & Liao, H. (2018). Effects of endophytic *Streptomyces albus* OsiSh-10 on *Arabidopsis thaliana* root architecture. *Genomics and Applied Biology*, 37(8): pp 3503-3509.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The plant journal*, 28(4): pp 465-474.
- López B J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2): pp 207-217.
- Lozano Sánchez, J., Armbrecht, I., & Montoya Lerma, J. (2015). Hongos formadores de micorrizas arbusculares y su efecto sobre la estructura de los suelos en fincas con manejos agroecológicos e intensivos. *Acta Agronómica*, 64(4): pp 289-296.
- Lutts, S., Majerus, V., & Kinet, J. M. (1999). NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 105(3): pp 450-458.
- Marquina, E. M., Ramírez, Y., & Castro, Y. (2018). Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annuum* L. Var. cacique gigante. *Bioagro*, 30(1): pp 3-16.
- Masood, S., Saleh, L., Witzel, K., Plieth, C., & Mühling, K. H. (2012). Determination of oxidative stress in wheat leaves as influenced by boron toxicity and NaCl stress. *Plant physiology and Biochemistry*, 56: pp 56-61.
- Massieu T Y., Lechuga J., (2002). El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo Análisis Económico. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco Distrito Federal, México. 17(36): pp. 281-303
- Masucci, J. D., & Schiefelbein, J. W. (1994). The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin-and ethylene-associated process. *Plant physiology*, 106(4): pp 1335-1346.

Masucci, J. D., & Schiefelbein, J. W. (1996). Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the Arabidopsis root. *The Plant Cell*, 8(9): pp 1505-1517.

Maurel, C., & Nacry, P. (2020). Root architecture and hydraulics converge for acclimation to changing water availability. *Nature Plants*, 6(7): pp 744-749.

McWilliam, J. R. (1986). The national and international importance of drought and salinity effects on agricultural production. *Functional plant biology*, 13(1): pp 1-13.

Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current opinion in plant biology*, 3(2): pp 153-162.

Medrano, F. G. (2012). Evolucion de la vegetacion desertica de America del Norte. En: *Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación*. Instituto Nacional de Ecología (1a Ed). pp 27-37

Mehrvaz, S., Chaichi, M. R., & Alikhani, H. A. (2008). Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barley (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment*, 3(6): pp 822-828.

Méndez M., Castro E., Peña C. A., Reyes, H., López J., & García-Pineda, E. (2020). Azospirillum brasilense Sp245 lipopolysaccharides induce target of rapamycin signaling and growth in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology*, 253: pp 1-7

Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in Pseudomonas species. *Environmental microbiology reports*, 2(3): pp 403-411.

Mishina, T. E., & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 50(3): pp 500-513.

Mohammadipanah, F., & Dehghani, M. (2017). Classification and taxonomy of Actinobacteria. In: *Biology and biotechnology of Actinobacteria*. Springer, Cham. pp. 51-77

Mojicevic, M., D'Agostino, P. M., Pavic, A., Vojnovic, S., Senthamaraiannan, R., Vasiljevic, B. & Nikodinovic-Runic, J. (2020). Streptomyces sp. BV410 isolate from chamomile rhizosphere soil efficiently produces staurosporine with antifungal and antiangiogenic properties. *MicrobiologyOpen*, 9(3): pp 1-18

Molina C., Creus, C. M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., & Lamattina, L. (2008). Aerobic nitric oxide production by Azospirillum brasilense Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(7): pp 1001-1009.

Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58: pp 459-481.

- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V., & Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194(3): pp 346-352.
- Mukherjee, G., Saha, C., Naskar, N., Mukherjee, A., Mukherjee, A., Lahiri, S., ... & Seal, A. (2018). An endophytic bacterial consortium modulates multiple strategies to improve arsenic phytoremediation efficacy in *Solanum nigrum*. *Scientific reports*, 8(1): pp 1-16.
- Nazoa, P., Vidmar, J. J., Tranbarger, T. J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., ... & Touraine, B. (2003). Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant molecular biology*, 52(3), pp 689-703.
- Núñez Cobo, J., & Verbist, K. (2018). Atlas de sequías de América Latina y el Caribe. UNESCO Publishing. P 8
- Ochiai El (1995). Toxicity of Heavy Metals and Biological Defense: Principles and Applications in Bioinorganic Chemistry-VII. *Journal of Chemical Education*, 72(6), 479-484
- Orozco M., Velázquez C., Macías L. I., Santoyo, G., Flores I., Alfaro R., & Valencia E. (2013). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant and soil*, 362(1-2): pp 51-66.
- Ortiz, T., Ocampo, V., Prada, L. D., & Franco, M. (2016). Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2): pp 32-39.
- Ortiz R., Campos J. & López J. J *Plant Growth Regul* (2019). *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* Influence *Arabidopsis* Root System Architecture Through an Auxin Response Mediated by Bioactive Cyclodipeptides 39, pp 254-265
- Pal, A. K., Mandal, S., & Sengupta, C. (2019). Exploitation of IAA Producing PGPR on mustard (*Brassica nigra* L.) seedling growth under cadmium stress condition in comparison with exogenous IAA application. *Plant Science Today*, 6(1): pp 22-30.
- Palacio Legislativo de San Lázaro, F. (2007). México: El Mercado del Maíz y la Agroindustria de la Tortilla. Centro de Estudios de las Finanzas Públicas. pp 1-20
- Pandey, A., Chandra, N., Srivastava, A., Kumar, D., & Kumar, S. (2018). Antimicrobial Metabolites Producing Soil Microorganisms: An update. 21(1): pp 46-57
- Park, Y. G., Mun, B. G., Kang, S. M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C. W., ... & Yun, B. W. (2017). *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS One*, 12(3): pp 1- 28
- Park, Y. S., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J. M., & Park, K. (2015). Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(2): pp 361-365.

- Phi, Q. T., Park, Y. M., Seul, K. J., Ryu, C. M., Park, S. H., Kim, J. G., & Ghim, S. Y. (2010). Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(12): pp 1605-1613.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28: pp 489-521.
- Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* , 17: pp 362-37
- Qi, Y., Li, X., Wang, J., Wang, C., & Zhao, S. (2021). Efficacy of plant growth-promoting bacteria *Streptomyces werraensis* F3 for chemical modifications of diseased soil of ginseng. *Biocontrol Science and Technology*, 31(2): pp 219-233.
- Rahmoune, B., Morsli, A., Khelifi-Slaoui, M., Khelifi, L., Strueh, A., Erban, A., ... & van Dongen, J. T. (2017). Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. *Journal of plant interactions*, 12(1): pp 1-6.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28(3): pp 142-149.
- Ramírez R., Larrinaga J. Á., Murillo B., Hernández N. Y., & Fujiyama, H. (2008). Respuesta antioxidante enzimática en frutos de chile ancho (*Capsicum annum* L.) bajo condiciones de estrés salino. *Interciencia*, 33(5): pp 377-383.
- Rangel J. A., Rodríguez M. D. L. N., Ferrera R., Castellanos J. Z., Ramírez R. M., & Alvarado E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2): pp 269-279.
- Rédei, G.P. (1992) A heuristic glance at the past of *Arabidopsis* genetics. In *Methods in Arabidopsis Research* (Koncz, C., Chua, N.H. and Schell, J., eds). Singapore: World Scientific, pp. 1–15.
- Richardson, M., Valdes-Rodriguez, S., & Blanco-Labra, A. (1987). A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. *Nature*, 327(6121): pp 432-434.
- Rousk, J., & Bengtson, P. (2014). Microbial regulation of global biogeochemical cycles. *Frontiers in microbiology*, 5: p 103.
- Rzedowski (1968). Las principales zonas áridas de México y su vegetación. *Bios. Revista del Seminario de Estudios Biológicos* 1: pp 4-24
- Saif, S., Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). Role of phosphate-solubilizing Actinomycetes in plant growth promotion: current perspective. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms* Springer, Cham. pp. 137-156.
- Samaniego B. Y., Reyes A., Moreno O. A., & Tun z, J. M. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 32(1): pp 10-22.
- Sanzón D., & Zavaleta E. (2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2): pp 154-164.

- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*, 7(2): pp 1-10.
- Shahzad, S. M., Arif, M. S., Riaz, M., Iqbal, Z., & Ashraf, M. (2013). PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European journal of soil biology*, 57: pp 27-34.
- Shinoda, S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi, S. I., Yamamoto, S., Taniguchi, H., & Mizuguchi, Y. (1991). Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *Microbiology*, 137(12): 2705-2711.
- Shutsrirung, A., Chromkaew, Y., Pathom-Aree, W., Choonluchanon, S., & Boonkerd, N. (2013). Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(3): pp 322-330.
- Singh, D. P., Patil, H. J., Prabha, R., Yandigeri, M. S., & Prasad, S. R. (2018). Actinomycetes as Potential Plant Growth-Promoting Microbial Communities. In *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. Elsevier. pp. 27-38
- Smil, V. (2001). A brilliant discovery. In: *Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production*. MIT press. pp 61-77
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4): pp 425-448.
- Stewart, W. M., Dibb, D. W., Johnston, A. E., & Smyth, T. J. (2005). The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production. *Agronomy Journal*, 97(1): pp 1-6.
- Suslow, T. V., & Schroth, M. N. (1982). Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology*, 72(1): pp 111-115.
- Suthindhiran, K., Jayasri, M. A., Dipali, D., & Prasar, A. (2014). Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern. *Journal of basic microbiology*, 54(10): pp 1098-1109.
- Tak, H. I., Ahmad, F., & Babalola, O. O. (2013). Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Springer, New York, NY.. 223: pp. 33-52
- Tiepo, A. N., Constantino, L. V., Madeira, T. B., Gonçalves, L. S. A., Pimenta, J. A., Bianchini, E., ... & Stolf-Moreira, R. (2020). Plant growth-promoting bacteria improve leaf antioxidant metabolism of drought-stressed Neotropical trees. *Planta*, 251(4): pp 1-11.
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99: pp 108-117.

- Tiwari, S., Prasad, V., Chauhan, P. S., & Lata, C. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8: p 1510.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74(1): pp 46-53.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9(11): pp 1963-1971.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., ... & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, 4: p 356.
- Vaishnav, A., & Choudhary, D. K. (2019). Regulation of drought-responsive gene expression in *Glycine max* L. Merrill is mediated through *Pseudomonas simiae* strain AU. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(1): pp 333-342.
- Vala, A. K., Dave, B. P., & Dube, H. C. (2006). Chemical characterization and quantification of siderophores produced by marine and terrestrial aspergilli. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(6): pp 603-607.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36(1): pp 453-483.
- Varma, A. (2012). *Mycorrhizae - the Friendly Fungi: What We Know, What Should We Know, and How Do We Know?* in: *Mycorrhiza manual* (Ed.). Springer Science & Business Media. pp 1-24.
- Velázquez C., Macías L.I., (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 339: pp 329–340
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G.F. Fitzgerald, K.F. Chater and D. van Sinderen. 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 495–548.
- Véry, A. A., & Sentenac, H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1): pp 575-603.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2): pp 571-586.
- World Health Organization. (2008). *Guidelines for drinking-water quality: second addendum Recommendations*. 1: pp 1-92
- World Health Organization; 2017. *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum*. Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. pp 1-541
- Worsley, S. F., Newitt, J. T., Rassbach, J., Batey, S. F., Holmes, N. A., Murrell, C & Hutchings, M. I. (2020). *Streptomyces* endophytes promote the growth of *Arabidopsis thaliana*. *bioRxiv*, 532309. pp 1-28

- Xu, J., Li, X. L., & Luo, L. (2012). Effects of engineered *Sinorhizobium meliloti* on cytokinin synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress. *Applied and environmental microbiology*, 78(22): pp 8056-8061.
- Yakushiji, H., Nonami, H., Fukuyama, T., Ono, S., Takagi, N., & Hashimoto, Y. (1996). Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in Satsuma mandarin fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(3): pp 466-472.
- Yamanaka, H., Satoh, T., Katsu, T., & Shinoda, S. (1987). Mechanism of haemolysis by *Vibrio vulnificus* haemolysin. *Microbiology*, 133(10): pp 2859-2864.
- Yandigeri, M. S., Meena, K. K., Singh, D., Malviya, N., Singh, D. P., Solanki, M. K., ... & Arora, D. K. (2012). Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions. *Plant Growth Regulation*, 68(3): pp 411-420.
- Yang, Y., Qi, M., & Mei, C. (2004). Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *The Plant Journal*, 40(6), 909-919.
- Yaxley, J. R., Ross, J. J., Sherriff, L. J., & Reid, J. B. (2001). Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant physiology*, 125(2): pp 627-633.
- Yi, H. S., Ahn, Y. R., Song, G. C., Ghim, S. Y., Lee, S., Lee, G., & Ryu, C. M. (2016). Impact of a bacterial volatile 2, 3-butanediol on *Bacillus subtilis* rhizosphere robustness. *Frontiers in Microbiology*, 7(993): pp 1-11
- Yi, K., Menand, B., Bell (2010).. A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet* 42: pp 264–267
- Yu, SM., Lee, Y.H. (2013). Plant growth promoting rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates the seedling growth of Chinese cabbage through indole emission. *Plant Soil* 370: pp 485–495
- Yuwono, T., Handayani, D., & Soedarsono, J. (2005). The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. *Australian journal of agricultural research*, 56(7): pp 715-721.
- Zafar-ul-Hye, M., Muhammad, H., Zahir, F., Ahmad, Z., Hussain, M., & Hussain, A. (2014). Application of ACC-deaminase containing rhizobacteria with fertilizer improves maize production under drought and salinity stress. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(3): pp 591–596
- Zagier, S. S. S., & Alfadhil, F. A. A. (2017). Induced systemic resistance in eggplant against cucumber mosaic virus (CMV) by Bacteria *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense*. *Kufa Journal for Agricultural Sciences*, 9(3): pp 156-167
- Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., Shi, H., & Paré, P. W. (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6): pp 737-744.
- Zhang, H., Kim, MS., Krishnamachari, V. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226(4): pp 839-851

Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. *Molecules*, 24(7): p 1411.

Zou, C., Li, Z., & Yu, D. (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *The Journal of Microbiology*, 48(4): pp 460-466.

Zubillaga, M. S., & Lavado, R. S. (2002). Fertilización fosfatada prolongada y contenido de elementos traza en un Argiudol típico de La Pampa Ondulada. 20(2): pp 110-113

XIII. Anexos.