



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado En Ingeniería de Biosistemas



Identificación de biomarcadores en la interacción de bacterias benéficas con jitomate (*Solanum lycopersicum*) bajo estrés biótico y abiótico.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

Mc. Nallely Solano Alvarez

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Presidente

Firma

Dra. Rosalía V. Ocampo Velázquez
Secretario

Firma

Dr. Enrique Rico García
Vocal

Firma

Dr. Luis Miguel Contreras Medina
Suplente

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero, 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Identificación de biomarcadores en la interacción de bacterias benéficas con jitomate (*Solanum lycopersicum*) bajo estrés biótico y abiótico.

por

Nallely Solano Alvarez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGDC-156551

1. Fundamentación teórica.

a) Importancia de microorganismos

Aunque no se conocía la existencia de las bacterias hasta el descubrimiento de Anton von Leeuwenhoek en 1683, su utilización para estimular el crecimiento de las plantas ha sido explotada desde tiempos ancestrales. Para la remediación de suelos, Theophrastus (327-287 AC) sugirió mezclar diferentes muestras de suelo (Tisdale SL., 1975). Hellriegel y Wilfarth investigaron la colonización de la rizosfera en pastos y legumbres, propusieron que las bacterias del suelo tenían la habilidad de convertir el N₂ atmosférico en formas asimilables por las plantas (Hellriegel, 1888).

Con experimentos en rábano, Kloepper introdujo el término “rizobacteria” a las bacterias que eran capaces de colonizar la raíz de las plantas, mientras que a las bacterias que eran capaces de estimular el crecimiento y de reducir la incidencia de las muertes de plantas (Kloepper J. S., 1978) las denominó como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) (Kloepper J. S., 1981). Las BPCV pueden definirse como una parte indispensable de la biota de la rizosfera que cuando se desarrollan en asociación con plantas huésped pueden estimular el crecimiento del mismo (Haiyambo, 2015).

Se ha impulsado la investigación de los microorganismos del suelo con potencial de promover el crecimiento vegetal debido a que las plantas dan cobijo a la comunidad microbiana en las raíces, exudando compuestos orgánicos e inorgánicos que favorecen a determinadas especies de bacterias (Babalola, 2010).

El uso de microorganismos podría ser una alternativa en su uso en suelos de climas secos debido a que en condiciones de poca humedad los cultivos necesitan realizar cambios en su metabolismo para contrarrestar el estrés sufrido por la poca disponibilidad del agua y la simbiosis que llegan a tener con los microorganismos cobra mayor importancia, ya que entre el 10 y 40% de los carbonos asimilados por

la planta son exudados por la raíz y tomados por los microorganismos de la rizósfera (Gobran, 2001).

Estos microorganismos se encuentran en el suelo o en la rizósfera, donde encuentran humedad que generalmente es poco variable y concentraciones altas de nutrientes (Grobela, 2015), estos microorganismos pueden promover el crecimiento de las plantas ya que les proporcionan nutrientes como el nitrógeno, fósforo y hierro de formas en que son fácilmente asimilables por la planta (Haiyambo D. P.-H., 2015) (Hernández-Rodríguez, 2006) y que se beneficien de otros mecanismos: como la producción de fitohormonas o de procesos antagónicos hacia patógenos (Ruzzi, 2015).

Esta zona rizósferica presenta una gran variedad de bacterias que se alimentan de la exudación de compuestos orgánicos procedentes de la raíz y que les sirven como fuente de energía (Chauhan, 2015). Estos microorganismos aislados pueden ser utilizados como bio-fertilizantes en la producción sustentable de cultivos (Haiyambo D. P.-H., 2015); dándole especial importancia aquellos nativos o endémicos ya que están adaptadas al medio ambiente local y son más competitivas que las no-nativas (Agaras 2015, Santoro, 2015).

Se sabe que la interacción entre diversas plantas y estas bacterias benéficas pueden llegar a tener múltiples beneficios por ejemplo *Bacillus amyloliquefaciens* que confiere protección en el cultivo de arroz a estrés causado por salinidad y sequía (Tiwari, 2017), *Kosakonia radicincitans* que afecta en la cantidad de aminoácidos, azúcar y compuestos volátiles mejorando el sabor del jitomate (Berger, 2017) o inclusive *Variovorax paradoxus* que ayuda a reducir la fertilización en condiciones de sequía de este mismo cultivo (Calvo-Polanco, 2016).

b) Biofertilizantes

En los últimos años las investigaciones sobre los beneficios de las denominadas Bacterias de Crecimiento Vegetal han ido en aumento debido a que son una gran herramienta para su utilización como alternativa al uso o disminución de fertilizantes químicos.

Estos nuevos productos generados del aislamiento de estas bacterias han demostrado tener características de supresión de patógenos, antibiosis, producción de sideróforos, etc; sin que se haya determinado un género bacteriano específico o un cultivo único de aplicación (Thilagar, 2018).

Los microorganismos benéficos están presentes en el suelo pero no siempre son los adecuados para la planta que se quiere sembrar o son muy escasos para poder tener un impacto positivo. Para potenciar su actividad benéfica y asegurar el éxito del uso los microorganismos benéficos se hace necesario aplicación de Biofertilizantes (bioinoculantes), elaborados con microorganismos promotores de crecimiento como lo son las BPCV (PGPR por sus siglas en inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria), como *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., que son las más utilizadas en los actuales productos comerciales (Bach-Álvarez, 2008).

Un biofertilizante es aquel que reúne a los microorganismos con el propósito de que al ser aplicado en las plantas provea de los nutrientes necesarios de una manera eficaz, induzca cierta resistencia a fitopatógenos (agentes infecciosos en plantas) o aumente ciertas características de calidad a los cultivos (Du Jardin, 2015).

a) Cultivo de jitomate

El cultivo de jitomate ha sido una gran aportación de México para el mundo ya que siendo originario de nuestro país actualmente representa la segunda hortaliza más cultivada a nivel mundial, con una producción aproximada de 170 millones de toneladas en 2014 (FAO, 2017), resultado de su alta demanda para la preparación de distintos tipos de alimentos en casi todos los países del mundo. En México el jitomate representa la principal hortaliza cultivada con una producción de 2, 769 000 toneladas en 2016 (SAGARPA, 2017).

Estas cifras ubican al cultivo de jitomate como objetivo en el desarrollo de tecnología agrícola para la producción sustentable de este, buscando aumento en la producción y/o reducción a las pérdidas ocasionadas por los diversos ataques de estrés biótico y abiótico a los que se enfrenta.

c) estrés biótico y abiótico

El principal estrés biótico de este cultivo es el cáncer bacteriano que una vez presente las pérdidas en los rendimientos pueden ser muy graves desde un 40 al 100% (Sen, 2015) es por esto que *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agente causal de esta enfermedad, es un organismo de cuarentena en la Unión Europea y en muchos otros países (Daferera, 2012).

Actualmente no se puede dejar de lado al estrés abiótico de causado por déficit hídrico ya que es el estrés que mayor impacto tiene sobre el crecimiento y desarrollo en las plantas en general, limitando la producción en todo el mundo. Se ha estimado que casi un tercio de los suelos son demasiado secos para apoyar el desarrollo y la productividad normales de la planta (Golldack, 2014). Además, el cambio climático global está extendiendo este problema del déficit hídrico a las regiones donde en el pasado los impactos de la sequía fueron insignificantes (Trenberth, 2014).

Es por esto que es necesario nuevas herramientas, como lo es la inoculación de bacterias benéficas, para apoyar la producción de alimentos contrarrestando los

efectos negativos de estreses que cada vez tienen mayor importancia como lo son el cáncer bacteriano y la disminución de la disponibilidad de agua; sin los perjuicios que ahora sobrellevamos de los agroquímicos hasta ahora utilizados.

2. Antecedentes.

a) Biomarcadores

Los biomarcadores son aquellas diferencias no típicas controladas genéticamente, de cualquier molécula orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo. Los biomarcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que no afecte al carácter en estudio (Tanksley, 1983). Cuando un organismo está expuesto a ciertas condiciones la expresión de los genes cambia, siendo esta una herramienta útil para la selección y evaluación de material genético.

Existen diversas relaciones que tienen las plantas con su ambiente, una de las que ha cobrado importancia en los últimos años, es la que tienen con los microorganismos presentes en el suelo, específicamente las que tienen con las bacterias benéficas que son aquellas que llegan a impactar positivamente en el crecimiento de las plantas (Kloepper J. S., 1978).

Estas bacterias benéficas ayudan en la promoción del crecimiento de las plantas por medio de varios mecanismos como lo es la biodisponibilización de elementos como el nitrógeno, fósforo y hierro a formas en que son fácilmente asimilables por la planta (Hernández-Rodríguez, 2006) (Haiyambo, 2015), la producción de fitohormonas o inclusive de procesos antagónicos hacia patógenos (Ruzzi, 2015), sin que se haya determinado un género bacteriano específico, un cultivo único de aplicación (Thilagar, 2019) ni los mecanismos de acción intrínsecos de las plantas promovidos por este tipo de simbiosis.

b) Perjuicios de los agroquímicos

Uno de los principales problemas que enfrenta la producción de tomate en nuestro país es el excesivo uso de agroquímicos ya sea para la nutrición de los cultivos o para tratar de contrarrestar el ataque a las plagas y enfermedades (SAGARPA, 2017), lo que trae como consecuencia incrementos en los costos de producción así como el costo ambiental que el desmedido uso de estos conlleva.

El uso de agroquímicos per se ha tenido un impacto negativo en muchos aspectos ya que el 17.8% de la superficie del territorio nacional presenta una degradación química equivalente a 34.04 millones de hectáreas, convirtiéndolo en el primer problema de degradación de suelos al que se debe enfrentar (SEMARNAT y CP, 2015).

Los nutrientes como el nitrógeno en el suelo tiene un índice de asimilación muy bajo por los cultivos, del total de nitrógeno que se incorpora al suelo, dependiendo del manejo y del tipo de fertilizante aplicado, más del 50% (hasta el 80%) es perdido por lixiviación. Se lava en nitrato orgánico o formas de éste que se pueden disolver en agua causando un aporte masivo de nutrientes inorgánicos en ríos, lagos y mares, que tiene como nombre eutrofización (Castellanos, 2006). Los fosfatos de los fertilizantes químicos también son responsables de la contaminación ambiental ya que ayudan en la proliferación de cianobacterias, que pueden producir toxinas de alto riesgo para la salud de la población expuesta. Algunas de estas toxinas se han asociado a enfermedades nerviosas de gravedad, semejantes al Alzheimer (SAGARPA-COFUPRO-UNAM, 2016).

Uno de los problemas más generalizados y que sigue en aumento, es el desabasto del agua, ya que una gran cantidad de mantos acuíferos de donde se extrae el agua presentan algún grado de contaminación; además de que el nivel de abatimiento de dichos mantos ha sido desde hace ya algún tiempo de 3 a 4 m por año, lo que trae como consecuencia que en muchas regiones actualmente se tenga que perforar a profundidades entre 200 y 300 m para encontrar agua, con el

consecuente costo que esto conlleva y que muchos productores no pueden solventar (Ortiz-Partida, 2019).

Se han utilizado microorganismos para su uso como biofertilizantes, pero dada la complejidad de la interacción entre las entidades biológicas y su desconocimiento a detalle sobre esta, siguen sin obtenerse los resultados esperados (Tsukanova, 2017). Por esta razón es necesario conocer de una manera sencilla y rápida e inclusive a priori los marcadores biológicos que necesitan estar presentes en la interacción de bacterias benéficas y el cultivo en este caso de jitomate, para que estos aislados bacterianos puedan ser utilizados como una opción en una práctica agrícola más sana y de precisión, atacando problemas que se tienen por el uso excesivo de fertilizantes y agroquímicos.

c) Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

El término bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) es utilizado para todas aquellas bacterias que impactan positivamente en el crecimiento de las plantas (Kloepper J. S., 1978). Incluye tres tipos de bacteria de suelo, dependiendo de su estilo de vida: bacterias de vida libre que no habitan la zona de la rizósfera, las que colonizan la raíz (rizoplano) y las bacterias endófitas que viven dentro de la raíz (Ruzzi, 2015).

Se ha demostrado que la actividad de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal no está limitada a un grupo específicos de bacterias ya que se ha reportado actividad en cepas que pertenecen a diferentes géneros como *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, y *Azospirillum* (Kloepper J. L., 1989) (Verma, 2014) (Kumar, 2015) (Singh, 2015) (Meena V. M., 2015).

El uso estos microorganismos podría ser una alternativa en su uso en suelos con déficit hídrico debido a que en condiciones de poca humedad los cultivos necesitan realizar cambios en su metabolismo para contrarrestar el estrés sufrido

por la poca disponibilidad del agua y la simbiosis que llegan a tener con los microorganismos cobra mayor importancia, ya que entre el 10 y 40% de los carbonos asimilados por la planta son exudados por la raíz y tomados por los microorganismos de la rizósfera (Gobran, 2001).

d) *Respuestas a la interacción plantas-bacterias benéficas*

Se sabe que la interacción entre diversas plantas y estas bacterias benéficas pueden llegar a tener múltiples beneficios por ejemplo *Bacillus amyloliquefaciens* que confiere protección en el cultivo de arroz a estrés causado por salinidad y sequía (Tiwari, 2017), *Kosakonia radicincitans* que afecta en la cantidad de aminoácidos, azúcar y compuestos volátiles mejorando el sabor del jitomate (Berger, 2017) o inclusive *Variovorax paradoxus* que ayuda a reducir la fertilización en condiciones de sequía de este mismo cultivo (Calvo-Polanco, 2018).

Cada cepa de bacterias benéficas para ser introducida en la agricultura debe ser estudiada para poder evaluar los múltiples posibles beneficios en particular, con la estimulación del crecimiento y con el desarrollo de resistencia a estreses bióticos y abióticos (Cardinale, 2015). Es importante comprender la capacidad de producir cambios en la expresión génica, cambios metabólicos y morfológicos subsecuentes que la cepa produce en una planta huésped ya que ayudaría a obtener información multidimensional sobre los cambios inducidos por estos microorganismos en los cultivos para una aplicación efectiva bajo cualquier tipo de estrés (Tsukanova, 2017).

3. Hipótesis.

Debido a que la expresión fenotípica es resultado de la carga genética y su interacción con el ambiente, existen patrones, genómicos, metabolómicos y morfológicos que pueden ser usados como biomarcadores de una interacción benéfica entre bacterias y cultivo de jitomate bajo estrés biótico y abiótico.

4. Objetivo.

Determinar biomarcadores correspondientes a la interacción de bacterias benéficas con el cultivo de jitomate que se asocian a los mecanismos de defensa bajo estrés biótico (*Clavibacter michiganensis*) y abiótico (déficit hídrico) para su posterior aplicación como un bioinoculante de precisión.

5. Objetivos específicos:

- Determinar las características fisiológicas/morfológicas del cultivo de jitomate con inoculación de aislados bacterianos benéficos, en diferentes tratamientos de estrés: biótico (*Clavibacter michiganensis*) y déficit hídrico.
- Analizar actividades enzimáticas y metabolitos asociados a respuesta a estrés en plantas.
- Evaluación la asociación de la presencia de *B. cereus*-Amazcala con índices NDVI y NGBVI en un cultivo en invernadero.
- Determinar niveles de expresión en genes de respuesta a estrés en plantas de jitomate que estarán expuestas a estrés biótico, así como a estrés abiótico.

6. Materiales y Métodos.

a) *Características fisiológicas/morfológicas del cultivo de jitomate con inoculación de aislados bacterianos benéficos.*

Se estandarizó el cultivo de jitomate variedad "OptiMax" en un invernadero en las instalaciones del Campus Amazcala de la UAQ, se trasplantaron 9 plántulas por tratamiento de 30 días de edad a bolsas de 2700cm³ con tezontle como sustrato, con un fotoperiodo de luz natural 12:12 con ciclos de luz-oscuridad.

Las plantas fueron regadas con una solución Steiner modificada según la etapa fenológica correspondiente con 16 tratamientos en un diseño experimental de bloques al azar, donde la mitad de ellos tuvieron un riego completo (T1-T8) y la otra mitad solo el 50% del volumen recomendado (T11-T18) (Figura 1). Las inoculaciones bacterianas con *B. c-A* (*Bacillus cereus* subs *toyonensis*) se realizaron con un cultivo celular a una concentración de 1×10^8 UFCml⁻¹, en una relación de 0.5 mL de la suspensión bacteriana por kg de sustrato.

Para todos los tratamientos la inoculación se realizó en la base de la planta con ayuda de un vaso de precipitado, para los tratamientos que además tenían inoculación vía foliar (T2, T3, T4, T12, T13 y T14) se utilizó el mismo cultivo bacteriano pero asperjado con ayuda de una bomba de aspersion manual hasta llegar al punto de rocío en las hojas.

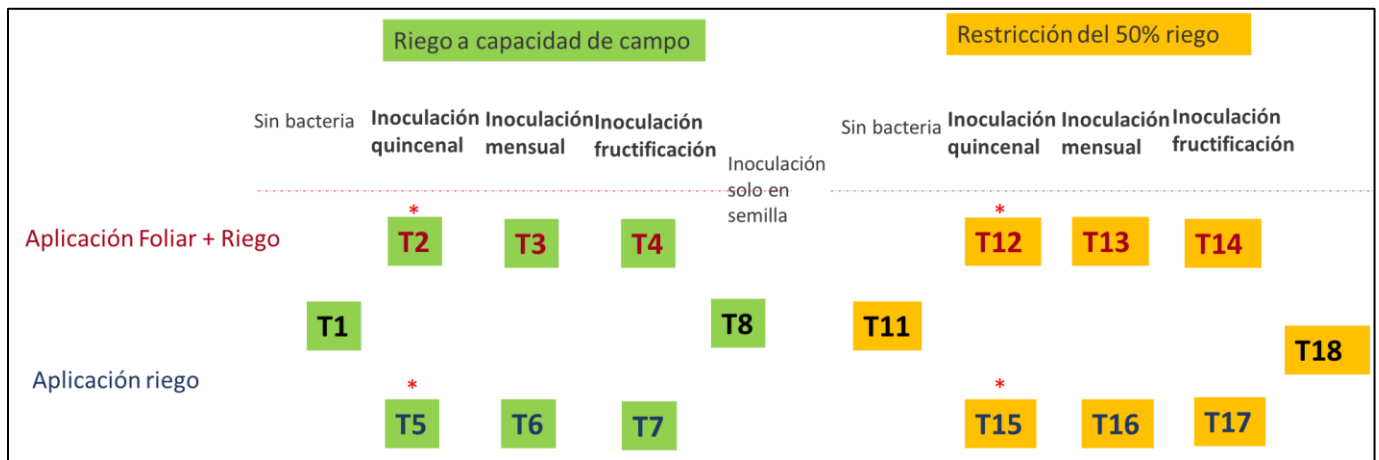


Figura 1. Diseño de tratamientos en experimento con déficit hídrico

Para el experimento con estrés biótico causado por *Clavibacter michiganensis* se utilizó un invernadero de 150 m² con 20 plántulas de jitomate por tratamiento variedad "OptiMax" de 30 días de edad en macetas con sustrato peat moss - vermiculita en relación 3:1. Con un fotoperiodo de luz natural 12:12 con ciclos de luz-oscuridad, riego diario con una solución Steiner a capacidad de campo (100 mL aproximadamente). La inoculación de los tratamientos T1, T2 y T3 con *B. c-A* se realizaron en la base de la planta con un inoculo a una concentración de 1×10^8 UFCml⁻¹, en una relación de 0.5 mL de la suspensión bacteriana por kg de sustrato y la infección con la bacteria *Cmm* (*Clavibacter michiganensis* sub *michiganensis*) se realizó con una punción con una aguja de insulina en el xilema de la planta con 0.05 mL del cultivo bacteriano infeccioso (Figura 2).

Las plantas de ambos experimentos se les midió altura con ayuda de un flexómetro, ancho de tallo con un vernier y cantidad de clorofila con un SPAD, además de tomar una muestra para secado en estufa para el cálculo de cantidad de biomasa así como otra muestra de hojas que se colocaron en nitrógeno líquido para los diferentes análisis posteriores.

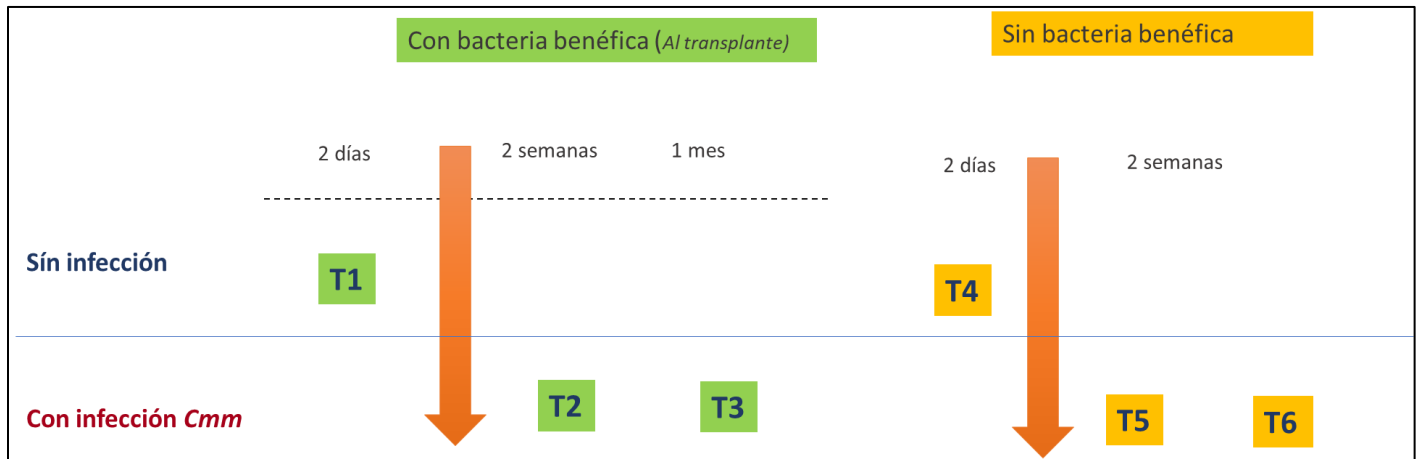


Figura 2. Arreglo de tratamientos en experimento con estrés biótico causado por *Cmm* (*Clavibacter michiganensis*)

b) *Actividades enzimáticas y metabolitos relacionadas con estrés CAT, PAL, SOD y prolina*

Las proteínas solubles totales se extrajeron de hojas liofilizadas (50 mg) molidas con 1.5 mL de buffer de extracción que contiene buffer de fosfato 0,05 M (pH 7.8), 0.1 mM Na₂EDTA. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. La concentración de proteínas se determinó utilizando el reactivo de Bradford (Merck, Darmstadt, Alemania) y albúmina de suero bovino (Merck, Darmstadt, Alemania) como estándar. El sobrenadante obtenido de las proteínas solubles totales se utilizó para cuantificar catalasa (CAT), fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y actividades de superóxido dismutasa (SOD). La actividad CAT se analizó siguiendo la tasa inicial de degradación de H₂O₂ durante 120 s a 240 nm, la actividad enzimática fue determinada (Afiyanti, 2014) con algunas modificaciones. PAL se determinó por espectrofotometría en 290 nm cuantificando el ácido cinámico formado a partir de la catálisis de L-fenilalanina (Toscano, 2018). La actividad de la SOD se determinó por espectrofotometría a 560 nm midiendo la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) (Hayat, 2018).

c) *Expresión de genes asociados a defensa (act, pr1, erf, etr)*

Marcadores moleculares para la biosíntesis de fenilpropanoides (*chs*), marcador molecular de defensa vegetal de ácido salicílico vía (proteína relacionada con la patogenicidad 1a, *pr-1a*) fueron evaluados en el estudio como indicadores de inducción de inmunidad en las plantas de tomate. El gen de la actina (*act*) se utilizó como control de mantenimiento. Las muestras por triplicado de hojas superiores se trituraron en nitrógeno líquido y se extrajeron ARN (PureZOL™, Bio-Rad). La integridad del ARN extraído se verificó por electroforesis en gel de agarosa y su pureza y concentración se evaluaron mediante un NanoDrop. Un g de ARN total de alta pureza (relación de absorbancia de 260/280 nm por encima de 2,0 y 260/230 nm relación de absorbancia 1.8-2.0) se utilizó para sintetizar el cDNA siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher™). El cDNA se diluyó a 400 ng μL^{-1} y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el posterior análisis de qPCR con las secuencias de los oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 1. El análisis se llevó a cabo en un sistema de tiempo real (Laboratorios BIORAD) utilizando sybgreen como fluoróforo. Las condiciones de reacción para todos los genes fueron: 5 s a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 40 ciclos de 5 s a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 30 s a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los niveles de expresión génica relativa se calcularon utilizando el DDCt método (Livak, 2001).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el análisis de expresión de genes

Gen	Secuencia de oligos (5'-3')	Secuencia de oligos (3'-5')
act	ATGTGACGTGGATATTAGGAAAG	AGGGAAGCCAAGATAGAGCC
chs	CCAAGGACTTGGCTGAGAAC	TATCGGGGACAAGAGTTTGG
pr1	GCCAAGCTATAACTACGCTACCAAC	GCAAGAAATGAACCACCATCC

d) *Evaluación la asociación de la presencia de B. cereus-Amazcala con índices NDVI y NGBVI en un cultivo en invernadero.*

Para el experimento de estrés biótico se tomó una fotografía por día durante una semana con una cámara RGB común y comuna una segunda cámara NIR generó la base de datos de imágenes de este experimento. Para adquirir imágenes RGB, se utilizó una cámara de teléfono inteligente Samsung Galaxy S7 Edge como fuente de imagen RGB a una resolución de 4032 x 3024 píxeles con una relación de aspecto de 4: 3. El proceso de adquisición de NIR se realizó utilizando una cámara Canon PowerShot A480 modificada a una resolución de 3648 x 2736 píxeles con el filtro de bloqueo de IR eliminado y reemplazado con un filtro azul estándar para aplicaciones NDVI para implementar un NIR-Green-Blue (NGBVI) utilizando la técnica de cámara NDVI de sensor único en la que la máscara roja se reemplazó por la máscara NIR en el sensor de la cámara (NASA, 2018). En consecuencia, se generó un conjunto de datos con 7 fotografías RGB y 7 fotografías NGBVI para poder observar cualquier cambio menor a lo largo del periodo de tiempo de una semana como se puede observar en la Figura 3, para un mejor análisis se seleccionaron solo 6 plantas por tratamiento donde las plantas A a F no fueron inoculadas con la bacteria benéfica B. c-A y las plantas 1 a 6 si fueron inoculadas.

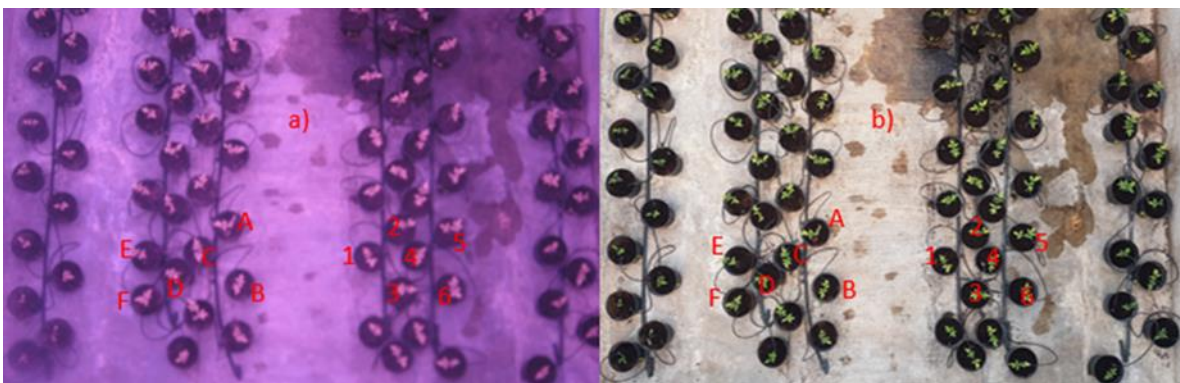


Figura 3. Ejemplo de imágenes adquiridas con ambas cámaras. a) Imagen de la cámara NGBVI. b) Imagen de la cámara RGB

e) *Análisis NDVI*

El NDVI es, con mucho, el Índice de Vegetación más utilizado para aplicaciones de agricultura de precisión y ha demostrado ser útil para visualizar la actividad fotosintética indirecta en campos que pueden estar relacionados con condiciones de estrés biótico y abiótico. Para calcular el NDVI, las operaciones de álgebra lineal deben realizarse entre las máscaras NIR y RED de acuerdo con la ecuación (A) (Chen, 2019). Como se mencionó anteriormente, este trabajo utilizó una técnica NDVI de cámara única donde se utilizó una cámara NGBVI con filtro azul y se calculó NDVI usando la ecuación (B), donde NIR proviene del lugar de la máscara roja en la imagen NGBVI y debido a la ausencia de la máscara ROJA, se utiliza la máscara AZUL en lugar de la máscara ROJA para obtener un resultado de tipo NDVI1.

$$NDVI = \frac{NIR-RED}{NIR+RED} \quad (A)$$

$$NDVI1 = \frac{NIR-BLUE}{NIR+BLUE} \quad (B)$$

f) *Análisis NGBVI*

NGBVI es un nuevo índice de vegetación basado en RGB que fue propuesto recientemente por los autores del presente estudio y se centra en resaltar las superficies de clorosis y necrosis sobre plantas verdes con una buena capacidad de ignorar la superficie sin vegetación sobre la imagen RGB. Además, NGBVI se puede calcular usando la ecuación (C), donde la resta de VERDE menos AZUL se divide por el valor máximo de píxel de la misma resta. Debido a esto, se obtiene un NGBVI en escala de grises como resultado y se puede convertir a una escala de color como Jet, CIELab, HSV, por nombrar solo algunos si el usuario desea resaltar las diferencias de imagen de una manera colorida.

$$NGBVI = \frac{GREEN-BLUE}{\max(GREEN-BLUE)} \quad (C)$$

g) Algoritmo de cuantificación

Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron seis plantas de cada uno de los dos grupos estadísticos con fines de cuantificación. Con el fin de extraer las características de las plantas por cada espécimen, se analizó una submáscara por separado para cada planta en estudio con el objetivo de cuantificar los valores de características específicas de cada planta. Además, se aplicó un algoritmo de cuantificación a cada máscara de planta, como se puede observar en la Figura 4, donde se extrae la submáscara de la planta y se binariza aún más para construir la nueva máscara de BW. Finalmente, el algoritmo de cuantificación se calcula de acuerdo con la ecuación (D) donde NBP es el número de píxeles no negros, N es el tamaño x, M es el tamaño y y todos los valores de píxeles no negros de IMG se acumulan para obtener un resultado Q cuantificado por planta.

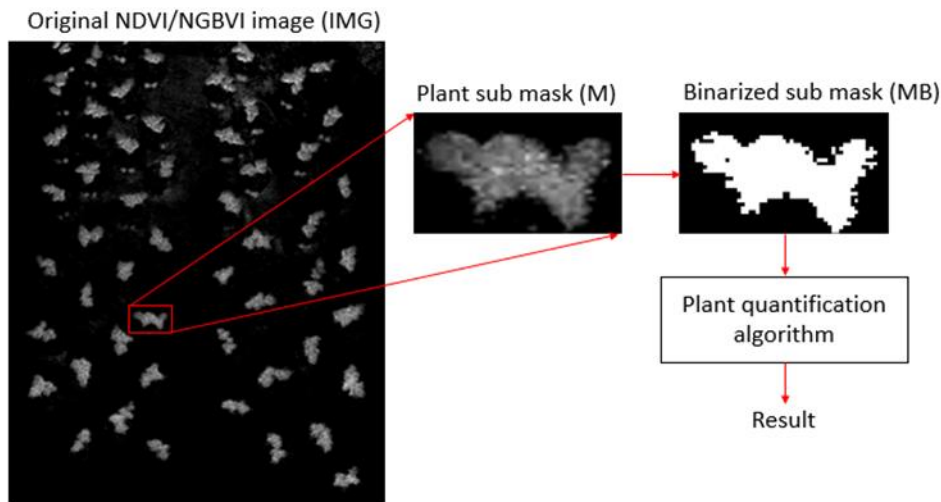


Figura 4. Diagrama de bloques para el algoritmo de cuantificación general

h) Análisis estadístico

Para las actividades enzimáticas, medidas de altura y peso de la planta, se realizó una prueba de normalidad de los datos (prueba de Anderson-Darling, $p = 0.05$). Si los datos no estaban en la normalidad, se realizaron pruebas no paramétricas como la prueba H de Kruskal-Wallis ($p = 0.05$) en lugar de ANOVA de una vía ($p = 0.05$). Todos los resultados obtenidos se expresaron mediante las medias más / menos sus errores estándar. Las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante ANOVA de una vía y las diferencias entre las medias se determinaron mediante la prueba de Tukey ($p = 0.05$) utilizando el software GraphPad PRISM versión 8.

7. Resultados

Para el experimento de estrés hídrico de acuerdo con evaluaciones intermedias durante el desarrollo de la investigación se determinó que no existía diferencia significativa entre las dos formas de inoculación de la bacteria benéfica B. c-A (en sustrato y sustrato+foliar), por lo que se decidió continuar solo con los tratamientos con inoculación en sustrato, considerando el ahorro de recursos y la practicidad de aplicación en este proyecto, pero también para su posible uso comercial.

a) Características fisiológicas/morfológicas del cultivo de jitomate con inoculación de aislados bacterianos benéficos.

Después de las aplicaciones quincenales, mensuales y en periodo de fructificación, se obtuvieron los siguientes resultados: plantas con tratamientos en déficit no existe diferencia significativa en la altura en ninguno de los tratamientos (Panel d, Figura 5), mientras que en tratamientos donde el riego no tuvo una restricción, las plantas inoculadas con el aislado bacteriano B. c-A durante el periodo de fructificación tuvieron una altura mayor (Panel d, Figura 5). En cuanto al ancho de tallo en tratamientos con riego sin restricción no hubo diferencia significativa (Panel a, Figura 5), mientras que en los tratamientos con déficit hídrico y aplicación del aislado bacteriano B. c-A durante el periodo de fructificación los tallos fueron significativamente más anchos que cualquier otro (Panel c, figura 5).

Con estos resultados podemos inferir que el aislado bacteriano tiene un efecto protector contra la disminución de la altura aun en condiciones de sequía y que incluso en estas condiciones prepara a la planta formando tallos más gruesos.

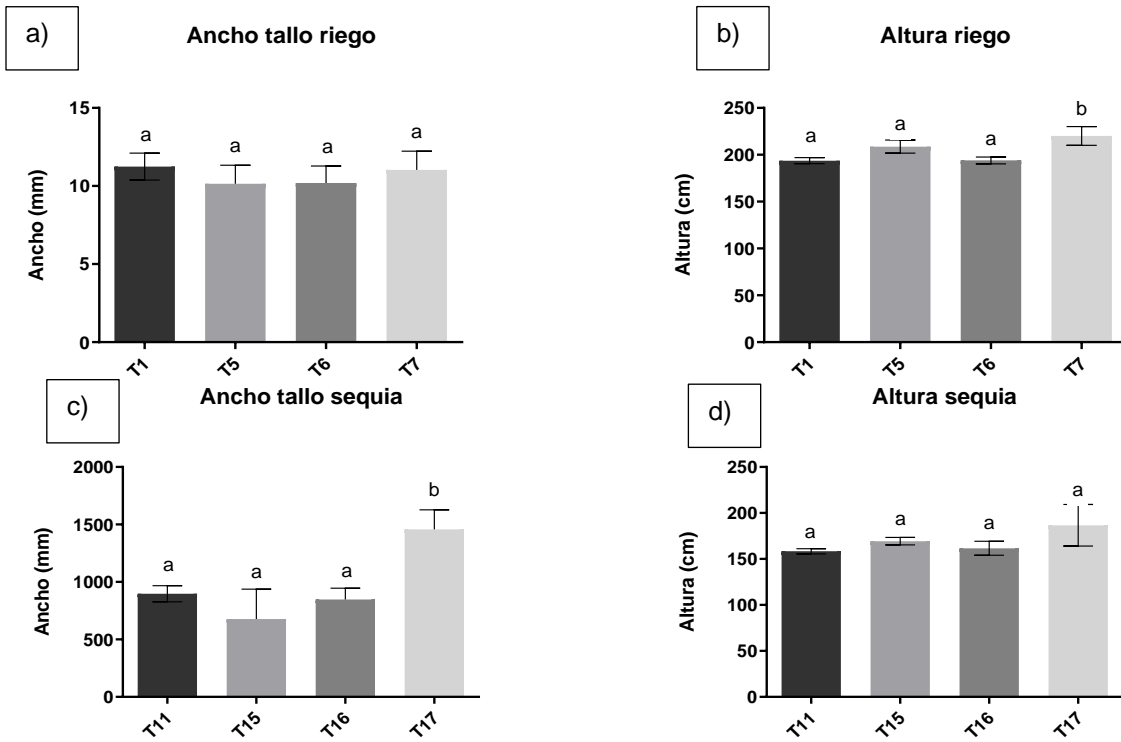


Figura 5. Evaluación de las plantas frutos en tratamientos con (gráficas en la parte superior) y sin estrés hídrico (gráficas en la parte inferior)

En el análisis de los datos obtenidos de los frutos se observó que en condiciones de déficit hídrico no hubo diferencia significativa en el número de jitomates por planta (Panel e, Figura 6), pero en el tratamiento donde se aplicó la bacteria solo en etapa de fructificación la masa de los jitomates fue mayor, así como también en el rendimiento por planta (Panel d y f, Figura 6). En cambio, en tratamientos donde no hubo restricción de agua en el riego el rendimiento en la aplicación de B. c-A de manera mensual hubo un mayor rendimiento (Panel a, Figura 6), mientras que no se vio una diferencia significativa entre tratamientos en cuanto al número de jitomates (Panel b, Figura 6)

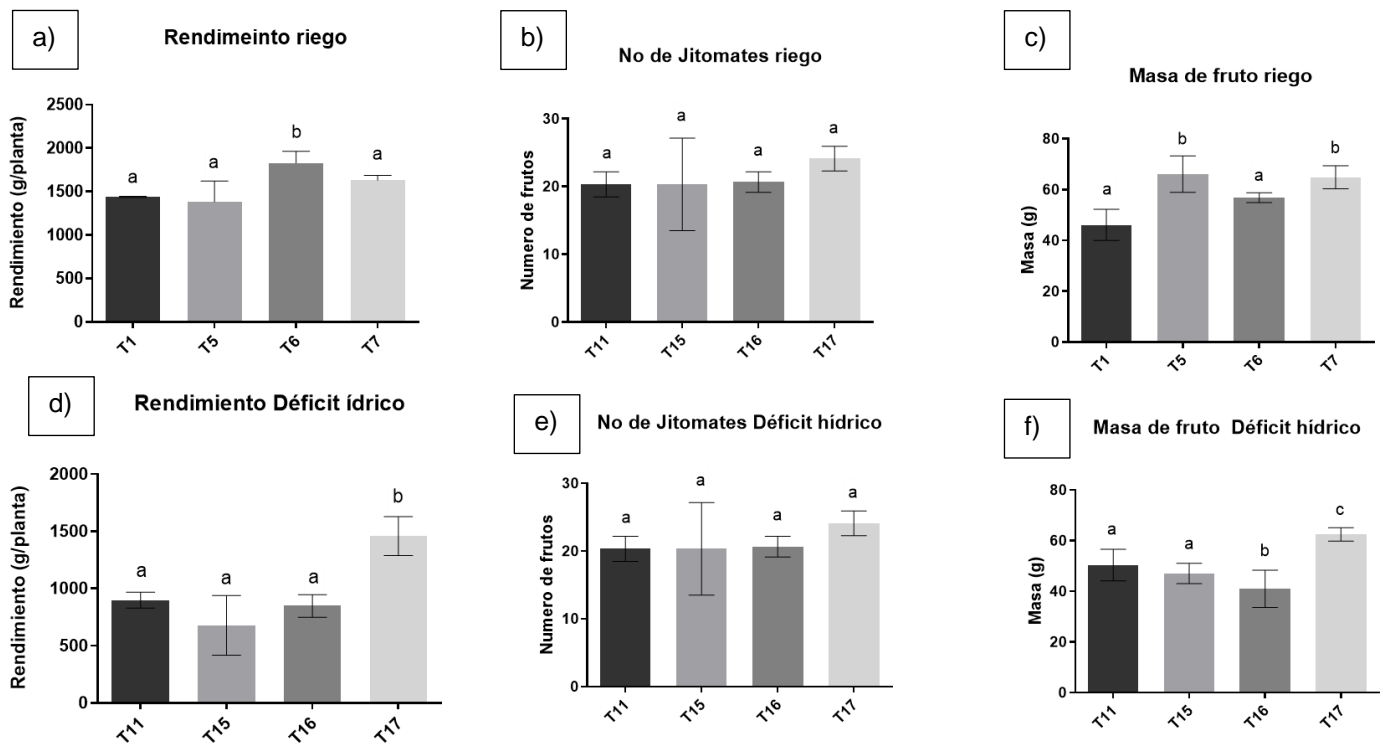


Figura 6. Evaluación de frutos en tratamientos con (gráficas en la parte superior) y sin estrés hídrico (gráficas en la parte inferior)

b) *Actividades enzimáticas y metabolitos relacionadas con estrés CAT, PAL, SOD y prolina*

Los resultados relacionados con actividades enzimáticas de los diferentes tratamientos nos muestran que el aislado bacteriano *B. c-A* disminuye la actividad enzimática de PAL tanto en condiciones de riego (Panel a, Figura 7) como en condiciones de estrés por disminución de agua (Panel e, Figura 7), en condiciones de estrés hídrico las actividades enzimáticas de CAT (Panel f, Figura 7) y de SOD (Panel g, Figura 7) disminuyen en presencia de *B. c-A* respecto al control sin inoculación bacteriana, lo cual indica que la bacteria confiere un efecto protector sobre la planta en condiciones de estrés originado por la disminución de agua.

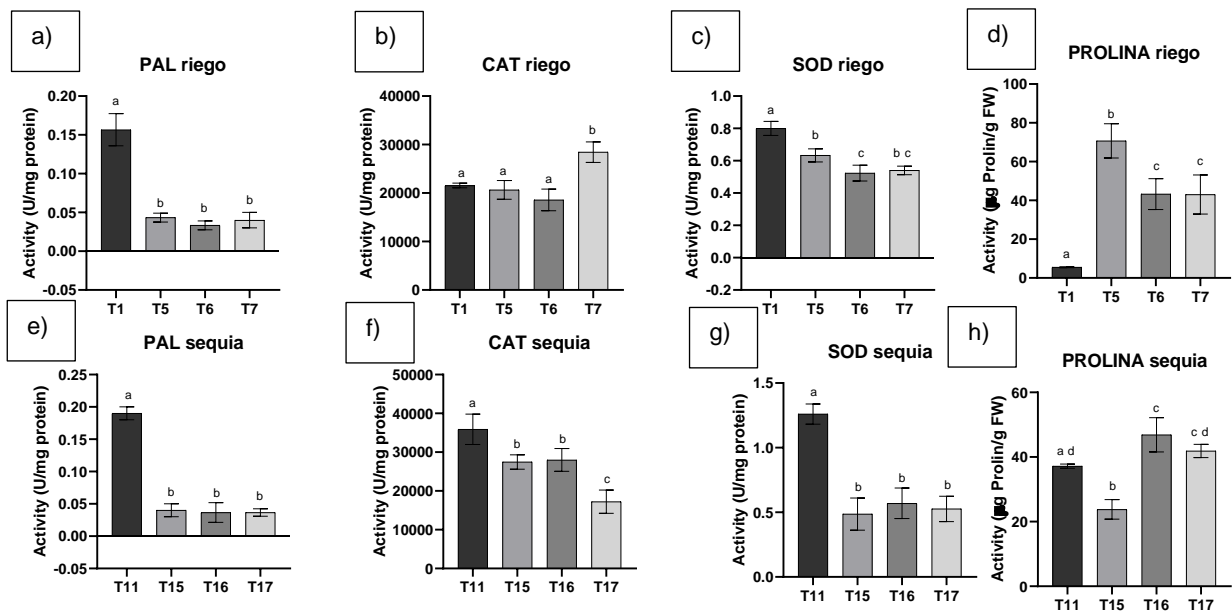


Figura 7. Actividades enzimáticas de plantas en estrés hídrico

c) *Expresión de genes asociados a defensa (act, pr1 y chs)*

Al analizar la expresión relativa de los genes *chs* y *pr 1-a* respecto al gen constitutivo *act* se encontró que el aislado bacteriano *B. c-A* aumenta la expresión de *chs* pero disminuye a su vez la de *pr1-a*, lo cual indica que la vía por la que actúa esta bacteria benéfica no es por la vía del ácido salicílico sino por otra como podría ser la vía del ácido jasmónico (Figura 8).

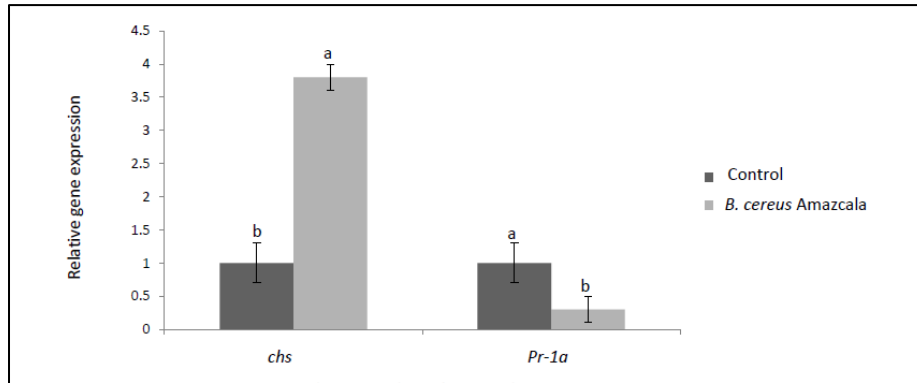


Figura 8. Análisis de la expresión relativa de los genes de *chs* y *pr 1-a*

d) *Evaluación la asociación de la presencia de B. cereus-Amazcala con índices NDVI y NGBVI en un cultivo en invernadero.*

Los resultados obtenidos de los tratamientos de plantas de jitomates inoculadas con el aislado bacteriano B. c-A. antes y posterior a la infección con *Clavibacter michiganensis* nos muestran que la cantidad de biomasa aumenta con la presencia de la bacteria benéfica independientemente de la infección durante los primeros 15 días de esta (Panel a, figura 9). Analizando solo los valores del índice GBN antes y después de la infección, los tratamientos con y sin inoculación de B. c-A no encontramos diferencia significativa (panel b, Figura 9), en cambio cuando se analizan los datos del índice NDVI, nos muestra que antes de la infección el tratamiento con la presencia de la bacteria B. c-A. los valores son mayores que en el grupo control, pero posterior a la infección los valores del índice NDVI en el tratamiento con la bacteria benéfica disminuyes con respecto al tratamiento sin la bacteria benéfica.

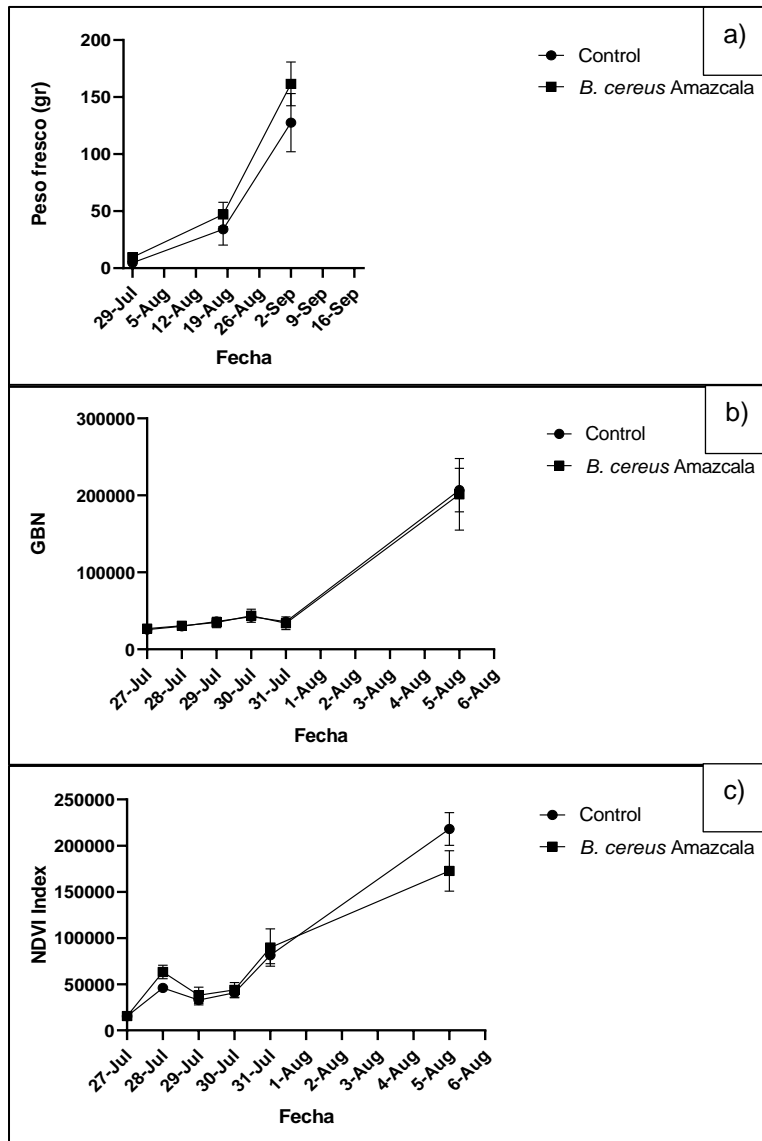


Figura 9. Peso fresco, valores de los índices GBN y NDVI de plantas bajo estrés biótico con *Cmm* respecto al tiempo

Al analizar las actividades enzimáticas de los tratamientos con y sin bacteria benéfica *B. c-A.* antes y posterior a la infección con *Clavibacter michiganensis*, muestra que las actividades de PAL y CAT previo a la infección disminuyen con la presencia de la inoculación de la bacteria benéfica *B. c-A* pero que posterior a la infección esta actividad enzimática aumenta respecto al control en los tratamientos que tienen la inoculación (Panel a y b, Figura 10), mientras que en la actividad enzimática de SOD no hay diferencia significativa entre tratamientos ni antes o posterior a la infección con *Cmm* (Panel c, Figura 10). En cambio, cuando observamos la altura y el peso de las plantas antes de la infección no existe diferencia significativa entre tratamientos, pero posterior a la infección las plantas

en el tratamiento con la inoculación de *B. c-A* desarrollaron más, por lo que tanto su peso como la altura fueron mayores respecto al tratamiento control (Panel d y e, Figura 10).

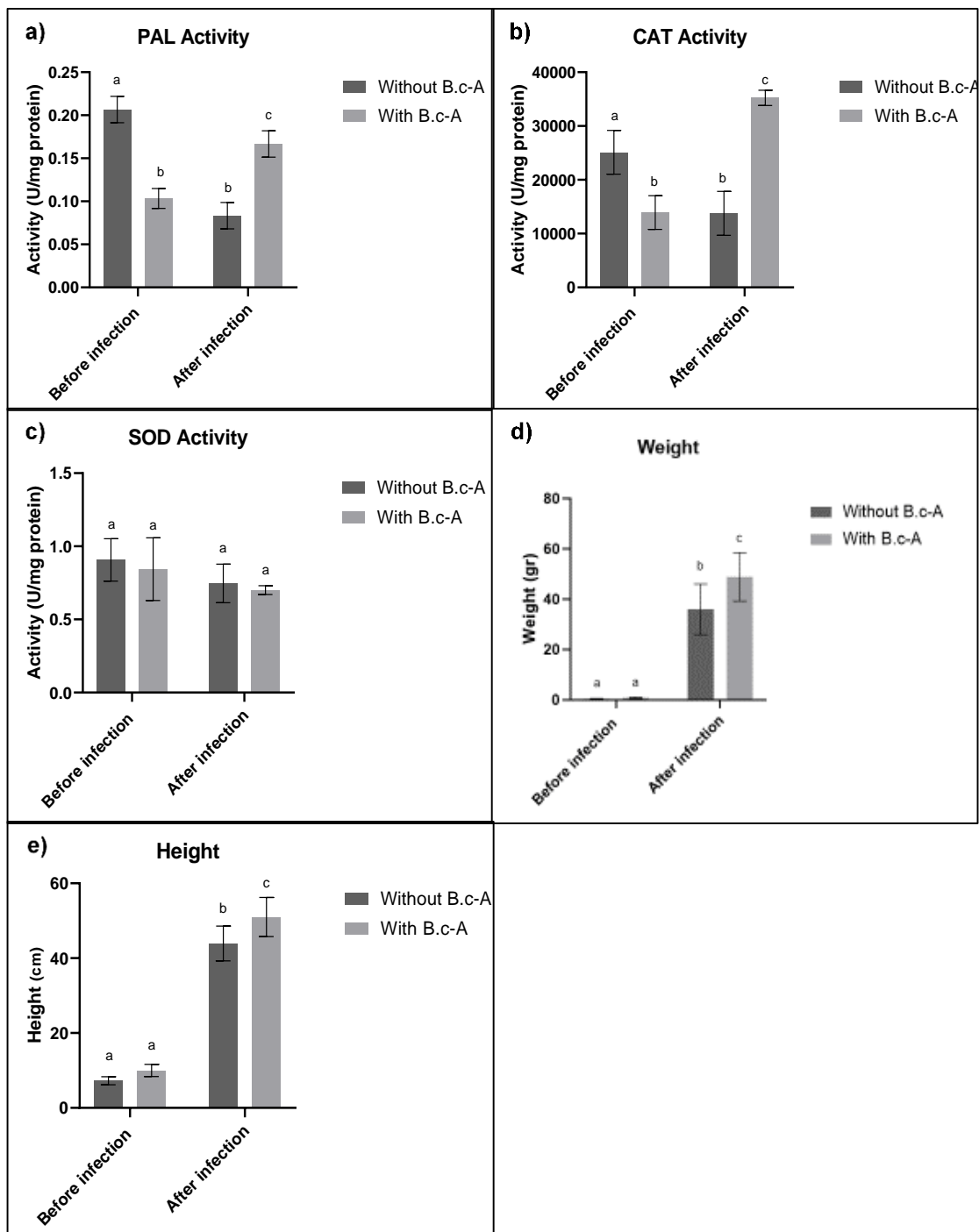


Figura 10. . Actividad enzimática (paneles a-c, peso (panel d), y altura (panel e) en plantas con y sin inoculación de *B. c-A*, antes y después de la infección

Los resultados de medir por separado el índice NDVI y el GBN que se propone nombrar NGBVI, se obtuvo como resultado que para NDVI en plantas previa a la infección tratadas con la bacteria *B. c-A* obtuvieron valores más altos de este índice respecto al grupo control, pero que posterior a la infección los valores del índice NDVI fueron menores en las plantas con la bacteria benéfica que respecto a las plantas sin inoculación (Panel a, Figura 11), en cambio el índice NGBVI no obtuvo diferencia significativa entre tratamientos inoculados con *B. c-A* y sin inocular antes ni posterior a la infección (Panel b, Figura 11).

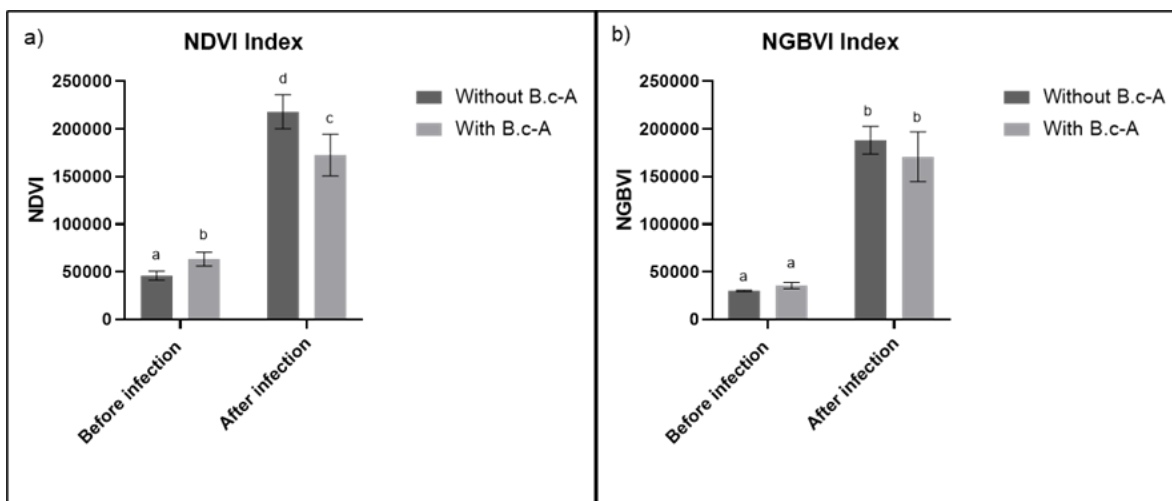


Figura 11. Valores de los índices GBN y NDVI con y sin inoculación de *B. c-A*, antes y después de la infección

Al realizar la correlación de las variables medidas, actividades enzimáticas, peso y altura de plantas, así como los índices NDVI y NGBVI, se encontró que existen valores de correlación entre estos últimos y las otras variables, lo que da pie a que el índice propuesto como NGBVI pueda ser utilizado también como un índice de vegetación (Tabla 2)

Tabla 2. Valores de correlación de los índices NDVI y GBVI con las actividades enzimáticas PAL, CAT, SOD, peso y altura

Before infection with <i>Cmm</i>										
	Without inoculation of B. c-A					With inoculation B. c-A				
	PAL	CAT	SOD	Weight	Height	PAL	CAT	SOD	Weight	Height
NDVI	-0.95	-0.09	0.73	-0.85	-0.93	-0.14	-0.94	-0.60	-0.21	0.37
			-							
NGBVI	0.58	0.66	0.19	0.38	0.97	0.69	0.96	0.96	0.75	0.24

After infection with <i>Cmm</i>										
	Without inoculation of B. c-A					With inoculation B. c-A				
	PAL	CAT	SOD	Weight	Height	PAL	CAT	SOD	Weight	Height
NDVI	-0.70	0.94	0.91	-0.96	-0.10	0.70	-0.33	-0.09	-0.05	0.99
			-							
NGBVI	-0.85	0.52	0.23	-0.47	-0.99	0.85	0.86	-0.99	-0.99	0.05

8. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos decir que el gen *pr-1a* está relacionado inversamente proporcional con la presencia de la bacteria benéfica B. c-A, ya que cuando esta la bacteria disminuye este gen.

El rendimiento y el tamaño del fruto en el tratamiento con déficit hídrico y aplicación de bacteria benéfica durante el periodo de fructificación es mayor respecto al control, por lo que podemos inferir que la presencia del aislado bacteriano B. c-A es de ayuda para contrarrestar el estrés causado por una disminución de agua en esta etapa del desarrollo, aunque cuando el riego es el óptimo el beneficio respecto al rendimiento se observa en el tratamiento donde la bacteria se aplica mensualmente respecto al control que no la tiene aunque en este caso los frutos son más pequeños que en los tratamientos donde se aplica quincenalmente y en fructificación.

PAL y CAT después de la infección con Cmm aumenta en tratamientos con inoculación de bacterias benéficas B. c-A asociadas con la respuesta al estrés oxidativo.

Antes de la infección con Cmm el índice NDVI tenía una correlación negativa con el peso y altura de la planta así como de la actividad PAL, pero después de la infección se mostró una correlación positiva con las actividades CAT y SOD sin bacterias benéficas.

El índice NGBVI tuvo una correlación positiva con las actividades de CAT, SOD y peso de la planta con la inoculación de B. cA, antes de la infección de Cmm, pero después de la infección se mostró una correlación positiva con las actividades de PAL y CAT y una correlación negativa con la SOD. y el peso.

9. Referencias

- Afiyanti, M. C. (2014). Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato. *Journal of Plant Physiology*, 171, 35-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.003>
- Amore, A. e. (2013). Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* , 93-101.
- Babalola, O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett*, 1559-1570.
- Berger, B. B. (2017). The plant growth-promoting bacteria *Kosakonia radicincitans* improves fruit yield and quality of *Solanum lycopersicum*. *J. Sci Food Agric*, 4865-4871.
- Calvo-Polanco, M. S.-R.-A.-L. (2016). Exploring the use of recombinant inbred lines in combination with beneficial microbial inoculants to improve drought stress tolerance in tomato. *Environmental and experimental botany*, 1-42.
- Castellanos, J. U. (2006). Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. *Intagri*.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2015). In vitro effectiveness of *Bacillus* and polyphenoles of native plants from México on *Rhizotocnia-Solani*. *Rev. Me. Cienc. Agríc*, 549-562.
- Chen, Z. W. (2019). Model for estimation of total nitrogen content in sandal wood leaves based on nonlinear mixed effects and dummy variables using multispectral images. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 195, 103874. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.103874>
- Cilia-López, V. A.-R.-A.-F. (2008). Etnobotánica de *Heliopsis Longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 83-89.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Kundil, Y., Purayil, K., & Aravind, R. (2015). Isolation, characterization and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*, 34-43.

- Edi-Premono, M., Moawad, M., & Vleck, P. (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones J. Crop Sci*, 13-23.
- FAO. (2002). *Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030*. Roma, Italia: FAO.
- FAO. (08 de Octubre de 2017). *Conservación de los recursos naturales para una agricultura sostenible*. Obtenido de Materia orgánica y actividad biológica: http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/ba/organic_matter.pdf
- François-Xavier, J. J. (2018). Comparison of cellulose vs. plastic cigarette filter decomposition under distinct disposal environments. *Waste Management*, 349-353.
- García, R., Lovaisa, N., & Ulla, E. (2015). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria in northwestern Argentina and its effect in promoting growth in maize (*Zea mays* L.). *Revista agrónomica del noreste argentino*, 19-28.
- Gilbert, J., Laverock, B., Temperton, B., Simon, T., Mühlhling, M., & Hughes, M. (2011). Gene expression profiling: Metatranscriptomics. En Y. Kwon, & S. Ricke, *High-throughput next generation sequencing. Methods in Molecular Biology* (págs. 195-205). Springer: Humana Press.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 22-28.
- Grönemeyer, J., Burbano, C., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2012). Isolation and characterization of root associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. *Plant soil*, 67-82.
- Haiyambo, D. C.-H. (2015). Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in east kavango region of namibia for plant promoting characteristics. *Curr Microbiol*, 566-571.
- Hayat, S. A. (2018). Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Scientia Horticulturae*, 240, 139-146. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.01>
- Hellriegel, H. W. (1888). Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und leguminosen. *Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins für Rubenzucker-Industrie Deutschen Reichs*, 234.

- Khati, P., A. S., Gangola, S., Kumar, R., Bhatt, P., & Kumar, G. (2017). Impact of agri-usable nanocompounds on soil microbial activity: an indicator of soil health. *CLEAN–Soil, Air, Water*.
- Kloepper, J., & Schroth, M. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *4th international conference on plant pathogenic bacteria* (págs. 879-882). Francia: Gilbert-Clarey.
- Kloepper, J., Lifshitz, R., & Zablutowicz, R. (1989). Free living bacteria inoculation for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*, 39-49.
- Kumar, A. V. (2018). Does plant microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? *Microbiological research*, 41-52.
- Kumar, A., Bahadur, I., Maurya, B., Raghuwanshi, R., Meena, V., Singh, D., & Dixit, J. (2015). Does a plant growth-promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability? *J. Pure Appl. Microbiol*, 715-724.
- Livak, K. S. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods*, 402-408.
- Maki, M. L. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci*, 500–516.
- Meena, V., Maurya, B., Verma, J., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., & Bajpai, B. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, K-release dynamics from waste mica. *Ecol. Eng.*, 340-347.
- Moerman, J. P. (2011). Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tobacco Control*, 30-35.
- Molina-Torres, J. H.-M.-G.-Á.-L.-S.-C. (2015). Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Asia-Pacific Entomolog*, 18(2), 227-231.
- NASA. (2018). *The AREN Project*. Spinoff.
- Novotny, T. S. (2014). Tobacco product waste: an environmental approach to reduce tobacco consumption. *Curr Environ Health Rep*, 208-216.
- Ocean Conservancy. (2017). *Together for our ocean International Coastal Cleanup 2017*. Washington: Ocean Conservancy.

- Ríos, M. (2012). Natural Alkamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*.
- Roder, A. P. (2014). Littered cigarette butts as a source of nicotine in urban waters. *Journal of Hydrology*, 3466–3474.
- SAGARPA. (2017). *Aumenta 35 por ciento producción de Jitomate "hecho en México"*. CDMX: SAGARPA.
- SAGARPA-COFUPRO-UNAM. (2013). *Los biofertilizantes y su uso en la agricultura*. México, D.F.: Editorial Prado, S.A. de C.V.
- Sarkar, A. K. (2018). A halotolerant Enterobacter sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Research in microbiology*, 20-32.
- SEMARNAT. (2000). Norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. SEMARNAT.
- SEMARNAT y CP. (2003). *Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana*. México.
- Sharifazizi, M., Behrouz, H., & Sadeghi, A. (2016). Evaluation of biological control of Erwinia Amylovora, causal agent of fire blight of pear by antagonistic bacteria. *Biological control*, 50-62.
- Silva, G. U. (2018). Plant-promoting rhizobacteria Methylobacterium komagatae increases crambe yield, roots system and height. *Industrial crops & products*, 277-281.
- Singh, N. S. (2015). Can we use maize (Zea mays) rhizobacteria as plant wroth promoter? *Vegetos*, 86-99.
- Smith, E. M. (2011). Covering their butts: responses to the cigarette litterproblem. . *Smith EA, McDaniel PA. Covering their butts: responses to the cigarette litterproblem. Tob Control. 2011;20:100–6.*, 100-106.
- Soylu, S., Baysal, Ö., & Soyly, M. (2003). Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar s metyl, against bacterial canker (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis) in tomato seedings. *Plant Science*, 1069-1075.
- Tisdale SL., N. W. (1975). Soil fertility and fertilizers. *Macmillan Publishing*, 694.

- Tiwari, S. P. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Front. Plant Sci*, 1-13.
- Toscano, S. F. (2018). PAL activities in asparagus spears during storage after ammonium sulfate treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 34-41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.010>
- UNEP. (2009). *Marine litter*. Nairobi: UNEP.
- Ventorino, V. A. (2015). Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Scientific Reports*, 5(8161).
- Verma, J. Y. (2014). Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea. *Soil Biol. Biochem*, 33-37.
- Wang, B. S. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* Strain W19 can Promote Growth and Yield and Suppress Fusarium Wilt in Banana Under Greenhouse and Field Conditions. *Pedosphere*, 733-744.