



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería de Biosistemas

“Efecto promotor de crecimiento vegetal en Jitomate (*Solanum lycopersicum*)
de un aislado bacteriano obtenido del municipio del Marqués, Qro”

Opción de titulación
Tesis

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

Presenta:
Nallely Solano Alvarez

Dirigido por:
Dra. Rosalía V. Ocampo Velázquez


Dra. Rosalía V. Ocampo Velázquez
Presidente


Firma

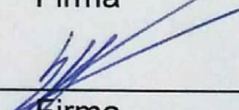
Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario


Firma

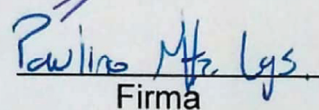
Mc. Humberto Aguirre Becerra
Vocal

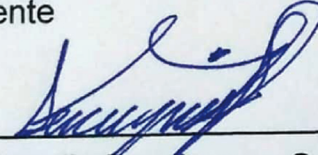

Firma

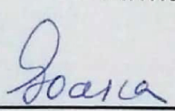
Dr. Enrique Rico García
Suplente


Firma

Mc. Paulino Martínez Lagunes
Suplente


Firma


Dr, Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad de Ingeniería


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Resumen.

En la revolución verde se inicia con la siembra de monocultivos mejorados así como con el uso indiscriminado de agroquímicos. Estas actividades han dejado graves repercusiones ambientales además de las ocasionadas en la salud de los organismos con los que llega a tener contacto. De esta problemática han surgido diversas corrientes que buscan reducir el uso indiscriminado de agroquímicos. Una alternativa al uso de fertilizantes químicos e incluso de pesticidas y herbicidas es el uso de bioinoculantes los cuales se elaboran a partir de microorganismos benéficos. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) tienen un efecto estimulante sobre las plantas con las que se relaciona debido a varios mecanismos de acción como la biodisponibilización de nutrientes, la producción de hormonas de crecimiento o el antagonismo con patógenos. En este trabajo se aisló una cepa BPCV que otorga beneficios en el crecimiento de plántulas de jitomate con las que es capaz de asociarse incluso cuando estas plántulas fueron expuestas al patógeno *Clavibacter michiganensis*.

(Palabras clave: biocontrol, aislamiento, bioinoculantes)

Summary.

During the green revolution the planting of improved monocultures begins, the indiscriminate use of agrochemicals, which have left as a consequence serious environmental repercussions as well as in the health of the organisms with which it comes into contact. From this problem have emerged diverse currents that seek to reduce the excessive use of agrochemicals. An alternative to the use of chemical fertilizers and even pesticides and herbicides is the use of bioinoculants which are made from beneficial microorganisms. Plant growth promoting bacteria (PGPR) have a stimulating effect on plants with which it is related by several mechanisms of action such as bioavailability of nutrients, production of growth hormones or antagonism with pathogens. In this work were isolated a strain of PGPR that provided benefits in the growth of tomato seedlings even when these seedlings were exposed to the pathogen *Clavibacter michiganensis*.

(Key words: biocontrol, isolation, soil inoculants)

Dedicatoria

A David por motivarme a seguir siempre mis sueños, por estar ahí de una y mil formas en cada momento de este proceso y siempre.

A mis Padres por no dejarme morir de hambre y siempre apoyarme en mis proyectos.

A Anahí que a pesar ser la pequeña de la casa le ha tocado comportarse como la mayor, por no dejarme sola en los momentos más duros y de más necesidad.

A los alumnos del posgrado en Biosistemas de la Universidad Autónoma de Querétaro, en especial a mis compañeros de generación, por su total apoyo en la realización de este trabajo, por brindarme su amistad y su soporte como colegas.

A Mozzy por su aporte para evitar volverme loca en los periodos más estresantes y por siempre tener una mirada de consuelo en los más tristes.

Agradecimientos.

Agradezco el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) ya que sin él no hubiera sido posible este trabajo.

A la Dra. Rosalía por aceptarme como su alumna y brindarme su guía.

Al Dr. Ramón por su apoyo incondicional, pero sobre todo por la motivación que me brindo a mí y a todos mis compañeros de seguir trabajando en este camino serpenteante llamado Ciencia.

A todo el grupo de trabajo de la UAQ campus Amazcala, por todas las facilidades otorgadas durante todo este proyecto, que a pesar de las muchas dificultades económicas y técnicas, siempre se encontró la manera de solucionarlas.

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	12
A) FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	12
<i>I.1.1 Revolución verde.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.2 Daños en el ambiente causados por agroquímicos.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.3 Aspectos económicos del uso de agroquímicos.....</i>	<i>13</i>
<i>I.1.4 Agricultura orgánica.....</i>	<i>13</i>
II. ANTECEDENTES.....	15
B) IMPORTANCIA DE MICROORGANISMOS	15
C) UBICACIÓN	15
D) BIOFERTILIZANTES	16
E) BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	17
F) MECANISMOS DE ACCIÓN DE BPCV	18
G) CÁNCER BACTERIANO, UNA OPORTUNIDAD PARA EL USO DE BPCV AGENTE COMO ANTAGÓNICO.....	18
H) SÍNTOMAS	19
I) IMPORTANCIA ECONÓMICA	19
III. OBJETIVOS.....	21
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
IV. HIPÓTESIS.....	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
A) AISLAMIENTO DE BACTERIAS	23
B) CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BACTERIAS AISLADAS.....	23
C) SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S rRNA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	24
D) SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS.....	24
E) PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONTRA <i>CLAVIBACTER MICGIGANENSIS IN VITRO</i>	24

F) DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA VEGETAL DE LOS AISLADOS EN PLÁNTULA DE JITOMATE.....	25
G) DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA VEGETAL DE LOS AISLADOS EN PLÁNTULA DE CHILE, LECHUGA Y MOSTAZA.....	26
H) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ANTAGÓNICA CONTRA <i>CLAVIBACTER MICHIGANENSIS IN VIVO</i>	27
I) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
A) AISLAMIENTO DE BACTERIAS	32
B) CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BACTERIAS AISLADAS.	33
C) SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S rRNA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	34
D) SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS.....	37
E) PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONTRA <i>CLAVIBACTER MICHIGANENSIS IN VITRO</i>	38
F) DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA VEGETAL DE LOS AISLADOS EN PLÁNTULA DE JITOMATE.....	41
G) DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA VEGETAL DE LOS AISLADOS EN PLÁNTULA DE CHILE, LECHUGA Y MOSTAZA.....	43
H) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ANTAGÓNICA CONTRA <i>CLAVIBACTER MICHIGANENSIS IN VIVO</i>	47
VII. CONCLUSIÓN.	51
VIII. REFERENCIAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Ricinus communis</i> del campus Amazcala del cual se tomó la muestra de raíz	22
Figura 2. Cultivo bacteriano de las diluciones seriadas provenientes del extracto de raíz.	23
Figura 3. Arreglo del diseño experimental en almacigo para evaluación de la promoción del crecimiento en plántula de jitomate.....	26
Figura 4. Arreglo del diseño experimental en almacigo para evaluación de la promoción del crecimiento en plántulas de diferentes plantas, donde D, I, N- Lechuga, E, J, Ñ-Mostaza, F, K, O- Chile	27
Figura 5. Experimentos <i>in vivo</i> de aislado bacteriano vs <i>Clavibacter michiganensis</i> a un mes de la infección.....	29
Figura 6. Experimento <i>in vivo</i> realizado en IPICTY donde se pone en contacto el aislado bacteriano vs <i>Clavibacter michiganensis</i>	30
Figura 7. Fotografía de la placa de la dilución seleccionada para hacer el conteo de UFC a) anverso y b) reverso	32
Figura 8. a) Fotografía de la tinción de Gram del aislado seleccionado, b) formación de grumos en la prueba de KOH.....	33
Figura 9. Fotografía de la tinción del aislado para la identificación de cristales <i>Cry</i> de <i>Bacillus thuringensis</i>	36
Figura 10. Evaluación de la solubilización de fosfatos a) vista del halo de solubilización en medio PVK y b) Análisis estadístico de los halos de solubilización comparado con un producto comercial	37

Figura 11. a) Se muestra el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de <i>Clavibacter michiganensis</i> . b) Las cajas Petri se incubaron un mes adicional para comprobar que el resultado no se revirtiera con el tiempo.....	38
Figura 12. a) Eficacia del aislado RR2 cultivado en medio mínimo de nutrientes (MEM) con respecto al control Qbacter. b) Fotografía del crecimiento del aislado RR2 vs <i>Clavibacter michiganensis</i>	39
Figura 13. a) Análisis de los halos de inhibición del aislado RR2 cultivado en medio LB y MEM vs <i>Clavibacter michiganensis</i> cepa 1569 b) Análisis de los halos de inhibición del aislado RR2 cultivado en medio LB y MEM vs <i>Clavibacter michiganensis</i> cepa Acr42	40
Figura 14. Evaluación de las diferentes variables para determina si el aislado bacteriano RR2 es promotor de crecimiento vegetal a) Cantidad de biomasa (peso seco), b) Ancho de tallo, c) Altura, d) Cantidad de clorofila.....	42
Figura 15. Evaluación de diferentes nutrientes y pH en plántulas de Chile con diferentes tratamientos T1-blano negativo, T2-1.5x10 ⁸ UFC/ml de RR2 y T3 3x10 ⁸ UFC/ml de RR2 a) Fósforo, b) Calcio, c) Potasio y d) pH.....	44
Figura 16. Evaluación de diferentes nutrientes y pH en plántulas de Mostaza con diferentes tratamientos T1-blano negativo, T2-1.5x10 ⁸ UFC/ml de RR2 y T3 3x10 ⁸ UFC/ml de RR2 a) Fósforo, b) Calcio, c) Potasio y d) pH.....	45
Figura 17 Evaluación de diferentes nutrientes y pH en plántulas de Lechuga con diferentes tratamientos T1-blano negativo, T2-1.5x10 ⁸ UFC/ml de RR2 y T3 3x10 ⁸ UFC/ml de RR2 a) Fósforo, b) Calcio, c) Potasio y d) pH.....	46
Figura 18. Evaluación de la carga bacteriana de <i>Clavibacter michiganensis</i> en plántula de jitomate con diferentes tratamientos T1-sin tratamiento, T2- Qbacter + patógeno T3- Aislado RR2 + patógeno.	47

Figura 19. Análisis de las variables en experimento *in vivo* de *Clavibacter michiganensis* cepa 1387 a) Altura b) Dosele c) Grado de severidad..... 49

Figura 20. Análisis de las variables en experimento *in vivo* de *Clavibacter michiganensis* cepa AcR42 a) Altura b) Dosele c) Grado de severidad..... 50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento de antagonismo contra <i>Clavibacter michiganensis</i>	28
Cuadro 2. Escala de severidad utilizada para medir el daño de <i>Clavibacter michiganensis</i> en plántula de jitomate.....	Error! Bookmark not defined.
Cuadro 3. Similitudes obtenidas según la secuencia forward analizada en BLAST (Extracto tomado de resultados obtenidos en línea)	35

I. INTRODUCCIÓN.

a) Fundamentos teóricos

I.1.1 Revolución verde

Al final de la Segunda Guerra mundial surge en Estados Unidos una manera de producir alimentos en suficiente cantidad para la población humana y nace un modelo de producción llamado Revolución Verde. Esta revolución se caracterizó por la siembra de monocultivos mejorados, principalmente maíz y trigo, el empleo de tecnología y desarrollo de maquinaria agrícola, además del uso de insumos agrícolas como fertilizantes químicos, plaguicidas y herbicidas. Lamentablemente el uso de estos productos en la agricultura solo aumentan la productividad agrícola en los primeros años, y con el tiempo decrece su eficacia (SAGARPA-COFUPRO-UNAM, 2013)

Actualmente, se sabe que los agroquímicos tienen efectos nocivos en la salud de las personas en formas muy diversas que van desde leves intoxicaciones hasta enfermedades crónicas en diversos órganos. Las repercusiones en el agua, aire y suelo también han sido graves y en la mayoría de las veces irreversibles (FAO, 2002).

I.1.2 Daños en el ambiente causados por agroquímicos.

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, 2003).

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 ha asociado a enfermedades nerviosas de gravedad, semejantes al Alzheimer (SAGARPA-COFUPRO-UNAM, 2013).

I.1.3 Aspectos económicos del uso de agroquímicos.

El uso de fertilizantes nitrogenados en el mundo aumenta año tras año y su precio también se incrementa con tasas de doble dígito, donde la tasa más alta se registró en el 2008 con un 52%, esto debido a que el petróleo es fundamental para su elaboración, tanto como materia prima así como de la energía necesaria para este proceso (CEPAL/FAO/IICA, 2011).

I.1.4 Agricultura orgánica

La agricultura orgánica según la FAO (FAO, 2006) es un sistema de producción que trata de utilizar al máximo los recursos de la finca, dándole énfasis a la fertilidad del suelo y la actividad biológica y al mismo tiempo, a minimizar el uso de los recursos no renovables y no utilizar fertilizantes y plaguicidas sintéticos para proteger el medio ambiente y la salud humana.

En México, el sector orgánico es el subsector agrícola más dinámico, con un crecimiento anual del 25%, la superficie cultivada orgánicamente ha aumentado de 23 000 ha en 1996 a 103 000 ha en 2000. Para el año 2000, esta agricultura fue

practicada por más de 53 000 productores en 262 zonas de producción de 28 estados de la República, lo cual generó 280 millones de dólares en divisas (Gómez-Tovar, 2004).

Los insumos más comunes de este tipo de agricultura dependen en gran medida del mantenimiento del equilibrio ecológico y de relacionar las actividades agrícolas con la conservación de la biodiversidad. Las especies nativas brindan una serie de servicios ecológicos dentro de los sistemas orgánicos como el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Por tal motivo, niveles más elevados de biodiversidad pueden fortalecer las funciones esenciales para los sistemas agrícolas y, por ende, para el desempeño agrícola. La promoción del aumento de la biodiversidad funcional constituye una estrategia ecológica clave para lograr mantener la sostenibilidad de la producción orgánica (FAO, 2006). Entre los más utilizados actualmente se encuentran excrementos avícolas y pecuarios, productos de compostaje, humus de lombriz, etc.

Derivado del conocimiento de éstos y otros problemas ambientales y de salud pública es que se genera en los consumidores de la población general el interés por los productos orgánicos, en los que tengan la certeza de que se encuentren libres de residuos tóxicos, aguas negras y radiaciones. Por lo que crece la importancia de generar insumos agrícolas que favorezcan estas crecientes prácticas agrícolas de cuidado a la ecología sin dejar de lado la calidad y rendimiento de producción. De ahí que este trabajo busca generar las bases para un producto a partir de bacterias benéficas como alternativa a los químicos utilizados actualmente.

II. ANTECEDENTES.

b) Importancia de microorganismos

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 benefician de otros mecanismos: como la producción de fitohormonas o de procesos antagónicos hacia patógenos (Ruzzi, 2015).

c) Ubicación

En la zona de la rizósfera se presentan 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).

El término “microorganismos nativos” hace referencia a un grupo de microbios benéficos que son originarios del área, que no son importados (Lakshman, 2015). Los microorganismos nativos o endémicos juegan un papel importante en la protección de la invasión de microorganismos con un potencial de causar alguna enfermedad. Ellos compiten contra los patógenos por los nutrientes esenciales y por los receptores en las células huésped con la producción de sideróforos y otras sustancias inhibitoras, creando un ambiente inviable para colonizar la raíz por los patógenos, a este proceso también se le conoce como biocontrol (Said, 2006).

d) 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, 2016).

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)

e) Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

El término Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal 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)

f) Mecanismos de acción de BPCV

Los mecanismos por los que las BPCV influyen el crecimiento vegetal pueden ser diversos. Existen los mecanismos directos donde se encuentran la producción de hormonas de crecimiento (3-Ácido indolacético, Ácido giberélico, citoquininas y etileno) (Meena R. S., 2015), la solubilización de fósforo o la fijación de nitrógeno. Mientras que los mecanismos indirectos pueden ser la supresión de microorganismos perjudiciales por la producción de sideróforos, secreción de metabolitos antifúngicos, competencia por nutrientes o exclusión de nicho (Kloepper J. , 1993). Adicionalmente a estos mecanismos antagónicos las rizobacterias pueden inducir resistencia sistémica la cual hace que la planta se encuentre protegida contra futuros ataques de patógenos (Bent, 2006).

Mediante la reintroducción de bacterias con importancia benéfica a un ambiente agrícola en condiciones favorables, se aumenta el número de población microbiana en el sustrato y se aprovechan las características benéficas en las que las bacterias son expertas sobre las plantas (Haiyambo D. P.-H., 2015).

Con este trabajo se busca aislar e identificar Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal con actividad en cultivos de jitomate para su uso potencial como biofertilizante de bajo costo para el campo mexicano.

g) Cáncer bacteriano, una oportunidad para el uso de BPCV agente como antagónico

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* es el agente causal del cáncer bacteriano en jitomate (*Solanum lycopersicum*). Esta enfermedad fue descrita en 1910 en el estado de Michigan en los Estados Unidos Americanos, aunque

actualmente esta enfermedad se puede encontrar en todas las regiones donde se cultive esta hortaliza. Inicialmente se pensó que era un parasito de floema, pero actualmente se sabe que es una bacteria que invade el xilema (Cass, 2015) .

La forma de diseminación de la bacteria es por semilla o de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo, poda o labores culturales. *C. michiganensis* tiene un rango grade de hospederos entre los que se encuentran diversas solanáceas como el tomate, hierba mora, chile, entre otros cultivos (EPPO, 2014).

h) Síntomas

Los síntomas en jitomate inician por las hojas de la parte basal donde se observa un color amarillo que conforme avanza cambia a color café mostrando las quemaduras en los bordes de las hojas que se extienden a toda la hoja matando a la planta por completo. Las hojas se curvan hacia el envés quedando adheridas a la planta. En los tallos se observa una necrosis de color parda en los haces vasculares ocasionando taponamientos. En el fruto se observa una mancha oscura rodeada de un halo blanco conocido como “ojo de pajaró”.

i) Importancia económica

El cáncer bacteriano es considerado la enfermedad bacteriana más importante que afecta a los jitomates, donde las pérdidas en los rendimientos pueden ser muy graves (Sen, 2015). Esta disminución de rendimiento varía de acuerdo a la locación, al cultivar o al estado fenológico de la planta al momento de la infección (Poysa, 1993); por ejemplo en Ontario Canadá represento pérdidas de rendimiento de hasta el 84% en cultivos comerciales. Las pérdidas económicas pueden ser muy grandes: en Michigan el cáncer bacteriano le ha costado a productores hasta \$300, 000 USD

en un solo año (Hausbeck, 2015). Como resultado de rendimientos bajos y pérdidas económicas severas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es un organismo de cuarentena en la Unión Europea y en muchos otros países (Daferera, 2012).

III. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo General.

Aislar e identificar bacterias de suelos de clima seco con características de actividad promotora del crecimiento vegetal.

3.2. Objetivos Particulares.

- Aislar bacterias de suelo de clima seco.
- Determinar las características morfológicas de las cepas aisladas
- Analizar la filogenia de los aislados seleccionados.
- Determinar la solubilización de fosfatos.
- Evaluar el efecto del aislado bacteriano en la altura, ancho de tallo y cantidad de clorofila en plantas de Jitomate (*Solanum lycopersicum*)
- Evaluar la eficacia de biocontrol contra *Clavibacter michiganensis*.

IV. HIPÓTESIS.

En suelos de climas secos existen bacterias promotoras de crecimiento vegetal que pueden convertirse en biofertilizantes debido a su capacidad de solubilizar fosfatos, además de tener una actividad enzimática de defensa y biocontrol contra fitopatógenos, que hacen posible el aumento de la longitud de raíz y de la cantidad de biomasa.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

El clima seco que es también llamado seco estepario, se caracteriza porque llueve poco con precipitaciones de 300 a 600mm anuales, temperaturas en promedio de 22° a 26°C en algunas regiones, y en otras de 18° a 22°C La falta de lluvia se debe al descenso de los vientos llamados contralisios, que tienen poca humedad por lo que no producen lluvias (INEGI, 2016).

Este clima se encuentra en la mayor parte del centro y norte del país, región que comprende el 28.3% del territorio nacional; y cubre el 14% de la superficie terrestre, pero la cifra aumenta debido a los recientes cambios climáticos que se han presentado (INEGI, 2016).



Figura 1. Planta de *Ricinus communis* del campus Amazcala del cual se tomó la muestra de raíz

a) Aislamiento de bacterias

Se sumergió 1 g de raíz tomada de *Ricinus communis* en 95 ml de agua estéril, para obtener una dilución inicial de (10^{-1}) y se agitó durante 10mín. Después, 1 ml de esta suspensión fue transferida en 9ml de agua estéril (10^{-2}). Esta dilución seriada se continuó hasta (10^{-10}) para después poner a incubar en cajas petri con medio Luria Bertani (LB). Estas cajas se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2-3 días. La dilución con una concentración de colonias cuantificable fue seleccionada para estimar la población de rizobacterias y expresada en UFC (Unidades Formadoras de Colonia) g^{-1} raíz (Dinesh, 2015). Las colonias se subcultivaron individualmente en Luria Bertani agar (Figura 2). Un total de cinco aislados fueron obtenidos y criopreservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol al 40 % para futuros estudios.

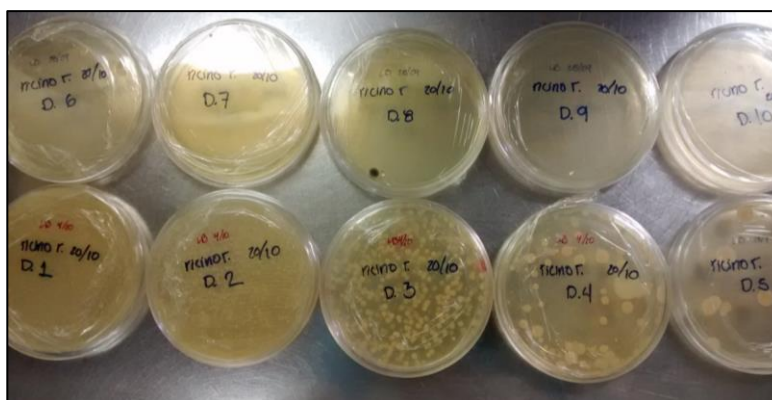


Figura 2. Cultivo bacteriano de las diluciones seriadas provenientes del extracto de raíz.

b) Caracterización Morfológica de bacterias aisladas.

Se tomarán muestras de las colonias formadas para colocarlas en cajas nuevas con agar LB y se incubaron durante dos días. Las colonias fueron analizadas individualmente por forma, tamaño, pigmentación y tinción de Gram (Buchanan, 1974).

c) Secuenciación del gen 16S rRNA y análisis filogenético.

El ADN obtenido del aislado bacteriano se obtuvo por una modificación del protocolo de Gilbert (Gilbert, 2011), al sustituir el buffer Tris por el CTAB. El extracto fue almacenado a -20°C hasta ser usado para el análisis del gen de rRNA 16S.

La secuencia obtenida del gen fue comparada con otras en la base de datos Gen Bank usando el programa BLAST de NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

d) Solubilización de fosfatos

La habilidad de solubilizar fosfato inorgánico fue probado depositando 5µl del crecimiento de una noche de los aislados en agar Pikovskaya (PVK) durante 10 días a 30 °C±2 °C (Grönemeyer, 2012). La formación de zonas transparentes alrededor de las colonias bacterianas fue un indicativo de la solubilización del fosfato inorgánico contenido en el agar PVK. Este experimento se realizó por triplicado y el índice de solubilización fue determinado midiendo el diámetro de las zonas transparentes del halo de solubilización que se generó en las cajas Petri que contenían el medio PVK con ayuda de un vernier (Edi-Premono, 1996)

e) Pruebas de antagonismo contra *Clavibacter michiganensis in vitro*

500 µl de la suspensión de bacterias fitopatógenas cultivadas en medio líquido LB (*Clavibacter michiganensis*) durante una noche a 150 g. (hasta llegar a una concentración de 1×10^8 CFUml⁻¹) se dispersó en la superficie con medio agar LB solidificado, se esperó 5 min a que el exceso de humedad se eliminara, para posteriormente colocar círculos de papel filtro de 5mm de diámetro, un disco para cada tratamiento. Los discos se sumergieron en una suspensión de las bacterias

aisladas (RR1, RR2, RR3, RR4, RR5) con una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ y se colocaron sobre la caja previamente inoculada con el fitopatógeno (Sharifazizi, 2016). Las cajas fueron incubadas a $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48-72 h o hasta que se observó una zona de inhibición. Como control negativo se utilizó medio LB estéril y el producto Q bacter se utilizó como control positivo. Para comprobar la eficacia del antagonismo observado, se realizó el mismo experimento con un total de 3 cepas diferentes de *Clavibacter michiganensis*, proporcionadas por colaboradores del laboratorio de biología molecular del IPICYT.

- f) Determinación de la capacidad promotora vegetal de los aislados en plántula de jitomate

El efecto del aislado RR2 (seleccionado previamente) en el crecimiento de plántula de jitomate *Solanum lycopersicum* fue evaluada en condiciones bajo invernadero. La bacteria fue cultivada en caldo nutritivo LB con agitación constante 180 g a 30°C por 48 h. Al finalizar la fase logarítmica el cultivo bacteriano fue centrifugado a 300 g por 3 min y el sobrenadante fue descartado, la pastilla fue resuspendida en agua estéril. La suspensión acuosa fue diluida hasta llegar hasta mantener una concentración 1.5×10^8 UFC mL⁻¹. Se llevó a cabo un ensayo de inoculación a pequeña escala con un diseño de bloques al azar con tres repeticiones de la unidad experimental de tres plantas (Figura 3). El diseño experimental consistió en tres tratamientos, en el control no inoculado (control negativo-T1) las semillas se sumergieron en agua estéril, mientras que para los otros dos tratamientos se utilizaron dos concentraciones diferentes del aislado bacteriano *Bacillus Cereus* (RR2) (T2, 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ y T3, 3×10^8 UFC mL⁻¹). Las inoculaciones fueron semanales durante un mes y cada tercer día se tomó una muestra de 3 repeticiones de la unidad experimental, en las que se evaluó, cantidad de biomasa, ancho de tallo, altura de la planta y cantidad de clorofila.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	P	Q	R	S
1	T1	T2	T3	T2	T1	T2	T1	T1	T2	T3	T1	T2	T1	T2	T1	T3	T3	T2	T2	T1
2	T1	T2	T3	T2	T1	T2	T1	T1	T2	T3	T1	T2	T1	T2	T1	T3	T3	T2	T2	T1
3	T1	T2	T3	T2	T1	T2	T1	T1	T2	T3	T1	T2	T1	T2	T1	T3	T3	T2	T2	T1
4	T3	T3	T2	T3	T3	T3	T2	T3	T1	T2	T2	T3	T3	T3	T3	T2	T1	T1	T1	T2
5	T3	T3	T2	T3	T3	T3	T2	T3	T1	T2	T2	T3	T3	T3	T3	T2	T1	T1	T1	T2
6	T3	T3	T2	T3	T3	T3	T2	T3	T1	T2	T2	T3	T3	T3	T3	T2	T1	T1	T1	T2
7	T2	T1	T1	T2	T2	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T3	T3	T3
8	T2	T1	T1	T2	T2	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T3	T3	T3
9	T2	T1	T1	T2	T2	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T3	T3	T3
10	T3	T1	T1	T2	T2	T1	T3	T2	T3	T1	T4	T1	T3	T1	T3	T1	T3	T3	T3	T3

Figura 3. Arreglo del diseño experimental en almacigo para evaluación de la promoción del crecimiento en plántula de jitomate.

- g) Determinación de la capacidad promotora vegetal de los aislados en plántula de chile, lechuga y mostaza.

Una vez que se comprobó la eficacia de la promoción de crecimiento en plántulas de jitomate, se diseñó un segundo experimento con plántulas de chile, lechuga y mostaza. El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones y una unidad de tres plantas por especie (Figura 4). Se tomaron los mismos tratamientos que en el experimento anterior T1- blanco negativo (sin bacteria) y dos tratamientos con concentraciones bacterianas diferentes, T2- 1.5×10^8 UFC ml⁻¹ y T3- 3×10^8 UFC ml⁻¹, se tomaron mediciones cada tercer día de altura de la planta, ancho de tallo y cantidad e clorofila durante un mes, al finalizar este periodo las plantas se destruyeron para analizar contenido de biomasa, y cantidad de nutrientes asimilados (Potasio, Calcio y Fósforo).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	P	Q	R	S
1				T1	T2	T1			T1	T1	T2			T1	T2	T1				
2				T1	T2	T1			T1	T1	T2			T1	T2	T1				
3				T1	T2	T1			T1	T1	T2			T1	T2	T1				
4				T3	T3	T3			T2	T3	T1			T2	T3	T3				
5				T3	T3	T3			T2	T3	T1			T2	T3	T3				
6				T3	T3	T3			T2	T3	T1			T2	T3	T3				
7				T2	T1	T2			T3	T2	T3			T3	T1	T2				
8				T2	T1	T2			T3	T2	T3			T3	T1	T2				
9				T2	T1	T2			T3	T2	T3			T3	T1	T2				
10				T2	T1	T2			T3	T2	T3			T3	T1	T2				

Figura 4. Arreglo del diseño experimental en almacigo para evaluación de la promoción del crecimiento en plántulas de diferentes plantas, donde D, I, N-Lechuga, E, J, Ñ-Mostaza, F, K, O- Chile

h) Evaluación de la capacidad de antagónica contra *Clavibacter michiganensis* *in vivo*

Para evaluar la capacidad antagónica contra *Clavibacter michiganensis* se utilizaron plantas de jitomate de 30 días de edad, germinadas en almacigo con Pet moss estéril como sustrato y se trasplantaron 3 plántulas de jitomate en un recipiente de un litro que contenía con una mezcla de arena y composta estéril (50:50) (Figura 5). Cada recipiente se tomó como una unidad experimental y se tuvieron 3 repeticiones de cada tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento de antagonismo contra *Clavibacter michiganensis*.

Nomenclatura	Tratamiento
T1	Blanco (-) sin tratamiento
T2	Aislado bacteriano
T3	Patógeno (<i>Clavibacter michiganensis</i>)
T4	Aislado + Patógeno
T5	Blanco (+) Q bacter + Patógeno

Una semana después del trasplante se aplicaron los tratamientos de manera preventiva previa a la infección con el patógeno *Clavibacter michiganensis*, todos fueron asperjados de manera foliar, donde el blanco (+) Q bacter, se aplicó según especificaciones de fabricante a una concentración de 5 ml/l, los demás tratamientos utilizaron un cultivo del aislado bacteriano de 24 h de crecimiento y se ajustó a una concentración de 1×10^8 UFC ml⁻¹. La infección con el patógeno se realizó 48 h después de la aplicación preventiva de los tratamientos donde se asperjó un cultivo de *Clavibacter michiganensis* de 24 h de crecimiento en un orbital a 180 g con una temperatura de 28 °C[±] 2 °C. Después de 30 días de la infección se analizó el nivel de esta en cada tratamiento por medio de conteo de colonias de *Clavibacter michiganensis*.



Figura 5. Experimentos *in vivo* de aislado bacteriano vs *Clavibacter michiganensis* a un mes de la infección.

De manera paralela se realizó un estudio en el Instituto Potosino de Investigación de Científica y Tecnología (IPICYT) donde se infectaron plantas de jitomate variedad Ailsa Craig de 31 días de edad con dos cepas patógenas de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (*Cmm*) AcR42 y 1387. Estas plantas de jitomate se pusieron en contacto con el patógeno *Cmm* y se usó el aislado bacteriano RR2 como agente antagónico (Figura 6). Para cada cepa de *Cmm* se pusieron ocho plantas por tratamiento y se aplicó la bacteria benéfica 48 h antes de la infección con *Cmm*; se aplicaron 10 ml en el sustrato y 10 ml por aspersión foliar cada semana, durante tres semanas. Los inóculos de *Cmm* y la bacteria benéfica se ajustaron a una concentración de 3×10^8 UFC/ml. El control químico (Terra -Cu) se aplicó cuando aparecieron los primeros síntomas de la enfermedad, 50 ml por planta en el sustrato a una concentración de 140 ppm, según especificaciones de fabricante. Al mismo tiempo se aplicó 3.8ml de manera foliar un antibiótico (Oximet) a una concentración 0.03 g/ml. Como control negativo, se pusieron tres plantas sin infectar con *Cmm* (CN).



Figura 6. Experimento *in vivo* realizado en IPICYT donde se pone en contacto el aislado bacteriano vs *Clavibacter michiganensis*.

Las variables que se midieron fueron la altura y dosel de la planta, así como porcentaje de incidencia utilizando la siguiente formula:

$$I = \frac{\text{No. de plantas enfermas}}{\text{No. total de plantas}} \times 100 \quad \text{Donde I es el porcentaje de incidencia}$$

Otra variable medida fue la severidad usando la escala que se muestra en el **Error! Reference source not found.** (Soylu, 2003).

Cuadro 2. Escala de severidad utilizada para medir el daño de *Clavibacter michiganensis* en plántula de jitomate.

Severidad	Característica
0	Plantas sanas
1	1- 2 hojas enfermas
2	3-4 hojas enfermas
3	4 a más hojas enfermas
4	Planta muerta

i) Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía por Tukey para parámetros individuales con un nivel de significancia del $p < 0.05$ utilizando el paquete estadístico GraphPad PRISM software, versión 7.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Aislamiento de bacterias

Según el conteo de células viables realizado en el vaciado en placa, la densidad de microorganismos en la rizosfera de ricino es de 5×10^5 UFC/g (Figura 7). Esto demuestra que el suelo donde se encontraba la planta contenía una buena cantidad de biomasa microbiana (FAO, 2017).

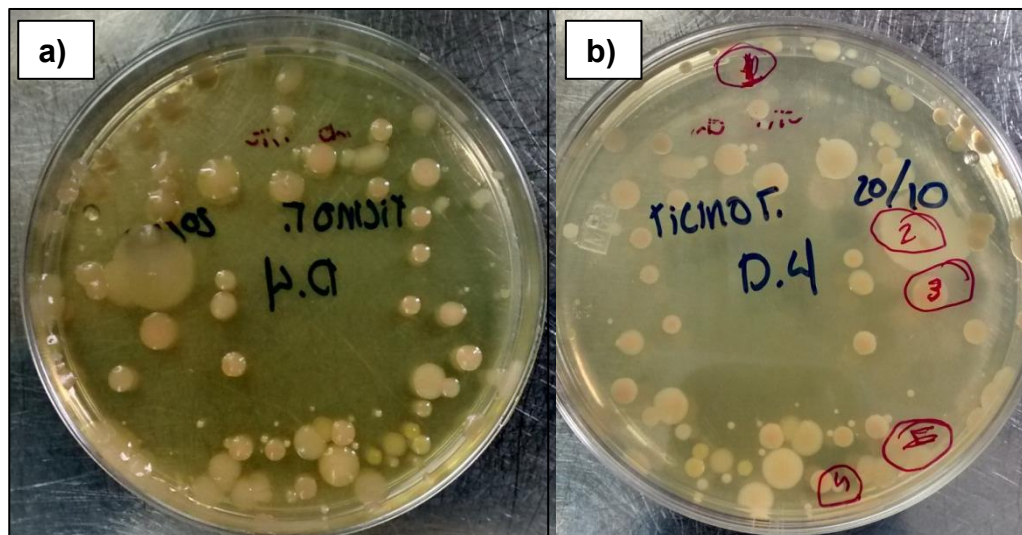


Figura 7. Fotografía de la placa de la dilución seleccionada para hacer el conteo de UFC a) anverso y b) reverso

b) Caracterización Morfológica de bacterias aisladas.

Para las pruebas de antagónico y de promoción de crecimiento solo se utilizó un aislado en particular, el cual tuvo resultados prometedores en pruebas preliminares. Este aislado según la tinción de Gram dio como resultado una coloración morado, lo cual nos indica que hablamos de una bacteria Gram +, este dato se confirmó con la prueba de KOH donde se formaron grumos en vez de filamentos (Figura 8).

Al observarse bajo el microscopio se puede decir que el aislado es un *Bacillus* sin flagelos. Este *Bacillus* es capaz de crecer sin problemas en medio LB y la colonia se desarrolla con una forma redonda y lisa, de borde irregular y de consistencia cremosa.

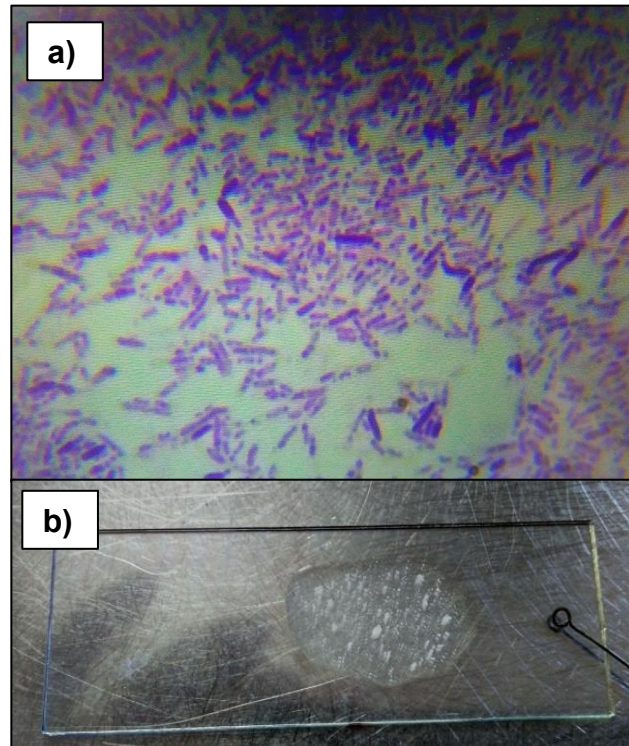


Figura 8. a) Fotografía de la tinción de Gram del aislado seleccionado, b) formación de grumos en la prueba de KOH

c) Secuenciación del gen 16S rRNA y análisis filogenético.

Después de la extracción de ADN del aislado bacteriano y del PCR para el gen 16S rARN, este producto de la reacción de PCR se envió al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica para su secuenciación y se obtuvo la siguiente secuencia.

Secuencia forward del aislado RR2

```
GACTTACCGGTGTGCTACTTACTGGACGACGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGTTC  
TCAAAGTTAAGGGCGTGCGGCGGAGTAACATGTGTAAGTCCTGCCATAAGACTGTT  
TAACTTCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAAT  
TGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGAGGGACCCGCGCCGCATTAGCTAGTTG  
CTGAGGAAACGGCTCACCATGGCTACGATGCGTATGCGAGCTGAAAGGGCGCCCGC  
CCCCACTGTCACTGACCCGGGACCAACTTTTCAACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCT  
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCG  
GGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCT  
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCT  
TAAGTCTGATGTGAAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA  
GACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG  
ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGC  
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACTCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA  
TGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCAGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAG  
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACCTCAAAGGAATTGGACGGGG  
GGCCCGCCACAAGGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTTGAAAGCCACCGCGAAGA  
ACCTTACCGAGGGTCTGACATTCCTTCTGAAAACCCTAGAGGATAGGGGCTTTCCTT  
CCTCCGGAGCAAGAAGTGACAGGTGGGTGCCAATGGGTGGTCGTTCCAGCCTCGGG  
GTTTCGTGGAGGAAATGTTGGGCGTTTCACGTTCTCCGCACATACGCAGAGGCGCG  
GACCATA
```

Una vez obtenida la secuencia, esta se analizó en el Programa BLAST del NCBI y se obtuvieron varias similitudes (Cuadro 1 Cuadro 3), la principal coincidencia fue entre *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus toyonensis*, pero al ser *B. toyonensis* una subespecie de *B. cereus* solo había que descartar entre *B. thuringiensis* y *cereus*.

Cuadro 3. Similitudes obtenidas según la secuencia forward analizada en BLAST (Extracto tomado de resultados obtenidos en línea)

Descripción	Puntuación Max	Puntuación Total	Query cover	Valor E	Ident
<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407, genoma completo	1441	20086	90%	0.0	92%
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-712, genoma completo	1441	17240	90%	0.0	92%
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>thuringiensis</i> str.1S5056, genoma completo	1441	18662	90%	0.0	92%
<i>Bacillus</i> sp. FDAARGOS_235, genoma completo	1441	20125	90%	0.0	92%
<i>Bacillus cereus</i> strain CMCC P0011, genoma completo	1441	21491	90%	0.0	92%
<i>Bacillus cereus</i> strain CMCC P0021, genoma completo	1441	22901	90%	0.0	92%
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HS18-1, genoma completo	1441	20037	90%	0.0	92%
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain MYBT18246, genoma completo	1441	17181	90%	0.0	92%
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792, genoma completo	1441	15784	90%	0.0	92%
<i>Bacillus thuringiensis</i> MC28, genoma completo	1441	21406	90%	0.0	92%

Para el descarte final entre estos dos tipos de *Bacillus* se llevó a cabo una tinción de cristales *Cry* del *Bacillus thuringiensis* que se encuentran en el momento de esporular, pero al no ser encontrados, se descartó que el aislado perteneciera a este grupo (Figura 9). Con este resultado podemos concluir que el aislado seleccionado es un *Bacillus cereus* subespecie *toyonensis*.

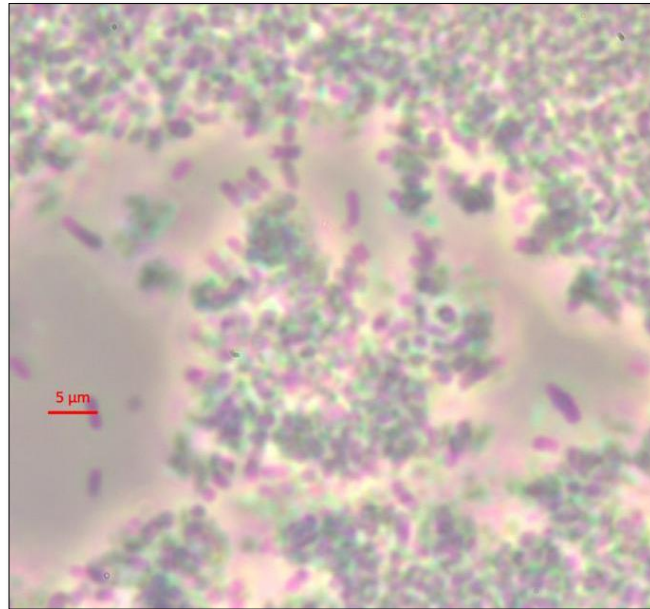


Figura 9. Fotografía de la tinción del aislado para la identificación de cristales *Cry* de *Bacillus thuringiensis*.

d) Solubilización de fosfatos

El medio Pikovskaya contiene fosfato tricálcico, el cual es la fuente inorgánica del P y no es disponible para la planta, pero al formarse un halo transparente alrededor de la colonia podemos aseverar que el aislado bacteriano es capaz de transformarlo a una forma asimilable (Figura 10). La deficiencia de fósforo en el suelo influye en el retraso de la madurez, en el desarrollo de la planta, disminuyendo el rendimiento de la cosecha (García, 2015), de ahí que sea tan importante esta prueba para la selección de posibles Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal.

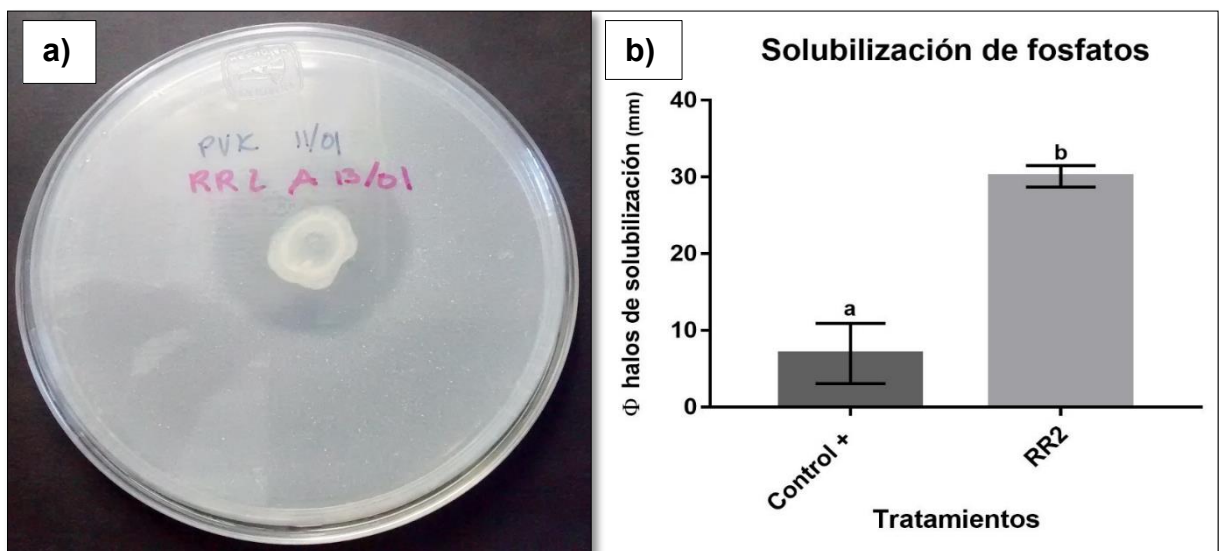


Figura 10. Evaluación de la solubilización de fosfatos a) vista del halo de solubilización en medio PVK y b) Análisis estadístico de los halos de solubilización comparado con un producto comercial

e) Pruebas de antagonismo contra *Clavibacter michiganensis* in vitro

Los cinco aislados se evaluaron contra el patógeno *Clavibacter michiganensis* donde el aislado nombrado RR2 fue el seleccionado para continuar con las pruebas posteriores debido a que fue el que obtuvo una mayor diferencia significativa de antagonismo con respecto al control positivo, un producto comercial orgánico base bacterias llamado Q bacter (Figura 11, a). Una vez realizada esta prueba de antagonismo las cajas Petri se incubaron durante un mes adicional, sólo para comprobar que la eficacia de los aislados respecto al patógeno se sostuviera y así fue (Figura 11, b). Con estos resultados podemos inferir que el *Bacillus* aislado es capaz de producir alguna clase de metabolito capaz de inhibir a *Clavibacter michiganensis* como se ha reportado en algunos trabajos con otros patógenos (Castillo-Reyes, 2015).

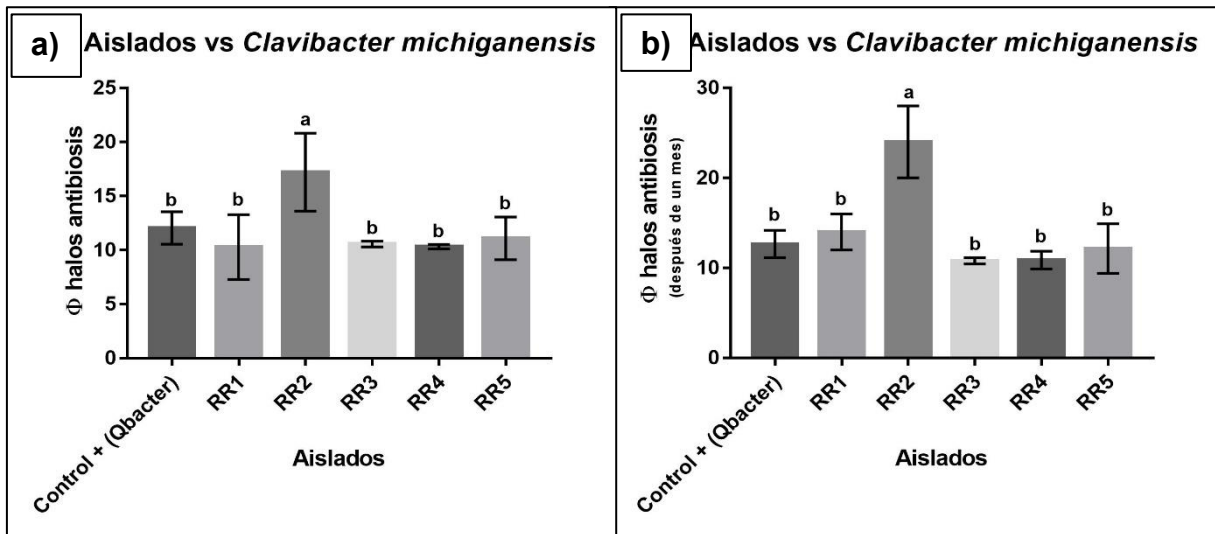


Figura 11. a) Se muestra el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *Clavibacter michiganensis*. b) Las cajas Petri se incubaron un mes adicional para comprobar que el resultado no se revirtiera con el tiempo.

Una vez que la prueba contra *Clavibacter michiganensis* fue positiva, se evaluó la eficacia del aislado seleccionado contra el mismo patógeno, pero en esta ocasión dicho aislado se cultivó en un medio mínimo en nutrientes (MEM). Con estos resultados podemos decir que cuando la bacteria aislada es sometida a cierto estrés como lo es la deficiencia de nutrientes, es inducida a producir el metabolito que es capaz de inhibir al patógeno en cuestión en una mayor concentración (Figura 12).

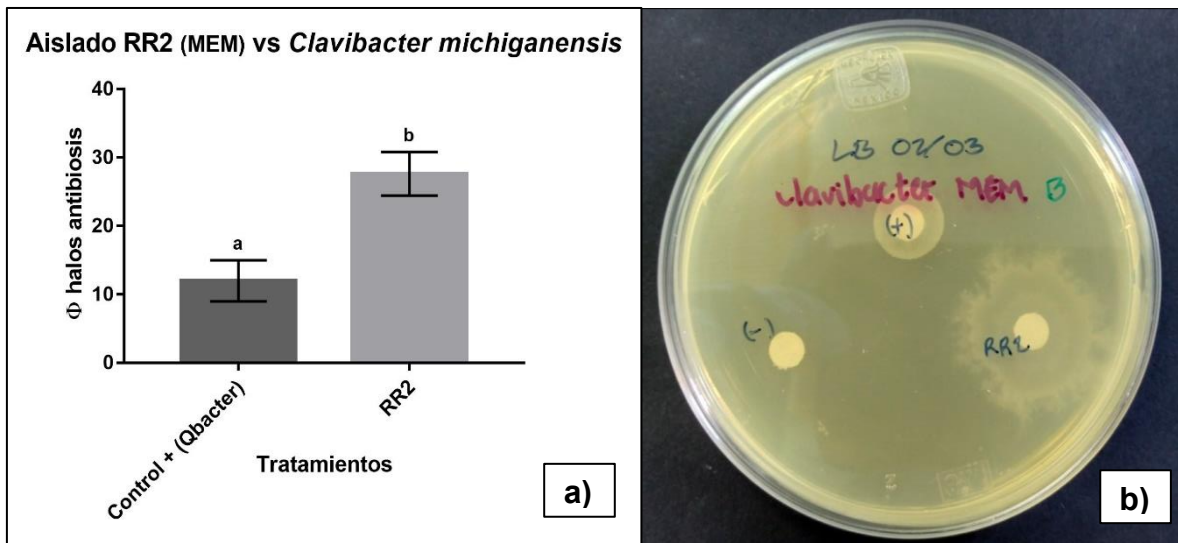


Figura 12. a) Eficacia del aislado RR2 cultivado en medio mínimo de nutrientes (MEM) con respecto al control Qbacter. b) Fotografía del crecimiento del aislado RR2 vs *Clavibacter michiganensis*.

Para corroborar que los resultados obtenidos fueran contundentes para todo el género *Clavibacter michiganensis*, se consiguieron dos cepas virulentas de este patógeno provenientes del Laboratorio de Biología Molecular del IPICYT y se corroboró que los resultados fueran semejantes a los obtenidos anteriormente,

donde el aislado bacteriano RR2 siguió inhibiendo al patógeno *Clavibacter michiganensis*, cultivado tanto en medio rico en nutrientes (LB), así como en mínimo de nutrientes (MEM) (Figura 13).

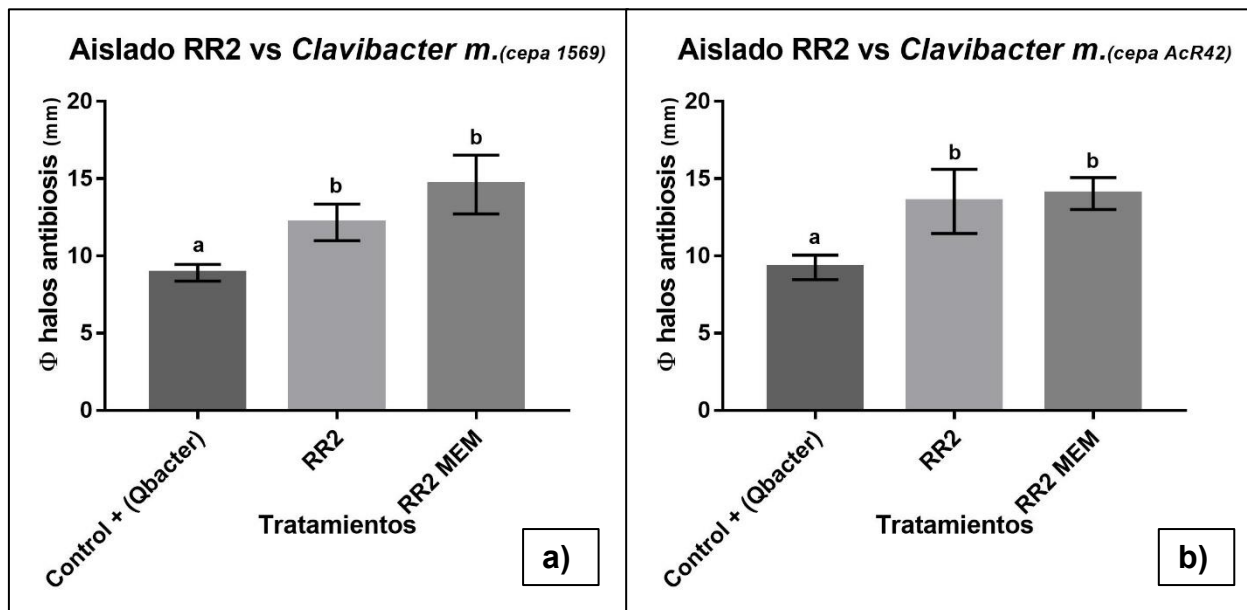


Figura 13. a) Análisis de los halos de inhibición del aislado RR2 cultivado en medio LB y MEM vs *Clavibacter michiganensis* cepa 1569 b) Análisis de los halos de inhibición del aislado RR2 cultivado en medio LB y MEM vs *Clavibacter michiganensis* cepa Acr42

f) Determinación de la capacidad promotora vegetal de los aislados en plántula de jitomate

Después de un mes de inoculaciones semanales se observó que para todas las variables analizadas altura de la planta, ancho de tallo, cantidad de clorofila y cantidad de biomasa no fueron significativamente diferentes los tratamientos T2 y T3 que contenían diferentes concentraciones del aislado bacteriano, aunque estos dos si fueron significativamente diferentes con respecto al tratamiento T1 que fue el blanco negativo (Figura 14). Con lo cual se puede concluir que el aislado bacteriano RR2 es capaz de promover el crecimiento de plantas de jitomate y que no es específico de plantas arbustivas como *Ricinus* donde fue aislado originalmente; sino que es capaz de hacer simbiosis con plantas como del género Solanáceas. Este fenómeno de no especificidad ya se había reportado en aislados de gramíneas (Haiyambo D. C.-H., 2015), fabáceas (Kumar, 2015) y algunas malezas (Gobelak, 2015) aplicados a diferentes cultivos de interés con óptimos resultados.

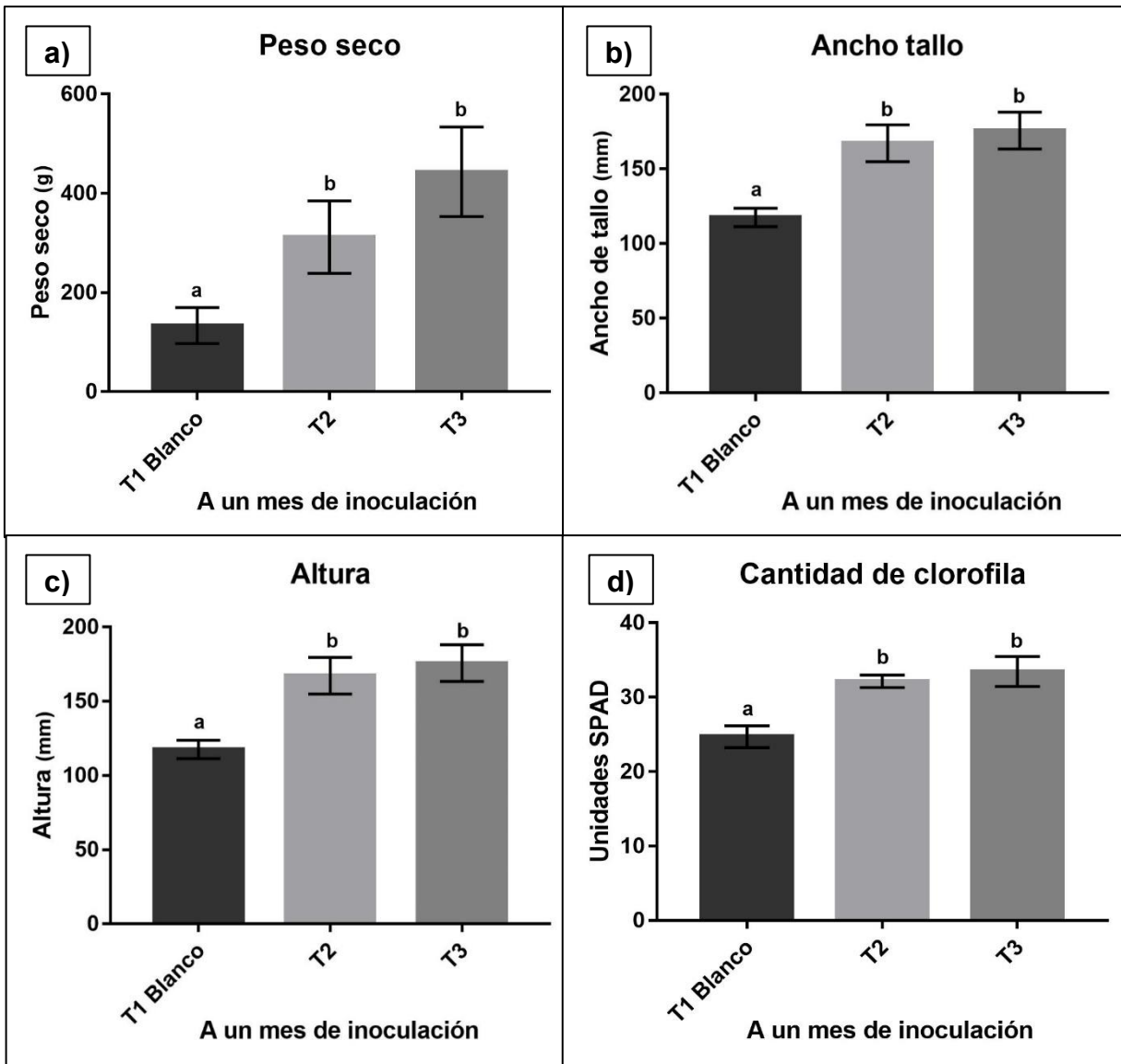


Figura 14. Evaluación de las diferentes variables para determina si el aislado bacteriano RR2 es promotor de crecimiento vegetal a) Cantidad de biomasa (peso seco), b) Ancho de tallo, c) Altura, d) Cantidad de clorofila

- g) Determinación de la capacidad promotora vegetal de los aislados en plántula de chile, lechuga y mostaza.

En este experimento se evaluaron variables diferentes a las tomadas en cuenta en las plántulas de jitomate, dándole importancia a los nutrientes asimilados por la planta, y se observó que tanto para Chile, Mostaza y Lechuga en los tratamientos T1 y T2 que contenían diferentes concentraciones del aislado bacteriano si hubo una diferencia respecto al control negativo T1 con respecto a Fosforo (Figura 15, a) (Figura 16, a) y (Figura 17, a). Y para Calcio sólo hubo diferencia significativa en plántulas de Chile (Figura 15, b) y Lechuga (Figura 17, b), no en Mostaza (Figura 16, b). Mientras que para Potasio solo hubo diferencia significativa en plántulas de Mostaza (Figura 16, c). La variable de pH no fue significativamente diferente en ninguno de los tratamientos.

Estos resultados *in vivo* reafirman los obtenidos del experimento *in vitro* de solubilización de fosfatos del aislado bacteriano, ya que podemos concluir que gracias a que la bacteria es capaz de hacer biodisponible al Fósforo, las plántulas de Chile, Mostaza y Lechuga pudieron tener una mejor asimilación de este nutriente.

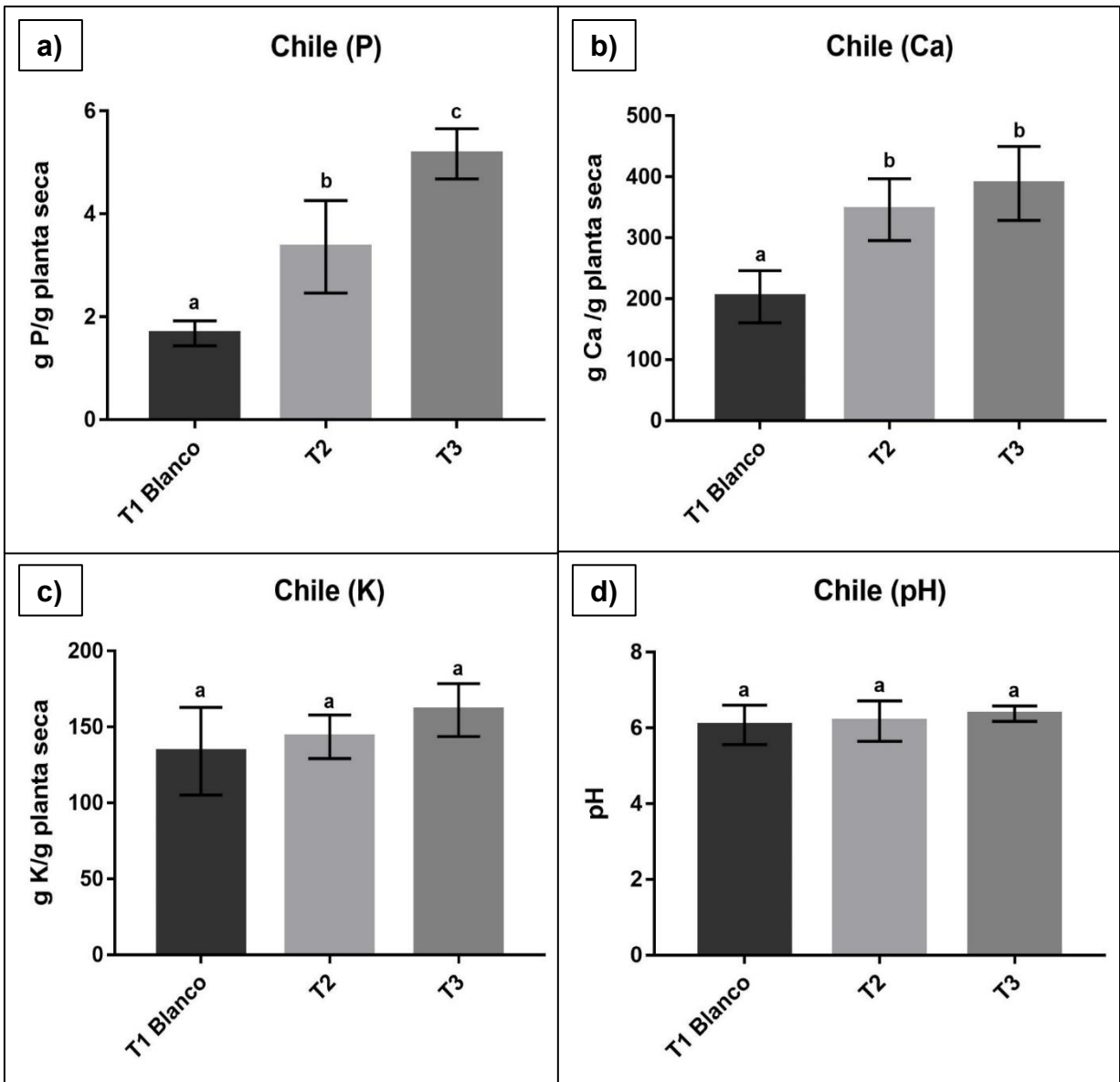


Figura 15. Evaluación de diferentes nutrientes y pH en plántulas de Chile con diferentes tratamientos T1-blanco negativo, T2-1.5x10⁸UFC/ml de RR2 y T3 3x10⁸UFC/ml de RR2 a) Fósforo, b) Calcio, c) Potasio y d) pH

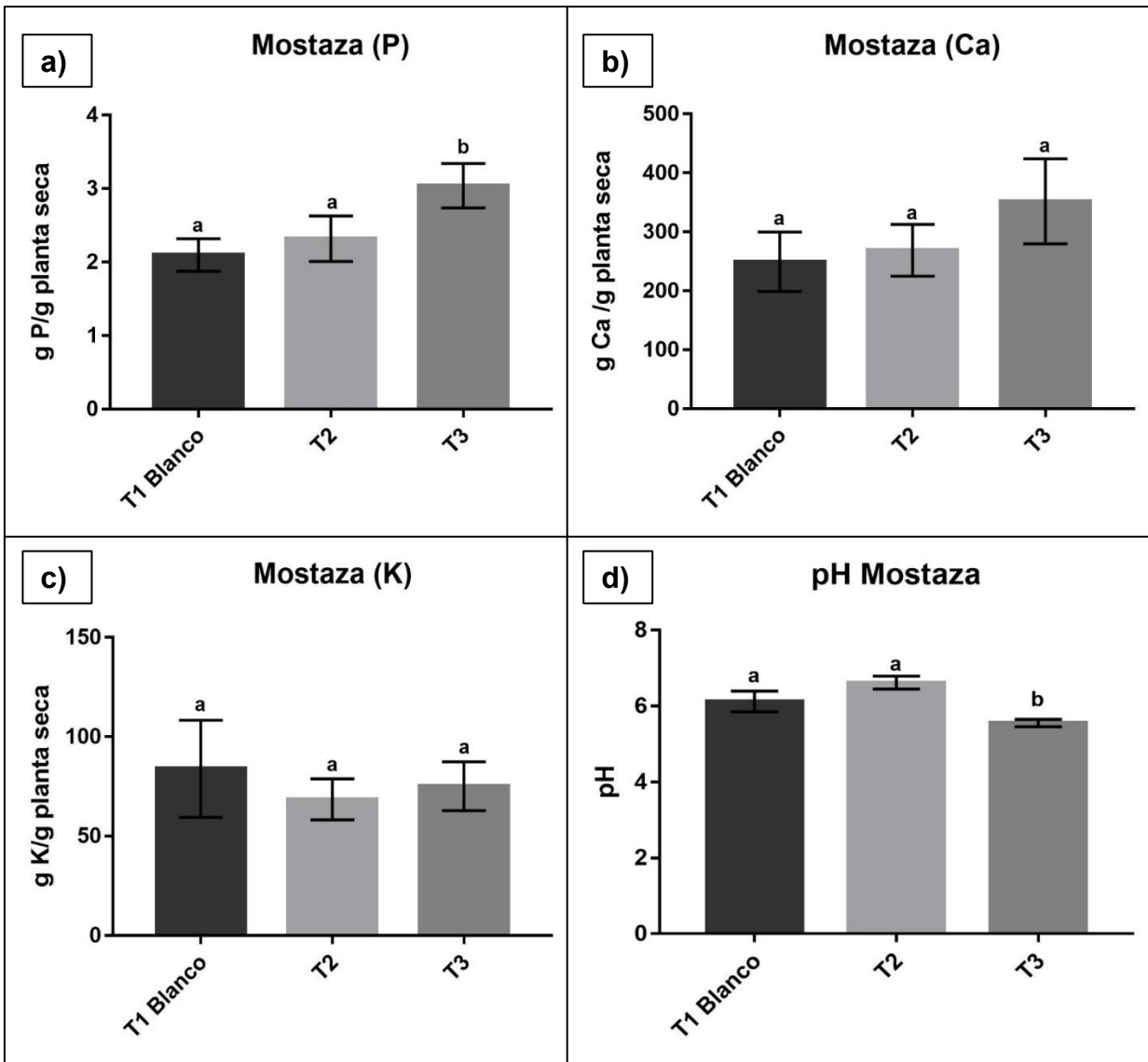


Figura 16. Evaluación de diferentes nutrientes y pH en plántulas de Mostaza con diferentes tratamientos T1-blanco negativo, T2-1.5x10⁸UFC/ml de RR2 y T3 3x10⁸UFC/ml de RR2 a) Fósforo, b) Calcio, c) Potasio y d) pH

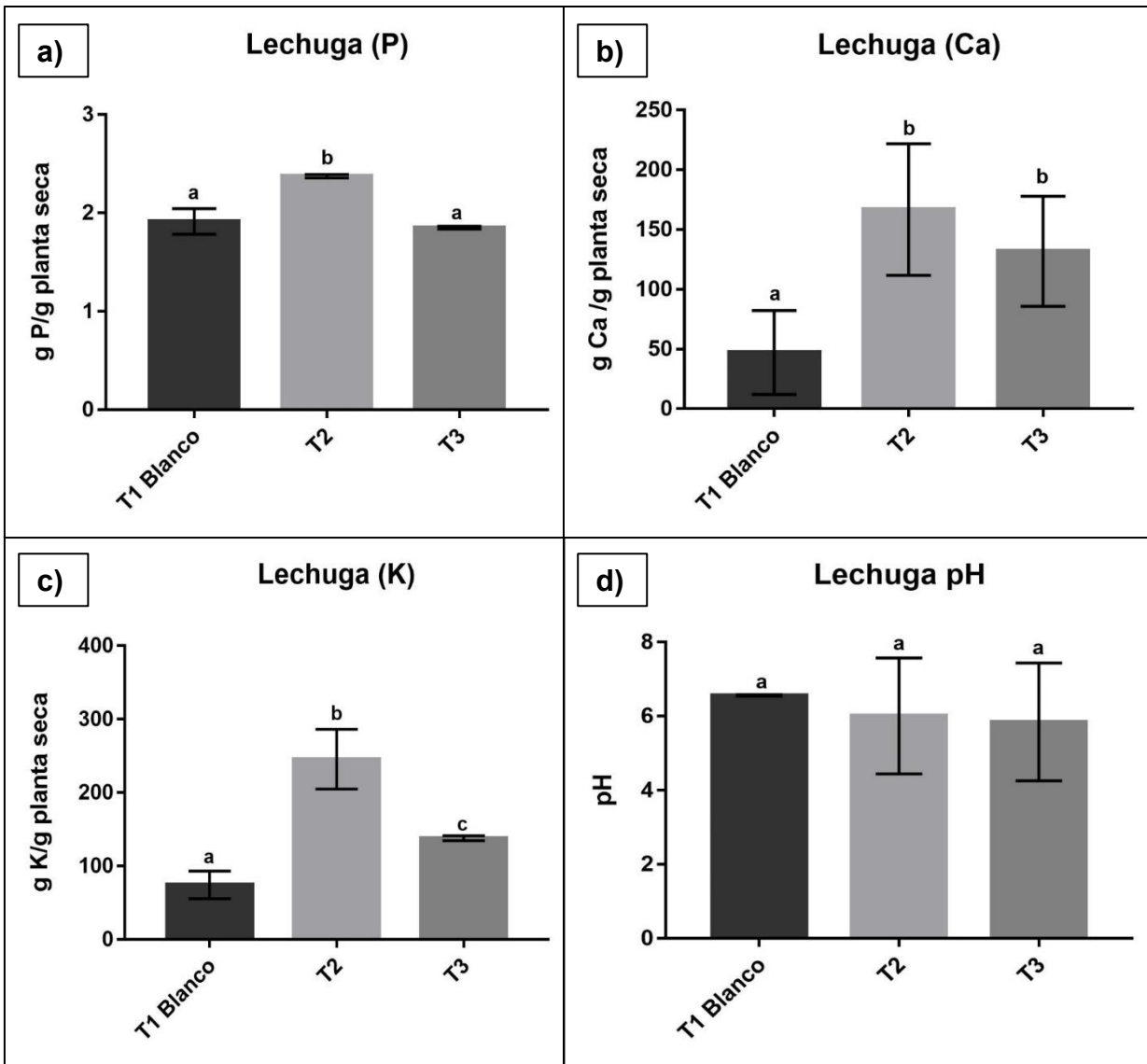


Figura 17 Evaluación de diferentes nutrientes y pH en plántulas de Lechuga con diferentes tratamientos T1-blanco negativo, T2-1.5x10⁸UFC/ml de RR2 y T3 3x10⁸UFC/ml de RR2 a) Fósforo, b) Calcio, c) Potasio y d) pH

h) Evaluación de la capacidad de antagónica contra *Clavibacter michiganensis* in vivo

En este experimento se obtuvo como resultado que el aislado bacteriano RR2 usado de manera preventiva, fue capaz de disminuir la carga bacteriana de *Clavibacter michiganensis* en plántulas de jitomate bajo condiciones de invernadero (Figura 18), corroborando los resultados *in vitro*, donde este efecto también fue visible. Si bien no se observó una diferencia significativa con respecto al control Q bacter, si se logró disminuir a la mitad la carga bacteriana del patógeno *Clavibacter michiganensis*.

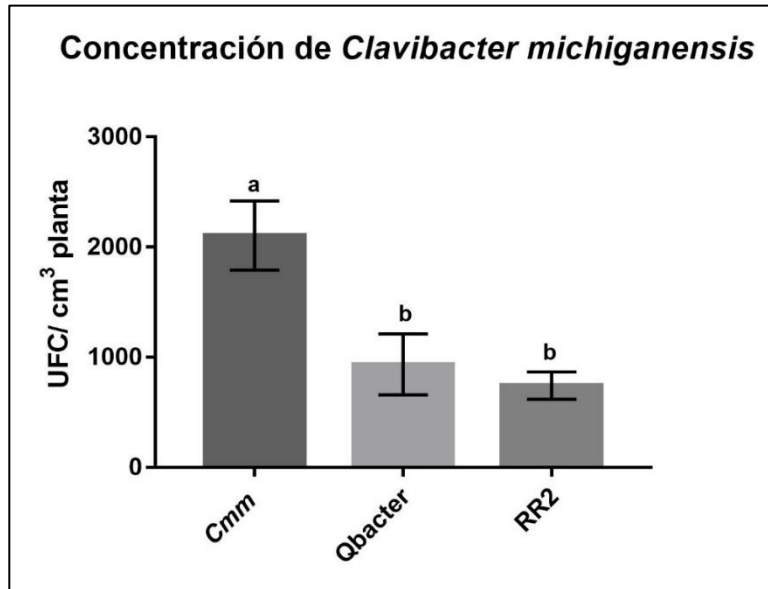


Figura 18. Evaluación de la carga bacteriana de *Clavibacter michiganensis* en plántula de jitomate con diferentes tratamientos T1-sin tratamiento, T2- Qbacter + patógeno T3- Aislado RR2 + patógeno.

En el experimento realizado en colaboración con el IPICYT los resultados no fueron tan contundentes, pero sí se observa una tendencia de las plantas tratadas con el aislado a no disminuir su tamaño (Figura 19, a y Figura 20, b), con respecto a las que no tienen ningún tipo de tratamiento y sí se observa una diferencia en cuanto a la severidad del daño (Figura 19, c y Figura 20, c), donde las plantas tratadas con el aislado RR2 se quedan en los primeros grados de severidad, inclusive con las dos cepas del mismo patógeno. Con esto podemos concluir que el aislado bacteriano RR2 es capaz de otorgar a la planta cierta protección contra el patógeno *Clavibacter michiganensis*.

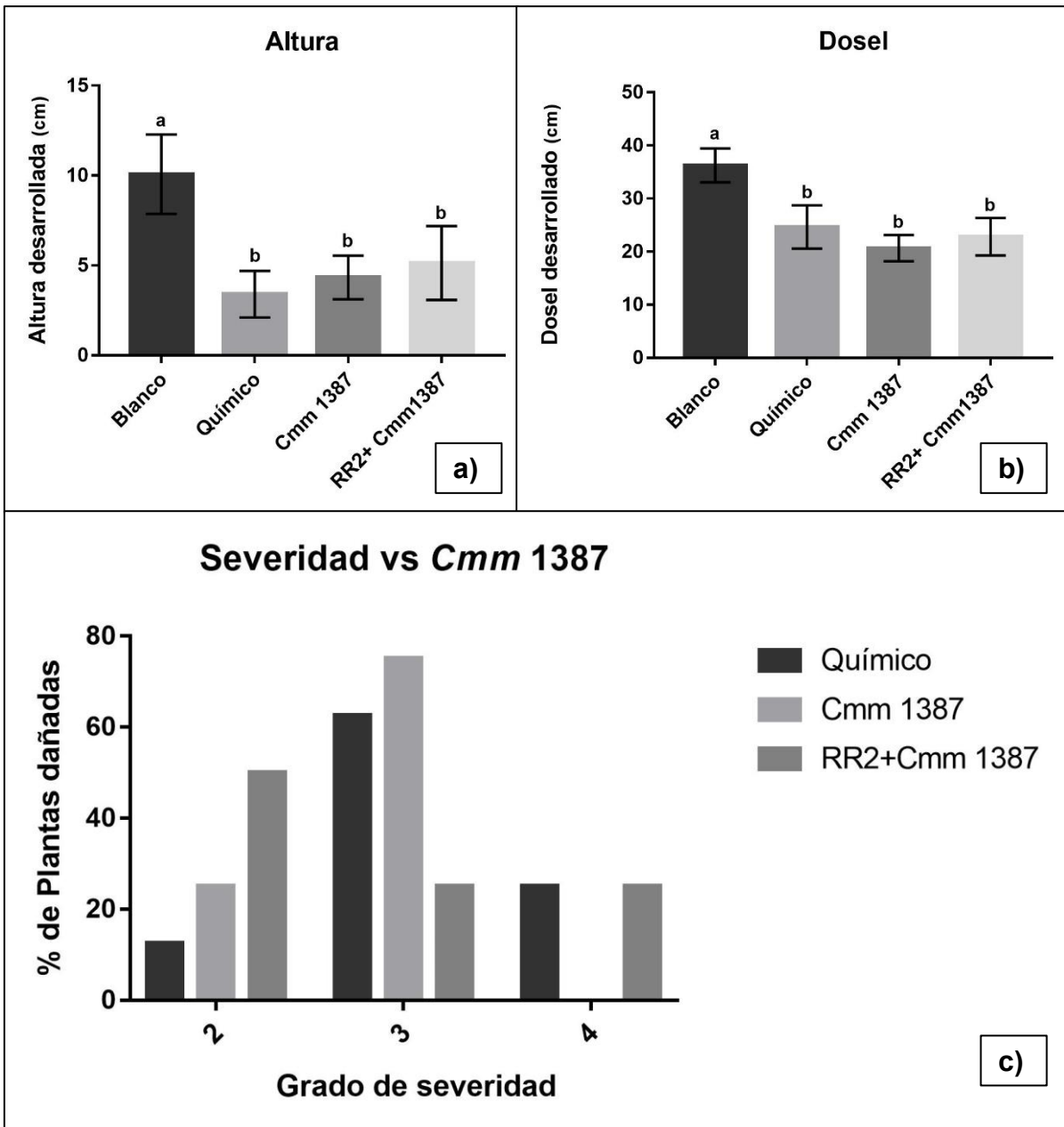


Figura 19. Análisis de las variables en experimento *in vivo* de *Clavibacter michiganensis* cepa 1387 a) Altura b) Dosel c) Grado de severidad

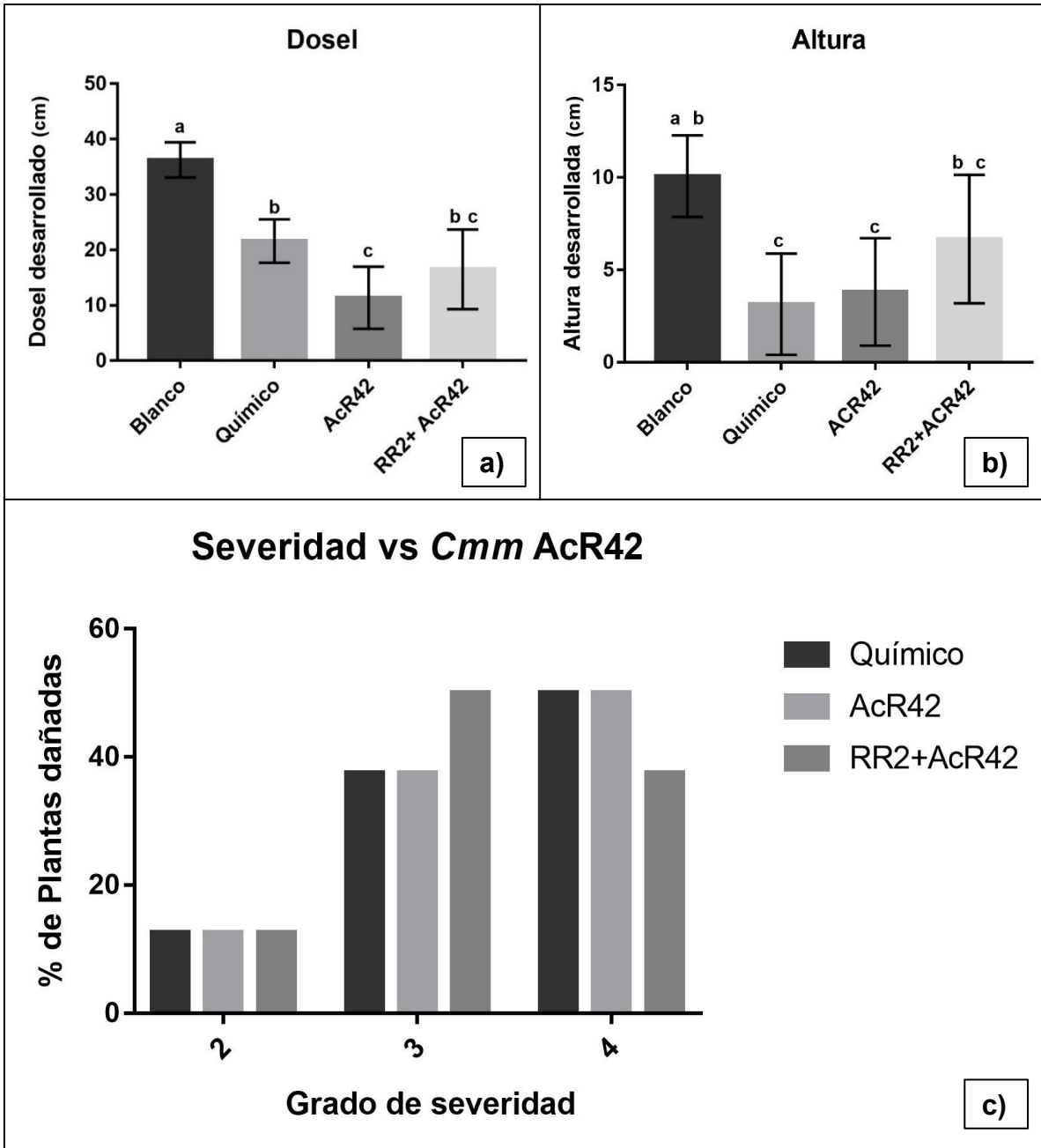


Figura 20. Análisis de las variables en experimento in vivo de *Clavibacter michiganensis* cepa AcR42 a) Altura b) Dosel c) Grado de severidad

VII. CONCLUSIÓN.

Basado en los resultados obtenidos se concluye que el aislado bacteriano RR2 obtenido de la rizosfera de Ricino e identificado como *Bacillus cereus* subespecie *toyonensis* es capaz de promover el crecimiento de plántulas de jitomate. Cuando él aislado es aplicado preventivamente le ofrece cierta protección el ataque del patógeno *Clavibacter michiganensis* disminuyendo su severidad. En trabajos futuros se pretende estudiar los posibles mecanismos por los que esta bacteria actúa ofreciendo múltiples beneficios a las plantas con las que interactúa.

VIII. REFERENCIAS.

- Babalola, O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett*, 1559-1570.
- Bach-Álvarez, T. D. (2008). Las rizobacterias, promotoras de crecimiento vegetal PGPR. *Agricultura orgánica* , 35-38.
- Bent, E. (2006). Induced systemic resistance mediated by plant growth promoting rizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). *Springer US*, 225-258.
- Boller, T. M. (1991). Colorimetric assay for chitinase Meth. *Enzymol*, 970-974.
- Buchanan, R. G. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Calvo, P. N. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, 3-41.
- Cass, W. G. (2015). Bacterial canker of tomatoes. *Dep. Agri. Western Aust*, 147-156.
- Castellanos, J. U. (2006). Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. *Intagri*.
- Castillo-Reyes, F. H.-C.-M.-O.-H. (2015). In vitro effectiveness of Bacillus and polyphenoles of native plants from México on Rhizotocnia-Solani. *Rev. Me. Cienc. Agríc*, 549-562.
- CEPAL/FAO/IICA. (2011). *Volatilidad de precios en los mercados agrícolas (2000-2010). Persepectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas una mirada hacia América Latina y el Caribe*.
- Chakraborty, U. C. (1993). Changes in the levels of peroxidase and phenylalanine ammonia lyase in Brassica napus cultivars showing variable resistance to Leptospaeria maculans. *Folia Microbiol*, 491-496.

- Chauhan, H. B. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria. Prospects and potencial. *Applied Soil*, 38-53.
- Daferera, D. Z. (2012). The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and C. michiganensis subsp. michiganensis. *Crop Prot.*, 39-44.
- Dey, R. P. (2004). Grow promotion and yield enhancement of peanut by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol, Res*, 371-394.
- Dinesh, R. A. (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.
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 3-14.
- Edi-Premono, M. M. (1996). Effect of phosphate solubilizing Pseudomonas putida on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones J. Crop Sci*, 13-23.
- EPPO. (2014). *Data sheets on cuarantines Pest. Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. EPPO A2 List. No. 50.
- FAO. (2002). *Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030*. Roma, Italia: FAO.
- FAO. (2006). *Deposito de documentos de la FAO*. Recuperado el 9 de Febrero de 2016, de Agricultura orgánica y biodiversidad: <http://www.fao.org/docrep/005/y4137s/y4137s06.htm>
- 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

- García, R. L. (2015). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria in northwestern Argentina and its effect in promoting growth in maize (*Zea mays* L.). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 19-28.
- Gilbert, J. A. (2011). Gene expression profiling: Metatranscriptomics. En Y. R. Kwon, *High-throughput next generation sequencing. Methods in Molecular Biology* (págs. 195-205). Springer: Humana Press.
- Gobran, G. W. (2001). *Trace elements in the rhizosphere*. Florida: CRC Press.
- Gómez-Tovar, L. y.-C. (2004). La agricultura orgánica en México y en el mundo. CONABIO. *Biodiversitas*, 13-15.
- Grobelak, A. N. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 22-28.
- Grönemeyer, J. B.-H. (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.
- Haiyambo, D. P.-H. (2015). Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in East Kavango region of Namibia for plant growth promoting characteristics . *Curr Microbiol*, 566-571.
- Hausbeck, K. B.-M. (2015). Effect of bactericides on population sizes and spread of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 38-44.

- Hellriegel, H. W. (1888). Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und leguminosen. *Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins für Rubenzucker-Industrie Deutschen Reichs*, 234.
- Hernández-Rodríguez. (2006). *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer.
- Kloepper, J. S. (1981). Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, 1020-1024.
- Kloepper, J. (1993). Plant growth promoting rhizobacterias as biological control agents. *Marcel Dekker*, 255-274.
- Kloepper, J. L. (1989). Free-living bacteria inoculation for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*, 39-49.
- Kloepper, J. S. (1978). Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. *Gilbert-Clarey*, 879-882.
- Koepper, J. L. (1989). Free-living bacteria inoculation for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*, 39-49.
- Kumar, A. B. (2015). Does a plant growth-promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability? *J. Pure Appl. Microbiol*, 715-724.
- Lakshman, B. S. (2015). Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech*, 867-876.
- Meena, R. S. (2015). Isolation of low temperature surviving plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L) and documentation of their plant growth promoting traits. *Biocatalysis and Agricultura Biotechnology*, 806-811.

- Meena, V. M. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, K-release dynamics from waste mica. *Ecol. Eng.*, 340-347.
- Pan, S. Y. (1991). A technique for detection of chitinase, beta-1,3-glucanase and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectric focusing. *Phytopathology*, 970-974.
- Pikovskaya, R. (1948). Solubilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 362-370.
- Poysa, V. (1993). Evaluation of tomato breeding lines resistant to bacterial canker. *Can. J. Plant Pathol*, 301-304.
- Ruzzi, M. A. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture . *Scientia Horticulturae*, 124-134.
- SAGARPA-COFUPRO-UNAM. (2013). *Los biofertilizantes y su uso en la agricultura* . México, D.F.: Editorial Prado, S.A. de C.V.
- Said, T. J. (2006). Bio prospecting and management of microorganisms. *National conference on agro biodiversity conservation and sustainable utilization.*, (págs. 129-130).
- SEMARNAT y CP. (2003). *Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana*. México.
- Sen, Y. W. (2015). Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance and interactions. *Phytopathological society*, 2-13.
- Sharifazizi, M. B. (2016). Evaluation of biological control of *Erwinia Amylovora*, causal agent of fire blight of pear by antagonistic bacteria. *Biological control*, 50-62.

- Singh, N. S. (2015). Can we use maize (*Zea mays*) rhizobacteria as plant growth promoter? *Vegetos*, 86-99.
- Soylu, S. B. (2003). Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar S-methyl, against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science*, 1069-1075.
- Stafford, W. B. (2005). Bacterial diversity in the rhizosphere of proteaceae species. *Environ. Microbiol.*, 1755-1768.
- Thilagar, G. B. (2016). Selected microbial consortia developed for chili reduces application of chemical fertilizers by 50% under field conditions. *Scientia Horticulturae*, 27-35.
- Tisdale SL., N. W. (1975). Soil fertility and fertilizers. *Macmillan Publishing*, 694.
- 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.