



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de octubre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)
Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)
Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)
M. en C. Marco Antonio Rogel Hernández (CCG UNAM)

Tesis: **Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Maria Guadalupe Castillo Texta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2020-10-21 09:23:49 | Firmante

Jk6HkBOiXtk1nFulO7tdrKiU0Ncq+9alyyRE5H1ZmKQ6dihJEvuTKsaYgduq3RouHkelV3iMEG7yco0MxskynBehXN7MilutRjs/zBfNAgn2RcjiTwIKJImba3nP6kUKc5sl7be7VeldlmU
dO12IPyRXVktqu71attYYNb+E4XXr6U1h7TqMz2GCpCBVaeXyGU0qxdIjhyng9IAuOGYp3ozN7HZygPvKdQDOwXWnDw22QXLeN5inwclspUjZstZCj2IdSrBblKzi207W47U3c
u+YaN2jrFbzcS5qNslJ3JvvG8pniNo19ob1y7Nh27xZRqAfJadfhKW0D52F90QdA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



hoWqFr

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8RnXanrpSLqySOVYO7wRYd62bPLjuMC>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de octubre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)
Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)
Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)
M. en C. Marco Antonio Rogel Hernández (CCG UNAM)

Tesis: **Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Maria Guadalupe Castillo Texta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2020-10-21 11:40:44 | Firmante

UKYnScMb1s3Xp76GxKgWXDeFIK/t7pOJuBU3rkWwYkU5TCIEumFxrWmqEzCxCGSMS9I2haiF7dHdOHI63LRfgRRHnf8v92ICgm6K83Z7e/wZwzSJq3YozTqFqDeQ3AFWvn4HMrlj/uT+UyvnGW9iAGqbpIZWbbinWmz9ianN0iaehHeml5KczP8NYC2+4S5aATqP18Zjzbz89jebmGppqOECsvac6WV2JwyRHq9mVvAflFmCoDbc8vM9amY+OkV5q+713ccGF6dp5zoqKtAdCc+UXkwULE8WN4OWQLZwIMBpo6Fw0zGt3LMhz+hClta7TL5+/CpvNRsfeddu1jP1Bw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[uPblZd](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QUNmlnzttY6StXysXnDK4guZ9oFofHXY>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de octubre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)
Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)
Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)
M. en C. Marco Antonio Rogel Hernández (CCG UNAM)

Tesis: **Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Maria Guadalupe Castillo Texta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2020-10-21 13:00:47 | Firmante

CV691UUfGhkXiHjUAJ6pPPEc8KNDovCZVpbxPwUxlvq/9B4apWdhhu5evOVDmW89fVCxXE/WumuMT/fwHoXii/2sRrawfCgsdY/IHHiV4P19oagqmBBA4MJYQnFJbLWYTIVdr/ohvusF0BA0wG6M0AH0Nv09cuehisk/kerMXaPu8B5+8T7HuXBDlp6/FXvr88tuzLksSrKrx6iPrpTFR5Os8V/p5+hsoltol2ScKQ2JNNs6PH4Ky1PVIDdpdUtGjzGpzaCh9CCv1Cx8fm4HqdJCWISUASR3rDBQaiob7SletfA/zWJEw+5RS715D89ZUTmLLnnInrMM3Gg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



S2DVcQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nfV4tRBFQwjOyU9kf6UjAp86qtxjXcGq>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de octubre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)
Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)
Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)
M. en C. Marco Antonio Rogel Hernández (CCG UNAM)

Tesis: **Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Maria Guadalupe Castillo Texta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. SUSANA VALENCIA DÍAZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2020-10-22 19:46:34 | Firmante

p7L5x1X7PxEU+p73Mb5g2XsDN+AzJ49if2akJgo+BEKVuJCCP+LcYllvaMs5wWrrSuR7ZPKYC1uAXmJUNgUPXQ6vbZK/IOMgyyHx16NLXoq/xuE+2wbTP3YCgAKGOgg7Mch40zTyzZyBjiAKSLBQhUmd8hZi7/GE//WzvCNikf/caVcMxdh6kF0xo0pSqj9j09zuJs3sTfam9qgevb9nvamZDj2O8mrqfU4FeiK3oXhrD+nMtguYm1wyYDIBgaG4BwC82Lr848+XP33w8+YtlT43ntlR5sxBYDq6JpB2LPtD9tQ6belGxIh4c20Xuz5xhS30cLyNCZucL/thWCTgxEAw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[kp6ocl](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/109P60uQYjRKIVsK7KX53Te4urBQIJi6>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de octubre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)
Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)
Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)
M. en C. Marco Antonio Rogel Hernández (CCG UNAM)

Tesis: **Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Maria Guadalupe Castillo Texta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

M. EN C. MARCO ANTONIO ROGEL HERNÁNDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARCO ANTONIO ROGEL HERNÁNDEZ | Fecha:2020-10-28 21:20:02 | Firmante

bGbLvm4JVKBaDbAfwPKux1k0pv2OsG644iZZ9hh2f+BD8qh1g5WDgqI9Usb0kBX5RKgHpCHL2a94Tjm8/B5Kn/mMUAeTnMhJAiqwplg6Tf7R5hbXOK+ghwepysrc2SZXi08I0/4Of07HSsXINwITeFbarSEJrolAbEHvi+KovMVRa+GpAasuh4acrjguDJrmJOFyg5s7+RuOiXZ+Zu0k4B85E9aKlvYRCd2eF5YxfeovDuWVkmX9+0US9QBZuz+XKPD8AF+andrchrTN EyEHyl10sFhPnNgmjKpQ1qt78ebw8i27o5Qwqw7Ohh1LUm6vSM+7fpVeC7iNakcYnzeaw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[GluJHt](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WgLJNMTvqwutoAMMPY52Sxj3wTfQfarq>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BIÓL. MARIA GUADALUPE CASTILLO TEXTA

DIRECTOR: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

CO-DIRECTOR: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Biól. Maria Guadalupe Castillo Texta

CODIRECTORES:

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2020

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. José Augusto Ramírez Trujillo y el Dr. Ramón Suárez Rodríguez. Para la realización de los estudios de posgrado se contó con la beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (2018-000068-02NACF).

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y en particular al Dr. Ramón Suárez Rodríguez, responsable del Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas por el espacio y los medios brindados para la realización de mi proyecto de investigación.

A mis directores de tesis

Al Dr. José Augusto Ramírez Trujillo un especial agradecimiento por su asesoramiento, disposición y paciencia durante mi estancia.

Al Dr. Ramón Suárez Rodríguez un especial agradecimiento por su asesoría, paciencia, apoyo y disposición así como la amistad brindada.

A ambos investigadores mi más sincero agradecimiento por haberme recibido en su grupo de trabajo brindándome la oportunidad y confianza para desarrollar este proyecto y concluir mis estudios de posgrado.

A mi comité sinodal

Extiendo mi gratitud a mi comité sinodal que durante los seminarios de investigación me orientaron y aconsejaron. Gracias por sus contribuciones, su disposición y por siempre exigirme más para mejorar este trabajo de tesis, al Dr. Edgar Dantán González, a la Dra. Susana Valencia Díaz, al Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, al M. en C. Marco Antonio Rogel Hernández y al Dr. Ramón Suárez Rodríguez.

A mis compañeros y amigos

A mis compañeros de laboratorio Laura Alicia Dector Arriaga, Julio Cesar Salinas Ocampo y Fernando Aranda Lozano gracias por los agradables momentos y las buenas carcajadas.

A mis amigas Dulce Solano Abarca, María Eugenia Rodríguez Luqueño, Ivonne Gallegos Navarrete y al M. en C. Roberto Trejo Albarrán, gracias por su valiosa amistad por siempre impulsarme a dar lo mejor de mí y aprender a valorarlo, por siempre estar incondicionalmente y permitirme pasar excelentes momentos con ustedes sin importar lo que pasará.

Dedicatorias

A los pilares de mi vida a los cuales les reconozco y valoró.

Mi mayor gratitud a mis padres. A mi hermosa madre *María del Pilar Texta Cipriano*, que ha sido primordial en mi vida, la cual siempre estuvo y estará presente sin excepción alguna. A mi padre *José Castillo Galeana*, el cual no ha sido participe físicamente en los últimos años de mi vida, sin embargo, la ha marcado significativamente. Siempre les estaré agradecida por el apoyo y amor que me brindan incondicionalmente, por inspirarme a ser una mejor persona a pesar de algunos malos ratos. A los que siempre recurrí para un consejo que me impulsará para seguir por esta vida llena de relieves, por impulsarme a dar lo mejor de mí y aprender a valorarlo, por sus enseñanzas y valores. Gracias por todo lo brindado jamás podré devolverles todo lo que han hecho por mí y en la persona en que me convertí.

A mis familiares

A mi hermano *José Carlos Castillo Texta* gracias por los momentos llenos de risas, alegrías, berrinches, enojos, pláticas y consejos. Siempre estaré para ti pase lo que pase.

A mis sobrinos *José Manuel* y *Keily* a los cuales les desearé siempre lo mejor, recuerden que siempre estaré para ustedes queriéndolos y orientándolos en su camino.

Solo aquellos que están a mi lado incondicionalmente serán los causantes de mis éxitos y alegrías !

Índice del contenido

Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Índice de abreviaturas	vi
RESUMEN	ix
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	2
2.1 Estrés en plantas	2
2.1.1 Estrés abiótico	3
2.1.2 Estrés hídrico	4
2.1.3 Salinidad	4
2.1.4 Cambios de temperatura	5
3. Vías de transducción de señales en respuesta al estrés en plantas	5
4. Género <i>Selaginella</i>	6
4.1 <i>Selaginella lepidophylla</i>	7
4.1.1 Generalidades de la planta	7
4.1.2 Genómica y transcriptómica	9
5. Microorganismos endófitos	9
5.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	10
5.2 Producción de fitohormonas	11
5.3 Géneros microbianos de interés agrícola	13
6. Interacción planta – microorganismo	15
7. Trehalosa	15
7.1 Propiedades fisicoquímicas de la trehalosa	17
7.2 Rutas de biosíntesis y degradación de la trehalosa	18
7.3 Trehalosa en la interacción con <i>Selaginella lepidophylla</i>	20
8. Justificación	22
9. Hipótesis	22
10. Objetivos	23
10.1 Objetivo general	23
10.2 Objetivos particulares	23
11. Metodología	23

11.1	Estrategia experimental.....	23
11.2	Colecta del material biológico	24
11.3	Aislamiento de bacterias endófitas de la planta de <i>Selaginella lepidophylla</i>	24
11.4	Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA)	24
11.5	Determinación de la solubilización de fosfatos	25
11.6	Determinación de la fijación biológica de nitrógeno (FBN)	25
11.7	Cuantificación de los niveles de trehalosa	26
11.8	Análisis molecular para la clasificación por patrones de ERIC-PCR.....	27
11.8.1	Extracción de DNA de las bacterias endófitas	27
11.8.2	Análisis de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR).....	27
11.9	Análisis estadísticos	28
12.	Resultados.....	29
12.1	Aislamiento de bacterias endófitas de <i>Selaginella lepidophylla</i>	29
12.2	Preservación y extracción de DNA de las bacterias endófitas.....	30
12.3	Parámetros generales para la caracterización de las bacterias endófitas	31
12.4	Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA) de las bacterias endófitas.....	38
12.5	Determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos de las bacterias endófitas.....	43
12.6	Determinación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de las bacterias endófitas.....	46
12.7	Cuantificación de los niveles de trehalosa de las bacterias endófitas	47
12.8	Candidatos para la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S	49
13.	Discusión	50
14.	Conclusiones.....	56
15.	Perspectivas	57
16.	Literatura citada.....	58
	Anexo de tabla.....	65

Índice de tablas.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la doradilla.

Tabla 2. Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

Tabla 3. Oligonucleótidos para el análisis de ERIC-PCR.

Tabla 4. Aislamientos bacterianos obtenidos de *S. lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado.

Tabla 5. Nomenclatura para la clasificación morfológica y abreviación.

Tabla 6. Aislamiento y caracterización de las bacterias endófitas de *Selaginella lepidophylla*.

Tabla 7. Aislados bacterianos relacionados con la producción de ácido indolacético (AIA).

Tabla 8. Frecuencia de los aislados bacterianos de acuerdo a sus niveles de producción de AIA.

Tabla 9. Aislados bacterianos relacionados con la solubilización de fosfato.

Tabla 10. Aislados bacterianos relacionados con la fijación biológica de nitrógeno.

Tabla 11. Aislados bacterianos relacionados con la producción de trehalosa.

Tabla 12. Aislados bacterianos para la amplificación y secuenciación del gen RNAr 16S.

Índice de figuras.

Figura 1. Imagen representativa del estrés biótico y abiótico en plantas (Tomado y modificado de Choi *et al.*, 2016).

Figura 2. Esquema de la vía de señalización para la activación de genes relacionados con la tolerancia ante el estrés biótico y abiótico en plantas (Tomado y modificado de Xu *et al.*, 2011).

Figura 3. Imagen representativa de *S. lepidophylla*. A) Aspecto hidratado. B) Aspecto deshidratado (Foto: Maria Guadalupe Castillo Texta).

Figura 4. Esquema representativo de la modulación de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos de plantas asociados a microorganismos endófitos para contener contra el estrés por sequía (Tomado y modificado de Kaushal, 2019).

Figura 5. Diagrama de activación e inhibición de las principales funciones de las fitohormonas. A) Auxinas; B) Giberelinas; C) Citoquininas; D) Etileno (Tomado de Alda, 2011; Hernández, 2018).

Figura 6. Estructura química de la α , α -trehalosa (Tomado de Elbein *et al.*, 2003).

Figura 7. Modelo de osmoprotección de la trehalosa. A) Modelo de protección de las proteínas durante la desecación. B) Modelo de protección de las membranas celulares durante la desecación (Tomada de Suárez *et al.*, 2015).

Figura 8. Rutas de biosíntesis y degradación de trehalosa en los organismos. Rutas de biosíntesis A) Vía TPS/TPP, B) Vía TS, C) Vía TreY/TreZ, D) Vía TreP y E) Vía TreT; F) Ruta de degradación de trehalosa, Vía TreH (Tomada y modificada de Avonce *et al.*, 2006).

Figura 9. Estrategia experimental.

Figura 10. Imágenes representativas del análisis de integridad de DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Muestras de DNA de los aislados bacterianos que crecieron en 1) Agar nutritivo (AN); 2) Luria Bertani (LB); 3) Peptona extracto de levadura (PY); 4) Agar papa dextrosa (PDA).

Figura 11. Amplificación de las secuencias consenso intergénicas enterobacterianas (ERIC-PCR), visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. A) ERIC-PCR de muestras en estado hidratado: De izquierda a derecha M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA); ERIC-PCR independientes 1) Agar nutritivo (AN); 2) Luria Bertani (LB); 3-4-5) Peptona extracto de levadura (PY); 6-7) Agar papa dextrosa (PDA). B) ERIC-PCR de muestras en estado deshidratado. De izquierda a derecha M: marcador de peso molecular; ERIC-PCR independientes.

Figura 12. Imagen representativa del análisis de ERIC-PCR. A) Análisis de los patrones de bandeo obtenidos mediante ERIC-PCR. B) Comparación de histogramas de los patrones para la agrupación.

Figura 13. Cuantificación de los bajos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de lluvia.

Figura 14. Cuantificación de los medianos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de lluvia.

Figura 15. Cuantificación de los altos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de lluvia.

Figura 16. Cuantificación de los bajos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de estiaje.

Figura 17. Cuantificación de los medianos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de estiaje.

Figura 18. Cuantificación de los altos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de estiaje.

Figura 19. Consumo de AIA por parte de los aislados bacterianos en ambas épocas de colecta.

Figura 20. Solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos en época de lluvia.

Figura 21. Solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos en época de estiaje.

Figura 22. Imagen representativa de la solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos en ambas épocas. Ab, *A. brasilense* Cd; aislados de la época de lluvia (121, 91, 24, 114, 11, 106, 13, 37, 5, 65, 36, 66, 43 y 46); aislados de la época de estiaje (1s, 9s, 3s, 15s, 11s, 36s, 38s, 5s, 39s y 14s).

Figura 23. Fijación biológica de nitrógeno. A) Representación de la altura del halo indicativo de FBN en el tubo de ensayo. B) FBN de los aislados bacterianos. B1) Aislados fijadores de nitrógeno de la época de lluvia. B2) Aislados fijadores de nitrógeno de la época de estiaje.

Figura 24. Cuantificación los niveles de trehalosa de los aislados bacterianos en época de lluvia.

Figura 25. Cuantificación los niveles de trehalosa de los aislados bacterianos en época de estiaje.

Índice de abreviaturas.

ABA. Ácido abscísico.

AIA. Ácido indolacético.

ANOVA. Análisis de varianza.

Al⁺³. Aluminio.

AN. Medio de cultivo agar nutritivo.

APX. Ascorbato peroxidasa.

ATPasas. Enzimas que hidrolizan ATP.

AUX. Auxinas.

BFN. Bacterias fijadoras de nitrógeno.

BPCV. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Ca²⁺. Calcio.

Ca₃(PO₄)₂. Fosfato Tricálcico.

CAT. Catalasa.

cDNA. Ácido de desoxirribonucleico complementario.

CK. Citoquininas.

CO₂. Dióxido de carbono.

DNA. Ácido de desoxirribonucleico.

DSP. Proteínas de estrés por desecación.

ELIP. Proteínas tempranas inducidas por la luz.

ERIC. Secuencias consenso intergénicas enterobacterianas (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)

ET. Etileno.

FBN. Fijación biológica de nitrógeno.

Fe⁺³. Hierro.

FT. Factores de transcripción.

GA. Giberelinas.

H₂PO₄⁻¹. Fosfato mono básico.

HPLC. Cromatografía líquida de alta eficacia.

HPO₄²⁻. Fosfato dibásico.

HSP. Proteínas de choque térmico.

InsP₃. Inositol trifosfato.

JA. Ácido jasmónico.

JP. Medio de cultivo Jain & Patriquin.

LB. Medio de cultivo Luria Bertani.

LEA. Proteínas tardías de la embriogénesis.

Mg²⁺. Magnesio.

MgSO₄. Sulfato de magnesio.

Mo. Molibdeno.

N o N₂. Nitrógeno; nitrógeno atmosférico.

NaCl. Cloruro de sodio.

NH₄⁺. Ion amonio.

NO₂⁻. Ion nitrito.

NO₂. Óxidos.

NO₃⁻. Ion nitrato.

OH. Grupo hidroxilo.

ORF. Marco de lectura abierto.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

PCV. Promoción del crecimiento vegetal.

PDA. Medio de cultivo agar papa dextrosa.

PGPR. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal ().

Pi. Fosfato inorgánico.

PK. Medio de cultivo Pikovskaya's.

POD. Peroxidasa.

PY. Medio de cultivo peptona extracto de levadura.

REP. Secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas.

Rep-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa de elementos repetitivos.

ROS. Especies reactivas de oxígeno.

RS. Reactivo de Salkowski.

RSI. Respuesta sistémica inducida.

SA. Ácido salicílico.

SOD. Superóxido dismutasa.

SP. Solubilización de fosfato.

TPP. Trehalosa-6-fosfato fosfatasa.

TPS. Trehalosa-6-fosfato sintasa.

TreH. Trehalasa.

TreP. Trehalosa fosforilasa.

TreS. Trehalosa sintasa.

TreT. Trehalosa glicosiltransferasa sintasa.

TreY. Malto-oligosil-trehalosa sintasa.

TreZ. Malto-oligosil-trehalosa hidrolasa.

Trp. Triptófano.

UDP. Uridina difosfato.

UV. Luz ultravioleta.

V. Vanadio.

RESUMEN

En el presente proyecto pretendemos estudiar y caracterizar la microbiota de *Selaginella lepidophylla* y determinar su papel en el proceso de tolerancia a la deshidratación de esta especie. Dentro de los resultados obtenidos, se ha logrado establecer el protocolo de desinfección para las plantas de *S. lepidophylla* en estado deshidratado siendo de 20% de hipoclorito de sodio y 0.1% de Tritón X-100 durante 20 minutos de lavado. Se obtuvieron 124 aislados bacterianos durante la época de lluvias (2018) y 41 aislados en época de estiaje (2019) en los diferentes medios de cultivos utilizados (Agar nutritivo; Luria Bertani; Peptona extracto de levadura; Agar papa dextrosa). Los aislados bacterianos fueron clasificados de acuerdo con su morfología y tiempo de crecimiento. Se realizó la extracción de DNA genómico, para posteriormente realizar el análisis por la técnica de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction), mediante el cual se obtuvieron 114 patrones diferentes que agruparon a 163 bacterias endófitas. Dentro de los parámetros evaluados para la caracterización de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se determinó la producción de ácido indolacético, la solubilización de fosfatos, la fijación biológica de nitrógeno y el contenido de trehalosa. Los resultados para la producción de AIA en medio de cultivo sin triptófano (Trp) solo presentó un aislado productor con 1.62 µg/ml (SIPDARi10⁻²1; 116) en época de lluvias. Para el medio de cultivo con Trp en ambas épocas se encontró productores de AIA (82.78% y 73.17% para época de lluvias y estiaje, respectivamente), los cuales se clasificaron de acuerdo con los niveles de producción de AIA (bajo, medio y alto). Se determinó que 13 aislados consumían el AIA producido a las 24h. Para la determinación de solubilización de fosfatos, para la época de lluvias se encontró un mayor número de aislados solubilizadores (57.37%) que en la época de estiaje (34.14%), fueron clasificados como (+) 1.1 a 4.1 mm, con un rango de entre 2.17 a 3.83 mm para la época de lluvias y 2.26 a 3.39 mm para la época de estiaje. Los resultados de la fijación biológica del nitrógeno mostraron que 133 aislados bacterianos (81.59%) fueron fijadoras de nitrógeno. La época de lluvias obtuvo un 81.96% (100 aislados) y la época de estiaje un 80.48% (33 aislados). Los aislados bacterianos presentaban diferentes niveles de fijación esto al ser relacionados con la intensidad del color y la altura del halo de crecimiento. Para la cuantificación de los niveles de trehalosa se tomó en cuenta a los mejores candidatos de acuerdo con los parámetros de promoción del crecimiento vegetal realizados previamente y al análisis de ERIC-PCR, siendo 97 aislados bacterianos para la época de lluvias y 22 aislados bacterianos para la época de estiaje. El medio de cultivo mínimo estaba adicionado con NaCl para inducir la producción de trehalosa por estrés salino y se cuantificó por el método de HPLC. Los aislados que presentaron producción de trehalosa para de época de lluvias fue del 88.65% (86 aislados) y para la época de estiaje del 86.36% (19 aislados).

1. Introducción

La desecación es un fenómeno que puede causar daños irreversibles a las plantas, sin embargo, algunas tienen la capacidad para contenerse contra ella como el género *Selaginella*, el cual comprende alrededor de 700 especies cosmopolitas encontradas en ambientes templados, tropicales, árticos y desérticos (Banks, 2009). Durante las últimas décadas han sido objeto de estudio debido a su capacidad para tolerar la desecación, así como para evaluar los efectos de la rehidratación en la dinámica de las enzimas, la síntesis de proteínas y los solutos presentes (Adams *et al.*, 1990; Banks 2009; VanBuren *et al.*, 2018). *Selaginella lepidophylla* llamada comúnmente “planta de resurrección”, “flor de roca”, “doradilla” o “siempre viva”, es una de las especies más estudiadas para comprender la tolerancia a la desecación, (Adams *et al.*, 1990; Iturriaga *et al.*, 2000; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005; Banks, 2009; Vargas *et al.*, 2009; VanBuren *et al.*, 2018). Su capacidad de tolerar la desecación es atribuida a la alta acumulación de trehalosa, la cual es independiente del estado fisiológico de la planta (estado hidratado y deshidratado). Sin embargo, en otras plantas tolerantes a la desecación el contenido de trehalosa es mínimo en comparación a los azúcares totales que se acumulan. Diversos trabajos han identificado genes como el *TPS1* y *TPS2* que codifican para las enzimas de biosíntesis de trehalosa en la planta de *S. lepidophylla*, sin embargo se han identificado un gran número de genes que codifican para la TPS de origen microbiano, que se aislaron a partir de un tamizado de una librería de cDNA, además cuando se cultivan en condiciones estériles *S. lepidophylla* libres de endófitos es incapaz de regenerarse, por lo que se sugiere que los altos niveles de trehalosa contenida en la planta así como el crecimiento y desarrollo normal es debido a los microorganismos endófitos (Figueroa-Soto *et al.*, 2004; Pampurova *et al.*, 2014). Los microorganismos endófitos colonizan los tejidos vegetales sin causar daño aparente y benefician a la planta hospedera por diversos mecanismos dentro de los cuales se encuentra la síntesis de ácido indolacético, la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno y la biosíntesis de trehalosa. La trehalosa es un disacárido no reductor con diversas funciones tales como fuente de carbono, energía, componente estructural, molécula reguladora y osmoprotector durante el estrés (Muller *et al.*, 1995; Elbein *et al.*, 2003; Zinniel *et al.*, 2002; Avonce *et al.*, 2006; Ramírez, 2010). Recientemente, se publicó el genoma de *S. lepidophylla* con un tamaño estimado de 109 Mb en donde registraron alrededor de 27, 204 genes, además determinaron una alta expresión de genes durante la desecación e hidratación, lo cual sugiere que la planta posee los mecanismos de protección contra la desecación (VanBuren *et al.*, 2018).

En el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos se desarrolló un protocolo para el establecimiento y obtención de plantas axénicas de *S. lepidophylla* (Calderón, 2011), en donde se observó la regeneración de plantas. No obstante, las plantas son sensibles al ser transferidas de la condición *in vitro* a maceta.

2. Marco Teórico

2.1 Estrés en plantas

El estrés ambiental restringe fuertemente al sector agrícola se estima que sólo el 10% de la superficie terrestre arable está libre de algún tipo de estrés. La plasticidad del metabolismo permite desarrollar respuestas a los cambios ambientales que fluctúan de manera regular y predecible. Por lo tanto, una variación del factor y su óptimo no necesariamente resulta en estrés (Basurto *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2018). El estrés es una restricción o fluctuaciones altamente impredecibles que ocasionan cambios en los patrones metabólicos regulares como en la fisiología, el metabolismo celular y la expresión génica, que impactarán en la tasa de crecimiento, desarrollo, productividad y adaptabilidad de la planta. El estrés, por lo tanto, se define como una condición fisiológica causada por diversos factores que tienden a alterar el equilibrio de la planta con una desviación significativa del conjunto de respuestas bioquímicas y fisiológicas que definen a un organismo bajo condiciones óptimas (Basurto *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2008; Montoliu, 2010). La tolerancia al estrés es la capacidad que presenta la planta para resistir y evitar a los estímulos ambientales negativos o poder permanecer en un estado en donde su fenotipo no se vea drásticamente perjudicado (Basurto *et al.*, 2008). La amplia gama de factores ambientales adversos se clasifica como estrés biótico y abiótico (**Figura 1**). El estrés biótico es causado por la acción de organismos vivos como los animales (herbivoría), otras plantas (competencia, alelopatía), microorganismos (hongos, bacterias) y otros agentes fitopatógenos (virus, viroides). Mientras que el estrés abiótico es causado por factores fisicoquímicos como la radiación ultravioleta (UV), concentración de dióxido de carbono (CO₂), exposición a metales pesados, déficit o exceso de nutrientes e iones y particularmente por la sequía, la salinidad y los cambios en las temperaturas (calor, frío y congelación). Estos últimos son causantes del estrés hídrico o deshidratación, ya sea que actúen de manera individual o en conjunto causan efectos negativos sobre la planta (Madhava, 2006; Covarrubias, 2007; Shao *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2013; Esquivel-Cote *et al.*, 2013; Redondo-Gómez, 2013).

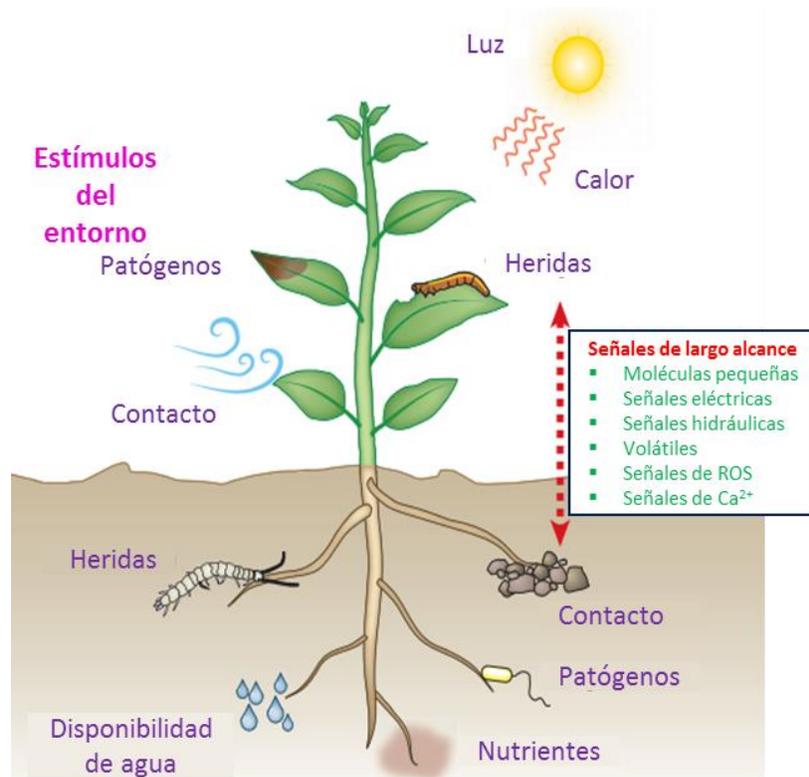


Figura 1. Imagen representativa del estrés biótico y abiótico en plantas (Tomado y modificado de Choi *et al.*, 2016).

2.1.1 Estrés abiótico

Las respuestas inducidas como defensa durante el estrés abiótico se pueden presentar a tres niveles. A nivel fisiológico (crecimiento y desarrollo) ocurre el reconocimiento de la señal en la raíz consiguiendo inhibir la germinación en semillas, senescencia prematura, se presenta pérdida en la turgencia y ajuste osmótico. Se reduce el potencial hídrico, la asimilación de nutrientes y nitrógeno, la fotosíntesis, la concentración interna y conductancia estomática del CO₂. Se produce toxicidad metabólica generando la acumulación de inhibidores de crecimiento. Ocurren alteraciones en la tasa de transpiración y respiración. A nivel bioquímico, disminuye la eficiencia fotoquímica y la RUBISCO, se acumulan metabolitos (malondialdehído monohidroascorbato, MDHA; glutationes; poliaminas; α -tocoferoles), se incrementan las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, SOD; catalasa, CAT; ascorbato peroxidasa, APX; peroxidasa, POD) reduciendo así la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). A nivel molecular se expresan genes en respuesta al estrés abiótico, incrementa la biosíntesis de ácido abscísico y proteínas específicas (proteínas tardías de la embriogénesis, LEA; proteínas de estrés por desecación, DSP; proteínas tempranas inducidas por la luz, ELIP y dehidrinas) (Madhava, 2006; Shao *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2013; Redondo-Gómez, 2013). Las respuestas fisiológicas dependerán de diversos factores como la etapa del año, la intensidad y la duración, además de factores intrínsecos de las plantas como la etapa del desarrollo, las interacciones ambientales, la especie y sus

características genéticas. Las condiciones estresantes inducirán cambios morfológicos, fisiológicos, metabólicos y de expresión genética como parte de una respuesta adaptativa para contener ante estas condiciones (Madhava, 2006; Covarrubias, 2007; Shao *et al.*, 2008). El déficit de agua afecta rápidamente los procesos fotosintéticos y de respiración. Por lo tanto, el agua es un compuesto elemental que imparte orden y estructura a las moléculas, así como en las interacciones que se lleven dentro de la célula (Basurto *et al.*, 2008).

2.1.2 Estrés hídrico

El sector agrícola es de los mayores consumidores de agua a nivel mundial, por ello se ha visto fuertemente afectado debido a las limitaciones en el uso inadecuado y escaso del recurso. Se reporta que en ciertas regiones del planeta se ha reducido 30% la disponibilidad de agua, por lo que en las últimas décadas se ha implementado el mejoramiento genético de los cultivos para hacerlos tolerantes a dichas condiciones (Madhava, 2006; Covarrubias, 2007). El estrés hídrico es ocasionado por múltiples factores como la falta de agua en el suelo y la atmósfera (sequía). La salinidad es causada por la evaporación del agua que conlleva a la acumulación de los solutos en el suelo, y por último los cambios de temperaturas (calor, frío y congelación) que limitan la disponibilidad del agua debido a sus características físicas como la evaporación por altas temperaturas y/o la formación de cristales por el congelamiento. Estos factores conducen una alta tasa de transpiración, incremento en la concentración de solutos, cambio en el volumen celular, alteraciones en la integridad de la membrana, reducción del potencial hídrico, desnaturalización de componentes fisiológicos y moleculares, cierre estomático y limitaciones en el intercambio de gases, por lo cual si es prolongado llevará a la desecación y eventualmente a la muerte de la planta. Debido a esto, la planta posee la capacidad para tolerar el estrés por medio de cambios en el metabolismo celular para originar la acumulación de solutos compatibles y proteínas específicas que pueden inducirse rápidamente durante el estrés osmótico (Madhava, 2006; Shao *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2013; Redondo-Gómez, 2013). Una respuesta efectiva ante los efectos del estrés hídrico son los cambios morfológicos que incluyen el cambio del ángulo de inclinación de las hojas, el enrollamiento, el incremento de la biomasa. Entre los cambios fisiológicos y metabólicos ocurre la disminución en la síntesis proteica y la velocidad de crecimiento, el aumento de cera en la cubierta de las hojas (cutícula), el cierre estomático, la disminución de la turgencia, cambios en la transpiración, respiración, fotosíntesis y en la distribución de nutrientes. La expresión genética conlleva a la formación de compuestos para la reparación y protección celular denominados solutos compatibles como los polioles (sorbitol o manitol), aminoácidos (prolina, ácido glutámico), compuestos de amonio cuaternario (glicina betaína) y disacáridos (sacarosa y trehalosa) que se encargan de mantener la integridad y funcionalidad de la célula (Madhava, 2006; Covarrubias, 2007; Verma *et al.*, 2013; Redondo-Gómez, 2013; Castillo-Texta, 2018).

2.1.3 Salinidad

Particularmente durante el estrés salino se presentan estrategias específicas debido a la acumulación de sales como el cloruro de sodio, carbonato de sodio, sulfato de sodio o sales

de magnesio y otras sustancias. El efecto de la salinidad en plantas es complejo y sus efectos adversos incluyen toxicidad iónica, desequilibrio, déficit de agua y nutrientes. La tolerancia ante la salinidad está relacionada con la homeostasis iónica, algunas estrategias son la exclusión de sales, un mecanismo que limita la acumulación de sales en los tejidos y se debe a la capacidad de regular su absorción y transporte. Un ejemplo de excluidor de sales son las estructuras epidérmicas especializadas encontradas en la superficie foliar, denominados tricomas. La compartimentalización de iones se lleva a cabo mediante la acumulación de sales en la vacuola debido a la translocación por medio del transporte antiporte con el fin de evitar la deshidratación y mantener el equilibrio osmótico (Madhava, 2006; Redondo-Gómez, 2013; Castillo-Texta, 2018).

2.1.4 Cambios de temperatura

Durante el estrés térmico el cual se encuentra relacionado con las características fisicoquímicas del agua, Redondo-Gómez en el 2013 clasificó de manera general algunas estrategias de las plantas para contender contra el estrés como los cambios anatómicos en el tamaño celular y engrosamiento de las hojas debido a la acumulación de solutos compatibles, iones y azúcares; cambios fisiológicos para minimizar la pérdida de agua como el cierre de estomas; y cambios moleculares como la síntesis de proteínas que ayudan a la protección y reparación celular (proteínas de choque térmico, HSP; LEA; ELIP). Estos cambios son regulados gracias a la participación de un gran número de moléculas y diversas redes de señalización que se encargan de promover la respuesta de defensa en la planta (Madhava, 2006; Redondo-Gómez, 2013; Castillo-Texta, 2018).

3. Vías de transducción de señales en respuesta al estrés en plantas

Las plantas al ser organismos sésiles se encuentran constantemente expuestas a diferentes condiciones de estrés las cuales afectan su crecimiento, desarrollo y productividad. El estrés ocurre de manera simultánea causado por múltiples factores de tal manera que la planta debe activar diversas respuestas e integrarlas para responder al estrés. Por ello, han desarrollado mecanismos moleculares únicos y sofisticados para hacer frente a estas condiciones. La tolerancia y aclimatación varía de acuerdo con la especie por lo que deben alternar su fisiología, morfología, metabolismo y expresión génica para contrarrestar los efectos del estrés (Madhava, 2006; Verma *et al.*, 2013; Redondo-Gómez, 2013). Estos mecanismos son conocidos como vías de transducción de las señales en donde participan un gran número de moléculas. Comienza con la percepción del estímulo externo por medio de receptores específicos situados en la membrana plasmática, durante los eventos de señalización se generan moléculas que tendrán la función de amplificar la señal denominados segundos mensajeros como el inositol trifosfato (InsP₃), enzimas que hidrolizan ATP (ATPasas), factores de transcripción (FT), especies reactivas de oxígeno (ROS), calcio (Ca²⁺), fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), entre otros. Con la participación de las cascada o rutas de señalización habrá proteínas encargadas de modificar a enzimas o proteínas por medio de la fosforilación o desfosforilación (proteínas cinasas y fosfatasa, respectivamente) que llevan la señal hasta el núcleo en donde regulan la activación o represión de genes para dar una respuesta de tolerancia al estrés (**Figura 2**) (Madhava, 2006; Covarrubias, 2007; Montoliu, 2010).

Además, se ha estudiado que la intervención de ciertos microorganismos presentan un papel importante dentro de las estrategias para contener el estrés (Esquivel-Cote *et al.*, 2013).

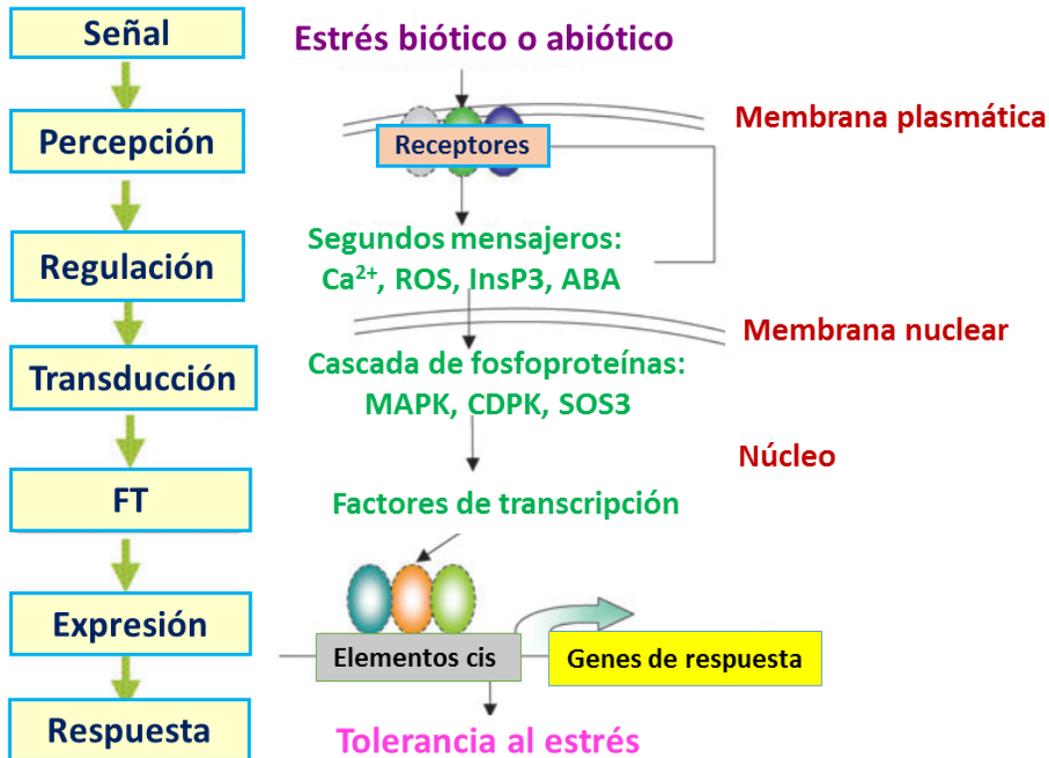


Figura 2. Esquema de la vía de señalización para la activación de genes relacionados con la tolerancia ante el estrés biótico y abiótico en plantas (Tomado y modificado de Xu *et al.*, 2011).

4. Género *Selaginella*

La clase Lycophyta alberga tres familias, las Lycopodiaceae, Isoeteaceae y Selaginellaceae, de esta última familia actualmente solo se reconoce el género *Selaginella* pertenecientes a un grupo monofilético asociada a los monilofitos (helechos, *Equisteum* y *Psilotum*) y plantas con semilla (gimnosperma y angiosperma). Son plantas cosmopolitas con microfílas, rizóforos y esporangios axiales que alberga alrededor de 700 especies incluidas las de climas desérticos, templados, tropicales y árticos capaces de tolerar condiciones de sequía y heladas (Banks, 2009). Son las plantas vasculares más antiguas en la tierra que datan del final del Silúrico y Devónico temprano. Durante el Devónico – Carbonífero medio ocurrió una expansión en la población de licofitas que contribuyó a la disminución del CO₂ atmosférico, durante la época del Paleozoico la asimilación de dicho compuesto se relacionó con el gran tamaño que presentaban las plantas de esa época. Se tienen registros fósiles de *Selaginella* que datan de hace 333 a 350 millones de años los cuales presentan grandes similitudes morfológicas con las actuales (Banks, 2009; VanBuren *et al.*, 2018). Se sugiere que uno de los primeros mecanismos de protección de las plantas ancestrales durante la transición del hábitat acuático al terrestre fue la capacidad para tolerar períodos de desecación y el bajo potencial hídrico atmosférico. Dicha adaptación ha prevalecido en el transcurso de los años, algunas plantas sobreviven cerca de la anhidrobiosis con menos de 10% del contenido

relativo de agua durante la sequía prolongada. Cabe mencionar que los mecanismos de las angiospermas evolucionaron a partir de la dispersión de semillas y/o polen (VanBuren *et al.*, 2018). Los análisis filogenéticos determinaron que el género *Selaginella* presenta una mayor tasa de evolución en comparación a las angiospermas, debido a que la tolerancia ante la desecación se encuentra más marcada en plantas sin semilla (musgos, helechos y licofitas), mientras que en las angiospermas es relativamente inusual. Sin embargo, los estudios acerca de los genomas de plantas de resurrección han sido la base molecular para poder comprender el origen de esta adaptación (Brighigna *et al.*, 2002; Banks, 2009; VanBuren *et al.*, 2018). *Selaginella* es el único clado de plantas terrestres que no presenta un evento de duplicación en su genoma completo, pero sí presenta pequeñas duplicaciones en tándem en los genes que confieren tolerancia a la desecación (VanBuren *et al.*, 2018). Al igual que otras plantas *Selaginella* sintetiza metabolitos secundarios para proporcionar protección contra los rayos UV, defensa contra patógenos, produce lignina para proporcionar rigidez a la pared celular protegiéndose del ataque contra herbívoros y patógenos. Algunas especies de este género son empleados en la medicina tradicional, por ejemplo, en China es una hierba popular usada para curar los dolores de cabeza y musculares; *S. bryopteris* conocida comúnmente como Sanjeevani es utilizada en la India para curar prácticamente todo inclusive revertir la muerte. En Colombia, *S. articulata* se emplea para tratar las mordeduras de serpientes y neutralizar el veneno de *Bothrops atrox*. Debido a estos reportes anecdóticos los investigadores se han encargado de identificar y caracterizar los compuestos activos de los extractos de *Selaginella*, entre los que se encuentran los uncinósidos A y B, y los biflavonoides los cuales son potentes antivirales contra el virus sincicial respiratorio (RSV), *S. moellendorffii* presenta el compuesto biflavonoide ginkgetina que se encarga de inhibir selectivamente el desarrollo de células cancerígenas al inducir la apoptosis. *S. tamariscina* inhiben la inducción del ácido nítrico y prostaglandinas implicadas en la patogénesis de algunos cánceres (Banks, 2009). Durante las últimas décadas han tenido gran relevancia cinco especies del género *Selaginella* (*S. tamariscina*, *S. sartorii*, *S. bryopteris*, *S. notohybrida* y *S. lepidophylla*) que han sido objeto de estudio debido a su capacidad evolutiva para tolerar la desecación durante períodos prolongados, así como para evaluar los efectos de la rehidratación en la dinámica de las enzimas, la síntesis de proteínas y los solutos presentes durante la desecación. Se ha sugerido que dicha tolerancia se debe a la compleja estructura celular que mantiene la integridad del material contenido en la célula (Adams *et al.*, 1990; Banks 2009; VanBuren *et al.*, 2018).

4.1 *Selaginella lepidophylla*

4.1.1 Generalidades de la planta

Selaginella lepidophylla conocida comúnmente como “planta de resurrección”, “doradilla”, “flor de roca”, “siempre viva” o “rosa de Jericó”, es una licofita perteneciente al género *Selaginella* (**Tabla 1**). Fue la primera planta vascular reportada en la literatura científica con la capacidad de sobrevivir a la pérdida de hasta el 95% del contenido de agua y de la pérdida de humedad del 0 – 50% durante largos períodos, posteriormente se reportaron otras plantas de resurrección (Adams *et al.*, 1990; Iturriaga *et al.*, 2000; Brighigna *et al.*, 2002; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005; Banks, 2009; Vargas *et al.*, 2009; VanBuren *et al.*, 2018). Esta especie

se encuentra filogenéticamente en los primeros linajes divergentes de las plantas vasculares, además de presentar similitudes morfológicas ancestrales (VanBuren *et al.*, 2018).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la doradilla.

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Lycophyta
Orden	Selaginetales
Familia	Selaginellaceae
Género	<i>Selaginella</i>
Especie	<i>Selaginella lepidophylla</i>

Su distribución en México abarca los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Zacatecas (Iturriaga *et al.*, 2000; Brighigna *et al.*, 2002; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005; Banks, 2009; Vargas *et al.*, 2009). Son consideradas especies xerófitas debido a la capacidad para sobrevivir largos períodos de sequía (Adams *et al.*, 1990). La apariencia de las plantas en estado deshidratado (**Figura 3A**), las micrófilas se curvan formando una esfera de color marrón de un tamaño de 6 – 10 cm de diámetro, una vez que la planta vuelve a ser hidratada se expanden las micrófilas formando una roseta y vira a un color verde para reanudar el crecimiento normal (**Figura 3B**). No presenta flores, ni tallos y su desarrollo radicular es simple, su patrón de ramificación de brotes y raíces depende del meristemo apical, el cual se va bifurcando para dar dos nuevos ápices y cada bifurcación forma una “Y”. La disposición de las micrófilas y la simetría de rodaje se clasifican como anisófila o isófila. Su reproducción es por medio de esporas conservado la generación del gametofito independiente del agua, son plantas del tipo homoclorofílicas debido a que retienen su clorofila durante la desecación. Sus requerimientos son sumamente básicos con suelos drenados, poca agua y exposición constante al sol (Iturriaga *et al.*, 2000; Brighigna *et al.*, 2002; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005; Banks, 2009; Vargas *et al.*, 2009). Es una planta empleada en la medicina tradicional por medio de infusiones para el tratamiento de cálculos biliares, dolor de riñón, infecciones en el tracto urinario y diuréticos (Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005).

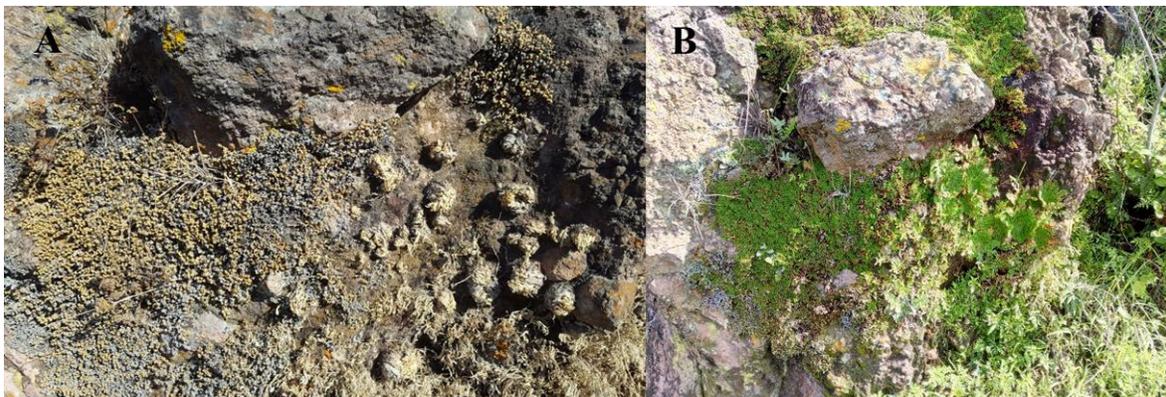


Figura 3. Imagen representativa de *Selaginella lepidophylla*. A) Aspecto deshidratado. B) Aspecto hidratado (Foto: Maria Guadalupe Castillo Texta).

4.1.2 Genómica y transcriptómica

Recientemente VanBuren y colaboradores (2018) reportaron la secuencia completa del genoma de *S. lepidophylla* con un tamaño estimado de 109 Mb, identificando 27, 204 genes de un conjunto haploide deducido de 89 Mb. En ausencia de duplicación de genomas completos los nuevos rasgos y adaptaciones surgen a través de duplicaciones locales o segmentos de genes. Reportan que los cambios en la expresión génica durante la desecación (77% de los genes; 21, 062) tienen expresión detectable en las micrófilas lo que implica una fuerte protección. El análisis de expresión génica a nivel del RNAm en estado hidratado y deshidratado generó 38 categorías agrupadas en tres patrones, 1) alta expresión en tejidos desecados seguidos de una disminución en la rehidratación (generalmente son duplicaciones de genes en tándem asociados a la protección celular y acumulación de osmoprotectores), 2) aumento en la expresión durante la hidratación asociados con la reparación del DNA, respuesta oxidativa y estrés hídrico, y 3) expresión constante en ambas etapas. La duplicación de genes ayuda a la innovación evolutiva y las duplicaciones de genes en tándem ayuda para la evolución adaptativa en entornos dinámicos. El cruce desigual de haplotipos y las duplicaciones genéticas mediadas por los LTR ayudan en la generación de nuevos genes para facilitar la evolución adaptativa. Por lo tanto, el contenido de genes específicos de haplotipos puede complementar la diversidad perdida en ausencia de duplicación del genoma completo. Las ELIP protegen al aparato fotosintético contra el daño fotooxidativo y otros tipos de estrés abiótico. *S. lepidophylla* presenta 23 ELIP expresadas durante la desecación y asociadas a genes relacionados a proteínas HSP, enzimas reparadoras de DNA, oleosinas y LEAs, siendo mayor que en plantas terrestres. Las proteínas LEA funcionan en la estabilidad de la membrana, protección macromolecular con roles en el desarrollo de las semillas, respuesta al estrés abiótico y tolerancia a la desecación. *S. lepidophylla* presenta una mayor cantidad de proteínas LEA en comparación de *S. moellendorffii* (65 y 36, respectivamente) que se encuentran altamente expresadas durante la desecación, rehidratación e hidratación con cambios significativos en la expresión lo que sugiere que estén asociados a mecanismos de protección constitutivos similares a los osmoprotectores (VanBuren *et al.*, 2018).

5. Microorganismos endófitos

La palabra endófito proviene del griego *endon*, que significa dentro y *phyte*, que significa planta. Este término se refiere a aquellos microorganismos que colonizan espacios intracelulares y vasculares de los tejidos vegetales, no tienen un efecto perjudicial pero sí algún beneficio en la planta. Esta definición diferencia entre los endófitos patógenos y los simbióticos (Zinniel *et al.*, 2002; Ramírez, 2010). Los endófitos pueden ingresar principalmente a través de la raíz, por las partes aéreas como flores, tallos, hojas y cotiledones. Específicamente, las bacterias ingresan por la radícula, estomas o por alguna herida de la planta. Las bacterias endófitas son encontradas incluso en semillas y pueden colonizar a las plantas. Una vez dentro se localizan en el punto de entrada o se extienden, su distribución en la planta es mayor en raíces, disminuyendo en tallos y hojas. Las variaciones en las poblaciones endófitas nativas e introducidas dependerán de la fuente de nutrición,

edad de la planta, tipo de tejido y el muestreo (Zinniel *et al.*, 2002; Rives *et al.*, 2007; Ramírez, 2010; Moreno *et al.*, 2018). Las plantas son excelentes hábitats microbianos, principalmente las raíces (rizósfera) debido a que desarrollan un ambiente húmedo poco variable con disponibilidad abundante de nutrientes. Los exudados radicales (mucigel) formados por azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos constituyen el 40% de los fotosintatos de la planta, propiciando un medio selectivo para las poblaciones microbianas heterótrofas que establecerán interacciones con la planta de tipo benéficas, perjudiciales y neutrales (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Ahman *et al.*, 2006; Rives *et al.*, 2007; Ramírez, 2010). Anteriormente las bacterias endófitas eran consideradas patógenos latentes, pero actualmente se ha demostrado que pueden tener dos efectos fundamentales. El primero efecto es el incremento en la capacidad para absorber nutrientes debido al crecimiento y desarrollo de las raíces por medio de la producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, asimilación de nutrientes, remoción de contaminantes y fijación de nitrógeno. El segundo efecto es la contribución como control biológico a través de la producción de agentes antifúngicos o antibacteriales, sideróforos o de inmunidad (Ahman *et al.*, 2006; Ramírez, 2010; Moreno *et al.*, 2018). La rizósfera es un ambiente dinámico en donde existe un gran conjunto de interacciones entre el suelo, raíces y microorganismos que conllevan a la estabilidad y rendimiento de la planta de esta manera la relación planta – microorganismo puede contribuir a un desarrollo biotecnológico (Pedraza *et al.*, 2010). Por ende, presenta una gran diversidad bacteriana ocasionando una alta competencia por los recursos y en consecuencia la limitación del mismo. Lo que sugiere que las bacterias endófitas pueden tener algunas ventajas competitivas sobre otras bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de los nutrientes es mayor dentro de la planta y el número de endófitos es menor, además de presentar mayor protección a las condiciones adversas del entorno (Rives *et al.*, 2007; Ramírez, 2010).

5.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Los fertilizantes químicos son empleados como sustituyentes de nutrientes para las plantas debido a la escasez en el suelo (Majeed *et al.*, 2015; Sánchez-Cruz *et al.*, 2019). Sin embargo, los costos, la disponibilidad y los impactos ambientales negativos son fuertes limitantes para su empleo. Una estrategia ideal es el empleo de microorganismos que satisfagan las necesidades de la misma manera que los biofertilizantes. Kloepper, 1993 define a estos microorganismos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) o actualmente llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Majeed *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2018; Sánchez-Cruz *et al.*, 2019). Las BPCV son un grupo heterogéneo de bacterias de vida libre que se encuentran en el suelo capaces de sobrevivir y colonizar la rizósfera de la planta para potencializar el crecimiento, desarrollo y rendimiento (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Ahman *et al.*, 2006; Rives *et al.*, 2007; Abbasi *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2013; Majeed *et al.*, 2015). Presentan mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal (PCV) directo o indirecto. Los mecanismos de acción con efecto directo implican la interacción planta – microorganismo como la síntesis de sustancias estimulantes del crecimiento (fitohormonas) como el ácido indolacético (AIA), citoquininas (CK) y giberelinas (GA). La asimilación y absorción de nutrientes incluyen la capacidad para

producir o cambiar la concentración de reguladores de crecimiento y la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Solubilizan fosfatos inorgánicos, minerales y otros nutrientes. Son antagonistas de fitopatógenos debido a la producción de sideróforos, compuestos antifúngicos y antibacterianos (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Ahman *et al.*, 2006; Rives *et al.*, 2007; Ramírez, 2010; Abbasi *et al.*, 2011; Esquivel-Cote *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2013; Majeed *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2018). Los efectos indirectos son en relación al control biológico, implicando la interacción del microorganismo de interés con un fitopatógeno para disminuir o prevenir los efectos perjudiciales por medio de la competencia de nicho ecológico o sustrato, síntesis de compuestos químicos como inhibidores de sideróforos, sustancias antimicrobianas, enzimas líticas, detoxificadoras, así como la resistencia sistémica inducida (RSI). Esta última induce la resistencia de tejidos sistémicos al ataque por fitopatógenos mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles (JA, SA, ET) que participan en la protección de las plantas (**Figura 4**) (Ahman *et al.*, 2006; Rives *et al.*, 2007; Abbasi *et al.*, 2011; Esquivel-Cote *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2018; Kaushal, 2019). De manera indirecta las BPCV promueven el crecimiento de las plantas al afectar la fijación simbiótica del N₂, la nodulación o la ocupación de nódulos (Ahman *et al.*, 2006; Rives *et al.*, 2007).

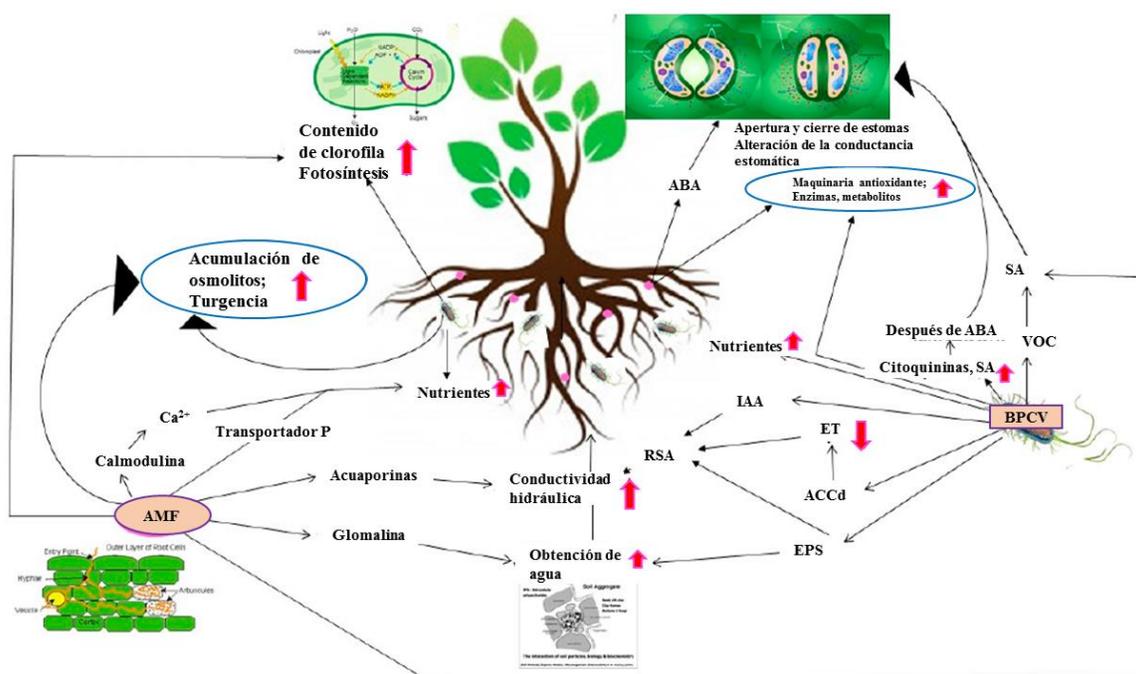


Figura 4. Esquema representativo de la modulación de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos de plantas asociados a microorganismos endófitos para contener contra el estrés por sequía (Tomado y modificado de Kaushal, 2019).

5.2 Producción de fitohormonas

Una hormona vegetal o fitohormona es una sustancia que regula un sinnúmero de procesos asociados al crecimiento y desarrollo de las plantas. Puede actuar a diferentes niveles (celular

y tisular), son productos de cascadas de señalización debido a su función como mensajero químico pueden interactuar de manera individual o en conjunto para amplificar la respuesta del estímulo (Rives *et al.*, 2007; Escaso *et al.*, 2010; Ramírez, 2010). Las BPCV promueven la síntesis de cinco fitohormonas fundamentales las auxinas (AUX), giberelinas (GA), citoquininas (CK), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA) (**Figura 5**). La fitoestimulación se lleva a partir de la manipulación de la compleja red de señalización de las hormonas, de compuestos con acción en el crecimiento o estimulación de la formación de raíces (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Rives *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2018). Las primeras fitohormonas descubiertas fueron las AUX encargadas de la división, crecimiento y diferenciación celular. Regulan la elongación del tallo, dominancia apical (inhibición del crecimiento de las yemas laterales frente a la yema apical), organización de las hojas (filotaxia), iniciación de la raíz, desarrollo del meristemo, flores, frutos y los tropismos (fototropismo y gravitropismo). Su mejor representante es el ácido indolacético (AIA), la biosíntesis se asocia con tejidos en división, especialmente los meristemos apicales del vástago y las hojas jóvenes, aunque prácticamente todos los tejidos producen ciertos niveles. Existen múltiples rutas de síntesis y degradación de AIA, siendo precursores el triptófano e indol-3-glicerol fosfato procedente del ácido corísmico, lo que hace prácticamente imposible que la planta carezca de esta hormona. Se almacena de forma conjugada con compuestos de alto y bajo peso molecular, algo relevante para su función en la semilla y los órganos de reserva teniendo un papel en el control de los niveles de AUX libres (Rives *et al.*, 2007; Escaso *et al.*, 2010; Ramírez, 2010). Las GA fueron el segundo grupo de hormonas en caracterizarse, la mayoría son precursores o productos de degradación de las que sí presentan actividad. Su acción es sobre la elongación del tallo, la germinación, el desarrollo de las anteras, flores y frutos, crecimiento del tubo polínico. La síntesis depende del desarrollo y el entorno, se producen de la ruta de síntesis de terpenoides que se utilizan como monómeros para construir el anillo final. El proceso final se realiza en tres etapas y en compartimentos celulares diferentes (plastos, retículo endoplásmico y citosol), siendo fuertemente regulado por procesos de retroalimentación positiva y negativa (Rives *et al.*, 2007; Escaso *et al.*, 2010; Ramírez, 2010). Las CK se descubrieron al buscar factores relacionados con la división de células vegetales. Tienen diversos efectos a nivel fisiológico participa en procesos como la senescencia, movilización de nutrientes, dominancia apical, formación y actividad de los meristemos apicales del tallo, desarrollo de la flor, ruptura de la dormición de las yemas o la germinación. Además, parece que intervienen en distintos aspectos del desarrollo regulados por la luz como la diferenciación de cloroplastos, desarrollo del metabolismo autótrofo o la expansión de la hoja y el cotiledón. El papel central de las CK y AUX es la influencia en la división celular y reparación de heridas, por ello son las únicas hormonas imprescindibles. Entre los principales lugares de síntesis se encuentran los meristemos apicales de la raíz donde se distribuyen a través del xilema hacia el tallo. En la regulación de su síntesis participa la AUX controlando la expresión de ciertos genes de enzimas que participan en la ruta de síntesis de CK, pero también hay otras formas de control como la conjugación con distintos compuestos o la degradación en las células del tejido diana (Rives *et al.*, 2007; Escaso *et al.*, 2010; Ramírez, 2010). El ET es una hormona de naturaleza gaseosa sintetizada en toda la planta, pero su concentración depende de la etapa de desarrollo y tejido vegetal. Se encuentra principalmente

durante la germinación, crecimiento (expansión y diferenciación celular), maduración del fruto, abscisión de la hoja y senescencia de la flor. Cualquier herida puede inducir su biosíntesis, al igual que la inundación, enfermedad o sequía. Este compuesto es sintetizado a partir del aminoácido llamado metionina por medio de una ruta cíclica, posteriormente se libera de los tejidos vegetales en donde fue sintetizado para difundirse a través de los espacios intercelulares y la zona externa del tejido (Rives *et al.*, 2007; Escaso *et al.*, 2010; Ramírez, 2010). El crecimiento y desarrollo de las plantas vendrá controlado por diversos reguladores positivos y negativos. Un ejemplo de ello es la latencia de yemas y semillas, la planta tiene la capacidad de evaluar si se presentan las condiciones favorables para su desarrollo, esto se debe a un compuesto denominado ABA. ABA es el encargado de la regulación del crecimiento, maduración de semillas, dormición y apertura de estomas, especialmente en situaciones de estrés y en algunos casos participa en la senescencia. La síntesis de ABA se produce solamente en los tejidos vegetales que presentan cloroplastos o amiloplastos y su contenido es altamente variable dependiendo del tejido y la etapa del desarrollo, su distribución a través de los tejidos vasculares (xilema y floema) presentándose en mayor contenido en la savia floemática (Rives *et al.*, 2007; Escaso *et al.*, 2010; Ramírez, 2010).

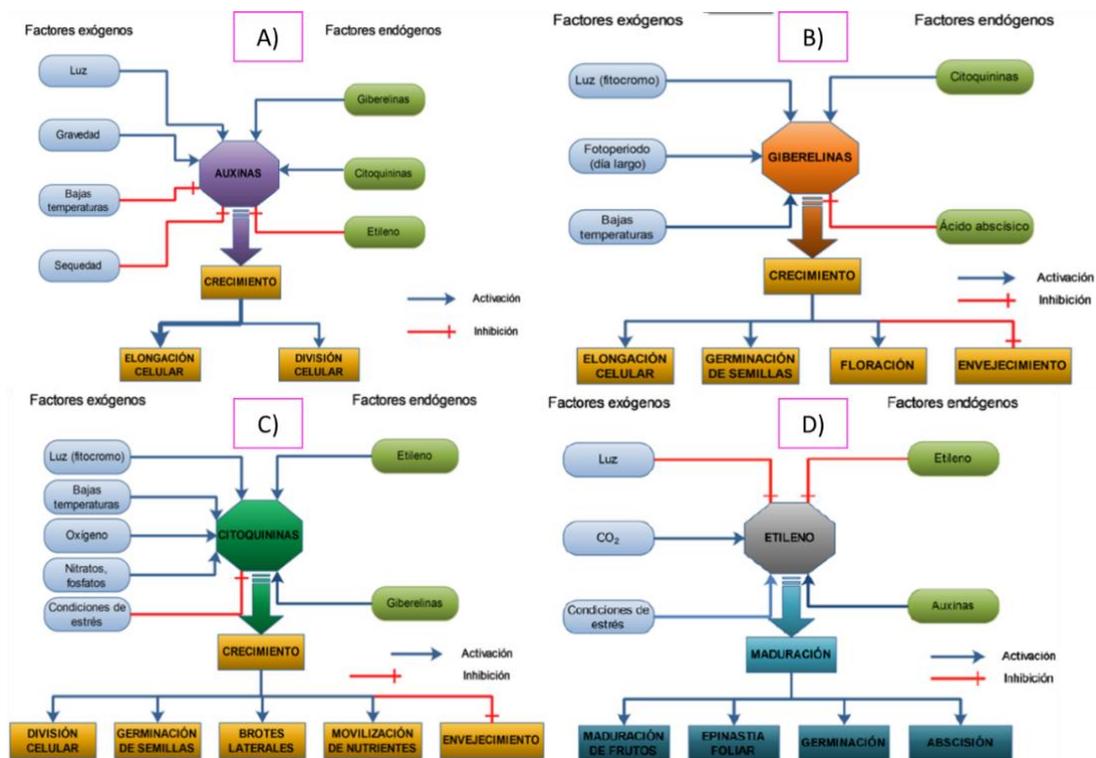


Figura 5. Diagrama de activación e inhibición de las principales funciones de las fitohormonas. A) Auxinas; B) Giberelinas; C) Citoquininas; D) Etileno (Tomado de Alda, 2011; Hernández, 2018).

5.3 Géneros microbianos de interés agrícola

En la actualidad se ha buscado identificar puntos específicos para el manejo de los cultivos para aumentar el rendimiento y disminuir el empleo de agroquímicos, además de considerar

el alto costo en los insumos agrícolas cuyos efectos en el ambiente son perjudiciales debido al uso excesivo e inadecuado, lo que ha generado una disminución en la fertilidad del suelo y su contaminación. Uno de los principales objetivos es cesar los daños perjudiciales mediante el empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal que formen asociaciones simbióticas entre las plantas que conlleven a beneficios mutuos (Pedraza *et al.*, 2010; Hassan, 2017). Para ello, se plantea el estudio de la diversidad genética y bioquímica de los microorganismos, así como la caracterización de BPCV con relación a los parámetros de la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, aporte de nutrientes, producción de fitohormonas y de sustancias capaces de captar hierro (sideróforos). Sin embargo, estas características dependerán del tipo de planta y suelo (Pedraza *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2013; Hassan, 2017). La rizósfera es un punto estratégico para los cultivos debido a la concentración de la actividad metabólica dada entre el intercambio de nutrientes de la atmósfera y el suelo, en donde la diversidad microbiana juega un papel importante debido a su participación en la captación de nutrientes y mineralización de materia orgánica. El funcionamiento óptimo del suelo no solo depende de su composición química, sino también de la amplia diversidad microbiana lo cual ayuda a sustentar la productividad vegetal y animal, mantiene y mejora la calidad del agua, el aire, el ciclo de nutrientes y contribuye en la sanidad humana (Pedraza *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2013). La presencia de un sinnúmero de microorganismos no forzosamente indica que participen en la dinámica benéfica de la planta, ya que depende del estado fisiológico, la actividad enzimática, la concentración y la disponibilidad de los recursos. Por ejemplo, la FBN depende exhaustivamente de microorganismos como rizobacterias simbióticas (*Rhizobium* spp.) u otras de vida libre (*Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp.) que han sido ampliamente estudiadas debido a la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico que se encuentra de forma ilimitada para poder ser asimilada por otros organismos del suelo y las plantas. Dicha capacidad representa un alto costo energético, pero resulta en una gran ventaja competitiva, especialmente cuando se encuentran en suelos escasos de compuestos oxidados o reducidos de nitrógeno (Pedraza *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2013). Diversos géneros poseen la capacidad de PCV destacándose *Beijerinckia*, *Derxia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Serratia* (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Ahman *et al.*, 2006; Rives *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2018). En la **Tabla 2** se muestran algunos representantes de BPCV utilizadas para el mejoramiento de los cultivos agrícolas.

Tabla 2. Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

Bacteria	Cultivo	Actividad	Referencia
<i>Pseudomonas</i> spp.	Diferentes cultivos.	Mayor capacidad competitiva de nutrientes, producción de antibióticos, sideróforos y RSI. Solubilización de fosfatos por su capacidad de producir ácidos orgánicos (ácido oxálico, fumárico y cítrico) y enzimas fosfatasa. Biocontrol.	Dowling y O'Gara, 1994; Ferraris y Couretot, 2004; Moreno <i>et al.</i> , 2018.
<i>Azotobacter chroococcum</i> .	Algodón, gramíneas, hortalizas.	Producto comercial: biofertilizante.	Monibac®; Moreno <i>et al.</i> , 2018.

<i>Azospirillum.</i>	Maíz, trigo, soja, caña de azúcar.	Producto comercial: biofertilizante. Biocontrol. Fitohormonas.	Masterfix gramínea; Moreno <i>et al.</i> , 2018.
<i>Rhizobium</i> spp.	<i>Lactuca sativa</i> L. (Lechuga).	Aumento de crecimiento debido a la producción de AIA (desarrollo radicular o vegetativo y producción de frutos).	Peña y Reyes 2007; Moreno <i>et al.</i> , 2018.
<i>Bacillus</i> spp., <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. cereus</i> .	<i>B. Capsicum annuum</i> L. (Chile), tomate y pimiento, <i>Pennisetum clandestinum</i> , <i>Teucrium polium</i> , maíz.	Aumento de la germinación, peso, tamaño y frutos debido a la producción de AIA y solubilización de fosfatos. Los ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de micronutrientes (Fe) estimulando la producción de sideróforos (biocontrol). Actividad enzimática (amilasa, celulasa, pectinasa, proteasas), ACC deaminasa lo cual reduce la síntesis de ET y por lo tanto genera tolerancia a sequía, salinidad, presencia de metales pesados y anegación.	Datta <i>et al.</i> , 2011; Luna <i>et al.</i> , 2013; Sánchez <i>et al.</i> , 2016; Hassan, 2017; Moreno <i>et al.</i> , 2018.

6. Interacción planta – microorganismo

La interacción planta – bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) puede ser un tanto inestable, la variabilidad de rendimiento estará sujeta a diversos factores ambientales (clima, características del suelo, composición o actividad microbiana nativa del suelo) que afectarán el crecimiento y su efecto en la planta. Por ello, es fundamental conocer los efectos en las plantas y si se ven alterados por los factores ambientales, así como la presencia de otros microorganismos (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Ahman *et al.*, 2006). La asociación de las plantas con bacterias endófitas puede ser de tipo mutualista, simbiótico o perjudicial. En las últimas décadas han sido de interés debido a las asociaciones con una gran cantidad de plantas a las que les provee beneficios y por ello pueden ser empleadas como agentes bioestimulantes (Ramírez, 2010).

7. Trehalosa

Los organismos poseen la capacidad para contender a los cambios ambientales tales como la sequía, la salinidad y las temperaturas extremas. Esta capacidad puede estar sujeta a cambios metabólicos para tener una actividad enzimática y estabilidad de la membrana óptimas, o por medio de la adaptación drástica que lleva a desarrollar vías de biosíntesis de solutos compatibles como los compuestos osmóticos, crioprotectores o termoprotectores encargados de reemplazar a las moléculas de agua para preservar la integridad estructural y funcional de las membranas y proteínas. Algunos de los compuestos sintetizados son los polioles o alcoholes de azúcar (manitol y sorbitol), aminoácidos (prolina y ácido glutámico), sales de amonio cuaternario (glicina betaína) y disacáridos (sacarosa y trehalosa) (Adams *et al.*, 1990; Avonce *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2009; Secks *et al.*, 2009). El proceso de desecación es común en las estructuras reproductivas de plantas como en los granos de polen, las esporas

y las semillas. Sin embargo, encontrar plantas completamente deshidratadas no es muy común a menos que presenten la capacidad de sobrevivir a la deshidratación, para ello deben proteger las estructuras celulares y llevar a cabo el proceso de reparación celular durante la hidratación (Figuroa-Soto *et al.*, 2004). La trehalosa (α , α -trehalosa o α -D-glucopiranosil-1, 1- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor constituido por dos unidades de glucosa unidas por un enlace α , α -1,1-glicosídico, debido a la conexión de los dos extremos reductores de los residuos de glucosa se anula su poder reductor (**Figura 6**). A pesar de que se presentan tres posibles anómeros de trehalosa (α , β -1,1-; β , β -1,1- y α , α -1,1) solo la forma α , α -trehalosa se ha aislado y sintetizado en organismos vivos (Muller *et al.*, 1995; Elbein *et al.*, 2003; Figuroa-Soto *et al.*, 2004; Escobedo *et al.*, 2004; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Avonce *et al.*, 2006; Pampurova *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2015).

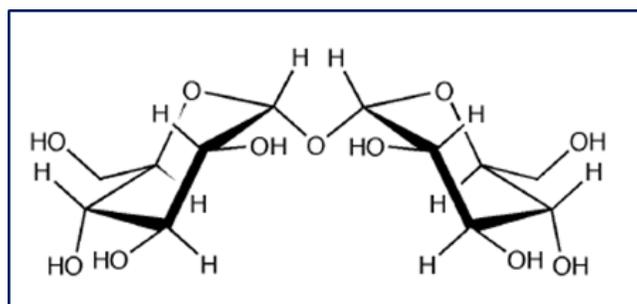


Figura 6. Estructura química de la α , α -trehalosa (Tomado de Elbein *et al.*, 2003).

El nombre de trehalosa se otorgó por el químico Marcellin P.E. Berthelot, que al estudiar las larvas del escarabajo *Larinus maculata Gyllenhal*, cuyo nombre común es “trehala” encontró a dicho azúcar (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2015). Se creía que solo los organismos extremófilos y criptobióticos lo presentaban, pero su presencia está ampliamente distribuida en los diversos dominios como en hongos y levaduras durante la esporulación, cuerpos fructíferos y células vegetativas (Avonce *et al.*, 2006). En líquenes y algas, pero en concentraciones más bajas en comparación a las levaduras. En bacterias como micobacterias y corinebacterias forma parte de la pared celular. En el reino animal fue descubierta en la hemolinfa de insectos, larvas y pupas. En insectos adultos se emplea en las actividades que requieren energía como el vuelo, lo que indica su papel como fuente de energía. En organismos anhidrobióticos donde pierden del 85 – 95% del contenido de agua ayuda a sobrevivir en los períodos de desecación o condiciones extremas, para posteriormente recuperarse sin daño colateral (anhidrobiosis o criptobiosis). Se presenta en plantas de resurrección (*S. lepidophylla*, *Sporobolus atrovirens* y *Myrothammus flabellifolius*) en donde ayuda ante el estrés por sequía, se creía que en plantas superiores no se presentaba la síntesis y acumulación de trehalosa pero gracias a la secuenciación de genomas se ha comprobado que la mayoría de las plantas presentan los genes de síntesis de trehalosa, lo que sugiere su participación en los procesos de crecimiento, desarrollo, señalización y en respuesta al estrés (Muller *et al.*, 1995; Iturriaga *et al.*, 2000; Elbein *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2009; Pampurova *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2015). Los niveles de trehalosa dependen de la edad de la célula, etapa de crecimiento, estado nutricional y condiciones ambientales (Elbein *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2015). Adams y colaboradores en 1990, realizaron estudios

comparativos entre plantas hidratadas y desecadas de *S. lepidophylla* para evaluar el contenido de azúcares libres, en donde determinaron un mayor contenido de trehalosa en comparación a la sacarosa. Dichos resultados confirmaron el trabajo de White y Towers (1967) quienes sugirieron que la disminución en la estequiometría en la concentración de sacarosa después de la rehidratación y crecimiento puede ser fuente de carbono o energía para la síntesis de trehalosa antes de la competencia fotosintética. Otra posible explicación es que la trehalosa se fosforile durante la desecación. Se ha demostrado a lo largo de las décadas que la acumulación de este disacárido ayuda a tolerar la desecación, además constituye el 90% de los carbohidratos solubles en *S. lepidophylla* siendo el organismo con mayor contenido de trehalosa. La cual es resistente a la criopreservación, vacío extremo, 100°C y altas dosis de radiación ionizante (Adams *et al.*, 1990; Iturriaga *et al.*, 2000).

7.1 Propiedades fisicoquímicas de la trehalosa

Su amplia distribución en los diversos dominios indica el papel tan importante que presenta a trehalosa como fuente energética y/o de carbono, transporte, estructural, estabilizador y protector de proteínas y membranas, regulador del crecimiento y desarrollo, así como de señalización (Muller *et al.*, 1995; Elbein *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2006; Pampurova *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2015). Las propiedades fisicoquímicas de la trehalosa explican porque es ampliamente utilizada en aplicaciones biotecnológicas inclusive sustituyendo a la sacarosa, sirve como aditivo de alimentos, cosméticos, estabilizador y preservador de moléculas complejas, de células, tejidos u órganos, osmoprotector, criopreservador y también puede ser empleado como marcador de selección en la generación de plantas transgénicas. Presenta la capacidad de preservar la estructura y función de las enzimas, así como de la integridad de las membranas celulares bajo condiciones de estrés por sequía, salinidad, radiación, frío, calor y oxidación (Suárez *et al.*, 2015). Las dos tensiones principales que se proponen para desestabilizar las bicapas lipídicas durante la deshidratación son la fusión y las transiciones de la fase lipídica. Los estudios por dispersión láser demuestran que la trehalosa y otros azúcares inhiben la fusión entre las vesículas durante la deshidratación, pero la inhibición de la fusión sola no es suficiente para preservar las vesículas secas. El efecto estabilizador de la trehalosa se debe a su estructura y estereoquímica, los estudios de difracción de rayos X, muestran que la trehalosa reemplaza a la molécula del agua para formar una envoltura protectora alrededor de la proteína deshidratada y de este modo protege su estructura tridimensional y su actividad. Se sugiere que la trehalosa interactúa directamente con la proteína mediante enlaces de puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilos (OH) y residuos polares en la proteína (**Figura 7A**), la trehalosa por lo tanto es necesaria para prevenir las transiciones de fases. La evidencia sugiere que la trehalosa deprime la temperatura de transición de fase de los lípidos deshidratados, lo que los mantiene en la fase cristalina líquida en ausencia de agua. Esto se debe a que encaja bien entre los grupos de cabeza polar de la membrana en donde mantiene múltiples sitios de interacción favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos para evitar la fusión, separación de fases y la ruptura de la membrana (**Figura 7B**). No está claro por qué esta interacción da como resultado la estabilización pero el hecho de que la trehalosa sea un azúcar no reductor

significa que no puede sufrir la típica reacción de apareamiento entre el grupo aldehído en los azúcares reductores y los grupos amino en las proteínas. La reacción de apareamiento generalmente conduce a la desnaturalización de las proteínas y se ve favorecida con el aumento de la temperatura (Elbein *et al.*, 2003; Figueroa-Soto *et al.*, 2004; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Pampurova *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2015).

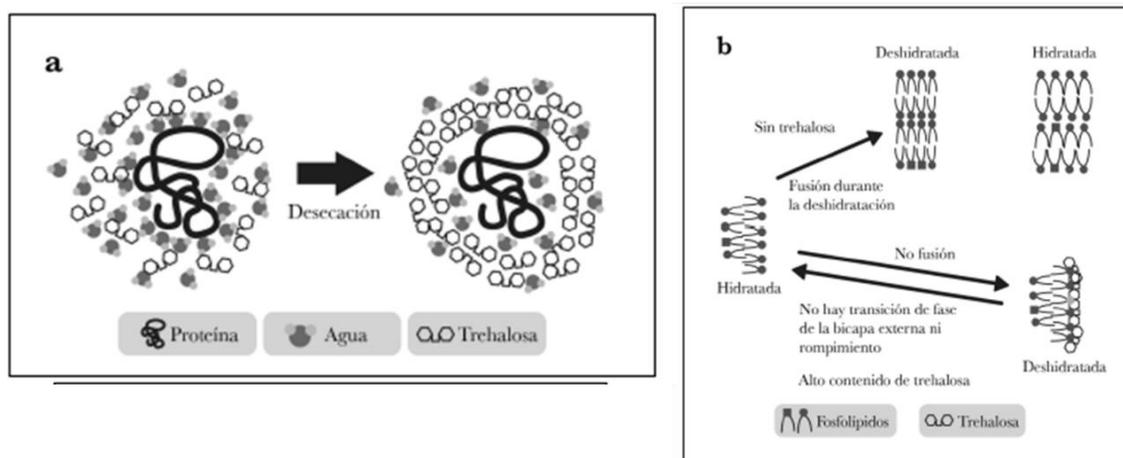


Figura 7. Modelo de osmoprotección de la trehalosa. A) Modelo de protección de las proteínas durante la desecación. B) Modelo de protección de las membranas celulares durante la desecación (Tomada de Suárez *et al.*, 2015).

7.2 Rutas de biosíntesis y degradación de la trehalosa

La α , α -trehalosa se puede sintetizar químicamente utilizando la reacción de adición de óxido de ET entre 2, 3, 4, 5-tetra-O-acetil-D-glucosa y 3, 4, 6-tri-O-acetil-1, 2-Anhidro-D-glucosa. La reacción antes descrita también puede dar lugar a la formación de otro anómero de trehalosa (β -trehalosa o neotrehalosa), el cual no ha sido aislado de ningún organismo vivo, aunque se identificó en un extracto de *Aspergillus oryzae*. El tercer anómero de trehalosa denominado β , β -trehalosa o isotrehalosa tampoco se ha aislado de ningún organismo vivo, pero se encontró en los hidrolizados de almidón (Elbein *et al.*, 2003). En 1982, fue descubierta la degradación de trehalosa por Luis F. Leloir y colaboradores en *Saccharomyces cerevisiae*, quien reportó que a partir de una forma inactiva (zimógeno) de trehalasa (α , α -trehalose-1-C-glucohidrolasa; EC 3.2.1.28) que se activa por fosforilación dependiente de AMP cíclico. Esta enzima al ser activada se localiza en el citoplasma, pero se identificó una segunda actividad de trehalasa en las vacuolas con actividad constitutiva. Al analizarlas se determinó que la enzima citoplásmica tenía un pH óptimo de 7, denominándose trehalasa neutra. Mientras que la vacuolar tenía un pH de 4.5 y se le denominó trehalasa ácida. Ambas demostraron que catalizaban la hidrólisis de la trehalosa y era inactiva para otros sustratos como celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa. La trehalasa ácida vacuolar además de la diferencia del pH mostró una baja Km (4mM vs 35mM de la trehalasa neutra citosólica), su eliminación en el genoma conduce a la incapacidad de crecer en trehalosa como fuente de carbono. Se sugiere que la trehalasa se traslada de su sitio de síntesis en el retículo

endoplásmico/aparato de Golgi al espacio periplásmico, uniéndose a la trehalosa exógena para internalizarla y escindirla en las vacuolas para producir glucosa libre (Muller *et al.*, 1995; Elbein *et al.*, 2003; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2015). La hidrólisis de trehalosa parece ser un proceso esencial para las funciones de varios organismos por ello se han identificado al menos cinco vías de biosíntesis de trehalosa (**Figura 8**). La primera vía de biosíntesis fue descubierta hace más de 50 años y es la más estudiada, se encuentra ampliamente distribuida en bacterias, arqueas, hongos, insectos y plantas. Esta vía involucra dos actividades enzimáticas catalizadas por la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS; OtsA en *E. coli*; E.C. 2. 4. 1. 15) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP; OtsB en *E. coli*; E.C. 3. 1. 3. 12). La TPS cataliza la transferencia del UDP-glucosa (funge como donante glucosídico; pudiendo emplearse ADP, GDP y CDP) a glucosa-6-fosfato (G6P) formando la trehalosa-6-fosfato (T6P) y UDP. Posteriormente la TPP desfosforila a T6P formando trehalosa y fosfato inorgánico (Pi) (**Figura 8A**) (Muller *et al.*, 1995; Elbein *et al.*, 2003; Figueroa-Soto *et al.*, 2004; Escobedo *et al.*, 2004; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Avonce *et al.*, 2006). La enzima TPP es específica para la T6P por lo que no tiene actividad con otros esteres de fosfato (G6P, glucosa-1-fosfato, fructosa-6-fosfato, gliceraldehído-3-fosfato) (Elbein *et al.*, 2003). En la segunda vía descrita, la enzima trehalosa sintasa (TreS), registrada por primera vez en *Pimelobacter* sp. se encarga de realizar la isomerización o reordenamiento intramolecular del enlace 1 α -4 α de la maltosa a un enlace 1 α -1 α formando la trehalosa (**Figura 8B**) (Elbein *et al.*, 2003; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Avonce *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2015). La tercera vía reportada para arqueas termófilas del género *Sulfolobus*, involucra la conversión de maltodextrinas (maltooligosacáridos, glucógeno y almidón) en trehalosa, por medio de dos reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima malto-oligosil-trehalosa sintasa (codificada por el gen *treY*; 720 aminoácidos) que promueve la transglicosilación del último resto de glucosa en el extremo reducido de las maltodextrinas desde un enlace α 1- α 4 a α 1- α 1 formando malto-oligosil trehalosa que presenta un resto de trehalosa al final del polímero. Posteriormente, la enzima malto-oligosil-trehalosa hidrolasa (codificada por el gen *treZ*; 556 aminoácidos) cataliza la hidrólisis de la trehalosa (**Figura 8C**) (Elbein *et al.*, 2003; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Avonce *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2015). Se presentan tres genes en esta vía *treX*, *treY* y *treZ*, TreY y TreZ catalizan las reacciones descritas. Mientras que TreX es una proteína de 713 aminoácidos que codifica una actividad de desramificación del glucógeno, elemental para producir maltodextrinas (Elbein *et al.*, 2003). La cuarta vía se reporta en hongos, se presenta cierta incertidumbre debido a que la enzima trehalosa fosforilasa (TreP) en la síntesis y degradación de trehalosa solo se ha demostrado *in vitro*. La TreP cataliza la hidrólisis reversible de la trehalosa en presencia de Pi. La transferencia de una molécula de glucosa a un fosfato genera glucosa-1-fosfato (G1P) y libera el resto de la glucosa (Elbein *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2006). La reacción es reversible, por lo que las células podrían dependiendo de la concentración de reactivos y productos sintetizar trehalosa a partir de G1P y glucosa libre (**Figura 8D**) (Elbein *et al.*, 2003). Se identificó una vía en el arquea hipertermófila *Thermococcus litoralis*, implica a la enzima trehalosa glicosiltransferasa sintasa (TreT) que cataliza la formación reversible de trehalosa a partir de ADP-glucosa (UDP y GDP-glucosa; menos eficientes) y glucosa. La TreT transfiere el resto de glucosa del ADP-glucosa y lo une a la posición 1 de otra molécula de glucosa para formar la trehalosa.

La trehalosa se degrada por la trehalasa (TreH) en dos moléculas de glucosa (**Figura 8E y 8F**) (Avonce *et al.*, 2006). Además de la tolerancia a sequía e incremento en la acumulación de trehalosa, aumenta la capacidad fotosintética y la producción de biomasa, lo cual sugiere que mejora además la tolerancia ante salinidad, estrés hídrico y frío (Escobedo *et al.*, 2004).

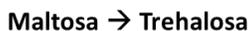
A) Vía TPS/TPP Bacterias, arqueas, hongos, insectos y plantas



Trehalosa-6-Fosfato sintasa
(TPS)

Trehalosa-6-Fosfato fosfatasa
(TPP)

B) Vía TS Bacterias



Trehalosa sintasa
(TS)

C) Vía TreY/TreZ Arqueas y bacterias



Malto-oligosil-trehalosa sintasa
(TreY)

Malto-oligosil-trehalosa hidrolasa
(TreZ)

D) Vía TreP Protistas, bacterias y hongos



←

Trehalosa fosforilasa
(TreP)

E) Vía TreT Arqueas y bacterias



←

Trehalosa glicosiltransferasa sintasa
(TreT)

F) Vía TreH Eucariontes y procariontes



Trehalasa
(TreH)

Figura 8. Rutas de biosíntesis y degradación de trehalosa en los organismos. Rutas de biosíntesis A) Vía TPS/TPP, B) Vía TS, C) Vía TreY/TreZ, D) Vía TreP y E) Vía TreT; F) Ruta de degradación de trehalosa, Vía TreH (Tomada y modificada de Avonce *et al.*, 2006).

7.3 Trehalosa en la interacción con *Selaginella lepidophylla*

En plantas se propone que la sacarosa realiza las funciones que podría llevar a cabo la trehalosa a pesar de no presentar la acumulación de trehalosa poseen la enzima trehalasa, la

cual se encarga de hidrolizar a la trehalosa. Por lo que se cree que una planta con la capacidad de acumular trehalosa podrá tener un mejor rendimiento bajo condiciones de estrés (Muller *et al.*, 1995). Desde hace varios años se sabe que en las interacciones simbióticas y/o patogénicas se ven favorecida o están mediadas por la trehalosa, como en el caso de la colonización por el hongo patógeno *Plasmodiophorea brassicae* o en hongos simbióticos como las micorrizas. La trehalasa puede ser modificada ante la presencia de trehalosa procedente de microorganismos simbiotes. La mayoría de las plantas superiores sintetizan bajos niveles de trehalosa, por lo cual las asociaciones con microorganismos proporcionarían trehalosa exógena aumentando los niveles en el contenido (Muller *et al.*, 1995; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2015). En 1913, se detectó trehalosa en *S. lepidophylla* por la técnica de cromatografía de gases en cantidades de hasta el 10% del peso seco, mientras que en platas rehidratadas se encontró un contenido del 1% del peso fresco. A la par se determinó el contenido de sacarosa mostrando la misma relación, siendo la trehalosa un azúcar elemental. Se detectaron bajas concentraciones de trehalosa en plantas que pudiesen estar relacionadas con la interacción de insectos y/o microorganismos (Muller *et al.*, 1995). *S. lepidophylla* es una planta tolerante a la desecación que puede perder del 80 al 95% de su agua protoplasmática durante un período de sequía y revivir cuando el agua vuelve a estar disponible. Se argumenta que *S. lepidophylla* puede sobrevivir a los ciclos de deshidratación – hidratación – deshidratación debido a la acumulación de trehalosa que interactúa con los grupos OH de las proteínas y las cabezas polares de los lípidos de las membranas propiciando el reemplazamiento de agua por trehalosa y de este modo protegen las membranas celulares. Durante los ciclos de deshidratación e hidratación, la microfíla de *S. lepidophylla* se curvan y se desenrollan. Los análisis ultraestructurales y bioquímicos del comportamiento de las microfílas durante el desenrollado en la rehidratación mostraron que la integridad enzimática celular y basal de las microfílas desecadas se conserva. El contenido de trehalosa supera los de sacarosa y glucosa. Debido al contenido muy bajo de trehalosa en la mayoría de las plantas vasculares, se pensaba que habían perdido la capacidad de producir esta molécula y que fue reemplazada por sacarosa. Sin embargo, la mayoría o todas las plantas vasculares intolerantes a la desecación como *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* albergan grandes familias de genes para la biosíntesis de trehalosa en sus genomas. Una hipótesis que puede soportar niveles altos de trehalosa es debido a que el dominio N-terminal puede ser inhibido por una proteína/metabolito o eliminado por una proteasa específica, lo que resulta en una alta actividad enzimática. A partir de una biblioteca de cDNA de *S. lepidophylla* realizado en un vector de expresión de levadura se lograron identificar varios genes que codifican para TPS, los cuales mostraron una mayor homología con TPS de origen fúngico que con TPS de plantas (Brighigna *et al.*, 2002; Figueroa-Soto *et al.*, 2004; Pampurova *et al.*, 2014).

8. Justificación

Las plantas constantemente enfrentan diversos factores ambientales como el ataque de patógenos, falta de agua, concentración de sales en el suelo y temperaturas extremas, los cuales le propician dificultades en el crecimiento, desarrollo y productividad. Por lo que las plantas han desarrollado estrategias para contender ante estas condiciones adversas, por medio de cambios morfológicos, fisiológicos, metabólicos y genéticos coordinados por una amplia red de señalización. Una respuesta común entre los organismos al estrés causado por la sequía, salinidad y temperaturas extremas es la acumulación de azúcares y otros compuestos compatibles que servirán como osmoprotectores. La trehalosa, es un disacárido no reductor conformado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace α , α -1,1-glicosídico, presenta funciones como fuente de energía, estructural, de transporte, regulador del crecimiento y señalización, además de una función fisiológica importante como protector durante el estrés abiótico en una amplia variedad de organismos como bacterias, hongos, insectos y en plantas de resurrección (*Myrothamnus flabellifolia*, *Sporobolus atrovirens* y *Selaginella lepidophylla*). *Selaginella lepidophylla* posee la capacidad para sobrevivir ante la desecación durante períodos prolongados y revivir cuando las condiciones son favorables sin presentar daño aparente. Dicha capacidad es atribuida a la alta acumulación de trehalosa, la cual es independiente del estado fisiológico de la planta (estado hidratado y deshidratado). En diversos trabajos de investigación se han clonado e identificado genes que participan en la biosíntesis de trehalosa y que son altamente expresados durante la desecación e hidratación en *S. lepidophylla*, pero en un trabajo relativamente reciente también se logró identificar genes de origen microbiano involucrados en la síntesis de trehalosa. Estos hallazgos sugieren que los altos niveles de trehalosa contenidos en la planta pueden deberse a la síntesis de trehalosa proporcionada por microorganismos endófitos. Además, de que estos microorganismos son necesarios también para el crecimiento normal de la planta, ya que presentan mecanismos de asimilación de diversos minerales y nutrientes importantes para el adecuado desarrollo de la misma.

En el presente trabajo pretendemos aislar y caracterizar los endosimbiontes de *S. lepidophylla*, particularmente bacterias endófitas provenientes de su ambiente natural y colectadas en dos diferentes épocas del año (lluvias y estiaje), esto nos permitirá determinar el papel de la microbiota endófitas asociada a la planta de resurrección en los estados naturales de hidratación y deshidratación, su caracterización bioquímica y fisiológica para tratar de entender el papel o aporte fisiológico y molecular a la planta, así como determinar los niveles de trehalosa producidos por los microorganismos endófitos.

9. Hipótesis

El aislamiento y caracterización de las bacterias endófitas asociadas a *Selaginella lepidophylla* y la evaluación de los parámetros promotores de crecimiento vegetal nos permitirá entender su papel en el proceso de tolerancia a la desecación.

10. Objetivos

10.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar las bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla*.

10.2 Objetivos particulares

1. Aislar y caracterizar a las bacterias endófitas de *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado.
2. Evaluar los parámetros de promoción del crecimiento vegetal en los aislados obtenidos.
3. Cuantificar los niveles de trehalosa en las bacterias endófitas.

11. Metodología

11.1 Estrategia experimental

Para el cumplimiento de los objetivos del presente proyecto se llevó a cabo la estrategia experimental mostrada en la **Figura 9**.

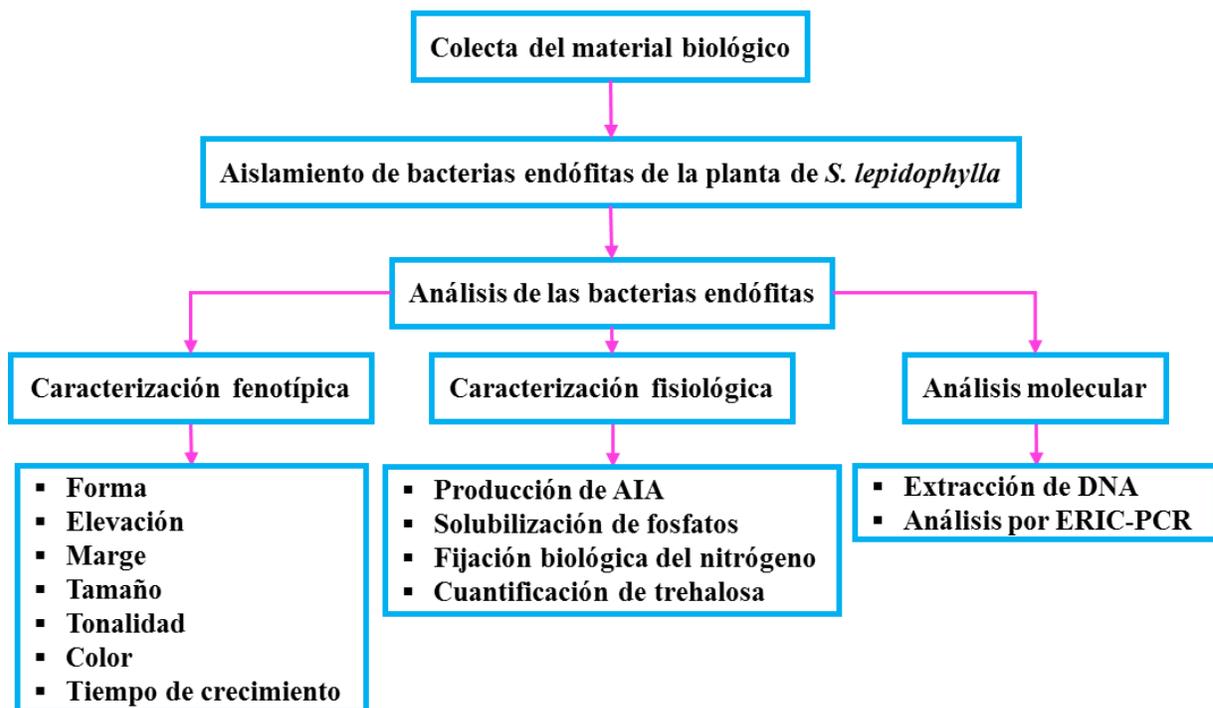


Figura 9. Estrategia experimental.

11.2 Colecta del material biológico

Se utilizaron cinco ejemplares de la planta *S. lepidophylla* para este proyecto. Las plantas se colectaron en el poblado de San Andrés de la Cal en el municipio de Tepoztlán, Morelos (18°57'22"E, 99°06'50"N, 1495 m.s.n.m.) durante las épocas de lluvias (julio, 2018) y estiaje (marzo, 2019) (estado hidratado y deshidratado, respectivamente). El sitio de estudio presenta un clima templado con diferentes tipos de vegetación como el bosque de pino, de oyamel, de encino, bosque mesófilo de montaña, matorral crasicaule y selva baja caducifolia. Durante la colecta y hasta el procesamiento se trató de que el tiempo no fuera mayor a 2h.

11.3 Aislamiento de bacterias endófitas de la planta de *Selaginella lepidophylla*

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología. Para eliminar el exceso de suelo se enjuagaron con abundante agua corriente. Se pesó por separado un gramo de micrófila y rizóforo. Los tejidos vegetales se colocaron en frascos estériles en donde se desinfectaron, para el tejido vegetal en estado hidratado se empleó cloro comercial al 10% (cloralex 1L al 6.15% de hipoclorito de sodio) y tritón X-100 al 0.05% durante 10 min. Para el tejido vegetal en estado deshidratado se empleó cloro comercial al 20% y tritón X-100 al 0.1% durante 20 min, toda la desinfección se realizó en la campana de flujo laminar. Para eliminar el desinfectante, se enjuagó cada muestra con abundante agua destilada estéril y se eliminó el exceso de humedad en una pieza de papel filtro estéril (Zinniel *et al.*, 2002; Rives *et al.*, 2007; Torreblanca, 2017). Para el aislamiento de las bacterias endófitas, se homogeneizó un gramo de tejido de rizóforo y micrófila con ayuda de un mortero estéril adicionando 9 ml de sulfato de magnesio (MgSO₄) 10mM. Posteriormente, se realizaron diluciones seriales, tomando el extracto inicial o stock como 10⁻¹ y se plateó hasta la dilución 10⁻³. Se sembraron 100 µl de cada dilución de los extractos obtenidos tanto del rizóforo como de la micrófila por separado en los cuatro medios de cultivo; medio agar nutritivo (AN; 5 g/L peptona de caseína, 3 g/L extracto de carne, 8 g/L cloruro de sodio, 15 g/L agar), medio Luria Bertani (LB; 10 g/L peptona de caseína, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L cloruro de sodio, 15 g/L agar), medio peptona extracto de levadura (PY; 5 g/L peptona caseína, 3 g/L extracto de levadura, 10 mL de cloruro de calcio 0.7M, 15 g/L agar), medio agar papa dextrosa (PDA; 39 g/L). Para el control de desinfección se tomó las impresiones de los tejidos antes del macerado, los cultivos se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias (Torreblanca, 2017).

11.4 Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA)

La detección y cuantificación de los compuestos indólicos particularmente AIA se lleva a cabo por ensayos inmunoquímicos y por métodos colorimétricos (Rives *et al.*, 2007; Flores, 2017). En este experimento se empleó un método colorimétrico, para lo cual previamente crecimos los aislados bacterianos en sus respectivos medios de cultivos sólidos (AN, LB, PY y PDA) durante 48h a 30°C, después se inocularon en medios de cultivo líquidos durante 24h

en agitación durante la noche (O/N, overnight) a 30°C. Se centrifugó el medio de cultivo a 14, 000 rpm durante 5 min, posteriormente se lavaron las células con 1 ml de MgSO₄ 10mM y se centrifugó durante 3 min. Finalmente, se resuspendió en un 1 ml de MgSO₄ y se mezcló en vórtex. Se determinó la OD_{600nm}, para ello se colocó en la celda 980 µl de MgSO₄ + 20 µl de las células, empleando como blanco 1 ml de MgSO₄. Posteriormente se ajustó el inóculo a una OD_{600nm} de 0.1 en el medio de cultivo líquido Jain & Patriquin (JP) con y sin triptófano (Trp) durante 24 y 48h (Jain and Patriquin, 1984; Sánchez-Cruz *et al.*, 2019). El medio de cultivo contiene (g/L): ácido succínico, 2.5; Fructosa, 2.5; K₂HPO₄, 6.0; KH₂PO₄, 4.0; NH₄Cl, 1.0; MgSO₄, 0.20, NaCl, 0.10; CaCl₂, 0.02; FeCl₃, 0.01; NaMoO₄, 0.002, KOH, 2.10 y Trp, 0.5, se ajustó a un pH de 6.0 a 6.2. El reactivo de Salkowski (RS) contiene 61.4 ml agua; 38.61 ml H₂SO₄; 1.2 g FeCl₃ (Jain and Patriquin, 1984). Una vez transcurrido el tiempo se tomaron 500 µl del cultivo se centrifugó y se mezcló con 500 µl del RS, para ser incubado durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, se determinó la OD_{540nm} (Glickmann & Dessaux, 1995). El desarrollo del color rosa indica la producción de AIA debido a la oxidación de los compuestos indólicos por las sales férricas. La cuantificación de la producción de AIA se determinó con la curva patrón del RS con diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20 y 40 µg/ml) de AIA comercial (Ahmad *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2016).

11.5 Determinación de la solubilización de fosfatos

Para determinar la capacidad de las bacterias endófitas para solubilizar fosfatos, previamente se crecieron los aislados bacterianos en sus medios de cultivo sólidos y posteriormente en medios de cultivo líquidos durante 24h en agitación O/N a 30°C. Se centrifugó el medio de cultivo a 14, 000 rpm durante 5 min, posteriormente se lavaron las células con 1 ml de MgSO₄ 10mM y se centrifugó durante 3 min. Finalmente, se resuspendió en un 1 ml de MgSO₄ y se mezcló con vórtex 20s. Se determinó la OD_{600nm}, se colocaron en la celda 980 µl de MgSO₄ + 20 µl de las células, empleando como blanco 1 ml de MgSO₄. Posteriormente se ajustó el inóculo a una OD_{600nm} de 0.2 en 10 µl en el medio de cultivo sólido Pikovskaya's (PK). El medio de cultivo contiene (g/L): extracto de levadura, 0.5; dextrosa, 10.0; Ca₃(PO₄)₂, 5.0; (NH₄)₂SO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.1; KCl, 0.2; MnSO₄; 0.0001; FeSO₄, 0.0001 y Agar, 15.0, se ajustó a un pH 7.2. Se incubó a 30°C durante 7 días, monitoreándolos al día 1, 2, 6 y 7, en este último se realizó la medición del halo indicativo de la solubilización de fosfatos (Ahmad *et al.*, 2006; Goreti *et al.*, 2014; Torreblanca, 2017). Para la determinación numérica se empleó la siguiente ecuación, expresando el resultado en milímetros (mm):

$$\text{Halo de la bacteria} + \text{Halo de la solubilización de fosfatos} / \text{Halo de la bacteria}$$

11.6 Determinación de la fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Para la determinación de la capacidad de FBN se empleó el medio de cultivo semisólido NFb, el cual es libre de nitrógeno y proporciona una gama de entornos desde aeróbicos hasta anaeróbicos, permitiendo que el inóculo crezca de acuerdo a sus características. Este medio

originalmente se desarrolló para *Azospirillum*, posteriormente se modificó la fuente de carbono, pH, concentración osmótica, vitaminas, sales, aminoácidos para otros géneros (Balbani *et al.*, 2014). Previamente se cultivaron los aislados bacterianos en sus medios de cultivo sólidos respectivos durante 48h a 30°C. Posteriormente se inóculo una asada hasta el fondo del tubo con el medio NFb. El medio de cultivo contiene (g/L): ácido málico, 5.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.2; NaCl, 0.1; CaCl₂·2H₂O, 0.02. Solución de micronutrientes (CuSO₄·5H₂O, 0.04; ZnSO₄·7H₂O, 0.12; H₃BO₃, 1.4; Na₂MoO₄·2H₂O, 1.0; MnSO₄·H₂O, 1.175), 2 ml. Azul de bromotimol (5 g/L en KOH 0.2 N), 1.6 ml; FeEDTA (solución 16.4 gL⁻¹), 4 ml. Solución vitamínica (biotina, 10 mg; piridoxal-HCl, 20 mg), 1 ml. KOH, 4.5. Ajustar el pH a 6.5. Agar de 1.6 a 1.8 g para el medio semisólido. Se monitorea por 10 días observando el halo de crecimiento (película bacteriana), así como su altura y el cambio de color del medio que viraba de azul a amarillo debido al cambio de pH. La altura del halo de crecimiento es relevante debido a que la nitrogenasa al ser sensible al oxígeno necesita tener condiciones un tanto anaerobias para su adecuado funcionamiento (Balbani *et al.*, 2014).

11.7 Cuantificación de los niveles de trehalosa

Para la extracción de trehalosa de las bacterias endófitas, se crecieron los aislados bacterianos en sus medios de cultivo sólidos y líquidos. Se centrifugó el medio de cultivo a 14, 000 rpm durante 5 min, posteriormente se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con 1 ml de MgSO₄ 10mM y se centrifugó durante 3 min. Finalmente, se resuspendió en un 1 ml de MgSO₄ y se mezcló con vórtex 20s. Se determinó la OD_{600nm}, se colocó en la celda 980 µl de MgSO₄ + 20 µl de las células, empleando como blanco 1 ml de MgSO₄. Posteriormente se ajustó el inóculo a una OD_{600nm} de 0.1 en el medio de cultivo líquido mínimo adicionado con 100 mM de NaCl durante 24h. El medio mínimo contiene (g/L): ácido succínico, 2.5; Fructosa, 2.5; K₂HPO₄, 6.0; KH₂PO₄, 4.0; NH₄Cl, 1.0; MgSO₄, 0.20; NaCl, 0.10; CaCl₂, 0.02; FeCl₃, 0.01; NaMoO₄, 0.002; KOH, 2.10 y NaCl, 20 ml. Se ajustó a un pH de 6.0 a 6.2. Transcurrido las 24h, se centrifugó el cultivo en tubos eppendorf de 1.5 ml, se decantó y se guardó a -20°C. Las células fueron resuspendidas en 1ml de etanol absoluto al 85% (con agua grado HPLC y etanol absoluto) e incubadas a 85°C durante 15 min para la lisis celular. Posteriormente, se centrifugó a 14, 000 rpm durante 5 min para transferir el sobrenadante (aquí van los azúcares) a un tubo de 1.5 ml para ser incubado a 85°C con tapa abierta hasta la evaporación del alcohol. Para la cuantificación del contenido de trehalosa se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas inglés), empleando una columna SUPELCOSIL LC-NH₂ (SIGMA-ALDRICH) y como fase móvil acetonitrilo – agua 75::25 (v/v) a un flujo de 1 ml/min. Se realizó una curva patrón (1.25, 0.625, 0.325 y 0.156 µg/ml) empleando trehalosa (Sigma Chemical Co.) (Nova, 2009; García *et al.*, 2017).

11.8 Análisis molecular para la clasificación por patrones de ERIC-PCR

11.8.1 Extracción de DNA de las bacterias endófitas

Los aislados bacterianos se crecieron en sus medios de cultivo sólidos durante 24 a 72h, posteriormente se inóculo en 5 ml de medio de cultivo líquido durante toda la noche en agitación a una temperatura de 30°C. Se tomó 100 µl de la suspensión en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 13, 000 rpm durante 5 min. Se adicionó 1 µl de lisozima en cada tubo, se agitó e incubó a 37°C durante 15 min. Posteriormente se añadió 60 µl de la solución de lisis y se resuspendió, para incubarse a 80°C durante 5 min, después se añadió 0.2 µl de RNasa se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 15 a 60 min. Transcurrido el tiempo, se agregó 20 µl de la solución de precipitación de proteínas, agitándose por 20s, se centrifugó a 16, 000 rpm durante 3 min y se incubó en hielo durante 5 min. Después se agregó 30 µl de PCI (Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico) agitándose vigorosamente durante 3 min, se transfirió a un tubo nuevo en donde se agregó 60 µl de isopropanol al 100%, se mezcló por inversión, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Se añadió 60 µl de etanol frío al 70% y se agitó durante 1 min, se decantó y se dejó secar el pellet durante 10 min. Posteriormente se agregó 10 µl de la solución de hidratación (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8.0; TE) para dejarse incubar a 65°C por 1h. Finalmente se cuantificó el DNA en un NanoDrop 2000 y se visualizó su integridad en un gel de agarosa al 1%.

11.8.2 Análisis de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR)

Una de las técnicas moleculares más empleadas en los últimos años es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuyo propósito es la identificación, tipificación bacteriana o monitoreo de cambios en la población microbiana (diversidad genética). Una de las variedades del PCR es el Rep-PCR, el cual se encarga de la amplificación de elementos repetitivos. Esta técnica permite el estudio de los genomas bacterianos completos mediante el análisis de patrones cepa específicos obtenidos durante la amplificación y visualizados por electroforesis en gel de agarosa expuesto a luz UV. El Rep-PCR comprende dos tipos de elementos repetitivos, las secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP) y las secuencias consenso intergénicas enterobacterianas (ERIC). El ERIC-PCR se basa en la tipificación para el estudio de la relación clonal de diversas bacterias Gram negativas y positivas, debido a la presencia de DNA intergénico repetido a lo largo del genoma bacteriano. Las secuencias ERIC comprende elementos de 126 – 127 pb que se encuentran restringidos a regiones transcritas del genoma ya sea en regiones intergénicas de operones policistrónicos o en regiones no traducidas “rio arriba” o “rio abajo” de los marcos de lectura abierta (ORF). Además, estas secuencias constituyen una clase de elementos de DNA repetitivos con repetición invertida central altamente conservada en el genoma bacteriano. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 1 ciclo a 94°C por 3 min; 35 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 46°C por 90s y elongación a 72°C por 2 min; y un paso final de extensión de 72°C por 8 min. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1.2%. Se

emplearon los oligonucleótidos para ERIC-PCR mostrados en la **Tabla 3**. La reacción de PCR contuvo: agua inyectable 7.6 μ l, Taq buffer KCl 1.5 μ l (10X), dNTPs 1.2 μ l (2mM), MgCl₂ 0.9 μ l (25mM), Taq polimerasa 1 μ l (1U/ μ l), DNA 1 μ l (50 ng/ μ l), ERIC-1R 0.9 μ l (10 pmol/ μ l), ERIC-2 0.9 μ l (10 pmol/ μ l); volumen total 15 μ l (Versalovic *et al.*, 1991; García *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006; Talavera *et al.*, 2011; Hernández-Cortez *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015; Liotti *et al.*, 2018). Las bacterias endófitas fueron agrupadas de acuerdo con sus características morfológicas, posteriormente por los diversos patrones cepa específicos durante el ERIC-PCR, agrupándose de acuerdo con los tamaños obtenidos por medio del sistema digital de imagen del fotodocumentador UV Múltiple DOC-IT.

Tabla 3. Oligonucleótidos para el análisis de ERIC-PCR.

ERIC-1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	22 pb
ERIC-2	5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'	22 pb

11.9 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza completamente al azar (ANOVA) para cada experimento, este análisis permite evaluar y concluir estadísticamente que las diferencias que presentan las medias de los experimentos son debido al tratamiento y no al azar o errores experimentales. Además, debido a que este análisis no señala cuál de las medias es la más afectada se realizó una prueba poshoc para comparar las medias con una prueba de rangos múltiples de Tukey para corroborar cual es la media que es diferente en comparación a las demás. Consideramos tres datos fundamentales, el valor de F (FCalculada) la cual se obtiene de dividir el cuadrado de la media del modelo entre el cuadrado de la media del error. El valor de $Pr > F$ el cual es la probabilidad del valor de F del modelo, este valor indica si un valor de FCalculada es o no significativo sobre la base de los puntos de referencia de 0.05 y 0.01 usados generalmente en investigación. De tal forma que si $Pr > F$ es menor o igual que 0.05 será una F significativa, si $Pr > F$ es menor o igual que 0.01 el valor de F será altamente significativo y si $Pr > F$ es mayor a 0.05 será no significativa. Por último, se consideró el valor de alfa (α) de 0.05. Para los análisis estadísticos se empleó el programa SAS (Statistical Analysis Software).

Nuestra variable dependiente fueron los experimentos de la determinación de los niveles y consumo de AIA, así como la solubilización de fosfatos. Para la determinación de la fijación biológica de nitrógeno se realizó de manera cualitativa, y para la determinación de trehalosa solo hubo una repetición. La variable independiente fueron las bacterias endófitas aisladas de *S. lepidophylla*. Las unidades experimentales fueron los diversos medios de cultivo que empleamos en los experimentos (Jain & Patriquin sin y con Trp, y Pikovskaya's). Las repeticiones fueron de tres para cada aislado bacteriano para la determinación de los niveles y consumo de AIA, así como la solubilización de fosfatos. Las réplicas solo se realizaron para el consumo de AIA en cinco ocasiones.

12. Resultados

12.1 Aislamiento de bacterias endófitas de *Selaginella lepidophylla*

En la **Tabla 4** se muestran los aislados bacterianos obtenidos en estado hidratado y deshidratado para los tejidos vegetales (micrófila y rizóforo) en los cuatro medios de cultivo. Podemos destacar que se obtuvo una mayor cantidad de aislados bacterianos endófitos en el estado hidratado con 124 (los aislados 73 y 112 se perdieron durante el crecimiento, solo se determinó hasta la producción de AIA. Mientras que los aislados 99 y 124 se perdieron tempranamente). El estado deshidratado se obtuvo 41 aislados bacterianos. Además al comparar la cantidad de aislados obtenidos en los diferentes medios de cultivo podemos observar que el medio PY presentó una mayor cantidad de aislados tanto en la época de lluvias como de estiaje. Respecto al tipo de tejido vegetal la mayor cantidad de aislados en ambas épocas fue en la micrófila, a excepción del estado hidratado en el medio de cultivo AN en donde observamos una menor cantidad de aislados en comparación al rizóforo. Los aislados bacterianos se individualizaron conforme aparecieron en los medios de cultivo y se agruparon de acuerdo a su morfología. Para la clasificación morfológica (**Tabla 5**) se consideró la forma, elevación, margen, color (tonalidad), tamaño y el tiempo de crecimiento.

Tabla 4. Aislamientos bacterianos obtenidos de *S. lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado.

Estado hidratado					
Medios de cultivo	AN	LB	PY	PDA	Subtotal
Micrófila (Mi)	8	14	24	17	63
Rizóforo (Ri)	20	7	22	12	61
Subtotal	28	21	46	29	
Total	124				
Estado deshidratado					
Micrófila (Mi)	5	7	9	4	25
Rizóforo (Ri)	3	3	8	2	16
Subtotal	8	10	17	6	
Total	41				

Tabla 5. Nomenclatura para la clasificación morfológica y abreviación.

Forma		Elevación		Margen		Color		Apariencia	
Circular	Ci	Convexa	Co	Entero	E	Amarillo	A	Agrupada	Ag
Filamentosa	F	Cóncava	Cc	Lobulado	Lo	Beige	Bg	Anillada	An
Irregular	I	Elevada	El	Ondulado	On	Blanca	B	Compacta	Com
Puntiforme	Pn	Pulvinada	Pu	Tamaño		Coral	C	Costra	Cos
				Colonia más pequeña	+ ++ +++	Durazno	Dz	Cremosa	Cr
		Plana	Pl	Móvil en caja	MC	Marfil	M	Definida	De
				Tonalidad		Naranja	N	Densa	D
						Negra	Ng	Gelatinosa	Gl
						Rosa	Rs	Grande	G
						Transparente	T	Lisa	L
								Pequeña	P
								Redonda	Rd
								Rugosa	R
								Seca	S
								Viscosa	V
				Tenue	Tn				

12.2 Preservación y extracción de DNA de las bacterias endófitas

Posterior a su clasificación por caracteres morfológicos, se realizó el crecimiento en medios de cultivo líquido y se prepararon los crioviales con glicerol al 20% para cada aislado bacteriano, los crioviales fueron almacenados a -80°C . A partir del mismo cultivo se realizó la extracción de DNA genómico. Se verificó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (**Figura 10**) y se determinó la concentración con ayuda de un NanoDrop 2000. Posteriormente se utilizó para el análisis de ERIC-PCR, la cantidad de DNA para la reacción fue $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ para discernir que la intensidad de las bandas es debida a la amplificación y no a la cantidad de DNA. Los aislados bacterianos se agruparon de acuerdo a las características morfológicas para correr juntas las muestras. La amplificación de ERIC-PCR permitió analizar los diferentes patrones cepa específicos que se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (**Figura 11**; **11A** estado hidratado y **11B** estado deshidratado). Los geles de agarosa se analizaron en el sistema digital de imagen del fotodocumentador UV Múltiple DOC-IT, el cual nos permitió analizar los diferentes tamaños de las bandas (**Figura 12A**) identificando 114 patrones de bandeo diferentes. La **Figura 12B** muestra la comparación de diversos histogramas de los patrones de bandeo para la agrupación.

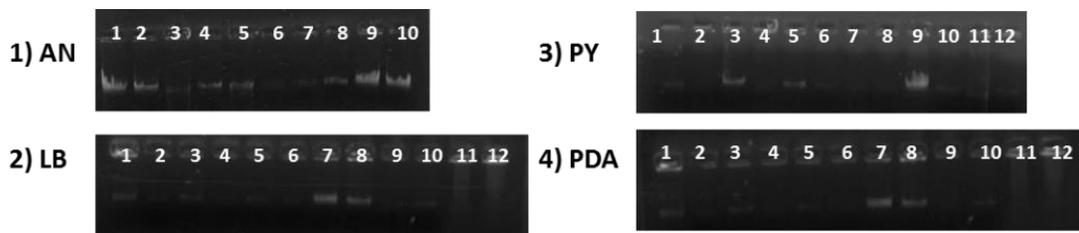


Figura 10. Imágenes representativas del análisis de integridad de DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Muestras de DNA de los aislados bacterianos que crecieron en 1) Agar nutritivo (AN); 2) Luria Bertani (LB); 3) Peptona extracto de levadura (PY); 4) Agar papa dextrosa (PDA).

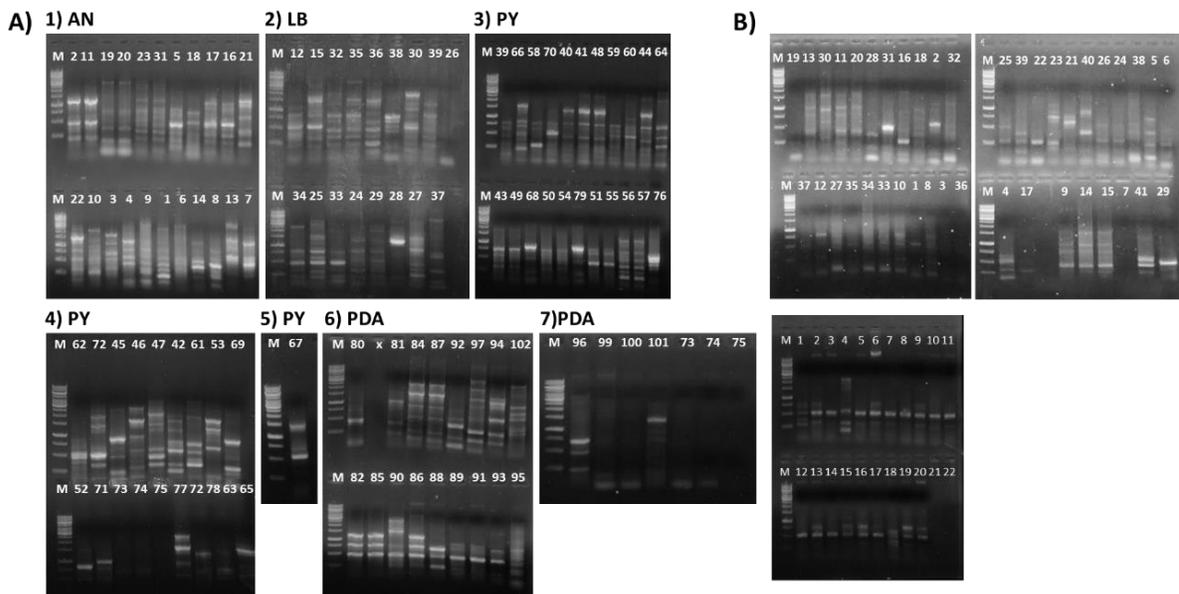


Figura 11. Amplificación de las secuencias consenso intergénicas enterobacterianas (ERIC-PCR), visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. A) ERIC-PCR de muestras en estado hidratado: De izquierda a derecha M: marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA); ERIC-PCR independientes 1) Agar nutritivo (AN); 2) Luria Bertani (LB); 3-4-5) Peptona extracto de levadura (PY); 6-7) Agar papa dextrosa (PDA). B) ERIC-PCR de muestras en estado deshidratado. De izquierda a derecha M: marcador de peso molecular; ERIC-PCR independientes.

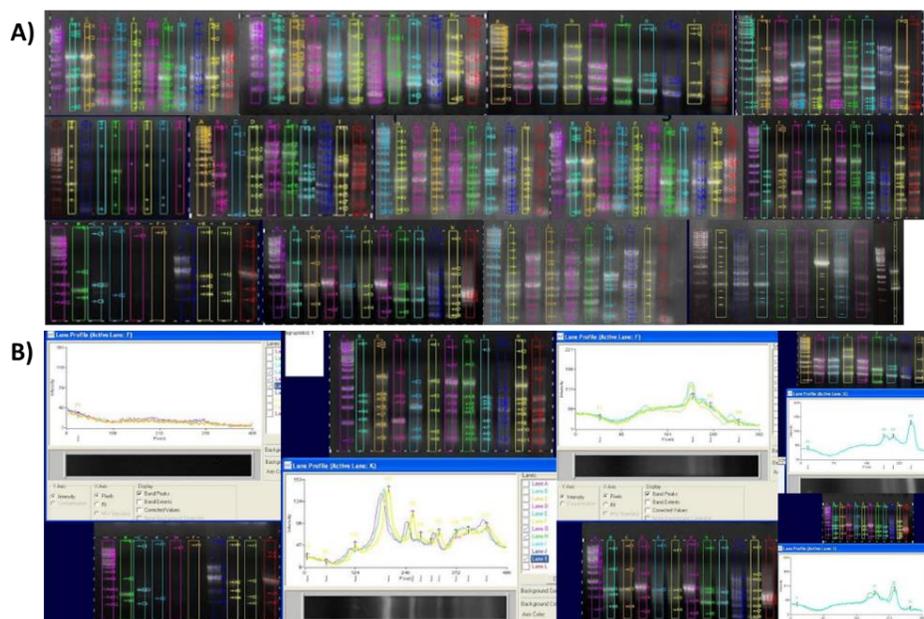


Figura 12. Imagen representativa del análisis de ERIC-PCR. A) Análisis de los patrones de bandeo obtenidos mediante ERIC-PCR. B) Comparación de histogramas de los patrones para la agrupación.

12.3 Parámetros generales para la caracterización de las bacterias endófitas

La **Tabla 6** presenta el aislamiento y caracterización de las bacterias endófitas de *Selaginella lepidophylla* obtenidos durante la época de lluvias (estado hidratado) y la época de estiaje (estado deshidratado). Se muestra el número de aislado y su nombre, se les asignó un nombre de acuerdo a la procedencia de la muestra: *Selaginella lepidophylla* (S1); el medio de cultivo del aislamiento (AN-LB-PY-PDA); el tejido vegetal (micrófila, Mi; rizóforo, Ri); el ejemplar de la planta (1 o 2); la dilución de la muestra (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y el número de la colonia. El asterisco se utilizó para diferenciar aislamientos con el mismo nombre. Además, se muestra el fenotipo y el tiempo de crecimiento de los aislados bacterianos. Los parámetros generales que se determinaron para la caracterización de los aislados bacterianos son el análisis de ERIC-PCR y otros parámetros que se explican con detalle más adelante como la producción de ácido indolacético (AIA) con Trp a las 24 y 48 horas, no se muestran los resultados sin Trp debido a que no hubo producción a excepción del aislado 116 (SIPDARi 10^{-2} 1) a las 48h (1.62 μ g/ml). La solubilización de fosfatos (SP), fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la cuantificación de los niveles de trehalosa de los aislados bacterianos.

Tabla 6. Aislamiento y caracterización de las bacterias endófitas de *Selaginella lepidophylla*.

Nombre	ERIC-PCR	AIA (µg/ml)		SP mm	FBN +/-	Trehalosa µg/ml	Fenotipo y tiempo de crecimiento
		Con Trp 24h	48h				
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	Control	9.35	26.98	-	Positivo	2.58	ND
<i>Pseudomonas lutea</i>	Control	2.09	0.7	ND	ND	ND	ND
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	Control	ND	ND	ND	ND	48.77	ND
Lista de cepas aisladas de <i>Selaginella lepidophylla</i> en estado hidratado.							
Medio Agar Nutritivo (AN) micrófila							
1. SIANMi10 ⁻¹	Patrón 12	46.38	50.58	2.67	Positivo	11.82	Ci-Co-En-A Cl-D; 24h
2. SIANMi10 ⁻²	Patrón 1	7.89	9.59	2.46	Positivo	4.8	Ci-Co-En-A O-P-Com-Cos; 24h
3. SIANMi210 ⁻¹	Patrón 9	0	9.04	-	Negativo	4.03	Pn-Co-En-A Cl-+P-Cr; 24h
4. SIANMi210 ⁻²	Patrón 10	46.42	51.33	2.87	Positivo	21.25	Ci-Co-En-A O-De-Com; 24h
5. SIANMi210 ⁻²	Patrón 4	10.16	19.29	2.5	Positivo	12.19	Ci-Pl-En-A O-P-Com-De-Cos; 24h
6. SILANMi10 ⁻²	Patrón 105	2.77	13.15	2.31	Negativo	1.88	Ci-Co-En-Bg-P+++Rd; 24h
7. SILANMi10 ⁻²	Patrón 106	0	0.58	2.37	Positivo	7.56	Ci-Co-En-N-P+++; 24h
8. SILANMi10 ⁻³	Patrón 107	0	16.02	X	NC	3.38	Ci-Co-En-B-P+++; 24h
Medio Agar Nutritivo (AN) rizóforo							
9. SIANRi10 ⁻²	Patrón 13	0	37.17	2.47	Negativo	4.72	Ci-Co-En-B/M-Cr-P; 72h
10. SIANRi110 ⁻¹	Patrón 17	3.44	2.49	2.44	Positivo	35.75	Ci-Co-En-Bg-Com-De; 24h
11. SIANRi110 ⁻²	Patrón 15	1.05	4.4	3.29	Positivo	4.86	Ci-Co-En-M-Cr; 24h
12. SIANRi110 ⁻³	Patrón 11	46.75	49.56	2.54	Positivo	25.01	Ci-Co-En-A O-Cr-R; 24h
13. SIANRi110 ⁻⁴	Patrón 8	0	0	2.73	Positivo	7.63	Ci-Co-En-N/Dz-S; 24h
14. SIANRi110 ⁻⁵	Patrón 1	6.49	7.14	2.55	Positivo	6.42	Ci-Co-En-A O/N; 24h
15. SIANRi110 ⁻⁶	Patrón 4	0	0	2.19	Negativo	1.41	Ci-Pl-En-A Cl/T-L-S; 24h
16. SIANRi110 ⁻²	Patrón 16	2.54	25.85	-	Positivo	0.82	I-Pu-On-M-D-R-V; 24h
17. SIANRi110 ⁻²	Patrón 14	0	0	-	Negativo	1.41	Ci-Co-En-M-+P; 24h
18. SIANRi110 ⁻³	Patrón 18	0	38.93	2.32	Positivo	7.32	Ci-Co-En-B/M-Ag-Com-Gl; 24h
19. SIANRi110 ⁻⁴	Patrón 6	0	45.42	-	Positivo	1.43	I-Pu-On-B/M-Cos; 24h
20. SIANRi110 ⁻⁵	Patrón 6	1.33	44.45	2.26	Positivo	5.95	Ci-Co-En-A/Bg-Gl-Ag; 72h
21. SIANRi110 ⁻⁶	Patrón 5	0	0	2.36	Positivo	7.71	Ci-Co-En-B/Bg-P; 72h
22. SIANRi210 ⁻²	Patrón 2	5.33	0.3	-	Positivo	18.31	I-El-Lo/On-T-MC; 72h
23. SIANRi210 ⁻²	Patrón 2	5.87	0.05	-	Positivo	18.73	I-El-Lo-T-MC; 72h
24. SIANRi210 ⁻³	Patrón 7	0	4.53	3.51	Positivo	13.79	Ci-Co-En-A O-Cr; 72h

25. SIANHRi3	Patrón 7	46.15	48.29	2.49	Positivo	3.96	Ci-Co-En-A Fl-Gl; 72h
26. SILANRi10 ⁻²¹	Patrón 108	3.08	22.4	2.34	Positivo	6.1	Ci-Co-En-N-P+++S-L; 24h
27. SILANRi10 ⁻²²	Patrón 107	0	1.66	2.24	Negativo	1.44	Ci-Co-En-Bg-Rd; 24h
28. SILANRi10 ⁻²³	Patrón 106	0	15.29	X	NC	ND	Ci-Co-En-B-Rd-R-Cos-De; 24h
Medio Luria Bertani (LB) micrófila							
29. SILBmi10 ⁻²²	Patrón 3	6.83	5.53	2.52	Positivo	15.52	Ci-Co-En-N-Cr-P; 24h
30. SILBmi110 ⁻¹²	Patrón 28	1.39	5	2.2	Positivo	5.22	Ci-Co-En-M-Cr-P; 24h
31. SILBmi110 ⁻²¹	Patrón 26	0	3.28	2.38	Positivo	4.29	Ci-Co-En-A Cl-Cos-S; 24h
32. SILBmi210 ⁻²²	Patrón 24	2.57	0	2.25	Negativo	1.48	Ci-Co-En-Bg-Cr-R-P; 24h
33. SILBmi210 ⁻¹¹	Patrón 31	0	32.93	2.65	Positivo	11.32	Ci-Co-En-B-Gl-G; 24h
34. SILBmi210 ⁻²²	Patrón 30	0	5.89	2.27	Positivo	6.04	Ci-Co-En-M-+P; 24h
35. SILBmi210 ⁻¹⁶	Patrón 29	4.85	0.03	-	Negativo	0.67	Ci-Co-En-Bg/M-+++P-Cr; 24h
36. SILBmi210 ⁻²¹	Patrón 23	2.08	1.96	2.19	Positivo	7.86	Ci-Co-En-N-Cos-G; 24h
37. SILBmi210 ⁻²²	Patrón 3	12.01	9.55	2.63	Positivo	ND	Ci-Co-En-N-P; 24h
38. SILBmi210 ⁻²³	Patrón 19	6.11	7.24	2.35	Positivo	2.84	Ci-Co-En-C/N-Gl-P; 24h
39. SILBmi210 ⁻²⁴	Patrón 27	0.24	8.81	2.26	Positivo	5.95	Ci-Co-En-Bg-Com-De; 24h
40. SILBmi210 ⁻²⁵	Patrón 25	0	0	2.27	Positivo	2.64	Ci-Co-En-C/Bg-Cr; 24h
41. SILLBmi10 ⁻²¹	Patrón 111	0	1.45	2.37	Positivo	5.48	Ci-Co-En-N-Rd-De; 24h
42. SILLBmi10 ⁻²²	Patrón 111	0	3.11	2.19	Positivo	0.21	Ci-Co-En-Bg-P+++; 24h
Medio Luria Bertani (LB) rizóforo							
43. SILBRi210 ⁻²¹	Patrón 20	0	50.02	2.17	Positivo	15.62	Ci-Co-En-N/Dz-+++P; 24h
44. SILBRi210 ⁻²²	Patrón 21	47.87	55.13	2.47	Positivo	24.56	Ci-Co-En-N-Ag-Com; 24h
45. SILBRi210 ⁻²³	Patrón 32	0	13.68	-	Positivo	17.22	Ci-Co-En-B/T-Cr; 24h
46. SILBRi210 ⁻²⁴	Patrón 22	16.43	16.07	2.17	Positivo	2.34	Ci-Co-En-N-R-Com; 24h
47. SILBRi210 ⁻²⁵	Patrón 52	0.58	10.77	2.26	Positivo	2.76	Ci-Co-En-A-P; 24h
48. SILLBRi10 ⁻²¹	Patrón 109	0	3.49	2.33	Positivo	10.24	Ci-Co-En-N-Rd; 24h
49. SILLBRi10 ⁻²²	Patrón 107	0	0	-	Negativo	2.67	Ci-Co-En-Bg-Rd-P+; 24h
Medio Peptona Extracto de Levadura (PY) micrófila							
50. SIPYMi10 ⁻²⁴	Patrón 56	0	3.62	-	Positivo	20.01	Ci-Co-En-A Cl/Bg-P; 48h
51. SIPYMi10 ^{-24.1}	Patrón 57	0	3.04	2.33	Positivo	22.17	Ci-Co-En-A-P; 48h
52. SIPYMi110 ⁻¹¹	Patrón 70	0	0	2.47	Positivo	19.33	Ci-Co-En-B-Cr-L; 24/48h
53. SIPYMi110 ⁻¹³	Patrón 61	4.16	0	-	Positivo	0.003	Ci-Co-En-A/Bg-Gl-P; 48h
54. SIPYMi110 ⁻¹⁴	Patrón 57	0	0	2.22	Positivo	1.46	Ci-Co-En-A-D; 48h
55. SIPYMi110 ⁻²¹	Patrón 68	35.82	51.53	2.42	Positivo	25.75	Ci-Co-En-A Fl-Com; 24h

56. SIPYMi110 ⁻²²	Patrón 67	32.04	20.48	-	Positivo	-	Ci-Co-En-A BI-P-Com-V; 24h
57. SIPYMi110 ⁻²³	Patrón 69	28.41	19.65	-	Positivo	-	Ci-Co-En-A CI-Com; 24h
58. SIPYMi110 ⁻²⁴	Patrón 57	22.35	46.25	-	Positivo	7.25	Ci-Co-En-A CI; 48h
59. SIPYMi110 ⁻³³	Patrón 61	13.69	52.28	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A/C-P; 48h
60. SIPYMi210 ⁻¹¹	Patrón 61	8.82	49.69	-	Positivo	4.27	Ci-Co-En-N-Cr; 48h
61. SIPYMi210 ⁻²¹	Patrón 43	0.77	10.47	2.25	Positivo	6.52	Ci-Co-En-N/A O-GI; 24/48h
62. SIPYMi210 ^{-21.1}	Patrón 74	0.82	5.25	2.8	Positivo	1.84	Ci-Co-En-B-Com; 24/48h
63. SIPYMi210 ⁻²²	Patrón 72	1.39	1	-	Positivo	7.12	Ci-Co-En-B-P-Com; 24/48h
64. SIPYMi210 ⁻²³	Patrón 61	8.6	1.25	-	Positivo	7.03	Ci-Co-En-T/A-P; 24/48h
65. SIPYMi210 ⁻²⁴	Patrón 43	0	1.22	2.41	Positivo	ND	Ci-Co-En-B/A O-R-P; 24/48h
66. SIPYMi210 ⁻³²	Patrón 63	31.21	37.05	2.19	Positivo	ND	Ci-Co-En-A+++P-Com; 24/48h
67. SIPYMi210 ^{-32.1}	Patrón 63	40.57	38.84	2.43	Positivo	29.5	Ci-Co-En-A+++P-Com; 24/48h
68. SIPYMi210 ⁻³⁴	Patrón 54	21.03	49.42	-	Positivo	-	PI-En-N-S-L-Puntos; 48h
69. SIPYMi210 ⁻³⁵	Patrón 58	1.35	36.55	2.98	Negativo	-	Ci-Co-En-Ng-P-Cr; 48h
70. SIPYMi210 ⁻³⁶	Patrón 59	1.41	36.5	2.33	Positivo	1.18	Ci-Co-En-Ng-P-R; 48h
71. SILPYMi10 ⁻²¹	Patrón 107	0	0	2.31	Positivo	2.9	Ci-Co-En-A-Rd-De; 24h
72. SILPYMi10 ⁻²²	Patrón 107	1.37	4.29	-	Positivo	0.36	Ci-Co-En-A-Rd; 24h
73. SILPYMi10 ⁻²³	Patrón 110	0.16	0.35	X	NC	ND	Ci-Co-En-B-P+++; 24h
Medio Peptona Extracto de Levadura (PY) rizóforo							
74. SIPYRi110 ^{-1*}	Patrón 71	10.24	1.29	-	Positivo	2.45	Ci-Co-En-B/M-Cr+++P-GI; 24h
75. SIPYRi110 ⁻²²	Patrón 65	2.93	13.73	2.37	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-R-Com; 24h
76. SIPYRi110 ⁻²¹	Patrón 75	0	4.09	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-R-GI-Ag; 24h
77. SIPYRi110 ⁻²²	Patrón 60	0	1.26	-	Negativo	2.01	Ci-Co-En-T/B-Rd+++P; 24h
78. SIPYRi110 ⁻²³	Patrón 76	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-Com-Cr; 24h
79. SIPYRi110 ⁻²⁴	Patrón 53	0	0	2.37	Positivo	0.88	Ci-Co-En-A O-R-Cos-S-P; 24h
80. SIPYRi110 ⁻²⁶	Patrón 51	0	1.75	-	Positivo	-	Ci-Co-En-M-Cr-Com-GI; 24/48h
81. SIPYRi110 ⁻²⁷	Patrón 62	0	6.93	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A/B-P; 48h
82. SIPYRi110 ⁻³¹	Patrón 73	0	2.16	-	Negativo	0.08	Ci-Co-En-T/B+++P; 48h
83. SIPYRi110 ⁻³²	Patrón 55	0	6.16	-	Negativo	-	PI-En-T/N-L-S; 48h
84. SIPYRi110 ⁻³⁴	Patrón 78	0	1.45	-	Positivo	0.99	Ci-Co-En-B/M-Com; 48h
85. SIPYRi110 ⁻³⁵	Patrón 66	0	1.95	-	Positivo	-	Ci-Co-En-A/N-P; 48h
86. SIPYRi110 ⁻¹	Patrón 49	0.53	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-P-Com; 24h
87. SIPYRi110 ⁻²²	Patrón 49	0.11	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-Com; 24h
88. SIPYRi110 ⁻³¹	Patrón 49	0.28	0.28	-	Positivo	6.12	Ci-Co-En-M-Rd-Com; 24h

89.	SIPYRi110 ⁻³ 2	Patrón 64	19.37	14.57	2.18	Positivo	1.9	Ci-Co-En-A O-P-Rd; 24h
90.	SIPYRi110 ⁻³ 3	Patrón 112	0	2.52	-	Positivo	-	Ci-Co-En-B-Cr-Gl-P; 48h
91.	SIPYRi110 ⁻³ 4	Patrón 75	6.58	0	3.67	Positivo	11.45	Ci-Co-En-B-P; 24h
92.	SIPYRi110 ⁻³ 5	Patrón 62	0	0	2.3	Positivo	4.31	Ci-Co-En-A O-Rd-Com; 48h
93.	SILPYRi110 ⁻² 1	Patrón 107	0.33	4.09	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Rd; 24h
94.	SILPYRi110 ⁻² 2	Patrón 110	0	0.99	-	Negativo	ND	Ci-Co-En-A; 24h
95.	SILPYRi110 ⁻² 3	Patrón 110	0	0	-	Negativo	ND	Ci-Co-En-A/N Osc caja-G-V; 24h
Medio Agar Papa Dextrosa (PDA) micrófila								
96.	SIPDAMi10 ⁻² 1	Patrón 33	1.25	3.8	-	Negativo	31.03	Ci-Co-En-Bg/M-Cr-Gl; 24h
97.	SIPDAMi10 ⁻² 1.1	Patrón 34	0	3.58	-	Positivo	24.21	Ci-Co-En-M-Cr-Poca; 48h
98.	SIPDAMi10 ⁻³ 2	Patrón 40	0	6.5	2.9	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
99.	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
100.	SIPDAMi110 ⁻² 2	Patrón 35	0.91	11.16	-	Positivo	3.25	Ci-Co-En-A-Gl-Cr-An; 48h
101.	SIPDAMi110 ⁻² 3	Patrón 40	3.05	7.83	2.67	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
102.	SIPDAMi110 ⁻² 4	Patrón 42	0.17	5.02	3.08	Positivo	-	Ci-Co-En-A-Com-Ag; 48h
103.	SIPDAMi110 ⁻³ 3	Patrón 35	10.39	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A/Bg-Gl-G; 48h
104.	SIPDAMi110 ⁻³ 4	Patrón 77	1.28	9.74	2.58	Positivo	0.4	Ci-Co-En-A-P-Com; 48h
105.	SIPDAMi210 ⁻² 1	Patrón 44	0	3.73	2.27	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
106.	SIPDAMi210 ⁻² 2	Patrón 41	5.59	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
107.	SIPDAMi210 ⁻² 3	Patrón 44	2.48	3.12	2.35	Positivo	10.11	Ci-Co-En-A-Com; 48h
108.	SIPDAMi210 ⁻² 4	Patrón 36	0.68	1.59	2.96	Negativo	-	Ci-Co-En-B/M-V-An; 48h
109.	SILPDAMi10 ⁻² 1	Patrón 113	3.28	12.93	2.46	Positivo	6.6	Ci-Co-En-T centro B-V-Gl; 24h
110.	SILPDAMi10 ⁻¹ 1	Patrón 65	8.92	18.43	2.22	Positivo	1.1	Co-En-T-V-Gl-Cos; 24h
111.	SILPDAMi10 ⁻³ 1	Patrón 110	0	0.7	2.23	Positivo	0.03	I-T centro B-Gl-V; 24h
112.	SILPDAMi10 ⁻² 2	Patrón 110	0	2.18	X	NC	ND	I-T centro B-Gl-V; 24h
Medio Agar Papa Dextrosa (PDA) rizóforo								
113.	SIPDARi10 ⁻¹ 1	Patrón 45	1.77	3.77	2.35	Positivo	5.51	Ci-Co-En-A-P-Com; 48h
114.	SIPDARi10 ⁻¹ 2	Patrón 38	29.1	34.34	3.42	Positivo	12.88	Ci-Co-En-Bg-V-Gl-G-MC; 48h
115.	SIPDARi10 ⁻¹ 3	Patrón 46	17.07	24.49	2.32	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-V; 48h
116.	SIPDARi10 ⁻² 1	Patrón 47	3.05	6.51	2.67	Positivo	-	Ci-Co-En-B-S-R-P-Poca; 48h
117.	SIPDARi10 ⁻² 2	Patrón 37	0	2.56	-	Positivo	10.18	Ci-Co-En-B-V-Gl-MC; 48h
118.	SIPDARi210 ⁻¹ 1	Patrón 114	0.97	3.07	X	NC	ND	No creció
119.	SIPDARi210 ⁻² 1	Patrón 48	0.46	4.22	-	Positivo	15.78	Ci-Co-En-B-Ag-Rd; 48h
120.	SIPDARi210 ⁻² 2	Patrón 49	0	0.32	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-Ag-Rd; 48h

121.	SIPDAHRi4	Patrón 50	3.07	0	3.83	Positivo	13.51	Ci-Co-En-B-Rd; 48h
122.	SIPDAHRi16	Patrón 39	17.03	36.34	-	Positivo	3.87	Ci-Co-En-B-V-Gl; 48h
123.	SILPDARi10 ⁻²¹	Patrón 49	0	2.08	-	Positivo	ND	I-Gl-V; 24h
124.	SILPDARi10 ⁻²²	NP	NP	NP	NP	NP	NP	I-Gl-V; 24h

Lista de cepas aisladas de *Selaginella lepidophylla* en estado deshidratado.

Medio Agar Nutritivo (AN) micrófila							Fenotipo y tiempo de crecimiento	
1.	2SIANMi10 ⁻¹¹ *	Patrón 88	41.77	49.16	3.39	Positivo	13.14	Ci-Co-En-A/N-P-Ag-L; 24h
2.	2SIANMi10 ⁻¹² *	Patrón 84	24.39	43.63	-	Positivo	0.02	Ci-Co-En-B-P-Rd; 24h
3.	SSIANMi10 ⁻¹¹	Patrón 90	39.29	46.78	2.74	Positivo	18.11	Ci-Co-En-A Cl-Rd-P+++; 24h
4.	SSIANMi10 ⁻¹²	Patrón 100	2.69	3.83	-	Positivo	19.3	Ci/I-Co-En-B-Cr-V-Gl; 24h
5.	SSIANMi10 ⁻²¹	Patrón 98	1.05	11.7	2.34	Positivo	6.37	Ci-Co-En-A Fl-P+++-L-S; 24h
Medio Agar Nutritivo (AN) rizóforo								
6.	2SIANRi10 ⁻¹¹	Patrón 99	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A Cl-P+++-S-L; 48h
7.	SSIANRi10 ⁻¹¹	Patrón 102	0	0	-	Negativo	ND	Ci-Co-En-B/Bg-P+++-L-S; 24h
8.	SSIANRi10 ⁻¹²	Patrón 89	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-Cos-R-D-V-Gl; 24h
Medio Luria Bertani (LB) micrófila								
9.	2SILBMi10 ⁻¹¹ *	Patrón 101	44.44	50.73	3.18	Positivo	9.3	Ci-Co-En-A-G-Rd-Com-De-El; 24h
10.	2SILBMi10 ⁻¹²	Patrón 87	25.68	40.38	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B/C-Rd-Ag-P-De-El; 24h
11.	2SILBMi10 ⁻¹³	Patrón 79	14.25	18.73	2.41	Positivo	-	Ci-Co-En-A-P; 24h
12.	2SILBMi10 ⁻¹⁴	Patrón 86	24.41	17.61	-	Positivo	0.07	Ci-Co-En-B-P-Ag; 24h
13.	SSILBMi10 ⁻¹¹	Patrón 79	18.82	34.92	-	Positivo	0.59	Ci-Co-En; 24/48h
14.	SSILBMi10 ⁻¹²	Patrón 101	1.24	30.02	2.26	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-P+++; 24h
15.	SSILBMi10 ⁻¹³	Patrón 101	30.31	38.47	2.42	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-P-Rd-Com-R-El
Medio Luria Bertani (LB) rizóforo								
16.	2SILBRi10 ⁻¹¹ *	Patrón 83	10.88	26.49	-	Negativo	-	Ci-Co-En-A Fl-P+++-S-Ag; 48h
17.	2SILBRi10 ⁻¹² *	Patrón 74	-	-	X	NC	ND	Ci-Co-En-B/T-P-Rd; 48h
18.	2SILBRiv10 ⁻¹¹	Patrón 15	9.3	18.33	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-Bg-G-V; 24h
Medio Peptona Extracto de Levadura (PY) micrófila								
19.	2SIPYMi10 ⁻¹¹ *	Patrón 74	19.14	11.52	-	Positivo	0.04	Ci-Co-En-B-P-Com-D; 24h
20.	2SIPYMi10 ⁻¹² *	Patrón 79	10.34	32.91	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-P-Com-D; 24h
21.	2SIPYMi10 ⁻¹³	Patrón 94	0	0.71	-	Positivo	5.53	I-Co-En-A Fl-El-Cos-Cr-V-Gl; 24h
22.	2SIPYMi10 ⁻¹⁴	Patrón 92	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-P-S-L; 24h
23.	2SIPYMi10 ⁻¹⁵	Patrón 93	0	11.04	-	Positivo	0.42	Ci-Co-En-A/N Fl-Cr-P+++; 24h
24.	2SIPYMi10 ⁻¹⁶	Patrón 96	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-Rs-P+++-L-S; 24h

25.	2SIPYMi10 ⁻¹⁷	Patrón 74	11.92	7.14	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-P-El; 24h
26.	SSIPYMi10 ⁻¹¹	Patrón 96	34.69	47.88	2.96	Positivo	15.66	Ci-Co-En-A Cl-Rd-De-Com; 24h
27.	SSIPYMi10 ⁻²¹	Patrón 87	41.66	47.58	2.33	Positivo	13.97	Ci-Co-En-A-Rd-Gl; 24h
Medio Peptona Extracto de Levadura (PY) rizóforo								
28.	2SIPYRi10 ⁻¹¹ *	Patrón 81	8.27	41	-	Positivo	1.35	Ci-Co-En-B-P-V-Gl-Com-Cr-D; 24h
29.	2SIPYRi10 ⁻¹²	Patrón 104	25.18	45.87	-	Negativo	0.21	Ci-Co-En-M/A-G-V-Gl-R; 24h
30.	2SIPYRi10 ⁻¹³	Patrón 80	24.96	41.7	-	Positivo	0.32	Ci-Co-En-B-G-S-R-Com-D; 24h
31.	2SIPYRiv10 ⁻¹¹	Patrón 82	0	42.16	-	Positivo	-	Ci-Co-En-B-D-R; 24h
32.	2SIPYRiv10 ⁻¹²	Patrón 85	20.89	43.52	-	Positivo	0.02	Ci-Co-En-B-Cr-V; 24h
33.	2SIPYRiv10 ⁻¹³	Patrón 87	-	-	X	NC	ND	Ci-Co-En-B/M-Gl-Cr; 24h
34.	2SIPYRin10 ⁻¹¹	Patrón 87	-	-	X	NC	ND	I-Co-En-Bg-R-G-Gl-Cr; 24h
35.	SSIPYRi10 ⁻¹¹	Patrón 87	0	6.38	-	Positivo	0.03	Ci-Co-En-B-P+++Com-De; 24h
Medio Agar Papa Dextrosa (PDA) micrófila								
36.	SSIPDAMi10 ⁻¹¹	Patrón 90	5.66	17.22	2.37	Positivo	ND	Ci-Co-En-A Cl-P+++L-S; 24h
37.	SSIPDAMi10 ⁻¹²	Patrón 74	-	-	2.32	NC	ND	Ci-Co-En-B/T-P+++Gl; 24h
38.	SSIPDAMi10 ⁻¹³	Patrón 97	0	23.03	2.36	Positivo	5.32	Ci-Co-En-A-P+++Gl; 24h
39.	SSIPDAMi10 ⁻¹⁴	Patrón 91	33.61	41.85	2.29	Positivo	ND	I-Co-En-Bg-R-Gl-V-De-An; 24h
Medio Agar Papa Dextrosa (PDA) rizóforo								
40.	2SIPDARi10 ⁻¹¹ *	Patrón 95	-	-	2.97	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-P-S-L; 48h
41.	2SIPDARiv10 ⁻¹¹	Patrón 103	-	-	X	NC	ND	Ci-Co-En-B-P-S-L; 24h

Notas de las abreviaciones de la tabla: NC: No creció, ND: No determinada, NP: No presente.

12.4 Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA) de las bacterias endófitas

La determinación de la producción de AIA se realizó en el medio de cultivo Jain & Patriquin (JP) con y sin triptófano (Trp), midiendo la densidad óptima a las 24 y 48h para determinar la cantidad de AIA producido o consumido por los aislados bacterianos. Se empleó como control la cepa *Azospirillum brasilense* Cd y *Pseudomonas lutea*, esta última según lo reportado por Torreblanca, 2017 presenta alta producción. La **Tabla 7** presenta los aislados que no crecieron, no producen y los productores de AIA así como su porcentaje correspondiente. La producción de AIA se encuentra detalladamente en la **Tabla 6**, a continuación se ejemplifican los aislados más representativos para ambas épocas. Los 122 aislados bacterianos inoculados en medio JP sin Trp en época de lluvias para las 24 y 48h no tuvo ningún productor a excepción del aislado SIPDARi10⁻²1 (116) con 1.62 µg/ml a las 48h (0.81% del total de los aislados) y el aislado SIPDARi210⁻¹1 (118) no creció. Para los 41 aislados en época de estiaje a las 24 y 48h ninguno fue productor y 6 aislados no crecieron (2SILBRi10⁻¹²*, 17s; 2SIPYRiv10⁻¹³, 33s; 2SIPYRin10⁻¹1, 34s; SSIPDAMi10⁻¹², 37s; 2SIPDARi10⁻¹1*, 40s; y 2SIPDARiv10⁻¹1, 41s). De los 122 aislados bacterianos inoculados en medio JP con Trp en época de lluvias a las 24h, 71 aislados producen AIA (58.19% del total de los aislados). El mayor productor fue SILBRi210⁻²2 (44) con 47.87 µg/ml y el menor productor fue SIPYRi110⁻²2 (87) con 0.11 µg/ml. A las 48h, aumento el número de aislados productores a 101 (82.78% del total de los aislados). El mayor productor nuevamente es el aislado 44 con 55.13 µg/ml y el menor productor fue SILBmi210⁻¹6 (35) con 0.037 µg/ml. Para los 41 aislados bacterianos en época de estiaje a las 24h, 25 aislados son productores de AIA (60.97% del total de aislados). El mayor productor fue 2SILBmi10⁻¹1* (9s) con 44.44 µg/ml y el menor productor fue SSIANMi10⁻²1 (5s) con 1.05 µg/ml. A las 48h, aumento el número de productores de AIA a 30 (73.17% del total de los aislados). El mayor productor nuevamente es el aislado 9s con 50.73 µg/ml y el menor productor fue 2SIPYMi10⁻¹³ (21s) con 0.71 µg/ml. Al igual que en el medio JP sin Trp nuevamente 6 aislados no crecieron.

Tabla 7. Aislados bacterianos relacionados con la producción de ácido indolacético (AIA).

Época	Jain & Patriquin	Tiempo	No crecieron	No producen	Producen	Porcentaje
Lluvias	Sin triptófano	24h	1	121	0	0%
		48h	1	120	1	0.81%
Estiaje		24h	6	35	0	0%
		48h	6	35	0	0%
Lluvias	Con triptófano	24h	0	51	71	58.19%
		48h	0	21	101	82.78%
Estiaje		24h	6	10	25	60.97%
		48h	6	5	30	73.17%

Los aislados bacterianos se clasificaron de acuerdo a sus niveles de producción de AIA (**Tabla 8**) como bajas productoras (1.0 a 10.9 µg/ml), medianas productoras (11.0 a 20.9 µg/ml) y altas productoras (21.0 a 30.9 µg/ml) (Ortega-Acosta *et al.*, 2017). Los aislados inoculados en medio JP sin Trp a las 24h no generó ningún productor, mientras que a las 48h en época de lluvias solo un aislado presentó baja producción. Los aislados bacterianos de la época de lluvias en el medio JP con Trp fueron bajas productoras con 69.01% (0.11 a 8.92

$\mu\text{g/ml}$) para las 24h y 62.37% (0.03 a 10.77 $\mu\text{g/ml}$) para las 48h. De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de $F= 134.24$ y $F= 101.25$ para las 24 y 48h respectivamente (**Figura 13**). Las medianas productoras con 12.67% (10.16 a 19.37 $\mu\text{g/ml}$) para las 24h y 12.87% (11.16 a 20.48 $\mu\text{g/ml}$) para las 48h. De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de $F= 216.58$ y $F= 68.21$ para las 24 y 48h respectivamente (**Figura 14**). Y las altas productoras con 18.30% (21.03 a 47.87 $\mu\text{g/ml}$) para las 24h y 24.75% (22.4 a 55.13 $\mu\text{g/ml}$) para las 48h. De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de $F= 928.53$ y $F= 743.69$ para las 24 y 48h respectivamente (**Figura 15**).

Los aislados bacterianos de la época de estiaje inoculados en medio JP con Trp a las 24h fueron bajas productoras con 32% (1.05 a 10.88 $\mu\text{g/ml}$) para las 24h y 13.33% (0.71 a 7.14 $\mu\text{g/ml}$) para las 48h. De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de $F= 846.92$ y $F= 83.27$ para las 24 y 48h respectivamente (**Figura 16**). Las medianas productoras con 20% (11.92 a 20.89 $\mu\text{g/ml}$) para las 24h y 23.33% (11.04 a 18.73 $\mu\text{g/ml}$) para las 48h. De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de $F= 262.4$ y $F= 235.02$ para las 24 y 48h respectivamente (**Figura 17**). Y las altas productoras con 48% (24.39 a 44.44 $\mu\text{g/ml}$) para las 24h y 63.33% (23.03 a 50.73 $\mu\text{g/ml}$) para las 48h. De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de $F= 586.38$ y $F= 703$ para las 24 y 48h respectivamente (**Figura 18**). Se aprecia que en la época de lluvias se tiene un mayor número de aislados con baja producción y un menor número de aislados con alta producción de AIA. Mientras que en época de estiaje es lo contrario, es decir se presenta un menor número de aislados con baja producción de AIA y un mayor número de aislados con alta producción de AIA. Este comportamiento se debe al sesgo por la diferencia en la cantidad de aislados bacterianos. Sin embargo, en proporciones de altas productores se encuentran muy similar en ambas épocas.

Tabla 8. Frecuencia de los aislados bacterianos de acuerdo a sus niveles de producción de AIA.

Niveles de AIA	Sin triptófano		Con triptófano			
	48h		24h		48h	
	Lluvias	Estiaje	Lluvias	Estiaje	Lluvias	Estiaje
Bajas productoras (1.0 a 10.9 $\mu\text{g/ml}$)	1 100%	0	49 69.01%	8 32%	63 62.37%	4 13.33%
Medianas productoras (11.0 a 20.9 $\mu\text{g/ml}$)	0	0	9 12.67%	5 20%	13 12.87%	7 23.33%
Altas productoras (21.0 a 30.9 $\mu\text{g/ml}$)	0	0	13 18.30%	12 48%	25 24.75%	19 63.33%

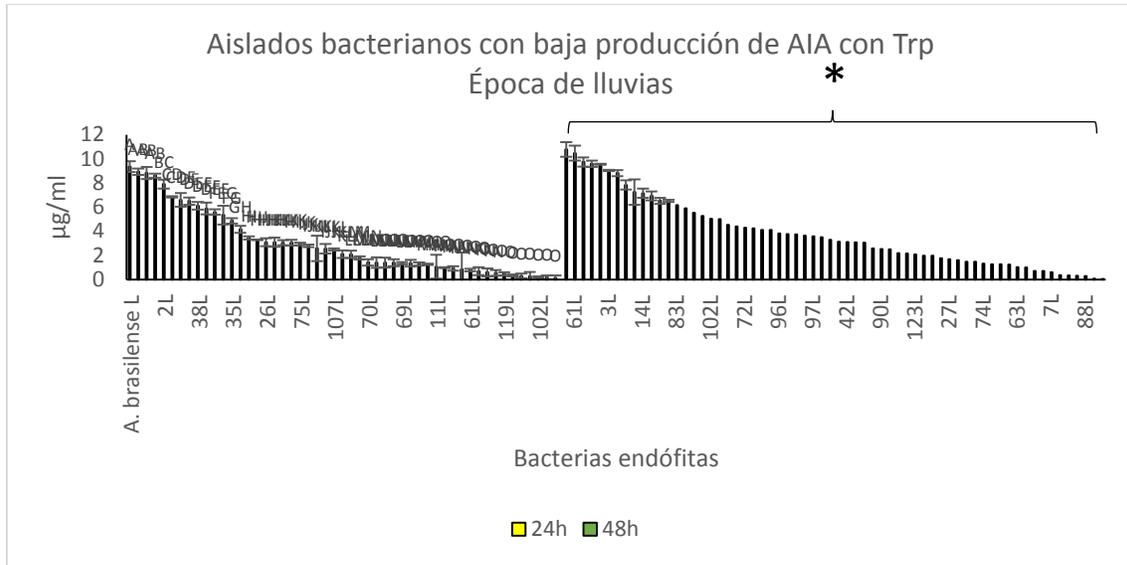


Figura 13. Cuantificación de los bajos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de lluvias. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

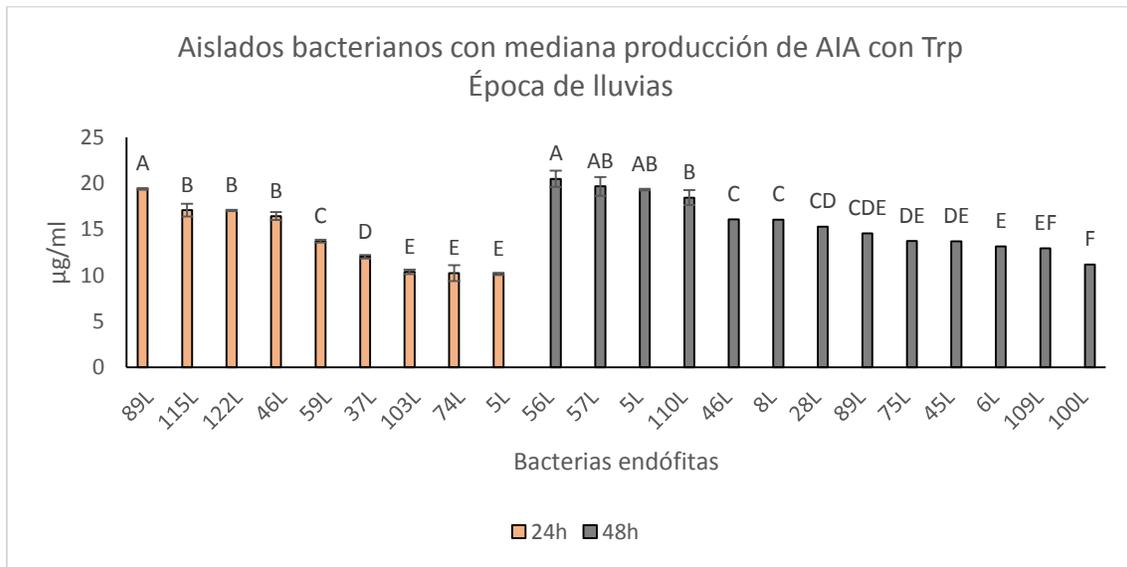


Figura 14. Cuantificación de los medianos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de lluvias. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

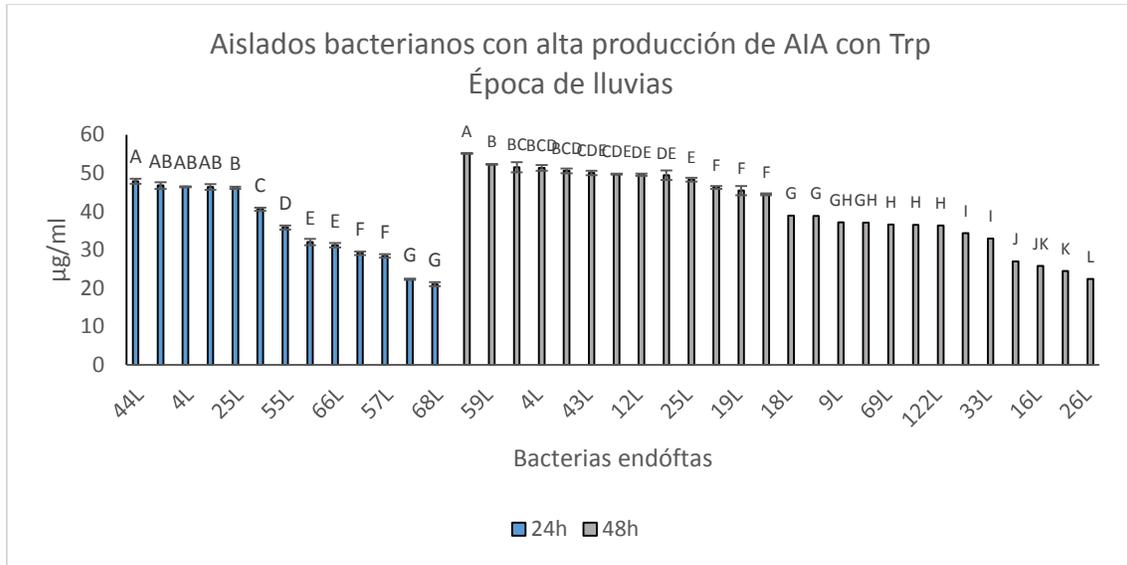


Figura 15. Cuantificación de los altos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de lluvias. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

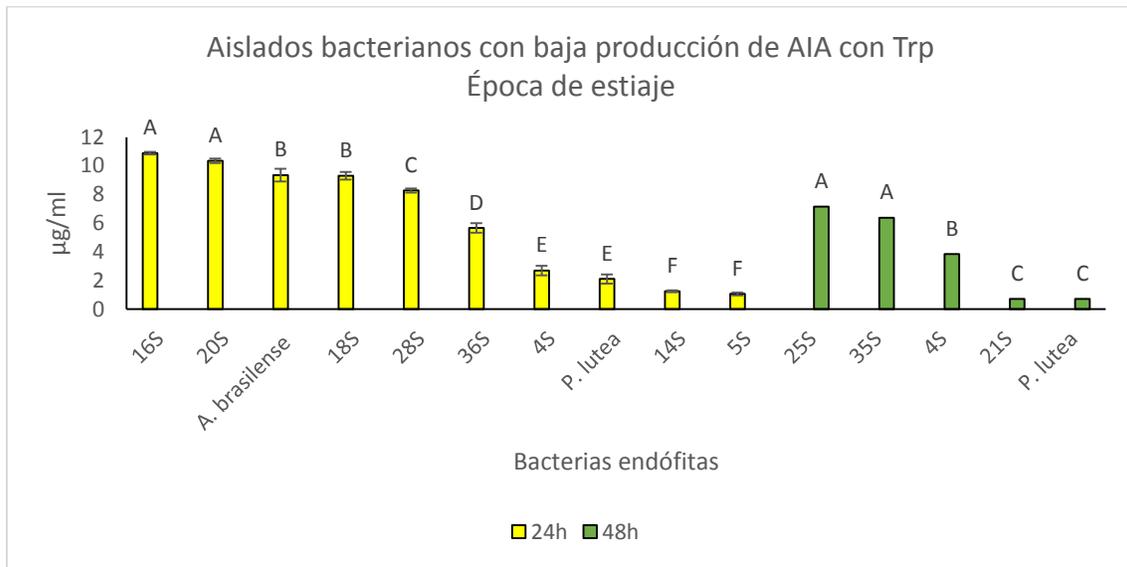


Figura 16. Cuantificación de los bajos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de estiaje. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

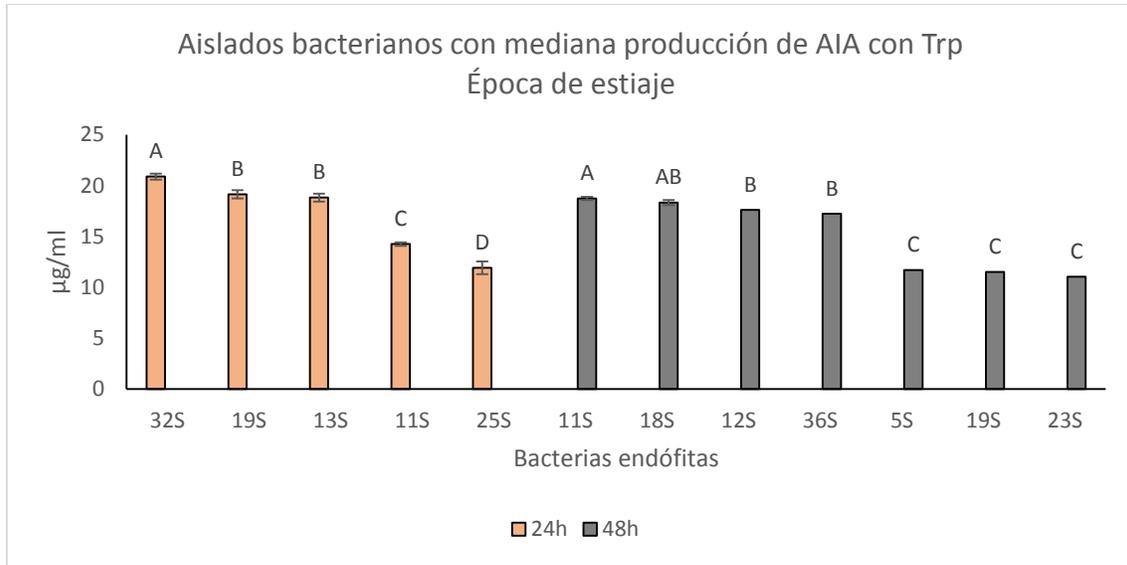


Figura 17. Cuantificación de los medianos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de estiaje. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

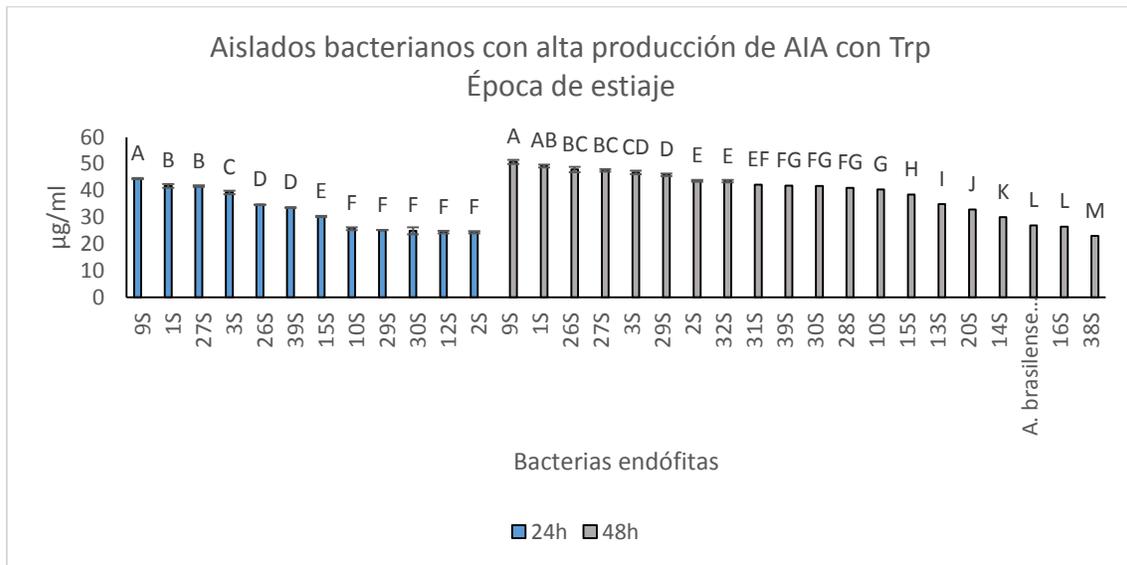


Figura 18. Cuantificación de los altos productores de AIA con Trp a las 24 y 48h para los aislados bacterianos de época de estiaje. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

La **Figura 19** presenta a los consumidores de AIA producido a las 24h. De los 16 aislados bacterianos presentes dos de ellos son control siendo *A. brasilense* Cd y *P. lutea*. La cepa de *A. brasilense* Cd no es consumidora del AIA, mientras que *P. lutea* sí es consumidora del compuesto. El resto de los aislados bacterianos se colectaron en ambas épocas, 11 de ellos para la época de lluvias y 3 para la época de estiaje. 13 aislados bacterianos, incluida *P. lutea* consumen el AIA drásticamente con valores de consumo de 12.64, 10.82, 8.09, 7.28, 7.12, 3.72, 2.92, 2.63, 2.57, 1.89, 1.65, 1.39 y 1.28 $\mu\text{g/ml}$ para los aislados 2SIPYMi10⁻¹*, 19s; SIPDAMi110⁻³3, 103; SIPYMi110⁻¹3, 53; SIPYMi110⁻²3, 57; 2SIPYMi10⁻¹7, 25s; SIPYMi110⁻²2, 56; SIPYRi110⁻³4, 91; SILB Mi210⁻²1, 36; SIPYRi110⁻¹, 86; SIPYRi110⁻²2, 87; 2SILB Mi10⁻¹4, 12s; *P. lutea* y SILB Mi10⁻²2, 29 respectivamente. Mientras que los 2 aislados restantes su consumo no fue mayor a 0.3 $\mu\text{g/ml}$, siendo de 0.25 y 0.08 $\mu\text{g/ml}$ para SIANRi110⁻¹1, 10; y SILB Mi210⁻²2, 37, respectivamente. De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de F= 321.07 y F= 3144.64 para las 24 y 48h, respectivamente.

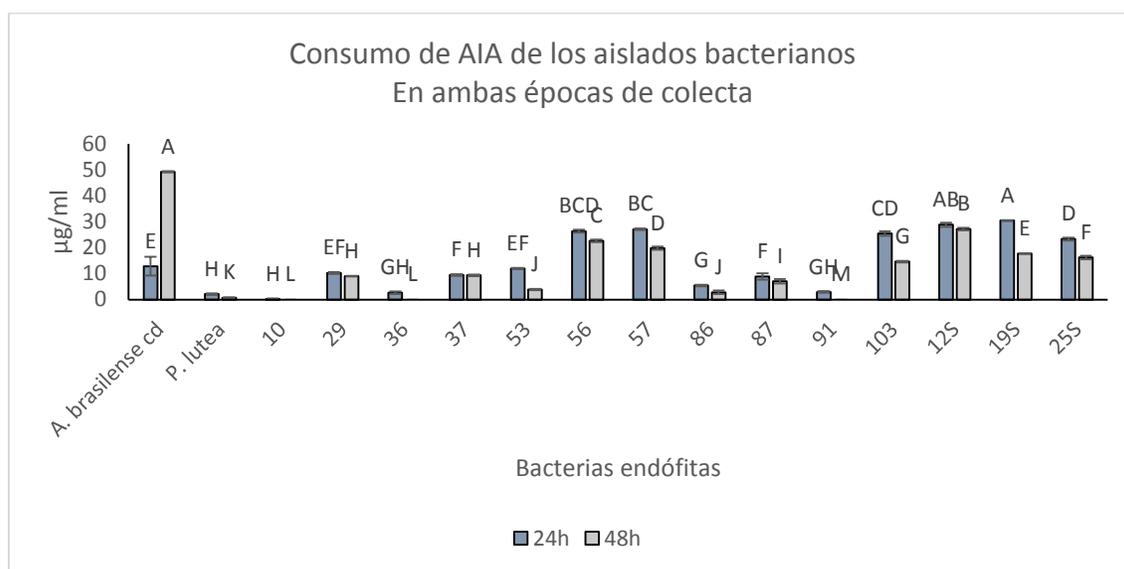


Figura 19. Consumo de AIA por parte de los aislados bacterianos en ambas épocas de colecta. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

12.5 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos de las bacterias endófitas

Para determinar la capacidad de solubilización de fosfatos (SP) de los aislados bacterianos se empleó el medio Pikovskaya's (PK) y se monitoreó por 7 días. Posteriormente se midió el halo indicativo de la SP expresado en milímetros (mm), determinando el cambio del medio de cultivo PK de blanco a transparente: (-) sin cambio de color; (\pm) <1.0; (+) 1.1 a 4.0; (++) 4.1 a 8.0 y (+++) >8.1 mm (Milagres *et al.*, 1999). En la **Tabla 9** se presenta los aislados

bacterianos que no crecieron, no solubilizan y los que solubilizan fosfatos así como su porcentaje correspondiente. En la época de lluvias 70 aislados solubiliaron el fosfato del medio de cultivo lo cual corresponde al 57.37% del total de los aislados en un rango de entre 2.17 a 3.83 mm (+). El aislado SIPDAHRi4 (121) fue el mayor solubilizador de fosfato con 3.83 mm y el menor fue SILBRi210⁻²4 (46) con 2.17 mm (**Figura 20**). De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de F= 14.43. Mientras que en la época de estiaje 14 aislados solubiliaron el fosfato del medio de cultivo siendo el 34.14% del total de aislados en un rango de entre 2.26 a 3.39 mm (+). El aislado 2SIANMi10⁻¹1* (1s) fue el mayor solubilizador de fosfato con 3.39 mm y el menor fue el aislado SSILB Mi10⁻¹2 (14s) con 2.26 mm (**Figura 21**). De acuerdo a los análisis estadísticos se presentaron diferencias significativas obteniendo un valor de F= 6.69. La **Figura 22** presenta una imagen representativa de los aislados bacterianos en ambas épocas de colecta (14 y 10 aislados bacterianos de lluvias y estiaje, respectivamente) con alta, media y baja SP en comparación con la cepa de *A. brasilense* Cd, la cual no presenta la capacidad de solubiliar fosfatos. La **Figura 22** presenta una imagen representativa de los aislados bacterianos en ambas épocas de colecta (14 y 10 aislados bacterianos de lluvias y estiaje, respectivamente) con alta, media y baja SP en comparación con la cepa de *A. brasilense* Cd, la cual no presenta la capacidad de solubiliar fosfatos.

Tabla 9. Aislados bacterianos relacionados con la solubilización de fosfato.

Época	No crecieron	No solubilizan	Solubilizan	Porcentaje
Lluvias	5	47	70	57.37%
Estiaje	4	23	14	34.14%

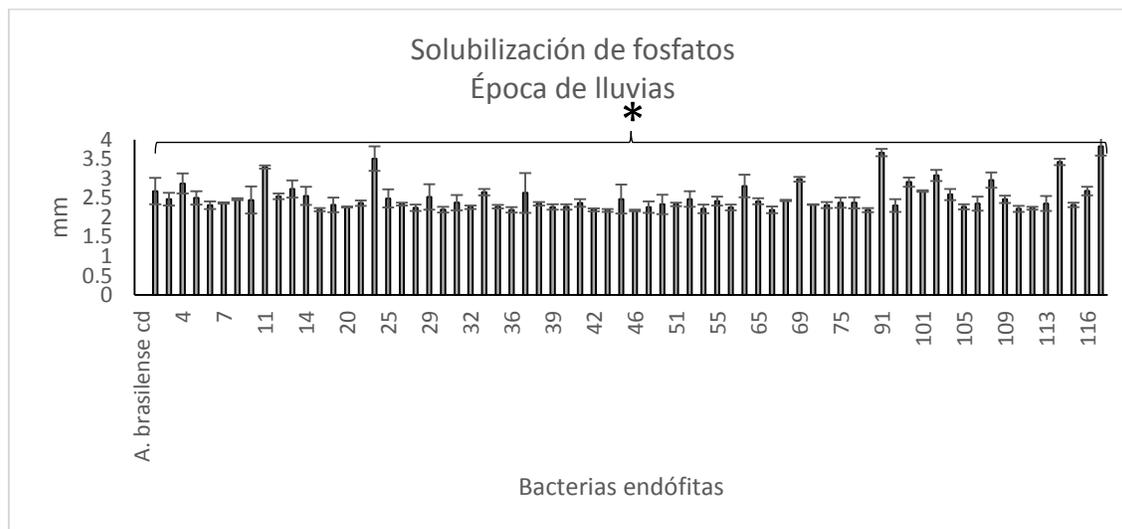


Figura 20. Solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos en época de lluvias. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($Pr > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

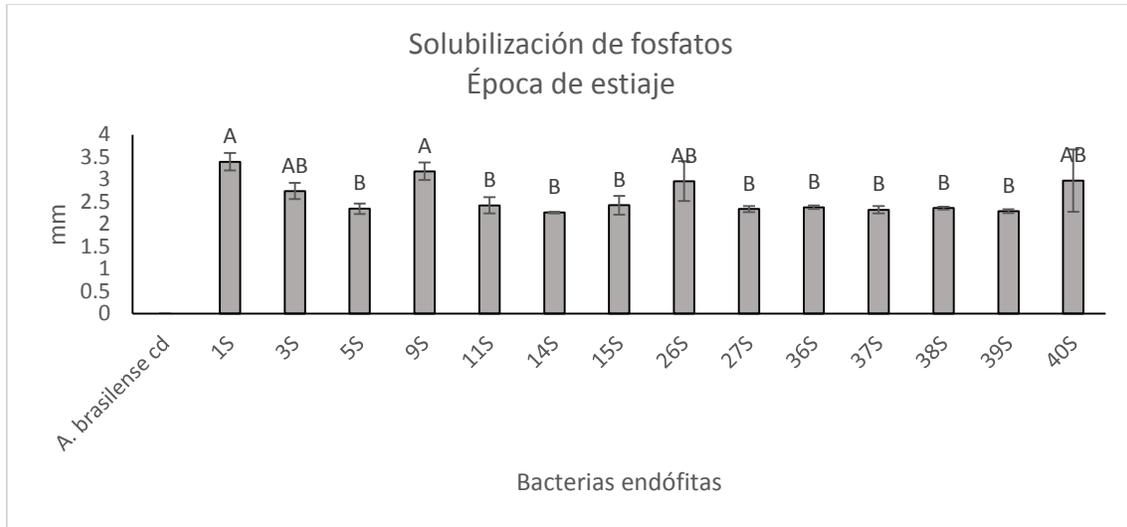


Figura 21. Solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos en época de estiaje. Las barras representan el valor de la media, las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la bacteria control fueron determinadas con un análisis ANOVA completamente al azar ($P > F = <0.0001$), seguido de un análisis de Tukey ($\alpha = 0.05$); las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

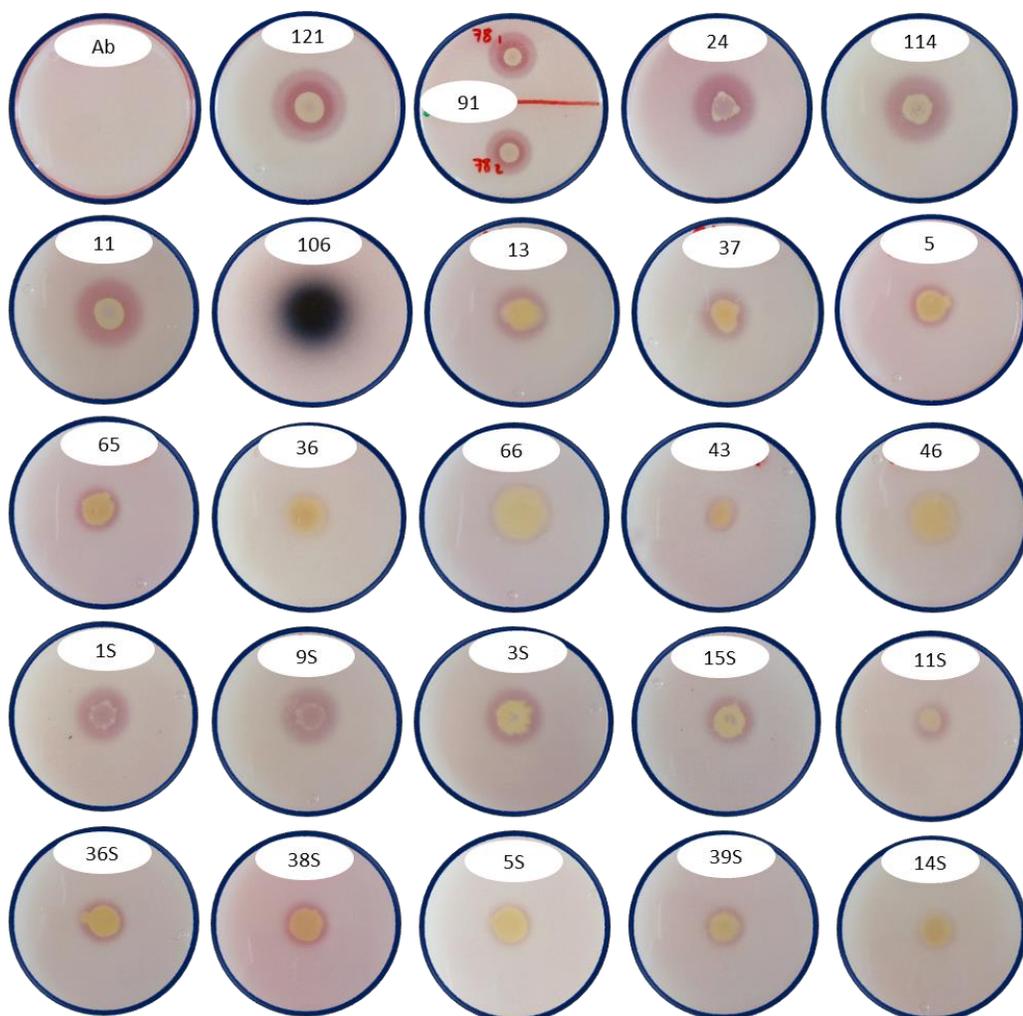


Figura 22. Imagen representativa de la solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos en ambas épocas. Ab, *A. brasilense* Cd; aislados de la época de lluvias (121, 91, 24, 114, 11, 106, 13, 37, 5, 65, 36, 66, 43 y 46); aislados de la época de estiaje (1s, 9s, 3s, 15s, 11s, 36s, 38s, 5s, 39s y 14s).

12.6 Determinación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de las bacterias endófitas

La inoculación de los aislados bacterianos fue en el medio semisólido NFb, se monitoreó por 10 días observando y agrupándose de acuerdo a la altura del halo de crecimiento (**Figura 23A**) y el cambio de color del medio (**Figura 23B**), el cual viraba de color amarillo a azul (intenso, I; medio, M y bajo, B). Se compararon los resultados con la cepa fijadora de nitrógeno *A. brasilense* Cd (Azul intenso 1). La **Tabla 10** presenta los aislados bacterianos con la capacidad de FBN. De los 163 aislados bacterianos el 81.59% (133 aislados) fueron positivos para la FBN. La época de lluvias obtuvo el 81.96% (100 aislados) y la época de estiaje el 80.48% (33 aislados). Se obtuvieron aislados no fijadores, siendo 17 aislados (13.93%) para la época de lluvias y 3 aislados (7.31%) para la época de estiaje. Para ambas épocas 5 aislados bacterianos no crecieron en el medio de cultivo semisólido NFb.

Tabla 10. Aislados bacterianos relacionados con la fijación biológica de nitrógeno.

Color vs altura de halo	Época			
	Lluvias	Porcentaje	Estiaje	Porcentaje
Intenso 1	36	29.5%	7	17.07%
Intenso 2	2	1.63%	1	2.43%
Intenso 3	1	0.81%	0	0%
Medio 1	13	10.65%	3	7.31%
Medio 2	9	7.37%	5	12.19%
Bajo 1	8	6.55%	7	17.07%
Bajo 2	10	8.19%	6	14.63
Bajo 3	8	6.55%	0	0%
Bajo 4	0	0%	1	2.43%
Amarillo 3	7	5.73%	0	0%
Amarillo sin halo	1	0.81%	0	0%
Azul sin halo	5	4.09%	3	7.31%
Total de FBN	100	81.96%	33	80.48%
Amarillo negativo	17	13.93%	3	7.31%
No crecieron	5	4.09%	5	12.19%

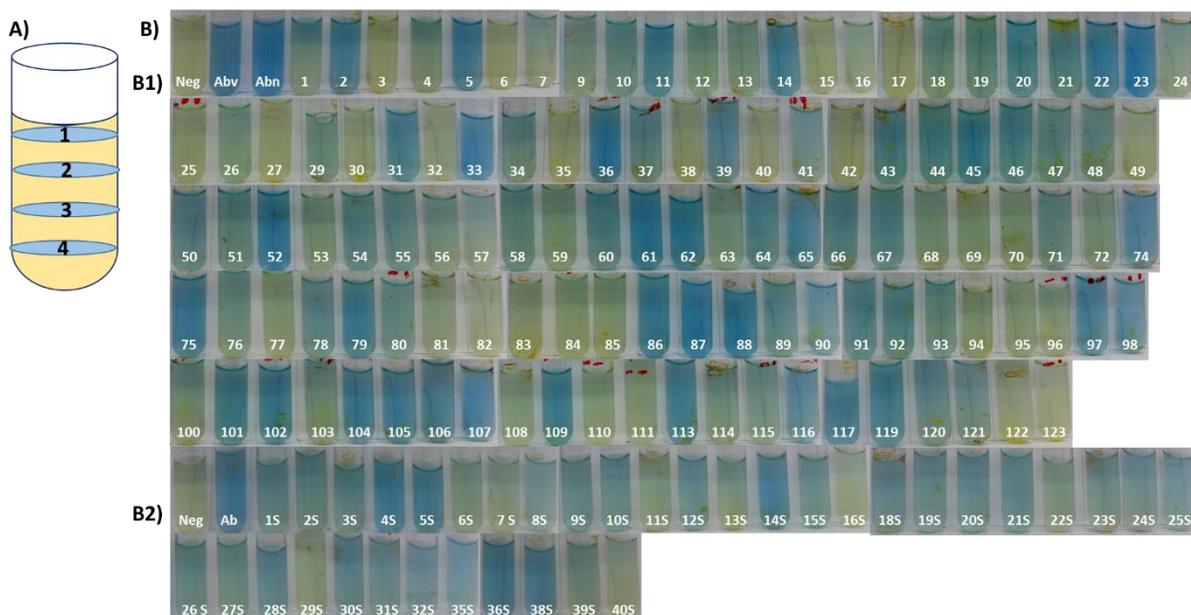


Figura 23. Fijación biológica de nitrógeno. A) Representación de la altura del halo indicativo de FBN en el tubo de ensayo. B) FBN de los aislados bacterianos. B1) Aislados fijadores de nitrógeno de la época de lluvias. B2) Aislados fijadores de nitrógeno de la época de estiaje.

12.7 Cuantificación de los niveles de trehalosa de las bacterias endófitas

Se seleccionaron los aislados bacterianos de acuerdo a los parámetros de PCV (AIA, SP y FBN) y el análisis de ERIC-PCR, siendo 97 aislados para la época de lluvias y 22 para la época de estiaje (**Tabla 11**). Los aislados bacterianos fueron crecidos en medio mínimo adicionado con 100 mM de NaCl, posteriormente la cuantificación de los niveles de trehalosa se realizó por HPLC. Se emplearon dos especies control, la cepa *A. brasilense* Cd con un

contenido de trehalosa de 2.58 $\mu\text{g/ml}$ y *Arthrobacter chlorophenolicus* con 48.77 $\mu\text{g/ml}$, esta última es una alta productora natural de trehalosa. En la época de lluvias se presentó un 88.65% de productores de trehalosa con un rango de 0.0038 a 35.75 $\mu\text{g/ml}$. El aislado SIANRi110⁻¹ (10) fue el mayor productor de trehalosa y SIPYMi110⁻¹³ (53) fue el menor productor (**Figura 24**). En época de estiaje se presentó un 86.36% de productores de trehalosa con un rango de 0.021 a 19.30 $\mu\text{g/ml}$. El aislado SSIANMi10⁻¹² (4S) fue el mayor productor de trehalosa y 2SIPYRiv10⁻¹² (32S) fue el menor productor (**Figura 25**).

Tabla 11. Aislados bacterianos relacionados con la producción de trehalosa.

Época	No presentan	Presentan	Porcentaje
Lluvias	11	86	88.65%
Estiaje	3	19	86.36%

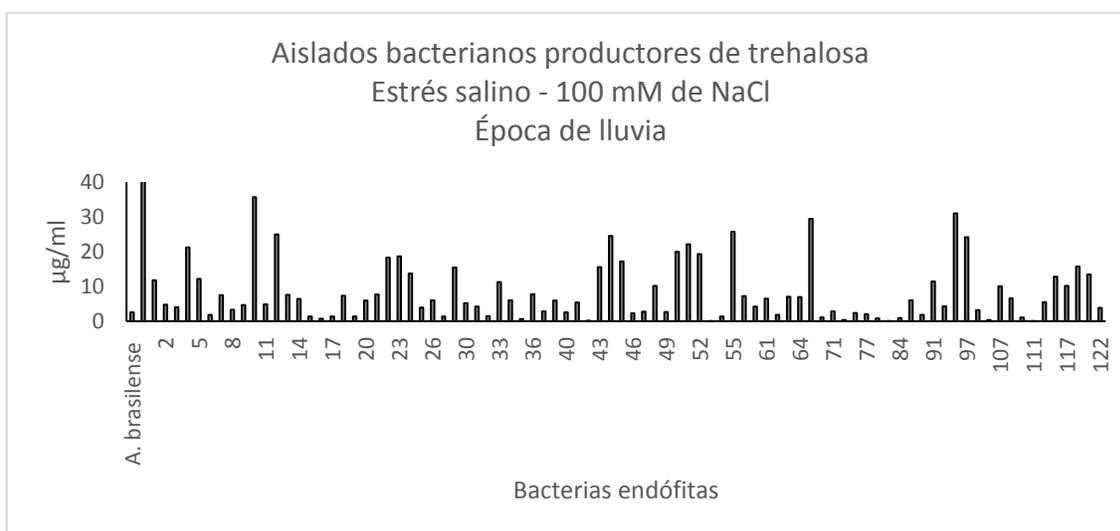


Figura 24. Cuantificación de los niveles de trehalosa de los aislados bacterianos en época de lluvias.

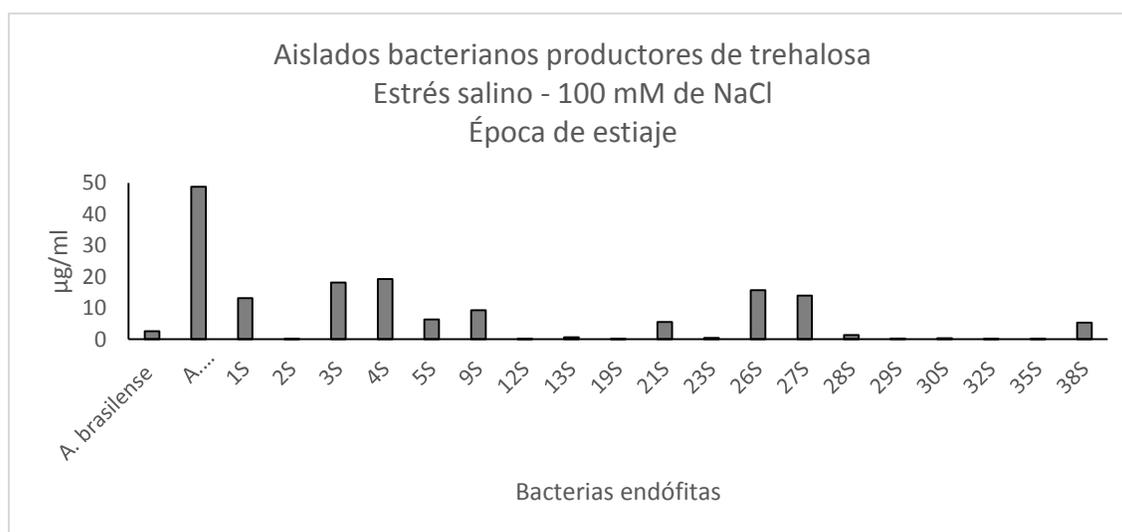


Figura 25. Cuantificación de los niveles de trehalosa de los aislados bacterianos en época de estiaje.

12.8 Candidatos para la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S

De acuerdo a la información previamente mencionada y detallada para cada uno de los experimentos y contenida en la **Tabla 6**, la cual engloba los parámetros generales para la caracterización de las bacterias endófitas. Identificamos candidatos para la amplificación y secuenciación del gen RNAr 16S, considerando para ambas épocas de colecta 3 condiciones (**Tabla 12**). 1) El contenido de trehalosa (20 aislados bacterianos), 2) el contenido de trehalosa, la producción de AIA y la solubilización de fosfatos (32 aislados bacterianos), y 3) características únicas (9 aislados bacterianos). Proponiendo en total a 61 aislados bacterianos para ambas épocas de colecta, de los cuales para la época de lluvias se consideraron 46 aislados y para la época de estiaje 15 aislados.

Tabla 12. Aislados bacterianos para la amplificación y secuenciación del gen RNAr 16S.

Época de lluvias		
Condición	Nombre y número del aislado bacteriano	Subtotal
Condición 1	SIANMi210 ⁻² 2, 4; SIANRi110 ⁻¹ 1, 10; SIANRi110 ⁻¹ 3, 12; SILBRi210 ⁻² 2, 44; SIPYMi10 ⁻² 4, 50; SIPYMi10 ⁻² 4.1, 51; SIPYMi110 ⁻² 1, 55; SIPYMi210 ⁻³ 2.1, 67; SIPDAMi10 ⁻² 1, 96 y SIPDAMi10 ⁻² 1.1 97.	10
Condición 2	SIANMi10 ⁻¹ 1, 1; SIANMi10 ⁻² 1, 2; SIANMi210 ⁻² 3, 5; SILANMi10 ⁻² 1, 6; SIANRi10 ⁻² 3.1, 9; SIANRi110 ⁻¹ 2, 11; SIANRi110 ⁻¹ 5, 14; SIANRi110 ⁻² 3, 18; SIANRi110 ⁻² 5, 20; SIANHRi3, 25; SILANRi10 ⁻² 1, 26; SILBMi10 ⁻² 2, 29; SILBMi110 ⁻¹ 2, 30; SILBMi210 ⁻¹ 1, 33; SILBMi210 ⁻² 1, 36; SILBMi210 ⁻² 4, 39; SILBRi210 ⁻² 4, 46; SILBRi210 ⁻² 5, 47; SIPYMi210 ⁻² 1, 61; SIPYMi210 ⁻² 1.1, 62; SIPYRi110 ⁻³ 2, 89; SIPDAMi110 ⁻³ 4, 104; SIPDAMi210 ⁻² 3, 107; SILPDAMi10 ⁻² 1, 109; SILPDAMi10 ⁻¹ 1, 110; SILPDAMi10 ⁻³ 1, 111, SIPDARi10 ⁻¹ 1, 113 y SIPDARi10 ⁻¹ 2, 114.	28
Condición 3	SIANRi210 ⁻² 3, 24; SILBMi210 ⁻² 3, 38; SILBMi210 ⁻² 5, 40; SIPYMi110 ⁻³ 3, 59; SIPYMi210 ⁻³ 5, 69; SIPYMi210 ⁻³ 6, 70; SIPDAMi210 ⁻² 2, 106 y SIPDARi10 ⁻² 1, 116.	8
Total de aislados bacterianos		46
Época de estiaje		
Condición 1	2SIANMi10 ⁻¹ 1*, 1; SSIANMi10 ⁻¹ 1, 3; SSIANMi10 ⁻¹ 2, 4; SSIANMi10 ⁻² 1, 5; 2SILBMi10 ⁻¹ 1*, 9; 2SIPYMi10 ⁻¹ 3, 21; SSIYMi10 ⁻¹ 1, 26; SSIYMi10 ⁻² 1, 27; 2SIPYRi10 ⁻¹ 1*, 28 y SSIPDAMi10 ⁻¹ 3, 38.	10
Condición 2	SSILBMi10 ⁻¹ 2, 14; SSILBMi10 ⁻¹ 3, 15; SSIPDAMi10 ⁻¹ 1, 36 y SSIPDAMi10 ⁻¹ 4, 39.	4
Condición 3	2SILBMi10 ⁻¹ 2, 10.	1
Total de aislados bacterianos		15

13. Discusión

Para obtener un incremento de la productividad de los suelos agrícolas para la alimentación de la población mundial, ha sido necesario el uso de fertilizantes químicos. Sin embargo, el uso prolongado de este tipo de compuestos ha ocasionado el deterioro y contaminación de los suelos, así como un decremento de la diversidad bacteriana. Diversas estrategias son necesarias para revertir el efecto nocivo ocasionado a los suelos, por lo que en los últimos años se ha buscado el fortalecimiento de los campos de cultivo por medio de diversos métodos. Una estrategia recientemente utilizada es el uso de microorganismos asociados a plantas que promueven ventajas directas e indirectas. Las bacterias endófitas Gram negativas están asociadas generalmente al control biológico, mientras que las Gram positivas a la PCV, dentro de los principales géneros descritos en la literatura encontramos a *Bacillus*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Trivedi *et al.*, 2017). Una de las vías para incrementar la sustentabilidad de los suelos es el uso de microorganismos movilizadores de nutrientes para reducir la necesidad y la dependencia de los fertilizantes químicos. Los endófitos bacterianos colonizan los tejidos vegetales sin causar daños a las plantas y establecen asociaciones benéficas con su hospedero. Las plantas que poseen la capacidad de crecer en ambientes extremos portan un microbioma que incrementa la biomasa durante los períodos de estrés. En el presente trabajo nos dimos a la tarea de aislar y caracterizar la microbiota bacteriana existente en la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla*, de la cual se obtuvieron 165 aislados bacterianos (**Tabla 4**) de los cuales 124 fueron para la época de lluvias y 41 para la época de estiaje. La composición de las poblaciones microbianas dependerá de diversos factores como la época del año (lluvias y estiaje), la especie, la etapa del desarrollo, las características genéticas, las interacciones ambientales, el tipo de tejido vegetal (micrófila y rizóforo) así como del propio endófito (Madhava, 2006; Covarrubias, 2007; Shao *et al.*, 2008; Trivedi *et al.*, 2017). La abundancia de bacterias endófitas durante la época de lluvias, las cuales pudiesen estar dentro de la planta debido a su participación en la tolerancia al estrés o por su futura participación en la síntesis, acumulación, degradación y/o asimilación de compuestos para la época de estiaje. No necesariamente una gran cantidad de endófitos significa que estén cooperando con la planta, algunos se encontraran momentáneamente (refugiándose) y otros prevalecen en ambas épocas. El tejido vegetal que presentó un mayor número de aislados fue la micrófila, y puede deberse a la expansión o mayor área de tejido en comparación del rizóforo y pudiesen utilizarlo para protegerse del exterior, además de que la integración de los compuestos sintetizados y asimilados por las bacterias endófitas hacia la planta pueda ser mejor y con ello llevar a cabo óptimamente la señalización y respuesta de la planta.

El AIA es el encargado de regular múltiples funciones como la división y expansión celular, diferenciación vascular, desarrollo de raíz lateral, fototropismo, gravitropismo, dominancia apical y la defensa de las plantas. El Trp es el principal precursor para la biosíntesis de AIA en bacterias y el principal exudado de las raíces de plantas (Vega-Celedón *et al.*, 2016). Cuando las rizobacterias se encuentran adheridas a las semillas o raíces emplean el Trp de los exudados para colonizar y proliferar, así como sintetizar y liberar AIA, de este modo se presentan niveles de AIA exógeno y endógeno que estimularán a la planta en sus diferentes mecanismos de crecimiento y desarrollo (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Esquivel-Cote *et al.*,

2013; Jetiyanon, 2015). En la literatura se menciona que alrededor del 80% de las rizobacterias son capaces de producir AIA, lo cual es un valor similar al obtenido de los aislados bacterianos (**Tabla 7**) para la época de lluvias (82.78%) y estiaje (73.17%). La interacción planta – endófito puede traer efectos positivos y/o negativos en cuanto al desbalance de las AUX ya que interfiere en el crecimiento y desarrollo. Las bacterias productoras interfieren en la incorporación de AIA en las plantas, por lo cual debe de tener la capacidad para tolerar e incorporar los niveles de AIA endógenos y exógenos, además su sensibilidad debe de ser óptima ante los cambios en la concentración del compuesto debido a que la interacción puede causar toxicidad en la planta (Spaepen *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2011; Vega-Celedón *et al.*, 2016; Sánchez-Cruz *et al.*, 2019). Los aislados bacterianos se agruparon de acuerdo a sus niveles de producción de AIA. En el medio de cultivo con Trp a las 48h (**Tabla 8**) para la época de lluvias se tiene un mayor número de aislados con baja producción (62.37%) y un menor número de aislados con alta producción (24.75%). Mientras que en época de estiaje se presenta un menor número de aislados con baja producción (13.33%) y un alto número de aislados con alta producción (63.33%). Este comportamiento podría deberse a que durante la época de estiaje se necesita un mayor número de aislados altos productores debido a que este compuesto podría estar colaborando con la tolerancia a la desecación. Además, se identificaron 13 aislados bacterianos que consumían el AIA producido a las 24h, incluyendo a la bacteria control *P. lutea*. Este comportamiento pudiese ser una forma de regulación de los niveles del AIA debido a los efectos positivos y negativos tanto en la planta como en el propio endófito. Diversos investigadores han realizados estudios en la PCV relacionados con la producción de AIA en el medio de cultivo Jain & Patriquin a diferentes concentraciones de Trp, la adición del Trp se debe a que ayuda a visualizar el compuesto y dar una idea acerca de la ruta de biosíntesis que en este caso sería dependiente del Trp. En nuestro trabajo los aislados bacterianos productores de AIA a las 48h para la época de lluvias presentaron un rango de 0.037 a 55.13 $\mu\text{g/ml}$ y para la época de estiaje de 0.71 a 50.73 $\mu\text{g/ml}$ (**Tabla 6**). Los autores que a continuación se mencionan proponen a sus aislados bacterianos como promotores del crecimiento vegetal óptimo para los cultivos agrícolas, nuestro trabajo presenta similitudes en cuanto a la producción del compuesto sugiriendo que serían candidatos ideales para la PCV. Castro-González *et al.*, 2011, estudiaron la diversidad de especies del género *Burkholderia* asociadas a plantas de caña de azúcar donde realizaron diversas pruebas de PCV, dentro de la producción de AIA registraron un rango de 0.03 a 56.8 $\mu\text{g/ml}$ pertenecientes a 26 cepas de 4 especies de *Burkholderia* (*B. unamae*, *B. tropica*, *B. caribensis* y *B. vientamiensis*). Luna *et al.*, 2013, determinaron la producción de AIA de 4 rizobacterias aisladas de plantas de tomate (MA04, MA06, MA12 y MA17) obteniendo bajos niveles de producción (2.3 a 6.8 mg/L^{-1}) con una concentración de Trp mayor (1 g/L) a la de este trabajo. En el trabajo de Fernandes-Júnior *et al.*, 2015, aíslan 16 bacterias PCV de la planta de resurrección *Tripogon spicatus*, presentando una producción de 5.8 a 87 $\mu\text{g/ml}$. Estos autores emplean una concentración 4 veces menor de Trp que en nuestro trabajo, sin embargo, adicionan NaCl generando estrés salino y por ende propicia la mayor producción AIA sugiriéndose que funge como una estrategia de protección ante el estrés. De acuerdo con lo reportado por Ortega-Acosta *et al.*, 2017, donde aíslan 12 fitobacterias endófitas de la planta acuática *Lemna gibba* en dos épocas del año (4 bacterias

para lluvias y 8 bacterias para estiaje), empleando una concentración de Trp muy inferior (1, 2 y 5 mg/L) a la nuestra obtuvieron una excelente producción del AIA, agrupándolas como bajas y altas productoras (Época de lluvias: 22.41 a 49.43 µg/ml; 22.8 a 49.92 µg/ml; 23.54 a 54.58 µg/ml. Época de estiaje: 1.6 a 74 µg/ml; 1.14 a 56.9 µg/ml; 2.62 a 74.29 µg/ml; con 1, 2 y 5 mg de Trp, respectivamente). En nuestro trabajo de los 163 aislados bacterianos obtenidos en ambas épocas de colecta solo 131 aislados eran productores de AIA (**Tabla 7**). El 24.75% de ellos (25 aislados) son altos productores para la época de lluvias y el 63.33% (19 aislados) para la época de estiaje (**Tabla 8**). Nosotros obtuvimos un mayor número de aislados con diferentes niveles de producción de AIA clasificados en tres grupos (bajos, medianos y altos productores). El menor productor a las 48h en la época de lluvias fue el aislado SILBmi210-16 (35) con 0.037 µg/ml y el mayor productor fue SILBri210⁻²2 (44) con 55.13 µg/ml. Para la época de estiaje el menor productor fue el aislado 2SIPYmi10⁻¹3 (21S) con 0.71 µg/ml y el mayor productor fue 2SILBmi10⁻¹1* (9S) con 50.73 µg/ml (**Tabla 6**). En el trabajo de Hassan, 2017 aísla 7 bacterias endófitas de la planta medicinal *Teucrium polium* L., la mayor productora de AIA fue Tp. 1B (*Bacillus cereus*) con un rango de 4.1 a 23.4 µg/ml, la producción incremento conforme aumentaba la concentración de Trp (1, 2 y 5 mg/ml). Nuestros mejores productores fueron SILBri210⁻²2 (9S) y 2SILBmi10⁻¹1* (44) con una producción de 50.73 y 55.13 µg/ml, respectivamente.

El fosfato orgánico está involucrado en el desarrollo de raíces, semillas y flores, constituye parte de los fosfolípidos de las membranas celulares y del material genético, participa en el metabolismo energético, en la fotosíntesis, la glucólisis, la respiración, la señalización y la síntesis de ácidos grasos (Corrales *et al.*, 2014). El fósforo constituye más del 0.2% del peso seco de las plantas y en bacterias del 1.5 a 2.5% (Beltrán, 2014; Corrales *et al.*, 2014). Las plantas adquieren el fósforo de forma inorgánica soluble como fosfatos mono ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) y dibásicos (HPO_4^{-2}) en un pH de 6.5 (Beltrán, 2014; Goreti *et al.*, 2014). Debido a la baja disponibilidad de este elemento las plantas y microorganismos compiten por las cantidades limitadas de este mineral a través de procesos de precipitación, solubilización, absorción y desorción (liberación del fósforo adsorbido). Las BPCV con capacidad para solubilizar fosfatos movilizan el fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde es asimilado por las raíces como compuestos solubles, posteriormente la planta suministra los compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano. El principal mecanismo de solubilización de fosfatos es la disminución o acidificación del pH del medio extracelular debido a la liberación de ácidos orgánicos (ácido butírico, oxálico, succínico, málico, glucónico, tartárico, acético, láctico, cítrico, fumárico, glucónico y 2-cetoglucónico) de bajo peso molecular que actúan sobre los compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Por medio de quelar los iones metálicos (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3}) que favorecen la formación de complejos insolubles (fosfato insoluble) y son transformados en fosfato asimilable para la planta. Diversos factores como las sales, pH y temperatura afectan la capacidad de las fosfobacterias para solubilizar fosfato (Beltrán, 2014; Corrales *et al.*, 2014; Goreti *et al.*, 2014; Jetiyanon, 2015; Moreno *et al.*, 2018; Sánchez-Cruz *et al.*, 2019). En la literatura mencionan que del 1 al 50% de las bacterias son capaces de solubilizar fosfatos y del 0.1 a 0.5% en los hongos (Beltrán, 2014; Moreno *et al.*, 2018). Esto es muy similar a lo que nosotros encontramos para

los aislados endófitos bacterianos y fúngicos (comunicación personal con Laura Dector). La determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos dio como resultado que para ambas épocas de colectas el 51.53% (84 aislados bacterianos) solubilizaron fosfato, siendo un 57.37% (70 aislados) para la época de lluvias cuyo índice oscilaba entre 2.17 a 3.83 mm y un 34.14% (14 aislados) para la época de estiaje con un índice de 2.26 a 3.39 mm (**Tabla 6 y 9**). Los siguientes trabajos mencionan que de acuerdo a los rangos de solubilización de fosfatos que presentan las bacterias son capaces de PCV. Castro-González *et al.*, 2011, obtuvieron un rango de solubilización de 2.9 a 5.0 mm pertenecientes a las especies *Burkholderia caribensis* y *B. unamae*. Goreti *et al.*, 2014, analizaron 75 cepas de *Pseudomonas* con potencial en la solubilización de fosfatos, de los cuales 8 aislados (P10, P11, P17, P24, P25, P26, P38 y P42) eran efectivas (>10 mm), siendo la mejor P42 con 15 mm y 38 aislados eran pobres solubilizadores de fosfato. Fernandes-Júnior *et al.*, 2015, reportó un índice que oscilaba entre 1.1 a 2.1 mm para 4 bacterias endófitas (25% del total de los aislados). Mientras que nuestros aislados presentan una mayor solubilización y un mayor número de bacterias endófitas. Hassad, 2017 reportó un índice de solubilización de fosfatos de 3.3 a 7.7 mm para 4 bacterias endófitas (57.14% del total de los aislados), nuestros resultados se asemejan en cuanto al porcentaje de aislados solubilizadores de fosfato. García *et al.*, 2017 analizaron cinco cepas nativas de *Azospirillum* (Az3, Az8, Az19, Az39 y Az63) para corroborar la PCV. La solubilización de fosfatos solo la realizaba la cepa Az19, mientras que Az63 y Az39 lo hacían débilmente.

El nitrógeno (N) es una molécula vital debido a su participación en la formación de ácidos nucleicos, aminoglúcidos, urea, poliaminas, vitaminas, nitratos, nitritos, proteínas y los responsables de proporcionar energía (ATP y GTP) así como del potencial reductor (NAD, NADP y FAD (Calvo, 2011). La fijación de nitrógeno es una reacción de óxido – reducción para formar amonio (ion amonio, NH_4^+ ; nitrito, NO_2^- ; nitrato, NO_3^-) u óxidos (NO_2). La fijación biológica del nitrógeno es realizada por microorganismos diazotrófos capaces de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2), dentro de los que se encuentran las bacterias que colonizan los nódulos de las raíces de leguminosas y otros vegetales para generar compuestos asimilables para otros seres vivos (Ruiz *et al.*, 2008; Calvo, 2011). Esta capacidad se debe al complejo de la nitrogenasa, son enzimas oxioreductasas constituida por dos componentes fundamentales la proteína Fe-M, en donde M es un metal (molibdeno, Mo la más abundante y eficiente; vanadio, V; hierro, Fe). La proteína Fe-Fe es sensible al oxígeno por lo que es inactivado irreversiblemente, la proteína leghemoglobina es la encargada de regular las concentraciones de oxígeno y por ende proteger a la nitrogenasa (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2008; Calvo, 2011; Balbani *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2018). Los factores que ayudan en la especificidad de la enzima son la cantidad de N_2 , los aminoácidos que rodean al cofactor los cuales ceden H para después donarlos al N_2 en la reducción, el tipo de nitrogenasa (Fe-Mo, Fe-V, Fe-Fe) y el alto flujo de electrones que favorecen la reducción del N_2 , ya que un bajo flujo da como producto H_2 (Ruiz *et al.*, 2008). Para formar la nitrogenasa activa se requiere de dos componentes, una molécula del componente I (Fe-M) y dos moléculas del componente II (Fe-Fe) (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2008; Calvo, 2011). La reacción principal del complejo de la nitrogenasa es reducir $\text{N}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- + 16\text{ATP} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{ADP} + 16\text{Pi}$, esta reacción presenta un alto costo energético (16

ATP = 225 kcal/mol) debido a la ruptura del triple enlace de la molécula de N. La nitrogenasa Fe-Mo es la más estudiada y se sugiere que su mecanismo puede ser aplicable para todos los tipos de nitrogenasa. El mecanismo sugiere que ocurre un cambio en la configuración o el estado de oxidación de la proteína Fe-Mo debido a la transferencia de electrones de la proteína Fe-Fe a los cúmulos P del cofactor, estos electrones son almacenados y posteriormente empleados en la reducción del N₂, este proceso es compensado por la hidrólisis de ATP de la proteína Fe-Fe (Ruiz *et al.*, 2008). Diversos estudios han revelado que la FBN viene acompañada de más parámetros de PCV como la solubilización de fosfatos, actividad de la ACC desaminasa, biosíntesis de AIA, e inclusive de control biológico y biorremediación (Castro-González *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos de la FBN (**Tabla 10**) mostraron que posiblemente 133 aislados bacterianos (81.59%) fijaban nitrógeno, para la época de lluvias fue un 81.96% (100 aislados) y para la época de estiaje 80.48% (33 aislados) los cuales presentan diferentes niveles de fijación de nitrógeno esto al ser relacionados con la intensidad del color y la altura del halo de crecimiento. Al obtenerse un alto porcentaje de bacterias fijadoras de nitrógeno nos hace pensar el experimento está sobreestimando las poblaciones diazotróficas, debido a que inicialmente las bacterias fueron crecidas en un medio de cultivo rico pudiesen tener las reservas necesarias para crecer en el medio de cultivo libre de N, por lo que se plantea sembrar para descartar que lleven reservas para el crecimiento.

Las células vegetales tienen la capacidad de sintetizar diversos componentes metabólicos para el crecimiento, desarrollo y defensa ante el estrés como los azúcares, lípidos, aminoácidos y metabolitos secundarios. Los azúcares y aminoácidos son los principales reguladores de las diferentes vías de transducción de señales. Las BPCV además de presentar los parámetros de PCV ya mencionados pueden producir, secretar o exudar polisacáridos que conllevan a la estabilidad del suelo para optimizar las condiciones del entorno y prevenir cambios bruscos que ponga en peligro a la planta (Griffiths *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2018). Particularmente, la producción de solutos compatibles como la trehalosa ayuda a contener este tipo de estrés (Secks *et al.*, 2009; Griffiths *et al.*, 2016; García *et al.*, 2017). Adams *et al.*, 1990 determinaron el contenido de azúcares de *S. lepidophylla* en estado deshidratado e hidratado corroborando que la trehalosa es el principal azúcar seguido de la sacarosa. Secks *et al.*, 2009 realizaron un estudio en plantas de festuca con el hongo endófito *N. coenophialum*, el cual le ayuda en la tolerancia al frío, sequía y al ataque de patógenos. Las plantas fueron sometidas con y sin estrés hídrico para registrar los cambios en los perfiles de carbohidratos mediante cromatografía de gases. Al comparar los dos tratamientos no se aprecian diferencias significativas en los perfiles de carbohidratos fúngicos (arabitol, manitol y fructosa), mientras que en las plantas sí (sacarosa, glucosa y trehalosa). Los bajos niveles de trehalosa indican que no estaría relacionado como osmoprotector, pero sí sabe de su participación en la estabilidad de membranas lipídicas y proteínas en otros organismos. En este caso, la intervención de los demás azúcares pudiese estar llevando la tolerancia al estrés hídrico, además se sugiere que la trehalosa pueda tener otro tipo de función como la de señalización. García *et al.*, 2017, determinaron el contenido de trehalosa, en donde sometieron a las cepas de *Azospirillum* a tres diferentes condiciones de estrés hídrico empleando sorbitol, PEG y sequía, observando que las cepas Az39 y Az19 eran las

mayormente tolerantes. Sin embargo, durante el estrés osmótico se comportan de manera diferente particularmente, la cepa Az19 presentó mayor tolerancia. Este comportamiento ayuda a comprender los mecanismos de osmoadaptación así como la interacción planta – bacteria en condiciones de estrés hídrico. En el contenido de trehalosa, la cepa Az19 presentó una producción con 388% más que la cepa Az39, inclusive excedió los niveles de la cepa Na5 mutante EMS derivada de Az39 que sobreproduce este compuesto. Estos resultados permiten relacionar la tolerancia al estrés osmótico con la producción de trehalosa. Mientras que un comportamiento similar de las cepas Az19 y Az39 en condiciones menores con PEG puede deberse a otros mecanismos independientes de la trehalosa como el glutamato o glicina betaína que también fungen como osmoprotectores. En nuestro trabajo determinamos los niveles de trehalosa de manera similar a los realizados por García *et al.*, 2017, analizamos 119 aislados bacterianos para ambas épocas de los cuales solo 105 aislados producían trehalosa (**Tabla 11**). Para la época de lluvias se encontraron 86 aislados productores (88.65%) con un rango de 0.0038 a 35.75 $\mu\text{g/ml}$ y para la época de estiaje 19 aislados productores (86.36%) con un rango de 0.021 a 19.30 $\mu\text{g/ml}$ (**Tabla 6**). Griffiths *et al.*, 2016, ha relacionado la concentración de trehalosa con la sacarosa. Se ha documentado que durante condiciones adversas como bajas temperaturas, sequía, salinidad y déficit de nutrientes ocurre el aumento de azúcares como la sacarosa, lo que lleva a la formación de hexosas como la trehalosa y a través de señales de la T6P se detectan los niveles de azúcares en la planta. Este mecanismo permite la adaptación a condiciones adversas. Se ha demostrado que la T6P promueve el crecimiento en ausencia de condiciones limitantes debido a su participación en la compleja vía de señalización que involucra a la sacarosa y a diversas fitohormonas.

El análisis de ERIC-PCR ayuda a discriminar a las bacterias endófitas por medio de los diferentes patrones de bandeo, agrupándolas de acuerdo a ello. De esta manera se reduce el número de bacterias que se utilizan posteriormente para la evaluación de los parámetros promotores del crecimiento vegetal. Se obtuvieron 114 patrones de bandeo diferentes para 163 bacterias endófitas, de los cuales 28 patrones agrupaban a 77 bacterias endófitas similares, mientras que 86 patrones diferentes albergaban independientemente al resto de las bacterias. Dentro de los 28 patrones que albergaban a las 77 bacterias endófitas, 9 patrones de bandeo presentaban prácticamente el mismo comportamiento en cuanto a producción de compuestos (AIA, SP, FBN y Trehalosa) siendo los patrones 2 (aislados 22 y 23), 40 (98 y 101), 44 (105 y 107), 49 (86, 87, 88, 120 y 123; este último tenía variación en la producción de AIA), 63 (66 y 67), 65 (75 y 110), 79 (13S y 20S; pero no el 11S), 107 (49 y 71; 72 y 93; pero no el 8 y 27) y 111 (41 y 42). Además, se encontraron aislados que presentaban un comportamiento un poco similar pero algún miembro del grupo de bandeo era muy diferente, siendo los patrones 57 (aislados 51 y 54; pero no el 58), 61 (59 y 60; pero no el 53 y 64), 74 (19S y 25S; pero no el 37S, 17S y 62). Dentro de los diferentes patrones de bandeo para las 86 bacterias endófitas restantes algunos aislados presentaban un comportamiento similar en la producción de compuestos, siendo los patrones 5 y 8 (aislados 21 y 13), 10 y 11 (4 y 12), 26 y 27 (31 y 39), 58 y 59 (60 y 70), 67 y 69 (56 y 57), 80 y 81 (30S y 28S), 84 y 85 (2S y 32S). El análisis funcional de la diversidad de las bacterias endófitas con relación a sus atributos PCV han permitido la caracterización óptima dependiendo al papel que desempeñan en la interacción con la planta y el entorno (Ortega-Acosta *et al.*, 2017).

14. Conclusiones

La amplia diversidad de bacterias endófitas dentro de una gran variedad de plantas sugiere el papel elemental que llevan en la fisiología y funcionamiento de las mismas. Los estudios muestran lo beneficiosos que resultan las bacterias endófitas en los cultivos agrícolas en relación a su crecimiento, desarrollo, rendimiento y adaptabilidad ante el estrés biótico y abiótico empleando los diversos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. Se presenta una diversidad de mecanismos. Sin embargo, la contribución de uno solo puede no tener una gran relevancia, mientras que múltiples mecanismos en una acción sinérgica pueda lograr marcar una relevancia significativa. Las combinaciones de BPCV utilizadas en un inóculo podrían dar mejores resultados en el desarrollo, rendimiento y adaptabilidad de los cultivos agrícolas. Sin embargo, es necesario seguir realizando más investigación sobre las diversas BPCV que producen efectos sinérgicos y su aplicación para promover el crecimiento de las plantas.

Algunos aislados bacterianos producían una alta concentración de AIA (SILBRi210⁻², 44 y 2SILBMi10⁻¹*, 9S; lluvias y estiaje) lo cual podría resultar perjudicial para la planta actuando como un herbicida. Altas concentraciones de AIA se logran en el laboratorio gracias a la adición del Trp, pero es poco probable que mencionado aminoácido se encuentre en grandes cantidades en el suelo o en los exudados de las raíces por lo que naturalmente los niveles de AIA sean menores. Además, con bajos niveles del compuesto (SILBMi210⁻¹6, 35 y 2SIPYMi10⁻¹3, 21S; lluvias y estiaje) se puede tener un efecto óptimo en la planta. Se identificaron aislados bacterianos consumidores del AIA, pudiendo ser una forma de regulación del compuesto debido a los efectos positivos y negativos.

El porcentaje de aislados bacterianos endófitos productores de AIA y solubilizadores de fosfato concuerda con lo reportado en la literatura. Estos son mecanismos de adaptación empleados por diversos microorganismos ante las limitantes y para la interacción con la planta que le ayudarán en la supervivencia.

El alto porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, nos sugiere que se podría estar sobreestimando las poblaciones diazotróficas de los tejidos vegetales (micrófila y rizóforo). Por ello, se debe de considerar el tipo de estudio que se requiera y buscar el método que se adecue más al del estudio y agregar nuevas formas de monitoreo.

Debido a que *Selaginella lepidophylla* presenta una alta acumulación de trehalosa, conocer los niveles de trehalosa de las bacterias endófitas asociadas a esta planta nos permite relacionarlo con la tolerancia a la desecación, sugiriendo que la acumulación de este disacárido es por parte de la propia planta como de las bacterias endófitas.

15. Perspectivas

- Identificar molecularmente los aislados bacterianos mediante herramientas moleculares.
- Identificar las vías de biosíntesis del AIA en las bacterias endófitas.
- Analizar la relación de las BPCV con la enzima ACC desaminasa.
- Determinar cuantitativamente la solubilización de fosfatos inorgánico.
- Determinar la fijación biológica de nitrógeno por cromatografía de gases mediante el ensayo de reducción de acetileno.
- Amplificación de los genes *nifH*.
- Cuantificar el contenido de trehalosa de *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado y en condiciones libres de endófitos.
- Evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal de las bacterias endófitas aisladas de *Selaginella lepidophylla* en plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum*.

16. Literatura citada

- Abbasi, M. K., Sharif, S., Kazmi, M., Sultan, T. and Aslam, M. (2011). Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. *Plant Biosystems*. 145 (1): 159 – 168.
- Adams, R. P., Kendall, E. and Kartha, K. K. (1990). Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 18: 107 – 110.
- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163 (2): 173 – 181.
- Alda, F. L. (2011). Regulación de la fisiología vegetal I: Las hormonas vegetales. <http://blog-ia20.blogspot.mx/2011/02/regulacion-de-la-fisiologia-vegetal-i.html>
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. and Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*. 6: 109 – 124.
- Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, Sampaio, S. V., Boddey, L. H. and Divan, B. V. L. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*. 384: 413 – 431.
- Banks, J. A. (2009). *Selaginella* and 400 million years of separation. *Annual Reviews of Plant Biology*. 60: 223 – 238.
- Basurto, S. M., Núñez, B. A., Pérez, L. R.R y Hernández, R. O. A. (2008). Fisiología del estrés ambiental en plantas. *Synthesis*. 48: 1 – 5.
- Beltran, P. M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15 (1): 101 – 113.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, vol. 32: 170 – 189.
- Brighigna, L., Bennici, A., Tani, C. and Tani, G. (2002). Structural and ultrastructural characterization of *Selaginella lepidophylla*, a desiccation-tolerant plant, during the rehydration process. *Flora*. 197: 81 – 91
- Calderón, G. C. (2011). Establecimiento de un método para la obtención de cultivos axenicos *in vitro* de *Selaginella lepidophylla*. Tesis en Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigación en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México. Pp 78.
- Calvo, G. S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *CT*. 3: 173 – 186.
- Castillo-Texta. M. G. (2018). Sobreexpresión del factor de transcripción *SIPti4* en plantas transgénicas de tabaco y su efecto ante el estrés biótico y abiótico. Tesis de Licenciatura en

Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos, México. Pp 76.

Castro-González, R., Martínez-Aguilar, L., Ramírez-Trujillo, A. Estrada-de los Santos, P. and Caballero-Mellado, J. (2011). High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. *Plant Soil*. 345: 155 – 169.

Choi, W-G., Hilleary, R., Swanson, S. J., Kim, S-H., Gilroy, S. (2016). Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 67: 287 – 307.

Corrales, R. L. C., Arévalo, G. Z. Y. y Moreno, B. V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA – Publicacion Cientifica en Ciencias Biomedicas*. 12 (21): 67 – 69.

Covarrubias, R. A. A. (2007). Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología*. 14: 253 – 262.

Dang, Z., McLenachan, P. A., Lockhart, P. J., Waipara, N., Er, O., Reynolds C. and Blanchon, D. (2019). Metagenome profiling identifies potential biocontrol agents for *Selaginella kraussiana* in New Zealand. *Genes*. 10 (106): 1 – 9.

Datta, M., Palit, R., Sengupta, C., Kumar, P. M. and Banerjee, S. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annum L.*) under field conditions. *Aust. J. Crop Sci*. 5: 531 – 536.

Dowling DN, O’Gara F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*. 12 (4): 133 – 141.

Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszek, I. and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. 13 (4): 17 – 27.

Escaso, S. F., Martínez, G. J. L. y Planelló, C. M. Del R. (2010). Hormonas vegetales: desarrollo y respuesta de las plantas con flor al ambiente. En: M. Martín Romo, E. Martín. (Eds) Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal. pp: 57 – 77. Madrid, España: Pearson educación, S. A.

Escobedo, G. A., Cabrera, P. J. L., Herrera, E. L. R., Hernández, L. C. y Montes de Oca, L. R. (2004). Mejora del crecimiento de plantas de tabaco mediante la inhibición del gen de la trehalasa. *Ciencia UANL*. 7 (4): 483 – 489.

Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. y Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Filitecnica Mexicana*. 36 (3): 251 – 258.

Fernandes-Júnior, P. I., de Tarso, A. S., Vianna, M. C., Tuao, G. C. A., Édson, Z. J., Silva, B. de S. L., de Cássia, N. M. R., Simão, A. N. R., da Silva B. M., Lima, S. S. and Vierira, M. L. M. (2015). The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern brazilian Caatinga. *R. Bras. Ci. Solo*. 39: 993 – 1002.

Ferraris G, Courerot L. (2004). Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas* spp) en trigo. *Revista de Tecnología Agropecuaria*. 9: 37 – 39.

Figuerola-Soto, C., Iturriaga, G. y Valenzuela-Soto, E. M. (2004). Actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa en plantas de *Selaginella lepidophylla* en respuesta a hidratación y desecación. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27 (1): 17 – 22.

Flores, B. E. (2017). Evaluación de la coinoculación de *Arthrobacter chlorophenolicus* y *Rhizobium tropici* CIAT 899 en *Phaseolus vulgaris* bajo condiciones de humedad limitante. Tesis en Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigación en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México. Pp 94.

García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, J. A. and Groppa, M. D. (2017). *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strain and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*. 202: 21 – 29.

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 61 (2): 793 – 796.

Goteti, P. K., Desai, S., Amalraj E. L. D., Taduri, M. and Sultana, U. (2014). Phosphate solubilization potential of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from diverse agroecosystems of India. *International Journal of Soil Science*. 9: 101 – 110.

Griffiths, C. A., Paul, M. J. and Foyer, C. H. (2016). Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1857 (10): 1715 – 1725.

Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K. and Burns, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N (2) fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43 (8): 1185 – 1207.

Hassan, S. El-Di. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*. 8: 687 – 695.

Hernández, G. Y. (2018). Análisis de la expresión de los genes de síntesis de trehalosa en *Azospirillum brasilense* 23Rpb. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos, México. Pp 76.

Hernández-Cortez, C., Majalca-Martínez, C., Hernández-Méndez, J. T., Giono-Cerezo, S., Aguilera-Arreola, M. G y Castro-Escarpulli, G. (2012). Presencia de secuencias ERIC en *Chlamydia trachomatis*. *Revista Biomedica*. 23: 87 – 93.

Islam, S., Akanda, A. M., Prova, A., Islam, Md. T. ad Hossain, Md. M. (2016). Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their

effect on plant growth promotion and disease suppression. *Fronties in Microbiology*. 6: 1 – 12.

Iturriaga, G., Gaff, D. F. and Zentella, R. (2000). New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of México, accumulate trehalose. *Australian journal of Botany*. 48: 153 – 158.

Jain, D. K. and Patriquin, D. G. (1984). Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 206 – 210.

Jetiyanon, K. (2015). Multiple mechanisms of *Enterobacter asburiae* strain RS83 for plant growth enhancement. *Songklanakarin Journal Sciences Technology*. 37 (1): 29 – 36.

Kaushal, M. (2019). Microbes in Cahoots with Plants: MIST to hit the jackpot of agricultural productivity during drought. *International Journal of Molecular Sciences*. 20: 1 – 22.

Kloepper, J. (1993). Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. 274.

Liotti, R. G., da silva, F. M. I., da silva, G. F., Furtado de mendonca, E. A. and Soares, M. A. (2018). Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potencial for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiological Research*. 207: 8 – 18.

Loredo-Osti, C., López-Reyes, L. y Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 2 (2): 225 – 239.

Luna, M. L., Martínez, P. R. A., Hernández, I. M., Arvizu, S. M. y Pacheco, A. J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Filotecnia Mexicana*. 36 (1): 63 – 69.

Madhava, R. K. V. (2006). Introduction. En: K. V. Madhava Rao, A. S. Raghavendra, K. and Janardhan Reddy (Eds). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in Plants*. pp: 1 – 14. India: Springer.

Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A. and Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Fronties in Microbiology*. 6: 1 – 10.

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. and Wade, W. G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. 64: 795 – 799

Mascorro-Gallardo, J. O., Avonce, N. e Iturriaga, G. (2005). Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11 (2): 193 – 202.

- Milagres, A. M. F., Machuca, A. and Napoleao, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of Chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*. 37: 1 – 6.
- Montoliu, V. A. 2010. Respuesta fisiológica de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. Tesis doctoral en Ingeniería Agrónoma. Universitat Jaume I de Castellón, Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales, Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Castellón de la Plana.
- Moreno, R. A., Carda, M. V., Reyes, C. J. L., Vásquez, A. J., y Cano R. P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 20 (1): 68 – 83.
- Muller, J., Boller, T. & Wiemken, A. (1995). Trehalose and trehalase in Plants: recent developments. *Elsevier. Plant Science*. 112: 1 – 9.
- Nova, F. B. (2009). Obtención y caracterización de cepas mutantes de *Rhizobium etli* sobreproductoras de trehalosa. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos, México. Pp 86.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaird, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W. and Backhaus, A. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal Bacteriology*. 178: 5636 – 5643.
- Ortega-Acosta, O., López-López, E., Rodríguez-Tovar, A. V., Guerrero-Zuñiga, L. A. y Rodríguez-Dorantes, A. M. (2017). Análisis funcional comparativo de fitobacterias productoras de ácido indolacético aisladas de plantas *Lemna gibba* de la zona chinampera de Xochimilco, México. *Hidrobiológica*. 27 (2): 153 – 161.
- Pampurova, S., Vershooten, K., Avonce, N. and Van Dijck, P. (2014). Functional screening of a cDNA library from the desiccation-tolerant plant *Selaginella lepidophylla* in yeast mutants identifies trehalose biosynthesis genes of plant and microbial origin. *J Plan Res, The botanical Society of Japan and Springer Japan*. 127: 803 – 813.
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R. S., Fernández, S. A., García, de S. I., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V. L.D. y Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11 (2): 155 – 164.
- Peña H. B. y Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa L.*). *Interciencia*. 32: 560 – 565.
- Pérez, M. M. B. (2016). Uso de un nuevo vector de transformación para incrementar la acumulación de trehalosa en *Nicotiana tabacum*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos, México. Pp. 93.

Ramírez, R. D. (2010). Bacterias endofíticas aisladas de fresa (*Fragaria x ananassa Dutch.*) y su impacto sobre plantas de interés agrícola. Tesis de Maestría en Ciencias Químico-biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología. México, D.F.

Redondo-Gómez. S. (2013). Abiotic and biotic stress tolerance in plants. En: G. R. Ranjan, D. A. Bandhu. (Eds). *Molecular stress physiology of plants*. pp: 1 – 20. India: Springer.

Rives, N., Acebo, Y. y Hernández, A. (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa L.*) perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 28 (2): 29 – 38.

Ruiz, H. B. L., Campos, G. A. J. A y Barba, B. N. (2008). Cofactor FeMco (M=Mo, V, Fe) en la nitrogenasa. *Educación química*. 19 (1): 34 – 41.

Sánchez, L. D. B., Pérez, P. J. V. y David, H. H. A. (2016). Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 18 (1): 65 – 72.

Sánchez-Cruz R., Tpia, V. I., Batista-García, R. A., Méndez-Santiago, E. W., Sánchez-Carbente, M. R., Leija, A. Lira-Ruan, V., Hernández, G., Wong-Villarreal, A. and Folch-Mallol, J. L. (2019). Isolation and characterization of endophytes from nodules of *Mimosa pudica* with biotechnological potential. *Microbiological Research*. 218: 76 – 86.

Secks, M. E., Richardson, M. D., West, C. P., Marlatt, M. L. and Murphy, J. B. (2009). Role of trehalose in desiccation tolerance of endophyte-infected tall fescue. *AAES Research Series*. 134 – 140.

Shao, H-B., Chu, L-Y., Jaleei, C. A. and Zhao, C-X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Elsevier*. 333: 215 – 225.

Souza, A. Nogueira, V B., Sousa, N. R., Procópio, A. R. I. and Silva, G. F. (2015). Operational taxonomic units (OTUs) of endophytic bacteria isolated from banana cultivars in the Amazon. *Genetics and Molecular Research*. 14 (3): 9932 – 9938.

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3 (4): 1 – 13.

Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 425 – 448.

Suárez, R. R., Raya, P. J. C. e Iturriaga, G. (2015). La trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. *Ciencia y tecnología Agropecuaria, México*. 13 (1): 1 – 13.

Talavera, R. M., Reyes, R. N. E., Lagunas, B. S., Fernández, R. P., Morales, E. V. y Vargas, E. E. S. (2011). Variabilidad genética de aislamientos de *Salmonella typhimurium* (grupo B) obtenidos de hígado de pollo destinados para el consumo humano. *Revista Mexicana Ciencia Pecuaria*. 2 (4): 371 – 380.

- Torreblanca, M. del P. (2017). Aislamiento e identificación de endófitos de la planta de resurrección *Selaginella nothohybrida*. Tesis en Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigación en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México. Pp. 63.
- Trivedi, G., Shah, R., Patel, P. and Saraf, M. (2017). Role of endophytes in agricultural crops under drought stress: current and future prospects. *Journal Applied and environmental microbiology*. 3 (4): 174 – 188.
- VanBuren, R., Wai, C. M., Ou, S., Pardo, J., Bryant, D., Jiang, N., mockler, T. C., Edger, P. and Michael, T. P. (2018). Extreme haplotype variation in the desiccation-tolerant clubmoss *Selaginella lepidophylla*. *Nature communications*. 9: 13.
- Vargas, M., Rocha, M., Iturriaga, P., Jiménez, S. y Bertozzi, G. (2009). Estudio del estrés abiótico de la planta de “resurrección” *Selaginella lepidophylla*. *Métodos de investigación. Colegio Marymount*. 1 – 17.
- Vázquez-Ramírez, M. A., Meléndez-Camargo, M. E. y Arreguín, M. L. S. (2005). Estudio etnobotánico de *Selaginella lepidophylla* (Hook. Et Grev.) Spring (Selaginellaceae-Pteridophyta) en San José Xicoténcatl municipio de Huamantla, Tlaxcala, México. *Polibotánica*. 19: 105 – 115.
- Vega-Celedón, P., Canchignia, H., González, M. y Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*. 37: 33 – 39.
- Verma, S., Nizam S. y Verma P. K. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plants. En: Sarwat, M., Ahmad, A., Abdin MZ. (Eds). *Stress signaling in plants: Genomics and proteomics perspective*, Volume 1. pp: 25 – 49. India: Springer.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19 (24): 6823 – 6831.
- White, E. and Towers, G. H. N. (1967). *Phytochemistry*. 6: 663.
- Wilson, L. A. and Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology Evolutionary*. 23 (6): 1156 – 1168.
- Xu, Z. S., Chen, M., Li, L. C. y Ma, Y. Z. (2011). Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *Journal of integrative plant biology*. 53 (7): 570 – 585.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Haris, B., Feng, Z., Kuczarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G. and Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (5): 2198 – 2208.

Anexo de tabla

Tabla del aislamiento y caracterización de las bacterias endófitas de *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado clasificados por patrones de ERIC-PCR.

Tabla del aislamiento y caracterización de las bacterias endófitas de *Selaginella lepidophylla*.

Nombre	ERIC-PCR	AIA ($\mu\text{g/ml}$)		SP mm	FBN +/-	Trehalosa $\mu\text{g/ml}$	Fenotipo y tiempo de crecimiento
		Con Trp 24h	48h				
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	Control	9.35	26.98	-	Positivo	2.58	ND
<i>Pseudomonas lutea</i>	Control	2.09	0.7	ND	ND	ND	ND
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	Control	ND	ND	ND	ND	48.77	ND
Lista de cepas aisladas de <i>Selaginella lepidophylla</i> en estado hidratado y deshidratado							
SIANMi10 ⁻² 1	Patrón 1	7.89	9.59	2.46	Positivo	4.8	Ci-Co-En-A O-P-Com-Cos; 24h
SIANRi110 ⁻¹⁵	Patrón 1	6.49	7.14	2.55	Positivo	6.42	Ci-Co-En-A O/N; 24h
SIANRi210 ⁻² 1	Patrón 2	5.33	0.3	-	Positivo	18.31	I-El-Lo/On-T-MC; 72h
SIANRi210 ⁻² 2	Patrón 2	5.87	0.05	-	Positivo	18.73	I-El-Lo-T-MC; 72h
SILBMi10 ⁻² 2	Patrón 3	6.83	5.53	2.52	Positivo	15.52	Ci-Co-En-N-Cr-P; 24h
SILBMi210 ⁻² 2	Patrón 3	12.01	9.55	2.63	Positivo	ND	Ci-Co-En-N-P; 24h
SIANMi210 ⁻² 3	Patrón 4	10.16	19.29	2.5	Positivo	12.19	Ci-Pl-En-A O-P-Com-De-Cos; 24h
SIANRi110 ⁻¹ 6	Patrón 4	0	0	2.19	Negativo	1.41	Ci-Pl-En-A Cl/T-L-S; 24h
SIANRi110 ⁻² 6	Patrón 5	0	0	2.36	Positivo	7.71	Ci-Co-En-B/Bg-P; 72h
SIANRi110 ⁻² 4	Patrón 6	0	45.42	-	Positivo	1.43	I-Pu-On-B/M-Cos; 24h
SIANRi110 ⁻² 5	Patrón 6	1.33	44.45	2.26	Positivo	5.95	Ci-Co-En-A/Bg-Gl-Ag; 72h
SIANRi210 ⁻² 3	Patrón 7	0	4.53	3.51	Positivo	13.79	Ci-Co-En-A O-Cr; 72h
SIANHRi3	Patrón 7	46.15	48.29	2.49	Positivo	3.96	Ci-Co-En-A Fl-Gl; 72h
SIANRi110 ⁻¹ 4	Patrón 8	0	0	2.73	Positivo	7.63	Ci-Co-En-N/Dz-S; 24h
SIANMi210 ⁻¹ 1	Patrón 9	0	9.04	-	Negativo	4.03	Pn-Co-En-A Cl-+P-Cr; 24h
SIANMi210 ⁻² 2	Patrón 10	46.42	51.33	2.87	Positivo	21.25	Ci-Co-En-A O-De-Com; 24h
SIANRi110 ⁻¹ 3	Patrón 11	46.75	49.56	2.54	Positivo	25.01	Ci-Co-En-A O-Cr-R; 24h
SIANMi10 ⁻¹ 1	Patrón 12	46.38	50.58	2.67	Positivo	11.82	Ci-Co-En-A Cl-D; 24h
SIANRi10 ⁻² 3.1	Patrón 13	0	37.17	2.47	Negativo	4.72	Ci-Co-En-B/M-Cr-P; 72h
SIANRi110 ⁻² 2	Patrón 14	0	0	-	Negativo	1.41	Ci-Co-En-M-+P; 24h
SIANRi110 ⁻¹ 2	Patrón 15	1.05	4.4	3.29	Positivo	4.86	Ci-Co-En-M-Cr; 24h

2SILBRiv10 ⁻¹ 1	Patrón 15	9.3	18.33	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-Bg-G-V; 24h
SIANRi110 ⁻² 1	Patrón 16	2.54	25.85	-	Positivo	0.82	I-Pu-On-M-D-R-V; 24h
SIANRi110 ⁻¹ 1	Patrón 17	3.44	2.49	2.44	Positivo	35.75	Ci-Co-En-Bg-Com-De; 24h
SIANRi110 ⁻² 3	Patrón 18	0	38.93	2.32	Positivo	7.32	Ci-Co-En-B/M-Ag-Com-Gl; 24h
SILBmi210 ⁻² 3	Patrón 19	6.11	7.24	2.35	Positivo	2.84	Ci-Co-En-C/N-Gl-P; 24h
SILBRi210 ⁻² 1	Patrón 20	0	50.02	2.17	Positivo	15.62	Ci-Co-En-N/Dz+++P; 24h
SILBRi210 ⁻² 2	Patrón 21	47.87	55.13	2.47	Positivo	24.56	Ci-Co-En-N-Ag-Com; 24h
SILBRi210 ⁻² 4	Patrón 22	16.43	16.07	2.17	Positivo	2.34	Ci-Co-En-N-R-Com; 24h
SILBmi210 ⁻² 1	Patrón 23	2.08	1.96	2.19	Positivo	7.86	Ci-Co-En-N-Cos-G; 24h
SILBmi210 ⁻² 2	Patrón 24	2.57	0	2.25	Negativo	1.48	Ci-Co-En-Bg-Cr-R-P; 24h
SILBmi210 ⁻² 5	Patrón 25	0	0	2.27	Positivo	2.64	Ci-Co-En-C/Bg-Cr; 24h
SILBmi110 ⁻² 1	Patrón 26	0	3.28	2.38	Positivo	4.29	Ci-Co-En-A Cl-Cos-S; 24h
SILBmi210 ⁻² 4	Patrón 27	0.24	8.81	2.26	Positivo	5.95	Ci-Co-En-Bg-Com-De; 24h
SILBmi110 ⁻¹ 2	Patrón 28	1.39	5	2.2	Positivo	5.22	Ci-Co-En-M-Cr-P; 24h
SILBmi210 ⁻¹ 6	Patrón 29	4.85	0.03	-	Negativo	0.67	Ci-Co-En-Bg/M+++P-Cr; 24h
SILBmi210 ⁻² 2	Patrón 30	0	5.89	2.27	Positivo	6.04	Ci-Co-En-M++P; 24h
SILBmi210 ⁻¹ 1	Patrón 31	0	32.93	2.65	Positivo	11.32	Ci-Co-En-B-Gl-G; 24h
SILBRi210 ⁻² 3	Patrón 32	0	13.68	-	Positivo	17.22	Ci-Co-En-B/T-Cr; 24h
SIPDAMi10 ⁻² 1	Patrón 33	1.25	3.8	-	Negativo	31.03	Ci-Co-En-Bg/M-Cr-Gl; 24h
SIPDAMi10 ⁻² 1.1	Patrón 34	0	3.58	-	Positivo	24.21	Ci-Co-En-M-Cr-Poca; 48h
SIPDAMi110 ⁻² 2	Patrón 35	0.91	11.16	-	Positivo	3.25	Ci-Co-En-A-Gl-Cr-An; 48h
SIPDAMi110 ⁻³ 3	Patrón 35	10.39	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A/Bg-Gl-G; 48h
SIPDAMi210 ⁻² 4	Patrón 36	0.68	1.59	2.96	Negativo	-	Ci-Co-En-B/M-V-An; 48h
SIPDARi10 ⁻² 2	Patrón 37	0	2.56	-	Positivo	10.18	Ci-Co-En-B-V-Gl-MC; 48h
SIPDARi10 ⁻¹ 2	Patrón 38	29.1	34.34	3.42	Positivo	12.88	Ci-Co-En-Bg-V-Gl-G-MC; 48h
SIPDAHRI16	Patrón 39	17.03	36.34	-	Positivo	3.87	Ci-Co-En-B-V-Gl; 48h
SIPDAMi10 ⁻³ 2	Patrón 40	0	6.5	2.9	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
SIPDAMi110 ⁻² 3	Patrón 40	3.05	7.83	2.67	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
SIPDAMi210 ⁻² 2	Patrón 41	5.59	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
SIPDAMi110 ⁻² 4	Patrón 42	0.17	5.02	3.08	Positivo	-	Ci-Co-En-A-Com-Ag; 48h
SIPYMi210 ⁻² 1	Patrón 43	0.77	10.47	2.25	Positivo	6.52	Ci-Co-En-N/A O-Gl; 24/48h
SIPYMi210 ⁻² 4	Patrón 43	0	1.22	2.41	Positivo	ND	Ci-Co-En-B/A O-R-P; 24/48h
SIPDAMi210 ⁻² 1	Patrón 44	0	3.73	2.27	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Com; 48h
SIPDAMi210 ⁻² 3	Patrón 44	2.48	3.12	2.35	Positivo	10.11	Ci-Co-En-A-Com; 48h

SIPDARi10 ⁻¹	Patrón 45	1.77	3.77	2.35	Positivo	5.51	Ci-Co-En-A-P-Com; 48h
SIPDARi10 ⁻³	Patrón 46	17.07	24.49	2.32	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-V; 48h
SIPDARi10 ⁻²	Patrón 47	3.05	6.51	2.67	Positivo	-	Ci-Co-En-B-S-R-P-Poca; 48h
SIPDARi210 ⁻²	Patrón 48	0.46	4.22	-	Positivo	15.78	Ci-Co-En-B-Ag-Rd; 48h
SIPYRi110 ⁻¹	Patrón 49	0.53	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-P-Com; 24h
SIPYRi110 ⁻²	Patrón 49	0.11	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-Com; 24h
SIPYRi110 ⁻³	Patrón 49	0.28	0.28	-	Positivo	6.12	Ci-Co-En-M-Rd-Com; 24h
SIPDARi210 ⁻²	Patrón 49	0	0.32	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-Ag-Rd; 48h
SILPDARi10 ⁻²	Patrón 49	0	2.08	-	Positivo	ND	I-Gl-V; 24h
SIPDAHRi4	Patrón 50	3.07	0	3.83	Positivo	13.51	Ci-Co-En-B-Rd; 48h
SIPYRi110 ⁻²	Patrón 51	0	1.75	-	Positivo	-	Ci-Co-En-M-Cr-Com-Gl; 24/48h
SILBRi210 ⁻²	Patrón 52	0.58	10.77	2.26	Positivo	2.76	Ci-Co-En-A-P; 24h
SIPYRi110 ⁻²	Patrón 53	0	0	2.37	Positivo	0.88	Ci-Co-En-A O-R-Cos-S-P; 24h
SIPYMi210 ⁻³	Patrón 54	21.03	49.42	-	Positivo	-	Pl-En-N-S-L-Puntos; 48h
SIPYRi110 ⁻³	Patrón 55	0	6.16	-	Negativo	-	Pl-En-T/N-L-S; 48h
SIPYMi10 ⁻²	Patrón 56	0	3.62	-	Positivo	20.01	Ci-Co-En-A Cl/Bg-P; 48h
SIPYMi10 ⁻² .1	Patrón 57	0	3.04	2.33	Positivo	22.17	Ci-Co-En-A-P; 48h
SIPYMi110 ⁻¹	Patrón 57	0	0	2.22	Positivo	1.46	Ci-Co-En-A-D; 48h
SIPYMi110 ⁻²	Patrón 57	22.35	46.25	-	Positivo	7.25	Ci-Co-En-A Cl; 48h
SIPYMi210 ⁻³	Patrón 58	1.35	36.55	2.98	Negativo	-	Ci-Co-En-Ng-P-Cr; 48h
SIPYMi210 ⁻³	Patrón 59	1.41	36.5	2.33	Positivo	1.18	Ci-Co-En-Ng-P-R; 48h
SIPYRi110 ⁻²	Patrón 60	0	1.26	-	Negativo	2.01	Ci-Co-En-T/B-Rd-++P; 24h
SIPYMi110 ⁻³	Patrón 61	4.16	0	-	Positivo	0.003	Ci-Co-En-A/Bg-Gl-P; 48h
SIPYMi110 ⁻³	Patrón 61	13.69	52.28	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A/C-P; 48h
SIPYMi210 ⁻¹	Patrón 61	8.82	49.69	-	Positivo	4.27	Ci-Co-En-N-Cr; 48h
SIPYMi210 ⁻²	Patrón 61	8.6	1.25	-	Positivo	7.03	Ci-Co-En-T/A-P; 24/48h
SIPYRi110 ⁻²	Patrón 62	0	6.93	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A/B-P; 48h
SIPYRi110 ⁻³	Patrón 62	0	0	2.3	Positivo	4.31	Ci-Co-En-A O-Rd-Com; 48h
SIPYMi210 ⁻³	Patrón 63	31.21	37.05	2.19	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-++P-Com; 24/48h
SIPYMi210 ⁻³ .1	Patrón 63	40.57	38.84	2.43	Positivo	29.5	Ci-Co-En-A-++P-Com; 24/48h
SIPYRi110 ⁻³	Patrón 64	19.37	14.57	2.18	Positivo	1.9	Ci-Co-En-A O-P-Rd; 24h
SIPYRi110 ⁻²	Patrón 65	2.93	13.73	2.37	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-R-Com; 24h
SILPDAMi10 ⁻¹	Patrón 65	8.92	18.43	2.22	Positivo	1.1	Co-En-T-V-Gl-Cos; 24h
SIPYRi110 ⁻³	Patrón 66	0	1.95	-	Positivo	-	Ci-Co-En-A/N-P; 48h

SIPYMi110 ⁻² 2	Patrón 67	32.04	20.48	-	Positivo	-	Ci-Co-En-A BI-P-Com-V; 24h
SIPYMi110 ⁻² 1	Patrón 68	35.82	51.53	2.42	Positivo	25.75	Ci-Co-En-A FI-Com; 24h
SIPYMi110 ⁻² 3	Patrón 69	28.41	19.65	-	Positivo	-	Ci-Co-En-A CI-Com; 24h
SIPYMi110 ⁻¹ 1	Patrón 70	0	0	2.47	Positivo	19.33	Ci-Co-En-B-Cr-L; 24/48h
SIPYRi110 ⁻¹ *	Patrón 71	10.24	1.29	-	Positivo	2.45	Ci-Co-En-B/M-Cr+++P-GI; 24h
SIPYMi210 ⁻² 2	Patrón 72	1.39	1	-	Positivo	7.12	Ci-Co-En-B-P-Com; 24/48h
SIPYRi110 ⁻³ 1	Patrón 73	0	2.16	-	Negativo	0.08	Ci-Co-En-T/B+++P; 48h
SIPYMi210 ⁻² 1.1	Patrón 74	0.82	5.25	2.8	Positivo	1.84	Ci-Co-En-B-Com; 24/48h
2SILBRi10 ⁻¹ 2*	Patrón 74	-	-	X	NC	ND	Ci-Co-En-B/T-P-Rd; 48h
2SIPYMi10 ⁻¹ 1*	Patrón 74	19.14	11.52	-	Positivo	0.04	Ci-Co-En-B-P-Com-D; 24h
2SIPYMi10 ⁻¹ 7	Patrón 74	11.92	7.14	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-P-El; 24h
SSIPDAMi10 ⁻¹ 2	Patrón 74	-	-	2.32	NC	ND	Ci-Co-En-B/T-P+++GI; 24h
SIPYRi110 ⁻² 1	Patrón 75	0	4.09	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-R-GI-Ag; 24h
SIPYRi110 ⁻³ 4	Patrón 75	6.58	0	3.67	Positivo	11.45	Ci-Co-En-B-P; 24h
SIPYRi110 ⁻² 3	Patrón 76	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-Com-Cr; 24h
SIPDAMi110 ⁻³ 4	Patrón 77	1.28	9.74	2.58	Positivo	0.4	Ci-Co-En-A-P-Com; 48h
SIPYRi110 ⁻³ 4	Patrón 78	0	1.45	-	Positivo	0.99	Ci-Co-En-B/M-Com; 48h
2SILB Mi10 ⁻¹ 3	Patrón 79	14.25	18.73	2.41	Positivo	-	Ci-Co-En-A-P; 24h
SSILB Mi10 ⁻¹ 1	Patrón 79	18.82	34.92	-	Positivo	0.59	Ci-Co-En; 24/48h
2SIPYMi10 ⁻¹ 2*	Patrón 79	10.34	32.91	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-P-Com-D; 24h
2SIPYRi10 ⁻¹ 3	Patrón 80	24.96	41.7	-	Positivo	0.32	Ci-Co-En-B-G-S-R-Com-D; 24h
2SIPYRi10 ⁻¹ 1*	Patrón 81	8.27	41	-	Positivo	1.35	Ci-Co-En-B-P-V-GI-Com-Cr-D; 24h
2SIPYRiv10 ⁻¹ 1	Patrón 82	0	42.16	-	Positivo	-	Ci-Co-En-B-D-R; 24h
2SILBRi10 ⁻¹ 1*	Patrón 83	10.88	26.49	-	Negativo	-	Ci-Co-En-A FI-P+++S-Ag; 48h
2SIANMi10 ⁻¹ 2*	Patrón 84	24.39	43.63	-	Positivo	0.02	Ci-Co-En-B-P-Rd; 24h
2SIPYRiv10 ⁻¹ 2	Patrón 85	20.89	43.52	-	Positivo	0.02	Ci-Co-En-B-Cr-V; 24h
2SILB Mi10 ⁻¹ 4	Patrón 86	24.41	17.61	-	Positivo	0.07	Ci-Co-En-B-P-Ag; 24h
2SILB Mi10 ⁻¹ 2	Patrón 87	25.68	40.38	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B/C-Rd-Ag-P-De-El; 24h
SSIPYMi10 ⁻² 1	Patrón 87	41.66	47.58	2.33	Positivo	13.97	Ci-Co-En-A-Rd-GI; 24h
2SIPYRiv10 ⁻¹ 3	Patrón 87	-	-	X	NC	ND	Ci-Co-En-B/M-GI-Cr; 24h
2SIPYRin10 ⁻¹ 1	Patrón 87	-	-	X	NC	ND	I-Co-En-Bg-R-G-GI-Cr; 24h
SSIPYRi10 ⁻¹ 1	Patrón 87	0	6.38	-	Positivo	0.03	Ci-Co-En-B-P+++Com-De; 24h
2SIANMi10 ⁻¹ 1*	Patrón 88	41.77	49.16	3.39	Positivo	13.14	Ci-Co-En-A/N-P-Ag-L; 24h
SSIANRi10 ⁻¹ 2	Patrón 89	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-Cos-R-D-V-GI; 24h

SSIANMi10 ⁻¹ 1	Patrón 90	39.29	46.78	2.74	Positivo	18.11	Ci-Co-En-A Cl-Rd-P++; 24h
SSIPDAMi10 ⁻¹ 1	Patrón 90	5.66	17.22	2.37	Positivo	ND	Ci-Co-En-A Cl-P+++L-S; 24h
SSIPDAMi10 ⁻¹ 4	Patrón 91	33.61	41.85	2.29	Positivo	ND	I-Co-En-Bg-R-Gl-V-De-An; 24h
2SIPYMi10 ⁻¹ 4	Patrón 92	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-M-P-S-L; 24h
2SIPYMi10 ⁻¹ 5	Patrón 93	0	11.04	-	Positivo	0.42	Ci-Co-En-A/N Fl-Cr-P+++; 24h
2SIPYMi10 ⁻¹ 3	Patrón 94	0	0.71	-	Positivo	5.53	I-Co-En-A Fl-El-Cos-Cr-V-Gl; 24h
2SIPDARi10 ⁻¹ 1*	Patrón 95	-	-	2.97	Positivo	ND	Ci-Co-En-B-P-S-L; 48h
2SIPYMi10 ⁻¹ 6	Patrón 96	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-Rs-P+++L-S; 24h
SSIPYMi10 ⁻¹ 1	Patrón 96	34.69	47.88	2.96	Positivo	15.66	Ci-Co-En-A Cl-Rd-De-Com; 24h
SSIPDAMi10 ⁻¹ 3	Patrón 97	0	23.03	2.36	Positivo	5.32	Ci-Co-En-A-P+++Gl; 24h
SSIANMi10 ⁻² 1	Patrón 98	1.05	11.7	2.34	Positivo	6.37	Ci-Co-En-A Fl-P+++L-S; 24h
2SIANRi10 ⁻¹ 1	Patrón 99	0	0	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A Cl-P+++S-L; 48h
SSIANMi10 ⁻² 2	Patrón 100	2.69	3.83	-	Positivo	19.3	Ci/I-Co-En-B-Cr-V-Gl; 24h
2SILBMi10 ⁻¹ 1*	Patrón 101	44.44	50.73	3.18	Positivo	9.3	Ci-Co-En-A-G-Rd-Com-De-El; 24h
SSILBMi10 ⁻² 2	Patrón 101	1.24	30.02	2.26	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-P+++; 24h
SSILBMi10 ⁻² 3	Patrón 101	30.31	38.47	2.42	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-P-Rd-Com-R-El
SSIANRi10 ⁻¹ 1	Patrón 102	0	0	-	Negativo	ND	Ci-Co-En-B/Bg-P+++L-S; 24h
2SIPDARiv10 ⁻¹ 1	Patrón 103	-	-	X	NC	ND	Ci-Co-En-B-P-S-L; 24h
2SIPYRi10 ⁻¹ 2	Patrón 104	25.18	45.87	-	Negativo	0.21	Ci-Co-En-M/A-G-V-Gl-R; 24h
SILANMi10 ⁻² 1	Patrón 105	2.77	13.15	2.31	Negativo	1.88	Ci-Co-En-Bg-P+++Rd; 24h
SILANMi10 ⁻² 2	Patrón 106	0	0.58	2.37	Positivo	7.56	Ci-Co-En-N-P+++; 24h
SILANRi10 ⁻² 3	Patrón 106	0	15.29	X	NC	ND	Ci-Co-En-B-Rd-R-Cos-De; 24h
SILANMi10 ⁻² 3	Patrón 107	0	16.02	X	NC	3.38	Ci-Co-En-B-P+++; 24h
SILANRi10 ⁻² 2	Patrón 107	0	1.66	2.24	Negativo	1.44	Ci-Co-En-Bg-Rd; 24h
SILLBRi10 ⁻² 2	Patrón 107	0	0	-	Negativo	2.67	Ci-Co-En-Bg-Rd-P+; 24h
SILPYMi10 ⁻² 1	Patrón 107	0	0	2.31	Positivo	2.9	Ci-Co-En-A-Rd-De; 24h
SILPYMi10 ⁻² 2	Patrón 107	1.37	4.29	-	Positivo	0.36	Ci-Co-En-A-Rd; 24h
SILPYRi110 ⁻² 1	Patrón 107	0.33	4.09	-	Positivo	ND	Ci-Co-En-A-Rd; 24h
SILANRi10 ⁻² 1	Patrón 108	3.08	22.4	2.34	Positivo	6.1	Ci-Co-En-N-P+++S-L; 24h
SILLBRi10 ⁻² 1	Patrón 109	0	3.49	2.33	Positivo	10.24	Ci-Co-En-N-Rd; 24h
SILPYMi10 ⁻² 3	Patrón 110	0.16	0.35	X	NC	ND	Ci-Co-En-B-P+++; 24h
SILPYRi110 ⁻² 2	Patrón 110	0	0.99	-	Negativo	ND	Ci-Co-En-A; 24h
SILPYRi110 ⁻² 3	Patrón 110	0	0	-	Negativo	ND	Ci-Co-En-A/N Osc caja-G-V; 24h
SILPDAMi10 ⁻³ 1	Patrón 110	0	0.7	2.23	Positivo	0.03	I-T centro B-Gl-V; 24h

SILPDAMi10 ⁻² 2	Patrón 110	0	2.18	X	NC	ND	I-T centro B-Gl-V; 24h
SILLBmi10 ⁻² 1	Patrón 111	0	1.45	2.37	Positivo	5.48	Ci-Co-En-N-Rd-De; 24h
SILLBmi10 ⁻² 2	Patrón 111	0	3.11	2.19	Positivo	0.21	Ci-Co-En-Bg-P++; 24h
SIPYRi110 ⁻³ 3	Patrón 112	0	2.52	-	Positivo	-	Ci-Co-En-B-Cr-Gl-P; 48h
SILPDAMi10 ⁻² 1	Patrón 113	3.28	12.93	2.46	Positivo	6.6	Ci-Co-En-T centro B-V-Gl; 24h
SIPDARi210 ⁻¹ 1	Patrón 114	0.97	3.07	X	NC	ND	NC
99	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
SILPDARi10 ⁻² 2	NP	NP	NP	NP	NP	NP	I-Gl-V; 24h

Notas de las abreviaciones de la tabla: NC: No creció, ND: No determinada, NP: No presente.