



CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA DEL EFECTO DE *Streptomyces* spp. EN PLANTAS MODELO Y DE INTERES AGRICOLA

By

Ilian Arianette Martínez Derreza

is licensed under a

[Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**



**CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA DEL EFECTO DE *Streptomyces*  
spp. EN PLANTAS MODELO Y DE INTERÉS AGRÍCOLA**

Por:

**IA. Ilian Arianette Martínez Derreza**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Agropecuarias



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



**CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA DEL EFECTO DE *Streptomyces*  
spp. EN PLANTAS MODELO Y DE INTERÉS AGRÍCOLA**

Por:

**IA. Ilian Arianette Martínez Derreza**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Agropecuarias

Director de tesis:

Dr. Pablo Delgado Sánchez-FAV

Codirectora:

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler-FC

Asesora:

Dra. María de la Luz Guerrero González-FAV

Asesor Externo:

Dr. Raúl Rodríguez Guerra-INIFAP

El trabajo titulado “**Caracterización morfofisiológica del efecto de *Streptomyces spp.* en plantas modelo y de interés agrícola**” fue realizado por la **IA. Ilian Arianette Martínez Derreza** como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Agropecuarias** y fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

Dr. Pablo Delgado Sánchez  
Director

---

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler  
Codirectora

---

Dra. María de la Luz Guerrero González  
Asesora

---

Dr. Raúl Rodríguez Guerra  
Asesor externo

---

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a 29 días del mes de Agosto del 2022.

## **DEDICATORIAS**

Este trabajo está dedicado a:

A mi papi José Luis, por cuidarme desde arriba y permitirme llegar hasta aquí.

Solo Dios sabe cuando hace coincidir los caminos de las personas que pudieran ser significativas en la vida, aquellas que te dejan mucho y se les toma un enorme aprecio.

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Pablo Delgado Sánchez; en el Laboratorio de Interacción planta.-microorganismo bajo la dirección de la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y en el Laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental General Terán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CIR- Noreste, bajo la asesoría del Dr. Raúl Rodríguez Guerra.

El proyecto de tesis contó con el apoyo del Proyecto: “Aprovechamiento de la biodiversidad microbiana contra problemas fitosanitarios de cultivos del área de influencia del CIR-Noroeste” (Número de proyecto: 13403834745).

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, donde concluí satisfactoriamente el programa educativo de Maestría en Ciencias Agropecuarias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU 1078501) para la realización de mis estudios.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal a cargo del Dr. Pablo Delgado Sánchez y la Dra. María de la Luz Guerrero que me permitió adentrarme a la rama de biotecnología vegetal.

Al Doctor Pablo Delgado Sánchez, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por la confianza de otorgarme este estudio, por ser maestro, tutor y mentor.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler por su disponibilidad de tiempo y su entrega a los proyectos donde participa, así como la facilidad brindada para la obtención de material de laboratorio.

A la Dra. María de la Luz Guerrero por ser el ejemplo que seguir, por la actitud que posee llena de perseverancia y seriedad, con vocación y ética. Por aportar sus conocimientos, basados en su experiencia en este campo para enriquecer y mejorar, así como ampliar el enfoque de los proyectos.

Al Dr. Raúl Rodríguez Guerra por su disponibilidad, apoyo y orientación para realizar este trabajo.

CONTENIDO	Página
DEDICATORIAS .....	iii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
CAPITULO I .....	2
INTRODUCCIÓN .....	2
Hipótesis .....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA .....	1
MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
Análisis histoquímico de la actividad <i>GUS</i> .....	7
Inoculación de semillas y plántulas de tomate con <i>Streptomyces</i> spp. ....	8
Medición de parámetros morfofisiológicos .....	8
Determinación cualitativa de producción de poliaminas .....	8
Análisis estadístico.....	9
RESULTADOS.....	10
Caracterización en plantas modelo .....	10
Análisis histoquímico de <i>GUS</i> .....	13
Inoculación de semillas y plántulas de tomate con <i>Streptomyces</i> spp. ....	16
Medición de parámetros morfofisiológicos .....	21
Determinación cualitativa de producción poliaminas .....	27
DISCUSIÓN .....	28
CAPITULO II .....	30
INTRODUCCIÓN .....	35
MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
Escrutinio contra hongos fitopatógenos.....	36
Coinoculación .....	36
Confrontaciones duales.....	37
Termoestabilidad de compuestos difusibles .....	37

RESULTADOS.....	38
Escrutinio contra hongos fitopatógenos.....	38
Coinoculación.....	38
Confrontaciones duales.....	41
Termoestabilidad de compuestos difusibles.....	43
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIÓN.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Col-0 en interacción indirecta con actinobacterias.....	10
2	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de las líneas reporteras <i>DR5::GUS</i> y <i>CyCB1;1::GUS</i> en interacción directa con actinobacterias.....	11
3	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en interacción directa con actinobacterias a los 25 dpi.....	12
4	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en interacción con actinobacterias.....	13
5	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea reportera <i>DR5::GUS</i> en interacción con actinobacterias.....	14
6	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea reportera <i>CyCB1,1::GUS</i> en interacción con actinobacterias.....	15
7	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea reportera <i>DR5::GUS</i> en interacción con actinobacterias.....	16
8	Plantas de tomate de 15 días en condiciones de invernadero inoculadas con las cepas 3AC y 4AC.....	17
9	Plantas de tomate de 15 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 3AC.....	<b>18</b>
10	Plantas de tomate de 15 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 4AC.....	<b>18</b>
11	Plantas de tomate de 30 días en condiciones de invernadero inoculadas con las cepas 3AC y 4AC.....	<b>19</b>
12	Plantas de tomate de 30 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 3AC.....	20
13	Plantas de tomate de 30 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 4AC.....	21
14	Evaluación de la variable largo de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero.....	22
15	Evaluación de la variable diámetro de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero.....	23
16	Evaluación de la variable largo de hoja en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero.....	24

17	Evaluación de la variable largo de raíz en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero.	25
18	Evaluación de la variable peso fresco y peso seco en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero.....	26
19	Producción en medio líquido de PAs por cepas de actinobacterias.....	27
20	Esclerocios de la coinoculación de la cepa PCR 3 y <i>S. rolfsii</i> a las 72 hpi en AN.....	39
21	Esclerocios de la coinoculación de la cepa 3AC y <i>S. rolfsii</i> a las 72 hpi en AN.....	<b>39</b>
22	Esclerocios de la coinoculación de la cepa 11AC y <i>S. rolfsii</i> a las 72 hpi en AN.....	40
23	Vista en estereoscopio de esclerocios de <i>Sclerotium rolfsii</i> posteriores a la transferencia en AN.....	40
24	Confrontación dual de la cepa PCR 3 vs <i>Sclerotium rolfsii</i> 72 hpi.....	41
25	Confrontación dual de la cepa 3 AC vs <i>Sclerotium rolfsii</i> 72 hpi.....	42
26	Confrontación dual de la cepa 11 AC vs <i>Sclerotium rolfsii</i> 72 hpi.....	43
27	Resiembra en AN de esclerocios expuestos a diferentes concentraciones de medios con la cepa PCR3 y sus compuestos.....	44
28	Resiembra en AN de esclerocios expuestos a diferentes concentraciones de medios con la cepa 3AC y sus compuestos.....	44
29	Resiembra en AN de esclerocios expuestos a diferentes concentraciones de medios con la cepa 11AC y sus compuestos.....	45

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Porcentajes de crecimiento radial de diferentes hongos fitopatogenos.....	38

## RESUMEN

Las actinobacterias son un grupo de microorganismos con características peculiares como lo es la producción de metabolitos secundarios y de exudados de especial interés para la biotecnología debido a la aplicación que estos tienen en diversas ramas como la farmacéutica y en el ámbito agropecuario. En la agricultura el uso de microorganismos está probablemente enfocado hacia el control biológico de plagas y enfermedades; sin embargo, son mayores las propiedades que poseen con relación a la promoción de crecimiento vegetal. El número de estudios y experimentos con cepas de *Streptomyces* spp. son mínimos debido a la poca información existente con respecto a la forma en la que interactúan con las plantas para ejercer su efecto benéfico. En el presente trabajo se utilizaron las cepas 3AC (*Streptomyces* sp.) y la 4AC (*Streptomyces diasticus* subsp. *ardiasticus*) las cuales fueron sometidas a pruebas de promoción de crecimiento en condiciones de invernadero, y pruebas *in vitro* en las que se inocularon líneas reporteras de *Arabidopsis thaliana* sensibles a auxinas (*DR5::GUS*) y reporteras de ciclo celular (*CyCB1;1::GUS*). En *Arabidopsis thaliana* se determinó que la cepa 3AC propicia mayor desarrollo foliar en comparación a los dos tratamientos restantes; sin embargo, la cepa 4AC obtuvo un mayor desarrollo radicular. En *Solanum lycopersicum* se obtuvieron resultados similares en las pruebas de promoción de crecimiento debido a la inoculación de ambas cepas. Las cepas 3AC y 4AC de actinobacterias poseen la cualidad de producir poliaminas e influir en las rutas de auxinas, siendo clave el tiempo de interacción con las plantas.

Palabras clave: *Streptomyces*, promoción de crecimiento, poliaminas, auxinas, *DR5::GUS*, *CyCB1;1::GUS*

## SUMMARY

Actinobacteria are a group of microorganisms with peculiar characteristics such as the production of secondary metabolites and exudates of special interest for biotechnology due to their application in various branches such as pharmaceuticals and agriculture. In agriculture, the use of microorganisms is probably focused on the biological control of pests and diseases; however, the properties they possess in relation to the promotion of plant growth are greater. The number of studies and experiments with *Streptomyces* spp. strains are minimal due to the lack of information on how they interact with plants to exert their beneficial effect. In the present work, strains 3AC (*Streptomyces* sp.) and 4AC (*Streptomyces diasticus* subsp. *ardiasticus*) were subjected to growth promotion tests under greenhouse conditions, and in vitro tests in which auxin-sensitive *Arabidopsis thaliana* reporter lines (*DR5-GUS*) and cell cycle reporter lines (*CyCBI;1::GUS*) were inoculated. In *Arabidopsis thaliana*, strain 3AC was found to have greater leaf development than the other two treatments; however, strain 4AC obtained greater root development than the other two. In *Solanum lycopersicum*, similar results were obtained in the growth promotion tests due to the inoculation of both strains. Actinobacteria strains 3AC and 4AC can produce polyamines and influence auxin pathways, being key to the interaction time with plants.

Key words: *Streptomyces*, growth promotion, polyamines, auxins, *DR5::GUS*, *CyCBI;1::GUS*.

## CAPITULO I

### CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA DEL EFECTO DE *Streptomyces* spp. EN PLANTAS MODELO Y DE INTERÉS AGRÍCOLA

#### INTRODUCCIÓN

La hortaliza más importante según la FAO en 2020 fue el tomate (*Solanum lycopersicum*) debido a su demanda mundial, donde México tuvo una producción de 3,259, 630 ton, posicionándolo en el lugar número diez a nivel mundial. Para el 2021 la producción fue de 3,031,668.76 ton y el estado de San Luis Potosí se posicionó como líder productor al concentrar un 17.2% de la producción a nivel nacional con 343,670.25 ton (SIAP, 2021) un valor de 2,353 millones de dólares. La producción de tomate tuvo una superficie sembrada de 3,342.20 hectáreas con un rendimiento de 133.66 ton/ha. La aplicación de nuevas tecnologías promueve el uso de microorganismos con fines potencialmente agrícolas, como las actinobacterias (presentes de forma abundante en los suelos) (Dinesh *et al.*, 2017) que poseen cualidades de producción de metabolitos secundarios (Olano *et al.*, 2008) y benefician el desarrollo celular vegetativo. El uso de inoculantes biológicos en los sistemas productivos es una alternativa viable, ya que permite una producción con menores costos y con un menor impacto ambiental al reducir el uso de plaguicidas, fertilizantes químicos y participar en la descomposición de residuos orgánicos. Además, los inoculantes biológicos tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, aportar nutrientes y producir compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de la planta al incrementar los nutrientes disponibles. Lo anterior permite un mayor rendimiento en los cultivos y una mayor producción, así como una disminución en la aparición de enfermedades en las plantas (Loredo *et al.*, 2004). Algunas cepas de actinobacterias son capaces de producir auxinas y poliaminas, las cuales participan en un gran número de procesos fisiológicos como el crecimiento, desarrollo y senescencia, hasta en la protección contra el estrés en las plantas (Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

## **Hipótesis**

El uso de las cepas 3AC y 4AC de *Streptomyces* promoverá y estimulará el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Solanum lycopersicum*) en comparación a plantas no inoculadas con dichas actinobacterias.

Las cepas de *Streptomyces* producirán compuestos con capacidad de inhibir el crecimiento y/o el desarrollo de hongos fitopatógenos.

## **Objetivo General**

Caracterizar el efecto promotor de crecimiento vegetal de las cepas 3AC y 4AC de *Streptomyces* en plantas modelo y de interés agrícola y determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos.

## **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de cepas de *Streptomyces* spp. sobre líneas reporteras de auxinas y ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*.
  - 1.1. Analizar el efecto de las cepas 3AC y 4AC de *Streptomyces* en la síntesis de auxinas mediante el uso de la línea reportera *DR5::GUS*.
  - 1.2. Analizar el efecto de las cepas 3AC y 4AC de *Streptomyces* en el ciclo celular mediante el uso de la línea reportera *CyCB1;1::GUS*.
2. Evaluar parámetros morfofisiológicos en plantas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con *Streptomyces* en condiciones de invernadero.
3. Determinar cualitativamente la producción de poliaminas (PAs) en cepas 3AC y 4AC de *Streptomyces*.
4. Determinar la capacidad de *Streptomyces* para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos.

## REVISIÓN DE LITERATURA

El suelo posee una gran variedad y cantidad de microorganismos los cuales proliferan en el sistema radicular de las plantas (Criollo *et al.*, 2012). Las bacterias asociadas con la rizosfera establecen relaciones no patogénicas con sus hospederos y son capaces de generar diversos mecanismos que benefician el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, promueven la resistencia a diversos tipos de estrés biótico y abiótico, ya que poseen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas o su entorno más cercano (Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

La colonización de la raíz se considera de gran importancia para que el microorganismo ejerza su función. La colonización y la supervivencia dependen de factores físicos, químicos y biológicos como son el pH, la textura del suelo, la disponibilidad de nutrientes, la humedad, la temperatura, la presencia de materia orgánica, especie de la planta y la competencia con otros microorganismos por la ocupación del nicho (Pérez *et al.*, 2017).

Si bien los procesos que median la colonización de la raíz no son del todo claros, la forma en que las bacterias son atraídas hacia la raíz parece estar relacionada con la mayor producción de fuentes de carbono, una mayor cantidad de agua disponible, o la atracción por un gradiente de concentración nutricional o de otros estímulos como lo son la quimiotaxis y la adhesión (Barea *et al.*, 2004).

Los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal inducidos por los microorganismos benéficos involucran la producción de sustancias orgánicas, producto del metabolismo secundario de las bacterias, que son capaces de promover respuestas fisiológicas específicas en las células de la planta, como la producción de fitohormonas o la regulación de estas dentro de la planta. Además, influyen en la disponibilidad de nutrientes, tal es el caso de la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de algunos elementos importantes, tal como el fósforo (Camelo *et al.*, 2011; Franco, 2008).

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas que se encuentran extensamente distribuidas en la naturaleza, poseen la característica típica de formar un micelio, generan

esporas, no producen mucopolisacáridos, por lo que se observan en placas de agar como colonias secas y no cremosas (Ezziyani *et al.* 2004; Franco, 2008). También producen *geosmina*, un compuesto cuya característica particular es el aroma a "tierra húmeda" (Dávila *et al.*, 2013).

El estudio de la morfología de las actinobacterias se basa en sus características microscópicas y macroscópicas, además de pruebas químicas y moleculares (Duraipandiyani *et al.*, 2010). Estas bacterias poseen un DNA con alto contenido de G-C que va hasta más del 70% en el género *Streptomyces*. En hábitats naturales, el género *Streptomyces* suele ser un importante componente de la población total de actinobacterias, son predominantemente de vida libre y se encuentran en una gran mayoría de suelos cultivados, no cultivados y como endófitos en varias partes de la planta (Dinesh *et al.*, 2017).

Existe un grupo de actinobacterias que residen de forma latente en los tejidos internos de las plantas que se denominan endófitas y la asociación de dichas bacterias con la planta huésped se puede dar de dos formas conocidas: comensalista o simbiótica, donde las bacterias obtienen nutrición y refugio de la planta y producen metabolitos secundarios biológicamente activos con efecto benéfico para la planta, que le pueden otorgar resistencia a estrés ambiental (Dinesh *et al.*, 2017)

Se ha reportado que las bacterias endófitas forman interacciones más resistentes con las plantas en comparación con las bacterias rizosféricas o epifitas (Misk & Franco, 2011; Wu *et al.*, 2011), debido a su capacidad de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios que poseen una actividad biológica con diversas funciones (Bérdy, 2005). Aunado a lo anterior, la peculiaridad de algunas cepas de actinobacterias de formar filamentos y esporas les permite fraccionar las partículas del suelo de la rizosfera que se encuentran fuertemente compactadas (Olanrewaju & Babalola, 2018).

Cerca de 23,000 tipos de metabolitos secundarios son producidos por microorganismos, las actinobacterias producen numerosas enzimas extracelulares y metabolitos, los cuales en su mayoría son antibióticos. El 75% de los compuestos biológicamente activos son producidos por el género *Streptomyces* que representan

alrededor de 7,600 compuestos activos (Olano *et al.*, 2008). Estos metabolitos secundarios poseen la capacidad de actuar como antibióticos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antivirales, antiparásitos, antifúngicos, entre otros (Khan *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2019).

Las sustancias promotoras de crecimiento o bioestimulantes son de origen orgánico y contribuyen en el desarrollo de diversos parámetros fisiológicos, ejerciendo su efecto en pequeñas concentraciones (Tahir & Aqeel, 2013). La producción de dichos compuestos por parte de cepas de *Streptomyces* se han involucrado en el crecimiento vegetal por medio de la producción de auxinas, citoquininas y giberelinas (las cuales se encuentran en la planta y son consideradas fitohormonas), sideróforos y la fijación de nitrógeno atmosférico (Olanrewaju & Babalola, 2018).

Las fitohormonas se definen como moléculas orgánicas que en pequeñas concentraciones (<1 mM) regulan diversos procesos celulares a través de la expresión de genes que intervienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de estar implicadas en la señalización de la respuesta a las modificaciones que se producen en su entorno; sin embargo, las auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides están asociadas al desarrollo mientras que el etileno y los jasmonatos están presentes en la respuesta de defensa de las plantas (Ciura & Kruk, 2018; Wang *et al.*, 2020; Wani *et al.*, 2016).

Las auxinas son ácidos orgánicos de bajo peso molecular y de tipo endógeno y sin función nutricional, actúan como señalizadores y mediadores de diversas respuestas, en una etapa temprana de la embriogénesis determinan el patrón de los tejidos y el desarrollo de los órganos, la dominancia apical, el control de la senescencia, la iniciación de las raíces adventicias, el desarrollo de las flores y los frutos, la división y el alargamiento celular al alterar la plasticidad de las paredes celulares. (Cao *et al.*, 2019; Egamberdieva *et al.*, 2017; Heinemann & Sauer, 2010; Olatunji *et al.*, 2017)

Las auxinas que son de tipo exógeno dependen esencialmente de la concentración para la visualización de un efecto sobre el crecimiento y el desarrollo de la planta, con bajas concentraciones de auxinas que promueven el crecimiento, mientras que altas concentraciones reportan un efecto inhibitorio sobre el desarrollo (Zhao, 2018a). El ácido

indol-3-acético (IAA) es la auxina natural más conocida porque es producida además de las plantas por hongos y bacterias en la rizosfera, donde actúa como una molécula de señalización entre las plantas y los microorganismos para promover el crecimiento de las plantas (Duca & Glick, 2020; Li *et al.*, 2018).

El IAA juega un papel regulador en la fisiología bacteriana, la comunicación microbiana y la adaptación a condiciones de estrés, ya que aumenta significativamente la exudación y la extensión de las raíces, acciones que modulan la actividad y la diversidad de las bacterias de la rizosfera que requieren estos compuestos para su desarrollo; una alteración de la homeostasis del IAA provoca cambios fisiológicos; las vías biosintéticas en bacterias se caracterizan genéticamente (desarrollando cepas productoras o deficientes) o bioquímicamente (caracterizando las enzimas que catalizan su biosíntesis) (Duca & Glick, 2020; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2020).

En *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que el IAA se sintetiza por dos vías de señalización; el triptófano (Trp) (Zhao, 2018b, 2012). La producción de Trp tiene un alto costo energético para la célula bacteriana, por lo que sólo se producen altos niveles de IAA endógeno cuando hay un aumento en la cantidad de Trp exógeno; se han caracterizado cinco vías diferentes de biosíntesis de IAA dependientes de Trp en bacterias: indol-3-acetamida (IAM); ácido indol-3-acetonitrilo (IAN); ácido indol-3-pirúvico (IPyA); triptamina (TAM) y triptófano cadena lateral oxidasa (TSO) (Duca & Glick, 2020).

Otros compuestos que actúan como bioestimulantes son las poliaminas (PAs), las cuales son moléculas policatiónicas constituidas por varios grupos amino a lo largo de su cadena y que se clasifican como aromáticas y alifáticas; en las plantas, las PAs afectan la actividad celular, por lo que están involucradas en un gran número de procesos fisiológicos como son el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación celular, la senescencia y la modulación de la apertura estomática. Además, participan en la respuesta a diversos tipos de estrés abiótico (daño por frío, estrés salino, atmósferas modificadas y estrés hídrico), así como en la participación en la señalización en la interacción planta-patógeno (Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

Por otro lado, como consecuencia de la interacción de las PAs con ácidos nucleicos, fosfolípidos y compuestos de la membrana celular, estos compuestos son capaces de estabilizar la estructura de las macromoléculas y afectar la expresión de los genes. La regulación de los niveles de PAs es un mecanismo esencial para la supervivencia de la célula, ya que la ausencia o la síntesis ilimitada puede generar consecuencias deletéreas (Roa & Rosas, 2013).

La mayoría de las células vivas, incluyendo las células de las plantas, pueden llevar a cabo la síntesis *de novo* de PAs, para posteriormente almacenarse en compartimientos celulares como pueden ser la vacuola, la mitocondria, el cloroplasto y la pared celular, en forma soluble e insoluble (Pandey *et al.*, 2000).

La biosíntesis de las PAs inicia con los precursores arginina u ornitina, que son metabólicamente reversibles, de modo que la L-ornitina puede convertirse en L-arginina por acción de la enzima arginasa. El primer paso es la descarboxilación de la L-ornitina ó L-arginina por la enzima arginina u ornitina descarboxilasa (ADC u ODC). La vía de ADC para la síntesis de putresina consiste en tres pasos enzimáticos catalizados por acción secuencial de la ADC, la agmatina iminohidrolasa y la *N*-carbamoilputrescina amidohidrolasa. La biosíntesis de espermidina involucra la transferencia de grupos aminopropilo a partir de la *S*-adenosilmetionina descarboxilada por acción de la enzima espermidina sintasa (SPDS); subsecuentemente, se puede sintetizar espermina a partir de espermidina por la acción de la espermina sintasa (SPMS) (Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

La putrescina y espermidina son ubicuas, es decir se encuentran en todos los organismos eucariotas y procariotas, mientras que la espermina parece estar asociada casi exclusivamente a células eucariotas (Mendoza & Rocha, 2002). La aplicación de PAs exógenas a plantas puede producir efectos visibles sobre el crecimiento y desarrollo; estudios previos han reportado una buena correlación entre PAs y la tasa de crecimiento en una gran variedad de sistemas vegetales (Carmona,1997).

Nassar y col (2003) reportaron la producción potencial de arginina descarboxilasa, así como la producción de putresina en cepas de actinobacterias mediante la determinación

cualitativa y cuantitativa de dichos compuestos; sin embargo, la información acerca de PAs producidas por dichos microorganismos aún es la limitada.

En el presente trabajo se pretende realizar la caracterización molecular de las sustancias producidas por cepas de actinobacterias del género *Streptomyces*, así como su ruta metabólica y forma de acción dentro de la planta y su influencia en parámetros como lo son el peso seco y el peso fresco de la planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización en Plantas Modelo

Se desinfectaron superficialmente semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0) y de las líneas reporteras sensibles a auxinas como *DR5::GUS* y de ciclo celular *CyCB1;1::GUS*, agregando 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 96% en agitación constante por dos minutos, posteriormente se descartó el etanol y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de solución clorada al 20% en agitación constante durante siete u ocho minutos, la cual se descartó para realizar ocho lavados con agua destilada estéril en agitación por un minuto. Las semillas lavadas se estratificaron por 2 días a 4 °C en condiciones de oscuridad. Cada tratamiento consistió en un total de 30 semillas, sembrando 10 ejemplares en cada caja de Petri con medio agar Murashige & Skoog 0.5x (pH 5.7) en cámaras de crecimiento con una temperatura de  $20\pm 2^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo largo de 16 h luz ( $195 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8h oscuridad. Cuando las plantas alcanzaron 7 días de edad, se realizaron pruebas de interacción directa (inoculando la cepa en la punta de la raíz) y a distancia (a 5.5 cm) con dos cepas de *Streptomyces* denominadas 3AC y 4AC, empleando 5  $\mu\text{L}$  de una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas/mL.

### Análisis Histoquímico de la Actividad *GUS*

Se analizó la expresión del gen reportero *GUS* mediante la actividad de la  $\beta$  glucuronidasa en la línea *DR5::GUS* sensible a auxinas y la línea *CyCB1;1::GUS* reportera de división celular en pruebas de interacción directa y a distancia con las dos cepas evaluadas. Para ello, las plantas fueron colocadas en microplacas de Elisa de 24 pozos que contenían aproximadamente 600  $\mu\text{L}$  de la solución de X-GLUC e incubadas a 37°C toda la noche. Pasado el tiempo de incubación, las plantas se depositaron en tubos cónicos de 1.5 mL y se agregó una solución de etanol:glicerol en proporción 90:10 hasta cubrir en su totalidad el material vegetal. Posteriormente, se incubó por 10 min a 70°C con la finalidad de eliminar la clorofila presente en los tejidos de la planta y así apreciar el producto de la actividad de la enzima  $\beta$  glucuronidasa (5,5'- dibromo-4, 4'-dicloro-

indigo), el cual genera una coloración azul en los sitios en los que se presentó actividad de las auxinas y del ciclo celular, respectivamente, en las líneas reporteras empleadas, para ser evaluadas a los tres y siete días posteriores a la interacción (Jefferson, 1987).

### **Inoculación de Semillas y Plántulas de Tomate con *Streptomyces* spp.**

En los ensayos de inoculación se emplearon dos cepas de *Streptomyces* (3AC, 4AC), y semillas de *Solanum lycopersicum*. Las semillas fueron lavadas durante 2 h con agua destilada estéril con el fin de remover el fungicida que fue aplicado por la casa comercial. Se establecieron tres tratamientos (tratamiento control, tratamiento inoculado con la cepa 3AC y tratamiento inoculado con la cepa 4AC) cada tratamiento contó con tres repeticiones (cada repetición con 20 plantas de tomate). El inóculo de las cepas consistió en 500 µl de una suspensión de  $1 \times 10^6$  UFC de las cepas 3AC y 4AC, el cual se aplicó el día de la siembra, a los diez y 20 días posteriores. Las charolas de germinación se emplearon con una mezcla de peat moss, perlita y zeolita (3:1:1) sin previa esterilización con la finalidad de simular las condiciones de los semilleros convencionales. Las charolas se mantuvieron a una temperatura ambiente de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  y riego a capacidad de campo en el invernadero.

### **Medición de Parámetros Morfofisiológicos**

Se evaluaron cuatro individuos de cada repetición, obteniendo datos de 12 plantas en total de cada muestreo de las tres repeticiones de cada tratamiento ( $n=12$ ), las cuales fueron seleccionadas al azar a los 15 y 30 días post-siembra para medir los siguientes parámetros según Restrepo & Escobar (2007): longitud de tallo (cm), longitud de la hoja (cm), longitud de la raíz (cm), el diámetro de tallo (mm), peso fresco (g) y peso seco (g). El secado de las plantas se realizó a  $45.7^\circ\text{C}$  por 5 días en una estufa. Además, se estimó la sobrevivencia de cada uno de los ejemplares en condiciones de invernadero.

### **Determinación Cualitativa de Producción de Poliaminas**

Se realizó una prueba para la detección de la producción de PAs a las dos cepas de *Streptomyces*, empleando el medio agar descarboxilasa de Möeller suplementado con L-

arginina y rojo fenol, y en medio sin agar. El cultivo se incubó 72 h a 37°C en oscuridad, hasta observar el crecimiento de las colonias. El viraje de la placa a una tonalidad morada indica la producción de PAs por parte de la cepa bacteriana.

### **Análisis Estadísticos**

Se realizaron análisis estadísticos mediante pruebas de ANOVA de dos vías empleando el software Statistica 7; indicando diferencias estadísticamente significativas con diferentes letras y la desviación estándar de cada uno de ellos. ( $p < 0.05$ ) (n=12).

## RESULTADOS

### Caracterización en Plantas Modelo

Basados en los resultados de inoculación de semillas y plantas de tomate, se evaluó el efecto de las actinobacterias en el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana* en diferentes interacciones, con la finalidad de identificar la influencia de las cepas sobre la planta. Como resultado se observó que existe una variación dependiente del tipo de inoculación del microorganismo. En plantas de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 la inoculación a distancia (Fig. 1) presentó un cambio en comparación a la inoculación directa (Fig. 2) en donde se observa como la longitud de la raíz principal y de las raíces secundarias no presentan inhibición al ser inoculadas con las dos actinobacterias evaluadas, el área foliar es visiblemente más uniforme y de mayor tamaño en comparación a las plantas control.

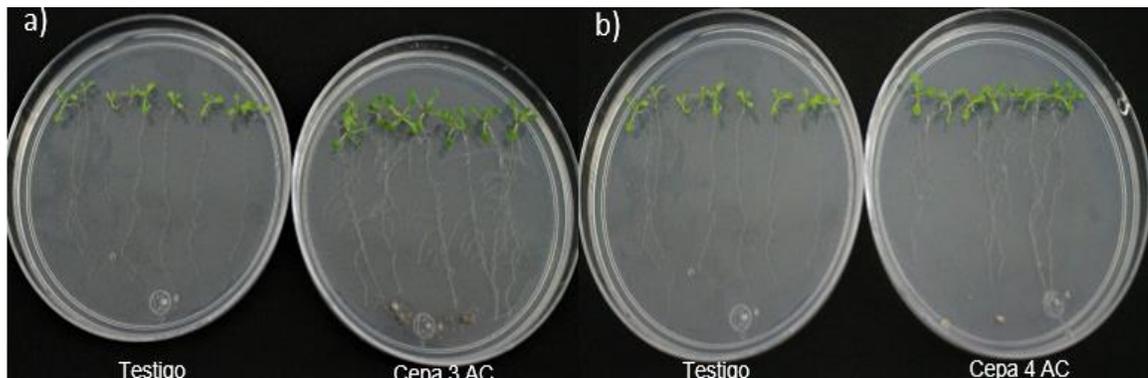


Figura 1. Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 en interacción indirecta con actinobacterias. a) Plantas inoculadas indirectamente con la cepa 3AC evaluadas a los 10 días posteriores a la inoculación (dpi). b) Plantas inoculadas indirectamente con la cepa 4AC evaluadas a los 10 dpi.

La inoculación directa presentó una disminución drástica de la longitud de la raíz principal; sin embargo, la promoción del desarrollo de las raíces secundarias fue mayor, por lo que se logra apreciar una mayor densidad de raíces secundarias y uniformidad en la parte aérea en comparación al control. Este efecto se presentó en las diferentes líneas reporteras utilizadas (Fig. 2). El tiempo de interacción a los tres días no presentó diferencias morfológicas visibles con respecto al control, por lo que los resultados más

significativos fueron obtenidos a los días con mayor interacción, similar a lo obtenido a las inoculaciones en plantas de tomate.

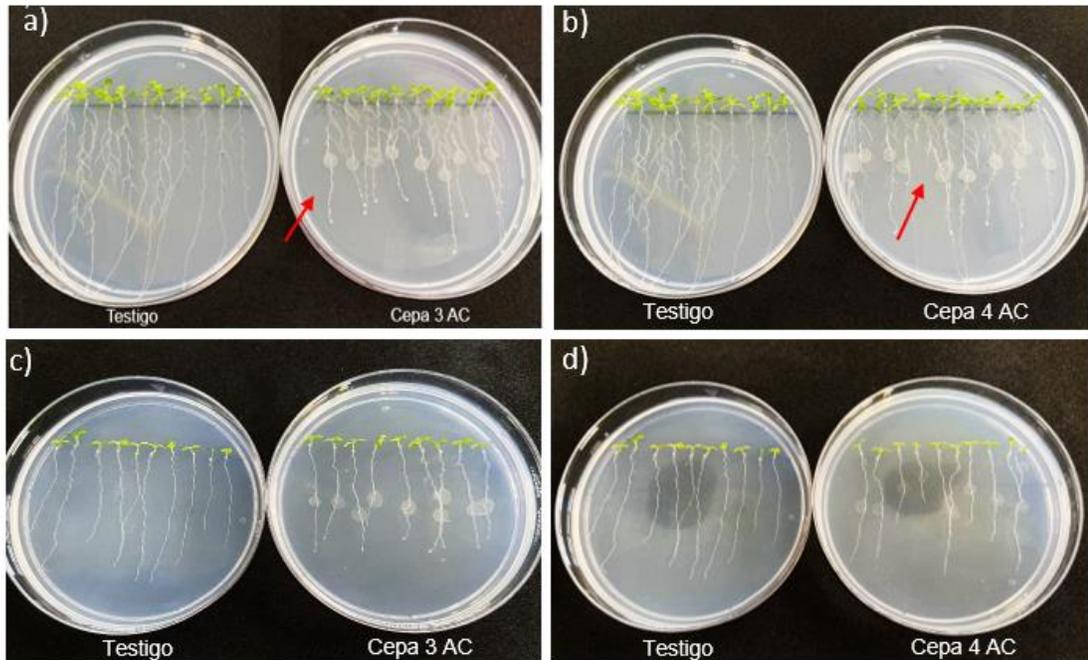


Figura 2. Plantas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas reporteras *DR5::GUS* y *CyCB1;1::GUS* en interacción directa con actinobacterias. a) Plantas inoculadas directamente con la cepa 3AC evaluadas a los siete dpi en la línea reportera *DR5::GUS*. b) Plantas inoculadas directamente con la cepa 4AC evaluadas a los siete dpi en la línea reportera *DR5::GUS*. c) Plantas inoculadas directamente con la cepa 3AC evaluadas a los siete dpi en la línea reportera *CyCB1;1::GUS*. d) Plantas inoculadas directamente con la cepa 4AC evaluadas a los siete dpi en la línea reportera *CyCB1;1::GUS*.

En comparación al efecto que se tuvo de la interacción directa en el medio sólido, la inoculación desde el día de la siembra en un ambiente diferente en donde se utilizó una torunda estéril humedecida con 5 mL de MS y una inoculación de 5  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas/mL, mostró que el desarrollo radicular de los ejemplares inoculados obtuvo mayor densidad en comparación a las plantas control que tuvieron las mismas condiciones (Fig. 3). Dicho resultado coincide con lo evaluado en las plantas de tomate, en donde la inoculación es directa en el sustrato.

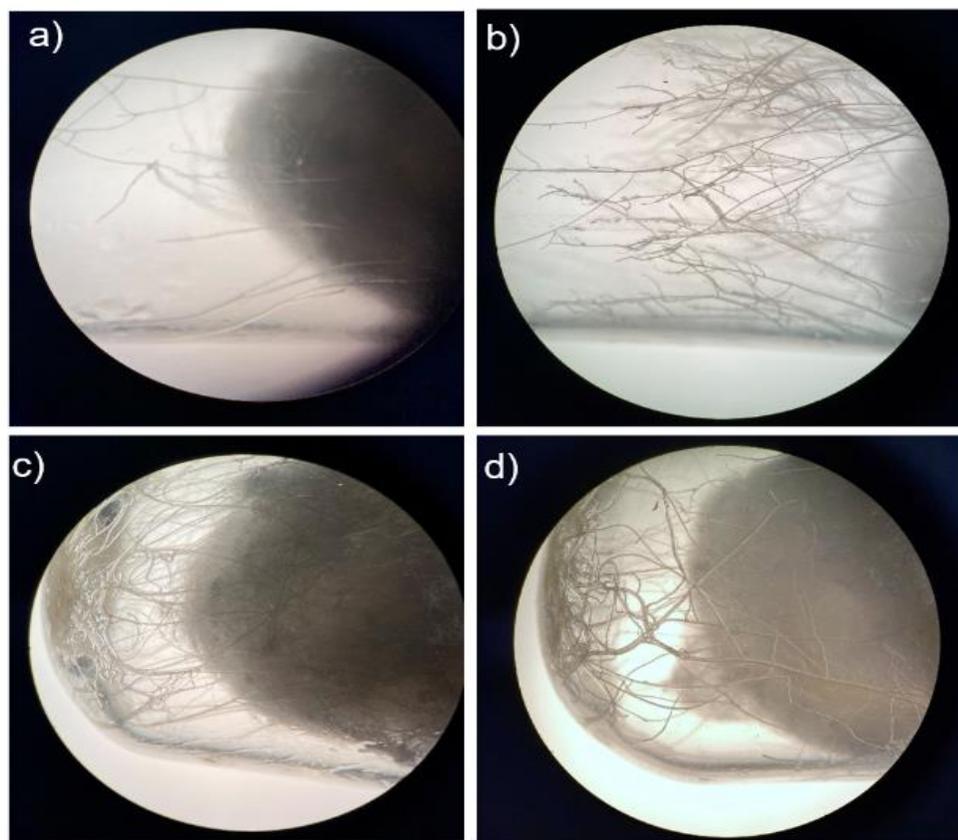


Figura 3. Plantas de *Arabidopsis thaliana* en interacción directa con actinobacterias a los 25 dpi. a) Se aprecia la raíz del tratamiento control. b) Raíces de plantas inoculadas con la cepa 3AC evaluadas 25 dpi. c) Raíces de plantas inoculadas con la cepa 4AC evaluadas 25 días dpi. d) Raíces de plantas inoculadas con la cepa 10 AC evaluadas 25 dpi.

Tomando en cuenta los resultados antes obtenidos, los compuestos producidos por las cepas son aquellos que influyen en el desarrollo de las plantas, por lo que se evaluó además la interacción con los compuestos volátiles producidos por las cepas, y se presentó un comportamiento similar al efecto que se obtuvo en la interacción por medio de compuesto difusibles (Fig. 4). Sin embargo, la capacidad de esporulación de las cepas fue un factor limitante en este ensayo, esto debido al estrés causado por el tipo de medio de cultivo usado. Las plantas inoculadas con las cepas 3AC y 4AC en placas divididas presentaron un mayor desarrollo en comparación al control no inoculado, observando un mayor desarrollo en la parte radicular y en la parte aérea de las plantas, por efecto de los compuestos volátiles producidos por dichas cepas.

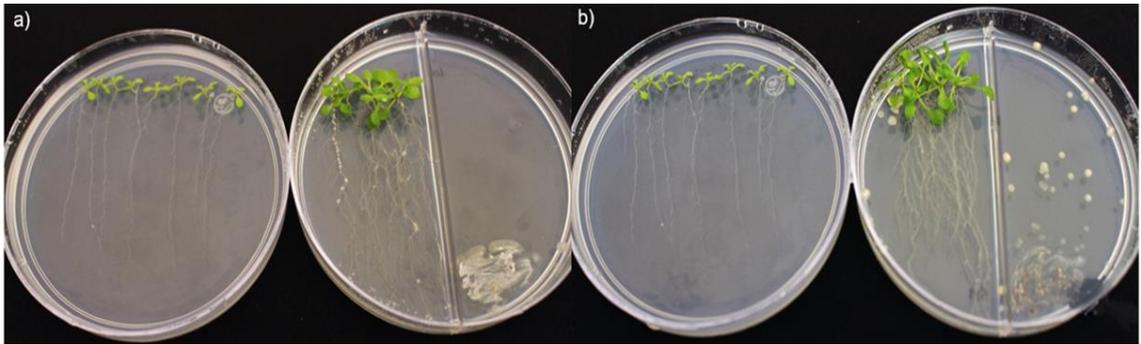


Figura 4. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* en interacción con actinobacterias. a) Se aprecian plantas que han sido inoculadas a distancia con la cepa 3AC evaluadas a los 10 dpi. b) Se aprecian plantas que han sido inoculadas a distancia con la cepa 4AC evaluadas a los 10 dpi.

### Análisis Histoquímico de GUS

La señal del gen reportero *GUS* en la línea *DR5::GUS* incrementó a los 7 dpi (Fig. 5), principalmente en el ápice de la hoja en los tres tratamientos (control, cepas 3AC y 4AC). En las plantas inoculadas con las actinobacterias, la señal de *GUS* se detecta en el borde de la hoja; esta señal incrementa en el eje proximal-distal a los 7dpi con la cepa 4AC. Si bien la cepa 3AC no posee una expresión mayor en el área meristemática en el día 3 dpi y 7 dpi dos días de la evaluación, el desarrollo de raíces secundarias y hojas fue mayor en comparación al control y a la cepa restante.

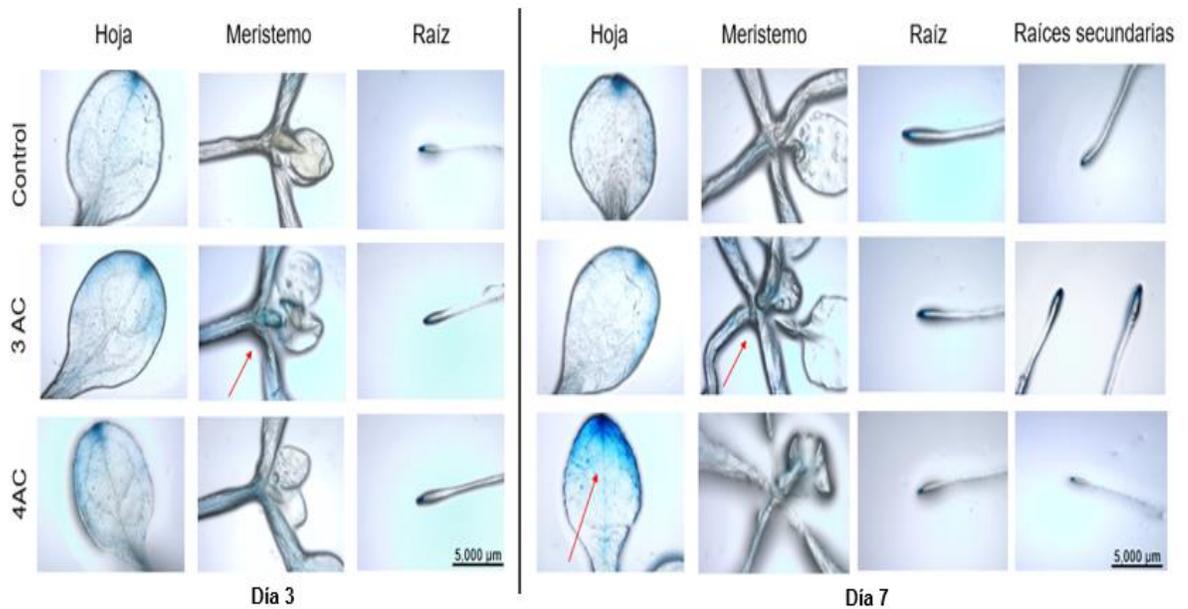


Figura 5. Plantas de *Arabidopsis thaliana* de la línea reportera *DR5::GUS* en interacción con actinobacterias. Se aprecian plantas que han sido puestas en interacción directa con las cepas 3AC y 4AC las cuales fueron evaluadas a los tres y siete dpi. La barra de escala corresponde a 5,000μm.

La señal del gen reportero *GUS* en la línea *CyCB1;1::GUS*, en la interacción directa de las cepas con la planta fue nula, por lo que aparentemente las dos cepas no estimulan la división celular a los tres dpi. A los 7dpi, la cepa 3AC mostró un incremento en la señal del reportero en la zona meristemática de la raíz en comparación al control. Ambas cepas (3AC y 4AC) mostraron una mayor señal del reportero en el meristemo apical a los 7dpi (Fig. 6).

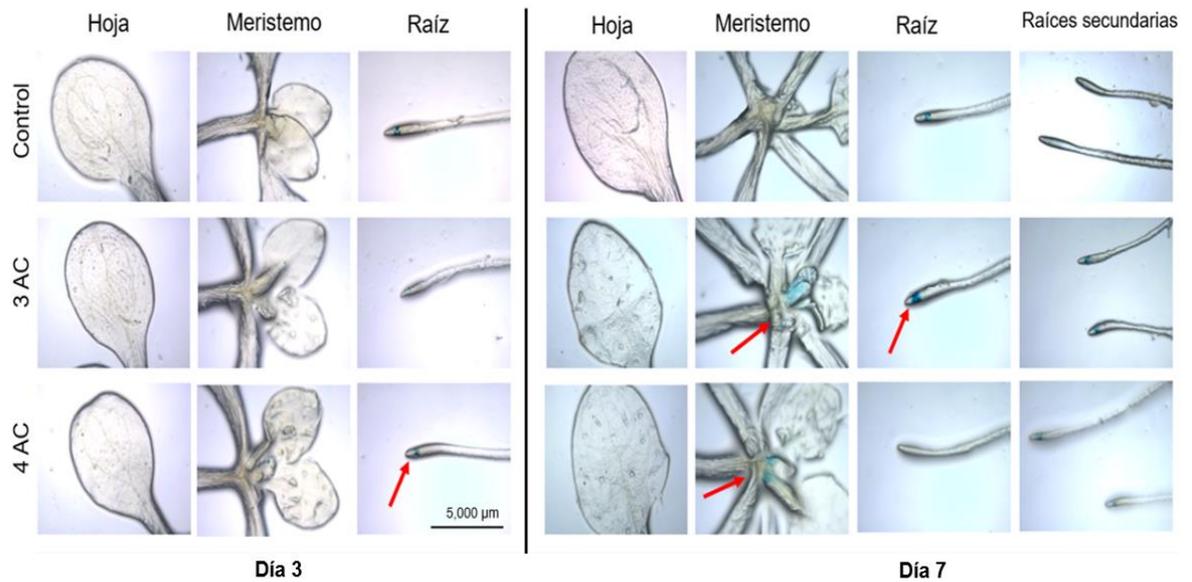


Figura 6. Plantas de *Arabidopsis thaliana* de la línea reportera *CyCB1;1::GUS* en interacción con actinobacterias. Se aprecian plántulas que han sido puestas en interacción directa con las cepas 3AC y 4AC las cuales fueron evaluadas a los tres y siete dpi.

Tomando en cuenta que la señal del reportero en la línea *DR5::GUS* incrementó principalmente a los 7 dpi, se realizó la inoculación de las cepas a distancia el día de la siembra de la semilla con la finalidad de permitir un crecimiento y desarrollo mayor de la colonia inoculada. De manera interesante, la señal del reportero incrementa en la interacción a distancia, lo que sugiere que la vía de auxinas es estimulada por compuestos difusibles en el medio producidos por las actinobacterias (Fig. 7). La cepa 3AC mostró una mayor señal del reportero en raíces, mientras que la cepa 4AC en hojas.

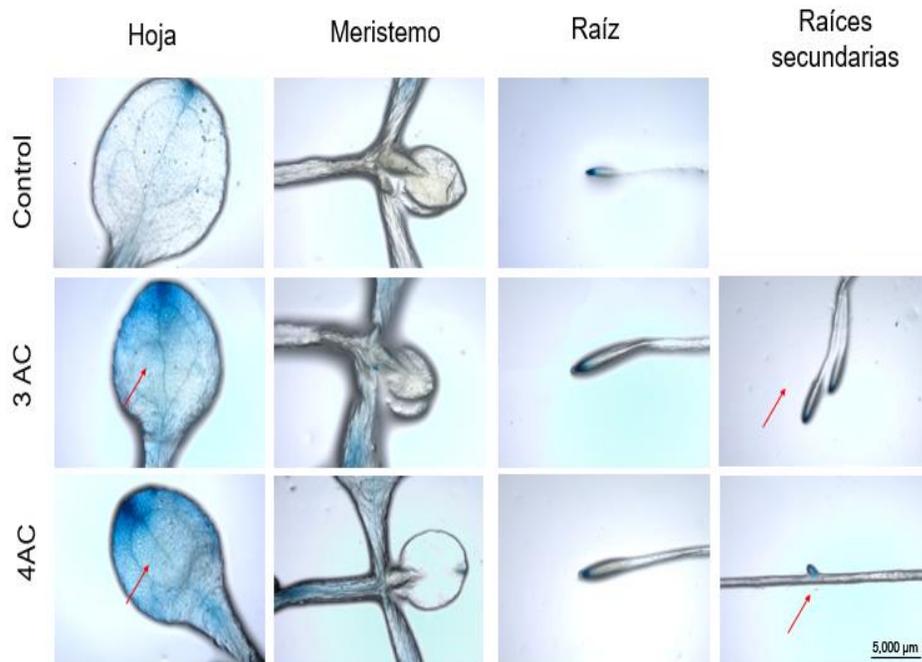


Figura 7. Plantas de *Arabidopsis thaliana* de la línea reportera *DR5::GUS* en interacción con actinobacterias. Se observan plantas que han sido puestas en contacto indirecto desde el día de la siembra de las semillas con las cepas denominadas 3AC y 4AC.

### **Inoculación de Semillas y Plántulas de Tomate con *Streptomyces* spp.**

El número de ejemplares que se evaluaron para el efecto promotor de crecimiento de las dos cepas de *Streptomyces* se vió disminuido debido a la depredación del área foliar de las plantas pertenecientes a los tratamientos durante los primeros 15 días por parte de fitófagos no identificados.

Durante los días posteriores a la primera inoculación, el control presentaba las mejores características de crecimiento, en la segunda semana el área foliar de la cepa 3AC comenzó a desarrollarse significativamente, para la toma de datos se apreciaba visualmente como las plantas inoculadas con las dos cepas de actinobacterias presentaban un mayor crecimiento y desarrollo en comparación al testigo (Fig. 8). Como se aprecia en la imagen (Fig. 9A), la cepa 3AC generó una mayor elongación del tallo y las hojas (Fig.9), en comparación a la cepa 4AC y al control; sin embargo, la cepa 4AC aparentemente genera radículas con mayor abundancia de raíces secundarias y por ende un desarrollo más visible de la misma (Fig. 10).



Figura 8. Plantas de tomate de 15 días en condiciones de invernadero inoculadas con las cepas 3AC y 4AC. a) Plantas de tomate de 15 días de edad sin inoculación. b) Plantas de tomate de 15 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra y diez días posteriores a la misma con la cepa denominada 3AC. c) Plantas de tomate de 15 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra y diez días posteriores a la misma con la cepa denominada 4AC.



Figura 9. Plantas de tomate de 15 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 3AC. a) Plantas de tomate de 15 días de edad sin inoculación. b) Plantas de tomate de 15 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra y 10 días posteriores a la misma con la cepa denominada 3AC.



Figura 10. Plantas de tomate de 15 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 4AC. a) Plantas de tomate de 15 días de edad sin inoculación. b) Plantas de tomate de 15 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra y 10 días posteriores a la misma con la cepa denominada 4AC.

Existe la hipótesis de que la carga de microorganismos presentes en el sustrato fue demasiado alta debido a su nula esterilidad, por lo que la capacidad de las cepas de *Streptomyces* para colonizar el sustrato fue ralentizado en un comienzo. Sin embargo, las inoculaciones posteriores aumentaron la densidad de su población, teniendo así los efectos de dicha interacción aún más visibles en la segunda toma de datos al día 30 (Fig. 11). Aunado a la capacidad de promover el crecimiento de las plantas de tomate, las hojas de las plantas control, y en menor proporción las inoculadas con la cepa 4AC, presentaron una tonalidad de apariencia purpura, la cual generalmente se asocia con la falta de fósforo (P) que pueda estar disponible para la planta en el sustrato, caso contrario a lo que se observó en las plantas inoculadas con la cepa 3AC, donde no solo la tonalidad de las hojas se vio beneficiado, si no que el tamaño de las mismas tuvo un mayor desarrollo y longitud.



Figura 11. Plantas de tomate de 30 días en condiciones de invernadero inoculadas con las cepas 3AC y 4AC. a) Plantas de tomate de 30 días de edad sin inoculación. b) Plantas de tomate de 30 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra, diez y 20 días posteriores a la misma con la cepa denominada 3AC. c) Plantas de tomate de 30 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra, diez y 20 días posteriores a la misma con la cepa denominada 4AC.

En la primera toma de datos, la cepa 3AC desarrolló la longitud de hoja más significativa, tendencia que continuó hasta el día 30. En la Figura 12, se aprecia la tonalidad de las hojas, longitud y desarrollo de la planta de ejemplares de dos tratamientos, control y la cepa 3AC.



Figura 12. Plantas de tomate de 30 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 3AC. a) Plantas de tomate de 30 días de edad sin inoculación. b) Plantas de tomate de 30 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra, diez y 20 días posteriores a la misma con la cepa denominada 3AC.



Figura 13. Plantas de tomate de 30 días en condiciones de invernadero inoculadas con la cepa 4 AC. a) Plantas de tomate de 30 días de edad sin inoculación. b) Plantas de tomate de 30 días de edad las cuales han sido inoculadas el día de la siembra, diez y 20 días posteriores a la misma con la cepa denominada 4 AC.

### Medición de Parámetros Morfofisiológicos

En el parámetro a evaluar largo de tallo (Fig. 14) de los 30 días de duración del experimento, se presentó en los datos obtenidos de los ejemplares que fueron inoculados con las dos cepas de *Streptomyces* fueron estadísticamente más representativas en comparación al control. En la toma de datos correspondiente al día 15 se obtuvo que las dos cepas evaluadas 3AC y 4AC fueron estadísticamente iguales, en donde las medias obtenidas son 4.6 y 4.4 cm respectivamente; sin embargo, significativamente mayores al control cuya media fue de 3.05 cm. La toma de datos del día 30 mostró la existencia de diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tres tratamientos, la cepa 3AC fue el tratamiento más representativo con una media de 7.1 cm, en contraste con la media de la cepa 4AC cuyo valor fue 6.4 cm, y el control siendo el tratamiento menos representativo obtuvo una media de 4.3 cm. En la variable de largo de tallo el tratamiento que obtuvo un

mayor efecto fue la cepa 3AC. Considerado el primer parámetro beneficiado por los microorganismos.

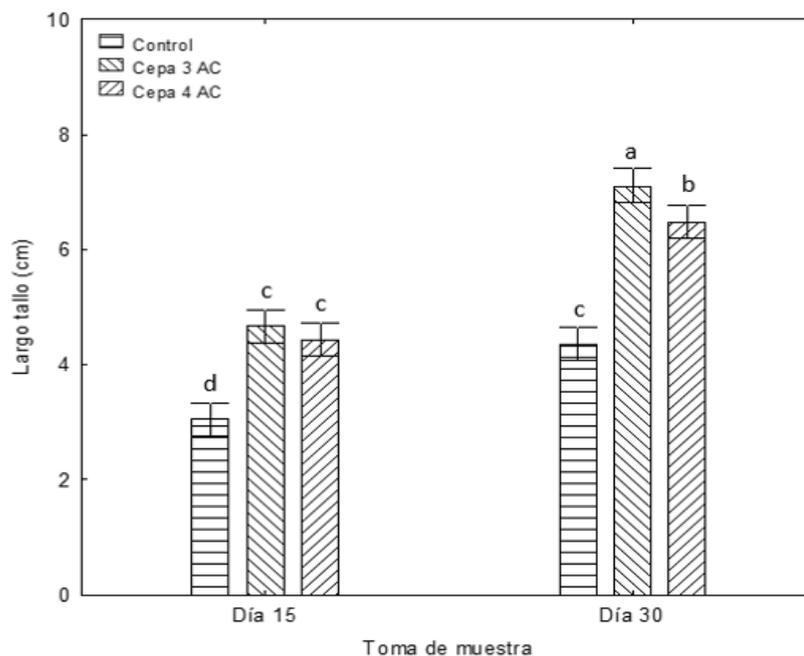


Figura 14. Evaluación de la variable largo de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero (n=12).

Los datos obtenidos para el parámetro de diámetro de tallo (Fig. 15) arrojaron que los tratamientos en los cuales se adicionaron las cepas de *Streptomyces* fueron estadísticamente mayores en ambas fechas de muestreo en comparación al control; sin embargo, no existe diferencia entre los tratamientos de las cepas 3AC y 4AC. En ambas fechas el control mostró el menor diámetro, con una media a los 30 días de 1.6 mm, en contraste con las dos restantes cuyas medias fueron de 2.3 y 2.1 mm, respectivamente.

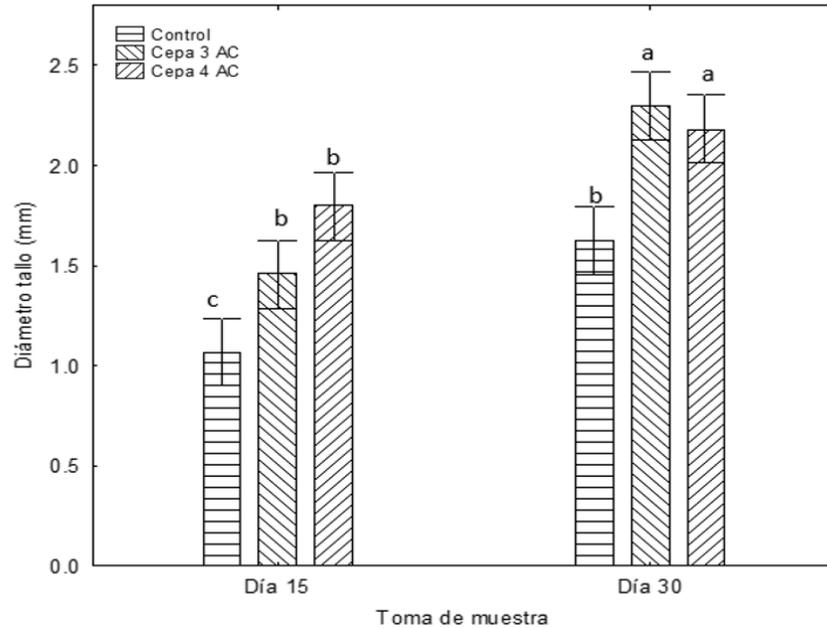


Figura 15. Evaluación de la variable diámetro de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero (n=12).

Para largo de la hoja (Fig. 16) se encontró que desde los primeros 15 días del experimento se obtuvo diferencias en la longitud de la hoja de las plántulas inoculadas en comparación con el control. Posteriormente a los 30 días con un total de dos inoculaciones, se obtuvieron resultados similares donde los valores más destacados fueron de las plantas que fueron expuestas a las cepas evaluadas 3AC y 4AC, con una media de 5.8 y 4.9 cm, respectivamente. El tratamiento control tuvo un incremento de 2 cm en la segunda evaluación, alcanzando una longitud de 3.19 cm aproximadamente. Se considera el segundo parámetro que aportó más beneficios a las plantas tratadas con las cepas de actinobacterias.

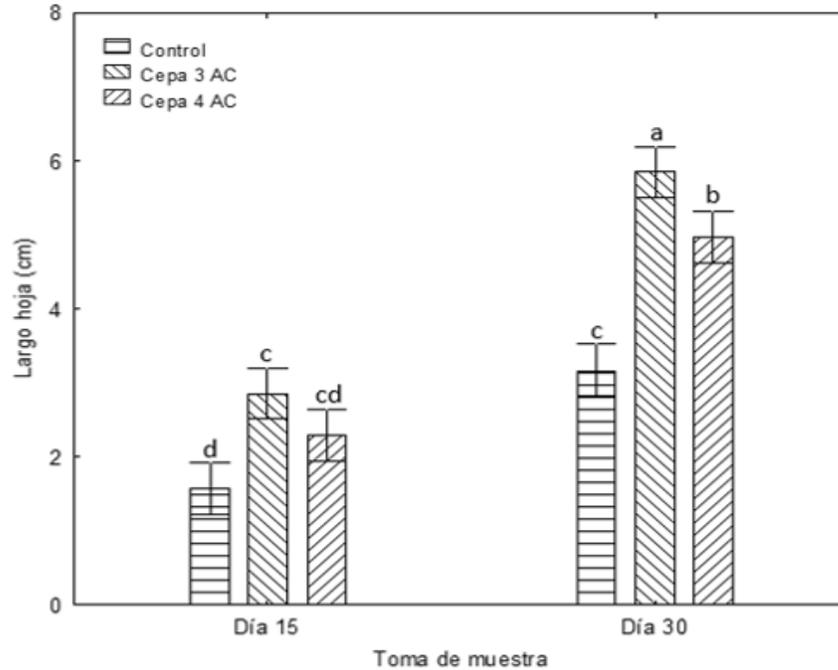


Figura 16. Evaluación de la variable largo de hoja en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero (n=12).

Durante la inoculación de semillas y plántulas con actinobacterias, no se adicionó fertilizante alguno, en el caso de largo de raíz (Fig. 17), la raíz de los testigos presentó un menor desarrollo en comparación a los ejemplares que fueron inoculados con las dos cepas evaluadas, si bien estadísticamente no se obtuvo una diferencia significativa en las tomas de datos, en las plantas inoculadas de 30 días se presentaron los cambios más importantes, si bien la longitud de la raíz fue el parámetro a medir, es importante mencionar que el desarrollo de raíces secundarias fue considerablemente más notorio que el desarrollo de las plántulas testigos. Se considera la longitud de la raíz un parámetro con mayor influencia debido a la inoculación de las dos cepas de *Streptomyces* 3AC y 4AC.

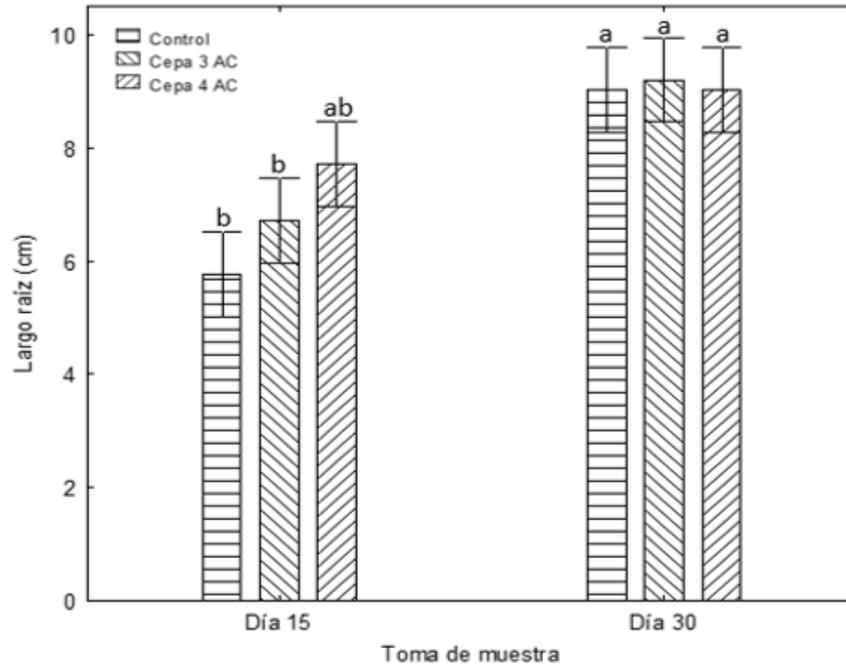


Figura 17. Evaluación de la variable largo de raíz en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero (n=12).

En cuanto a los datos obtenidos para peso fresco y peso seco (Fig. 18) se obtuvo el peso fresco en las plántulas del día 15 inoculadas con las actinobacterias, no presentaron diferencia significativa en comparación al testigo. Sin embargo, a los 30 días después de la siembra estas variables comenzaron a presentar diferencias significativas; en donde las dos cepas utilizadas fueron iguales estadísticamente con una media de 1.1 g en comparación al control en donde la media al día 30 fue de 0.4 g. Obteniendo en las plantas inoculadas con cepas de *Streptomyces* un peso fresco 2.4 veces mayor en comparación al testigo.

Si bien los datos de las plántulas inoculadas obtuvieron los mayores pesos durante el ciclo, en donde se obtuvo un mayor peso fresco y por ende el valor del peso seco fue proporcional, los valores más representativos fueron hasta el día 30. Cada uno de los parámetros fue evaluado de forma individual y en algunos casos se obtenían los valores más altos en los ejemplares que se habían inoculado con las cepas de actinobacterias 3AC y 4AC al realizar la toma de los datos correspondientes a peso fresco, que es un conjunto de todos los parámetros anteriores. Se demuestra que los ejemplares inoculados están por

encima del desarrollo de los ejemplares que fueron utilizados como control, sin adición de ningún tipo de fertilizante. Dado estos valores se consideró que el efecto de las cepas 3AC y 4AC adicionadas a las semillas presentaron en las plantas utilizadas mayor biomasa en comparación a los testigos en un lapso y condiciones ambientales iguales.

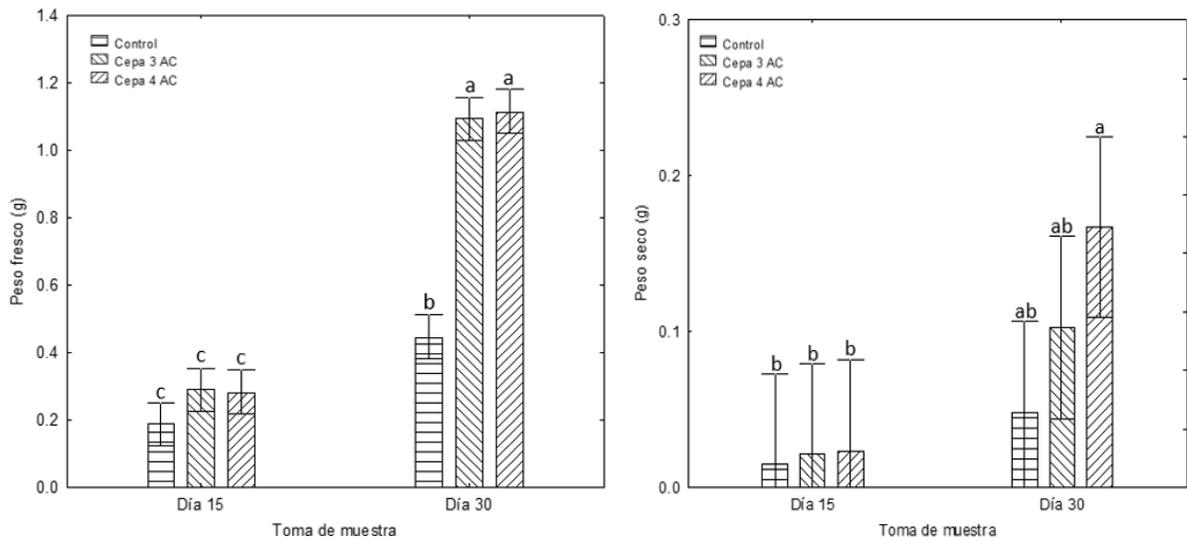


Figura 18. Evaluación de la variable peso fresco y peso seco en plantas de tomate inoculadas con las cepas 3AC y 4AC de 15 y 30 días en condiciones de invernadero (n=12).

## Determinación Cualitativa de Producción Poliaminas

Cumplidas las 72 h de incubación, las placas de Petri que fueron inoculadas con las cepas tuvieron un cambio de coloración, esto debido a la producción de PAs, al término del periodo se pudo apreciar un cambio total del medio a tonalidad púrpura, siendo positivo el resultado de dicho experimento. Se utilizó el medio de cultivo Möeller, esta vez en líquido para evaluar el comportamiento de la producción de dichos compuestos en distintas condiciones (Fig. 19), el cambio de tonalidad en medio sólido se dio en los tres dpi de la cepa, caso contrario lo que se observó en medio líquido en donde el desarrollo de la cepa fue en las primeras 48 h en condiciones de agitación constante a 1300 rpm a 30°C, pero la tonalidad del medio no presentó cambios sino hasta 30 dpi y en ausencia de agitación.

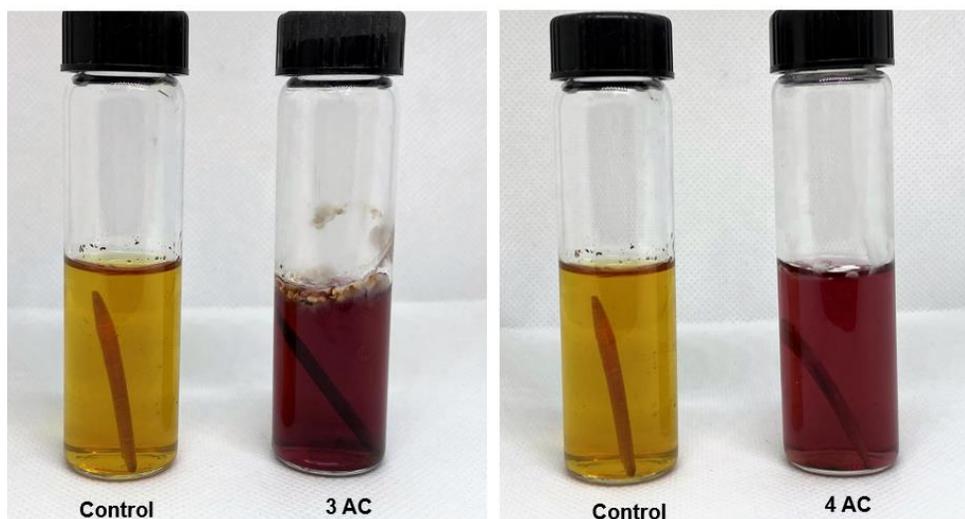


Figura 19. Producción en medio líquido de PAs por cepas de actinobacterias. Detección cualitativa de PAs en medio líquido en donde el desarrollo de las cepas fue en las primeras 48 h en condiciones de agitación constante a 1300 rpm a 30°C; sin embargo, la tonalidad del medio no presentó cambios sino hasta 30 dpi y en ausencia de agitación.

## DISCUSIÓN

Los efectos benéficos de algunas bacterias utilizadas como bioinoculantes son mayores cuando su concentración alcanza valores que les permiten competir con las comunidades ya establecidas en el suelo (Mantilla & Martínez, 2007). Lo anterior concuerda con lo obtenido por las inoculaciones de las cepas 3AC y 4AC en plantas de tomate, debido a la nula esterilidad del sustrato y del agua utilizada durante el experimento, las comunidades bacterianas presentes en el sustrato influyeron en un comienzo en el efecto de promoción de crecimiento, por lo que al aumentar las inoculaciones se aumentó la concentración en la rizosfera.

López-Bucio *et al.*, (2007) hace uso de microorganismos para promover el crecimiento vegetal de frijol en condiciones de sustrato estéril, en donde concluyó que hubo un incremento en el peso fresco y peso seco de las plantas, y en la arquitectura de su raíz tuvo ciertas modificaciones (incluyendo el incremento de raíces secundarias y la longitud de estas) en contraste con el control. Resultado similar al obtenido en las plantas de tomate al ser inoculadas con actinobacterias, por lo que su investigación fue continuada con la inoculación de uso de líneas reporteras de *A. thaliana* como en nuestro proyecto.

El uso de *Streptomyces* se ha evaluado en otras especies vegetales en distintas condiciones. Condori-Pacsi *et al.* (2019) evaluaron la capacidad de promover el crecimiento de ajo en macetas con sustrato y riego estéril; como resultados obtuvieron el incremento de tamaño de raíz las cuales tuvo variaciones dependiendo de la cepa y su tratamiento. La influencia de uno de los parámetros a evaluar tiende a estar relacionado a más de uno, usualmente con el peso fresco y seco de las plantas inoculadas; sin embargo, una de sus conclusiones es que la interacción directa microorganismo-planta es la que posee mayores y visibles resultados.

La inoculación de chile con de distintas cepas de *Streptomyces* en condiciones de invernadero por Robles-Hernández *et al.* (2015) permitió encontrar que los pesos secos de hojas y raíces alcanzaron los valores más representativos en contraste al control, los diferentes tratamientos consistieron en el uso de medios suplementados para el

crecimiento de las diversas cepas, lo que presentó variaciones en el efecto sobre las plantas de Chile inoculadas.

Durante la caracterización del efecto de las actinobacterias en plantas modelo, las diferentes interacciones poseen morfologías distintas, en su estudio Méndez-Gómez *et al.* (2020) realizaron tres interacciones entre el hongo *Azospirillum brasilense* y *Arabidopsis thaliana* en diferentes concentraciones  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  CFU/mL; a pesar de las distintas concentraciones usadas durante su investigación, la interacción directa de  $10^3$  CFU/mL con las plantas consistió en la adición del microorganismo en el medio de cultivo donde se sembrarían los ejemplares, caso contrario a la nuestra usada en donde el inóculo está en contacto directo con la punta de raíz; sin embargo, los resultados fueron similares donde se disminuye drásticamente la longitud de la raíz principal y promueve el desarrollo de las raíces secundarias. La señalización en la línea reportera sensible a ciclo celular es mayor en la interacción por medio de los compuestos difusibles producidos por el microorganismo y por difusibles que por contacto directo.

López-Bucio *et al.*, (2007) en su estudio “*Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*” evalúa el efecto de una bacteria sobre líneas de *A. thaliana* sensibles a auxinas, tomando como antecedente la inoculación de dichos microorganismos en plantas de frijol. La interacción directa con la cepa del microorganismo fue capaz de aumentar el crecimiento aéreo de las plantas y de modificar la arquitectura de su raíz, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria, lo cual le es atribuido a las auxinas exógenas y al etileno, provocando simultáneamente un dramático aumento de los pelos radiculares y de las raíces secundarias; con ello reduce la expresión de *DR5::GUS* en la raíz principal.

En el presente trabajo, las dos cepas evaluadas, fueron sometidas a una prueba cualitativa de producción de PAs, a lo que se atribuye los efectos observados en las plántulas que fueron inoculadas con las mismas. La producción de PAs además de su capacidad de influir en la ruta de auxinas, si bien es una hipótesis que puede ser descartada por medio de un análisis de cromatografía de gases, además de su identificación nos permitiría conocer las concentraciones producidas por las cepas de actinobacterias.

## LITERATURA CITADA

- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., (2004). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania. 351-371.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1-26.
- Camelo, R.M, Vera M.S., Bonilla, B.R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166.
- Carmona, A. J. (1997). Contribución al conocimiento del papel de las poliaminas en el desarrollo del fruto de la platanera: Estudio de las implicaciones fisiológicas de estas sustancias sobre el crecimiento «in vitro» de los tejidos del ovario. Tesis Doctorado, Departamento de Biología Vegetal, Universidad de la Laguna. 226p.
- Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., & Cheng, J. (2019). The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6343.
- Ciura, J., & Kruk, J. (2018). Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 229, 32–40.
- Condori-Pacsi, S. J., Fernández-Guzman, P. R., & Valderrama-Valencia, M. R. (2019). Aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp. rizosféricos promotores del crecimiento vegetal. *Idesia (Arica)*, 37(2), 109–116.
- Coulibaly, A. E., Pakora, G., Ako, A. B. A., Amari, G. E., N'Guessan, C. A., Kouabenan, A., Kone, D., & Djaman, J. A. (2022). Diversity of *Sclerotium rolfsii* antagonist fungi isolated from soils of the rhizosphere of tomato crops and identification of some antifungal compounds. *Heliyon*, 8(2), e08943.
- Criollo, P. J., Obando, M., Sánchez, M. L., Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en

- el altiplano cundiboyacense. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
- Dávila, M. D., Gallegos, M. G., Hernández, F. D., Ochoa, Y. M., Flores, O. A. (2013). Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(8), 1187-1196.
- Dinesh, R., Srinivasan, V., Ananda-Porraj, M., & Srmbikkal, H. (2017). Endophytic actinobacteria: Diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(5), 546-566.
- Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8607–8619
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd\_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2104.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Ahmed, A., Candela, M. (2004) Evaluación de biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum L.*) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 26: 61-68.
- Franco, M. C. (2008) Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias en hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctorado, Facultad de Ciencias, Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Granada. 260p.
- Heinemann, M., & Sauer, U. (2010). Systems biology of microbial metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 337–343.
- Hernández-Jiménez, J., Montes-Belmont, R., Flores-Moctezuma, H.E., Nava-Juárez, R.A., Chanona-Pérez, J. (2004). Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22, 345-350.
- Khan, S. T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozone, I., Mukai, A., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2010)-. Streptomyces associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic

- genes for secondary metabolites and products. *Environmental Microbiology*, 13(2), 391–403.
- Kumaran, S., Bharathi, S., Utra, V., Thirunavukkarasu, R., Nainangu, P., Gopi Krishnan, V., Renuga, P. S., Wilson, A., & Balaraman, D. (2020). Bioactive metabolites produced from *Streptomyces enissocaesilis* SSASC10 against fish pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101802.
- Lee, N., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B. K. (2019). Synthetic biology tools for novel secondary metabolite discovery in *Streptomyces*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 667–686.
- Li, M., Guo, R., Yu, F., Chen, X., Zhao, H., Li, H., & Wu, J. (2018). Indole-3-Acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 443.
- Li, Y., Guo, Q., He, F., Li, Y., Xue, Q., & Lai, H. (2019). Biocontrol of root diseases and growth promotion of the tuberous plant *Aconitum carmichaelii* induced by actinomycetes are related to shifts in the rhizosphere microbiota. *Microbial Ecology*, 79(1), 134–147.
- Li, Y., He, F., Lai, H., & Xue, Q. (2017). Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 299–311.
- Liu, F., Yang, S., Xu, F., Zhang, Z., Lu, Y., Zhang, J., & Wang, G. (2022). Characteristics of biological control and mechanisms of *Pseudomonas chlororaphis* zm-1 against peanut stem rot. *BMC Microbiology*, 22(1), 1-13.
- Loredo, C., López, L., Espinosa, D., (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA Latinoamericana*, 22(2), 225-239
- López-Bucio, 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), 207–217.
- Luna-Esquivel, E. N., Ojeda-Barrios, D. L., Guerrero-Prieto, V. M., Ruíz-Anchondo, T., & Martínez-Téllez, J. J. (2014). Polyamines as indicators of stress in plants. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 20(3), 283-295.
- Méndez-Gómez, M., Barrera-Ortiz, S., Castro-Mercado, E., López-Bucio, J., & García-Pineda, E. (2020). The nature of the interaction *Azospirillum-Arabidopsis* determine the molecular and morphological changes in root and plant growth promotion. *Protoplasma*, 258(1), 179–189.
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2003). Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. *Plant Growth Regulation*, 40(2), 97-106.
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., Salas, J. A. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomyces by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 10(5), 281-292
- Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2018). *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1179–1188.
- Olatunji, D., Geelen, D., & Verstraeten, I. (2017). Control of endogenous auxin levels in plant root development. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2587
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235, 126439
- Pandey, S., Ranade, S., Nagar, P., Nikhil, K. (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Biosciences* 25(3), 291-299.

- Pérez, P. I., Meriño, R. L., Ábalos, R. A., Pérez, R. M. (2017). Características promotoras de crecimiento vegetal en rizobacterias aisladas de suelos contaminados con compuestos fenólicos. *Rev. Cubana Química*, Vol. 29 (1), 73-88.
- Rabinal, C., & Bhat, S. (2019). Identification of differentially expressed genes in *Trichoderma koningii* IABT1252 during its interaction with *Sclerotium rolfsii*. *Current Microbiology*, 77(3), 396–404.
- Restrepo, J. S., & Escobar, A. F. (2007). Evaluación de algunos parametros fisiologicos del Raygrass Bestfor (*Lolium perenne*), bajo condiciones de estrés hídrico. Tesis Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES. 51p.
- Roa, M. V., & Rosas, R. Q. (2013). Polyamine Biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 45-59
- Tahir, M. & Aqeel, S. M. (2013). Plant Growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 11(1), 1-7.
- Wang, L., Hart, B. E., Khan, G. A., Cruz, E. R., Persson, S., & Wallace, I. S. (2020). Associations between phytohormones and cellulose biosynthesis in land plants. *Annals of Botany*, 126(5), 807–824
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4(3), 162–176
- Zhao, Y. (2012). Auxin Biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant*, 5(2), 334–338.
- Zhao, Y. (2018). Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 417–435.

## CAPITULO II

### EFECTOS PRODUCIDOS POR INTERACCIONES DIRECTAS E INDIRECTAS DE CEPAS DE *Streptomyces* spp. SOBRE *Sclerotium rolfsii*

#### INTRODUCCIÓN

*Sclerotium rolfsii* es un fitopatógeno de vida libre, posee la capacidad de producir estructuras de resistencia llamados esclerocios, los cuales sobreviven en estado latente en el suelo durante el invierno en la espera de condiciones óptimas presentes en la siguiente temporada (Liu *et al.*, 2022). Causa pudrición de la semilla, pudrición del tallo y marchitez en un amplio rango de hospederos que va desde jitomate, papa, calabaza, cacahuate, cebolla, hasta reportes en huertos de manzano en el estado de Sonora, esto debido a su capacidad de infección la cual comienza en la semilla, raíz o región del tallo que culmina en la descomposición de la planta (Rabinal & Bhat, 2019; Coulibaly *et al.*, 2022; Hernández-Jiménez *et al.*, 2004). El control de dicho fitopatógeno continua en proceso, debido a la resistencia de sus estructuras, en la actualidad el uso de fungicidas químicos son la única opción de manejo, pero ha generado cepas resistentes y su impacto ambiental es excesivo (Rabinal & Bhat, 2019; Coulibaly *et al.*, 2022). Las nuevas tecnologías usadas en la agricultura han optado por la búsqueda de microorganismos capaces de influir en el crecimiento y desarrollo de fitopatógenos de importancia económica, recientemente estudios realizados con actinobacterias, han demostrado su capacidad de producción de metabolitos secundarios de especial interés, este estudio tiene como objetivo evaluar la interacción entre seis cepas de *Streptomyces* spp. y *S. rolfsii*, con la hipótesis de que sus compuesto difusibles y compuestos volátiles producidos inhiben el crecimiento del fitopatógeno, generando así una alternativa al uso de fungicidas químicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Escrutinio contra Hongos Fitopatógenos

Seis cepas de actinobacterias (PCR-3, PCR-5, 3AC, 4AC, 10AC, 11AC) fueron evaluadas para determinar el efecto de las mismas sobre el crecimiento y desarrollo de seis fitopatógenos: *Macrofumina phaseolina*, *Phytophthora* sp., *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrofumina phaseolina*, *Rafelea fusca*; en el centro de cajas Petri conteniendo Agar Nutritivo (AN), se inoculó cada cepa y se incubó a 32 °C por 7 días, pasado el periodo de incubación en cada extremo cardinal a una distancia de 1.5 cm se inoculó un fragmento de colonia de cada fitopatógeno. A las 24, 48 y 72 h de establecida la confrontación se determinó el crecimiento radial de cada fitopatógeno en dirección a la colonia de actinobacteria, así como el porcentaje de inhibición respecto al testigo.

### Coinoculación

Se obtuvieron suspensiones de esporas de las cepas seleccionadas a partir de colonias de siete días de edad y posteriormente se inocularon 20 µL en puntos cardinales de cajas Petri; después de permitir su secado se colocó el fitopatógeno sobre cada gota del inóculo. Se realizaron seis repeticiones de cada una de las cepas, y seis repeticiones sin actinobacterias que fueron consideradas como control. A las 72 h posteriores a la inoculación (hpi) se realizó la transferencia de los fitopatógenos al AN para ser evaluados a las 24, 48, 72 y 96 hpi. Se determinó el porcentaje de fitopatógenos con la capacidad de germinar nuevamente, formar hifas y que posteriormente generen nuevas colonias. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar. Porcentajes abajo de 25, de 26 a 50 y mayores de 51 de esclerocios germinados y que formaron colonia, se consideró que las actinobacterias tuvieron una actividad antagónica alta, una actividad antagónica moderada y una actividad antagónica baja contra el fitopatógeno, respectivamente.

## **Confrontaciones Duales**

Basados en los resultados que se obtuvieron del escrutinio, en el centro de cajas Petri conteniendo AN se inoculó cada cepa (con seis repeticiones cada una) y se incubó a  $32 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 días, pasado el proceso de crecimiento, en cada extremo cardinal a una distancia de 1.5 cm se colocó un fragmento de colonia de *S. rolfsii*; para evaluar el posible efecto de inhibición de los compuestos volátiles, se retiró la tapa de las cajas a usar y se sustituyó por la base de otra caja Petri siguiendo el protocolo antes mencionado para la inoculación del fitopatógeno sin presencia de las cepas de actinobacterias. Ambas bases se sellaron una frente a la otra y se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 72 h. Se evaluó el crecimiento radial de cada fragmento del fitopatógeno a las 24, 48 y 72 hpi. El testigo consistió en inocular en cada extremo cardinal a una distancia de 1.5 cm al fitopatógeno en cajas Petri libre de actinobacterias y sustituyendo la tapa por una base inoculada de la misma forma.

## **Termoestabilidad de Compuestos Difusibles**

Se realizaron inoculaciones de 12 cajas de AN, con la finalidad de distribuir ampliamente las cepas de *Streptomyces* seleccionadas en el escrutinio para su crecimiento, en las condiciones antes mencionadas. Pasado el periodo de incubación y desarrollo, se retiró el medio de las cajas de Petri y se depositó en un matraz para posteriormente fundirlo hasta obtener un medio líquido, el cual fue preparado a una concentración de 100, 75, 50 y 25% de Agar inoculado y el volumen restante fue preparado con AN. A las 72 hpi se realizó la transferencia de los fitopatógenos al AN para ser evaluados a las 24, 48, 72 y 96 hpi. Se determinó el porcentaje de germinados, así como el crecimiento radial de las hifas. Se realizaron seis repeticiones de cada una de las cepas, y seis repeticiones sin actinobacterias que serán consideradas como control.

## RESULTADOS

### Escrutinio contra Hongos Fitopatógenos

De las seis cepas evaluadas, se seleccionaron aquellas que hayan influido en el desarrollo y crecimiento de las colonias de los fitopatógenos para su evaluación en pruebas posteriores. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de crecimiento radial de las cepas de los fitopatógenos en contacto con las seis actinobacterias antes mencionadas pasadas las 72 h de su evaluación, donde las cepas PCR 3, 3AC y 11AC, obtuvieron los porcentajes de crecimiento más representativos sobre *Sclerotium rolsfii*.

Tabla 1.- Porcentajes de crecimiento radial de diferentes hongos fitopatógenos.

Tratamiento/ Fitopatógeno	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>Sclerotium</i> <i>rolsfii</i>	<i>Macrofumina</i>	<i>Fusarium</i> <i>solani</i>	<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>
<b>Control</b>	100	100	100	100	100
<b>PCR 3</b>	92.3	11.0	76.5	109.1	46.2
<b>PCR 5</b>	-	18.5	-	90.9	-
<b>3 AC</b>	128.6	0.0	43.5	83.3	71.4
<b>4 AC</b>	122.2	45.0	73.9	125.0	100.0
<b>10 AC</b>	61.5	15.0	64.7	54.5	46.2
<b>11 AC</b>	69.2	3.7	64.7	81.8	76.9

### Coinoculación

Basados en los resultados del escrutinio se seleccionaron tres cepas de actinobacterias (PCR 3, 3AC ,11 AC) para ser evaluadas, consideradas de interés debido a la inhibición causada contra *S. rolsfii* (Tabla 1). La coinoculación de los microorganismos nos permitió evaluar su interacción directa y la competencia existente entre ellos. Las actinobacterias mostraron la capacidad de desarrollarse en menor tiempo en contraste al esclerocio de *Sclerotium rolsfii*, por lo que se apreció una colonia madura, y le permitió controlar el crecimiento del fitopatógeno. Con el supuesto de que la presión ejercida sobre el esclerocio se debía a la colonia, al realizar la transferencia a un AN nuevo tendría la capacidad de germinar, colonizar el medio y formar una colonia nueva; sin embargo, el

crecimiento de las cepas de actinobacterias fue el resultado dicha re-siembra (Fig.20, Fig.21, Fig.22)



Figura 20. Esclerocios de la coinoculación de la cepa PCR 3 y *S. rolfsii* a las 72 hpi en AN.

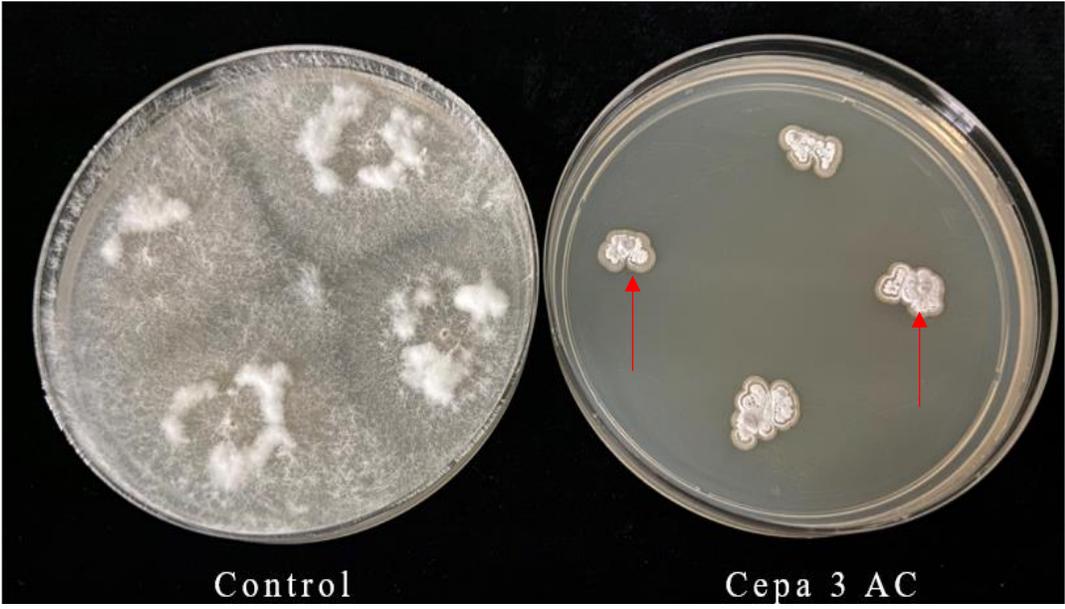


Figura 21. Esclerocios de la coinoculación de la cepa 3AC y *S. rolfsii* a las 72 hpi en AN.

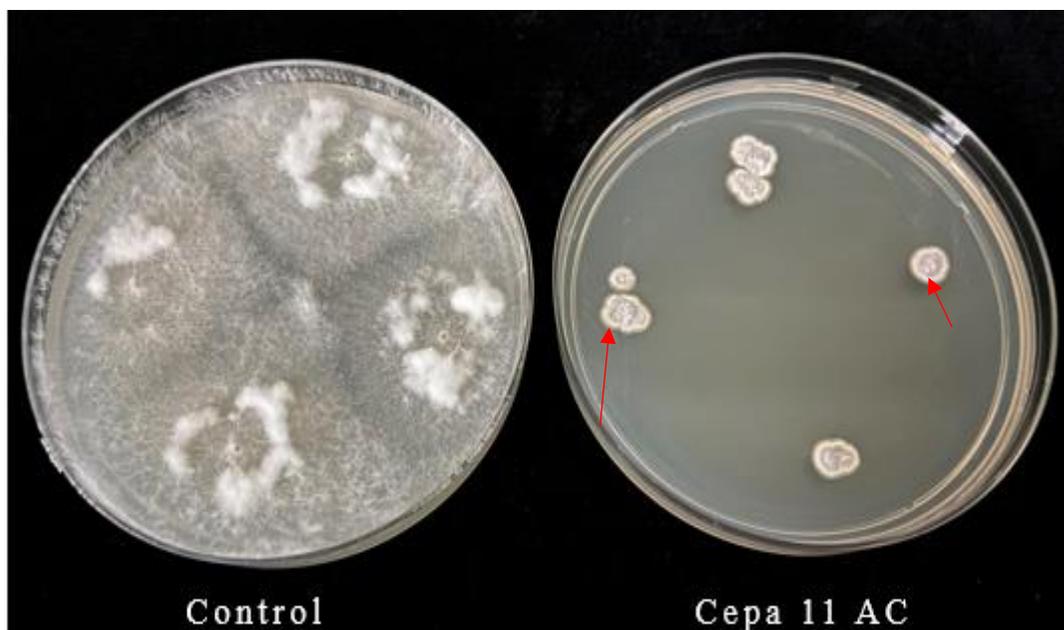


Figura 22.- Esclerocios de la coinoculación de la cepa 11 AC y *S. rolfsii* a las 72 hpi en AN.

En la Figura 23 se hace una vista con estereoscopio con la finalidad de observar a detalle la estructura del esclerocio y su posible desarrollo en el medio de cultivo; sin embargo, solo se logra apreciar como las actinobacterias han colonizado una vez más no solo el medio, si no en su totalidad a la estructura del fitopatógeno, sirviendo, como un inóculo de las cepas.

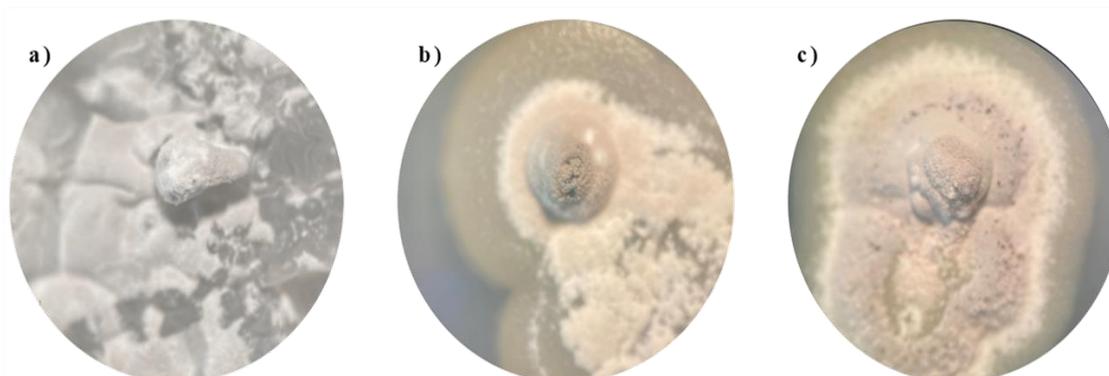


Figura 23. Vista en estereoscopio de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* posteriores a la transferencia en AN. a) Vista en estereoscopio de esclerocio de la coinoculación de la cepa PCR 3 a las 72 hpi en AN. b) Vista en estereoscopio de esclerocio de la coinoculación de la cepa 3 AC a las 72 hpi en AN. c) Vista en estereoscopio de esclerocio de la coinoculación de la cepa 11 AC a las 72 hpi en AN.

## Confrontaciones Duales

Las confrontaciones duales tienen como objetivo evaluar el efecto de los compuestos difusibles en el medio y los compuestos volátiles, ambos producidos por las cepas inoculadas. Durante el tiempo de interacción se observó que, en contraste con el escrutinio en donde existía cierto crecimiento radial de las hifas aún cuando se encontraban en contacto con los compuestos difusibles presentes en el medio, dicho comportamiento no se repitió y la inhibición fue del 100% en cada una de las repeticiones de cada cepa (Fig. 24, Fig. 25, Fig. 26). Aunado a ello, no se presentó la colonización del medio por parte de *S. rolfsii* como se observa en el control, debido a la presencia de la actinobacteria.

Las tres cepas poseen la capacidad de producir ambos compuestos con la capacidad de influir en el desarrollo de las colonias de *S. rolfsii*.

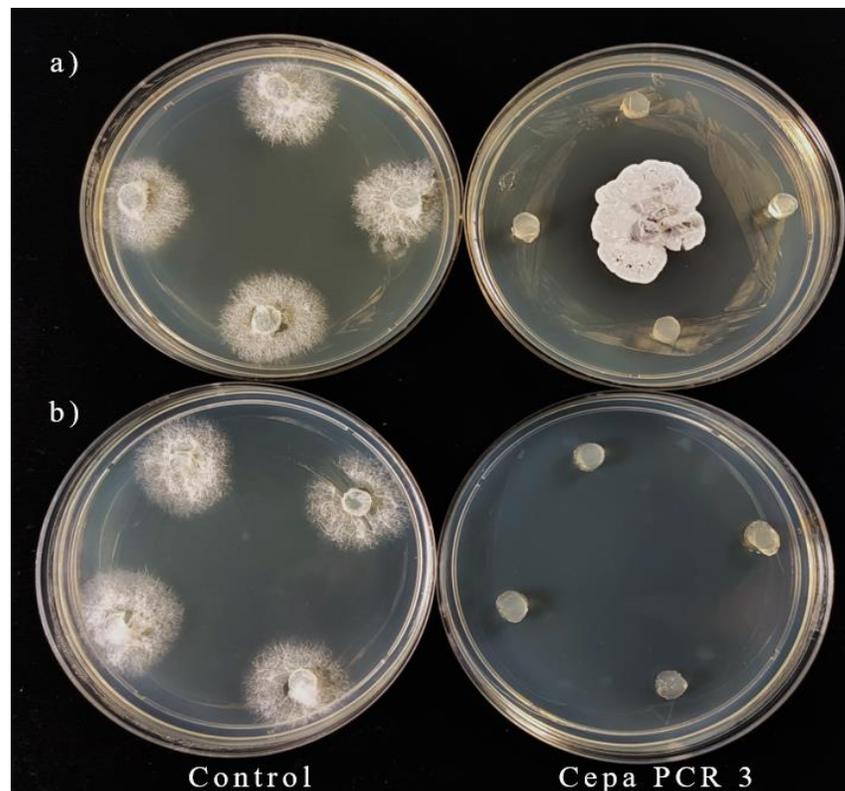


Figura 24. Confrontación dual de la cepa PCR 3 vs *Sclerotium rolfsii* 72 hpi. a) Evaluación del efecto de los compuestos difusibles en el medio. b) Evaluación del efecto de los compuestos volátiles producidos por la cepa.

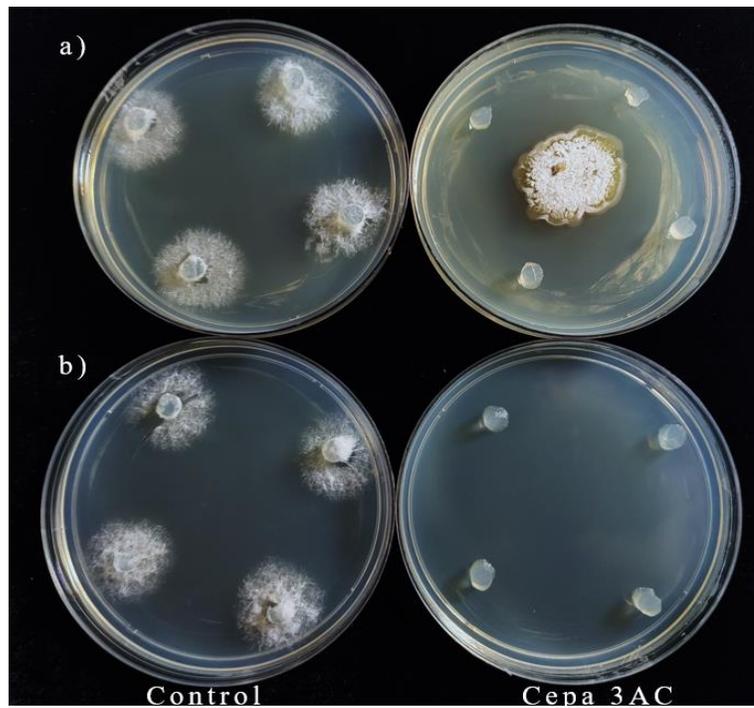


Figura 25. Confrontación dual de la cepa 3AC vs *Sclerotium rolfsii* 72 hpi. a) Evaluación del efecto de los compuestos difusibles en el medio. b) Evaluación del efecto de los compuestos volátiles producidos por la cepa.

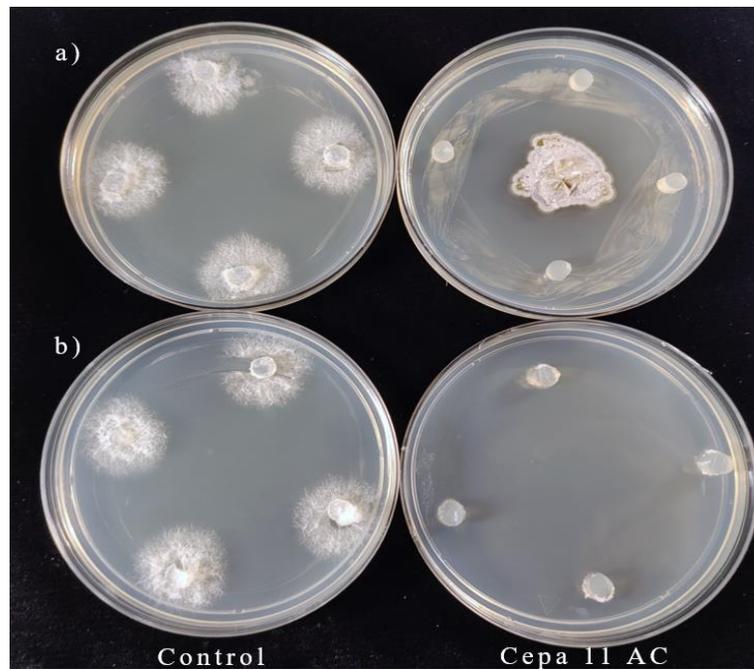


Figura 26. Confrontación dual de la cepa 11AC vs *Sclerotium rolfsii* 72 hpi. a) Evaluación del efecto de los compuestos difusibles en el medio. b) Evaluación del efecto de los compuestos volátiles producidos por la cepa.

## Termoestabilidad de Compuestos Difusibles

Considerando los resultados obtenidos de las confrontaciones duales, la capacidad que poseen los compuestos difusibles producidos por las actinobacterias resultó ser de especial interés debido al efecto causado sobre las diferentes estructuras de *Sclerotium rolfii*, por lo que la caracterización de dichos compuestos es de relevancia. Una característica es la termoestabilidad de los mismos, dicha prueba nos permitió saber si posterior a su esterilización y en diferentes concentraciones de los medios con compuestos difusibles, se posee el mismo o diferente efecto presentado antes de su exposición a la temperatura y presión a la cual fue sometida. Durante su incubación en los medios con las distintas concentraciones, se tuvo un efecto de fungistasis; sin embargo, al realizar la resiembra en AN aquellas que eran menores (50 y 25%) presentaron crecimiento, dichos resultados variaron dependiendo de la cepa.

La cepa PCR 3 presentó termoestabilidad en sus compuestos producidos, conforme disminuía la concentración de los mismos, la germinación de esclerocios se presentó a las 48 h post resiembra (Fig.27). Dando así como resultado que la exposición de dichas estructuras a los compuestos difusibles termoestables más concentrados disminuye la viabilidad del esclerocio hasta evitar por completo su capacidad de formación de nuevas colonias, efecto llamado fungicida.

Las cepas 3AC y 11AC, al igual que la anterior, presentaron termoestabilidad en sus compuestos; sin embargo, la concentración al 50% tuvo el mismo efecto que las dos más altas (100 y 75%). La resiembra de las estructuras del fitopatógeno en AN, confirmó que la viabilidad del esclerocio a excepción del 25% es nula después de la interacción con los medios esterilizados (Fig. 28, Fig. 29).

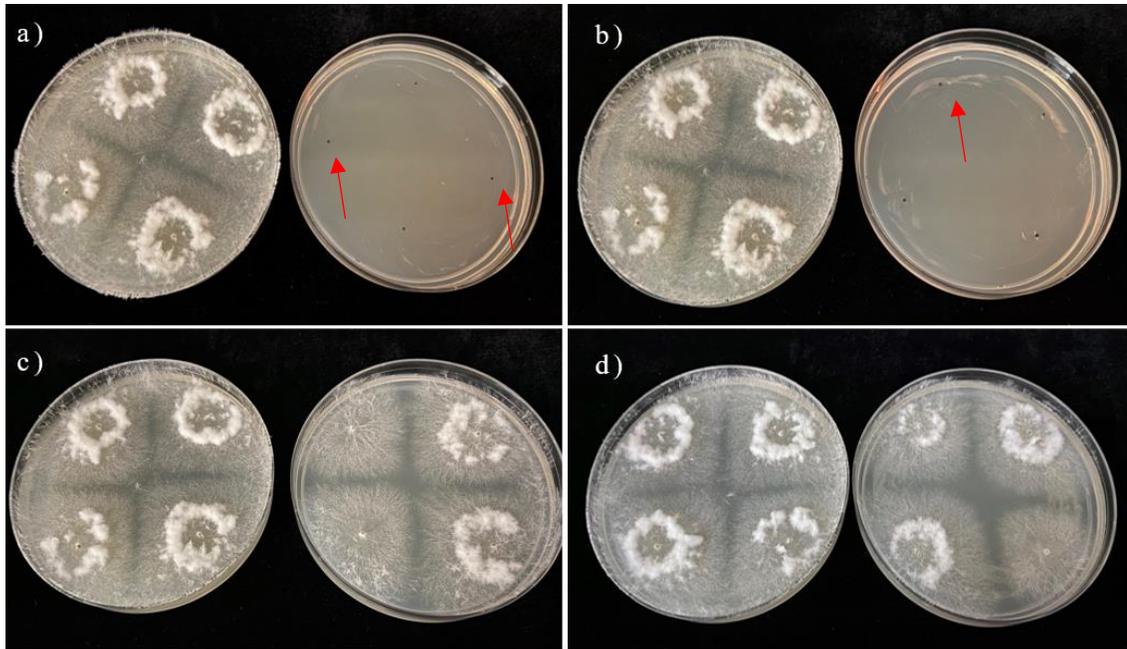


Figura 27. Resiembra en AN de esclerocios expuestos a diferentes concentraciones de medios con la cepa PCR 3 y sus compuestos. a) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 100%. b) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 75%. c) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 50%. d) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 25 %.

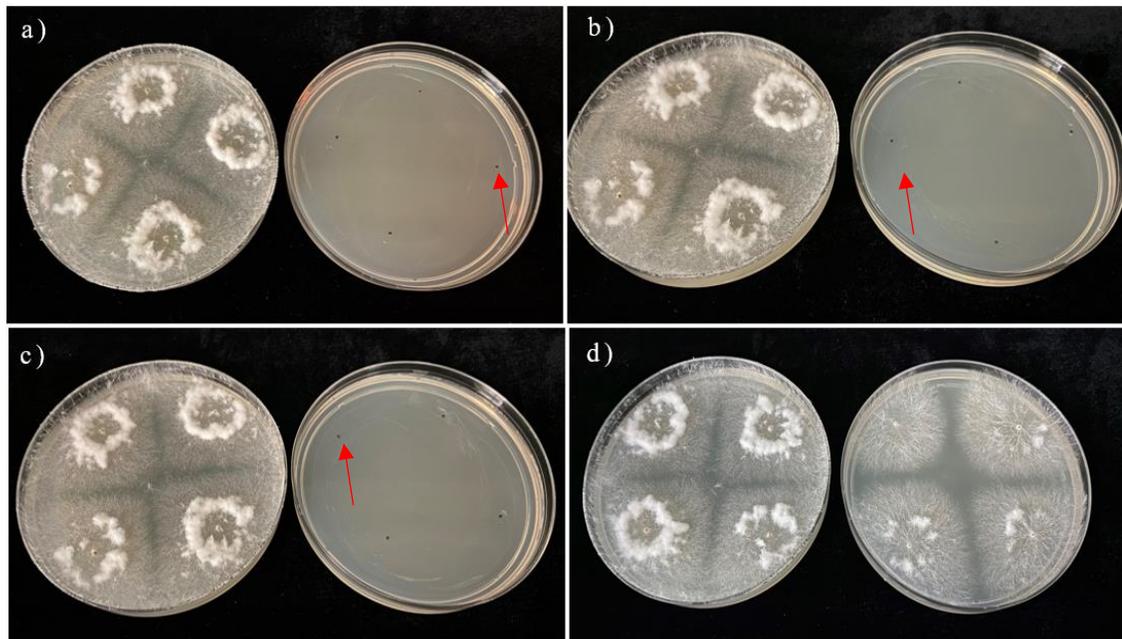


Figura 28. Resiembra en AN de esclerocios expuestos a diferentes concentraciones de medios con la cepa 3AC y sus compuestos. a) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 100%. b) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 75%. c) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 50%. d) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 25%.

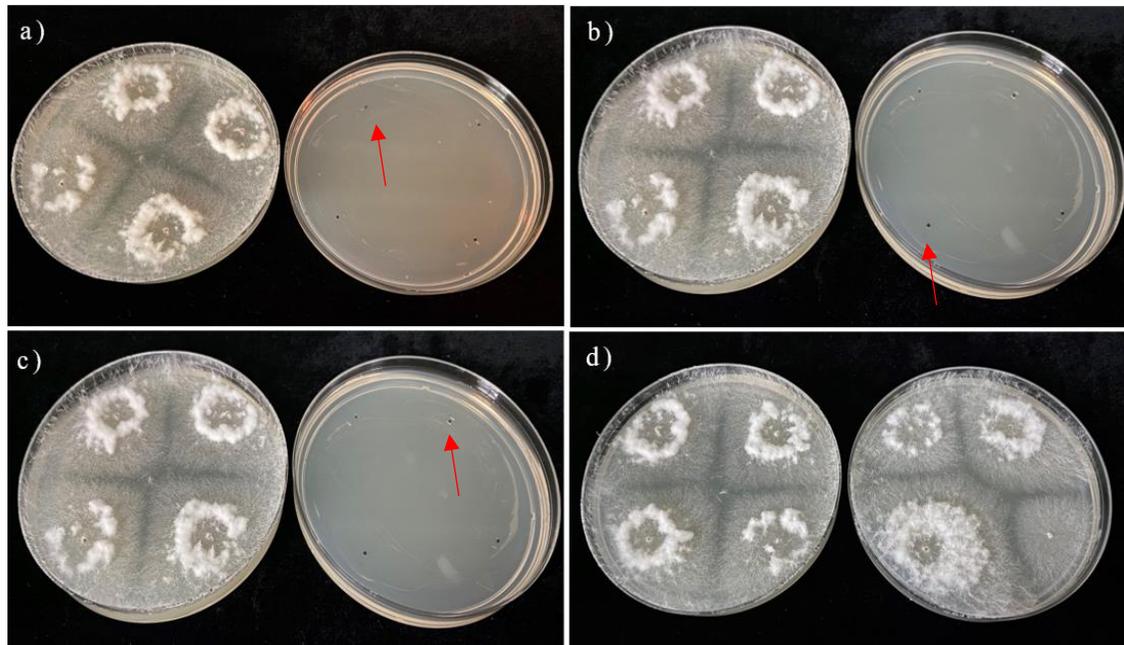


Figura 29. Resiembra en AN de esclerocios expuestos a diferentes concentraciones de medios con la cepa 11AC y sus compuestos. a) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 100%. b) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 75%. c) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 50%. d) Resiembra en AN de esclerocios expuestos a una concentración de 25%.

## DISCUSIÓN

Kumaran *et al.*, (2020) realizó aislamientos microbiológicos, en donde su objetivo principal fue el aislamiento de actinobacterias productoras de ciertos pigmentos marinos para su identificación metabólica, cuya finalidad era la búsqueda de bioactivos producidos por las cepas capaces de influir en el crecimiento y desarrollo de patógenos de importancia económica en la acuicultura. Las confrontaciones fueron entre los compuestos extraídos de las actinobacterias contra *Pseudomonas sp*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophilia*, *Vibrio paraheamolyticus* y *Vibrio Harvey*, en donde existe inhibición de crecimiento de dichos patógenos; si bien los microorganismos evaluados en su estudio no son considerados de importancia vegetal, el uso de actinobacterias arrojaron además la identificación de sus compuestos con efecto antifúngico, tal como es el caso de los metabolitos producidos por las cepas usadas en nuestro estudio en donde no solo influye en el crecimiento del hongo, si no en la inhibición del desarrollo de *S. rolfsii*.

El uso de microorganismos para uso antagónico de fitopatógenos suele limitarse a *Trichoderma* y algunas bacterias, dejando a un lado el uso y beneficios debido a los pocos estudios sobre actinobacterias según menciona Li *et al.*, (2017), además en su investigación titulada “Mechanism of *in vitro* antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes” hace uso de cinco cepas de *Streptomyces* para el control de diversos hongos de importancia económica (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*) y *S. rolfsii*, dicho autor en Li *et al.*, (2019) hizo uso de una nueva metodología de biofiltrados libres de células, para la inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* y *F. oxysporum* logrando así la inhibición de un 22 y 36%, respectivamente, caso contrario en nuestro trabajo donde se obtuvo la inhibición total del crecimiento del primer fitopatógeno.

Dichos estudios hacen uso de diferentes metodologías en donde se extraen y evalúan los metabolitos producidos por las cepas, en contraste a nuestro estudio donde se hace la interacción de los distintos compuestos producidos, tanto los compuestos volátiles como los difusibles, además de la interacción directa actinobacteria-fitopatógeno.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se logaron evaluar dos cepas de actinobacterias 3AC (*Streptomyces* sp.) y 4AC (*Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus*) las cuales demostraron en plantas de tomate y de *Arabidopsis thaliana* tener acción de promotor de crecimiento al compararse con las plántulas control, se podría ampliar esta frase indicando los efectos promotores más importantes (desarrollo de raíz, de la parte aérea). Además, no se indica cual tratamiento directo o a distancia funciono mejor. En los estudios de interacción de la cepa 4AC con la línea reportera *DR5::GUS* se encontró que el periodo de interacción entre las plantas y el microorganismo incrementa la respuesta del reportero, por lo que esta cepa estimula la respuesta a auxinas. A pesar de la nula esterilidad del sustrato para la evaluación en condiciones de invernadero las inoculaciones consecutivas de las cepas 3AC y 4AC además de conferirle al tomate la capacidad de resistir a las condiciones en las que se desarrollaron las plantas.

Con los resultados antes mencionados la caracterización del efecto sobre fitopatógenos fue de relevancia, siendo las cepas PCR 3, 3AC y 11AC, aquellas que poseen la capacidad de ejercer un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de *S. rolfsii*. Las diferentes interacciones de dichos microorganismos por medio de compuestos difusibles, compuestos volátiles y de inoculaciones directa, permitieron concluir que las cepas poseen actividad fungicida sobre el fitopatógeno y sobre su estructura de resistencia.

Se requiere realizar más estudios para la identificación y la cuantificación de metabolitos producidos por dichas cepas.

## LITERATURA CITADA

- Coulibaly, A. E., Pakora, G., Ako, A. B. A., Amari, G. E., N'Guessan, C. A., Kouabenan, A., Kone, D., & Djaman, J. A. (2022). Diversity of *Sclerotium rolfii* antagonist fungi isolated from soils of the rhizosphere of tomato crops and identification of some antifungal compounds. *Heliyon*, 8(2), e08943.
- Heinemann, M., & Sauer, U. (2010). Systems biology of microbial metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 337–343.
- Hernández-Jiménez, J., Montes-Belmont, R., Flores-Moctezuma, H.E., Nava-Juárez, R.A., Chanona-Pérez, J. (2004). Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22, 345-350.
- Khan, S. T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozone, I., Mukai, A., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2010)-. Streptomyces associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environmental Microbiology*, 13(2), 391–403.
- Kumaran, S., Bharathi, S., Utra, V., Thirunavukkarasu, R., Nainangu, P., Gopi Krishnan, V., Renuga, P. S., Wilson, A., & Balaraman, D. (2020). Bioactive metabolites produced from *Streptomyces enissocaesilis* SSASC10 against fish pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101802.
- Li, M., Guo, R., Yu, F., Chen, X., Zhao, H., Li, H., & Wu, J. (2018). Indole-3-Acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 443.
- Li, Y., Guo, Q., He, F., Li, Y., Xue, Q., & Lai, H. (2019). Biocontrol of root diseases and growth promotion of the tuberous plant *Aconitum carmichaelii* induced by actinomycetes are related to shifts in the rhizosphere microbiota. *Microbial Ecology*, 79(1), 134–147.

- Li, Y., He, F., Lai, H., & Xue, Q. (2017). Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 299–311.
- Liu, F., Yang, S., Xu, F., Zhang, Z., Lu, Y., Zhang, J., & Wang, G. (2022). Characteristics of biological control and mechanisms of *Pseudomonas chlororaphis* zm-1 against peanut stem rot. *BMC Microbiology*, 22(1), 1-13.
- Rabinal, C., & Bhat, S. (2019). Identification of differentially expressed genes in *Trichoderma koningii* IABT1252 during its interaction with *Sclerotium rolfsii*. *Current Microbiology*, 77(3), 396–404.