

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN**  
**PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**  
**UNIDAD SINALOA**



“Selección y evaluación de bacterias endófitas de plantas de la familia Poaceae de la Reserva la Uba, Guasave, Sinaloa, con potencial biotecnológico y antagonístico a *Rhizoctonia zeae*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN  
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

GLORIA MARGARITA ZAMUDIO AGUILASOCHO

GUASAVE, SINALOA, MEXICO. DICIEMBRE, 2019.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 06 del mes de diciembre del año 2019, el que suscribe Gloria Margarita Zamudio Aguilasocho alumna del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente, con número de registro A180497, adscrito al CIIDIR Unidad Sinaloa, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y el Dr. Jesús Damián Cordero Ramírez y cede los derechos del trabajo titulado “Selección y evaluación de bacterias endófitas de plantas de la familia Poaceae de la Reserva la Uba, Guasave, Sinaloa, con potencial biotecnológico y antagonico a *Rhizoctonia zeae*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [gloria.aguilas8@hotmail.com](mailto:gloria.aguilas8@hotmail.com); [ignacioemaldonado@yahoo.com.mx](mailto:ignacioemaldonado@yahoo.com.mx); [elcofra@yahoo.com.mx](mailto:elcofra@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

*Gloria Aguilasocho*

GLORIA MARGARITA ZAMUDIO AGUILASOCHO



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-13  
REP 2017

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS  
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS*

Ciudad de México  de  del

El Colegio de Profesores de Posgrado de  en su Sesión  
(Unidad Académica)

No.  celebrada el día  del mes  de  conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Zamudio	Apellido Materno:	Aguilasocho	Nombre (s):	Gloria Margarita
-------------------	---------	-------------------	-------------	-------------	------------------

Número de registro:

del Programa Académico de Posgrado:

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Objetivo general del trabajo de tesis:

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director:  2° Director:

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

2° Director de Tesis

Dr. Jesús Damián Cordero Ramírez

Aspirante

Gloria Margarita Zamudio Aguilasocho

Presidente de colegio de profesores

Dr. Héctor Manuel Esparza Leal





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14  
 REP 2017

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de  siendo las  horas del día  del mes de  del  se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de:  para examinar la tesis titulada:  por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Zamudio	Apellido Materno:	Aguilasocho	Nombre (s):	Glicia Margarita
-------------------	---------	-------------------	-------------	-------------	------------------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:


Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **NO APROBAR**  la tesis, en virtud de los motivos siguientes:  
Satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_


Comisión Revisora de Tesis

  
 Director de Tesis  
 Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza  
 13295-EG-18 Profesor colegiado Titular C

  
 Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez  
 12418-EA-17 Profesor Colegiado Titular B

  
 Dr. Francisco Roberto Quroz Figueroa  
 14590-ED-19 Profesor Colegiado Titular C

  
 2º Director de Tesis  
 Dr. Jesús Damán Cordero Ramírez

  
 Dra. Melina López Moyer  
 13298-EF-18 Profesor Colegiado Titular C

Presidente del Colegio de Profesores

  
 Dr. Hector Manuel Esparza Leal



**CIIDIR - IPN**  
 UNIDAD SINALOA  
 DIRECCION

## **Agradecimiento a proyectos**

El trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Rhizósfera del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección de el Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y el Dr. Jesús Damian Cordero Ramírez. El presente trabajo fue apoyado económicamente a través del proyecto SIP 20170939, SIP 20195345 Y UDO-PTC-047 (511-6/17-7608). La alumna Zamudio Aguilasocho fue apoyada con una beca CONACYT con clave 894763.



## Dedicatoria

*A mis ángeles en el cielo, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles, aunque ya no estén presentes se que me guían con su infinita luz y estoy segura que se sentirán muy orgullosos de mis logros. Siempre en mi mente y mi corazón abuelo **Francisco Aguílasocho** † y primo **Gabriel Espinoza Aguílasocho** †.*

*A mi madre **María Rita Aguílasocho Peñelas** por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, sentó en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación, siempre apoyándome en cada sueño y en cada lucha. Todos mis logros son gracias a usted.*

*A mi familia quienes son mi motor, especialmente a mis hermanos y abuelita: **Jesús Hector, Alejandra y Mamá Tita**.*

*A mi novio **Tony Montoya** que en todo momento estuvo apoyándome y aguantando mi mal humor. Eres el mejor!!*

## **Agradecimientos**

A dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Al Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza que a pesar de que no me conocía depositó su confianza en mí y abrió las puertas de su laboratorio permitiéndome formar parte de su gran equipo de trabajo. Gracias por la formación y orientación académica brindada durante mi estancia. Es un claro ejemplo de persona a seguir.

Al Dr. Jesús Damian Cordero Ramírez por su incondicional ayuda y buena disposición en la realización de la tesis. Además, agradezco infinitamente por insistir tanto para que continuara preparándome académicamente.

A la Dra. Estefanía Morales Ruiz por tener siempre la mejor disposición en ayudarme para el desarrollo de mi proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Molecular de la Rizósfera por sus consejos y apoyo brindado: Iselita, Alicia, Paul, Valeira, Masudur y Eduardo.

A mis amigos Sandy, Candelario y Ricardo por su apoyo, consejos, largas charlas en el laboratorio, tantas risas y momentos divertidos, sin duda alguna ustedes hicieron que mi estancia fuera muy feliz.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
Glosario.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Interacción microorganismo-planta.....	3
2.2. Bacterias endófitas .....	4
2.2.1. Mecanismos de las bacterias endófitas como promotoras del crecimiento vegetal .....	5
2.2.2. Bacterias endófitas como agentes de biocontrol.....	8
2.2.3. Colonización de plantas por bacterias endófitas.....	9
2.3. Zona de preservación ecológica del centro de población “La Uba” .....	11
2.4. Importancia del carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.).....	14
2.5. El cultivo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	15
2.5.1. Problemáticas del cultivo .....	16
2.6. El género <i>Rhizoctonia</i> .....	17
2.6.1. Ciclo infectivo.....	18
2.7. Bacterias endófitas con potencial biotecnológico en maíz y carrizo .....	19
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos específicos .....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
6.1. Material vegetal y aislamiento de microorganismos.....	24
6.2. Prueba de viabilidad de la colección bacteriana .....	25
6.3. Prueba de hemólisis .....	26
6.4. Evaluación del potencial antagónico.....	26
6.4.1. Conservación del hongo fitopatógeno <i>Rhizoctonia zeae</i> .....	26



6.4.2. Bioensayos vs. fitopatógenos <i>in vitro</i> .....	27
6.4.3. Producción de quitinasas.....	28
6.4.4. Producción de glucanasas.....	29
6.4.5. Producción de proteasas.....	30
6.4.6. Producción de lipasas.....	30
6.5. Evaluación de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal.....	31
6.5.1. Producción de sideróforos.....	31
6.5.2. Producción de ácido indolacético (AIA).....	32
6.5.3. Solubilización de fosfatos.....	32
6.6. Identificación molecular de microorganismos antagonistas.....	33
6.6. 1. Extracción del ADN genómico.....	33
6.6. 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
6.7. Implementación de <i>Galleria mellonella</i> como modelo de estudio para microorganismos patógenos.....	34
6.7.1. Crianza de larvas de <i>G. mellonella</i> .....	34
6.7.2. Condiciones de crecimiento de cepas bacterianas y preparación de inóculos para infección.....	35
6.7.3. Infección de <i>G. mellonella</i> .....	36
6.8. Comprobación del endofitismo en las bacterias.....	37
6.8. 1. Resistencia a antibióticos.....	37
6.8. 2. Preparación de células electrocompetentes.....	37
6.8. 3. Transformación bacteriana.....	38
6.8. 4. Colonización de bacterias en raíces de maíz.....	39
6.8. 5. Confirmación de la colonización y visualización microscópica de las bacterias en raíces de maíz.....	40
7. RESULTADOS.....	42
7.1. Creación de la colección microbiana.....	42
7.2. Determinación del potencial antagonico.....	44
7.2.1. Determinación de la producción de quitinasas.....	46
7.2.2. Determinación cualitativa de la actividad glucanasa.....	46
7.2.3. Determinación cualitativa de la actividad proteasa.....	48
7.3. Determinación cualitativa de la actividad lipasa.....	49

7.4. Determinación de la producción de sideróforos .....	50
7.5. Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA). .....	51
7.6. Determinación de la solubilización de fosfato .....	51
7.7. Identificación molecular de los aislados bacterianos endofíticos .....	52
7.8. Evaluación de la virulencia de las cepas de carrizo y maíz en bioensayos con <i>G. mellonella</i> .....	53
7.9. Evaluación de la resistencia a los diferentes antibióticos .....	59
7.10. Transformación de bacterias endófitas de maíz.....	59
7.11. Confirmación de la colonización de las raíces de maíz con bacterias aisladas de carrizo y maíz.....	60
7.12. Visualización al microscopio de raíces de maíz colonizadas por <i>B. aryabhattai</i> .....	61
7.13. Visualización al microscopio de raíces de maíz colonizadas por <i>P. guariconensis</i> y <i>P. plecoglossicida</i> expresando la proteína fluorescente roja mCherry. ....	62
8. DISCUSIÓN.....	65
9. CONCLUSIONES.....	74
10. BIBLIOGRAFÍA.....	75
11. ANEXOS.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Interacciones endofíticas planta-bacteria.....	5
<b>Figura 2.</b> Tipos de endófitos y su proceso de colonización en la raíz.....	10
<b>Figura 3.</b> Reserva Ecológica “La Uba”.....	12
<b>Figura 4.</b> Ciclo infectivo de <i>Rhizoctonia</i> .....	19
<b>Figura 5.</b> Esquema general del trabajo.....	24
<b>Figura 6.</b> Esquema de los bioensayos patógeno vs. microorganismo.....	27
<b>Figura 7.</b> Curva estándar para la cuantificación de AIA.....	32
<b>Figura 8.</b> Adultos de <i>Galeria mellonella</i> .....	35
<b>Figura 9.</b> Inyección de larvas de <i>G. mellonella</i> .....	37
<b>Figura 10.</b> Mapa del plásmido pPROBE mCherry (RFP).....	39
<b>Figura 11.</b> Prueba de hemólisis.....	43
<b>Figura 12.</b> Tinción de Gram.....	44
<b>Figura 13.</b> Capacidad antagónica de aislados de carrizo hacia <i>Rhizoctonia zeae</i> ... ..	45
<b>Figura 14.</b> Capacidad antagónica de aislados de maíz hacia <i>Rhizoctonia zeae</i> .....	46
<b>Figura 15.</b> Bacterias endófitas con capacidad de producir quitinasas en agar quitina coloidal.....	46
<b>Figura 16.</b> Actividad $\beta$ -1,4-endoglucanasa de bacterias endófitas de carrizo y maíz.....	47
<b>Figura 17.</b> Actividad proteasa de bacterias de carrizo y maíz.....	48
<b>Figura 18.</b> Actividad lipasa de bacterias de carrizo y maíz.....	49
<b>Figura 19.</b> Producción de sideróforos por bacterias endófitas de carrizo y maíz.....	50
<b>Figura 20.</b> Bacterias endófitas de carrizo y maíz con capacidad de solubilizar fosfato.....	52
<b>Figura 21.</b> Larvas utilizadas para los ensayos de virulencia.....	53
<b>Figura 22.</b> Curvas de supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectadas con cepas $\gamma$ -hemolíticas aisladas de carrizo.....	55
<b>Figura 23.</b> Curvas de supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectadas con cepas $\gamma$ -hemolíticas aisladas de maíz.....	56

<b>Figura 24.</b> Curvas de supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectadas con cepas $\alpha$ -hemolíticas aisladas de carrizo.....	58
<b>Figura 25.</b> Curvas de supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectadas con cepas $\alpha$ -hemolíticas aisladas de maíz.....	58
<b>Figura 26.</b> Confirmación de la transformación de <i>P. guariconensis</i> (37) y <i>P. plecoglossicida</i> (66) con el plásmido pPROBE mCherry en gel de agarosa. ....	60
<b>Figura 27.</b> Colonización de <i>B. aryabhatai</i> en raíces de maíz.. .....	61
<b>Figura 28.</b> Colonización de <i>P. guariconensis</i> y <i>P. plecoglossicida</i> en raíces de maíz. ....	61
<b>Figura 29.</b> Raíces de maíz colonizadas por <i>B. aryabhatai</i> y teñidas con WGA-Alexa Fluor 488®.....	62
<b>Figura 30.</b> Raíces de maíz colonizadas por <i>P. guariconensis</i> transformadas con el plásmido pPROBE mCherry mediante microscopía de fluorescencia .....	63
<b>Figura 31.</b> Raíces de maíz colonizadas por <i>P. plecoglossicida</i> transformadas con el plásmido pPROBE mCherry mediante microscopía de fluorescencia roja. ....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Criterio de actividad glucansa .....	30
<b>Tabla 2.</b> Aislamiento de bacterias en plantas de carrizo y maíz .....	42
<b>Tabla 3.</b> Prueba de hemólisis .....	43
<b>Tabla 4.</b> Efecto antagonista <i>in vitro</i> de aislados bacterianos de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.) contra <i>R. zea</i> , y su porcentaje de inhibición (% de inhibición) en medio PDA. ....	45
<b>Tabla 5.</b> Análisis cualitativo de la actividad $\beta$ -1,4-endoglucanasa de bacterias endófitas de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	47
<b>Tabla 6.</b> Análisis cualitativo de la actividad proteasa de bacterias endófitas de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.). ....	48
<b>Tabla 7.</b> Análisis cualitativo de la actividad lipolítica de bacterias endófitas de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.). ....	49
<b>Tabla 8.</b> Producción de sideróforos de bacterias endófitas de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	50
<b>Tabla 9.</b> Producción de AIA de bacterias endófitas. ....	51
<b>Tabla 10.</b> Índice de solubilización de fosfato (IS) de bacterias endófitas de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.).. ....	52
<b>Tabla 11.</b> Identidad de bacterias endófitas de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	53
<b>Tabla 12.</b> Aislados bacterianos de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.) que mostraron efecto antagonista <i>in vitro</i> contra <i>R. zea</i> , y su porcentaje de inhibición (% de inhibición) en medio PDA. ....	57
<b>Tabla 13.</b> Patrón de resistencia a antibióticos de las bacterias $\gamma$ -hemolíticas con potencial antagónico a <i>R. zea</i> . ....	59
<b>Tabla 14.</b> Características de biocontrol y promoción de crecimiento vegetal de bacterias endófitas de carrizo ( <i>Arundo donax</i> L.) y maíz ( <i>Zea mays</i> L.). ....	66

## Glosario

**Antagonismo.** Interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos.

**Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.** Bacterias de vida libre en el suelo capaces de adaptarse, colonizar la planta y persistir favoreciendo el crecimiento y desarrollo vegetal.

**Cepa.** En microbiología, una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior.

**Coloización bacteriana.** Es la capacidad que tienen las bacterias para establecerse y multiplicarse en las raíces de las plantas ya sea en el exterior o en el interior de una célula vegetal.

**Control biológico.** Método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

**Endófito.** Organismo endosimbionte, a menudo una bacteria u hongo, que vive dentro de una planta durante al menos una parte de su ciclo de vida.

**Fitopatógeno.** Agente causante o capaz de causar enfermedad en las plantas

**Nativo.** Relativo al lugar donde se ha nacido.

**Patogenicidad.** Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

**Virulencia.** Término cuantitativo que define el grado en que un patógeno puede causar enfermedad; esto a menudo está relacionado con el número de microorganismos que se requieren para causar la infección o la frecuencia de infección en una población dada y los determinantes de virulencia de la cepa.

## Resumen

En Sinaloa, el maíz es uno de los cultivos de granos más rentables, lo que ha llevado a su monocultivo, esto ha provocado la aparición y el aumento de problemas causados por enfermedades fúngicas, tal es el caso de *Rhizoctonia zae*. En los últimos años la incidencia en el maíz de este hongo fitopatógeno ha aumentado, causando pudrición de tallos y raíces. Para combatir enfermedades de este tipo se ha empleado el control biológico, sin embargo, la efectividad no ha sido la esperada. Uno de los principales motivos para la falta de éxito es que los microorganismos utilizados son bacterias exóticas. De esto se deriva la importancia de utilizar organismos nativos de la región para el control biológico, como es el caso de las bacterias endofíticas aisladas de carrizo y el maíz. Estas bacterias endofíticas al compartir el mismo nicho ecológico que el patógeno poseen un potencial antagonismo para combatir la rizoctoniasis.

Se utilizó la hoja, el tallo y la raíz de la planta de carrizo y maíz para realizar el aislamiento de bacterias, se seleccionaron once cepas  $\gamma$ -hemolíticas que presentaron capacidad antagonista contra *R. zae* con porcentajes de inhibición del crecimiento que oscilaron del 21 al 50%. Asimismo, se realizó una caracterización para conocer los posibles mecanismos de antagonismo y promoción del crecimiento. Se encontró que una cepa produce quitinasa, seis cepas producen glucanasas y proteasas, ocho cepas producen IAA en un rango de 0.013 a 1.60  $\mu\text{g/mL}$ , seis cepas producen sideróforos y seis presentan la capacidad de solubilizar fosfato. Para complementar la caracterización de las bacterias en cuanto a su posible patogenicidad al humano, se implementó el modelo de *Galleria mellonella* para evaluar la virulencia que éstas presentaban encontrando tres cepas virulentas. Así mismo, se realizó la identificación molecular de los aislados más promisorios y se encontró que pertenecen a las siguientes especies: *Rhizobium pakistanense*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus aryabhatai*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas guariconensi*, *Pseudomonas plecoglossicidaugugosa*. Finalmente, se evidenció la colonización de *B. aryabhatai*, *P. guariconensi* y *P. plecoglossicida* en raíces de maíz por microscopía de fluorescencia. Considerando lo anterior, se concluyó que las cepas

aisladas de carrizo y maíz tienen el potencial de promover el crecimiento de las plantas y ejercer control biológico de *R. zae*.

### **Abstract**

In Sinaloa, corn is one of the most profitable grain crops. This has led to its monoculture, and to the appearance and increase of problems caused by fungal diseases, such as *Rhizoctonia zae*, that during the last years has seen an increase in its incidence in maize, causing stem and root rot. To fight this type of diseases biological control has been used, however, the effectiveness has not been as expected and one of the main reasons for the lack of success is that the microorganisms used are exotic bacteria. Derived of this reason, it is important to use native organisms of the region for biological control. This is the case for endophytic bacteria isolated from the giant reed and maize. Endophytic bacteria share the same ecological niche with the pathogen and become potential antagonists to fight against rhizoctoniasis.

Leaves, stems and roots of the giant reed and maize plants were used to isolate eleven  $\gamma$ -hemolytic strains that were selected due to their antagonistic capacity against *R. zae* with growth inhibition percentages ranging from 21 to 50%. Likewise, a characterization to learn about their possible antagonistic and growth promotion mechanisms. One of the strains produced chitinase, six strains produced glucanases and proteases, eight strains produced IAA in a range of 0.013 and 1.60  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , six strains produced siderophores and six had the ability to solubilize phosphate. To complement the analysis of the bacterium on their possible human pathogenicity, the model of *Galleria mellonella* was used to evaluate the virulence, finding that three strains were virulent. Likewise, the molecular identification of the strains was performed and they belong to the following species: *Rhizobium pakistanense*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus aryabhatai*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Acinetobacter radioresistens*, *B. velezensis*, *Pseudomonas guariconensi*, *P. plecoglossicida*, *P. aeruginosa*. Finally, the colonization of *B. aryabhatai*, *P. guariconensi* and *P. plecoglossicida* in corn roots as endophytes was evidenced by Fluorescence microscopy. Considering all the above mentioned, it was



concluded that the strains isolated from giant reed and maize have the potential to promote plant growth and to control *R. zea*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El maíz, es el grano que más se produce mundialmente. Éste es uno de los alimentos más usados para consumo humano, alimentación de ganado y como fuente de un gran número de productos industriales, convirtiéndose en uno de los productos agrícolas de mayor importancia en los mercados internacionales (FAO, 2019).

Los países con mayor producción de maíz son Estados Unidos, China, Brasil y Argentina. México se encuentra ubicado en el quinto lugar de producción con 27, 762, 481 toneladas (FAO, 2017). Cabe señalar que, el estado de Sinaloa es el principal productor nacional de este grano, en el año 2017 se produjeron 6,083,162 toneladas (SIAP, 2017).

El cultivo del maíz se ve limitado en su producción por la influencia de diversos factores bióticos y abióticos. Entre los factores bióticos que afectan la producción de maíz se encuentran las enfermedades. Las de mayor relevancia en este cultivo son las ocasionadas por los microorganismos, tal es el caso de los hongos. En este grupo se identifican especies del género *Rhizoctonia*, especies fitopatógenas que se encuentran distribuidas por todo el mundo, afectando a más de 500 especies de plantas (González *et al.*, 2006; Chavarro *et al.*, 2007) y el maíz no es la excepción.

Con la finalidad de aumentar los rendimientos de producción así como para controlar la presencia de plagas y enfermedades, los agricultores han empleado estrategias como el uso de diversos agroquímicos: fertilizantes, herbicidas y pesticidas. Sin embargo, el uso inadecuado de éstos ha traído consecuencias, tanto en la salud humana, como en el deterioro del ambiente, ocasionando problemas en las tierras de cultivo como la reducción de la biodiversidad, erosión y pérdida de permeabilidad de los suelos y aumentando la vulnerabilidad a las plagas y enfermedades (Zavaleta-Mejía, 1999).

Es por ello, que se ha intensificado la búsqueda de alternativas sustentables, tales como el desarrollo de inoculantes microbianos, para mejorar el crecimiento de las plantas

y combatir las enfermedades de las mismas. Esta estrategia se propone para reducir la dependencia de los fertilizantes y pesticidas sintéticos y contribuir a mantener la producción actual sin afectar el medio ambiente (Pereg & Mcmillan, 2015).

Existen cerca de 300,000 diferentes especies de plantas en la tierra, y se estima que cada planta hospeda a uno o más endófitos. Pocas han sido estudiadas en relación a su asociación con endófitos, por lo tanto, es posible encontrar nuevos microorganismos benéficos asociados a cada especie vegetal en diferentes ecosistemas (Ryan *et al.* 2008). Tal es el caso de las bacterias endófitas, las cuales pueden brindar protección al compartir en la planta el mismo nicho ecológico que el patógeno mediante el control o inhibición de su crecimiento.

Es importante explorar y estudiar la biodiversidad de los microorganismos endófitos para identificar aquellos que pudieran tener un efecto antagonista contra el patógeno del maíz *Rhizoctonia zae*, lo cual ayudará a determinar estrategias de biocontrol en la agricultura para el estado de Sinaloa, así como también identificar aquellos microorganismos que presenten características promotoras de crecimiento vegetal que permitirán aumentar los rendimientos de producción en el cultivo de maíz.

## 2. ANTECEDENTES

La explosión demográfica ha obligado a los países a buscar estrategias para producir alimento a gran escala y de esta manera satisfacer las necesidades a nivel mundial. Sin embargo, existe la problemática de pérdida de la producción en diferentes cultivos por problemas fitosanitarios. Este problema se agrava debido al aumento en el número de enfermedades que se presentan durante el desarrollo de los cultivos (Aliye *et al.*, 2008). Entre estas enfermedades, algunas que producen pérdidas considerables en la producción son causadas por hongos fitopatógenos (Neeraja *et al.*, 2010).

Los microorganismos endófitos han sido reportados como agentes de control para fitopatógenos en diversos cultivos. La colonización de bacterias endófitas en plantas induce diferentes modificaciones en la pared celular como la degradación de pectina, celulosa y producción de compuestos fenólicos que inducen la formación de una barrera estructural en el sitio potencial de ataque del fitopatógeno (Benhamou *et al.*, 2000). Así mismo, otro mecanismo de respuesta de las plantas colonizadas con bacterias endófitas frente a fitopatógenos es la producción de enzimas líticas las cuales degradan la pared celular de organismos patógenos fúngicos (Fishal *et al.*, 2010).

### 2.1. Interacción microorganismo-planta

Las interacciones entre las plantas y su entorno es un proceso muy dinámico. La raíz no sólo proporciona anclaje, absorción de nutrientes y absorción de agua a la planta, sino que es un órgano clave para la interacción de la planta con su ambiente (Hinsinger *et al.*, 2008).

Los microorganismos en el suelo emiten señales químicas, las cuales son percibidas por las plantas para posteriormente liberar compuestos químicos en forma de exudados a través de la raíz. Los exudados radicales contienen azúcares, mucigel, ácidos orgánicos y aminoácidos, y estos representan las principales fuentes de carbono y

nitrógeno para los microorganismos rizosféricos. Dichos compuestos tienen la capacidad de atraer a microorganismos e iniciar interacciones simbióticas, pero también pueden atraer a patógenos dentro de la rizósfera (Nelson, 2004; Chaparro *et al.*, 2012). Esto es debido a que los exudados no solamente son aprovechados como fuentes de carbono por los microorganismos, sino también, como fuente de moléculas que promueven la quimiotaxis de los microorganismos presentes en el suelo hacia la rizósfera (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003).

De esta manera, la planta funciona como un nicho, donde los microorganismos pueden tener funciones específicas, tales como: fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, promover el crecimiento vegetal y control biológico, pero también se puede presentar el desarrollo de microorganismos que son patógenos para la planta y que tienen una influencia negativa en su crecimiento y desarrollo (Goswami *et al.*, 2014; Goudjal *et al.* 2014).

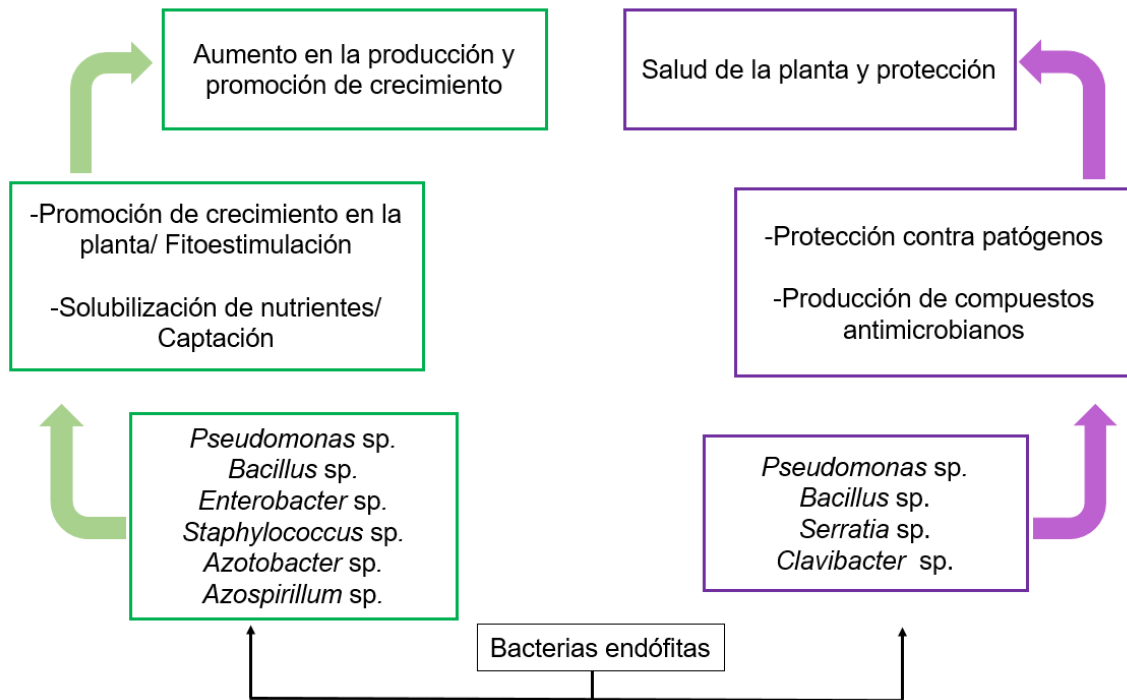
## **2.2. Bacterias endófitas**

El término endófito vegetal, se refiere a un organismo endosimbionte, a menudo una bacteria u hongo, que vive dentro de una planta durante al menos una parte de su ciclo de vida sin causar una enfermedad aparente (Arnold, 2005).

Anteriormente se desconocían las funciones de las bacterias endófitas y eran consideradas como patógenos latentes, sin embargo, se han realizado investigaciones que demuestran que estas bacterias pueden ser capaces de promover el crecimiento a través de la movilización de nutrientes, además que pueden producir reguladores del crecimiento vegetal, así mismo, pueden brindar protección a la planta contra organismos fitopatógenos mediante el control o inhibición de estos (Ahemad, 2012).

Se han realizado diversos trabajos donde se demuestra que las bacterias endófitas pueden tener dos efectos principales en las plantas (Figura 1); uno de ellos consiste en

promover el crecimiento y desarrollo, mientras que el otro permite brindar protección contra patógenos (Ryan *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Interacciones endofíticas planta-bacteria, modificado de Ryan *et al.*, (2008).

### 2.2.1. Mecanismos de las bacterias endófitas como promotoras del crecimiento vegetal

Las plantas están en contacto cercano con las bacterias endófitas y pueden brindar beneficios hacia su hospedero, debido a que poseen diferentes mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal, tales como solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos, así como el suministro de nutrientes esenciales (Qin *et al.*, 2015). Este es el caso de algunas actinobacterias endófitas que tienen la capacidad de promover el crecimiento de plantas de *Jatropha curcas*. Esta promoción puede ser de manera directa o indirecta a través de

una combinación de los mecanismos anteriores, y además de la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Qin *et al.*, 2015).

### **2.2.1. 1. Solubilización de fósforo**

El fósforo es uno de los principales nutrientes de la planta. Los suelos pueden contener grandes reservas de fósforo total (P), pero la cantidad de P que se encuentra disponible para la planta suele ser una proporción pequeña ya que la mayoría se encuentra en forma insoluble. Las plantas sólo pueden absorber este mineral en dos formas iónicas solubles, la monobásica y la dibásica (revisado en Jha & Sara, 2015). Sin embargo, algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de solubilizar el fosfato con lo que queda a disposición de la planta, lo que proporciona ventajas frente a las plantas que no están asociadas a microorganismos capaces de solubilizar este elemento (Pande *et al.*, 2017).

Los mecanismos que utilizan dichas bacterias para convertir el P a sus formas solubles son diferentes. Por ejemplo, uno de ellos se basa en la secreción de ácidos orgánicos producidos en el metabolismo de los azúcares. Los microorganismos utilizan los azúcares que toman de los exudados de las raíces de las plantas, los metabolizan y liberan ácidos orgánicos como el ácido butírico, oxálico, succínico, málico, glucónico, acético, láctico, o cítrico, entre otros. Estos actúan como quelantes de cationes principalmente de calcio (Ca), hierro (Fe), aluminio (Al) y magnesio (Mg), que acompañan a la liberación de fosfatos a partir de compuestos de fosfato insoluble (Goswami *et al.*, 2014).

Otro método de solubilización de fosfatos es mediante enzimas fosfatasas, producidas por bacterias de los géneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia*. Este mecanismo toma especial importancia cuando los suelos presentan deficiencias de fosfato. Las fosfatasas son capaces de solubilizar el P

mediante la hidrólisis de las pozas de fósforo contenidas en la materia orgánica (Mehnaz & Lazarovits, 2006).

### **2.2.1. 2. Producción de fitohormonas**

Las fitohormonas son sustancias endógenas bioactivas presentes en las plantas, que regulan diversos procesos del desarrollo vegetal, por ejemplo crecimiento, división celular o extensión de la raíz. Las principales hormonas vegetales son auxinas, giberelinas y citocininas (Glick, 2014).

La auxina más importante es el ácido indolacético (AIA), este puede ser sintetizado por algunos microorganismos como producto de su metabolismo, tal es el caso de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Castillo, 2005).

Se han realizado estudios sobre estas moléculas y se ha demostrado que su efecto en el crecimiento vegetal es en la raíz aumentando la elongación, y controlando el desarrollo de las raíces laterales, así como el número y la longitud de los pelos absorbentes, aumentando la capacidad de la planta para absorber los nutrientes (Salazar-Henao *et al.*, 2016).

Por otro lado, las giberelinas constituyen un amplio grupo de hormonas que tienen efectos notables para la planta promoviendo la germinación de las semillas, el alargamiento del tallo y la inducción de la floración, en parte debido a que son transportadas desde las raíces a las partes aéreas (Vega-Celedón *et al.*, 2016).

Por último, las citocininas promueven y mantienen la división celular de las plantas y están involucradas en varios procesos de diferenciación incluyendo la formación de los brotes o el crecimiento primario de la raíz, además también están involucradas en el mantenimiento de los grupos de células madre totipotentes en el meristemo de la raíz de las plantas (Leibfried *et al.*, 2005).



### **2.2.1. 3. Producción de sideróforos**

El hierro es otro nutriente esencial para las plantas, actúa como cofactor en una serie de procesos importantes como respiración, fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Rout & Sahoo, 2015). Por lo general es muy abundante en suelos, su especie química predominante es el ión  $Fe^{+3}$ , forma que reacciona para generar óxidos e hidróxidos insolubles y por tanto son inaccesibles para las plantas y los microorganismos (Colombo *et al*, 2014).

Frente a este problema, en las plantas existen dos tipos de estrategias para la absorción eficiente de hierro. La primera consiste en la liberación de compuestos orgánicos capaces de quelar el hierro, reduciéndolo y haciéndolo soluble con lo que puede ser absorbido por medio de un sistema enzimático presente en la membrana celular de la planta a través de transportadores de hierro (Conte & Walter, 2011). La segunda estrategia consiste en absorber el complejo formado por un determinado compuesto orgánico y el hierro en la forma  $Fe^{+3}$  para ser reducido dentro de la planta y absorbido fácilmente (Ahmed & Holmström, 2014).

Ahmed y Holmström (2014), en su revisión discuten que algunas bacterias son capaces de liberar sustancias quelantes que hacen disponible el hierro en la rizósfera para que puedan ser absorbidos por la planta. Además de mejorar la absorción del hierro y promover el crecimiento de la planta, algunas bacterias pueden inhibir el crecimiento de patógenos empleando este mecanismo, tal es el caso de *Pseudomonas* que sintetizan compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos, péptidos capaces de unir el hierro de manera reversible. Estos compuestos al ser secretados por las bacterias inhiben el crecimiento de patógenos al limitar el hierro disponible para ellos (Shen *et al.*, 2013).

### **2.2.2. Bacterias endófitas como agentes de biocontrol**

Existen reportes en la literatura que demuestran el uso potencial de las bacterias endófitas como agentes de biocontrol de patógenos que producen enfermedades de importancia económica en diversos cultivos, tal es el caso de cepas de *Streptomyces* sp.

aisladas de plantas nativas del desierto del Sahara, las cuales mostraron un efecto de biocontrol contra *Rhizoctonia solani* (Goudjal *et al.* 2014). Bacterias endófitas aisladas de maíz del género *Paenibacillus* presentaron actividad antagónica contra el hongo *Fusarium graminearum*, que causa pudrición en mazorca, e inhibieron la acumulación de micotoxinas generadas por este hongo (Mousa *et al.* 2015). Otro estudio realizado en maíz bajo invernadero, reveló el efecto antagónico de la cepa B25 de *Bacillus cereus sensu lato* contra el hongo *F. verticillioides* (Figueroa-López *et al.*, 2016), así como en pruebas en campo (Lizárraga-Sánchez *et al.*, 2015).

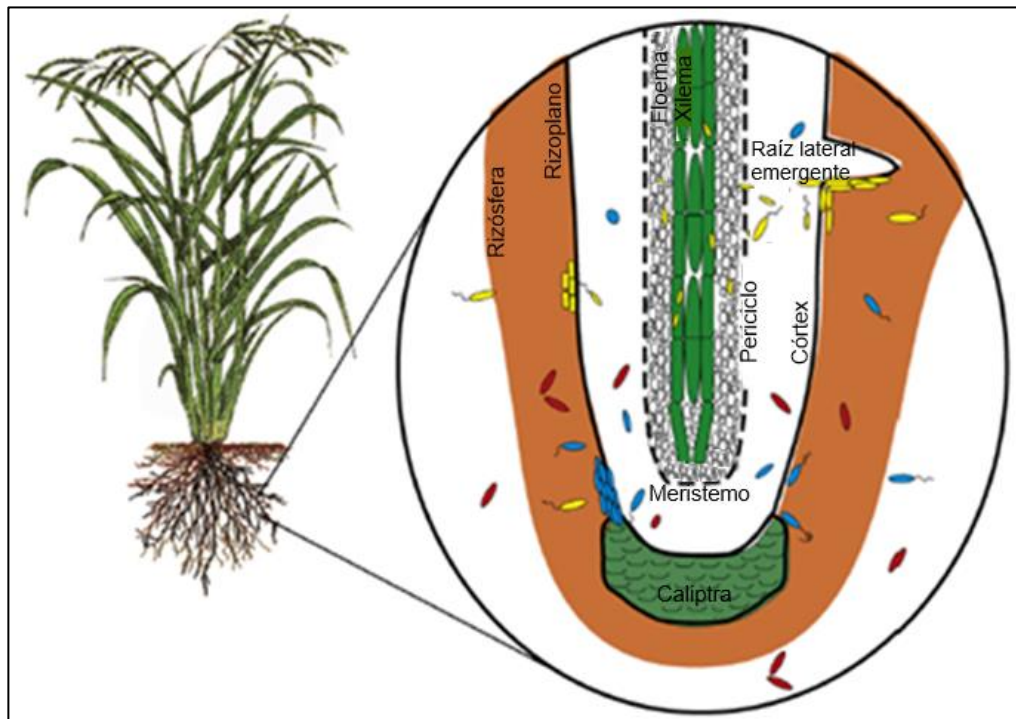
### **2.2.3. Colonización de plantas por bacterias endófitas**

El ciclo de vida de los endófitos se puede caracterizar como bifásico, alternando entre las plantas como hospederos y como organismos de vida libre en el medio ambiente, principalmente el suelo. Es probable que la mayoría de los microorganismos que pueden prosperar dentro de las plantas tengan un estilo de vida bifásico. La diversidad microbiana observada dentro de las plantas podría ser explicada por la capacidad que tienen los endófitos para entrar y persistir (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Los endófitos del suelo generalmente penetran a la planta huésped (colonización) a través de las grietas formadas en las uniones de los pelos radicales laterales. Una vez dentro de la planta huésped se extienden rápidamente a los espacios intercelulares en la raíz, pero existen otras formas de entrada a la planta, por ejemplo, heridas causadas por herbívoros, microorganismos fitopatógenos, nemátodos o por medio de aperturas naturales de la planta, tales como los estomas. Sin embargo, las grietas de la raíz que son formadas por la emergencia de las raíces laterales son reconocidas como el principal punto de entrada para la colonización bacteriana en suelo (Hardoim *et al.*, 2008).

Existen tres tipos de endófitos según su colonización en la planta como se muestra en la Figura 2: 1) se consideran endófitos pasajeros, a los microorganismos cuya colonización es a través de heridas naturales o después de la invasión de raíces por nemátodos y a menudo se restringen en el tejido del córtex de la raíz; 2) los endófitos

oportunistas muestran características particulares de colonización de la raíz, por ejemplo una respuesta de quimiotaxis, que les permite colonizar el rizoplano y luego invadir los tejidos internos de la planta a través de grietas formadas en los sitios de emergencia de las raíces laterales y puntas de raíz. Una característica que tiene en común los endófitos pasajeros y endófitos oportunistas es que están confinados a tejidos vegetales particulares, por ejemplo a las células del córtex en la raíz; y 3) los endófitos competentes, los cuales presentan propiedades de endófitos oportunistas, pero además son capaces de invadir hasta llegar al tejido vascular, a partir de este tejido se extienden por toda la planta (Hardoim *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Tipos de endófitos y su proceso de colonización en la raíz (Hardoim, 2008). Endófitos pasajeros (células rojas), endófitos oportunistas (células azules) y endófitos competentes (células amarillas).

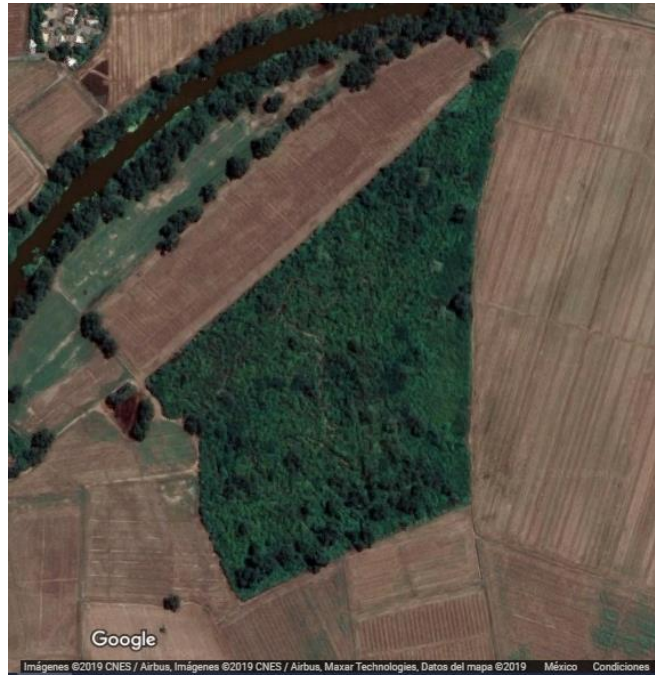
Prácticamente todas las plantas están colonizadas por una diversidad de bacterias endófitas, estas pueden ser detectadas en un momento particular dentro de los tejidos

aparentemente sanos de la planta. En su mayoría, estas bacterias pueden colonizar diferentes compartimentos de la planta en el apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes celulares y vasos del xilema. Además, algunas bacterias son capaces de colonizar los órganos reproductores de la planta, por ejemplo semillas, flores y frutos (Stone *et al.*, 2000).

Por lo antes mencionado, resulta importante explorar y estudiar la biodiversidad de bacterias endófitas en sitios que no han sido perturbados antropogénicamente, para identificar aquellos organismos que presenten propiedades que permitan su uso biotecnológico en sistemas agrícolas comerciales, tales como solubilización de P, producción de quitinasas, sideróforos o compuestos promotores del crecimiento vegetal y de esta manera contribuir a disminuir el uso de agroquímicos. Además, el uso de microorganismos endémicos aumenta las probabilidades de éxito, ya que éstos están adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la región, y su presencia en el ecosistema disminuye el riesgo de causar algún desorden en la estructura de las comunidades de la microbiota del suelo.

### **2.3. Zona de preservación ecológica del centro de población “La Uba”**

“La Uba” fue decretada en el año de 1998 como zona de preservación ecológica de centro de población. Ésta es una zona de vegetación natural, localizada en el municipio de Guasave, en la Cofradía de Tamazula de la sindicatura de Tamazula a 26 Km al suroeste de la ciudad de Guasave, Sinaloa. Esta zona comprende una superficie de 17.88 hectáreas, ubicadas a orillas de la margen izquierda del Río Sinaloa, con las coordenadas 25°29′42″ de latitud norte y 108°27′12″ de longitud Oeste (Figura 3). Los asentamientos circundantes que se encuentran son: La Uba, La Cofradía de Tamazula, La Guamuchilera y El Dorado (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).



**Figura 3.** Reserva Ecológica “La Uba”, vista satelital de Google maps (2019).

El suelo predominante es de tipo aluvión, permeable con materiales no consolidados y el manto se localiza a 3 metros de profundidad. En esta zona se presentan dos tipos de suelo, el fluvisol eutríco (J) y el feozem háplico (H), esto según la clasificación de la FAO-UNESCO adaptado por la comisión de estudios del Territorio Nacional a los suelos de México. El fluvisol eutríco se localiza a ambos márgenes del río Sinaloa, se caracteriza por estar formado por material acarreado por el agua, está constituido por materiales disgregados que no presentan estructuras de terrones, es decir son suelos muy poco desarrollados, presenta alta permeabilidad ya que en su mayor parte se constituyen de arena y capas de grava, no existiendo en el área materiales consolidados que obstruyan dicha permeabilidad, presentan alta fertilidad. Mientras que los feozem háplico, son suelos que se distribuyen en la mayor parte del municipio de Guasave, en esta área se presentan como suelos pardos de textura media, rica en materia orgánica y nutrientes (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).

En este sitio se desarrollan tres tipos de vegetación, la primera corresponde a Selva Baja Caducifolia, la cual está compuesta por árboles cuya altura está comprendida entre los 4 y 15 metros, y se caracteriza porque más del 75% de sus árboles dominantes pierden totalmente el follaje durante la época seca del año (6-8 meses), algunos elementos de este tipo de vegetación son el guayacán (*Guaiacum officinale*), la chicayota (*Solanum refractum*), el San Juan (*Jacquinia pungens*), el huizache (*Caesalpinia cacalaco*) y el guamúchil (*Pithecellobium*). El segundo tipo de vegetación en esta zona es la vegetación en galería localizada en los márgenes del río, en condiciones favorables de humedad local, las especies dominantes presentes en esta comunidad son el sauce (*Salix humboldtiana*) y el álamo (*Populus dimorpha*). El último tipo de vegetación es la vegetación secundaria, es la originada por la destrucción de la vegetación primaria, que puede encontrarse en recuperación tendiendo al estado original y en otros casos presenta un aspecto y composición florística diferente (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).

La zona de La Uba, presenta una diversidad de plantas, tal es el caso de las gramíneas como el carrizo (*Arundo donax* L.) y en sus alrededores el maíz (*Zea mays* L.) pertenecientes a la familia Poaceae. Cabe mencionar que esta área ha sido afectada a sus alrededores, la vegetación original ha sido sustituida por terrenos agrícolas, tal es el caso del cultivo de maíz que ha sido introducido a la zona (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).

En nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios previos en el centro de población "la Uba" Guasave. Se reportó la presencia de hongos micorrízicos arbusculares del *phylum Glomeromycota* y pertenecientes a los géneros *Glomus*, *Scutellospora* y *Gigaspora*, los cuales fueron identificados a nivel morfológico y molecular (Martínez-Álvarez, 2003). Así mismo, se realizó la identificación de un hongo ascomiceto de la familia *Chetomiaceae*, el cual presentó actividad *in vitro* antagonista contra dos hongos fitopatógenos de raíz: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Rhizoctonia solani* (Galindo-Flores *et al.*, 2005). En otro estudio realizado por el mismo grupo de trabajo, se analizó la biodiversidad de la microbiota rizosférica de dos especies solanáceas: *Solanum*

*lycopersicon*, L. y *Datura* sp. (tomate y toloache), el cual reporta que existen diferencias entre los grupos filogenéticos de organismos más abundantes en la rizósfera de una solanácea en zonas de cultivo, comparado a *Datura* sp. en la zona de “la Uba” (López-Rivera, 2011). Es importante mencionar que aun cuando se han estudiado diversos aspectos de la microbiota del suelo en esta zona no se ha realizado investigación concerniente a bacterias endófitas en este sitio.

#### **2.4. Importancia del carrizo (*Arundo donax* L.)**

El carrizo es una planta silvestre perteneciente a la familia Poaceae, se propaga fácilmente de manera natural, generalmente crece en pantanos, drenajes y cabeceras de cuencas. Su periodo vegetativo es perenne y la temperatura óptima para su desarrollo oscila entre 30-35 °C. Es una planta de fácil propagación debido a su sistema de rizomas o estolones (Flores-Maldonado *et al.*, 2008).

Se encuentra distribuido en diferentes partes del mundo y tiene múltiples usos, por ejemplo artesanal y ornamental, en la construcción, industria y medicina. En Rumania y Polonia se cosechan grandes cantidades para utilizarlo como materia prima en la industria papelera y química (Cunningham & Milton, 1987), en Europa y Estados Unidos se utiliza para tratamiento de aguas residuales por su elevada capacidad de retención y reciclado de nutrientes (Gerritsen *et al.*, 2014), así mismo, se ha demostrado su potencial como materia prima para producir energía por combustión directa o para biocombustibles de segunda generación (Scordia *et al.*, 2012), siendo este ultimo una de las aplicaciones de mayor importancia, ya que se ha presentado la necesidad de encontrar recursos alternativos sostenibles de energía renovable, a causa de la constante disminución de disponibilidad de las reservas de energía fósil (Ohlrogge *et al.*, 2009). Estudios recientes sugieren que esta planta es un candidato prometedor en comparación con otros cultivos de bioenergía debido a su alta producción de biomasa, la adaptabilidad de las plantas y el bajo aporte requerido para su cultivo (Kobayashi *et al.*, 2013; Corno *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Liguori *et al.*, 2016).

En México, se utiliza para el mallado en la construcción de casas de adobe, tejado en chozas, viviendas y altares, además, algunos agricultores lo utilizan para la construcción de barreras rompe-vientos en sus parcelas y al mismo tiempo disminuir la erosión del suelo, también, se utiliza como planta medicinal en el tratamiento de la diabetes, enfermedades gastrointestinales y dolor estomacal. Algunos artesanos elaboran instrumentos musicales como flautas y armónicas a partir de esta especie (Mejía-Saulés & Dávila-Aranda, 1992; Gerritsen *et al.*, 2014).

En México, esta planta se distribuye principalmente en los estados de Chihuahua, Estado de México, Guanajuato, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Mejía-Saulés & Dávila-Aranda, 1992).

## **2.5. El cultivo de maíz (*Zea mays* L.)**

El cultivo de maíz tiene su origen en México, de donde se extendió a todo el mundo. Pertenece a la familia de las gramíneas, es una planta anual de fácil desarrollo, el tallo es simple y erecto, pudiendo alcanzar los cuatro metros de altura, se reproduce por polinización cruzada. La temperatura óptima para su desarrollo oscila entre los 18 a 24 °C (Ruiz *et al.*, 2013; SAGARPA, 2017). Es uno de los principales cultivos debido a que tiene múltiples usos, es empleado como alimento tanto para consumo humano como para ganado y como materia prima de un gran número de productos industriales convirtiéndose en uno de los productos de mayor importancia en los mercados internacionales (AMIS, 2015; FAO, 2019).

En 2017, México tubo una producción de 27,762,481 toneladas, dicha producción se divide en maíz blanco y amarillo. El maíz blanco representa el 86.94% de la producción y se destina principalmente al consumo humano, esa producción satisface la totalidad del consumo nacional. El maíz amarillo se destina a la industria o a la fabricación de alimentos balanceados para la producción pecuaria, satisfaciendo sólo el 24% de los



requerimientos nacionales; se usa principalmente en la alimentación animal y elaboración de productos industriales (SAGARPA, 2017).

En el mismo año, el 51.3% del maíz blanco se destinó al consumo humano, 18.9% al consumo pecuario, 20.3% a autoconsumo, 4.8% a exportación, 0.7% a semillas y el resto a mermas (4%). En el caso de maíz amarillo el 77.2% se destinó al consumo pecuario, 16.3 a la industria almidonera, el 2.6% a autoconsumo, 2.2% al consumo humano, 0.1% a semillas y el resto a mermas (1.6%) (SIAP, 2018).

### **2.5.1. Problemáticas del cultivo**

El cultivo del maíz se ve limitado por factores bióticos como lo son la ocurrencia de enfermedades y ataques de organismos plaga, y por factores abióticos como el déficit hídrico, radiación excesiva o insuficiente, entre otros (Mueller et al., 2012).

Las enfermedades de mayor relevancia e incidencia en este cultivo son las ocasionadas por hongos. En este grupo se identifica a *Rhizoctonia* spp., el cual es un hongo patógeno que habita en el suelo y puede sobrevivir por un tiempo indefinido como organismo saprófito. Se encuentra distribuido por todo el mundo afectando a más de 500 especies de plantas, comola col, pimiento, frijol, caña de azúcar, berenjena, caucho, cítricos, coco, café, zanahoria, ajonjolí, papa, cebolla, lechuga, tomate, alfalfa, tabaco, arroz, espinaca, trigo, entre otras, afectando a las raíces, tallos, tubérculos, y órganos que se desarrollan cerca del suelo (González, et al., 2006; Chavarro et al., 2007; Postma & Schilder, 2015; Barnett et al., 2017; Martins et al., 2018) y el cultivo del maíz no ha sido la excepción.

Este grano es atacado por una enfermedad que es conocida como rhizoctoniasis o mancha bandeada del maíz, esto debido a que ataca principalmente la vaina de la hoja causando una mancha alargada atizonada, además afecta raíces y tallos causando pudrición (Cardona, et al., 1999). En Latinoamérica, se han venido agudizando los problemas causados por *R. solani* en plantaciones comerciales de maíz, provocando

importantes reducciones de los niveles de productividad (Perdomo *et al.*, 2007). Sumner & Minton (1989) evaluaron en Estados Unidos el efecto producido por la pudrición de mazorcas de maíz causada por *R. solani*, encontrando pérdidas en el rendimiento hasta de un 47% en parcelas con un elevado nivel de inóculo. González *et al.* (2010) encontraron que aislamientos de *R. solani* provenientes de arroz y maíz fueron capaces de infectar tanto al maíz como al arroz, pero mostraban una mayor agresividad hacia su huésped original.

En México, se han realizado investigaciones con *Rhizoctonia*, sin embargo, se han enfocado específicamente en el cultivo de papa debido a que éste presenta un mayor problema con este patógeno. En Sinaloa, Fernández-López (2011) identificó un cultivo de papa infectado por *Rhizoctonia* al Norte del estado. Con respecto al cultivo de maíz existe poca información a pesar de que actualmente se está presentando continua y agresivamente esta enfermedad. Rábago-Zavala (2017) identificó 14 aislados de *Rhizoctonia spp.* provenientes de plantas de maíz dulce en el norte de Sinaloa, de las cuales 11 pertenecen a la especie *R. zaeae* y tres a *R. solani*. Otro trabajo realizado fue el de Carreño-Chávez (2017), quien realizó pruebas de patogenicidad en semillas de maíz utilizando dos aislados, *R. zaeae* y *R. solani*, presentando el 100% de severidad el primero y el segundo un 37%, esto con relación a los testigos en el ensayo los cuales no presentaron daños en las raíces, además evaluó la efectividad biológica “*in vitro*” de *B. cereus* cepa B25 en el control de *Rhizoctonia spp.* la cual mostró un efecto antagonista para *R. zaeae* 35.71 % y *R. solani* 43.75%.

## **2.6. El género *Rhizoctonia***

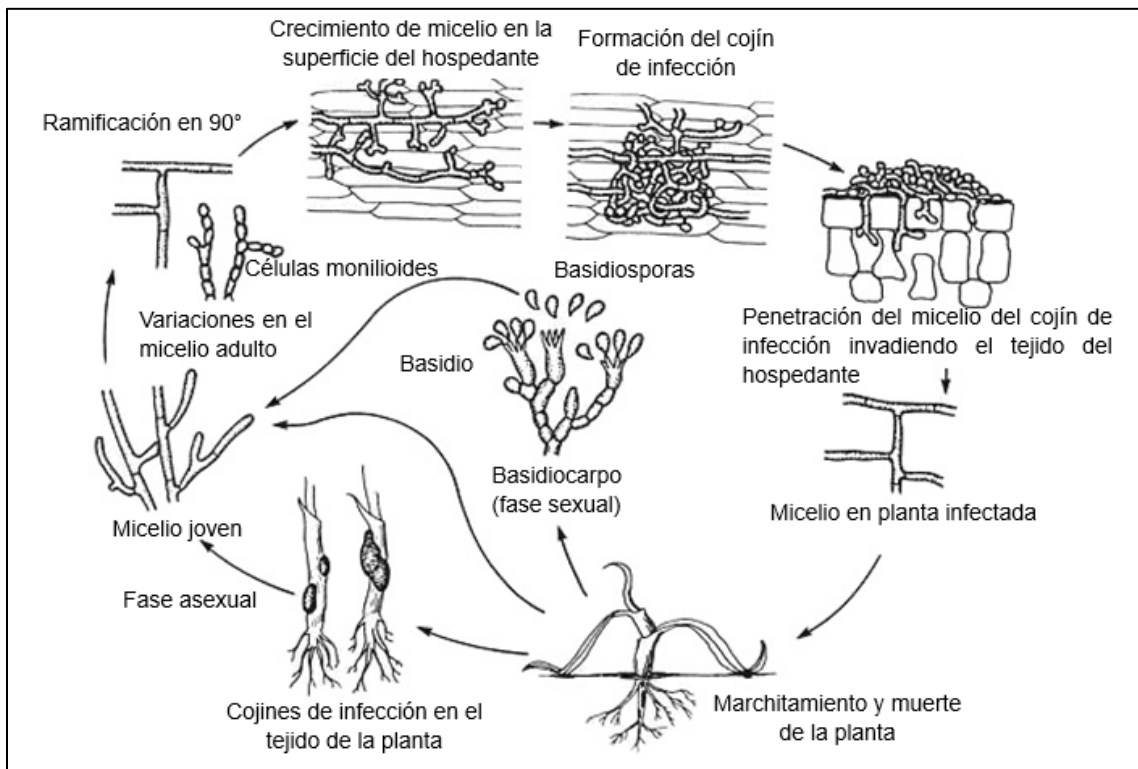
Es un grupo de hongos filamentosos que no producen esporas y comparten caracteres morfológicos generales como la formación de micelio y esclerocios de coloración parda, los esclerocios son resistentes a los ambientes extremos y le permite al hongo sobrevivir en condiciones adversas (Tredway & Burpee, 2006).

La identificación de especies de *Rhizoctonia* puede ser en función del número de núcleos, se clasifica en especies binucleadas y multinucleadas. Entre las especies binucleadas se encuentra *R. cerealis* y en las especies multinucleadas *R. solani*, *R. zea* y *R. oryzae* (Tredway & Burpee, 2006).

Los organismos pertenecientes a este complejo son saprófitos, motivo por el cual pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ausencia de plantas hospedadoras vivas (Cubeta & Vilgalys, 1997). Cuando las condiciones no son favorables para el crecimiento, estos hongos persisten como micelio o como esclerocios en la paja y el suelo (Tredway & Burpee, 2006).

### **2.6.1. Ciclo infeccioso**

En presencia de una planta huésped y condiciones ambientales favorables, las especies de *Rhizoctonia* inician la colonización de la superficie de la planta huésped con hifas largas no ramificadas. Estas hifas pueden ramificarse y penetrar a través de los estomas o dar lugar a estructuras llamadas almohadones de infección, que son agregados de hifas retorcidas. Los cojines de infección de *Rhizoctonia* se forman con mayor frecuencia a lo largo de los bordes de los haces vasculares o sobre los estomas. Los cojines de infección están involucrados en la degradación enzimática y la penetración física de la superficie de la hoja, lo que proporciona entrada al patógeno en la planta. Cuando hay suficiente humedad, las especies de *Rhizoctonia* se propagan de una planta a otra mediante el crecimiento de hifas entre las hojas de las plantas (Tredway & Burpee, 2006) (Figura 4).



**Figura 4.** Ciclo infeccioso de *Rhizoctonia* (Tredway & Burpee, 2006).

## 2.7. Bacterias endófitas con potencial biotecnológico en maíz y carrizo

Se han descrito los beneficios proporcionados por la colonización de bacterias endófitas en plantas de maíz con cepas seleccionadas en diferentes estudios, tal es el caso de lo reportado por Montañez *et al.* (2012) quienes encontraron que *Herbaspirillum frisingense* fue la única especie bacteriana que mostró un efecto positivo en dos cultivares de maíz, cuya inoculación resultó en un aumento de la biomasa del brote y peso seco de la raíz en comparación con los controles no inoculados. Por su parte, Naveed *et al.* (2013) mostraron que la inoculación de *Enterobacter* sp. aumentó significativamente la biomasa de las plantas, el número de hojas, el área foliar y el rendimiento de grano desde un 14% hasta un 42%, respectivamente, en comparación con el control no inoculado. Así mismo observaron que la inoculación mejoró la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) y redujo el tiempo necesario para la floración. Adamoski *et al.*, (2014) mostraron que *Enterobacter* sp. y *Bacillus* sp. inhiben el crecimiento de cuatro hongos fitopatógenos

(*Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolaris maydis* y *Cercospora zeae-maydis*), así mismo, aumentan el volumen de la raíz en un 44% y 39%, respectivamente, y la germinación de semillas en un 47% y 56%, lo antes mencionado se debe a que muestran la capacidad de producir AIA, sideróforos, solubizan fosfato y producen enzimas líticas.

Con respecto a la planta de carrizo, existen pocos reportes donde se utilizan bacterias endófitas con características biotecnológicas para elevar la productividad de biomasa, tal es el caso de lo reportado por Xu y Kloepper (2014), quienes aislaron y evaluaron la actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a la planta *A. donax* L. para usarlas como biofertilizantes, en sus resultados obtuvieron 120 aislamientos de los cuales el 100% presentó actividad fijadora de nitrógeno, mientras que el 95% de los aislamientos presentó capacidad de producir auxinas en un rango de 1.5 a 115  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y el 85% de los aislados produjo sideróforos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En Sinaloa, el maíz es uno de los granos más rentables, lo que ha provocado su monocultivo, esto ha propiciado la aparición y el incremento de problemas causados por enfermedades fúngicas. En los últimos años, ha aumentado la incidencia de plantas de maíz, con pudrición de tallo y raíz asociadas al hongo *R. zeae*, con efectos negativos sobre el rendimiento del cultivo.

Para hacer frente a dicha problemática, el uso de productos químicos ha sido por mucho tiempo la opción utilizada por los agricultores, sin embargo, se ha demostrado que la implementación de estos no es la mejor alternativa, por los daños que ocasionan sus residuos a la salud, y al medio ambiente ocasionando un desbalance ecológico en el suelo.

En la actualidad, el control biológico es una alternativa que se emplea para combatir enfermedades en cultivos de importancia agrícola. Sin embargo, su eficacia no es la esperada debido a que en muchos de los casos no existe un verdadero control de calidad sobre los productos existentes en el mercado. Otra problemática a la que se enfrenta el control biológico es que los microorganismos empleados son bacterias exóticas, esto pudiera hacer que la efectividad del producto no sea la deseada al no estar adaptados a las condiciones edafo-climáticas regionales. Además, al no ser nativos de la región pudieran desplazar a algún organismo nativo y causar un desbalance poblacional. De esto se deriva la importancia de emplear organismos nativos de una región determinada para el control biológico.

El municipio de Guasave, cuenta con un área natural protegida la cual corresponde a la Zona de Preservación Ecológica de Centro de Población “La Uba” (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998). Al ser esta, la única zona endémica de la región donde se encuentran plantas de diferentes familias, resulta de interés estudiar las poblaciones cultivables de bacterias endófitas de la familia de plantas Poaceae que se encuentran en este lugar, ya que éstas representan unos de los grupos vegetales con mayor interés económico en el

país, siendo el maíz uno de los cultivos de mayor importancia comercial y con el paso del tiempo éste se introdujo a este relicto de vegetación.

Estudiar las poblaciones bacterianas presentes en la planta pertenecientes a los phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* resulta importante, ya que está demostrado que se han utilizado de manera exitosa en el biocontrol y como promotoras de crecimiento en la agricultura (Mendes *et al.*, 2011), motivo por el cual se propone en el presente proyecto estudiar el posible efecto de bacterias endófitas nativas obtenidas de la planta de carrizo y maíz presentes en “La Uba” como agentes de biocontrol de la enfermedad ocasionada por el hongo *Rhizoctonia zeae* en plantas de maíz y/o promotoras de crecimiento vegetal.

#### **4. HIPÓTESIS**

Bacterias endófitas aisladas de plantas pertenecientes a la familia Poaceae de la Zona de Preservación Ecológica de Centro de Población “La Uba”, Guasave, Sinaloa, mostrarán potencial para el combate del fitopatógeno *Rhizoctonia zeae* y/o potencial como promotoras del crecimiento vegetal.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Aislar microorganismos endófitos de maíz y carrizo e identificar aquellas bacterias que pudieran tener un efecto antagonista contra *R. zeae* o algún potencial como promotoras del crecimiento vegetal.

## 5.2. Objetivos específicos

- Crear una colección de aislados de bacterias endófitas putativas de maíz y carrizo e identificar aquellas que no ocasionen daño a la salud humana.
- Seleccionar bacterias con potencial de control del hongo fitopatógeno *R. zea* mediante pruebas *in vitro*.
- Seleccionar las bacterias que presenten características de promotoras de crecimiento vegetal mediante pruebas *in vitro*.
- Identificar molecularmente los mejores aislados seleccionados de las pruebas *in vitro*.
- Demostrar que las bacterias seleccionadas son endófitas del maíz.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se muestra el esquema general de trabajo, el cual incluye el aislamiento de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax* L.) y maíz (*Zea mays* L.), así como su caracterización bioquímica, identificación molecular y localización espacial en plantas de maíz.

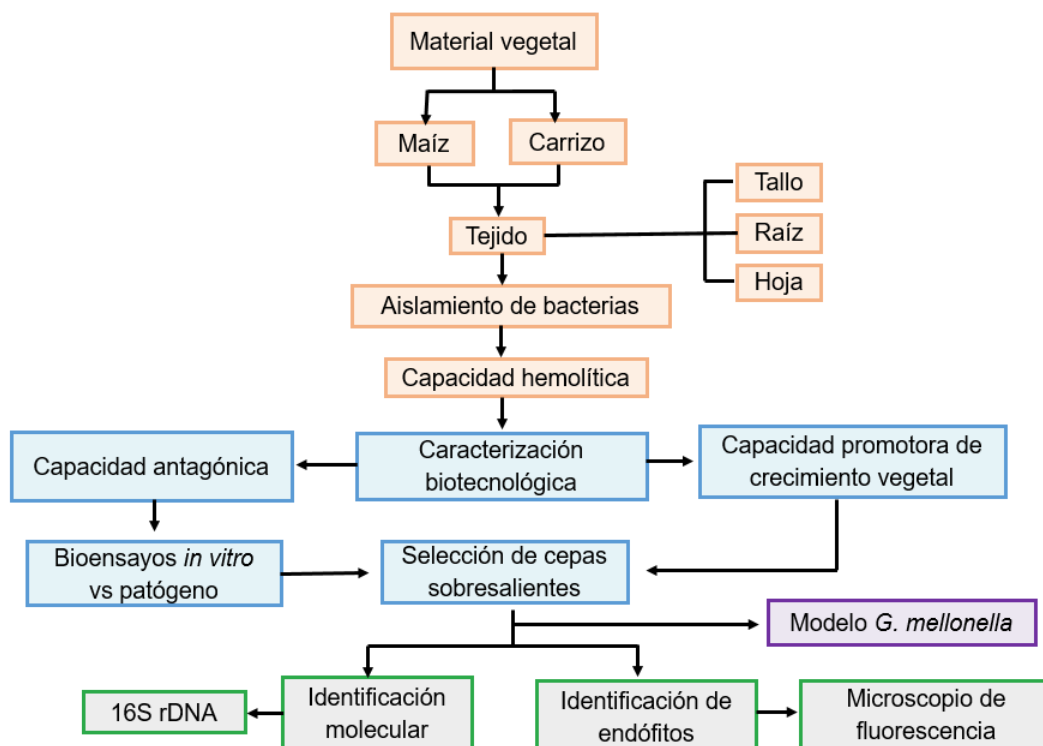


Figura 5. Esquema general del trabajo

### 6.1. Material vegetal y aislamiento de microorganismos

El muestreo se realizó tomando plantas de maíz (*Zea mays* L.) y carrizo (*Arundo donax* L.) que se encontraban en los alrededores y al interior de la Zona de Preservación Ecológica del Centro de Población “La Uba”.

Los aislados bacterianos se obtuvieron a partir de tejidos de hoja, tallo y raíz. Éstos se lavaron con agua de grifo y 2 gotas de detergente líquido comercial (Axió<sup>TM</sup>) durante

5 min. Posteriormente se realizaron cortes de 1 a 2 cm de longitud. Los tejidos vegetales se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% durante 1 min, posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1% por 10 min, finalmente se adicionó una solución de Tween-20 (Sigma, Cat. P7949) al 10% (v/v) durante 1 min, seguido por tres lavados con agua destilada estéril (Jasim *et al.*, 2014).

Una vez desinfectado el material, se realizaron cortes transversales y longitudinales en los fragmentos del tejido, posteriormente se colocaron en cajas Petri conteniendo diferentes medios de cultivo selectivos: LB (Sigma, Cat. L3022) para favorecer el crecimiento de *Bacillus* y *Enterobacter* (Nagórska *et al.*, 2007), medio King B (Sigma, Cat. 6078) para favorecer el aislamiento de *Pseudomonas* (Cavaglieri *et al.*, 2005) y agar de aislamiento de actinomicetos (AIA) (Fluka, Cat. 17117) para favorecer el crecimiento de Actinomicetos. Las colonias morfológicamente distintas que crecieron en el medio se seleccionaron hasta lograr su total purificación.

A partir de los aislados puros, se tomó una asada de estos y se depositó en un tubo de tapa de rosca el cual contenía 5 mL de medio LB (Sigma, Cat. L3022), se incubó a 30 °C, 200 rpm durante 18 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se pasó el cultivo a tubos de criopreservación (Axigen, Cat. 33156061) con glicerol (Faga Lab, cat. 2214) a una concentración final de 15%. Se mezclaron por inversión y se almacenaron por triplicado en un par de ultracongeladores a -80 °C para su criopreservación (Pasarellt & Mcginnis, 1992).

## **6.2. Prueba de viabilidad de la colección bacteriana**

Una vez generada la colección, se midió la capacidad de crecimiento de los organismos después de haber sido congelados a -80 °C. Para ello, se descongelaron los aislados de la colección bacteriana, se sembraron en placas de medio LB (Sigma, Cat. L3022), y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. El aislado se consideró no viable si no se observó crecimiento después de 24 h de incubación.

### 6.3. Prueba de hemólisis

La prueba de hemólisis se realizó para descartar los aislados con potencial efecto patogénico para el humano. Las bacterias se crecieron en tubos de 15 mL, el cual contenía 5 mL de medio LB líquido (Sigma, Cat. L3022). Se incubaron por 24 h a 30 °C y 200 rpm. Posteriormente se tomó 1 mL de cada tubo con cultivo, se colocó en un tubo de 1.6 mL y centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, el sobrenadante se colocó en otro tubo de 1.6 mL y se centrifugó a las condiciones antes mencionadas. Se tomaron 50 µL del sobrenadante, se colocó en orificios con diámetro de 6 mm realizados previamente en cajas Petri con medio agar sangre (MCD LAB, Cat. 7504). Como control negativo se agregó 50 µL de medio LB estéril en cada placa de agar sangre (Modificado de Figueroa-López *et al.*, 2016). Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h para monitorear la apariencia del agar alrededor de los orificios. Dependiendo de los halos de lisis que se manifestaron en el medio de cultivo, éstas se clasificaron como:  $\alpha$  (lisis parcial de eritrocitos),  $\beta$  (lisis total de eritrocitos) y  $\gamma$  (ausencia de hemólisis) (Forbes *et al.*, 2002).

### 6.4. Evaluación del potencial antagónico

Se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar si las bacterias endófitas presentan posibles mecanismos de actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia zeae*.

#### 6.4.1. Conservación del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia zeae*

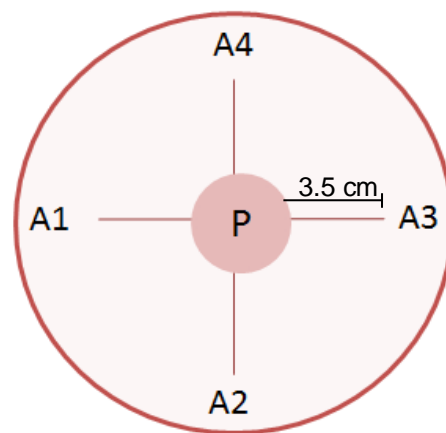
Para los ensayos *in vitro* se utilizó una cepa de *R. zeae* proporcionada por el Dr. Rubén Félix Gastélum de la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Los Mochis (2018).

La cepa se conservó utilizando aceite mineral como método de conservación (Montesino *et al.*, 2015). Dicho método consistió en utilizar tubos de vidrio de 18 mL con taparosca, se agregó 10 mL de agar dextrosa de papa (BD Bioxon, Cat. 211900) y se esterilizó a 121 °C durante 15 min, posteriormente se inclinó en un ángulo de 45°. Se

sembró el hongo por estría e incubó 25 °C durante 5 días. Se esterilizó aceite mineral (Faga-Lab, Cat. 1300) a 120 °C, por 15 min. Se permitió que trascurrieran de 24 a 48 h, y se realizó una segunda esterilización bajo las condiciones antes mencionadas, posteriormente se llevó el aceite mineral al horno a 180 °C por 60 min para eliminar la humedad retenida. En condiciones asépticas se cubrió el cultivo con el aceite, corroborando que el nivel quedara un centímetro por arriba del cultivo. Se cerró el tubo, se selló con papel Parafilm®, se etiquetó y almacenó en posición vertical a 4 °C.

#### 6.4.2. Bioensayos vs. fitopatógenos *in vitro*

En placas de PDA sólido se trazó una línea horizontal y una vertical, en el centro se depositó un disco de agar PDA (BD Bioxon, Cat. 211900) con micelio del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia zeae* de manera respectiva; y en los extremos de las líneas a 3.5 cm, se colocó 10 µL de cada uno de los aislados de la colección bacteriana crecidos en medio líquido LB (Sigma, Cat. L3022) por 24 h a 30 °C y 200 rpm, de tal manera que en cada placa se colocaron cuatro aislados diferentes (Figura 6). Esto se realizó por triplicado y posteriormente se incubó a 25 °C durante 3 días (Benhamou *et al.*, 1994).



**Figura 6.** Esquema de los bioensayos patógeno vs. microorganismo. P = patógeno; A1 = aislado 1; A2 = aislado 2; A3 = aislado 3; A4 = aislado 4.

El porcentaje de inhibición por antagonismo se evaluó midiendo la distancia radial de crecimiento de cada patógeno, con respecto a los diferentes microorganismos colocados en la caja (Ho *et al.*, 1991), utilizando la ecuación reportada por Prince *et al.*, (2011):

$$\% \text{ de inhibición del crecimiento} = \frac{r-r_1}{r} \times 100$$

Donde:

r = crecimiento del hongo medido en mm desde el centro de la colonia de manera radial hacia el borde del centro de la placa en ausencia del antagonista.

r<sub>1</sub>= el crecimiento del hongo es medido en mm desde el centro de la colonia de manera radial hacia el antagonista.

#### **6.4.3. Producción de quitinasas**

Las bacterias se crecieron en 5 mL de medio de cultivo LB (Sigma, Cat. L3022) durante 24 h, 200 rpm a 30 °C, posteriormente se transfirió 10 µL del cultivo a placas con agar-quitina coloidal, se incubó por 5 días a 30°C, como control positivo se utilizó *Bacillus cereus* sensu lato (B25). Para la preparación de la quitina coloidal se llevó a cabo la metodología reportada por Roberts y Selitrennikoff (1988) con algunas modificaciones. Se colocaron 20 gr de quitina en polvo (Sigma Aldrich, Cat. C7170) en 350 mL de ácido clorhídrico concentrado (J.T. Baker, Cat. 9535-02), se dejó a 4 °C durante la noche con agitación vigorosa. Posteriormente, se agregó 2 L de etanol absoluto a 4°C y se mantuvo en agitación durante 8 h a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 4500 g durante 30 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó la quitina con agua de grifo hasta llegar a un pH neutro (7.0). Se adicionó agua destilada, se centrifugó a 4500 g por 20 min y se verificó el pH (7.0). Se eliminó el sobrenadante, se colectó la quitina con la ayuda de una espátula, para finalizar se puso a secar a 50 °C por 24 h, se maceró con la ayuda de un mortero y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

El agar-quitina coloidal se preparó con 0.5 g de sulfato de amonio (Faga Lab, Cat. 2332), 0.1 g de fosfato dipotásico (Fermont, Cat. 35842), 1 g de cloruro de sodio (Faga Lab, Cat. 2153), 0.01 g de sulfato de magnesio (Faga Lab, Cat. 2344), 0.05 g de extracto

de levadura (BD Bioxon, Cat. 230900), 0.5 g de quitina coloidal y 1.5 g de agar (BD Bioxon, Cat. 215000), en 50 mL de agua destilada. Se esterilizó a 121 °C por 20 min y posteriormente se dispensó en cajas Petri (Figueroa-López, 2011).

La actividad de la enzima quitinasa se identificó por la formación de una zona clara alrededor de las células bacterianas después de 5 días de crecimiento a 30 °C (Figueroa-López, 2016).

#### **6.4.4. Producción de glucanasas**

La actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa se evaluó usando carboxi-metil-celulosa (CMC) (Sigma Aldrich, Cat. 419273) como sustrato. Para esta prueba se prepararon placas Petri con medio CMC 1% (p/v).

Para llevar a cabo la determinación cualitativa de la actividad glucanasa, las colonias individuales se cultivaron en 5 mL de caldo LB (Sigma, Cat. L3022) durante 48 h a 30 °C y 200 rpm. Se depositó 1 mL del cultivo en un tubo de 1.6 mL, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, posteriormente se colocó 50  $\mu$ L de sobrenadante en las perforaciones de 6 mm de diámetro en placas de agar CMC al 1%, y se incubaron durante 24 h a 50 °C (Ramírez & Cocha, 2003), como control positivo se utilizó una enzima comercial (celulasa de *Trichoderma reesei*, Cat. C8546), el ensayo se realizó por triplicado. La actividad  $\beta$ -1,4-endoglucanasa se reveló mediante la adición de 5 mL de colorante Rojo Congo al 1% (p/v) (Sigma, Cat. C6767) durante 15 min. Posteriormente se eliminó el colorante y se agregó 5 mL de cloruro de sodio 2 M (Faga Lab Cat. 2153) durante 5 min para eliminar el exceso de colorante. Después de eliminar la solución salina se determinó la actividad glucanasa por la presencia de una zona clara alrededor del pocillo (halo) la cual fue medida en centímetros (Teather & Wood, 1982).

Una vez obtenidos los resultados, los microorganismos se agruparon de acuerdo al criterio de actividad glucanasa de Ramírez y Cocha (2003) con algunas modificaciones (Tabla 1).

**Tabla 1.** Criterio de actividad glucanasa propuesto por Ramírez y Cocha (2003)

Actividad glucanasa	Rango de halo de hidrólisis (cm)
Muy buena	$\geq 1.4$
Buena	1.20 – 1.39
Regular	1.00 – 1.19
Escasa	0.80 – 0.99
Ausencia de actividad	0.60 – 0.79

#### **6.4.5. Producción de proteasas**

Las colonias individuales se crecieron en 5 mL de medio de cultivo LB (Sigma, Cat. L3022), se incubaron a 30 °C, 200 rpm durante 24 h, posteriormente se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm. Se transfirió 50  $\mu$ L del sobrenadante y se colocó en orificios con diámetro de 6 mm realizados previamente en cajas Petri con agar leche desnatada, se incubó por 24 h a 30 °C, como control positivo se utilizó *B. subtilis* (BsTA16) (Rahman *et al.*, 2019). Para la preparación de agar leche desnatada se llevó a cabo de acuerdo por lo reportado por Jones *et al.* (2007), primeramente se preparó una solución madre al 10% (p/v) de leche en polvo sin grasa (Svelty, Nestle®), se esterilizó a 115 °C por 10 min. Se preparó agar LB el cual se esterilizó a 121 °C por 15 min; exactamente el 10% (p/v) de la solución de la leche se mezcló en el agar LB hasta llevar a una concentración final de 1% (p/v) mientras aún estaba caliente. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislado bacteriano. La actividad proteasa se identificó por la formación de un halo claro alrededor del pozo.

#### **6.4.6. Producción de lipasas**

Para la determinación cualitativa de la actividad lipolítica, las bacterias fueron evaluadas en agar gliceril tributirato (tributirina). Para dicha prueba se prepararon placas Petri de agar LB conteniendo tributirina al 1% (p/v) (Stead, 1984). Las colonias individuales se crecieron en 5 mL de medio de cultivo LB (Sigma, Cat. L3022), se incubaron a 30 °C, 200 rpm durante 24 h, posteriormente se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm. Se transfirió 50  $\mu$ L del sobrenadante y se colocó en

orificios con diámetro de 6 mm realizados previamente en cajas Petri con agar gliceril tributirato, se incubó por 48 h a 30 °C. La actividad lipolítica se identificó mediante la formación de un halo claro alrededor del pozo (Salwoom *et al.*, 2019).

## **6.5. Evaluación de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal**

Se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar si los aislados presentan capacidad de promoción de crecimiento vegetal.

### **6.5.1. Producción de sideróforos**

Las colonias individuales se cultivaron en 5 mL de caldo LB (Sigma, Cat. L3022) durante 24 h a 30 °C y 200 rpm. Se colocó 10 µL del cultivo en placas de agar LB suplementado con 200 µM de 2,2-bipyridyl (Sigma, Cat. D216305) (Neela *et al.*, 2018), utilizando como control positivo (+) la cepa *Acinetobacter* sp. (B31) y caldo LB como control negativo (-), posteriormente las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h. La producción de sideróforos se determinó implementando el método de recubrimiento O-CAS (Pérez-Miranda *et al.*, 2007) con algunas modificaciones. Las colonias con zonas amarillo/naranja se consideraron como cepas productoras de sideróforos a partir de los 20 min y hasta las 24 h.

El medio O'CAS (200 mL) se preparó como se describe a continuación. Se realizaron dos soluciones, la solución de PIPES (6.048 g de PIPES (Sigma, Cat. P6757) en 180 mL de H<sub>2</sub>O, pH 5.8) y la solución de colorante azul (esta solución es una mezcla de tres soluciones diferentes: solución A: 30 mg de CAS (Pfaltz & Bauer, Cat. C21430) en 25 mL de H<sub>2</sub>O; solución B: 2.7 mg de cloruro férrico (Faga Lab, Cat. 2143) en 10 mL de ácido clorhídrico 10 mM (J. T. Baker, Cat. 9535-02); solución C: 36 mg de HDTMA (Sigma, Cat. H6269) en 40 mL de H<sub>2</sub>O. Las tres soluciones se mezclan en las siguientes proporciones: a los 25 mL de la solución A, se le añaden 4.5 mL de la solución B y 40 mL de la solución C para un volumen final de 69.5 mL), ambas soluciones se esterilizaron a 121 °C, 17.5



lb/in<sup>2</sup> por 15 min. Posteriormente, a la solución de PIPES se agregó 20 mL de la solución de colorante azul, finalmente se añadió agarosa al 1% (p/v) (Nara Biotec, Cat. NR-90125) como agente gelificante y se calentó para disolverla.

### 6.5.2. Producción de ácido indolacético (AIA)

Una colonia individual se cultivó en un matraz de 50 mL con 10 mL de caldo LB (Sigma, Cat. L3022), se incubó por 48 h a 30 °C y 200 rpm, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante el cual se hizo reaccionar con 100 µL del reactivo de Salkowsky (0.2 g de cloruro férrico (Faga Lab, Cat. 2143), 4.23 mL de ácido sulfúrico (Faga Lab, Cat. 2047) en un volumen final de 10 mL) en relación 1:1 (v/v) y se dejó incubar en oscuridad durante 30 min. La aparición de un color rojizo indica la producción de ácido indolacético (Loper & Schroth, 1986). Posteriormente, se cuantificó espectrofotométricamente a 530 nm. Se creó una curva estándar usando medio líquido LB con concentraciones de 0 a 60 µM de AIA (Sigma, Cat.12886) por triplicado (Figura 7), y se determinó la concentración de AIA equivalente de las bacterias endófitas.

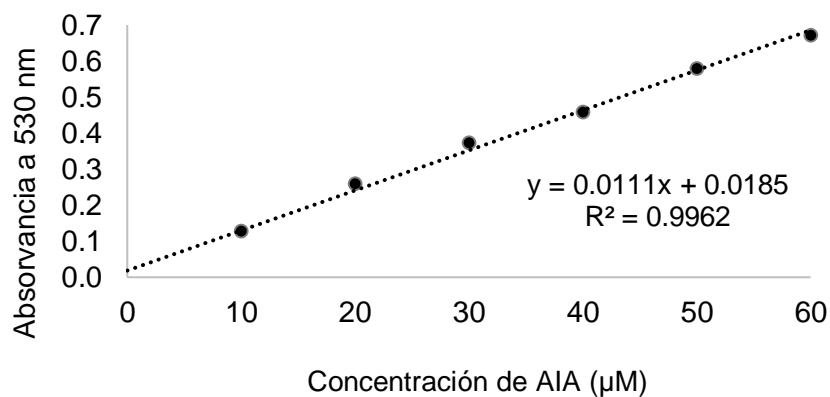


Figura 7. Curva estándar para la cuantificación de AIA.

### 6.5.3. Solubilización de fosfatos

El presente ensayo se realizó empleando el medio de cultivo agar Pikovskaya, el cual contiene 2.5 g de fosfato tricálcico insoluble (Sigma, Cat. 693898), 13 g de glucosa (Faga

Lab, Cat. 2165), 0.5 g de sulfato de amonio (Faga Lab, Cat. 7738), 0.2 g de cloruro de sodio (Faga Lab, Cat. 2153), 0.1 g de sulfato de magnesio Faga Lab, Cat. 2344), 0.2 g de cloruro de potasio (Faga Lab, Cat. 1062), 0.5 g de extracto de levadura (Sigma, Cat. 8213) y 15 g de agar (BD Bioxon, Cat. 215000). Se ajustó el pH a 7.2, posteriormente se disolvió en 1000 mL de agua destilada (Pikovskaya, 1948).

Cada aislado fue sembrado en placas de agar Pikovskaya, para lo cual, de una colonia aislada se puso a crecer cada bacteria en 5 mL de medio LB (Sigma, Cat. L3022) durante 24 h a 30 °C y 200 rpm. Se tomó 10 µL del cultivo y se colocó en la caja de Petri. Se realizó por triplicado y se incubó durante 7 días a 30 °C. La formación de un halo claro en el medio del cultivo alrededor de la colonia indica una reacción positiva para ese aislado. El índice de solubilización (IS) fue calculado empleando la fórmula reportada por Edi-Premono *et al.* (1996):

$$IS = \frac{\text{diámetro de la colonia} + \text{diámetro del halo}}{\text{diámetro de la colonia}}$$

## **6.6. Identificación molecular de microorganismos antagonistas**

### **6.6. 1. Extracción del ADN genómico**

Los aislados se crecieron en tubos con 5 mL de medio LB (Sigma, Cat. L3022) y se incubaron por 24 h a 30 °C y 200 rpm. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Cat. 69506) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN genómico se realizó utilizando el equipo NanoDrop® (Thermo Fisher, Cat. ND2000).

### **6.6. 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El ADN genómico fue empleado para amplificar la región 16S del ADN ribosomal de las bacterias endófitas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

(PCR); para ello se utilizaron oligonucleótidos universales para procariotes: F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC -3') y C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC -3'), los cuales amplifican una región de aproximadamente 1400 pb (Shi *et al.*, 1997).

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para los oligonucleótidos F2C/C en un volumen final de 50  $\mu$ l de reacción:

Reactivo	Volumen por muestra	Concentración final
ADN templado	1 $\mu$ l	10 - 100 ng
Buffer 5X	10 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 $\mu$ l	1.25 mM
F2C (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
C (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
dNTP's (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
GoTaq® DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ l	2.5 U
Agua ultrapura	34 $\mu$ l	

Las condiciones del programa de PCR para amplificar el ADNr fueron las siguientes: desnaturalización por 4 min a 95 °C, 30 seg a 95 °C; anillamiento 30 seg a 60 °C; elongación 1.5 min a 72 °C, esto repetido por 33 ciclos; y un paso final de elongación de 7 min a 72 °C.

## 6.7. Implementación de *Galleria mellonella* como modelo de estudio para microorganismos patógenos

### 6.7.1. Crianza de larvas de *G. mellonella*

Los huevos de *G. mellonella* fueron proporcionados por la Dra. Abigail Gonzáles Valdéz de la Universidad Nacional Autónoma de México, correspondiente al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad de México. A una semana de su oviposición, los huevos se colocaron en un recipiente de taparrosca (con pequeños agujeros en la tapa), se les alimentó con una dieta artificial en forma de galleta (mezclando: 90 g de harina de

maíz Maseca®, 50 g de harina de trigo Del Valle®, 50 g de leche en polvo (Nestle®), 20 g de levadura seca (Magidely®), 50 g de miel de abeja (Crista miel ®), 50 mL de agua, 50 mL de glicerol (Faga Lab, Cat. 2214), 1.2 g de benzoato de sodio (Casa Elina®) (modificado de Mukherjee *et al.*, 2010), se incubaron a 30 °C y en 7 días emergieron las larvas. En esta etapa, *G. mellonella* tiene un periodo de  $28 \pm 6$  días (Pyralidae, 2017) de crecimiento, durante los cuales se alimentó con la dieta artificial cada vez que fue necesario hasta obtener larvas de 2 a 3 cm aproximadamente para ser utilizadas en los experimentos. Cabe mencionar que 30 larvas se dejaron en incubación bajo las mismas condiciones para que se formara la pre-pupa, pupa y finalmente emergiera el adulto, y de esta manera mantener la cría. Una vez obtenidos los adultos, estos se pasaron a un frasco, donde se tapó con una malla para que la hembra colocara los huevecillos (Figura 8) y se incubaron a 30 °C durante 24 - 48 h. Los huevos fueron colocados nuevamente en dieta recién preparada para su posterior eclosión, desarrollo y maduración de las larvas y así reiniciar con su ciclo de vida (modificado de Jorjão *et al*, 2018).



**Figura 8.** Adultos de *Galeria mellonella*

### **6.7.2. Condiciones de crecimiento de cepas bacterianas y preparación de inóculos para infección**

Para cada cepa, se preparó un pre-inóculo con una colonia aislada en 5 mL de medio LB (Sigma, Cat. L3022) durante 18 h a 30 °C y 200 rpm. Posteriormente se tomaron 50

$\mu\text{L}$  del cultivo y se inocularon en tubo con 5 mL de medio LB fresco que se incubó por 6 h con las condiciones antes mencionadas.

Posteriormente se centrifugó el cultivo bacteriano a 10,000 rpm por 1 min, y se resuspendió la pastilla celular en 1 mL de solución estéril de sulfato de magnesio 10 mM (Faga Lab, Cat. 2344). A partir de esa suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$ ; las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  fueron sembradas en medio LB sólido para llevar a cabo el conteo en placa de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y así determinar la dilución requerida para inyectar un número conocido de bacterias.

### **6.7.3. Infección de *G. mellonella***

Previo a la infección, las larvas de *G.mellonella* se mantuvieron en ayuno por 24 horas.

De los inóculos deseados, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  a grupos de 8 larvas seleccionadas al azar utilizando una jeringa para insulina U-100 (DL®) de 0.3 mL, cabe aclarar que se descartaron aquellas larvas con coloración oscura y poco móviles. La inyección se realizó en el costado del último par de pro-patas como se muestra en la Figura 9. Como control negativo (no infección) se utilizó buffer de sulfato de magnesio 10 mM (Faga Lab, Cat. 2344). Después de la inyección, las larvas se incubaron a 30°C en placas de Petri, y fueron revisadas a las 16, 24 y 48 h para evaluar la progresión de la infección llevando un registro del número de larvas muertas en cada tiempo. Las larvas se consideraron muertas si no se movían, no se reorientaban a sí mismas cuando se colocaban sobre sus espaldas y no respondían a los estímulos (Megaw *et al.*, 2015). El porcentaje de supervivencia se representó en función al número de larvas sobrevivientes para cada concentración de bacteria inyectada. Al finalizar el experimento se recolectó la hemolinfa de las larvas y se plaqueó en agar LB, el cual se incubó por 30 °C por 24 h para demostrar que la larva estaba infectada por determinada bacteria.



Figura 9. Inyección de larvas de *G. mellonella*

## 6.8. Comprobación del endofitismo en las bacterias

Para demostrar la capacidad de crecimiento de los aislados bacterianos dentro de la planta de maíz, primeramente se conoció la resistencia que presentan a diferentes antibióticos, posteriormente se realizó la preparación de las células electrocompetentes, seguido de la transformación bacteriana y se finalizó con la colonización de las bacterias en los tejidos de la planta.

### 6.8. 1. Resistencia a antibióticos

Las bacterias se crecieron en placas de medio LB con diferentes antibióticos: ampicilina (Am), kanamicina (Km), gentamicina (Gm), tetraciclina (Tc), cloranfenicol (Cm), eritromicina (Em) y estreptomina (Sm), a concentraciones finales de 5, 10, 12.5, 50 y 100 mg mL<sup>-1</sup> (dependiendo el antibiótico), posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h (Choi *et al.*, 2006).

### 6.8. 2. Preparación de células electrocompetentes

Se realizó la preparación de células competentes de *Pseudomonas guariconensis* y *P. plecoglossicida* con el fin de insertar un plásmido pPROB mCherry que contiene un

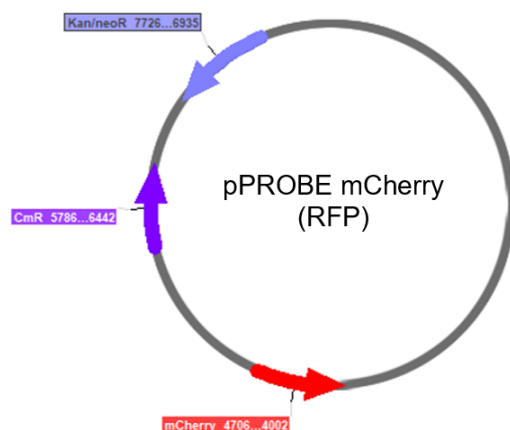
gen que codifica para una proteína rojo fluorescente (RFP), un gen de resistencia a cloranfenicol (CmR) y un gen de resistencia a kanamicina (KanR).

Se sembró por estriado en una placa con medio sólido LB una asada de los dos aislados criopreservados a -80 °C, se incubó por 24 h a 37 °C para reactivar a la bacteria. Una colonia de dicha placa se resembró por estriado en una placa de medio LB la cual se incubó por un periodo de 18 - 24 h a 37 °C. Posteriormente se realizó un pre-inóculo, para lo cual en un tubo de ensaye (15 mL) se colocaron 5 mL de medio LB y se adicionó una colonia del cultivo, se incubó durante la noche a 30 °C y 200 rpm. Una vez pasado el tiempo de incubación, se diluyó 100 veces en 30 mL de caldo LB fresco y se incubó a 30 °C y 200 rpm (Martínez-Álvarez, 2016; Harris *et al.*, 2016). De dicho cultivo se analizó el crecimiento tomando lecturas de densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) de longitud de onda esperando tener una  $DO_{600nm}$  de 0.4 – 0.6 (Sun *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2016).

Para preparar las células electrocompetentes se utilizó la metodología descrita por Morales-Ruiz *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Una vez que el cultivo alcanzó una  $OD_{600}$  de 0.4, las células se enfriaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó a 4,500 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sedimento celular se resuspendió suavemente en 3 mL de sacarosa 300 mM (1/10 del volumen original) (Iwasaki *et al.*, 1994). A continuación se dividió la suspensión celular en tres tubos de microcentrífuga de 1.6 mL (1 mL en cada tubo) y se centrifugó a 4 °C durante un minuto a 10,000 rpm. En total, se realizaron tres lavados con sacarosa 300 mM, para cada uno de ellos, el sedimento celular se resuspendió suavemente con la micropipeta y se centrifugó a 4 °C durante 1 minuto a 10,000 rpm. Finalmente, las células en cada tubo de microcentrífuga se resuspendieron en 300 µl de sacarosa 300 mM, y se mantuvieron en hielo para su posterior transformación.

### **6.8. 3. Transformación bacteriana**

Se llevó a cabo la transformación bacteriana de las células competentes por el método de electroporación utilizando el plásmido pPROB mCherry (Figura 10).



**Figura 10.** Mapa del plásmido pPROBE mCherry (RFP). Posee: el gen que codifica para la proteína roja fluorescente (RFP), un gen de resistencia a cloranfenicol (CmR) y un gen de resistencia a kanamicina (KanR).

Se mezclaron 90  $\mu$ L de células electrocompetentes y 400 ng de pPROBE mCherry (GFP). La mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 1 mm. Como control negativo, se realizaron electroporaciones sin plásmido. Cada mezcla de células con y sin plásmido, se colocaron en las celdas individuales de electroporación y se les dio un pulso eléctrico (2,500 kV/cm) empleando un electroporador Gene Pulser Xcell. Después del pulso eléctrico, las células se recuperaron en 900  $\mu$ L de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, NaCl 5 M, KCl 1 M, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 M, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1M, glucosa 1 mM) en un tubo de microcentrífuga (1.6 mL), y se incubaron a 37 °C por dos horas. Finalmente se sembraron 200  $\mu$ L de las bacterias transformadas (con o sin plásmido) en medio LB agar con antibiótico y se incubaron 16 horas a 37 °C (Harris *et al.*, 2016).

#### 6.8. 4. Colonización de bacterias en raíces de maíz

Se evaluó la colonización de bacterias transformadas con el plásmido pPROBE mCherry aisladas de maíz (*Pseudomonas guariconensis* (37); *Pseudomonas plecoglossicida* (66), y una bacteria no transformadas aislada de carrizo (*Bacillus aryabhatai* (3)). Para lo antes mencionado, primero se llevó a cabo la preparación del inóculo como lo describe Martínez-Álvarez *et al.* (2016) con algunas modificaciones para



las bacterias transformadas, las cuales se incubaron a 37 °C. De los diferentes cultivos se tomaron lecturas de densidad óptica a 595 nm de longitud de onda hasta llegar a la fase estacionaria del cultivo, de esta manera fue posible determinar la fase exponencial para detener el cultivo a utilizar como inóculo en los ensayos de colonización (Anexo 1), además de conocer la concentración de células con la cual se inoculó la semilla de maíz.

Previamente a la inoculación, semillas de maíz comercial (Híbrido Garañón, ASGROW) se desinfectaron empleando un tratamiento hidrotérmico para eliminar toda posible microbiota acompañante. Primeramente las semillas se sumergieron en una solución de Tween-20 (5 gotas de Tween-20 por 100 mL de agua destilada estéril), y fueron sonicadas durante 5 minutos. Pasado el tiempo, la solución de Tween se decantó y las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.75% y se colocaron en un termobañó a 52 °C durante 20 min. Finalmente, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar al aire en una campana de flujo laminar (Leyva-Madrigal *et al.*, 2015).

Los ensayos de colonización se realizaron utilizando la técnica de papel enrollado (Warham *et al.*, 1996) como lo describe Leyva-Madrigal *et al.*, (2015). Una vez recubiertas las semillas con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  a  $7.5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, éstas se colocaron en papel estraza (36 x 19.5 cm) previamente humedecido con agua destilada estéril. Posteriormente, los papeles con las semillas se enrollarán hasta adoptar una forma cilíndrica. El ensayo se mantuvo en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 25 °C durante 10 días.

#### **6.8.5. Confirmación de la colonización y visualización microscópica de las bacterias en raíces de maíz**

Las plantas se cosecharon 10 días posteriores a la inoculación, para la confirmación del endofitismo bacteriano, una parte de las raíces se desinfectaron superficialmente utilizando la metodología reportada por (Jasim *et al.*, 2014), se realizaron cortes

transversales y longitudinales del tejido y se colocó en placas con agar LB para *B. aryabhatai* y agar LB suplementado con antibiótico (Km 100 mg mL<sup>-1</sup>) para *P. guariconensis* y *P. plecoglossida*, finalmente se incubaron durante 24 h a 30 °C.

El resto de las raíces fueron embebidas en una solución salina amortiguadora de fosfatos 1x (PBS) (NaCl 0.137 M, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM) para realizar cortes transversales y longitudinales con la ayuda de una lámina de bisturí. Como control negativo se utilizarán plantas sin inocular. En el caso de las bacterias no transformadas (Gram +), las muestras cortadas se incubaron durante la noche a 4 °C en 1 ml de PBS 1x suplementado con WGA, conjugado Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (WGA, 1 ng / $\mu$ l; Cat. W11261, Life Technologies, Eugene, OR, EE.UU.), seguido por tres lavados con buffer PBS 1x (Figueroa-López *et al.* 2014). Para la visualización, se colocaron una preparación de tejido en un portaobjetos de microscopio y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio.

Las observaciones al microscopio se realizaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM6000. Para la observación de mCherry se utilizó el filtro TX2 (filtro de excitación BP 560/40), y para WGA-Alexa Fluor 488<sup>®</sup> se utilizó el filtro I3 (filtro de excitación BP 450-490).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Creación de la colección microbiana

Se obtuvo una colección de bacterias de diferentes tejidos vegetales (hoja, raíz y tallo), compuesta por 133 aislados en total, de los cuales, 43 aislados bacterianos fueron de plantas de carrizo (*Arundo donax* L.) y 90 bacterias de plantas de maíz (*Zea mays* L.), como se muestra en la Tabla 2. Cabe destacar, que en la raíz de ambas especies se logró aislar un mayor número de probables bacterias endófitas, representando un 57.8% del total de los aislados. Por otro lado, el tejido donde se obtuvo un menor número de bacterias aisladas fue en el tallo, representando solamente un 17.2% del total.

**Tabla 2.** Aislamiento de bacterias en plantas de carrizo y maíz

<b>Tejido</b>			
<b>Planta</b>	Hoja	Tallo	Raíz
Carrizo	10	6	27
Maíz	23	17	50
<b>Total</b>	33	23	77

La colección se creó en tubos de criopreservación, colocando un aislado por tubo. Se realizó por triplicado el banco y se colocaron en dos ultracongeladores diferentes, teniendo tres grupos de 133 bacterias para un total de 399 tubos criopreservados a -80 °C.

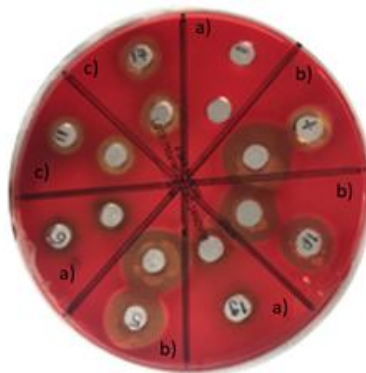
Posteriormente se realizaron pruebas de viabilidad de los aislados donde se descongelaron las 133 bacterias, éstas mostraron una eficiencia de viabilidad del 97.7%, lo que indica que solamente tres muestras (2.3%) de los aislados de la colección bacteriana fueron no viables.

A las 130 bacterias viables, se les realizó un análisis microbiológico para descartar la posibilidad que fueran posiblemente patogénicas para el humano, tomando como

criterio de selección solamente a los aislados que no presentaron actividad hemolítica ( $\gamma$ -hemolíticos). En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en dicha prueba; en relación a los aislados de carrizo, 34 de ellos mostraron actividad hemolítica parcial y total, solamente seis aislados presentaron actividad  $\gamma$ -hemolítica. En lo que corresponde a los 90 aislados de maíz, 8 mostraron actividad  $\alpha$  y 9 presentaron  $\beta$ -hemólisis, de manera que el resto de las bacterias presentaron actividad  $\gamma$ -hemolítica. En la Figura 11 se pueden apreciar los tres tipos de hemólisis.

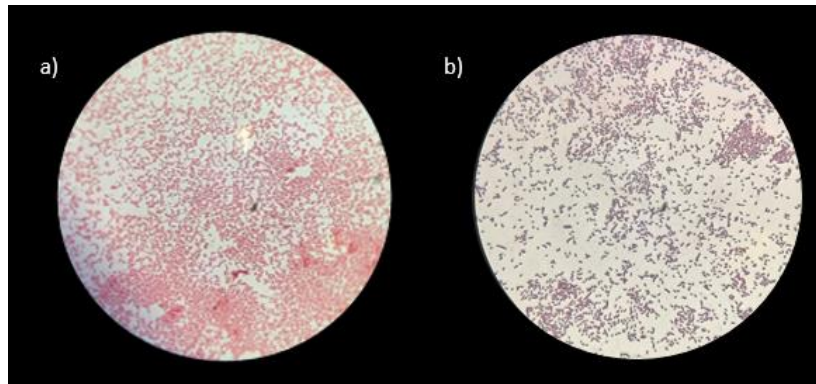
**Tabla 3.** Prueba de hemólisis

<b>Hemólisis</b>	$\alpha$ -hemólisis (hemólisis parcial)	$\beta$ -hemólisis (hemólisis total)	$\gamma$ -hemólisis
<b>Planta</b>			
Carrizo	25	9	6
Maíz	8	9	73
<b>Total</b>	33	18	79



**Figura 11.** Prueba de hemólisis. a) Bacterias con actividad  $\gamma$ -hemolítica, b) Bacterias con actividad  $\beta$ -hemolítica, c) Bacterias con actividad  $\alpha$ -hemolítica.

Los 79 aislados bacterianos restantes, se crecieron en 500  $\mu$ l de medio LB y se les realizó la tinción de Gram (Figura 12), 65 aislados fueron Gram negativos y 14 Gram positivos.



**Figura 12.** Tinción de Gram; a) Aislado Gram negativo, b) Aislado Gram positivo.

## 7.2. Determinación del potencial antagonico

Los 79 aislados con actividad  $\gamma$ -hemolítica fueron utilizados para realizar los bioensayos *in vitro* contra *Rhizoctonia zeae*, encontrando que 11 aislados mostraron capacidad antagonica hacia el fitopatogeno, de los cuales, seis correspondieron a aislados obtenidos de carrizo (Figura 13) y cinco de maíz (Figura 14).

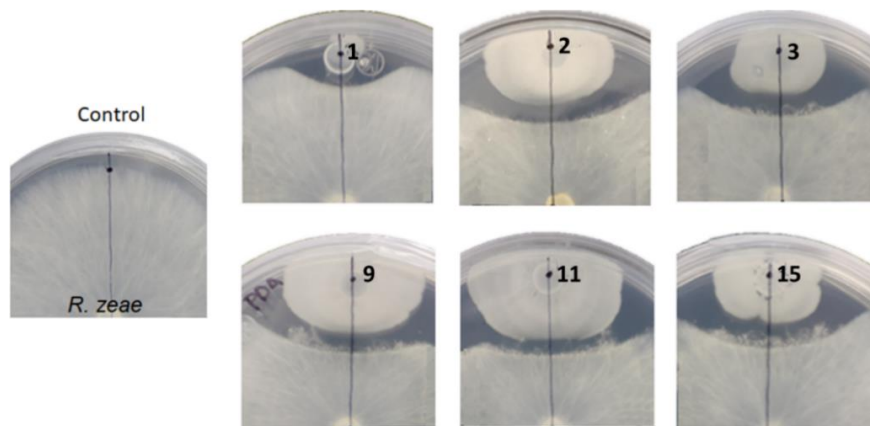
Los porcentajes de inhibición en el caso de los aislados de carrizo oscilaron desde el 21% hasta 50%, siendo el aislado 11 el que presentó el mayor porcentaje de inhibición con un 50.57%, por el contrario, el que presentó un menor porcentaje de inhibición fue el aislado 1 con un 21.14% como se muestra en la Tabla 4.

Con respecto a los aislados de maíz los porcentajes de inhibición estuvieron en el rango de 25% a 40%, siendo los aislados 66 y 67 los que presentaron el menor porcentaje con un 25.71%, por su parte el aislado 95 fue el que presentó el mayor porcentaje con un 40% de inhibición (Tabla 4).

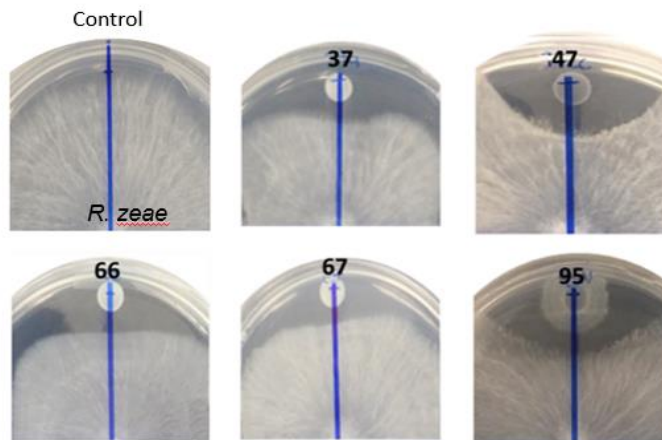
**Tabla 4.** Efecto antagonista *in vitro* de aislados bacterianos de carrizo (*Arundo donax* L.) y maíz (*Zea mays* L.) contra *R. zeae*, y su porcentaje de inhibición (% de inhibición) en medio PDA (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	Hemólisis	% de inhibición
Carrizo	Raíz-P1	1	γ	21.14±0.05 <sup>a</sup>
	Raíz-P1	2	γ	45.71±0.1 <sup>ef</sup>
	Raíz-P2	3	γ	44±0.05 <sup>de</sup>
	Raíz-P1	9	γ	45.71±0.1 <sup>ef</sup>
	Raíz-P1	11	γ	50.57±0.05 <sup>f</sup>
	Raíz-P1	15	γ	44±0.05 <sup>de</sup>
Maíz	Hoja-P4	37	γ	29.71±0.05 <sup>b</sup>
	Hoja-P5	47	γ	34.28±0.05 <sup>c</sup>
	Raíz-P1	66	γ	25.71±0.05 <sup>ab</sup>
	Raíz-P1	67	γ	25.71±0.1 <sup>ab</sup>
	Raíz-P5	95	γ	40±0.05 <sup>cd</sup>

Los valores corresponden a la media ± DE. Los valores con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).



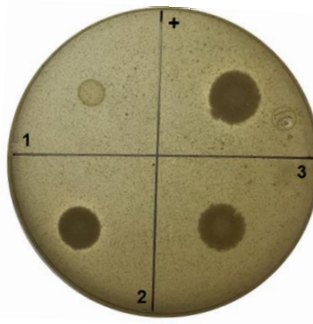
**Figura 13.** Capacidad antagónica de aislados de carrizo hacia *Rhizoctonia zeae*. Tres días después de la inoculación (ddi).



**Figura 14.** Capacidad antagonística de aislados de maíz hacia *Rhizoctonia zeae*. Tres días después de la inoculación (ddi).

### 7.2.1. Determinación de la producción de quitinasas

Se realizó la determinación de producción de quitinasas para los once aislados seleccionados en agar quitina coloidal. El único aislado que presentó la capacidad de producir quitinasas formando un halo claro alrededor de la colonia fue el 2 (Figura 15).



**Figura 15.** Bacterias endófitas con capacidad de producir quitinasas en agar quitina coloidal; + (control positivo).

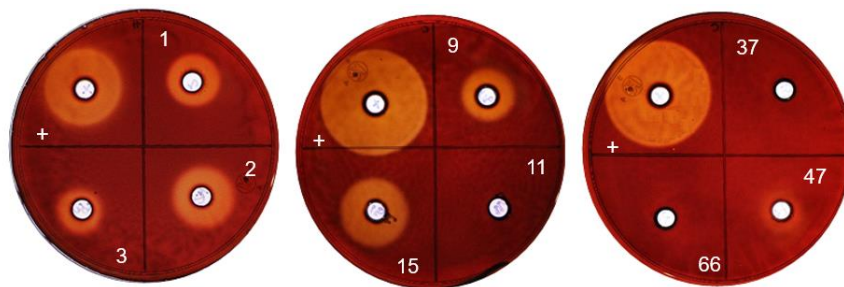
### 7.2.2. Determinación cualitativa de la actividad glucanasa

Se realizó la determinación cualitativa de la actividad  $\beta$ -1,4-endoglucanasa a los once aislados (100%) con capacidad antagonística (Tabla 5). Los resultados mostraron que seis bacterias presentaron dicha actividad, lo cual corresponde al 54.54% del total de los

aislados, del cual, el 45.45% correspondió a aislados de carrizo y el 9.09% a aislados de maíz. Los aislados tuvieron actividad clasificada como muy buena según el criterio de actividad propuesto por Ramírez y Cocha (2003), siendo los aislados 1, 2, 9 y 15 los que tuvieron muy buena capacidad de degradar la celulosa presente en el medio formando halos claros de hidrólisis alrededor del pozo de inoculación como se puede observar en la Figura 16. El microorganismo que presentó la mayor actividad fue el aislado 15 perteneciente a la planta de carrizo.

**Tabla 5.** Análisis cualitativo de la actividad  $\beta$ -1,4-endoglucanasa de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax* L.) y maíz (*Zea mays* L.). (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	Halo de hidrólisis (cm)	Actividad $\beta$ -1,4-endoglucanasa
Carrizo	Raíz-P1	1	1.46	Muy buena
	Raíz-P1	2	1.8	Muy buena
	Raíz-P2	3	1.26	Buena
	Raíz-P1	9	1.46	Muy buena
	Raíz-P1	11	0.6	Ausencia de actividad
	Raíz-P1	15	1.93	Muy buena
Maíz	Hoja-P4	37	0.6	Ausencia de actividad
	Hoja-P5	47	1.26	Buena
	Raíz-P1	66	0.6	Ausencia de actividad
	Raíz-P1	67	0.6	Ausencia de actividad
	Raíz-P5	95	0.6	Ausencia de actividad



**Figura 16.** Actividad  $\beta$ -1,4-endoglucanasa de bacterias endófitas de carrizo y maíz; + (control).



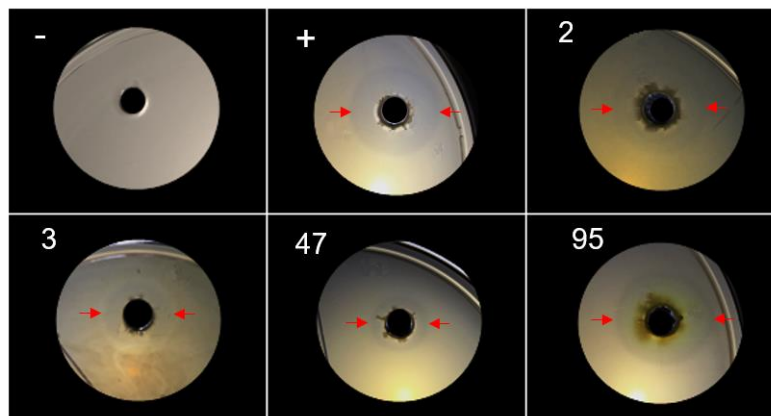
### 7.2.3. Determinación cualitativa de la actividad proteasa

La presencia de un halo claro alrededor de la colonia y/o pozo indicó la actividad proteolítica (figura 17). De las once cepas evaluadas, seis producen proteasas con halos de hidrólisis desde los 3 mm hasta 6 mm (tabla 6), siendo el aislado 3 correspondiente a carrizo y 95 a maíz quienes mostraron una mayor actividad.

**Tabla 6.** Análisis cualitativo de la actividad proteasa de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax* L.) y maíz (*Zea mays* L.). (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	Actividad proteasa
Carrizo	Raíz-P1	1	-
	Raíz-P1	2	++
	Raíz-P2	3	+++
	Raíz-P1	9	+
	Raíz-P1	11	-
	Raíz-P1	15	+
Maíz	Hoja-P4	37	-
	Hoja-P5	47	++
	Raíz-P1	66	-
	Raíz-P1	67	-
	Raíz-P5	95	+++

Los resultados se expresan en función del diámetro de los halos formados alrededor de las colonias. Símbolos: - ausencia de actividad; + < 3 mm; ++ >3<4 mm; +++ > 4 mm



**Figura 17.** Actividad proteasa de bacterias de carrizo y maíz; + (control positivo), - (control negativo).

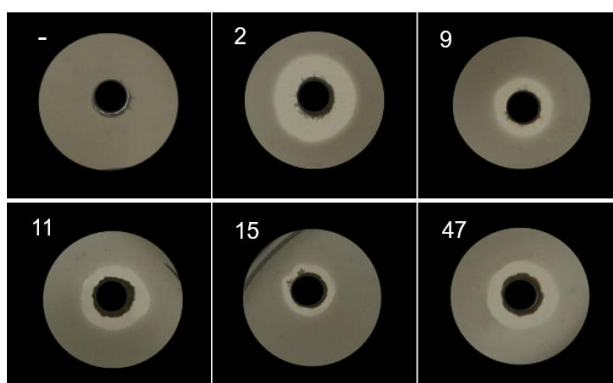
### 7.3. Determinación cualitativa de la actividad lipasa

Se realizó la determinación cualitativa de la actividad lipolítica de los once aislados seleccionados (Tabla 7), teniendo como resultado que 6 bacterias presentaron dicha capacidad formando halos de hidrólisis desde 2 mm hasta 4.5 mm (Figura 18). El aislado que presentó la mayor actividad lipolítica fue el aislado 2, perteneciente a una planta de carrizo.

**Tabla 7.** Análisis cualitativo de la actividad lipolítica de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax* L.) y maíz (*Zea mays* L.) (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	Actividad lipasa
Carrizo	Raíz-P1	1	-
	Raíz-P1	2	+++
	Raíz-P2	3	-
	Raíz-P1	9	++
	Raíz-P1	11	++
	Raíz-P1	15	+
Maíz	Hoja-P4	37	-
	Hoja-P5	47	++
	Raíz-P1	66	-
	Raíz-P1	67	-
	Raíz-P5	95	+

Los resultados se expresan en función del diámetro de los halos formados alrededor de las colonias. Símbolos: - ausencia de actividad; + < 3 mm; ++ >3<4 mm; +++ > 4 mm



**Figura 18.** Actividad lipasa de bacterias de carrizo y maíz; - (control negativo).

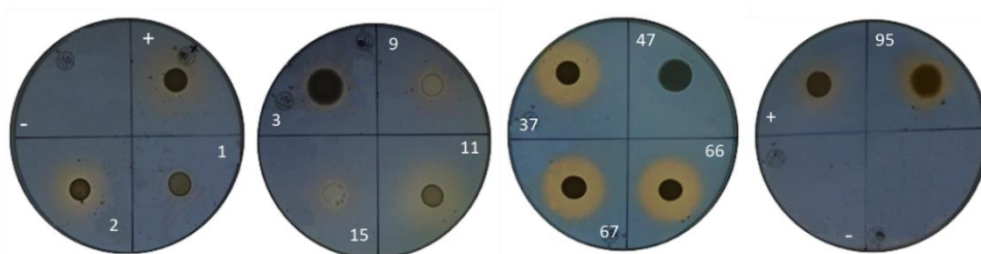
#### 7.4. Determinación de la producción de sideróforos

Se determinó la capacidad que presentan los once aislados para producir sideróforos a través de la presencia de un halo color naranja (Figura 19). Del total de las bacterias endófitas, seis mostraron la capacidad de producir sideróforos, de las cuales, dos correspondieron a aislados de carrizo y el resto a aislados de maíz. Se pudieron observar halos desde los 3 mm hasta 6 mm (Tabla 8). Seis aislamientos fueron capaces de producir el cambio de color de azul a naranja.

**Tabla 8.** Producción de sideróforos de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax L.*) y maíz (*Zea mays L.*). (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	Sideróforos
Carrizo	Raíz-P1	1	-
	Raíz-P1	2	++
	Raíz-P2	3	-
	Raíz-P1	9	-
	Raíz-P1	11	+++
	Raíz-P1	15	-
Maíz	Hoja-P4	37	+++
	Hoja-P5	47	-
	Raíz-P1	66	+++
	Raíz-P1	67	+++
	Raíz-P5	95	+

Los resultados se expresan en función del diámetro de los halos formados alrededor de las colonias. Símbolos: - ausencia de sideróforos; + < 3 mm; ++ >3<4 mm; +++ > 4 mm.



**Figura 19.** Producción de sideróforos por bacterias endófitas de carrizo y maíz; + (control positivo), - (control negativo).

### 7.5. Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA).

Se realizó la determinación de la producción de AIA a los once aislados seleccionados, dando como resultado que el 72% de las bacterias produjeran AIA en un rango de 0.075 a 9.17  $\mu\text{M}$  (Tabla 9). Todos las cepas de maíz produjeron AIA, siendo el aislado 95 el que produjo mayor concentración de AIA (9.17  $\mu\text{M}$ ).

**Tabla 9.** Producción de AIA de bacterias endófitas. (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	AIA	
			( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
Carrizo	Raíz-P1	1	-	-
	Raíz-P1	2	0.31	0.054
	Raíz-P2	3	4.30	0.754
	Raíz-P1	9	-	-
	Raíz-P1	11	0.075	0.013
	Raíz-P1	15	-	-
Maíz	Hoja-P4	37	6.20	1.08
	Hoja-P5	47	3.49	0.61
	Raíz-P1	66	5.93	1.03
	Raíz-P1	67	5.30	0.92
	Raíz-P5	95	9.17	1.60

### 7.6. Determinación de la solubilización de fosfato

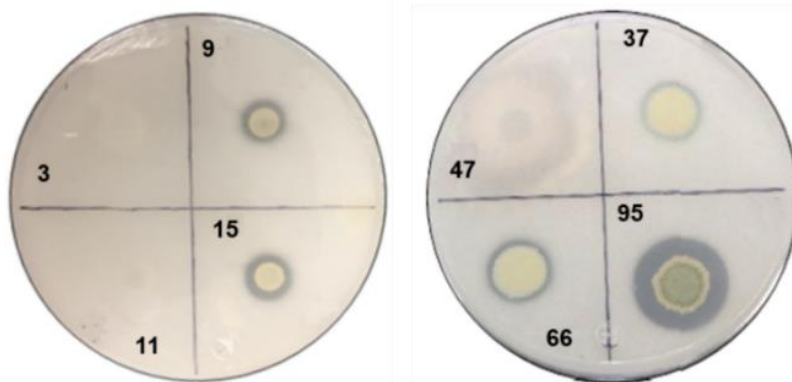
Se llevó a cabo una prueba cualitativa en agar Pikovskaya para conocer la capacidad que presentan los once aislados antagonistas para solubilizar fosfato.

Los resultados indicaron que seis de los aislados presentaron dicha capacidad formando halos claros alrededor de la colonia (Figura 20). Del total de las bacterias con capacidad de solubilizar fosfato, dos pertenecen a bacterias de carrizo y cuatro a bacterias de maíz.

En la Tabla 10 se pueden observar los índices de solubilización (IS) de las bacterias endófitas, los cuales van desde 1.08 hasta 1.83, siendo el aislado de maíz 95 el que presentó el mayor IS con 1.83, seguido del aislado de carrizo 15 con un IS de 1.47.

**Tabla 10.** Índice de solubilización de fosfato (IS) de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax* L.) y maíz (*Zea mays* L.). (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	IS
Carrizo	Raíz-P1	1	-
	Raíz-P1	2	-
	Raíz-P2	3	-
	Raíz-P1	9	1.35
	Raíz-P1	11	-
	Raíz-P1	15	1.47
Maíz	Hoja-P4	37	1.08
	Hoja-P5	47	-
	Raíz-P1	66	1.17
	Raíz-P1	67	1.08
	Raíz-P5	95	1.83



**Figura 20.** Bacterias endófitas de carrizo y maíz con capacidad de solubilizar fosfato

### 7.7. Identificación molecular de los aislados bacterianos endofíticos

Los once aislados  $\gamma$ -hemolíticos que presentaron potencial antagónico hacia el fitopatógeno *R. zea* fueron identificados molecularmente. El análisis de las secuencias obtenidas del ADN ribosomal mostró una identidad del 98 al 100% a especies de los géneros *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Tabla 11).

**Tabla 11.** Identidad de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax L.*) y maíz (*Zea mays L.*). (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	Taxa identificada en el banco de datos NCBI	Identidad (%)	Accesión
Carrizo	Raíz-P1	1	<i>Rhizobium pakistanense</i>	100	NR_145565.1
	Raíz-P1	2	<i>Staphylococcus warneri</i>	100	NR_025922.1
	Raíz-P2	3	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99	NR_118442.1
	Raíz-P1	9	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	100	NR_113405.1
	Raíz-P1	11	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	100	NR_114074.1
	Raíz-P1	15	<i>Bacillus velezensis</i>	100	NR_075005.2
Maíz	Hoja-P4	37	<i>Pseudomonas guariconensis</i>	98	NR_135703.1
	Hoja-P5	47	<i>Bacillus velezensis</i>	100	NR_075005.2
	Raíz-P1	66	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99	NR_114226.1
	Raíz-P1	67	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100	NR_114226.1
	Raíz-P5	95	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	NR_117678.1

### 7.8. Evaluación de la virulencia de las cepas de carrizo y maíz en bioensayos con *G. mellonella*

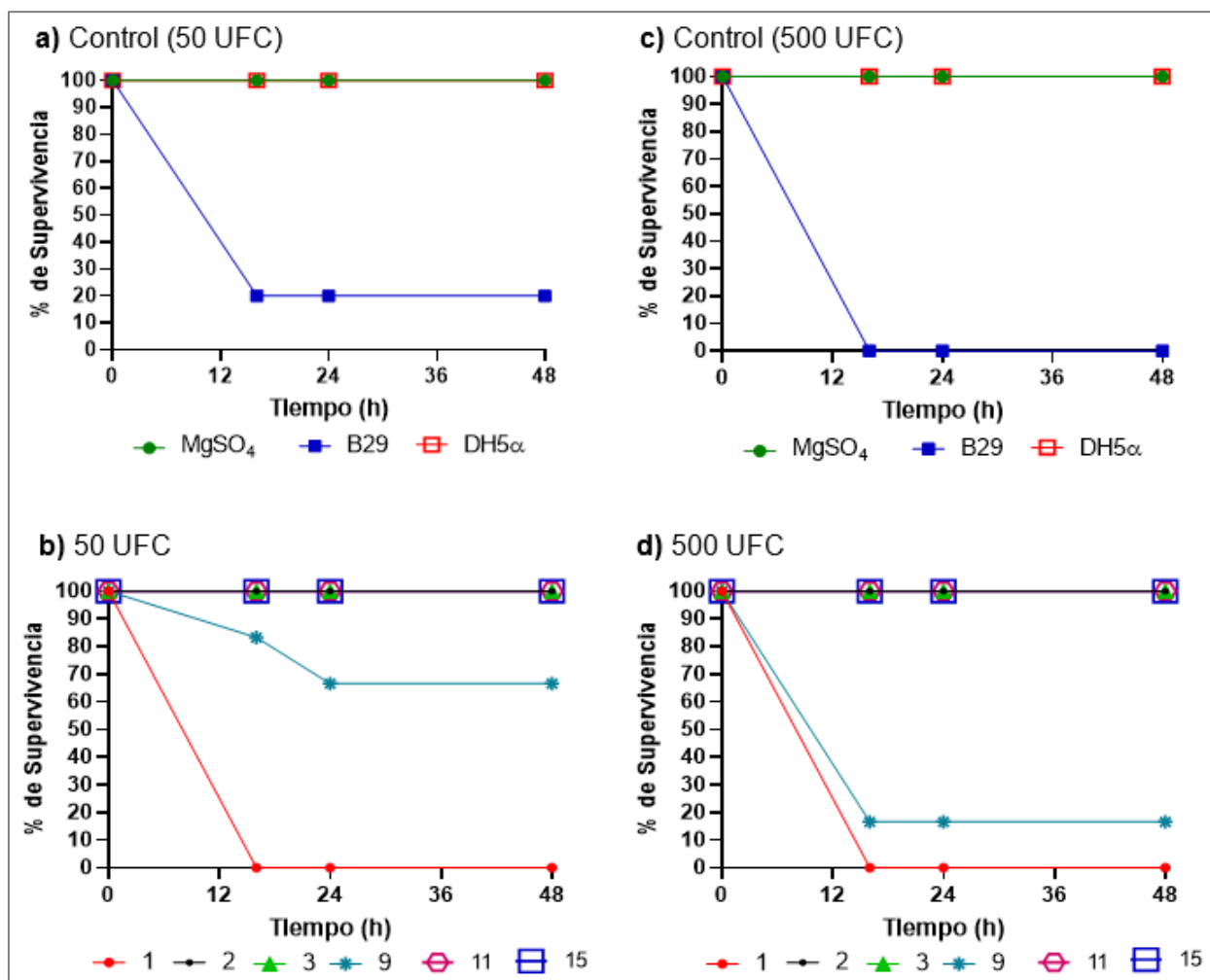
Con la dieta y las condiciones de cría empleadas, se logró obtener larvas vigorosas, de tamaño de 2 a 3 cm y color amarillo-crema uniforme, ideal para los ensayos biológicos de respuesta inmune (Figura 21).



**Figura 21.** Larvas utilizadas para los ensayos de virulencia

Hecho lo anterior, se procedió a realizar la evaluación de virulencia de las cepas  $\gamma$ -hemolíticas con potencial antagónico (Figura 22 y Figura 23) utilizando diferentes concentraciones de inóculo (50 y 500 UFC totales por larva).

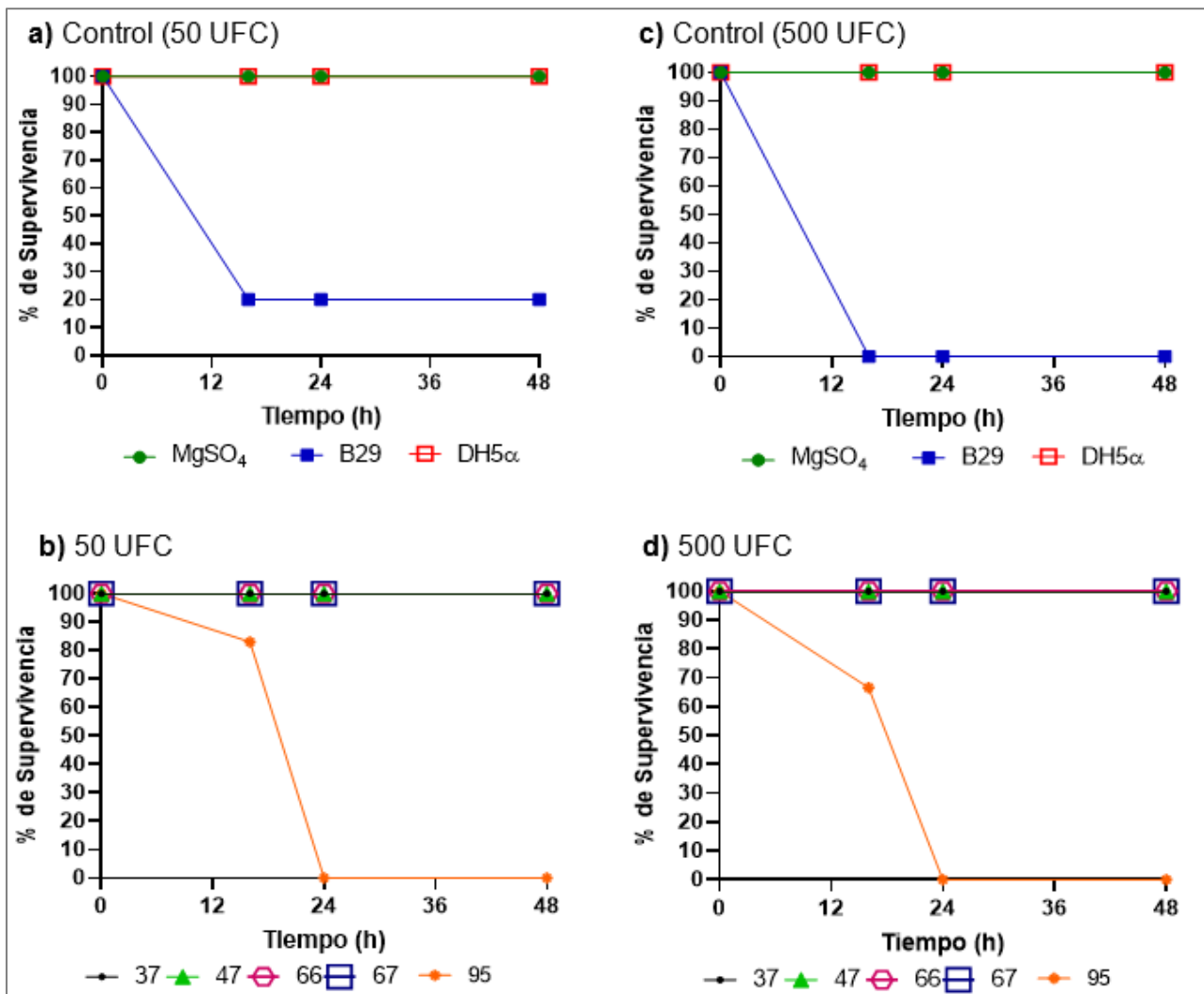
En la Figura 22 se pueden observar los resultados obtenidos en el bioensayo con *G. mellonella* evaluando los seis aislados  $\gamma$ -hemolíticos de carrizo. Las cepas 1 (*Rhizobium pakistanense*) y 9 (*Staphylococcus saccharolyticus*) fueron virulentas al ser inoculadas con 500 UFC, debido a que a las 16 h ya se tenía del 0 - 20% de supervivencia de las larvas, siendo la cepa 1 la más virulentas obteniendo un 0% de supervivencia. Cuando se realizó la inoculación a una concentración más baja (50 UFC), la mortalidad de *Staphylococcus saccharolyticus* disminuyó, con supervivencias del 70% a las 48 h. Cabe señalar que las cepas 2 (*Staphylococcus warneri*), 3 (*Bacillus aryabhata*), 11 (*Acinetobacter radioresistens*) y 15 (*Bacillus velezensis*) no mostraron virulencia en las larvas al ser inoculadas con ambas concentraciones (500 y 50 UFC), obteniendo una supervivencia del 100%.



**Figura 22.** Curvas de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con cepas  $\gamma$ -hemolíticas aisladas de carrizo. **a)** Buffer de MgSO<sub>4</sub> (control -); 50 UFC de *Bacillus thuringiensis* (B29) (control +); 50 UFC de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (control -); **b)** Larvas inoculadas con 500 UFC; **c)** Buffer de MgSO<sub>4</sub> (control -); 500 UFC de *Bacillus thuringiensis* (B29) (control +); 500 UFC de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (control -); **d)** Larvas inoculadas con 500 UFC.

Así mismo se realizó el ensayo para los aislados  $\gamma$ -hemolíticos de maíz (Figura 23) teniendo como resultado que las cepas 37 (*P. guariconensis*), 47 (*B. velezensis*), 66 (*P. plecoglossicida*) y 67 (*P. plecoglossicida*) mostraron el 100 % de supervivencia a las 48 h al ser inoculadas con 50 y 500 UFC, por su parte, la cepa 95 (*P. aeruginosa*) fue la única que presentó virulencia, obteniendo el 0% de supervivencia a las 24 h en ambas concentraciones (50 y 500 UFC).





**Figura 23.** Curvas de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con cepas  $\gamma$ -hemolíticas aisladas de maíz. **a)** Buffer de MgSO<sub>4</sub> (control -); 50 UFC de *Bacillus thuringiensis* (B29) (control +); 50 UFC de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (control -); **b)** Larvas inoculadas con 500 UFC; **c)** Buffer de MgSO<sub>4</sub> (control -); 500 UFC de *Bacillus thuringiensis* (B29) (control +); 500 UFC de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (control -); **d)** Larvas inoculadas con 500 UFC.

Por lo antes mencionado, se decidió descartar las cepas que fueron virulentas en el modelo de *G. mellonella*, lo que nos sugiere que la prueba de hemólisis no es una técnica absoluta para la selección de bacterias con un posible riesgo a la salud humana, y existen diversas pruebas que se pueden complementar para la selección de los microorganismos. Es por ello que se procedió a evaluar las cepas  $\alpha$ -hemolíticas de carrizo y maíz que presentaron potencial antagónico hacia el fitopatógeno (Tabla 12) para

tener mayores posibilidades de obtener más bacterias candidatas como potenciales antagonistas a este hongo.

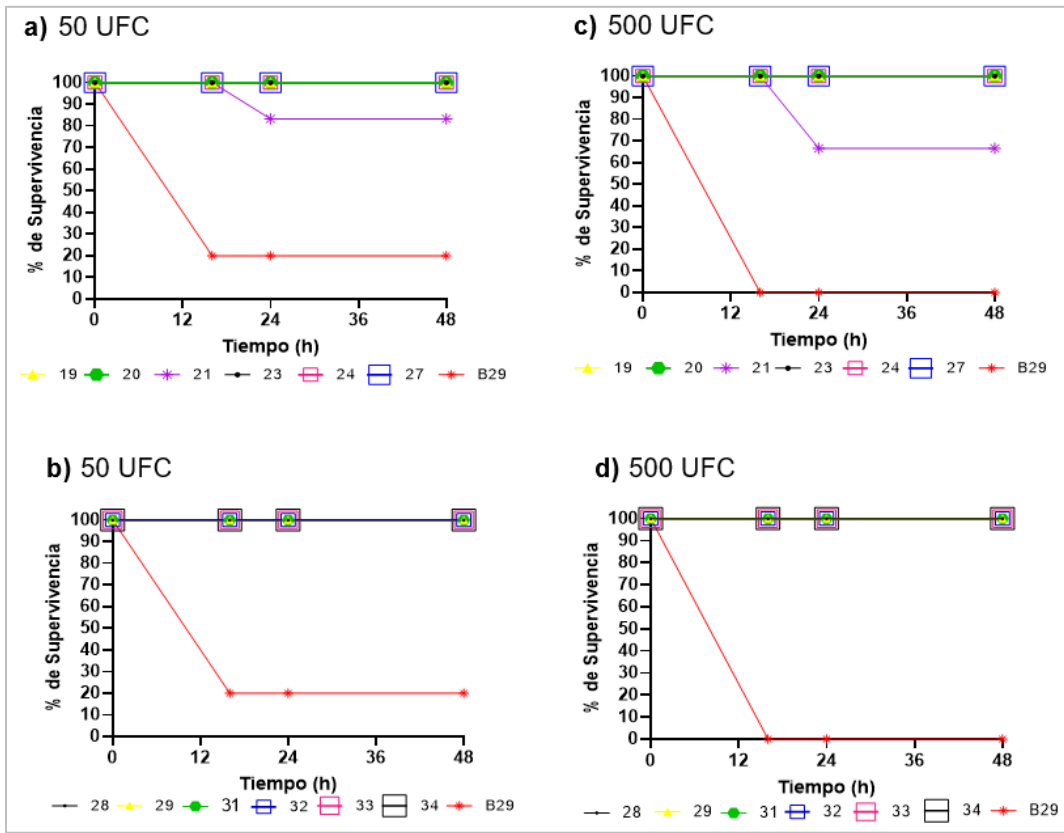
**Tabla 12.** Aislados bacterianos de carrizo (*Arundo donax L.*) y maíz (*Zea mays L.*) que mostraron efecto antagonista *in vitro* contra *R. zeae*, y su porcentaje de inhibición (% de inhibición) en medio PDA (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5).

Planta	Tejido de aislamiento	Bacteria	Hemólisis	% de inhibición
Carrizo	Hoja-P1	19	α	37.14±0.01 <sup>abcd</sup>
	Hoja-P1	20	α	37.14±0.06 <sup>abc</sup>
	Hoja-P1	21	α	40±0.01 <sup>abc</sup>
	Hoja-P3	23	α	38.28±0.06 <sup>abc</sup>
	Hoja-P5	24	α	38.28±0.06 <sup>abc</sup>
	Hoja-P3	27	α	28.57±0.01 <sup>ef</sup>
	Hoja-P4	28	α	37.14±0.01 <sup>abcd</sup>
	Tallo-P2	29	α	36.28±0.06 <sup>bcd</sup>
	Tallo-P5	31	α	37.14±0.01 <sup>abcd</sup>
	Tallo-P5	32	α	42.85±0.01 <sup>ab</sup>
	Tallo-P3	33	α	44.71±0.06 <sup>a</sup>
Tallo-P3	34	α	28.57±0.01 <sup>ef</sup>	
Maíz	Hoja-P4	36	α	34.28±0.01 <sup>cde</sup>
	Hoja-P5	46	α	31.42±0.06 <sup>def</sup>
	Tallo-P2	49	α	37.14±0.06 <sup>cde</sup>

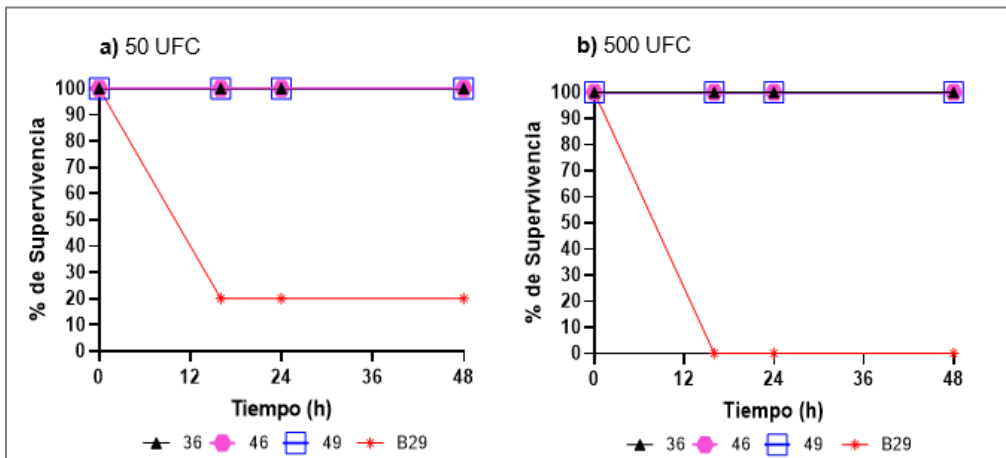
Los valores corresponden a la media ± DE. Los valores con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

En la figura 24 se puede observar que se realizó la evaluación de las 15 cepas α-hemolíticas aisladas de carrizo, teniendo como resultado que el aislado 21 fue el que presentó virulencia obteniendo el 80% de supervivencia al ser inoculado con 50 UFC, al aumentar la concentración de inóculo a 500 UFC la supervivencia de las larvas disminuyó al 65% de supervivencia. Con respecto al resto de las bacterias evaluadas, todas presentaron el 100% de supervivencia a las 48 h al ser inoculadas con ambas concentraciones (50 y 500 UFC).

Con respecto a los aislados α-hemolíticos de maíz, se puede observar en la figura 25, que todos presentaron el 100% de supervivencia a las 48 h al ser inoculados con 50 y 500 UFC.



**Figura 24.** Curvas de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con cepas  $\alpha$ -hemolíticas aisladas de carrizo. **a) y b)** Larvas inoculadas como 50 UFC, Control positivo: *Bacillus thuringiensis* (B29); **c) y d)** Larvas inoculadas con 500 UFC, Control positivo: *Bacillus thuringiensis* (B29).



**Figura 25.** Curvas de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con cepas  $\alpha$ -hemolíticas aisladas de maíz. **a)** Larvas inoculadas como 50 UFC, Control positivo: *Bacillus thuringiensis* (B29); **b)** Larvas inoculadas con 500 UFC, Control positivo: *Bacillus thuringiensis* (B29).

## 7.9. Evaluación de la resistencia a los diferentes antibióticos

Se determinó la sensibilidad de las 11 cepas  $\gamma$ -hemolíticas a los diferentes antibióticos. En la Tabla 13 se muestra el patrón de resistencia, cabe mencionar que el aislado 9 fue el único que mostró susceptibilidad a los siete antibióticos evaluados en diferentes concentraciones.

**Tabla 13.** Patrón de resistencia a antibióticos de las bacterias  $\gamma$ -hemolíticas con potencial antagonico a *R. zaeae*.

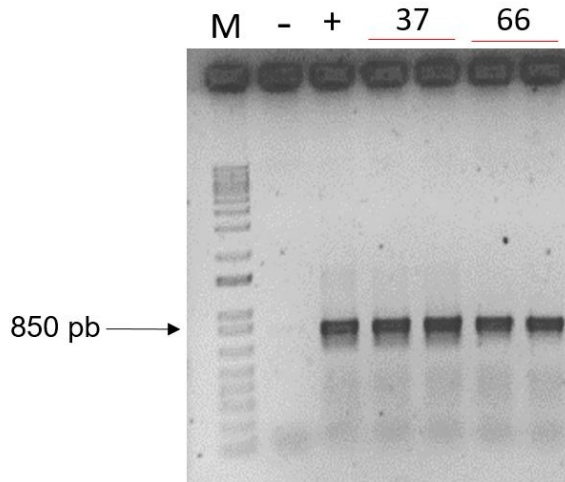
Antibiótico (mg mL <sup>-1</sup> ) Aislado	Amp		Km		Cm			Em		Tc	Sm		Gm
	100	50	100	50	5	10	50	5	50	12.5	50	10	
1	R	R	I	R	I	ND	S	I	S	R	R	R	
2	R	R	R	R	I	ND	R	I	R	R	R	R	
3	R	R	I	R	I	ND	R	I	S	R	S	S	
9	S	S	ND	S	I	ND	R	S	S	S	S	S	
11	R	R	ND	R	ND	I	R	I	R	S	S	S	
15	S	S	ND	R	I	ND	R	S	S	S	S	S	
37	R	S	I	R	ND	R	R	I	S	S	R	R	
47	S	R	R	R	I	ND	R	I	S	S	R	R	
66	R	S	I	R	ND	R	R	I	S	R	R	R	
67	R	S	ND	R	ND	R	R	I	S	R	R	R	
95	R	R	R	R	ND	R	R	I	R	R	R	R	

Abreviaturas: Amp, ampicilina; Km, kanamicina; Cm, cloranfenicol; Em, eritromicina; Tc, tetraciclina; Sm, Estreptomina; Gm, gentamicina. (R= resistente; S= susceptible; I= intermedio; ND = no determinado)

## 7.10. Transformación de bacterias endófitas de maíz

Se logró transformar las bacterias *P. guariconensis* (37) y *P. plecoglossida* (66) con el plásmido pPROBE mCherry conteniendo la proteína fluorescente mCherry. La incorporación del plásmido a las bacterias se comprobó mediante la extracción del mismo de las colonias resistentes a kanamicina. En la Figura 26 se muestra el producto de PCR

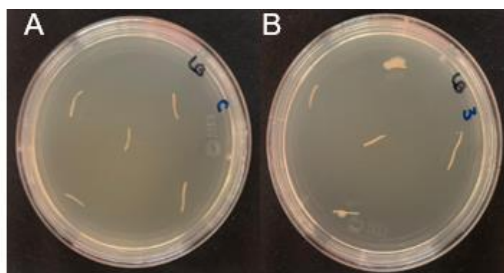
en colonia, donde se puede identificar una banda de peso molecular de aproximadamente 850 pb que corresponde a la amplificación del gen mCherry.



**Figura 26.** Confirmación de la transformación de *P. guariconensis* (37) y *P. plecoglossicida* (66) con el plásmido pPROBE mCherry en gel de agarosa; M (marcador de peso molecular), - (control negativo), + (control positivo plásmido pPROBE mCherry), 37 (*P. guariconensis*), 66 (*P. plecoglossicida*).

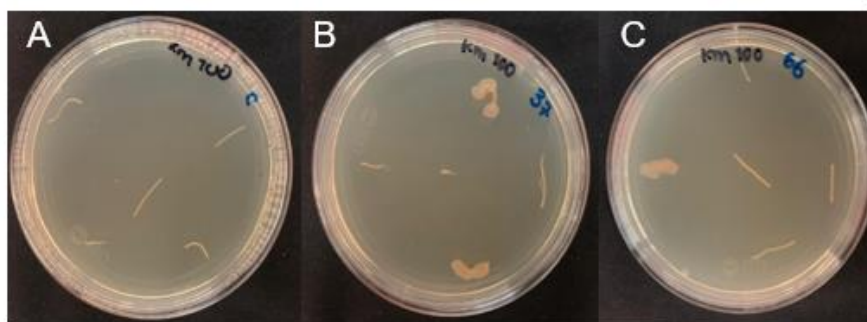
### 7.11. Confirmación de la colonización de las raíces de maíz con bacterias aisladas de carrizo y maíz

Se comprobó la colonización de *B. aryabhatai* (Figura 27), *P. guariconensis* (Figura 28) y *P. plecoglossicida* (Figura 28) en raíces de maíz desinfectadas superficialmente y colocándola en placas con agar LB. En la Figura 27 se pueden observar cortes transversales y longitudinales del tejido colonizado por *B. aryabhatai*. La figura A representa tejido sin colonizar (control). La Figura B muestra raíces colonizadas, donde se puede observar crecimiento en algunos de los tejidos, después de haber sido esterilizado superficialmente el tejido, lo cual nos sugiere que la bacteria se encuentra de manera endófito y no superficialmente. Esto se apoya por el hecho de que en la Figura B se advierten algunos trozos de tejido que no mostraron crecimiento bacteriano mostrando que el tratamiento de esterilización fue efectivo en eliminar la contaminación superficial del tejido.



**Figura 27.** Colonización de *B. aryabhatai* en raíces de maíz. A) Raíces sin colonizar (control); B) Raíces colonizadas.

Con respecto a la colonización de las bacterias *P. guariconensis* y *P. plecoglossicida*, fue posible observar crecimiento bacteriano en raíces inoculadas (Figura 28). La figura A representa tejido sin colonizar (control). Las figuras B y C muestran tejido colonizado por *P. guariconensis* y *P. plecoglossicida*, respectivamente.

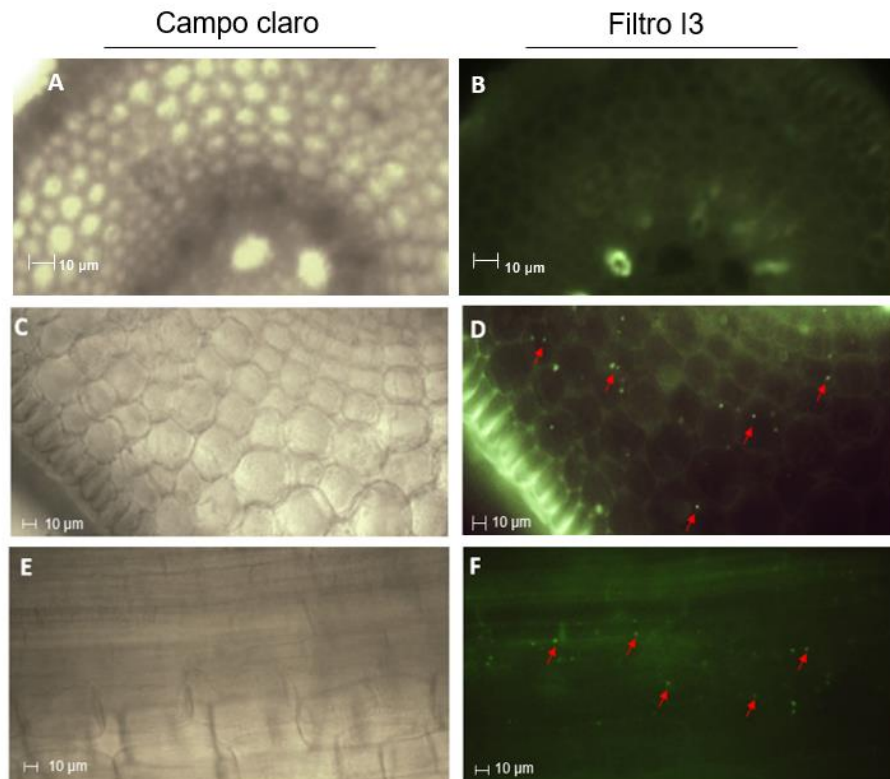


**Figura 28.** Colonización de *P. guariconensis* y *P. plecoglossicida* en raíces de maíz. A) Raíces sin colonizar (control); B) Raíces colonizadas por *P. guariconensis*; C) Raíces colonizadas por *P. plecoglossicida*

### 7.12. Visualización al microscopio de raíces de maíz colonizadas por *B. aryabhatai*

Se observaron cortes transversales y longitudinales de raíces teñidas con WGA-Alexa Fluor 488® en un microscopio de fluorescencia, en los cuales se pudo detectar la presencia de bacterias en células corticales de tejido colonizado por *B. aryabhatai* (Figura 29). Las Figuras 29A y 29B representan tejido de maíz sin colonizar en los diferentes canales espectrales (control). Por su parte, las Figuras 29C y 29E indican la visualización de tejido de raíz de maíz colonizadas con *B. aryabhatai* en campo claro. Las figuras 29D y 29F

indican la localización de bacterias en campo espectral verde teñidas con WGA-Alexa Fluor 488®, en ellas se puede observar la presencia de *B. aryabhatai* en el tejido del cortex interno de la raíz de maíz. Estos resultados demuestran que la cepa *B. aryabhatai* aislada de la raíz de la planta de carrizo, presenta la capacidad de colonizar endofíticamente la raíz de maíz.

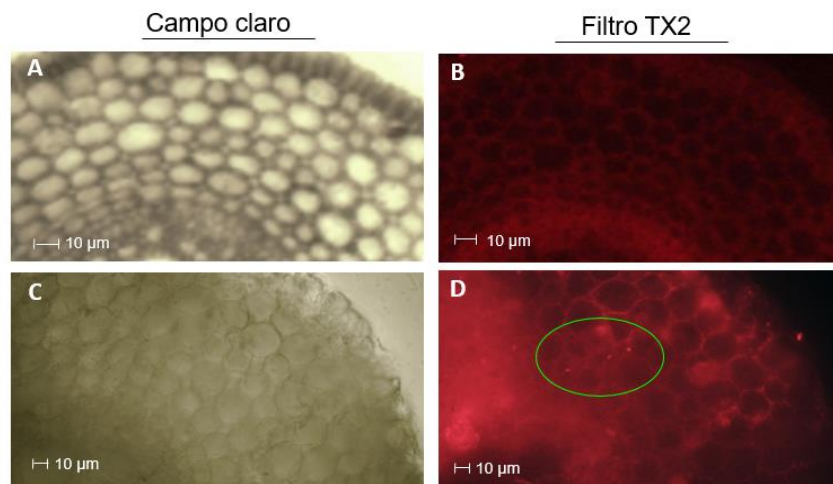


**Figura 29.** Raíces de maíz colonizadas por *B. aryabhatai* y teñidas con WGA-Alexa Fluor 488®. (A y B) Micrografía de raíces sin inocular visualizadas en campo claro y campo fluorescente verde. (C y D) Micrografías de corte transversal. (E y F) Micrografías de corte longitudinal. Las flechas indican bacterias detectadas.

### 7.13. Visualización al microscopio de raíces de maíz colonizadas por *P. guariconensis* y *P. plecoglossida* expresando la proteína fluorescente roja mCherry.

Bacterias expresando el gen mCherry fueron empleadas para colonizar raíces de maíz utilizando la técnica del papel enrollado. En la Figura 30 se muestran imágenes en campo

claro y campo fluorescente de la colonización de *P. guariconensis*, la cual fue aislada de hoja de maíz. Las Figuras 30A y 30B representan tejido de maíz sin colonizar en los diferentes canales espectrales (control). Por su parte, las Figuras 30C y 30D indican la visualización de tejido de raíz de maíz colonizado con *P. guariconensis* en ambos campos espectrales, donde fue posible observar la presencia de bacterias en células corticales de la raíz, dicho resultado es relevante, debido a que ésta es una buena evidencia de que la bacteria es endófito de raíz, a pesar de que se aisló del tejido vascular de hoja.

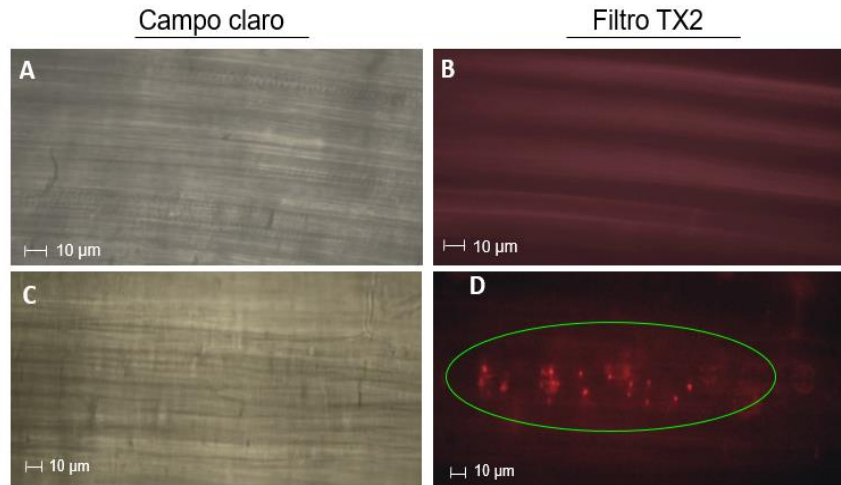


**Figura 30.** Raíces de maíz colonizadas por *P. guariconensis* transformadas con el plásmido pPROBE mCherry mediante microscopía de fluorescencia. (A y B) Micrografías de raíces sin inocular visualizadas en campo claro y campo fluorescente rojo. (C y D) Micrografías de corte transversal. El círculo indica bacterias detectadas en células corticales.

En la Figura 31 se muestran imágenes de la colonización de *P. plecoglossicida* en campo claro y campo fluorescente. Las Figuras 31A y 31B representan tejido de maíz sin colonizar en los diferentes canales espectrales (control). Las Figuras 31C y 31D indica la visualización de un corte longitudinal de tejido de raíz de maíz colonizada con *P. plecoglossicida*, donde se puede observar en el campo fluorescente la presencia de la bacteria en el plano del interior de las células de tejido vascular. La microscopía de fluorescencia permitió revelar la presencia de dicho organismo dentro del tejido vascular de la raíz.



Los resultados antes mostrados, sugieren que la inoculación de *B. aryabhatai*, *P. guariconensis* y *P. plecoglossicida* en la semilla fue eficiente, permitiendo la colonización endofítica del tejido radicular.



**Figura 31.** Raíces de maíz colonizadas por *P. plecoglossicida* transformadas con el plásmido pPROBE mCherry mediante microscopía de fluorescencia roja. (A y B) Micrografía de raíces sin inocular visualizadas en campo claro y campo fluorescente. (C y D) Micrografías de corte longitudinal. El círculo indica bacterias detectadas en células de tejido vascular.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se aislaron bacterias endófitas a partir de diferentes tejidos (hoja, tallo y raíz) de plantas de carrizo (*Arundo donax* L.) y maíz (*Zea mays* L.) para conocer su potencial biotecnológico como agentes de biocontrol y/o de promoción de crecimiento vegetal mediante pruebas bioquímicas.

El aislamiento de bacterias endófitas se llevó a cabo de manera exitosa (Tabla 2). En cuanto al origen de los aislados a partir de los tejidos de raíz, tallo y hoja, se logró aislar un mayor número de microorganismos de la raíz de ambas especies (carrizo y maíz) comparado con tallo y hoja. Estos resultados coinciden con lo reportado por Marag y Suman (2018), quienes realizaron un aislamiento de bacterias endófitas a partir de diferentes tejidos (tallo, hoja y raíz) de maíz y la mayor carga microbiana se encontró en la raíz. Esto se debe principalmente a que las bacterias de la rizósfera pueden colonizar a la planta a través de las grietas formadas en la fase de desarrollo de la raíz y a través de las heridas generadas por patógenos y/o nemátodos; o bien están fuertemente adheridas o formando biopelículas y sobreviven al proceso de desinfección de la raíz.

Para la selección de los aislados con potencial biotecnológico se realizó la prueba de hemólisis con el objetivo de descartar aquellas cepas que pudiesen presentar posible patogenicidad para el humano, motivo por el cual, se seleccionó aquellos microorganismos que mostraron actividad  $\gamma$ -hemolítica (79 bacterias), descartando los que presentaron actividad  $\alpha$  y  $\beta$ -hemolítica (Tabla 3). Es importante realizar este tipo de pruebas, ya que nuestros resultados sugieren que los microorganismos seleccionados en este proyecto pueden ser utilizados para controlar la rhizoctoniasis en el cultivo de maíz sin causar un riesgo para la salud humana.

**Tabla 14.** Características de biocontrol y promoción de crecimiento vegetal de bacterias endófitas de carrizo (*Arundo donax L.*) y maíz (*Zea mays L.*). (P1= planta 1; P2= planta 2; P4= planta 4; P5= planta 5); IS (índice de solubilización de fósforo), AIA (ácido indolacético).

Planta	Tejido de origen	Cepa	% inhibición de <i>R. zeae</i>	Quitinasas	Glucanasas	Proteasas	Lipasas	AIA (µg/mL)	Sideróforos	IS de P	Patogenicidad a humanos
Carrizo	Raíz-P1	1) <i>Rhizobium pakistanense</i>	21.14±0.05 <sup>a</sup>	-	++++	-	-	-	-	-	+
	Raíz-P1	2) <i>Staphylococcus warneri</i>	45.71±0.1 <sup>ef</sup>	+	+++	++	+++	0.054	++	-	-
	Raíz-P2	3) <i>Bacillus aryabhatai</i>	44±0.05 <sup>de</sup>	-	+++	+++	-	0.754	-	-	-
	Raíz-P1	9) <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	45.71±0.1 <sup>ef</sup>	-	++++	+	++	-	-	1.35	+
	Raíz-P1	11) <i>Acinetobacter radioresistens</i>	50.57±0.05 <sup>f</sup>	-	-	-	++	0.013	+++	-	-
	Raíz-P1	15) <i>Bacillus velezensis</i>	44±0.05 <sup>de</sup>	-	++++	+	+	-	-	1.47	-
Maíz	Hoja-P4	37) <i>Pseudomonas guariconensis</i>	29.71±0.05 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1.08	+++	1.08	-
	Hoja-P5	47) <i>Bacillus velezensis</i>	34.28±0.05 <sup>c</sup>	-	+++	++	++	0.61	-	-	-
	Raíz-P1	66) <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	25.71±0.05 <sup>ab</sup>	-	-	-	-	1.03	+++	1.17	-
	Raíz-P1	67) <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	25.71±0.1 <sup>ab</sup>	-	-	-	-	0.92	+++	1.08	-
	Raíz-P5	95) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40±0.05 <sup>cd</sup>	-	-	+++	+	1.60	+	1.83	+

Los valores corresponden a la media ± DE. Valores con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05). Los resultados se expresan en función del diámetro de los halos formados alrededor de las colonias. Símbolos: + < 3 mm; ++ >3<4 mm; +++ > 4 mm.

Con el fin de conocer la capacidad antagónica de los aislados, se realizó una confrontación *in vitro* contra el fitopatógeno *Rhizoctonia zeae*, la cual permitió evaluar de manera rápida a las 79 bacterias endófitas seleccionadas (Tabla 3), dando como resultado que seis bacterias de carrizo y cinco de maíz presentaron dicha capacidad (Tabla 11), obteniendo porcentajes de inhibición en el intervalo de 21.12 a 50.57%. Existen reportes similares en la literatura donde bacterias endófitas de plantas pertenecientes a la familia Poaceae pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de ciertos fitopatógenos, tal es el caso de lo reportado por Comby *et al.* (2017) quienes aislaron bacterias endófitas de trigo y observaron que presentaban un amplio rango de eficiencia para inhibir el crecimiento de dos hongos fitopatógenos: *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* (0 – 51% y 0 – 53%), obteniendo porcentajes de inhibición similares a los presentados en este trabajo. Mousa *et al.* (2015) aislaron bacterias de diversos genotipos de maíz, encontrando cepas con capacidad antagónica a *F. graminearum* y otros 19 hongos fitopatógenos. Marag y Suman (2018) identificaron bacterias endófitas capaces de inhibir a dos fitopatógenos de maíz, *R. solani* y *Exserohilum turcicum*. Así mismo, Figueroa-López *et al.* (2016) evaluaron el efecto antagónico de la cepa B25 de *Bacillus cereus sensu lato* contra el hongo *F. verticillioides*, encontrando porcentajes de inhibición del 52% en pruebas con medio sólido (PDA).

En relación con lo mencionado, la capacidad de control biológico mostrada por los aislados endofíticos podría deberse a diferentes mecanismos, como la competencia por nutrientes, producción de metabolitos, antibióticos y enzimas hidrolíticas. Este último es uno de los mecanismos más estudiados en bacterias con actividad antifúngica debido a que estas emplean un arsenal de actividades enzimáticas tales como las quitinasas, proteasas, lipasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas, las cuales están involucradas en la degradación de la pared celular y de los componentes de membrana durante el antagonismo (Nefzi *et al.*, 2016).

Para comprender el mecanismo de acción involucrado en el control biológico de las once cepas antagónicas, se evaluó la capacidad de producción de algunas enzimas

hidrolíticas (Tabla 14), resultando en lo siguiente: un aislado mostró la capacidad de producir quitinasas (Figura 14), seis bacterias mostraron actividad endoglucansa, seis presentaron actividad proteasa y seis exhibieron actividad lipasa. Estos resultados coinciden con lo reportado por Figueroa-López *et al.* (2016), quienes mostraron que la bacteria endófito de *Bacillus cereus sensu lato* (B25) presentó actividad quitinasa y proteasa. Así mismo, Yan *et al.* (2013) aislaron una cepa del tallo del álamo (*Bacillus pumilus* JK-SX001) con capacidad antagónica a tres hongos fitopatógenos (*Cytospora chrysosperma*, *Phaeoclavulina macrospora* y *Fusicoccum aesculi*) causantes de la enfermedad del cancro del álamo, encontrando que dicha cepa presenta actividad endoglucansa, lipasa y produce proteasas.

De las cepas analizadas en este estudio, seis mostraron la capacidad de producir sideróforos (Tabla 14), siendo similar a lo reportado por Ribeiro *et al.* (2018) quienes evaluaron la capacidad de cuatro aislados endofíticos de maíz pertenecientes al género *Bacillus*, encontrando que tres de ellos produjeron sideróforos del tipo carboxilato. La síntesis de estas moléculas pueden promover el crecimiento de la planta actuando a través de dos mecanismos: directamente en la nutrición vegetal, debido a que el hierro disponible para las plantas es generalmente bajo, por lo tanto los compuestos quelantes orgánicos producidos por las bacterias pueden ayudar a la absorción y promover el crecimiento vegetal indirectamente influyendo en el control de fitopatógenos al reducir la disponibilidad de Fe (Beneduzi *et al.*, 2012), lo que limita el crecimiento de los mismos.

Así mismo se evaluó la capacidad que presentaban los aislados bacterianos para producir AIA, obteniendo ocho cepas productoras de auxinas (Tabla 14). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Dawwam *et al.* (2013) quienes mostraron que los endófitos bacterianos produjeron diferentes cantidades de AIA que oscilaron entre 0.6 y 10.73 µg/mL, sin embargo ellos utilizaron un medio suplementados con triptófano. El triptófano funciona como precursor del AIA y puede promover la producción de la misma (Spaepen *et al.*, 2007).

A pesar de que las bacterias producen pequeñas cantidades de AIA en comparación con lo reportado por diversos autores, los resultados obtenidos son relevantes debido a que los efectos de la auxina en la planta dependen de su concentración, es decir, cuando es baja, puede estimular el crecimiento de la planta, de lo contrario, cuando es alta puede ser inhibitoria (Park *et al.*, 2015), esto se puede deber a que el AIA producido por la bacteria modifica el nivel de la auxina endógena de la planta a un nivel óptimo o perjudicial. Fierro-Coronado *et al.* (2014) demostraron que la bacteria *E. cloacae* a una concentración de 0.0087  $\mu\text{g/mL}$  presenta un efecto fisiológico de promoción del sistema radical en *A. thaliana* promoviendo el desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares. Por su parte, Hernández-Rodríguez *et al.* (2008), mostraron que a concentraciones bajas de AIA (5.93  $\mu\text{g/mL}$ ) en un medio suplementado con triptófano, la bacteria *Burkholderia* sp. (MBf15) fue capaz de aumentar la longitud de la raíz en plantas de maíz. Así mismo, Adamoski *et al.* (2014) evaluaron bacterias endófitas de raíces de maíz y observaron que las bacterias que produjeron niveles más bajos de AIA (35  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando como precursor triptófano tuvieron mayor influencia sobre el alargamiento y volumen de la raíz.

Por otra parte, existen diversos estudios donde se demuestra que las bacterias endófitas podrían ser utilizadas como bioinoculantes al mejorar la absorción de fósforo y el rendimiento en las plantas (Leyva-González *et al.*, 2014). En el presente trabajo, seis bacterias presentaron la capacidad de solubilizar fosfato presentando índices de solubilización (IS) de 1.08 a 1.83 (Tabla 14), siendo similares a lo reportado por Ribeiro *et al.* (2017), quienes demostraron la actividad solubilizadora de fosfato tricálcico *in vitro* del 65% de las bacterias endófitas de maíz, obteniendo IS en el intervalo de 1.00 a 3.71. Por su parte, Ibarra-Galeana *et al.* (2017) evaluaron la capacidad que presentaban tres cepas bacterianas rizosféricas de maíz (*Sinorhizobium meliloti*, *B. flexus* y *B. megaterium*) para solubilizar el fósforo (P), promover el crecimiento y la nutrición del fósforo en maíz, encontrando que la inoculación de las cepas por separado, así como un consorcio de las mismas en un suelo deficiente en P y utilizando fertilizante sin P mejoró la altura de la

planta, el peso seco de los brotes de las raíces, así como la nutrición de P en las plantas de maíz.

Con el fin de conocer los géneros bacterianos asociados a plantas de carrizo y maíz, se realizó la identificación molecular de los 11 aislados  $\gamma$ -hemolíticos seleccionados por su capacidad antagónica hacia el fitopatógeno *R. zeae* (Tabla 14). Los resultados mostraron que las bacterias endófitas pertenecían a 5 géneros diferentes: *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, los cuales han sido reportados como endófitos en diferentes especies vegetales. Por ejemplo, *Rhizobium pakistanense* fue aislado de nódulos de cacahuete (Khalid *et al.* 2015). *Staphylococcus warneri* ha sido identificada como endófito de frijol, maíz y arroz (Costa *et al.*, 2012; Bodhankar *et al.*, 2017; Chaudhry *et al.*, 2017). Por su parte, *Bacillus aryabhatai* fue reportado en caña de azúcar, tomate y maíz (Kruasuwan & Thamchaipenet, 2016; Tian *et al.*, 2017; Marag & Suman, 2018). *Acinetobacter radioresistens* ha sido identificada en tomate maíz (Rashid *et al.*, 2012; Thanh *et al.*, 2014). *Bacillus velezensis* fue aislado de maíz y cacahuete (Kim *et al.*, 2018; Massawe *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019). *Pseudomonas guariconensi* fue reportada como endófito de papa, caña de azúcar y tomate (Ramírez-Bahena *et al.*, 2015; Kruasuwan & Thamchaipenet, 2016; Tian *et al.*, 2017). *Pseudomonas plecoglossicida* se aisló de álamo, platano y tomate (Moore *et al.*, 2006; Marcano *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* fue reportado como endófito de pimienta negra, chile rojo y papa (Kumar *et al.*, 2013; Allu *et al.*, 2014; Ramírez-Bahena *et al.*, 2015).

La diversidad de los diferentes géneros encontrados en ambas plantas (tabla 14) se debe a que están fuertemente influenciada por la naturaleza de la especie hospedante como lo menciona Ding y Melcher (2016). Ding *et al.* (2013) identificaron que la especie huésped es el determinante más importante en la selección de su comunidad endofítica, seguido de las fechas y lugares de muestreo. De hecho, diferentes cultivares de una especie de planta cultivada en el mismo suelo también puede diferir en su diversidad endofítica, según lo informado por Granér *et al.* (2003) para cuatro cultivares diferentes de *Brassica napus* que tienen diferentes poblaciones bacterianas endofíticas. Por lo

tanto, la especie de la planta huésped gobierna fuertemente el tipo de bacteria endofítica que la coloniza.

Actualmente las bacterias endófitas han sido ampliamente estudiadas por la capacidad de antagonismo que presentan a hongos fitopatógenos y promoción de crecimiento vegetal, por lo tanto, están ganando impulso para desarrollar agrobiológicos, no obstante, es necesario realizar evaluaciones de riesgo de estos microorganismos para garantizar que no representen una amenaza inadvertida para la salud humana al ser aplicados en campo.

Recientemente la prueba que se utiliza para la selección de microorganismos con potencial biotecnológico es la prueba de hemólisis, sin embargo, ésta prueba es muy específica y solamente nos indica que pasa si la bacteria llega al torrente sanguíneo. Existen reportes en literatura donde muestran que la rizósfera alberga especies bacterianas como: *B. cereus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* spp. que causan infecciones en la piel (Berg *et al.* 2005). A pesar de que estos informes proporcionan evidencia de la aparición de patógenos oportunistas, se dispone muy poca información sobre su virulencia, es por ello que en el presente proyecto se utilizaron larvas de *G. mellonella* como modelo experimental para conocer acerca de la virulencia de las cepas seleccionadas. Hay que mencionar que, este modelo ha sido ampliamente utilizado para estudiar la virulencia de patógenos humanos como: *Vibrio cholerae* (Noreen *et al.*, 2017), *P. aeruginosa* (Miyata *et al.*, 2003), *Staphylococcus aureus* (Desbois *et al.*, 2011), y *B. cereus* (Fedhila *et al.*, 2006) debido a que la respuesta inmune de los insectos muestra similitudes estructurales y funcionales con la respuesta inmune innata de los mamíferos (Kavanagh & Reeves, 2004).

Por lo antes mencionado se llevó a cabo el bioensayo con las cepas  $\gamma$ -hemolíticas, teniendo como resultado que dos cepas  $\gamma$ -hemolíticas de carrizo (Figura 21) y una de maíz (Figura 22) fueron virulentas para las larvas en las dos concentraciones de bacterias evaluadas (50 y 500 UFC), así mismo, al evaluar las cepas  $\alpha$ -hemolíticas, solamente se



encontró que el aislado 21 (figura 23), mostró virulencia. La virulencia de las bacterias estudiadas fue dependiente de cada cepa, debido a que se utilizó la misma temperatura de incubación y concentración de inóculo. De las cuatro cepas patógenas se observó que conforme se aumentó la concentración de inóculo, las cepas fueron más virulentas, siendo nuestros resultados consistentes por lo reportado por Noreen *et al.* (2017) quienes observaron que al aumentar la concentración del inóculo de una cepa de *Vibrio cholerae*, ésta mostraba mayor virulencia.

Por otra parte, una característica importante para que una bacteria sea considerada endófitas es que se muestre evidencia de su presencia dentro de los tejidos de las plantas, para lo cual, se realizaron ensayos de colonización en plantas de maíz utilizando *B. aryabhatai* (aislado de carrizo) teñido con WGA-Alexa Fluor 488®, *P. guariconensi* y *P. plecoglossicida* (aislados de maíz) transformadas con el plásmido pPROBE mCherry para su posterior visualización en el microscopio con fluorescencia. En el caso de *B. aryabhatai*, esta es una bacteria Gram positiva, la lectina WGA es una proteína aglutinina del germen de trigo que es capaz de reconocer las unidades de N-acetil glucosamina de los peptidoglucanos presentes en la pared de las bacterias Gram positivas facilitando su visualización al acoplarse el WGA a un fluoróforo: Alexa-Fluor 488 nm, el cual fluoresce en el espectro verde. Para las bacterias Gram negativas el WGA no funciona para teñir la pared bacteriana ya que ésta no posee residuos de peptidoglucano como en las bacterias Gram positivas. Para las bacterias Gram negativas del género *Pseudomonas* se logró su visualización transformando las dos cepas de *Pseudomonas* con un plásmido pPROBE mCherry que lleva una resistencia a un antibiótico para la selección del plásmido y la proteína fluorescente roja mCherry expresada bajo la regulación de un promotor constitutivo fuerte. Esto permite que la bacteria produzca constitutivamente la proteína fluorescente roja y poder visualizarla el campo fluorescente rojo. Los resultados obtenidos demostraron que *B. aryabhatai* una bacteria aislada como endófitas de carrizo es capaz de colonizar el tejido cortical de las raíces de una especie vegetal distinta de la cual fue aislada (carrizo) pero de la misma familia: el maíz. Esto abre las posibilidades al estudio de la especificidad del endofitismo en plantas y pudiera esta bacteria constituir un

nuevo modelo para su estudio en carrizo y maíz que nos ayude a elucidar los límites del endofitismo inter-específico. *Pseudomonas guariconensi* y *P. plecoglossicida*, bacterias Gram negativas aisladas de hoja y raíz de maíz, demostraron colonizar el tejido cortical y el tejido vascular, respectivamente, de raíces de maíz. Lo que es importante para *P. guariconensi*, es que esta bacteria fue aislada como endófito de tejido foliar, esto sugiere que esta bacteria probablemente inicie la colonización de maíz vía radical, penetrando a través de raíz y aquí sea donde se establece la colonización para llegar al tejido vascular y viajar de ahí a hoja. Para comprobar estas observaciones, se requerirá en el futuro un estudio detallado de cómo se lleva a cabo el establecimiento de la colonización en el tiempo y estudios probablemente más detallados de visualización de la penetración, establecimiento y movimiento en los tejidos de maíz.

En los tres casos se evidenció la presencia de bacterias como endófitas dentro del tejido de la raíz, estos resultados son similares a lo reportado por Hao *et al.* (2017) quienes transformaron la cepa *Paenibacillus polymyxa* con una proteína verde fluorescente GFP, encontrando que la bacteria era capaz de colonizar las raíces de trigo, maíz y pepino. Así mismo, Vinayarani *et al.* (2018) tiñeron con bromuro de etidio a *P. aeruginosa* y mostraron que era capaz de colonizar el rizoma de cúrcuma.

## 9. CONCLUSIONES

A partir de plantas de carrizo y maíz se creó una colección de 79 aislados de bacterias endófitas no hemolíticas y 33 bacterias  $\alpha$ -hemolíticas.

Seis aislados de carrizo y cinco de maíz se seleccionaron con potencial antagónico hacia el fitopatógeno *Rhizoctonia zae*, obteniendo porcentajes de inhibición de 21% hasta 50%.

Los 11 aislados se evaluaron para conocer los mecanismos de acción involucrados en el control biológico, se encontró que el aislado *Staphylococcus warneri* fue el que produjo quitinasas, proteasas, lipasas y presentó actividad endoglucanasa.

Cuatro aislados de maíz (*Pseudomonas guariconensis* y *Pseudomonas plecoglossicida* (66), *Pseudomonas plecoglossicida* (67) y *Pseudomonas aeruginosa*) presentaron todas las características de promoción de crecimiento vegetal evaluadas: sideróforos, AIA, y solubilización de fosfato.

Dos cepas  $\gamma$ -hemolíticas de carrizo (*Rhizobium pakistanense*, *Staphylococcus saccharolyticus*) y una de maíz (*Pseudomonas aeruginosa*) mostraron virulencia en larvas de *G. mellonella*.

La combinación de la prueba de hemólisis y el modelo de *G. mellonella* se complementan para descartar bacterias potencialmente patógenas para el humano.

Se logró evidenciar que *Bacillus aryabhatai*, *Pseudomonas guariconensis* y *Pseudomonas plecoglossicida* son bacterias endófitas de la planta de maíz.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adamoski, D., Hungria, M., Kava-Cordeiro, V., Ikeda, A. C., Szilagyi-Zecchin, V. J., Glienke, C., Galli-Terasawa, L. V. (2014). Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, 4, 1–9.
- Ahemad, M. (2012). Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: A review. *IIOAB Journal*, 3, 39–46.
- Ahmed, E. & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7, 196-208.
- Aliye, N., Fininsa, C., Hiskias, Y. (2008). Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*, 47, 282–288.
- Allu, S., Kumar, N. P., Audipudi, A. V. (2014). Isolation, biochemical and PGP characterization of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chilli red fruit antagonistic against chilli anthracnose disease. *International Journal of Microbial Application Science*, 3, 318–329.
- AMIS (internet). Agricultural market information system (2019). Disponible en: <http://www.amis-outlook.org/>. Revisado en septiembre de 2019.
- Arnold, A.E. (2005). Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. En *Current trends in mycological research*. Deshmukh, S. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68.
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S., Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249, 271-277.
- Barnett, S., Zhao, S., Ballard, R., Franco, C. (2017). Selection of microbes for control of *Rhizoctonia* root rot on wheat using a high throughput pathosystem. *Biological Control*, 113, 45–57.

- Benhamou, N., Gagné, S., Quéré, D.L., Dehbi, L. (2000). Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Biochemistry and Cell Biology*, 90, 45-56.
- Benhamou, N., Lafontaine, P. J., Nicole, M. (1994). Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants treated with chitosan. *Phytopathology*, 84, 1432-1444.
- Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria, *Environmental Microbiology*, 7, 1673–1685.
- Bodhankar, S., Grover, M., Hemanth, S., Reddy, G. (2017). Maize seed endophytic bacteria : dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp. *3 Biotech*.
- Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K., Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes, *Virulence*, 4:7, 597-603.
- Cardona, R., Rodríguez, H., Nass, H. (1999). Manchas bandeadas en maíz causadas por *Rhizoctonia solani* en Portuguesa, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 12, 32–33.
- Carreño-Chávez, J. (2017). *Bacillus cereus* cepa B25 para el control de la pudrición de raíz en maíz y frijol causado por, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia zeae*, en Sinaloa. Tesis de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente. Universidad Autónoma de Occidente, Los Mochis, Sinaloa.
- Castellanos, G., Jara, C., Mosquera, G. (2016). Manejo del hongo en el laboratorio: *Rhizoctonia solani*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Pp. 1-23.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J., Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*, 27, 137–142.
- Cavaglieri, L., Orlando, J. R. M. I., Rodriguez, M. I., Chulze, S., Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156, 748-754.

- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 489-499.
- Chaudhry, V., Sharma, S., Bansal, K., Patil, P. B. (2017). Glimpse into the Genomes of Rice Endophytic Bacteria: Diversity and Distribution of Firmicutes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 4–8.
- Chavarro, E., Ceresini, P. C., Ramos, L. M., Pereira, D. A., Schurt, D. A., Vieira Jr, J. R., McDonald, B. A. (2015). The *Urochloa* foliar blight and collar rot pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in South America via a host shift from rice. *Phytopathology*, 105, 1475-1486.
- Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D., Bian, K. (2019). Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiological Research*, 218, 41–48.
- Choi, K. H., Kumar, A., Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 64, 391–397.
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J., Pinton, R., Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes, *Journal of Soils and Sediments*, 14, 538–548.
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C., Baillieul, F. (2017). Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different *in vitro* tests. *Microbiological Research*, 202, 11–20.
- Conte, S. S. & Walker, E. L. (2011). Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant*, 4, 464-476.
- Corno, L., Pilu, R., Adani, F. (2014). *Arundo donax* L.: a non-food crop for bioenergy and bio-compound production. *Biotechnology Advances*, 32, 1535-1549.

- Costa, L. E. D. O., de Queiroz, M. V., Borges, A. C., de Moraes, C. A., de Araújo, E. F. (2012). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria Isolated From the Leaves of. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1562–1575.
- Cubeta, M. A. & Vilgalys, R. (1997). Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *Phytopathology*, 87, 462–473.
- Cunningham, A. B., & Milton, S. J. (1987). Effects of basket-weaving industry on mokola palm and dye plants in northwestern Botswana. *Economic Botany*, 41, 386–402.
- Desbois, A. P., & Coote, P. J. (2011). Wax moth larva (*Galleria mellonella*): An in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1785–1790.
- Ding, T., & Melcher, U. (2016). Influences of Plant Species, Season and Location on Leaf Endophytic Bacterial Communities of Non-Cultivated Plants, 1–13.
- Ding, T., Palmer, M. W., & Melcher, U. (2013). Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria, 1–11.
- Edi-Premono, M. Moawad., Vleck, P. 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere *Indonesian Journal of Crop Science*, 11, 13–23.
- FAO (internet). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (2019). Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/es/>. Revisado en septiembre de 2019.
- FAO (internet). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (2017). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Revisado en marzo de 2019.
- Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., Nielsen-LeRoux, C. (2006). Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Molecular Microbiology*, 62, 339–355.

- Fernández-López, L. A. (2011). Identificación molecular de grupos anastomóticos de *Rhizoctonia solani* asociados a la costra negra y cancro del tallo en el cultivo de papa en Sinaloa. Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.
- Fierro-Coronado, R. A., Quiroz-Figueroa, F. R., Maldonado-Mendoza, I. E., García-Pérez, L. M., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E. (2014). IAA-producing rhizobacteria from chickpea (*Cicer arietinum* L.) induce changes in root architecture and increase root biomass. *Canadian Journal of Microbiology*, 60, 639–648
- Figueroa-López, A. M. (2011). Escrutinio masivo de un banco de germoplasma para obtener microorganismos antagonistas a *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.
- Figueroa-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Martínez-Álvarez, J. C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G. J., Félix-Gastélum, R., Castro-Martínez, C., Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *SpringerPlus*, 5, 330-341.
- Fishal, E.M., Meon, S., Yun, W.M. (2010). Induction of tolerance to *Fusarium wilt* and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible Berangan Banana pre-inoculated with *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. *Agricultural Sciences in China*, 9, 1140-1149.
- Flores-Maldonado, J. J., Prado-Navarro, A., Domínguez-Orozco, A. L., Mendoza, R., Gonáles-Marínes, A. I. (2008). El carrizo gigante, especie invasora de ecosistemas riparios. CONABIO. *Biodiversitas*, 81, 6-10.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S. (2002). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 11<sup>th</sup> Ed. Mosby, St. Louis, MO.p.
- Galindo-Flores, H., Martínez-Álvarez, J. C., Nava-Pérez, E., García-Estrada, R. S. Maldonado-Mendoza, I. E. (2005). A Saprotrophic fungal isolate with homology to



members of the Chaetomiaceae behaves as an antagonist of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 130-139.

- Gerritsen, P. R. W., Ortiz-Arrona, C., González-Figueroa, R. (2014). Usos populares, tradición y aprovechamiento del carrizo: estudio de caso en la costa sur de Jalisco, México. *Revista Economía, Sociedad y Territorio*, 9, 185–207.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169, 30-39.
- González-García, V., Portal-Onco, M. A., Rubio-Susan, V. (2006). Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4, 55-79
- González-Vera, a D., Bernardes-de-Assis, J., Zala, M., McDonald, B. A, Correa-Victoria, F., Graterol-Matute, E. J., Ceresini, P. C. (2010). Divergence between sympatric -rice and maize- infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from Latin America. *Phytopathology*, 100, 172–182.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel P., Thakker, J. N. (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*, 169, 66–75.
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A. (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 169, 59-65.
- Granér, G., Persson, P., Meijer, J., & Alstro, S. (2003). A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*, 224, 269–276.
- H. Ayuntamiento de Guasave (Gobierno del Estado de Sinaloa; Secretaría de Desarrollo Social, Medio Ambiente y Pesca; Subsecretaría de Desarrollo Urbano y Ecológico; Dirección de Recursos Naturales y Medio Ambiente). (1998). “La Uba” Cofradía de Tamazula, Guasave. Zona de Preservación Ecológica de Centro de Población. Sinaloa.

- Hao, T., & Chen, S. (2017). Colonization of wheat, maize and cucumber by *Paenibacillus polymyxa* WLY78. *PLoS ONE*, *12*, 1–10.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, *16*, 463-471.
- Harris, J. R., Lundgren, B. R., Grzeskowiak, B. R., Mizuno, K., Nomura, C. T. (2016). A rapid and efficient electroporation method for transformation of *Halomonas* sp. O-1. *Journal of Microbiological Methods*, *129*, 127–132.
- Harun-Or-Rashid, M., Kim, H. J., Yeom, S. I., Yu, H. A., Manir, M. M., Moon, S. S., Kang, Y. J., Chung, Y. R. (2018). *Bacillus velezensis* YC7010 enhances plant defenses against brown plant hopper through transcriptomic and metabolic changes in rice. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1–15.
- Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Acebo-Guerrero, Y., Velazquez-del Valle, M. G., Hernández-Lauzardo, A. N. (2008). Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology*, *39*, 180–186.
- Hinsinger, P., Bravin, M., Devau, N., Gerard, F., Le Cadre, E., Jaillard, B. (2008). Soil-root-microbe interactions in the rhizosphere: a key to understanding and predicting nutrient bioavailability to plants. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, *8*: 39-47.
- Ibarra-Galeana, J. A., Castro-Martínez, C., Fierro-Coronado, R. A., Armenta-Bojórquez, A. D., Maldonado-Mendoza, I. E. (2017). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico. *Annals of Microbiology*, *67*, 801–811.
- Iwasaki, K., Uchiyama, H., Yagi, O., Kurabayashi, T., Ishizuka, K., Takamura, Y. (1994). Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *58*, 851–854.

- Jasim, B., Joseph, A. A., John, C. J., Mathew, J., Radhakrishnan, E. K. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech*, *4*, 197-204.
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, *5*, 108–119.
- Jones, B. V., Sun, F., Marchesi, J. R. (2007). Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. *Letters in Applied Microbiology*, *45*, 418–420
- Jorjão, A. L., Oliveira, L. D., Scorzoni, L., Figueiredo-Godoi, L. M. A., Prata, M. C. A., Jorge, A. O. C., Junqueira, J. C. (2018). From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*, *9*, 383–389.
- Kavanagh, K., & Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology*, *28*, 101–112.
- Khalid, R., Zhang, Y. J., Ali, S., Sui, X. H., Zhang, X. X., Amara, U., Chen, W. X., Hayat, R. (2015). *Rhizobium pakistanensis* sp. nov., isolated from groundnut (*Arachis hypogaea*) nodules grown in rainfed Pothwar, Pakistan. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *107*, 281–290.
- Kobayashi, H., & Fukuoka, A. (2013). Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*, *15*, 1740–1763.
- Kruasuwan, W., & Thamchaipenet, A. (2016). Diversity of culturable plant growth-promoting bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. *Journal of Plant Growth Regulation*.
- Kumar, A., Munder, A., Aravind, R., Eapen, S. J., Tümmler, B., Raaijmakers, J. M. (2013). Friend or foe: Genetic and functional characterization of plant endophytic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, *15*, 764–779.

- Kumar, A., Munder, A., Aravind, R., Eapen, S. J., Tümmeler, B., Raaijmakers, J. M. (2013). Friend or foe: Genetic and functional characterization of plant endophytic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 15, 764–779.
- Leibfried, A., To, J. P. C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J., Lohmann, J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438, 1172–1175.
- Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., Herrera-Estrella, L., López-Bucio, J., López-Arredondo, D. L. (2014). Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 95–123.
- Leyva-Madrigal, K. Y., Larralde-Corona, C. P., Apodaca-Sánchez, M. A., Quiroz-Figueroa, F. R., Mexia-Bolaños, P. A., Portillo-Valenzuela, S., Maldonado-Mendoza, I. E. (2015). *Fusarium* Species from the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Involved in Mixed Infections of Maize in Northern Sinaloa, Mexico. *Journal of Phytopathology*, 163, 486–497.
- Liguori, R., Ventorino, V., Pepe, O., Faraco, V. (2016). Bioreactors for lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of high added value products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 597–611.
- Lim, H. S., Kim, Y. S., Kim, S. D. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 510-516.
- Lizárraga-Sánchez, G. J., Leyva-Madrigal, K. Y., Sánchez-Peña, P., Quiroz-Figueroa, F. R., Maldonado-Mendoza, I. E. (2015). *Bacillus cereus sensu lato* strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. *Field Crops Research*, 176, 11–21.
- Loper, J. E., & Schroth, M. N. (1986). Influence of Bacterial Sources of Indole-3-acetic Acid on Root Elongation of Sugar Beet. *Phytopathology*. *Phytopathology*, 76, 386–389.
- López-Rivera, R. (2011). Biodiversidad de la microbiota rizosférica de dos especies solanáceas: (*Solanum lycopersicon*, L. y *Datura spp.*) tomate y toloache. Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de

Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.

- Lynne, A. M., Haarmann, D., Loudon, B. C. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12, 51-53.
- Marag, P. S., & Suman, A. (2018). Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays L.*). *Microbiological Research*, 214, 101–113.
- Marcano, I. E., Díaz-Alcántara, C. A., Urbano, B., González-Andrés, F. (2016). Assessment of bacterial populations associated with banana tree roots and development of successful plant probiotics for banana crop. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 1–20.
- Martínez-Álvarez, J. C. (2016). Desarrollo de una formulación en polvo a base de esporas de *Bacillus cereus sensu lato* cepa B25 para el control biológico de *Fusarium verticillioides* en maíz. Tesis de Doctorado en Biotecnología Agropecuaria. Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México.
- Martínez-Álvarez, J. C. (2003). Identificación molecular de hongos micorrízicos arbusculares en el municipio de Guasave, Sinaloa. Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa.
- Martins, S. A., Schurt, D. A., Seabra, S. S., Martins, S. J., Ramalho, M. A. P., Moreira, F. M. de S., Pereira, J. C., Goyulart, A., Medeiros, F. H. V. de. (2018). Common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) growth promotion and biocontrol by rhizobacteria under *Rhizoctonia solani* suppressive and conducive soils. *Applied Soil Ecology*, 127, 129–135.
- Massawe, V. C., Hanif, A., Farzand, A., Mburu, D. K., Ochola, S. O., Wu, L., Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Gao, X. (2018). Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *American Phytopathological Society*.

- Megaw, J., Thompson, T. P., Lafferty, R. A., Gilmore, B. F. (2015). *Galleria mellonella* as a novel *in vivo* model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Chemosphere*, 139, 197–201.
- Mehnaz, S., & Lazarovits, G. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, 51, 326-335.
- Mejía-Saulés, M.T., & Dávila-Aranda, P. (1992). *Gramíneas útiles de México*, México: Universidad Nacional Autónoma de México. p. 42
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T.Z., Andersen, G. L., Bakker, P., Raaijmakers, J. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 1097, 1097–1100.
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M., Drenkard, E. (2003). Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71, 2404–2413.
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M., Sicardi, M. (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, 21–28.
- Montesino, R., Ayala, M. A., Berlanda, A. M. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos, 1<sup>ra</sup> ed. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). México, D.F
- Moore, F. P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Campbell, C. D., Moore, E. R. B. (2006). Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 539–556.

- Morales-Ruiz, E., López-Ceballos, A., Maldonado-Mendoza, I. E. (2019). Transformation of the rhizospheric *Bacillus cereus* sensu lato B25 strain using a room-temperature electrocompetent cells preparation protocol. *Plasmid*, *105*, 102435.
- Mousa, W. K., Shearer, C. R., Limay-Rios, V., Zhou, T., Raizada, M. N. (2015). Bacterial endophytes from wild maize suppress *Fusarium graminearum* in modern maize and inhibit mycotoxin accumulation. *Frontiers in plant science*, *6*, 1–19.
- Mueller, N. D., Gerber, J. S., Johnston, M., Ray, D. K., Ramankutty, N., Foley, J. A. (2012). Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature*, *490*, 254–257.
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A., Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*, 310–317.
- Nagórska, K., Bikowski, M., Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, *54*, 495–508.
- Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M., & Sessitsch, A. (2013). The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: A maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biology and Fertility of Soils*, *50*, 249–262.
- Neela, V., Kalidasan, V., Awang Hamat, R., Azman, A., Kumar, S., Joseph, N. (2018). Putative iron acquisition systems in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Molecules*, *23*, 2048.
- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P., Moerschbacher, B. M., Podile, A. R. (2010). Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*, 231–241.
- Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Mokni-Tlili, S., Aydi Ben Abdallah, R. (2016). Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biological Control*, *97*, 80–88.

- Nelson, L. M. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): prospects for new inoculants. *Crop management*, 3, 7-14.
- Noreen, Z., Wren, B. W., Thomson, N., Ali, A., Bokhari, H. (2017). *Galleria mellonella* is low cost and suitable surrogate host for studying virulence of human pathogenic *Vibrio cholerae*. *Gene*, 628, 1–7.
- Ohlrogge, J., Allen, D., Berguson, B., Dellapenna, D., Shachar-hill, Y., Stymne, S. (2009). Driving on Biomass. *Science*, 324, 1019–1021.
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 379–391.
- Park, J. M., Radhakrishnan, R., Kang, S. M., Lee, I. J. (2015). IAA producing enterobacter sp. I-3 as a potent bio-herbicide candidate for weed control: a special reference with lettuce growth inhibition. *Indian Journal of Microbiology*, 55, 207–212.
- Pasarellt, L., & Mcginnis, M. R. (1992). Viability of fungal cultures maintained at -70 °C. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1000–1004.
- Perdomo, R., Hernández, A., González, A., Pineda, J., Alezones, J. (2007). Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. *Interciencia*, 32, 48-55.
- Pereg, L., & Mcmillan, M. (2015). Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 349–358.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 127–131.
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Postma, J., & Schilder, M. T. (2015). Enhancement of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* in sugar beet by organic amendments. *Applied Soil Ecology*, 94, 72–79.



- Prince, L., Raja, A., & Prabakaran, P. (2011). Antagonistic Potentiality of some soil mycoflora against *Colletotrichum falcatum*. *World Journal of Science and Technology*, 1, 39–42.
- Pyralidae, L. (2017). Efecto de la temperatura en el ciclo de desarrollo de *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae). *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 37, 63–69.
- Qin, S., Miao, Q., Feng, W. W., Wang, Y., Zhu, X., Xing, K., Jiang, J. H. (2015). Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Applied Soil Ecology*, 93, 47–55.
- Rábago-Zavala, K. (2017). Caracterización morfológica, molecular y patogénica de aislados de *Rhizoctonia spp.*, de papa, frijol, y maíz dulce en el Norte de Sinaloa. Tesis de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente. Universidad Autónoma de Occidente, Los Mochis, Sinaloa.
- Rahman Khalil, Md. M., Fierro Coronado, R. A., Peñuelas-Rubio. O., Villa Lerma, A. G., Plascencia Jatomea, R., Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E. (2019). No publicado.
- Ramírez, P. & Cocha, J. M. (2003). Degradación Enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Biológica Peru*, 10, 67–77.
- Ramírez-Bahena, M. H., Cuesta, M. J., Tejedor, C., Igual, J. M., Fernández-Pascual, M., Peix, Á. (2015). *Pseudomonas endophytica* sp. nov., isolated from stem tissue of *Solanum tuberosum* L. in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2110–2117.
- Rashid, S., Charles, T. C., Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217–224.
- Ribeiro, V. P., Barros, B. A., de Abreu, C. S., Figueiredo, J. E. F., Oliveira, C. A., Gomes, E. A., Luna, U. G. P., Marriell, I. E., dos Santos, V. L. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, 16, 1-13.

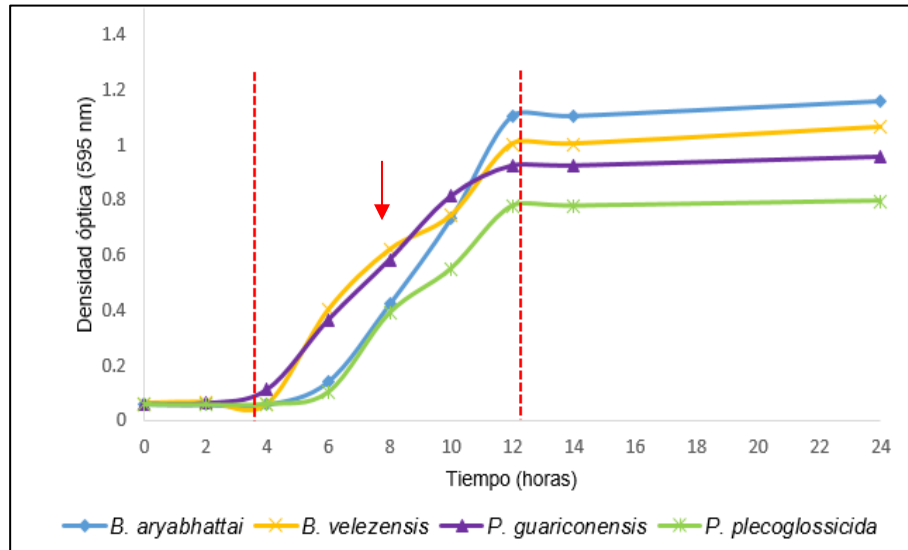
- Roberts, W.K. & Selitrennikoff, C.P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of general microbiology*, 134, 169–176.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 827–837.
- Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 1-24.
- Ruiz, J. A., Medina, G., González, I. J., Flores, H. E., Ramírez, G., Ortiz, C., Byerly, K. F., Martínez, R. P. (2013). Requerimientos agroecológicos de los cultivos. Disponible en: [http://www.inifapcirpac.gob.mx/publicaciones\\_nuevas/Requerimientos%20Agroec%20de%20Cultivos%20da%20Edici%F3n.pdf](http://www.inifapcirpac.gob.mx/publicaciones_nuevas/Requerimientos%20Agroec%20de%20Cultivos%20da%20Edici%F3n.pdf). Revisado en octubre de 2019.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278, 1-9.
- SAGARPA (internet). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. (2017). Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B\\_sico-Ma\\_z\\_Grano\\_Blanco\\_y\\_Amarillo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf) Revisado en octubre de 2019.
- Salazar-Henao, J. E., Vélez-Bermúdez, I. C., Schmidt, W. (2016). The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis. *Development*, 143: 1848-1858.
- Salwoom, L., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Shariff, F. M., Convey, P., Pearce, D., Ali, M. S. M. (2019). Isolation, characterisation, and lipase production of a cold-adapted bacterial strain *Pseudomonas* sp. LSK25 isolated from Signy Island, Antarctica. *Molecules*, 24, 1–14.
- Scordia, D., Cosentino, S. L., Lee, J. W., Jeffries, T. W. (2012). Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. *Biomass and Bioenergy*, 39, 296–305.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., Zhang, X. (2013). Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics*, 14, 271-290.

- Shi, T., Reeves, R. H., Gilichinsky, D. A., Friedmann, E. I. (1997). Characterization of viable bacteria from siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology*, 33, 169-179.
- SIAP (internet). Atlas agroalimentario 2012-2018. (2018). Disponible en: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018). Revisado en octubre de 2019.
- SIAP (Internet). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Disponible en: [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do). Revisado en mayo de 2018.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 425–448.
- Stead, D. (1984). Evaluation of a fluorimetric assay on the lipases from strains of milk psychrotrophic bacteria. *Journal of Dairy Research*, 51, 123–130.
- Stone, J.K., Bacon, C.W., White, J.F. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial Endophytes*, 3–29.
- Sumner, D. R., & Minton, N. A. (1989). Crop losses in corn induced by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 and nematodes. *Phytopathology*, 79, 934–941.
- Sun, S., Zhang, Z., Luo, Y., Zhong, W., Xiao, M., Yi, W., Fu, P. (2011). Exopolysaccharide production by a genetically engineered *Enterobacter cloacae* strain for microbial enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*, 102, 6153-6158.
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 777–780.
- Thanh, D. T. N. (2014). Isolation, Characterization and Identification of Endophytic Bacteria in Maize (*Zea Mays* L.) Cultivated on Acrisols of the Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 2, 224.
- Tian, B., Zhang, C., Ye, Y., Wen, J., Wu, Y., Wang, H., Li, H., Cai, W., Cheng, Z., Lei, S., Ma, R., Lu, C., Cao, Y., Xu, X., Zhang, K. (2017). Beneficial traits of bacterial

- endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 247, 149–156.
- Tredway, L.P. & Burpee, L. L. (2006). *Rhizoctonia* diseases of turfgrass. *The American Phytopathological Society*. Disponible en: [https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Rhizoc\\_tonia.aspx](https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Rhizoc_tonia.aspx). Revisado en mayo de 2018.
  - Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., Seeger, M. (2016). Revisión bibliográfica. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33–39
  - Vinayarani, G., & Prakash, H. S. (2018). Growth promoting rhizospheric and endophytic bacteria from *Curcuma longa* L. as biocontrol agents against rhizome rot and leaf blight diseases, 34, 218–235.
  - Wang, W., Tang, X., Zhu, Q., Pan, K., Hu, Q., He, M., Li, J. (2014). Predicting the Impacts of Climate Change on the Potential Distribution of Major Native Non-Food Bioenergy Plants in China, *PLoS One*, 9, 1–11.
  - Warham EJ, Sutton B, Butler L. 1996. Seed testing of maize and wheat: A laboratory guide: CIMMYT.
  - Xu, J. & Kloepper, J. (2014). Isolation and assessment of nitrogen-fixing bacteria from *Arundo donax* L. (Giant Reed) for use as biofertilizers. Auburn University, Auburn University, AL. Long Beach Convention Center, Room 102A. <https://scisoc.confex.com/crops/2014am/webprogram/Paper86601.html>
  - Yan, A.-Q., Wu, X.-Q., Wang, Y.-F., Ren, J.-H., Ye, J.-R., Li, H. (2013). Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. *Biological Control*, 67, 421–430.
  - Zavaleta-Mejía, E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana*, 17, 201–207.

## 11. ANEXOS

**Anexo 1.** Curva de crecimiento de *Bacillus aryabhatai* (3), *Pseudomonas guariconensis* (37), *Bacillus velezensis* (47) y *Pseudomonas plecoglossicida* (66). La flecha indica el tiempo en que se tomó el inóculo.



Las bacterias fueron crecidas todas en medio LB a una temperatura de 30 °C y 200 rpm.