



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

"DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA BIO-FORMULACIÓN A  
BASE DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL  
CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) COMO ALTERNATIVA  
PARA LA PRODUCCIÓN ORGÁNICA DE *Solanum*  
*lycopersicum*"

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

**IAQ. DANIEL MENDOZA JIMÉNEZ**

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ  
Codirector

DR. HÉCTOR PAUL REYES POOL

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**"DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA BIO FORMULACIÓN A  
BASE DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL  
CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) COMO ALTERNATIVA  
PARA LA PRODUCCIÓN ORGÁNICA DE *Solanum  
lycopersicum*."**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**IAQ. DANIEL MENDOZA JIMÉNEZ**

**DIRIGIDA POR  
Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ**

**Codirector**

**DR. HÉCTOR PAUL REYES POOL**

**SINODALES**

**Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ**

**Dr. HÉCTOR PAUL REYES POOL**

**Dr. FIDEL LANDEROS JAIME**

**Dra. DULCE MARIA PALMERIN CARREÑO**

**Dr. SANTIAGO VERGARA PINEDA**

## Resumen

La marchitez vascular del tomate es una enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, siendo la principal amenaza para este cultivo. No obstante, una alternativa ambientalmente sostenible es la implementación del control biológico debido al impacto negativo que producen los agroquímicos dado que sus residuos se filtran a través del suelo contaminando las aguas subterráneas y dañando al ecosistema. Por consiguiente, en el presente trabajo se evaluó el efecto de consorcios de PGPR (DM1 y DM2) con el principal objetivo de evaluar sus efectos sobre la promoción del crecimiento y el grado de marchitez vascular planta de tomate ocasionado por *F. oxysporum*, y a su vez se evaluó la encapsulación de 2 PGPR en partículas de alginato de sodio con trehalosa al 10 % con el objetivo de prolongar su vida útil expuestas a diferentes condiciones de almacenamiento, además de probar su efecto de liberación en el cultivo de tomate. Los resultados demostraron la capacidad de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* por las PGPR aisladas de un huerto orgánico de fresa. Se evaluaron varios caracteres para demostrar que las bacterias utilizadas pertenecen al grupo de las PGPR, además, se realizó la identificación molecular de las mismas mediante secuenciación de la región ribosomal 16S, obteniéndose varios géneros como lo son: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter* y *Pantoea*. Se ensayó la compatibilidad entre las bacterias seleccionadas para establecer consorcios y analizar así su efecto antagonista contra *F. oxysporum* y su efecto beneficioso en las plantas de tomate. Fue posible establecer dos consorcios (DM1 y DM2), ambos inhibieron el desarrollo de *F. oxysporum* en un 85%. Posteriormente, se evaluó su capacidad para promover el crecimiento de la planta de tomate y su efecto bioprotector frente a *F. oxysporum*; observamos un efecto positivo en la aceleración del ciclo fenológico del tomate, dado que se obtuvieron flores y frutos antes que el control. Además, el cultivo fue protegido frente a la marchitez por arriba del 90%. Con la técnica de encapsulamiento se logró obtener un valor del 98 % de eficiencia de encapsulación, al evaluar la liberación de estas a un tiempo de 6 meses a diferentes condiciones de temperatura se observó que este valor baja al 80 %, indicándonos que es posible mantener las PGPR viables por periodos largos de tiempo.

**Palabras clave:** PGPR, tomate, consorcio, antagonismo, cultivo.

## **Abstract**

Tomato vascular wilt is a disease caused by the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, being the main threat to this crop. However, an environmentally sustainable alternative is the implementation of biological control due to the negative impact produced by agrochemicals since their residues leach through the soil contaminating groundwater and damaging the ecosystem. Therefore, in the present work, the effect of PGPR consortia (DM1 and DM2) was evaluated with the main objective of assessing their effects on growth promotion and the degree of vascular wilt in tomato crop caused by *F. oxysporum*, and at the same time the encapsulation of 2 PGPR in sodium alginate particles with 10% trehalose was evaluated with the objective of prolonging their shelf life exposed to different storage conditions, in addition to testing their release effect in tomato crop. The results demonstrated the growth inhibition capacity of *F. oxysporum* by PGPR isolated from an organic strawberry orchard. Several characters were evaluated to demonstrate that the bacteria used belong to the PGPR group, in addition, their molecular identification was performed by sequencing of the 16S ribosomal region, obtaining several genera such as: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter* and *Pantoea*. The compatibility between the selected bacteria was tested to establish consortia to analyze their antagonistic effect against *F. oxysporum* and their beneficial effect on tomato plants. It was possible to establish two consortia (DM1 and DM2), both of which inhibited the development of *F. oxysporum* by 85%. Subsequently, their ability to promote tomato crop growth and their bioprotective effect against *F. oxysporum* was evaluated; we observed a positive effect on the acceleration of the phenological cycle of tomato, since flowers and fruits were obtained before the control. In addition, the crop was protected against wilt by more than 90%. With the encapsulation technique, a value of 98% of encapsulation efficiency was obtained. When evaluating the release of PGPR over a period of 6 months at different temperature conditions, it was observed that this value dropped to 80%, indicating that it is possible to maintain the PGPR viable for long periods of time.

**Key words: PGPR, tomato, consortium, antagonism, crop.**

“Nunca debes tener miedo de lo que estás haciendo cuando es correcto”

“No tengo talento especial, solo soy apasionadamente curioso”

*Marie Curie*

“Recuerda mirar hacia las estrellas y no abajo hacia tus pies. Trata de darle sentido a lo que ves y pregúntate qué haces que el universo. Sé curioso. Por más dura que la vida pueda parecer, siempre hay algo que puedes hacer para llegar al éxito. lo importante es que nunca te des por vencido”.

*Stephen Hawking*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Antonio Cervantes por haberme dado la confianza de trabajar en su equipo de laboratorio desde mi formación como ingeniero, y aportarme de sus enseñanzas para poder ser un mejor profesionalista.

Al Dr. Héctor Pool por su tiempo y dedicación por su conocimiento para poder ejecutar los ensayos de encapsulación y aceptar ser mi Codirector de este trabajo.

A la Dra. Dulce Palmerín, Dr. Santiago Vergara y al Dr. Fidel Landeros por su aporte en la parte de análisis de resultados y en la resolver las dudas que se venían generando.

Al M en C. Salvador Ramírez técnico de LAMIMO por la ayuda requerida durante la realización del trabajo.

A mis compañeros-amigos del Laboratorio en especial a Adriana, Erick, Martin, Isaac, Edith y Fernando (los biólogos) por hacer de todo este tiempo una estancia amena en donde no solo era el venir a trabajar, sino contar con personas con las que platicar y ayudarse mutuamente en diversas circunstancias.

A mis mejores amigos Karen y Omar por apoyarme en todo este proceso, en donde sin importar las circunstancias siempre estaban ahí para poder platicar con ellos cuando más los necesitaba, hacerme comprender que las cosas pasan por algo y que la gente que en verdad nos quiere va a estar ahí sin importar los problemas.

A Santiago y Cristina por ser mis grandes amigos desde la preparatoria con los cuales he vivido grandes experiencias y momentos felices, aunque no estemos tan juntos últimamente los aprecio demasiado porque me han ayudado en momentos donde se requiere el contar con alguien para platicar y recibir esos consejos que son los que te ayudan a dejar de lado los problemas y ser mejor persona.

A mi familia en especial a mis padres que siempre me han apoyado en mis decisiones que tomo día a día, a mis hermanos que siempre están apoyándome en cualquier cosa que realizo y seguirme en mis ocurrencias de irnos de viaje cada año.

Al CONAHCYT por la beca 1229188 para poder seguir mis estudios.

Al proyecto FONDEC FNB202207 por la gestión de recursos.

Resumen.....	i
Indice de figuras.....	vi
Indice de tablas.....	xi
<b>1 ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1 AGRICULTURA EN MÉXICO .....	1
1.2 CULTIVO DE TOMATE.....	2
1.2.1 Enfermedades que afectan la producción de tomate.....	3
1.2.2 Ciclo de vida de <i>Fusarium</i> sp.....	4
1.2.3 Mecanismo de infección de <i>F. oxysporum</i> .....	5
1.2.3.1 Control biológico de enfermedades en plantas.....	7
1.3 ¿QUÉ SON LAS PGPR? .....	7
1.4 MECANISMOS DIRECTOS O DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO .....	8
1.4.1 Solubilización de fosfatos .....	9
1.4.2 Fijación de N <sub>2</sub> .....	10
1.4.3 Producción de fitohormonas.....	10
1.5 MECANISMOS INDIRECTOS O DE PROTECCIÓN EN CONTRA DE AGENTES FITOPATÓGENOS .....	12
1.5.1 Producción de metabolitos secundarios.....	12
1.5.2 Producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) .....	13
1.5.3 Producción de sideróforos.....	13
1.6 CONSORCIOS BACTERIANOS.....	14
1.7 BIOINOCULANTES A BASE DE PGPR .....	15
1.7.1 Encapsulación de PGPR .....	16
<b>2 HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>4 METODOLOGÍA.....</b>	<b>20</b>
4.1 AISLAMIENTO DE PGPR.....	20
4.1.1 Colección de PGPR del Laboratorio de Biología Molecular (LAMIMO) .....	20



4.1.2	Obtención de PGPR fijadora de N <sub>2</sub> de vida libre .....	20
4.1.3	Aislamiento de PGPR simbiótica del nódulo de frijol .....	20
4.2	DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE ACCIÓN DE PGPR .....	21
4.2.1	Solubilización de fosfatos .....	21
4.2.2	Solubilización de potasio .....	21
4.2.3	Producción de ácido Indol acético .....	22
4.2.4	Secreción de quitinasas .....	22
4.2.5	Producción de sideróforos .....	22
4.2.6	Producción de ácido cianhídrico (HCN) .....	23
4.2.7	Degradación de almidón .....	23
4.2.8	Degradación de celulosa .....	23
4.2.9	Bacterias productoras de proteasas .....	24
4.2.10	Producción de enzimas hemolíticas .....	24
4.2.11	Producción de lipasas .....	24
4.3	CINETICA DE CRECIMIENTO DE LAS PGPR .....	24
4.4	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PGPR .....	25
4.4.1	Crecimiento de las PGPR para extracción de DNA .....	25
4.4.2	Molienda con N <sub>2</sub> líquido de paquete celular .....	25
4.4.3	Extracción de DNA .....	25
4.4.4	Amplificación de la región 16s del rDNA ribosomal (rDNA) .....	26
4.4.5	Secuenciación y análisis bio-informático .....	26
4.5	PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD ENTRE PGPR: FORMACIÓN DE CONSORCIOS .....	27
4.5.1	Método de Kirby Bauer .....	27
4.5.2	Prueba de antibiosis .....	28
4.6	OBTENCIÓN DE LA BIO-FORMULACIÓN DE PGPR .....	28
4.7	PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS .....	28
4.8	CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LOS CONSORCIOS DE PGPR EN CONTRA DE <i>F. oxysporum</i> .....	29
4.8.1	Prueba de antibiosis .....	29
4.8.2	Ensayo de doble cultivo .....	29
4.8.3	Efecto de la producción de los COVs en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> .....	30
4.8.4	Efecto del extracto libre de células de la bio-formulación de PGPR sobre la producción de biomasa de <i>F. oxysporum</i> .....	31

4.8.5	Extracción de metabolitos secundarios secretados por la bio-formulación al medio de cultivo.....	32
4.8.5.1	Evaluación del efecto de los metabolitos producidos por las bio-formulaciones en la germinación de conidios de <i>F. oxysporum</i> .....	33
4.8.5.2	Tinción de los conidios expuestos a metabolitos secundarios con azul de tripano.....	34
4.9	EFFECTO DE LA BIO-FORMULACIÓN EN <i>Trichoderma</i> sp.....	35
4.9.1	Cultivo de cepas <i>Trichoderma</i> sp y obtención de esporas. ....	35
4.9.2	Prueba de antibiosis.....	35
4.9.3	Efecto de la producción de los COVs en el crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp... ..	35
4.10	MANEJO DEL CULTIVO DE TOMATE ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	35
4.10.1	Obtención de plántula de tomate.....	35
4.10.2	Desarrollo vegetativo del cultivo de tomate.....	36
4.10.3	Infección del cultivo de tomate con <i>F. oxysporum</i> .....	36
4.10.3.1	Obtención y conteo de conidia de <i>F. oxysporum</i> .....	36
4.10.3.2	Infección del cultivo de tomate con conidia de <i>F. oxysporum</i> .....	36
4.11	ENCAPSULACIÓN, ESTABILIDAD Y LIBERACIÓN DE LAS DE PGPR.....	37
4.11.1	Encapsulación de PGPR.....	37
4.11.2	Efecto de la vida de anaquel en la liberación de las PGPR encapsuladas ....	38
4.11.3	Liberación de las de PGPR encapsuladas en una matriz sólida a base de: peat moss-agrolita y suelo arcilloso.....	39
4.12	EFFECTO DEL CONSORCIO DE PGPR ENCAPSULADO EN LA PLÁNTULA DE TOMATE.....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
5.1	Obtención de las PGPR de estudio.....	40
5.2	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PGPR.....	41
5.3	ANÁLISIS DEL PERFIL BIOQUÍMICO QUE CORRESPONDE A BACTERIAS PGPR.....	47
5.4	CINETICA DE CRECIMIENTO DE LAS PGPR.....	50
5.5	PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD ENTRE PGPR: FORMACIÓN DE CONSORCIOS (BIO-FORMULACIÓN).....	52
5.6	PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS.....	55

5.7	CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LA BIO-FORMULACIÓN DE PGPR EN CONTRA DE <i>F. oxysporum</i> .....	56
5.7.1	Antibiosis y cultivo dual .....	56
5.7.2	Compuestos orgánicos volátiles (COVs).....	59
5.7.3	Efecto del extracto libre de células (ELC) en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> .....	60
5.7.4	Evaluación de los metabolitos producidos por la bio-formulación en la germinación de conidios de <i>F. oxysporum</i> .....	62
5.8	EFFECTO DE LA BIO-FORMULACIÓN EN CONTRA DE <i>Trichoderma</i> sp.....	64
5.9	MANEJO DEL CULTIVO DE TOMATE ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	67
5.9.1	Efecto promotor del crecimiento de la bio-formulacion en el cultivo de tomate.....	68
5.9.2	Manejo de la marchitez vascular en cultivo de tomate .....	74
5.10	ENCAPSULACIÓN, ESTABILIDAD Y LIBERACIÓN DE LAS DE PGPR .....	80
5.10.1	Encapsulación de PGPR .....	80
5.10.2	EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA VIABILIDAD DE LAS PGPR ENCAPSULADAS A DIFERENTES TEMPERATURA Y TIEMPO .....	81
5.10.3	Liberación de las PGPR en una matriz solida (mezcla de sustrato y suelo arcilloso).....	84
5.11	ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA PLÁNTULA DE TOMATE POR EL EFECTO DE LA LIBREACIÓN DE LAS PGPR ENCAPSULADAS.....	86
5.11.1	Efecto de las PGPR encapsuladas en el desarrollo de la plántula de tomate.....	87
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>102</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Mapa geográfico de México donde se representa a los estados con mayor producción y exportación de tomate en 2023.....	3
Figura 2. Ciclo de infección de <i>F. oxysporum</i> .....	6
Figura 3. Representación gráfica de los mecanismos de acción que ejecutan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). ....	9
Figura 4. Esquema hormonal en el ciclo fenológico del cultivo de tomate .....	12
Figura 5. Secciones de placa para el ensayo dual.....	30
Figura 6. Secciones de placa para el ensayo de los compuestos volátiles .....	31
Figura 7. Distribución de los metabolitos secundarios extraídos de los consorcios bacterianos aplicados a conidios de <i>F. oxysporum</i> .....	34
Figura 8. Relación filogenética entre la cepa 712 y <i>Achromobacter marplatensis</i> (KC790296).....	43
Figura 9. Relación filogenética entre la cepa 728A y <i>Bacillus thuringiensis</i> (KC692184).....	44
Figura 10. Relación filogenética entre la cepa 729A y <i>Chryseobacterium culicis</i> (MZ636644).....	44
Figura 11. Relación filogenética entre la cepa 1290 y <i>Pantoea ananatis</i> (DQ195525).....	45
Figura 12. Relación filogenética entre la cepa 1218 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> (MZ389289).....	45
Figura 13. Relación filogenética entre la cepa 1286, 1288, 1193, y 1217 y <i>Pseudomonas mediterranea</i> (MN712327), <i>Pseudomonas putida</i> (MF462927).....	46
Figura 14. Relación filogenética entre la cepa 726a <i>Enterobacter hormaechei</i> (AJ508302).....	46

Figura 15. Pruebas bioquímicas para la identificación de mecanismos de acción de las PGPR.....	49
Figura 16. Diagrama de Venn para la agrupación de las actividades metabólicas de las PGPR.....	49
Figura 17. Diagrama de Venn para la agrupación de las actividades líticas presentes en las PGPR.....	50
Figura 18. Cinética de crecimiento de las PGPR.....	51
Figura 19. Determinación de la compatibilidad entre PGPR por el método de Kirby Bauer.....	54
Figura 20. Esquema gráfico de la conformación de la bio-formulación DM1 y DM2.....	54
Figura 21. Producción de exopolisacáridos por DM1 y DM2.....	56
Figura 22. Prueba de antibiósisis por parte de las bio-formulaciones DM1, DM2 en contra <i>F. oxysporum</i> .....	58
Figura 23. Ensayo del cultivo dual (PGPR- <i>F. oxysporum</i> ).....	59
Figura 24. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por las bio-formulaciones DM1, DM2 en contra <i>F. oxysporum</i> .....	60
Figura 25. Efecto de inhibición del ELC obtenido de la bio-formulación en la producción de biomasa de <i>F. oxysporum</i> .....	61
Figura 26. Actividad antifúngica de los metabolitos producidos por la bio-formulación en conidias de <i>F. oxysporum</i> .....	63
Figura 27. Cambios estructurales en las conidias de <i>F. oxysporum</i> expuestas a los metabolitos extraídos de las bio-formulaciones.....	63
Figura 28. Efecto de la bio-formulación DM1, DM2 en el desarrollo de <i>T. asperellum</i> y <i>T. atroviride</i> .....	65
Figura 29. Efecto de la antibiósisis por parte de la bio-formulación en la esporulación de <i>Trichoderma</i> .....	66

Figura 30. Efecto de los COVs producidos por la bio-formulación en el desarrollo de <i>Trichoderma</i> .....	67
Figura 31. Desarrollo del cultivo de tomate a los 130 días de crecimiento.....	69
Figura 32. Etapa de fructificación en el cultivo de tomate.....	70
Figura 33. Desarrollo del sistema radicular del cultivo de tomate a los 130 días de crecimiento.....	71
Figura 34. Efecto en el desarrollo de la zona radicular y sistema vegetativo del cultivo de tomate por medio del uso de la bio-formulación.....	72
Figura 35. Evaluación de los cambios fisiológicos (floración-fructificación) del cultivo de tomate mediante el uso de la bio-formulación.....	73
Figura 36. Evaluación del efecto protector de la bio-formulación en contra de la marchitez vascular en tomate ocasionada por <i>F. oxysporum</i> .....	75
Figura 37. Efecto de la marchitez vascular en la zona radicular del cultivo de tomate a los 130 días de crecimiento.....	77
Figura 38. Evaluación del desarrollo del cultivo de tomate expuesto a la marchitez vascular donde se evaluó la zona radicular.....	78
Figura 39. Evaluación de los cambios fisiológicos (floración-fructificación) del cultivo de tomate expuesto a la marchitez vascular.....	79
Figura 40. Cápsulas y liberación del consorcio 1288 ( <i>P. mediterranea</i> )-1290 ( <i>P. ananatis</i> ).....	81
Figura 41. Representación gráfica de la vida útil de las PGPR encapsuladas.....	84
Figura 42. Liberación de las PGPR encapsuladas en medio sólido (peat moss-agrolita-vermiculita) y suelo (arcilloso).....	86
Figura 43. Efecto en el desarrollo de la plántula de las PGPR encapsuladas y en cultivo líquido.....	88
Figura 44. Efecto en el desarrollo radicular y del tallo de la plántula de tomate por acción de las PGPR encapsuladas.....	89

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	<b>Agentes causales de las enfermedades más comunes en el cultivo de tomate.....</b>	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b>	<b>Ejemplos de PGPR utilizadas como agentes de biocontrol contra diversos fitopatógenos en cultivo de tomate.....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 3.</b>	<b>Componentes de reacción del ensayo de obtención de biomasa .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 4.</b>	<b>PGPR seleccionadas para el trabajo .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5.</b>	<b>Identificación molecular de las PGPR mediante el análisis de la región 16s RNA.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 6.</b>	<b>Efecto en los tratamientos en el ciclo fenológico del cultivo de tomate. *Experimento realizado en el 2023. ....</b>	<b>70</b>
<b>Tabla 7.</b>	<b>Ciclo fenológico del cultivo de tomate expuesto a la marchitez vascular .....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 8.</b>	<b>Pruebas bioquímicas para caracterización de PGPR.....</b>	<b>102</b>

## **1 ANTECEDENTES**

### **1.1 AGRICULTURA EN MÉXICO**

La agricultura es la encargada de proveer alimentos, materias primas, y mano de obra al sector agroindustrial y de servicios, es por ello por lo que demanda gran cantidad de productos industriales de primera necesidad para la producción agrícola, entre ellos: fertilizantes, herbicidas, plaguicidas, maquinaria, entre otros, y en el aspecto social favorece el arraigo a sus tierras, el apoyo a familias y la conservación de recursos naturales de cierto número de personas en sitios productores.

La superficie agrícola sembrada en México durante el 2023 fue de aproximadamente 20 millones en donde se alcanzó un volumen de 271 millones de toneladas, el cual incrementó 0.9% con respecto de 2021. El aumento en el volumen se determinó por una mayor cosecha de frutas, hortalizas y forrajes. En el primer grupo de cultivos destaca la producción de naranja, plátano, manzana y limón, que en conjunto registraron 11 millones 340 mil toneladas. En el segundo, es relevante el tomate rojo con 3 millones 392 mil toneladas. En el último grupo, la alfalfa registró el aumento más significativo, 35 millones 119 mil toneladas. Los granos presentaron limitaciones productivas, lo cual determinó una cosecha menor comparada con su similar de 2021. La reducción fue de 1.2%. Los cultivos de maíz y frijol presentaron las mayores disminuciones (Expectativas Agroalimentarias 2023).

Otro factor importante que influye en el desarrollo de la agricultura es el calentamiento global, puesto que, en el año 2023, la media nacional de temperatura para el mes de enero fue 16.6 °C, mientras que en el mismo periodo de 2022 fue de 17.1 °C, lo que representa un aumento en la temperatura promedio nacional de 3% para ese mes; febrero 2023 es de 18.0 °C, lo que representa un aumento de 6% (Expectativas Agroalimentarias 2023).

La precipitación media nacional en enero de 2023 fue de 16 mm, la cual representó una disminución de 7% con respecto a enero de 2022, cuando se observó una media nacional de 17 mm; para febrero de 2023 se registró una media nacional de 13.4 mm, lo que representó una disminución de 18.3% con respecto al mismo



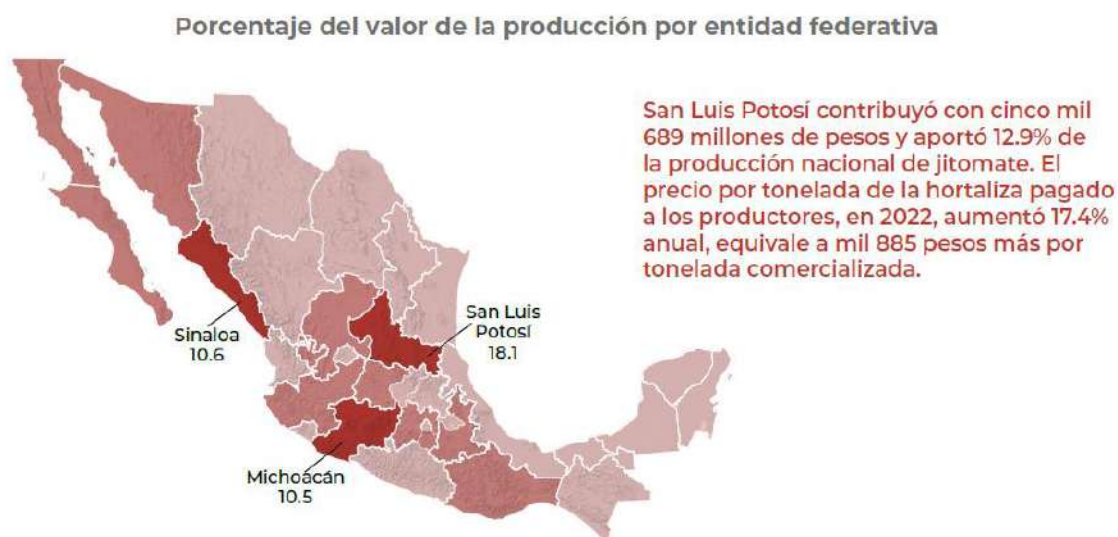
mes del año anterior, cuando se registró una media de 16.4 mm (Expectativas Agroalimentarias 2023).

## **1.2 CULTIVO DE TOMATE**

La plantación de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos hortícolas que se producen en condiciones de agricultura protegida en el estado de Querétaro con mayor interés en el ámbito de la exportación, la producción en invernadero representa gran atractivo, especialmente para aquellos cultivos destinados preferentemente a los mercados internacionales que exigen calidad y pagan precios más elevados.

La tierra de cultivo en México para el año 2023 fue de aproximadamente 48 mil 42 hectáreas y se obtuvo una producción de 3 millones 324 mil toneladas, 1.4% menos respecto del año anterior. El estado de Querétaro es el undécimo productor de tomate rojo en México; su producción le permite dominar el arancel de 17.5% (Fig. 1). El SIAP dio a conocer que actualmente este cultivo se cosecha en Querétaro en 289 hectáreas (Ha), 167 en invernadero y 122 a campo abierto; los municipios de Colón con 90, Arroyo Seco con 59 y Pedro Escobedo con 55, son los tres líderes en producción, principalmente con la variedad tomate Saladet, que por su calidad se contempla para exportación, consumo nacional y local (Agroalimentario, 2022.).

La temperatura óptima en el desarrollo para el cultivo del tomate se encuentra entre 20-30 °C durante el día y entre 14-17 °C durante la noche; temperaturas superiores a los 35 °C afectan la fructificación por mal desarrollo de óvulos en la etapa de floración. Temperaturas superiores a 30 °C y menores a 12 °C ocasionan que la fecundación sea incompleta. La maduración del fruto es influenciada por la temperatura en lo que se refiere a precocidad y color del fruto, de manera que temperaturas superiores a los 30 °C originan coloraciones amarillentas en la mayor parte de la superficial del fruto (Carmona et al., 2020).



**Figura 1.** Mapa geográfico de México donde se representa a los estados con mayor producción y exportación de tomate en 2023 (Agroalimentario, 2023).

### 1.2.1 Enfermedades que afectan la producción de tomate

El cultivo de tomate se ve mayormente afectada por varios de fitopatógenos; los principales agentes causales son bacterias, hongos, virus. Las enfermedades que no son prevenidas o tratadas a tiempo llegan a originar daños severos al cultivo y en ocasiones se tiene la pérdida total del cultivo.

La agricultura es, sin duda, el sector más vulnerable de los países menos desarrollados y desempeña un papel fundamental para garantizar la seguridad alimentaria y el crecimiento económico. Se estima que los hongos son la principal amenaza para este cultivo debido a su requerimiento hídrico ocasionando aproximadamente el 65% de las pérdidas del cultivo, siendo los más comunes aquellos fitopatógenos que pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Sclerotinia* como se aprecia en la Tabla 1 propuesta por Azeem en el año 2022. Estos hongos son responsables de causar una pérdida considerable en todo el mundo. Las enfermedades de las plantas deben controlarse para mantener la cantidad y calidad de los alimentos producidos por los agricultores en todo el mundo (Azeem et al., 2022).

**Tabla 1.** Agentes causales de las enfermedades más comunes en el cultivo de tomate (Azeem et al., 2022).

Enfermedad	Nombre común	Agente causal
Bacteriana	Cáncer bacteriano	<i>Clavibacter michiganensis</i>
	Mancha bacteriana	<i>Xantomonas campestris</i>
	Mancha negra del tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>
Fúngica	Antracnosis	<i>Colletotrichum sp.</i>
	Cáncer del tallo	<i>Alternaria sp</i>
	Cenicilla	<i>Leveillula taurica</i> <i>Erycipse orontii</i> <i>Oidium lycopersicum</i>
	Damping off	<i>Phytophthora sp</i> <i>Pythium sp.</i> <i>Fusarium sp.</i>
	Marchitez vascular	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Moho gris	<i>Botrytis cinerea</i>
	Tizon temprano	<i>Alternaria solani</i>

### 1.2.2 Ciclo de vida de *Fusarium sp.*

El hongo fitopatógeno *F. oxysporum* es el agente causal de la marchitez vascular del tomate, el cual origina pérdidas superiores al 60% en este cultivo. En condiciones de invernadero, los síntomas llegan a ser evidentes en las etapas de floración y llenado de frutos; el desarrollo de la enfermedad se ve favorecida por temperaturas superiores a los 30 °C.

*Fusarium sp.* se propaga principalmente a través del suelo donde sus hifas crecen y esporas se diseminan, los hongos fitopatógenos se clasifican, según su interacción con las planta hospedera y sus mecanismos de nutrición, en necrótrofos los cuales degradan los tejidos vegetales y adquieren sus nutrientes de las células muertas, estos hongos son muy eficaces para matar plantas mediante la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE) y moléculas fitotóxicas, los biotróficos necesitan células vegetales para sobrevivir y completar su ciclo vital por tal motivo han desarrollado una notable especialización en estructuras de infección para invadir la planta y eludir o controlar el sistema inmunitario del huésped, por último los hemibiotróficos

combinan ambas estrategias de infección, comenzando con una fase biotrófica y, cuando cambian las condiciones se activa la fase necrótrofa a medida que degradan las células, hoy en día *F. oxysporum* se ha catalogado como necrótrofo (Gutiérrez-Sánchez et al., 2023).

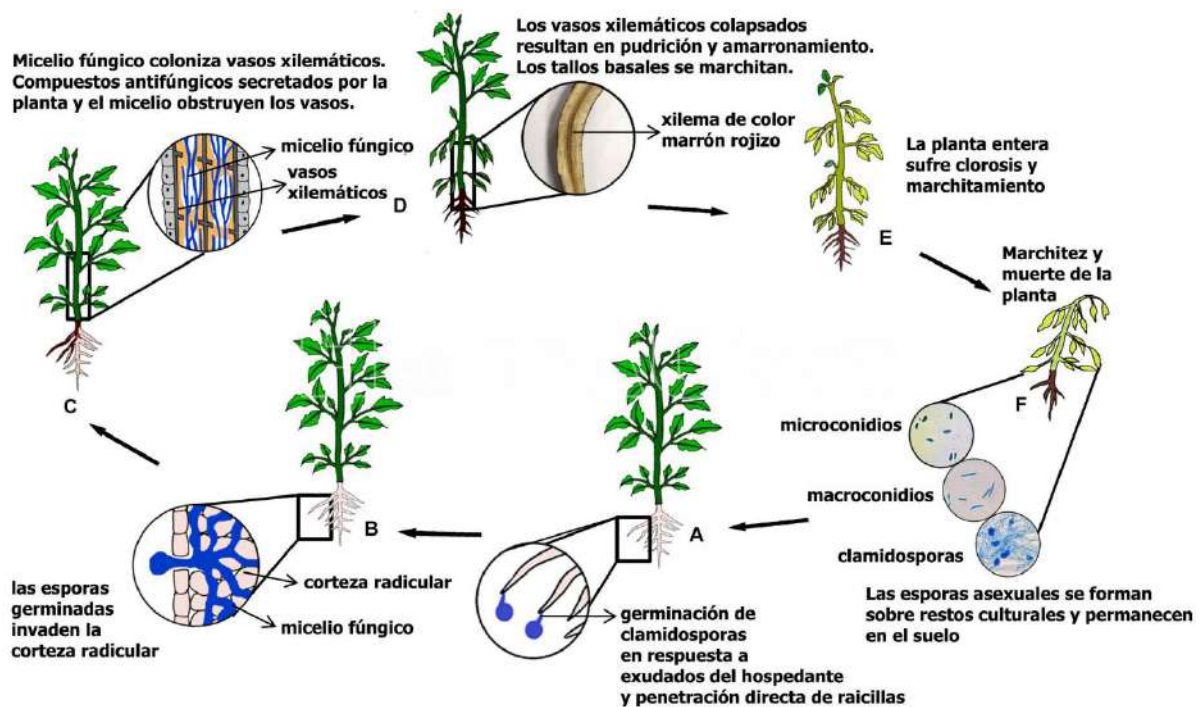
Las especies de *Fusarium* tienen varias características morfológicas que ayudan a su identificación y una de las más destacadas es el desarrollo de macro y micro conidios de diversas formas y tamaños, que son esporas asexuales. Otras estructuras que forman se denominan clamidosporas, que garantizan la supervivencia del patógeno en el suelo y en la planta durante muchos años, lo que dificulta enormemente la gestión y el control de las enfermedades causadas por las diversas especies de *Fusarium*. La enfermedad causada por *F. oxysporum* y *F. solani* es una complicación grave que reduce el crecimiento, el rendimiento del fruto y la calidad, amenazando la producción. Los síntomas comunes de la marchitez por *Fusarium* son decoloración y enrollamiento hacia el interior de las hojas (Hami et al., 2021).

### **1.2.3 Mecanismo de infección de *F. oxysporum***

*Fusarium oxysporum* libera un arsenal de proteínas (degradadoras de la pared celular, efectores, factores inductores de necrosis, etc.), metabolitos y toxinas (ácido fusárico y tricotecenos) que modulan la fisiología de la planta huésped para debilitar su respuesta inmunitaria y permitir su proliferación. Las plantas infectadas experimentan un taponamiento de los vasos (xilema-floema) debido a la oclusión de los vasos xilemáticos, acompañada de daños en la pared celular que provocan fugas en la membrana, un desequilibrio hídrico, que finalmente conduce al estrés hídrico y el marchitamiento (Fernandes & Ghag, 2022; Lephatsi et al., 2022). El estrés hídrico inducido reduce la presión de turgencia de la hoja y deteriora el flujo de electrones del citocromo QA al QB afectando al aparato fotosintético, especialmente a los fotosistemas, las alteraciones en el fotosistema II (PSII) reflejan una disminución de la capacidad de recolección de luz, separaciones de carga en los centros de reacción del PSII y supresión del transporte de electrones en el lado aceptor del PSI. A su vez una infección ocasionada por *Fusarium* provoca una disminución del contenido de

clorofila y carotenoides, la actividad del cloroplasto, estas afectaciones interfieren con la cadena de transporte de electrones, la actividad ATP sintetasa, la fijación de CO<sub>2</sub>, los niveles fotosintéticos, el cierre estomático y la reducción de la actividad de la Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) en el cultivo tomate (Fernandes & Ghag, 2022).

El proceso de infección comienza cuando las hifas del hongo crecen y forman una red alrededor de los pelos radicales, ubicando los puntos de penetración en la unión de las células epidermales, atraviesa el córtex y avanza hasta el sistema vascular (xilema), el cual usa para penetrar la planta con la proliferación de sus hifas y microconidias (Fig. 2). Estas estructuras dentro de los vasos del xilema, sumadas a secreciones de polisacáridos y enzimas pectinolíticas reducen o bloquean el flujo de agua y nutrientes en la planta (Carmona et al., 2020).



**Figura 2.** Ciclo de infección de *F. oxysporum* tomado de Dirección General De Sanidad Vegetal Centro Nacional De Referencia Fitosanitaria (Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Micología, n.d.)

### **1.2.3.1 Control biológico de enfermedades en plantas**

El uso de microorganismos beneficiosos para el control biológico de enfermedades y plagas de las plantas se ha convertido en una alternativa viable a los plaguicidas químicos en la agricultura. De preferencia se sugiere usar control biológico contra hongos y bacterias fitopatógenas, empleando organismos benéficos como lo son las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) siendo *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* un ejemplo de este tipo de PGPR.

La capacidad de los microorganismos para controlar plagas y enfermedades está bien documentada, pero la variabilidad de los resultados que a menudo se registran en condiciones de campo es uno de los principales desafíos para una adopción más amplia en la agricultura. El biocontrol se centra en el uso de microorganismos individuales o en conjunto cuya funcionalidad y la persistencia del inoculante están fuertemente influenciadas por sus complejas interacciones dentro del microbiota del suelo y el medio ambiente (Minchev et al., 2021).

### **1.3 ¿QUÉ SON LAS PGPR?**

Las PGPR son un grupo muy importante de microorganismos, que colonizan principalmente las raíces de las plantas (rizosfera) y su importancia se debe principalmente a su capacidad para promover el crecimiento de las plantas de diversas maneras como biofertilizantes, agentes de control biológico y bioestimuladores. Los organismos que no colonizan simbióticamente la rizosfera de una planta se conocen como PGPR extracelulares, mientras que los que forman una estructura nodular y establecen una relación simbiótica se conocen como PGPR intracelulares, de igual manera podemos encontrar a las bacterias endófitas las cuales otorgan beneficios para las plantas que prosperan en su interior y pueden mejorar su desarrollo en condiciones normales y en estrés debido a factores bióticos o abióticos, estas llegan a beneficiar directamente a las plantas huésped mejorando la absorción de nutrientes y regulando la producción de las fitohormonas relacionadas con el crecimiento y el estrés. Por otro lado, mejoran la salud de las plantas contrarrestando a plagas y patógenos con antibióticos, enzimas hidrolíticas, limitación de nutrientes y activación del mecanismo de defensa de las plantas

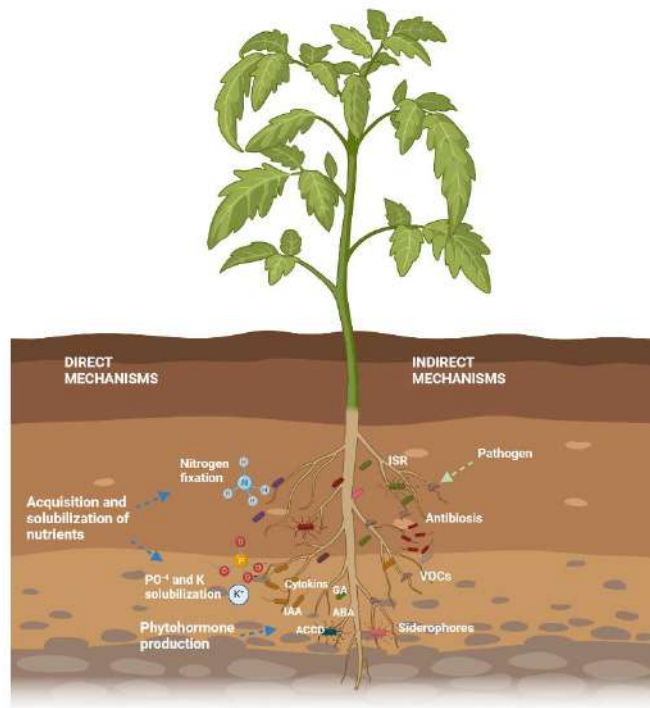
denominado resistencia sistémica inducida (ISR) el cual se base en la señalización sistémica a larga distancia para proporcionar protección a los tejidos distales, induciendo respuestas inmunitarias rápidas y fuertes contra la colonización de patógenos. Para conferir estos beneficios, las PGPR endófitas tienen que colonizar la endosfera de la planta después de colonizar la rizosfera. La colonización se consigue mediante una batería de rasgos que implican motilidad, adhesión, degradación de polímeros vegetales y evasión de las defensas de la planta (Afzal et al., 2019; Ghoghari et al., 2022).

En los últimos años las PGPR han adquirido una gran importancia como alternativa al uso de fertilizantes inorgánicos. Se conoce que los fertilizantes a base de NPK (nitrógeno, fósforo y potasio) desempeñan un papel muy importante en la mejora del crecimiento de las plantas, lo que se ha traducido en un mayor rendimiento de los cultivos. Aunque tienen una gran importancia agroeconómica, su uso ha afectado de muchas maneras al medio ambiente (Roy et al., 2022).

El interés por las PGPR es consecuencia de su capacidad para influir efectivamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas, el modo como promueve el crecimiento se divide en mecanismos directos e indirectos. El efecto se refleja en el aumento de biomasa vegetal, contenido de nutrientes de la planta (nitrógeno, fósforo, potasio y hierro), la longitud de las raíces y/o de los brotes, incremento en la tasa fotosintética, la protección a las plantas contra diversos fitopatógenos (Reed & Glick, 2023; Wilson & Roberts, 2012).

#### **1.4 MECANISMOS DIRECTOS O DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO**

Los mecanismos directos incluyen la producción de fitohormonas (ácido indol acético, citoquininas, giberelinas, entre otras), la fijación de nitrógeno, la adquisición de minerales como lo es la solubilización de fosfatos, zinc y potasio representan sus efectos más importantes cuando se aplican para la fertilización biológica, la formación de biofilms, la producción de sideróforos, y la resistencia de las plantas al estrés abiótico (Reed & Glick, 2023) (Fig. 3).



**Figura 3.** Representación gráfica de los mecanismos de acción que ejecutan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

#### 1.4.1 Solubilización de fosfatos

Un elemento fundamental del metabolismo vegetal es el fósforo (P) debido a que es un componente estructural del ADN y ARN, y en los fosfolípidos. Aunque este componente es abundante en el suelo, permanece en forma no disponible por lo que no puede ser absorbido por las plantas en la mayoría de las condiciones del suelo. La cantidad de formas disponibles para plantas es generalmente baja porque la mayor parte del fósforo presente en el suelo se encuentra en formas insolubles, mientras que las plantas lo absorben sólo en dos formas solubles, monobásica ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y di básica ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Rani et al., 2022).

La solubilización del fósforo inorgánico se produce a través de la secreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, tales como ácido acético, cítrico, glucónico, láctico, málico, succínico, tartárico, 2-cetoglucónico y oxálico estos llegan a actuar como quelantes de los cationes divalentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que acompañan la liberación de fosfatos de compuestos fosfatados insolubles, a su vez también pueden formar



complejos solubles con iones metálicos asociados al fósforo insoluble, liberando así las formas solubles de éste; otro mecanismo de solubilización implica la producción de enzimas de hidrólisis de ésteres fosfóricos como la C-P liasa, la D- $\alpha$ -glicerofosfatasa, la fosfatasa, fosfonoacetato hidrolasa y fitasa. Entre las bacterias con capacidad para solubilizar fosfatos se encuentran *Pseudomonas putida*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans* y *Rhizobium leguminosarum* (Rani et al., 2022).

#### **1.4.2 Fijación de N<sub>2</sub>**

La presencia de nitrógeno en el suelo suele llegar a ser elevada (<80%), sin embargo, la mayor parte de este nitrógeno es insoluble y, por lo tanto, no está disponible para las plantas. El N<sub>2</sub> atmosférico es convertido en formas disponibles para las plantas mediante la fijación biológica del N<sub>2</sub> (FBN), en la que los microorganismos fijadores de nitrógeno tienen el potencial de transformar el N<sub>2</sub> en amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno se clasifican en 2 grupos: 1) Bacterias simbióticas fijadoras que establecen una simbiosis con leguminosas, por ejemplo, *Rhizobium*. 2) bacterias no simbióticas (de vida libre, asociativas y endófitas) este tipo de bacterias no penetran en el tejido vegetal, pero viven lo suficientemente cerca de la raíz como para permitir que la planta absorba el exceso de nitrógeno que no es consumido por su propio metabolismo de la bacteria como *Azospirillum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Beijerinckia* sp., *Azoarcus* sp., *Azotobacter* sp., *Burkholderia unamae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., El proceso de fijación de N<sub>2</sub> es llevado a cabo por la enzima nitrogenasa, cuyos genes (nif) se encuentran en los dos grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno (Morales-García et al., 2019).

#### **1.4.3 Producción de fitohormonas**

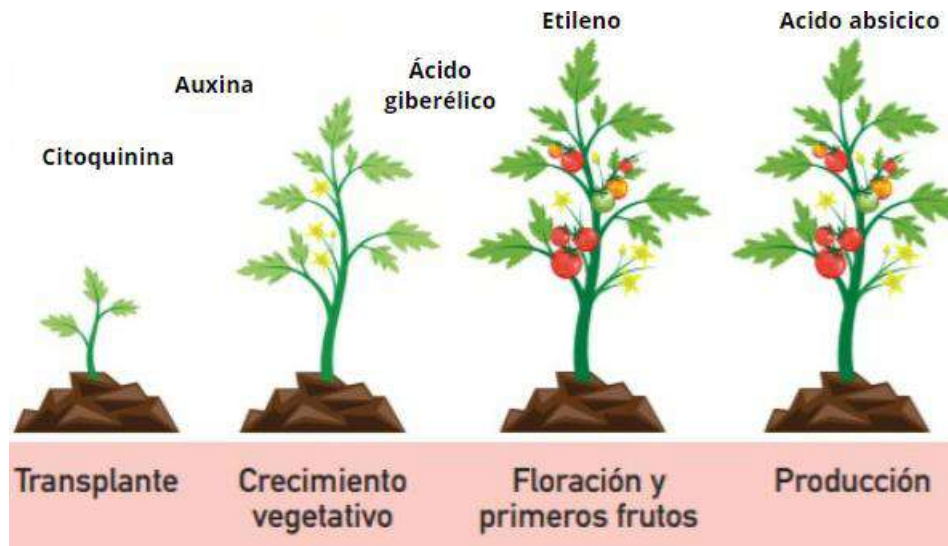
Las auxinas, las citoquininas, las giberelinas y los brasinoesteroides promueven el crecimiento de las plantas, mientras que otras fitohormonas como el etileno, el ácido abscísico y los jasmonatos controlan las actividades de crecimiento

a través de mecanismos de defensa frente a procesos inhibitorios del crecimiento, como el letargo, la senescencia, la abscisión (Fig. 4).

El ácido indol-3-acético (IAA) es una auxina sintetizada por muchas PGPR, ésta auma la tasa de desarrollo del xilema y de la raíz principal; inicia la formación de raíces laterales; controla los procesos de crecimiento vegetativo; las respuestas a la luz; y promueve la división, extensión y diferenciación de las células vegetales. Participa en la resistencia al estrés, la formación de pigmentos y la fotosíntesis. Algunas PGPR capaces de inducir la producción de IAA son: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella variicola* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Flores-Gallegos & Nava-Reyna, 2018; Singh et al., 2019).

El etileno es una fitohormona que a altas concentraciones induce la abscisión de las hojas, la senescencia de las hojas, la clorosis y el marchitamiento de las flores, algunas PGPR poseen la enzima ACC deaminasa, la cual se encarga de degradar el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo (ACC) (precursor del etileno) en amoniaco y  $\alpha$ -cetobutirato, por lo que protegen a las plantas y facilitan su crecimiento y desarrollo reduciendo los niveles de etileno (Flores-Gallegos & Nava-Reyna, 2018).

La citoquinina es otra fitohormona que influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como la ramificación, la producción de clorofila, el aumento de la división celular, el retraso de la senescencia, la formación de la vasculatura embrionaria, desarrollo de hojas, germinación de las semillas y el crecimiento de las raíces. Las PGPR secretan niveles más bajos de citoquininas en comparación con los patógenos de plantas, de modo que el efecto de las PGPR en el crecimiento de las plantas es estimulante, mientras que el efecto de las citoquininas de los patógenos es inhibitorio (Singh et al., 2019). La adenilato isopentenil transferasas (IPT) es otra enzima importante en el metabolismo de fitohormonas, participando en la biosíntesis de citoquininas.



**Figura 4.** Esquema hormonal en el ciclo fenológico del cultivo de tomate

### 1.5 MECANISMOS INDIRECTOS O DE PROTECCIÓN EN CONTRA DE AGENTES FITOPATÓGENOS

Los mecanismos indirectos incluyen la restricción de patógenos mediante la producción de enzimas (celulasa, quitinasa, glucanasa), compuestos orgánicos volátiles (COVs), producción de metabolitos secundarios y así como la competencia por el espacio y los nutrientes (Fig. 3). Las PGPR más conocidas pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, que pueden promover el crecimiento de las plantas e inhibir los hongos patógenos. Además, una amplia gama de bacterias como *Agrobacterium* sp., *Burkholderia* sp., *Azotobacter* sp., *Frankia* sp., *Azospirillum* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Serratia* sp. y *Thiobacillus* sp. también se consideran por sus mecanismos de defensa y promoción de crecimiento (Azeem et al., 2022).

#### 1.5.1 Producción de metabolitos secundarios

Las PGPR producen una gran gama de metabolitos secundarios que son secretados localmente o cerca de la superficie de la planta, es importante mencionar que estas moléculas se sintetizan durante la fase estacionaria de crecimiento, son biodegradables y no se necesitan en cantidades elevadas, a diferencia de los agroquímicos que son recalcitrantes a la biodegradación y se aplican en grandes cantidades a los cultivos agrícolas para mantener la salud de las plantas (Fig. 4).

Los mecanismos de acción de estos compuestos en los fitopatógenos incluyen: la inhibición de síntesis o destrucción de la pared celular, la desestabilización estructural de la membrana celular, la inhibición de la traducción. Algunas PGPR pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas* y *Serratia* producen varios metabolitos secundarios como la pioluteorina, la pirrolnitrina, el ácido fenazina-1-carboxílico, el DAPG (2,4-diacetilcloroglucinol) y antibióticos biosurfactantes, a los cuales se les conoce como el principal mecanismo de biocontrol de fitopatógenos transmitidos por el suelo (Flores-Gallegos & Nava-Reyna, 2018; Rani et al., 2022). El ácido cianhídrico (HCN) es un metabolito secundario producido por muchas rizobacterias, el cual posee la particularidad de inhibir la cadena de transporte de electrones y el suministro de energía a las células, algunas de PGPR que sintetizan este compuesto pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*.

#### **1.5.2 Producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs)**

Los COVs son moléculas pequeñas producidas por bacterias, identificadas como moléculas de señalización que funcionan como atrayentes o repelentes químicos. Los COVs interactúan con las plantas promoviendo el crecimiento de estas induciendo el ISR, suprimiendo fitopatógenos, estimulando la fotosíntesis y modulando la señalización fitohormonal. Otra función propuesta para los COVs es aumentar la resistencia al estrés abiótico de las plantas bajo condiciones de salinidad, sequía y metales pesados.

#### **1.5.3 Producción de sideróforos**

La mayor parte del hierro ( $Fe^{3+}$ ) presente en el suelo no está disponible para ser asimilado tanto por las plantas como por los microorganismos. Algunos microorganismos han desarrollado la capacidad de producción de sideróforos, los cuales pueden llegar a ser péptidos de bajo peso molecular o metabolitos secundarios (ácidos orgánicos) con alta afinidad para quelar hierro, éstos deben de formar un complejo sideróforo-férrico y se suelen clasificar en tres categorías: fenolatos, hidroxamatos y carboxilatos. Las PGPR con capacidad de producir sideróforos adquieren ventajas competitivas en la colonización de la raíz,

competencia por el nicho ecológico e inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por la baja disposición de  $\text{Fe}^{3+}$  (Rani et al., 2022).

## 1.6 CONSORCIOS BACTERIANOS

El diseño de consorcios microbianos para mejorar la fiabilidad de las prácticas actuales de control biológico es actualmente una tendencia importante en la biotecnología agrícola, en el contexto global y sostenible, el uso de consorcios se está explotando comercialmente.

La aplicación de consorcios microbianos se enfoca en albergar diversas combinaciones de microorganismos con diferentes características de PGPR, las cuales establecen un sistema robusto favoreciendo de manera dual el crecimiento de las plantas y el biocontrol de patógenos. Los consorcios microbianos también pueden comprender cepas que muestren el mismo modo de acción, pero toleren diferentes condiciones ambientales o que muestren interacciones dependientes del genotipo de planta (Compant et al., 2019).

Un punto importante para considerar es que se ha observado, que en algunos consorcios no se ha robustecido el sistema PGPR en comparación con los inoculantes individuales, lo que indica que es necesaria una selección inteligente y basada en el conocimiento de las cepas que se involucrarán en la formación del consorcio (Ghoghari et al., 2022).

Es relevante considerar la procedencia de un consorcio o de un miembro del consorcio para hacer coincidir las condiciones ambientales de un candidato a PGPR con las condiciones de aplicación, aumentando así el éxito del consorcio (Ghoghari et al., 2022; Minchev et al., 2021).

En general, las PGPR que se han utilizado para el desarrollo de consorcios son aquellas que pertenecen a los géneros de: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum* estos son ejemplos mayormente estudiados de interacciones positivas planta-microorganismo que mejoran la disponibilidad de nutrientes en el suelo, la absorción y asimilación de nutrientes por parte de la planta.

**Tabla 2.** Ejemplos de PGPR utilizadas como agentes de biocontrol contra diversos fitopatógenos en cultivo de tomate (Saberri Riseh et al., 2023).

Consorcio de PGPR	Agente causal	Cultivo
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Ochrobactrum intermedium</i>	<i>F. oxysporum f.sp. lycopersici</i>	tomate
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> <i>B. siamensis</i>	<i>F. oxysporum f.sp. lycopersici</i> <i>F. oxysporum f. sp. radices-lycopersici</i>	tomate
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>B. subtilis</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	tomate

### 1.7 BIOINOCULANTES A BASE DE PGPR

Los bioinoculantes formulados a base microorganismos benéficos son respetuosos con el medio ambiente, en comparación con la amplia variedad de productos que se utilizan habitualmente para mejorar el potencial del suelo, proporcionar los nutrientes necesarios a la planta huésped y la eliminación de fitopatógenos. El uso prolongado de fertilizantes químicos no es beneficioso para la salud del suelo, puesto que afecta a las comunidades microbianas, y disminuye la fertilidad del suelo. Por esta razón se ha implementado el uso de bioinoculantes a base de PGPR ya que desempeñan una función importante en la mejora de la producción de cultivos y a su vez protegen el suelo de condiciones desfavorables. El manejo de PGPR en forma de bioinoculantes permite sostener con éxito la producción agrícola (Saberri Riseh et al., 2023). Las formulaciones pueden proteger a las bacterias de la lluvia, el pH, la radiación UV, la humedad, la salinidad, las temperaturas hostiles y otros factores ambientales. Para que la tecnología de formulación tenga éxito, es vital evitar la pérdida de las PGPR utilizando una cantidad de inóculo adecuada y seleccionar un portador apropiado. Estas formulaciones sirven de soporte y desempeñan un papel clave en el aumento de la viabilidad bacteriana y la liberación controlada de células y materiales bioactivos (Saberri Riseh et al., 2023).

Las formulaciones microbianas para aplicaciones agrícolas incluyen generalmente los inoculantes en forma líquida o sólida. Una formulación sólida es una preparación en la que el inóculo se mezcla con un soporte sólido en la proporción adecuada. Un portador es un material inerte, utilizado para el transporte de microbios desde el laboratorio al campo (Sahu & Brahma Prakash, 2016), estos materiales son ventajosos porque se ha demostrado que pueden aumentar el suministro de fósforo a la planta, la resistencia a los patógenos transmitidos por el suelo y la degradación biológica de contaminantes orgánicos. Las formulaciones líquidas suelen ser productos acuosos, oleosos o a base de polímeros. Son una formulación que contiene no sólo los microorganismos deseados y sus nutrientes, sino también un protector celular especial y aditivos que promueven la supervivencia celular en el almacenamiento y después de la aplicación a la semilla o el suelo (Sahu & Brahma Prakash, 2016; Vassilev, Vassileva, Martos, Garcia del Moral, et al., 2020a). Las formulaciones actuales se basan en una o varias cepas beneficiosas con un portador adecuado que puede proporcionar estabilización y protección durante el transporte y el almacenamiento (Saberri Riseh et al., 2023).

### **1.7.1 Encapsulación de PGPR**

Entre los materiales naturales, los biopolímeros han despertado gran interés para abrir la puerta a formulaciones eficaces. En el proceso de encapsulación, los microorganismos utilizados se inmovilizan en una matriz de reticulación y se liberan gradualmente durante la degradación del polímero. Los polisacáridos son los biopolímeros más utilizados en la tecnología de encapsulación celular debido a que no interfieren con la supervivencia funcional de las células. La encapsulación basada en biopolímeros otorga una protección a los microorganismos frente a las condiciones ambientales y, por tanto, mejora la vida útil y la liberación de los microorganismos en el suelo. Debido a su accesibilidad y costo algunos de los biopolímeros comúnmente empleados son el almidón, el alginato de sodio, el quitosano, la carboximetilcelulosa y las gomas vegetales (Saberri Riseh et al., 2023).

El alginato de sodio es una materia prima no tóxica, biodegradable y de fácil acceso sin ningún efecto negativo en el crecimiento de las plantas. Dado que las

cápsulas de alginato cálcico están estructuradas como una red suelta con un alto contenido de agua, se ha sugerido que el uso de alginato para la encapsulación da lugar a la formación de perlas distorsionadas. Para evitarlo, se incorporan materiales complementarios durante el proceso de encapsulación como lo son algunos carbohidratos, tales como la sacarosa, la trehalosa o la glucosa que se utilizan ampliamente para preservar a los microorganismos de los cambios en la presión osmótica y pueden contribuir a su conservación y mantenimiento especialmente tras el secado, lo que podría mejorar la resistencia mecánica (Li & Lucchesi, 2018; Morales-García et al., 2019; Saberi Riseh et al., 2023).



## 2 HIPÓTESIS

La aplicación de una bio-formulación a base de PGPR en planta de tomate disminuye la necesidad del uso de fertilizantes y fungicidas debido a su capacidad promotora del crecimiento vegetal y a su efecto antagonista contra *F. oxysporum*.

La encapsulación de PGPR en una matriz de alginato de sodio mantiene la viabilidad en diferentes condiciones de almacenamientos y a su vez promueven el crecimiento de la plántula de tomate.

## 3 OBJETIVOS

### General

Elaborar una bio-formulación a base de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) para evaluar su capacidad promotora de crecimiento en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*), y evaluar el efecto protector contra *F. oxysporum*.

### Específicos

- Elaborar una bio-formulación robusta a base de PGPR considerando los diferentes mecanismos que ejecuta cada bacteria para ejercer su efecto benéfico
- Evaluar la capacidad de la bio-formulación para antagonizar a *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*
- Determinar el efecto benéfico de la bio-formulación en planta de tomate en su desarrollo fisiológico altura de la planta, desarrollo radicular, la floración, la fructificación, y la maduración del fruto
- Evaluar el efecto bio-protector de la bio-formulación contra *F. oxysporum* en el cultivo de tomate
- Determinar las condiciones de encapsulamiento para la ejecución del bioinoculante solido a base de PGPR.

- Determinar la vida de anaquel de las PGPR encapsuladas en alginato de sodio a diferentes condiciones de almacenamiento.
- Analizar el efecto promotor del crecimiento de las PGPR encapsuladas en el desarrollo de la plántula de tomate.

## **4 METODOLOGÍA**

### **4.1 AISLAMIENTO DE PGPR**

#### **4.1.1 Colección de PGPR del Laboratorio de Biología Molecular (LAMIMO)**

Se realizó un muestreo en un huerto de fresa con manejo orgánico en la localidad de La Calera en el municipio de Irapuato, Guanajuato en el 2015. De la zona de la rizósfera se procedió a realizar el aislamiento de bacterias, las cuales se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el ultra congelador hasta posteriores experimentos.

#### **4.1.2 Obtención de PGPR fijadora de $\text{N}_2$ de vida libre**

Se realizó un muestreo de suelo a un cultivo de leguminosas (frijol) tomando solamente el suelo perteneciente a la zona de la rizosfera. En el laboratorio se procedió a pesar 1 g de suelo, se colocó en un tubo cónico de 50 mL con 9 mL de agua destilada estéril, se agitó en vortex por 2 min para tener una mezcla homogénea. De esta solución se tomó 1 mL y se realizaron diluciones decimales con agua destilada estéril. De la última dilución  $10^{-4}$  se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$ , se sembró uniformemente con perlas de vidrio estériles en una placa del medio Nitrogen Free Bacteria (NFB) cuya composición es: ácido málico  $5\text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $0.05\text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.02\text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $0.05\text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0.03\text{ gL}^{-1}$ , 2 mL de azul de bromotimol (95% de etanol y 5% de azul de bromotimol), agar bacteriológico al 2%, Se incubó a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Se tomó una colonia aislada para estriar en una placa fresca de NFB y se incubó a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Una vez que se contó con un cultivo axénico se creció en caldo nutritivo (CN) por 24 h a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación constante (150 rpm), se tomó 1 mL se colocó en un tubo plástico de 1.5 mL con 500  $\mu\text{L}$  de glicerol estéril y 1000  $\mu\text{L}$  de cultivo, se homogeneizó en el vortex, se almacenó en el ultracongelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para experimentos posteriores (Shameem M et al., 2023).

#### **4.1.3 Aislamiento de PGPR simbiótica del nódulo de frijol**

Se partió de nódulos maduros de frijol recolectados en Panindícuaro, Michoacán. Se procedió a lavarlos con jabón comercial, se trataron con hipoclorito de sodio al 2 % por 3 min, se enjuagaron con agua destilada, este proceso se repitió 2 veces. Una vez lavados y sanitizados los nódulos se colocaron en un vaso con agua destilada estéril para lavarlos por última vez. En un mortero se colocaron los

nódulos y se molieron usando una solución de PBS (Phosphate buffer saline, pH 7.4) ( $\text{NaCl}$   $8 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $0.2 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $1.44 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.24 \text{ gL}^{-1}$ ). La pasta obtenida se colocó en un tubo cónico estéril de 50 mL y se llevó a un volumen final de 10 mL con PBS, a partir de esta solución se prepararon diluciones seriadas. De la dilución  $10^{-5}$  se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$ , se colocó en una placa de medio Nitrogen free bacteria (NFB) y se distribuyó de manera homogénea con perlas de vidrio. Se incubó a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Se trabajó para obtener un cultivo axénico, se tomó una colonia aislada para conservar en el ultracongelador a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  como en el punto anterior (Zhao et al., 2017).

## **4.2 DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE ACCIÓN DE PGPR**

### **4.2.1 Solubilización de fosfatos**

El ensayo se realizó en agar medio Pikovskaya (glucosa  $10 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $0.2 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $0.2 \text{ gL}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$   $0.5 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.1 \text{ gL}^{-1}$ , extracto de levadura  $0.5 \text{ gL}^{-1}$ , fosfato tricálcico  $5 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   $0.004 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.008 \text{ gL}^{-1}$ , agar bacteriológico  $20 \text{ gL}^{-1}$ , púrpura de bromocresol  $0.04 \%$ ) pH 6.8. Se creció a las bacterias en CN a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se midió la absorbancia en el espectro Thermo Scientific, y se ajustó la densidad óptica ( $\lambda=600$ :  $\text{DO}_{600}$ ) a 1. En la placa, se inoculó una gota de 20  $\mu\text{L}$  para cada una de las bacterias de forma equidistante, la placa se incubó a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 h (Lu et al., 2021), las placas se fotografiaron, el ensayo se realizó por triplicado.

### **4.2.2 Solubilización de potasio**

Se usó el medio Aleksandrov modificado (glucosa  $5 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $0.5 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{CaCO}_3$   $0.1 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$   $0.06 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$   $2 \text{ gL}^{-1}$ , feldespato  $4 \text{ gL}^{-1}$ )

Se creció a las bacterias en CN a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se midió la absorbancia en el espectro Thermo Scientific, y se ajustó a 1 la  $\text{DO}_{600}$ . En la placa, se inoculó una gota de 20  $\mu\text{L}$  para cada una de las bacterias de forma equidistante, la placa se incubó a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h, las placas se fotografiaron, el ensayo se realizó por triplicado (Etesami et al., 2017).

#### **4.2.3 Producción de ácido Indol acético**

La capacidad para producir IAA por las bacterias de interés se determinó por un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldehído 10 gL<sup>-1</sup>, alcohol amílico o isoamílico 150 mL, ácido clorhídrico 50 mL). Cada aislado seleccionado se cultivó en CN (7.5 mL) adicionado con triptófano (1 gL<sup>-1</sup>) hasta la fase de crecimiento exponencial (DO<sub>600</sub> ≥ 1). A continuación, se colocó la PGPR (1.5 mL) en un tubo de ensayo y se le adicionó 1 mL del reactivo de Kovacs. El desarrollo de un anillo color rojo o rosáceo en la parte superior del tubo indica la producción de IAA. El experimento se realizó por triplicado (Patani et al., 2023).

#### **4.2.4 Secreción de quitinasas**

Se creció a las PGPRs en CN a 28 °C durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se ajustó su DO<sub>600</sub> a 1. La secreción de quitinasas se determinó en medio sintético: NaHPO<sub>4</sub> 6 gL<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 gL<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>Cl 1 gL<sup>-1</sup>, extracto de levadura 0.05 gL<sup>-1</sup>, almidón 1%, quitina coloidal 10 gL<sup>-1</sup>, agar 2%. En una caja Petri, se colocó una gota de 40 µL por cada una de las PGPR de manera equidistante, se incubó a 28 °C por 96 h. Tras el tiempo de incubación, la presencia de un halo de degradación indica una reacción positiva. Para evidenciar el halo de hidrólisis, la placa se tiñó con una solución de rojo Congo (2%) durante 2 min y se lavó con agua destilada dos veces. El experimento se realizó por triplicado (Wang et al., 2023).

#### **4.2.5 Producción de sideróforos**

Para evaluar la producción de sideróforos se utilizó el método Fe-CAS preparado según referencia. Las bacterias de interés en caldo nutritivo a 28 °C durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se ajustó su DO<sub>600</sub> a 1. Se colocó una gota de 20 µL de cada una de las bacterias de manera equidistante, se incubó a 28 °C durante 24 h. La reacción se consideró positiva cuando se observó un halo color naranja rodeando la colonia bacteriana debido a la eliminación de hierro del CAS por el sideróforo (Lu et al., 2021).

#### **4.2.6 Producción de ácido cianhídrico (HCN)**

La síntesis de HCN se identificó utilizando agar LB adicionado con 4.4 gL<sup>-1</sup> de glicina. En la parte superior de la placa se colocó un papel de filtro Whatman N° 1 sumergido en una solución de carbonato de sodio al 12.5% y ácido pícrico al 2.5%, el cual tiene color amarillo. Se estrió cada una de las bacterias de interés de manera individual en una placa y se incubó a 28 °C durante 72 h. El viraje de color del papel filtro a naranja-rojo, se considera una prueba positiva para la producción de HCN. El experimento se realizó por triplicado (Sriwati et al., 2023).

#### **4.2.7 Degradación de almidón**

Para identificar bacterias que hidrolicen el almidón se utilizó el medio compuesto de: almidón 2 gL<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2 gL<sup>-1</sup>, peptona de caseína 2 gL<sup>-1</sup>, NaCl 6 gL<sup>-1</sup>, agar bacteriológico 2%, pH 6.8. Se creció a las PGPR en CN a 28 °C durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se ajustó su DO<sub>600</sub> a 1.0. Se colocó gotas de 20 µL de cada una de las PGPR de manera equidistante en la placa de almidón, se incubó por 72 h a 28 °C.

Posteriormente, cada placa fue cubierta con solución de yodo-lugol 1% (p/v) durante 5 min. Se enjuagó con agua destilada varias veces. Las colonias que presentaron un halo de clarificación a su alrededor indica la hidrólisis del almidón. El experimento se realizó por triplicado (Mehmood et al., 2023).

#### **4.2.8 Degradación de celulosa**

Para determinar la capacidad de las PGPR para la hidrólisis enzimática de la celulosa se preparó un medio mínimo a base de celulosa con la siguiente composición: celulosa 5 gL<sup>-1</sup>, NaNO<sub>3</sub> 1 gL<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 gL<sup>-1</sup>, KCl 1 gL<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0.05 gL<sup>-1</sup>, extracto de levadura 0.5 gL<sup>-1</sup>, glucosa 1 gL<sup>-1</sup>, agar al 2%.

Se creció a las PGPR en CN a 28 °C durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se ajustó su DO<sub>600</sub> a 1.0. Se colocaron gotas de 20 µL de cada una de las PGPR de manera equidistante encima de la placa de celulosa, se incubó por 96 h a 28 °C. La producción de celulasas genera un halo de clarificación alrededor de la bacteria. Se cubrió la placa con Rojo Congo al 2%, se dejó reaccionar por 5 min, se

enjuagó varias veces con agua destilada estéril para observar de mejor manera el halo (González-Ista et al., 2023; Tang et al., 2020).

#### **4.2.9 Bacterias productoras de proteasas**

Se usó gelatina bacteriológica marca BIOXON ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ) la cual se disolvió en agua caliente hasta tener una solución homogénea, se dispensaron 4 mL en tubos de vidrio (15x125) y se esterilizó en autoclave.

Se tomó una colonia con el asa bacteriológica en punta y se inoculó por punción cada una de las PGPR. Se incubó por 72 h a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , pasado este tiempo los tubos se incubaron a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Una reacción positiva licua a la gelatina, lo que hace que se mantenga líquida aún en frío. El experimento se realizó por triplicado (Sriwati et al., 2023).

#### **4.2.10 Producción de enzimas hemolíticas**

Se creció a las PGPR en CN a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se ajustó la  $\text{DO}_{600}$  a 1.0 para cada una de ellas. Se colocó una gota de 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las PGPR de manera equidistante en la placa de agar sangre (sangre de cordero al 5%), se incubó por 24 h a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Un halo de hemólisis observado a contraluz indica una prueba positiva para  $\beta$  hemólisis. Se utilizó *Staphylococcus aureus* como control positivo. El ensayo se realizó por triplicado.

#### **4.2.11 Producción de lipasas**

Se creció a las PGPR en CN a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h con agitación constante (150 rpm), en una placa de Agar-Tween 80: peptona  $1 \text{ gL}^{-1}$ , NaCl  $4 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $1 \text{ gL}^{-1}$ , Tween 80 al 1% se inoculó con una gota de 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las PGPR, las placas se incubaron por 48 h a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , después del tiempo de incubación se espera observar un halo de color gris alrededor de la colonia indicado una reacción positiva. El proceso se realizó por triplicado para cada muestra (Carballo et al., 2016; Ilesanmi et al., 2020).

### **4.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS PGPR**

Se crecieron las bacterias de manera individual en CN por 24 h con agitación constante (150 rpm). Se preparó un volumen de 12 mL para cada una de las PGPR

ajustada a una  $DO_{600} = 0.05$ . Se incubó a 28 °C por un tiempo de 120 h con agitación constante (150 rpm). Se leyó su  $DO_{600}$  a las 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 horas. Para ello se tomó 1 mL de cada una de las muestras, se colocó en un tubo plástico de 1.5 mL, y se leyó la  $DO_{600}$  de cada muestra en celdas de plástico. El proceso se realizó por triplicado para cada muestra. Una vez obtenidos los datos se procedió a realizar el análisis de varianza usando el programa estadístico Minitab18.

#### **4.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PGPR**

##### **4.4.1 Crecimiento de las PGPR para extracción de DNA**

Se crecieron las bacterias de manera individual en 20 mL de CN por 24 h con agitación constante (150 rpm), se centrifugó el cultivo de cada una a 6,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se almacenó en el ultracongelador a -80 °C.

##### **4.4.2 Molienda con N<sub>2</sub> líquido de paquete celular**

Se utilizó mortero y pistilo estéril congelados con nitrógeno líquido, la muestra se molió hasta tener un polvo fino, evitando siempre que la muestra se descongelara. La muestra se recuperó con una espátula metálica estéril en 2 tubos de plástico de 1.5 mL. A cada uno se le colocaron aproximadamente 500 mg de la muestra molida, se almacenaron en el ultracongelador a -80 °C.

##### **4.4.3 Extracción de DNA**

A un tubo con la muestra se le adicionó un volumen de 200 µL de TSNTE (Tritón x-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris pH=8 10 mM, EDTA 1mM), se añadieron perlas de vidrio estériles aproximadamente un volumen de 200 µL. Enseguida se adicionó un volumen de 300 µL de fenol-cloroformo (1:1) y se agitó en vortex por 3-4 min, posteriormente se adicionaron 200 µL de buffer TE (Tris pH=8 10 mM, EDTA 1 mM) y se mezcló por inversión con la mano. Se centrifugó en la microcentrífuga modelo Thermo SCIENTIFIC a 13,000 rpm por 8 min, se recuperó la fase acuosa y se añadió 1 mL de etanol frío al 100%, se mezcló por inversión el tubo y se incubó a -20 °C por 1 h. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 13,000 rpm por 8 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se suspendió en 400 µL de agua grado biología molecular (H<sub>2</sub>O GBM), se agregaron 5 µL de



RNAsa A ( $10 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) y se incubó por 20 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Enseguida se adicionaron  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de una solución de acetato de amonio  $4 \text{ M}$ ,  $1 \text{ mL}$  de etanol al  $100\%$  y se mezcló por inversión, se incubó a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Se centrifugó a  $12,000 \text{ rpm}$  por 8 min y se descartó nuevamente el sobrenadante. Se agregaron  $400 \text{ }\mu\text{L}$  de etanol al  $70\%$ , y se golpeteó el tubo para liberar la pastilla formada, se centrifugó a  $13,000 \text{ rpm}$  por 5 min y se descartó el sobrenadante (Hoffman y Wiston, 1987)

El tubo se colocó invertido sobre una sanita para permitir que la pastilla de DNA se seque ( $10 \text{ min}$ ). Finalmente se adicionó ( $\text{H}_2\text{O}$  GBM) aproximadamente  $80 \text{ }\mu\text{L}$ . Una vez solubilizado el DNA se cuantificó en el Nanodrop 2000 spectrophotometer con  $2 \text{ }\mu\text{L}$  para determinar su concentración y pureza. Se preparó una solución de DNA a  $25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Se realizó una electroforesis con  $5 \text{ }\mu\text{L}$  de muestra de DNA en un gel de agarosa al  $1\%$  teñido con bromuro de etidio ( $50 \text{ }\mu\text{g}$ ) Lotfi & Soleimani, 2022).

#### **4.4.4 Amplificación de la región 16s del rDNA ribosomal (rDNA)**

Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las reportadas por (Silva et al., 2014), se utilizaron los cebadores para un fragmento del gen ribosomal 16S directo 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG); reverso 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) los cuales amplifican un fragmento aproximado de  $\sim 1500\text{pb}$ . La reacción de PCR se realizó a un volumen final de  $25 \text{ }\mu\text{L}$ , la cual consistió en:  $2.50 \text{ }\mu\text{L}$  de buffer DreamTaq,  $0.40 \text{ }\mu\text{L}$  dNTPs ( $10 \text{ mM}$ ),  $0.5 \text{ }\mu\text{L}$  sentido,  $0.5 \text{ }\mu\text{L}$  reverso,  $0.30 \text{ }\mu\text{L}$  Taq DreamTaq,  $5 \text{ }\mu\text{L}$  DNA ( $125 \text{ ng}$ ), y  $10.8 \text{ }\mu\text{L}$  agua GBM. El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s, hibridación a  $62 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s, extensión de  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 80 s, una elongación final de  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min La observación del producto de PCR se realizó como en el punto anterior (Lotfi & Soleimani, 2022).

#### **4.4.5 Secuenciación y análisis bio-informático**

El producto de PCR amplificado se limpió con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit según lo indicado por la casa comercial. El producto de PCR se secuenció en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Genómica para la

Biodiversidad (LANGEBIO) en Irapuato por el método de Sanger. Con las secuencias generadas se realizó la edición en el programa Chromas Lite 2.1.1<sup>®</sup>. Se realizó un análisis tipo Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar la identidad del microorganismo. Posteriormente, se descargaron secuencias en GenBank de especies previamente publicadas que pertenezcan a los géneros identificados. Se realizó un alineamiento de las secuencias usando el programa Mesquite (<https://mesquiteproject.org/>), se descargó la alineación final para realizar el análisis filogenético correspondiente para cada una de las muestras, para esto se empleó el programa MrBayes ([MrBayes | index \(nbisweden.github.io\)](http://MrBayes | index (nbisweden.github.io))) usando el método de máxima verosimilitud con un bootstrap de 1000 réplicas.

#### **4.5 PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD ENTRE PGPR: FORMACIÓN DE CONSORCIOS**

##### **4.5.1 Método de Kirby Bauer**

Para determinar la capacidad de las bacterias de crecer entre sí sin que haya antagonismo entre ellas, se utilizó la prueba del Kirby Bauer. Se crecieron las PGPR de manera individual en CN por 24 h con agitación constante (150 rpm), se ajustó su DO<sub>600</sub> a 0.20 y 1 respectivamente.

Se colocó en una placa de agar Müller Hilton 200 µL de una PGPR de interés ajustada a una DO<sub>600</sub> 0.2, se distribuyó de manera uniforme por toda la placa con un hisopo estéril para obtener crecimiento en forma de un tapete bacteriano. Se colocaron discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro estériles de manera uniforme por toda la placa, a cada uno se le colocaron 15 µL de cada una del resto de las PGPR (ajustadas a DO<sub>600</sub> de 1). Las placas se incubaron a 28 °C por 24 a 48 h. Esta prueba se realizó para cada una de las PGPR. El control se llevó a cabo en una caja de AN, se colocó un disco de papel filtro para cada bacteria y se inoculó cada una de ellas individualmente (15 µL) ajustado a la DO de 1, la placa se incubó a 28 °C durante 24 a 72 h. La ausencia de un halo de inhibición reveló una interacción positiva (compatible), la presencia un halo inhibición, no compatible (Gefen et al., 2017).

#### **4.5.2 Prueba de antibiosis**

Se preparó una placa de agar nutritivo (AN) con un disco de celofán estéril que cubre la superficie. Se inoculó con 160  $\mu\text{L}$  de una de las PGPR ajustada a  $\text{DO}_{600}$  de 1, con un hisopo estéril se estrió la superficie de la placa evitando tocar los bordes de ésta, se incubó por 72 h a 28 °C. Posteriormente, se retiró el disco de celofán obteniendo así una placa de AN impregnada de metabolitos secundarios, proteínas y enzimas. Se inocularon sobre la placa de AN gotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las PGPR restantes ajustadas de igual manera a una  $\text{DO}_{600}$  de 1. Para el control se colocaron en una placa de AN fresca gotas de 20  $\mu\text{L}$  de todas las PGPR ajustadas de igual manera. Se incubó a 28 °C por 24 y 48 h, se verificó su crecimiento (Gefen et al., 2017).

#### **4.6 OBTENCIÓN DE LA BIO-FORMULACIÓN DE PGPR**

Una vez determinada la capacidad para formar consorcios bacterianos (interacciones compatibles), cada una de las PGPR se creció independientemente en CN a 28 °C por 24 h con agitación constante (150 rpm), posteriormente se ajustó su  $\text{DO}_{600}$  a 1.0. A continuación se mezcló en proporción 1:1 cada una de las bacterias que formarán parte de la bio-formulación (consorcios). Su uso posterior depende de cada experimento.

#### **4.7 PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS**

Para determinar la capacidad de producción de polisacáridos por parte de las PGPR, se utilizó el medio YEM (extracto de levadura 1  $\text{gL}^{-1}$ , manitol 10  $\text{gL}^{-1}$ , fosfato de potasio 0.5  $\text{gL}^{-1}$ , sulfato de magnesio 0.2  $\text{gL}^{-1}$ , cloruro de sodio 0.1  $\text{gL}^{-1}$ , se ajustó el  $\text{pH}= 7$  (Aeron et al., 2021). Se creció a las PGPR en CN a 28 °C durante 24 h con agitación constante (150 rpm), se ajustó su  $\text{DO}_{600}$  a 1.0. Se realizó la bio-formulación con respecto al punto 4.6. Se inoculó con 500  $\mu\text{L}$  de la bio-formulación 25 mL de medio YEM, se incluyó un control negativo *Escherichia coli*, (Top10) preparado de igual manera. Se incubó a 28 °C por 5 días a 150 rpm. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó cada cultivo a 8,000 rpm por 10 min, el sobrenadante se dispuso en un matraz Erlenmeyer de 125 mL estéril al cual se le adicionaron 40 mL de acetona previamente enfriada por 24 h a 4 °C. La muestra se colocó en

refrigeración (4 °C) durante 6 días, enseguida se procedió a filtrar usando tela Magitel (mantenida peso constante), la muestra se secó a peso constante, por diferencia de peso se determinó el peso en mg de polisacárido precipitado. Cada tratamiento se realizó por triplicado para realizar el análisis estadístico con la separación de medias (Upadhyay et al., 2017).

#### **4.8 CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LOS CONSORCIOS DE PGPR EN CONTRA DE *F. oxysporum***

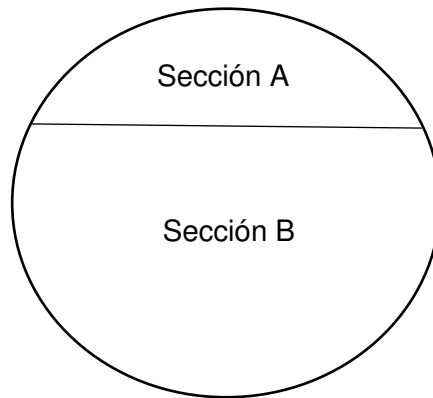
##### **4.8.1 Prueba de antibiosis**

Se utilizó el consorcio preparado como en el punto 4.6. Se preparó una placa de PDA con celofán estéril. Del consorcio preparado como en el punto 4.6, se tomaron 160 µL, se distribuyó con hisopo estéril y se incubó por 4 días a 28 °C. Posteriormente se retiró el celofán y se obtuvo una caja impregnada con metabolitos secundarios, proteínas, enzimas, excretados por las bacterias que conforman el consorcio. Previamente se creció a durante una semana a 28 °C a *F. oxysporum* en una placa de PDA, se cortaron discos con sacabocado (0.5 cm diámetro) y se colocó un disco al centro de la placa. Como control positivo se colocó un disco de micelio en una placa de PDA fresca. Las placas se incubaron a 28 °C por 7 días, se midió el crecimiento radial que alcanzó el hongo, considerando el 100% el diámetro de la colonia de la caja control. El experimento se realizó por triplicado (3 cajas por tratamiento) con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias (Tuckey) ( $p < 0.005$ ) (Slama et al., 2019).

##### **4.8.2 Ensayo de doble cultivo**

Esta prueba representa la interacción bacteria-fitopatógeno (PGPR-*F. oxysporum*) en un mismo sistema. Para ello se preparó una caja de Petri de (90 x 15) dividida en 2, con un portaobjetos se realizó una división en la caja aproximadamente en un tercio de ésta, en la zona de menor tamaño se colocó AN (sección A) en el resto de la placa se colocó PDA (sección B), (Fig. 5). Sobre la sección A se inocularon 160 µL de la bio-formulación (punto 4.6) y se distribuyó por toda esta sección de manera homogénea, mientras que en la zona B se colocó un disco (0.5 cm<sup>2</sup>) de micelio de *F. oxysporum*. Las placas se incubaron a 28 °C por 5

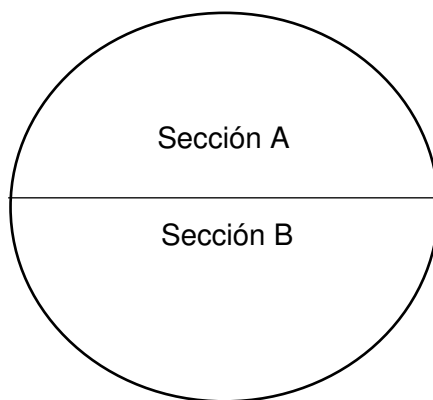
días. El experimento se realizó por triplicado (3 cajas por tratamiento) con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias (Tuckey) ( $p < 0.005$ ) (Ramírez et al., 2022).



**Figura 5.** Secciones de placa para el ensayo dual

#### **4.8.3 Efecto de la producción de los COVs en el crecimiento de *F. oxysporum***

Se utilizaron cajas de Petri divididas (Fig. 6). En la sección A se colocó AN mientras que en la sección B se usó PDA. La sección A fue inoculada con 160  $\mu\text{L}$  de la bio-formulación (punto 4.6), esta se estiró de manera uniforme por toda la superficie con un hisopo estéril. En la sección B se colocó un disco (0.5 cm de diámetro) *F. oxysporum* crecido en PDA previamente por una semana. Se incubó a 28 °C, por 4 días. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el efecto en el crecimiento del hongo por la presencia de compuestos volátiles (Azeem et al., 2022; González-Ista et al., 2023). El experimento se realizó por triplicado (3 cajas por tratamiento) con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias (Tuckey) ( $p < 0.005$ ).



**Figura 6.** Secciones de placa para el ensayo de los compuestos volátiles

#### **4.8.4 Efecto del extracto libre de células de la bio-formulación de PGPR sobre la producción de biomasa de *F. oxysporum*.**

Se tomaron 160  $\mu\text{L}$  de la bio-formulación (punto 4.6), y se inocularon en 50 mL de PDB por sus siglas en inglés (Potato-Dextrose-Broth), se incubó a 28 °C por 96 h con agitación constante (150 rpm). Enseguida, en condiciones de esterilidad el cultivo se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min en la centrifuga Thermo SCIENTIFIC. Se recuperó el sobrenadante en un tubo cónico de 50 mL. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocó el extracto libre de células proveniente de la bio-formulación, se agregó Medio Mínimo *Fusarium* 2x (MMF2x) (nitrato de sodio 2  $\text{gL}^{-1}$ , cloruro de potasio 0.50  $\text{gL}^{-1}$ , sulfato de magnesio 0.50  $\text{gL}^{-1}$ , fosfato dipotásico 1  $\text{gL}^{-1}$ , sacarosa 30  $\text{gL}^{-1}$ , sulfato de zinc 0.01  $\text{gL}^{-1}$ ), 120  $\mu\text{L}$  de ampicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), y un inóculo de  $\sim 1 \text{ cm}^2$  de *F. oxysporum*, según como se muestra en la Tabla 3. Como control positivo se incluyó el cultivo del hongo solamente en medio PDB con MMF2x (Tabla 3).

Los matraces se incubaron a 28 °C por 7 días con agitación constante (150 rpm). Posteriormente, se realizó un sistema de filtración por gravedad, para este paso se utilizó tela magitel a peso constante. Enseguida se realizó la filtración de cada cultivo para recuperar la biomasa crecida, se recuperó el magitel y se colocó en cajas Petri a 70 °C (estufa Felisa) por 24 h. Finalmente, por diferencia de peso, se calculó la reducción de biomasa producida (Borrajo et al., 2022).

El experimento se realizó por triplicado con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias (Tuckey) ( $p < 0.005$ ).

**Tabla 3.** Componentes de reacción del ensayo de obtención de biomasa

	Control	DM1	DM2
	positivo		
PDB estéril 20 mL	+	-	-
PDB proveniente de la bio-formulación (20 mL)	-	+	+
Ampicilina 120 $\mu$ L	+	+	+
Disco de micelio	+	+	+
MMF 2X (20 mL)	+	+	+

#### 4.8.5 Extracción de metabolitos secundarios secretados por la bio-formulación al medio de cultivo.

Se preparó labio-formulación (punto 4.6), se inoculó con 160  $\mu$ L una placa de PDA (se prepararon 5 placas por consorcio). Las placas se incubaron a 28 °C por 96 h. Se preparó un conjunto de placas para cada extracción, se utilizaron 2 solventes de distinta polaridad: acetato de etilo y hexano. Posteriormente, el agar de cada caja de Petri se fraccionó con una espátula estéril en cuadros de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>, se depositaron en un frasco Schott (500 mL) estéril, se congeló a -80 °C durante 48 h. Posteriormente a cada frasco se le adicionaron 50 mL de agua destilada estéril, al frasco 1 se le agregaron 150 mL de acetato de etilo (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), al frasco 2, 150 mL de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>). Los frascos se agitaron a 150 rpm durante 24 h a 28 °C.

La separación de la fase líquida con respecto a la fase sólida se realizó por medio de una decantación en un sistema de filtrado para la separación de los solutos (agar), el filtrado se recuperó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril, en base a la densidad de cada una de las fases (orgánica y acuosa) se logró separar la orgánica que es donde se van a encontrar la mayor cantidad de compuestos de interés. Una vez que se recuperó la fase orgánica para cada uno de los solventes y cada

consorcio, se realizó la concentración de los metabolitos en el rotavapor modelo Heidolph acoplado a un sistema de vacío, el cual su fundamento establece una destilación suave de los solventes presentes en la muestra, para el caso del acetato de etilo se utilizó una temperatura inicial de 60 °C y una final de 70 °C, se realizó un incremento gradual cada 3 min de 5 °C. Para la extracción con hexano, se comenzó con una temperatura de 50 °C con incremento gradual de 3 °C cada 3 min hasta llegar a 62 °C. Los metabolitos presentes en el matraz balón se recuperaron en frascos ámbar previamente pesados (peso constante), se le adicionó al matraz balón 2 mL del solvente para lavarlo (3 veces) y así recuperar la mayor cantidad posible de compuestos. Finalmente, el solvente se evaporó a baño maría. Una vez secados se realizó un nuevo pesado para obtener la cantidad de metabolitos recuperados. Por último, se ajustaron los metabolitos a una concentración de a 100 ng/μL con metanol al 96%. Se almacenaron a -20 °C en el congelador modelo Thermo SCIENTIFIC, siempre que fue posible se evitó el contacto con la luz para evitar posible foto descomposición.

#### **4.8.5.1 Evaluación del efecto de los metabolitos producidos por las bioformulaciones en la germinación de conidios de *F. oxysporum*.**

Se sembraron las cepas de *F. oxysporum* en medio PDA, se incubaron por aproximadamente 10 días a temperatura ambiente, enseguida se extrajeron las esporas con 5 mL de PBS estéril con ayuda de una varilla de vidrio en forma de triángulo, para eso se procedió a realizar un raspado suavemente por toda la zona de la placa, se colectó la suspensión para depositarla en un tubo plástico cónico de 15 mL estéril finalmente se llevó la suspensión a un volumen final de 10 mL para realizar el conteo de esporas con la cámara de Neubauer. Con base a la fórmula se obtuvo la cantidad de conidia/mL.

$$\frac{\text{conidia}}{\text{mL}} = (\text{conidia contada})(\text{dilución})(10,000)(5)$$

Se colocaron 2500 conidia en un tubo de plástico de 1.5 mL estéril, se prepararon tubos con dicha cantidad de conidia y se agregaron 3, 6 y 12 μL de los metabolitos extraídos, la reacción se llevó a un volumen final de 50 μL con PBS estéril



(18  $\mu$ L conidia + 3,6 o 12  $\mu$ L metabolitos + PBS). Las reacciones se incubaron por 8 h a 150 rpm a 28 °C. Posteriormente en placas de PDA con Tritón X100 al 0.5%, se inocularon 10  $\mu$ L de cada una de las reacciones. Como control se incluyó un tubo con conidia sin metabolitos, solamente el solvente (18  $\mu$ L conidia + 10  $\mu$ L metanol+ 22  $\mu$ L PBS). Por placa se sembraron: el control y el tratamiento de 3, 6 y 12  $\mu$ L del metabolito. Las placas así generadas se incubaron a 28 °C por 96 h. Posteriormente se observó el crecimiento obtenido en cada condición. La prueba se realizó por triplicado (Fig. 7).



**Figura 7.** Distribución de los metabolitos secundarios extraídos de los consorcios bacterianos aplicados a conidios de *F. oxysporum*. El punto 0 mg corresponde al control en el que los conidios fueron tratados solamente con metanol.

#### **4.8.5.2 Tinción de los conidios expuestos a metabolitos secundarios con azul de tripano.**

Se tomaron 20  $\mu$ L de la reacción del punto anterior y se colocaron en un tubo de 1.5 mL, se adicionaron 10  $\mu$ L de azul de tripano al 0.4% (AMRESCO), se incubaron a 28 °C por 5 min. En un portaobjetos se colocaron 10  $\mu$ L y se observó al microscopio óptico Leica DM500 con el objetivo de 40X. Los conidia teñidos de azul de azul indica que esta se encuentra muertas por la acción de los metabolitos secundarios, caso contrario están vivas.

## **4.9 EFECTO DE LA BIO-FORMULACIÓN EN *Trichoderma* sp**

### **4.9.1 Cultivo de cepas *Trichoderma* sp y obtención de esporas.**

Se emplearon 2 cepas de *Trichoderma*, (*T. asperellum* y *T. atroviride*), donadas por el Dr. Ulises Esquivel Naranjo. La obtención y cuenta de conidia se realizó en base al punto 4.8.5.1.

### **4.9.2 Prueba de antibiosis**

Se utilizó una placa impregnada de compuestos difundidos por la bio-formulación (punto 4.8.1) se colocó un inóculo de 500 conidia de *Trichoderma* sp. Las placas se incubaron a 28 °C por 10 días. Pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar la extracción y conteo de conidia (punto 4.9.1). Como control se usó una placa de PDA fresca libre de metabolitos. El experimento se realizó por triplicado (3 cajas por tratamiento) con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias (Tuckey) ( $p < 0.005$ ) (Slama et al., 2019).

### **4.9.3 Efecto de la producción de los COVs en el crecimiento de *Trichoderma* sp.**

El ensayo se realizó como en el punto 4.8.3. Sobre la sección A se inocularon 160  $\mu$ L de la bio-formulación, y en la sección B se colocó un inóculo de *Trichoderma* que contenía 500 conidia. Se incubó a 28 °C, por 4 días. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el efecto en el crecimiento del hongo por la presencia de compuestos volátiles (Azeem et al., 2022; González-Ista et al., 2023).

## **4.10 MANEJO DEL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

### **4.10.1 Obtención de plántula de tomate**

Se realizó la siembra de semillas de tomate Saladet (Hortaflo, semilla de jitomate tipo SALADET, Rancho "Los Molinos") en charola de unicel de 200 cavidades usando una mezcla de peat moss, agrolita y vermiculita como sustrato de siembra. Cada tratamiento se colocó en charola por separado, los cuales fueron: bio-formulación de PGPR, manejo con fertilizantes: Urea ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ),  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , producto orgánico comercial (Bio-Organik), control solamente a base de agua. La bio-formulación se suministró una vez por semana (1 mL por planta, preparado como en

el punto 4.6.). La solución de fertilizantes se aplicó con respecto al ciclo fenológico, para el producto Bio-Organik se siguieron las indicaciones del fabricante. Este manejo se siguió hasta la obtención de la plántula 28 días aproximadamente. Una vez lista la plántula se trasplantó a maceta de (20x30x30) usando la misma mezcla de siembra.

#### **4.10.2 Desarrollo vegetativo del cultivo de tomate**

Se utilizaron plántulas provenientes del apartado 4.10.1. Para los tratamientos con la bio-formulación se realizó una inoculación semanal con 10 mL/planta, el uso de fertilizantes se basó con respecto a la etapa fenológica de la planta, y para el producto Bio-Organik se siguieron las indicaciones del fabricante. Los tratamientos se aplicaron hasta la obtención del fruto. Se evaluaron los siguientes parámetros: tamaño de planta, tamaño de raíz, peso fresco y seco, número de flores, número de frutos. Para cada tratamiento se tuvo una n=30. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.005$ ) (Minchev et al., 2021).

#### **4.10.3 Infección del cultivo de tomate con *F. oxysporum***

##### **4.10.3.1 Obtención y conteo de conidia de *F. oxysporum***

La preparación de conidia de *F. oxysporum* se realizó como se indica en el punto 4.9.1.

##### **4.10.3.2 Infección del cultivo de tomate con conidia de *F. oxysporum***

Se utilizaron plántulas provenientes del apartado 4.10.1. Pasado 40 días después del trasplante se realizó la infección con  $2 \times 10^6$  conidias de *F. oxysporum* suspendidas en un volumen de 10 mL de agua destilada estéril con la ayuda de una jeringa estéril éstas se colocaron directamente en el suelo en la zona más cercana a la raíz (Minchev et al., 2021).

En el tratamiento a base de fertilizantes, se usó el fungicida Previcur® energy, fungicida sistémico de Bayer (propamocarb + fosetil (47 %)) aplicando una dosis de 3 mL L<sup>-1</sup> una vez por semana durante 3 semanas (Minchev et al., 2021).

El resto de los tratamientos se manejando como indica el punto 4.10.2.

Se tomaron datos de tamaño de planta, tamaño de raíz, peso fresco y seco, número de flores, número de frutos, plantas muertas y sanas. Para cada tratamiento se tuvo una n=30. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.005$ ).

#### **4.11 ENCAPSULACIÓN, ESTABILIDAD Y LIBERACIÓN DE LAS DE PGPR**

##### **4.11.1 Encapsulación de PGPR**

Se trabajó con las PGPR:1286-1290, se crecieron de manera individual en caldo nutritivo por 24 h a 28 °C a 150 rpm. Después se ajustó cada bacteria a una  $DO_{600}$  de 1, se mezclaron en proporción 1:1. Para formar la emulsión, se colocaron 5 mL de la bio-formulación en un vial ámbar y se mezcló con 500  $\mu$ L de aceite mineral emulsionable grado agrícola (Syngenta) y 500  $\mu$ L de trehalosa al 10% (Sigma), a 12,000 rpm empleando un homogeneizador de mano de altas velocidades (D-160, Science MED). La mezcla se realizó durante un periodo total de 2 min, se aplicaron pulsos de 30 s para evitar el sobrecalentamiento de la propela. A continuación, en un tubo cónico de 50 mL, se depositaron 20 mL de una solución de alginato de sodio al 2% estéril (p/v) y se le añadió la emulsión generada. Se mezcló con la ayuda de un vortex durante un periodo de 30 s, seguido del homogeneizador a 12,000 rpm, como se describió anteriormente.

Para comenzar a producir las cápsulas, se depositaron 25 mL de una solución de  $CaCl_2$  al 2% (p/v) estéril pH 4.0 en un vaso de precipitados estéril con agitador magnético estéril. La velocidad de agitación se mantuvo constante a 150 rpm. Entonces, empleando una jeringa de 10 mL la mezcla con el cultivo celular se extruyó gota a gota sobre la solución de  $CaCl_2$ . Las cápsulas se mantuvieron en agitación por 35 min. Al finalizar el tiempo de exposición, las cápsulas se filtraron a través de un embudo de vidrio y magitel estéril, se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Finalmente se colocó a las cápsulas en un tubo cónico de 50 mL estéril para experimentos posteriores.

El cálculo del porcentaje de encapsulación se realizó de la siguiente manera: se tomó 1 mL de la bio-formulación y se realizaron diluciones seriadas, se tomaron

100  $\mu$ L de la última dilución ( $10^{-6}$ ) para hacer una siembra en una placa de agar nutritivo, con ayuda de perlas de vidrio se realizó una distribución homogénea de ésta, se incubó por 24 h a 28 °C, pasado el tiempo de incubación se observó la morfología de las PGPR que crecieron y se contó la cantidad de unidad formadora de colonias (UFC) obtenidas.

De la emulsión preparada se tomó 1 mL y de igual manera se procedió a realizar diluciones seriadas, se procedió como en el punto anterior. y se realizó el conteo de UFC obtenidas.

Con base a lo anterior y corroborar que se procedió a una encapsulación correcta se tomó 1 g de cápsulas, se disolvieron con 9 mL de PBS  $pH$  7, se agitó por 30 min a 28 °C a 150 rpm, de esa solución se tomó 1 mL para realizar diluciones seriadas, y así de igual manera proceder a realizar conteo de UFC, e identificación morfológica de las PGPR encapsuladas (Ravichandran et al., 2022; Saberi Riseh et al., 2023; Vassilev, Vassileva, Martos, Garcia, et al., 2020).

Con los datos obtenidos de UFC provenientes del cultivo de PGPR, las UFC que se quedaron en la emulsión, y las UFC encapsuladas se procedió a realizar el cálculo del % de eficiencia de encapsulación utilizando la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{\log_{10}(capsulas (\frac{UFC}{mL}))}{\log_{10}(emulsión (\frac{UFC}{mL}))} x 100$$

#### **4.11.2 Efecto de la vida de anaquel en la liberación de las PGPR encapsuladas**

Se procedió a dividir en 3 partes iguales las cápsulas obtenidas del punto 4.11.1, ésta se colocó en tubos cónicos de 50 mL estériles, los cuales se incubaron a 4 °C, a 28 °C y a 37 °C respectivamente por un mes, 3 meses y 6 meses. Una vez transcurrido el tiempo se procedió determinar el número de UFC como en el punto anterior. Para las cápsulas almacenadas a 4 °C se incubó por 24 h para una completa disolución.

#### **4.11.3 Liberación de las de PGPR encapsuladas en una matriz sólida a base de: peat moss-agrolita y suelo arcilloso**

Se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL 10 g de sustrato o suelo húmedo, se esterilizó 2 veces a 20 psi por 25 min. A continuación, se adicionó 1 g de las cápsulas en cada matraz y nuevamente se humedeció con agua destilada estéril, se incubó a 28 °C a 150 rpm por aproximadamente 96 h. Una vez transcurrido el tiempo se procedió determinar el número de UFC como en el punto 4.11.1.

#### **4.12 EFECTO DEL CONSORCIO DE PGPR ENCAPSULADO EN LA PLÁNTULA DE TOMATE**

Se realizó la siembra de semillas de tomate Saladet (Hortaflo, semilla de jitomate tipo SALADET, Rancho "Los Molinos") en vasos de plástico de 1 L a los cuales se lo colocó una combinación de peat moss, agrolita y vermiculita previamente esterilizada en proporción 1:1:1. Se depositó 1 g de cápsulas en los vasos que contienen la mezcla de sustrato a una profundidad de aproximadamente 3 cm, todo esto se realizó 48 h previas a la siembra. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Control (germinación a base de agua), 2) cápsulas vacías "sin PGPR", 3) cápsulas con PGPR, y 4) consorcio en cultivo líquido. Se utilizó una n=15 para cada tratamiento. La adición de las cápsulas y del consorcio en medio líquido se realizó semanalmente por 5 semanas hasta la obtención de la plántula de tomate. Los parámetros analizados fueron: altura de la plántula, longitud de la raíz, y porcentaje de germinación. Una vez obtenidos los datos se procedió a realizar un análisis estadístico (ANOVA) y una prueba de Tuckey (>0.005) con separación de medias, los análisis estadísticos se realizaron en el programa Minitab 18.

## 5 RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención de las PGPR de estudio

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son un grupo de bacterias colonizadoras de raíces capaces de competir por un nicho rico en nutrientes, además influyen de forma favorecedora en la calidad y la productividad de los cultivos, con una amplia gama de rasgos beneficiosos ejercidos mientras colonizan la rizosfera. Existen datos sobre la influencia de las PGPR en la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés ambiental, la descontaminación por metales pesados, la prevención del ataque de patógenos, la producción de fitohormonas, etc. Las PGPR pueden ser epifitas o endófitas dependiendo del lugar de su funcionalidad; también el mecanismo de acción puede ser directo o indirecto según el beneficio adquirido por la planta.

El aislamiento de las PGPR se realizó en un huerto orgánico de fresa ubicado en la localidad de La Calera en el municipio de Irapuato, Guanajuato en el 2015, de la zona de la rizósfera de dicho cultivo se procedió a realizar el aislamiento de las PGPR las cuales se conservaron a -80 °C en el ultra congelador hasta posteriores experimentos. De igual manera se realizó otro aislamiento para la obtención de PGPR fijadoras de N<sub>2</sub> simbióticas o de vida libre a partir de la rizosfera de un cultivo de frijol y de los nódulos de este cultivo. Finalmente se seleccionaron a las PGPR que se utilizarían en el trabajo, contamos con una amplia variedad de PGPR, y a su vez se le asignó a cada una de ellas el código correspondiente al cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular (Tabla 4).

**Tabla 4.** PGPR seleccionadas para el trabajo

Codigo de cepario	Lugar de aislamiento
1286	Cultivo orgánico de fresa
1288	Cultivo orgánico de fresa
1290	Cultivo orgánico de fresa
712	Cultivo orgánico de fresa
728a	Cultivo orgánico de fresa
726a	Cultivo orgánico de fresa
729a	Cultivo orgánico de fresa
1193	Nódulo de frijol
1217	Rizosfera de cultivo de frijol
1218	Rizosfera de cultivo de frijol

## 5.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PGPR

Con base a los resultados de la secuencia del gen 16s RNA y utilizando la herramienta BLAST disponible en la base de datos NCBI se identificó de manera tentativo el género y la especie de los aislados utilizados en el trabajo de investigación (Tabla 5), sin embargo, para corroborar estos resultados arrojados por el BLAST se realizó el árbol filogenético de cada una de ellas utilizando los software MESQUITE para la alineación de las secuencias y Mr. Bayes para la formación del árbol filogenético mediante la inferencia bayesiana con un bootstrap de 1000 réplicas.

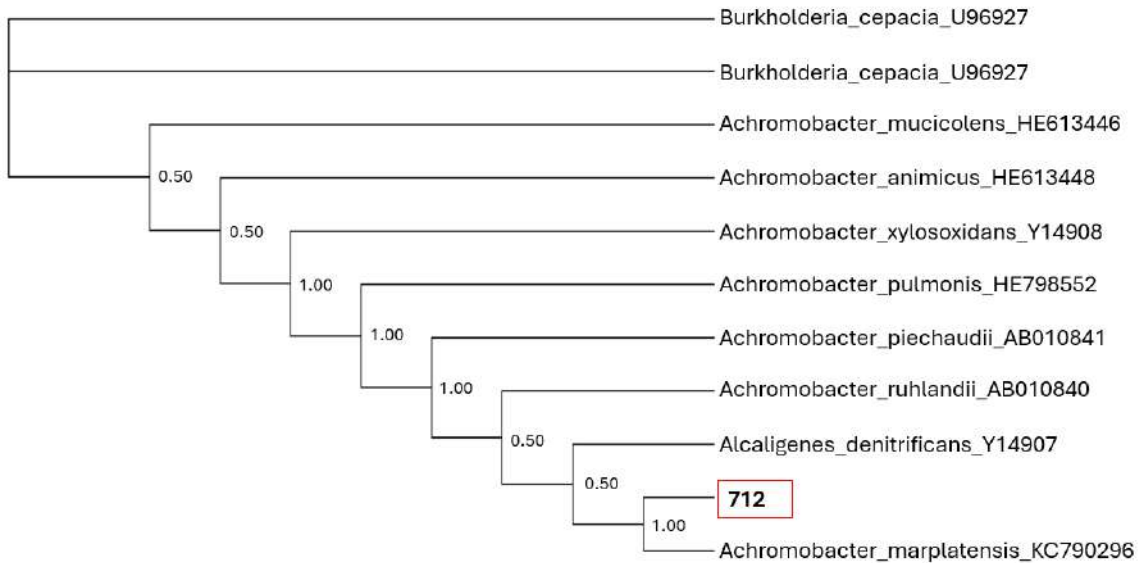
Mostrando que el aislado 712 tiene una emparejamiento con *Achromobacter marplatensis* (Fig. 8), en un trabajo de Santos en el 2021 reportó que algunas PGPR pertenecientes al género *Achromobacter* llegan a producir bajos niveles de ácido indol-3-acético, sin embargo éstas tienden a poseer una capacidad alta de solubilizar fosfatos, aluminio y potasio además de que son capaces de degradar celulosa en grandes cantidades ( $0.61 \text{ mL}^{-1}$ ) (Santos & Riguel, 2021); el aislado 728A se emparejo con *Bacillus thuringiensis* (Fig. 9), Ali en el 2022 demostró la resistencia al estrés por salinidad de hasta 3M NaCl, la inoculación con *B. thuringiensis* aumentó el contenido de clorofila, los niveles de enzimas antioxidantes en comparación con las plantas de maíz no inoculadas (Baber Ali et al., 2022); para el aislado 729A se relacionó con *Chryseobacterium culicis* (Fig. 10), en el año 2021 Kumar en conjunto con su equipo encontraron *C. culicis* mostró una actividad antifúngica con más del 60 % de inhibición del crecimiento micelial de *Magnaporthe oryzae* usando el método de cultivo doble, sin embargo al probar el efecto los COVs en contra del patógeno reportaron que este valor aumentó hasta un 80% de inhibición (Kumar et al., 2021); para el aislado 1290 se encontró similitud *Pantoea ananatis* (Fig. 11), estudios previos del grupo de investigación de Lu en 2021 mostró que *P. ananatis* presentó múltiples rasgos promotores del crecimiento vegetal como la solubilización de fosfatos, la producción de ácido indol-3-acético, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminasa y sideróforos, a su vez la inoculación de esta PGPR al cultivo de arroz mejoró de forma evidente el crecimiento de las raíces y los brotes en



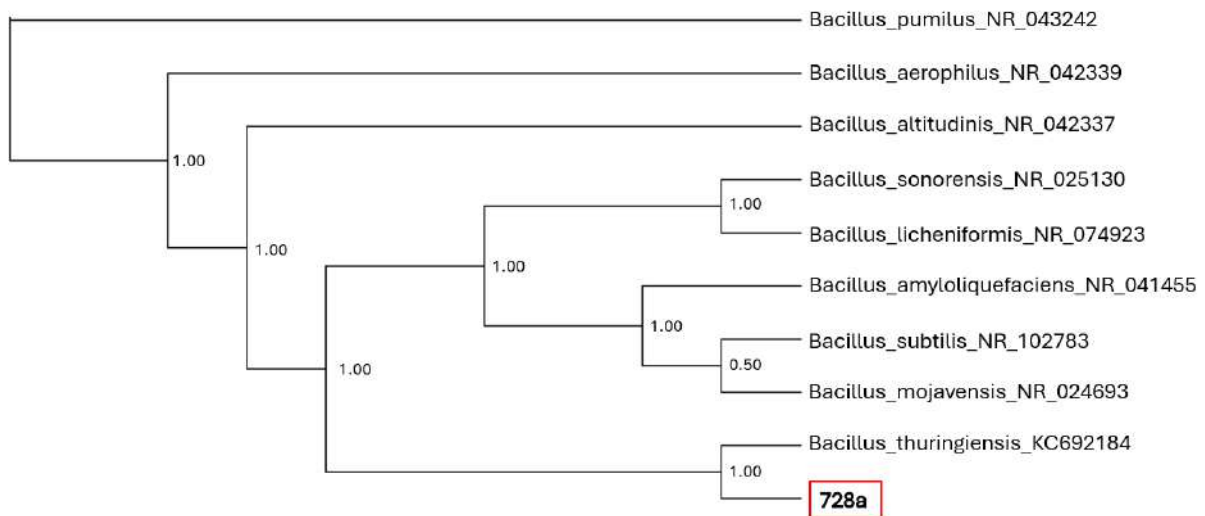
condiciones normales y de estrés salino (Lu et al., 2021b); el aislado 1218 obtuvo similitud con *Klebsiella pneumoniae* (Fig. 12), en un reporte del 2022 por parte del grupo de trabajo de Kim se encontró que esta PGPR es productora de 2,3-butanediol (BDO) molécula capaz de controlar la marchitez bacteriana del tomate producida por *Ralstonia solanacearum* (Kim et al., 2022); para los aislados (1286, 1288) y (1193,1217) se encontró un emparejamiento con *Pseudomonas mediterranea* y *Pseudomonas putida* respectivamente (Fig. 13), Gu en el 2020 reportó que *P. mediterranea* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por el suelo, como *Rhizoctonia solani*, causante de la mancha ocular aguda del trigo, *Phytophthora nicotianae*, causante de la pata negra del tabaco, *Fusarium graminearum*, causante de la podredumbre del tallo del maíz además de que es capaz de producir sideróforos, amilasa, proteasa y solubiliza el fósforo orgánico (Gu et al., 2020) y finalmente el aislado 726a se encontró relacionado con *Enterobacter hormaechei* (Fig. 16), en un trabajo de Ranawat del 2021 se observó que *E. hormaechei* fue capaz de solubilizar K-feldespatos en potasio, fosfato tricálcico y también produjo ácido indol-3-acético, la aplicación de esta PGPR en el cultivo de tomate se observó en una mejora de la biomasa, aumento la longitud de los brotes en comparación con el control, también se vio modificada la arquitectura de las raíces, lo que mejoró la productividad del cultivo (Ranawat et al., 2021).

**Tabla 5.** Identificación molecular de las PGPR mediante el análisis de la región 16s RNA.

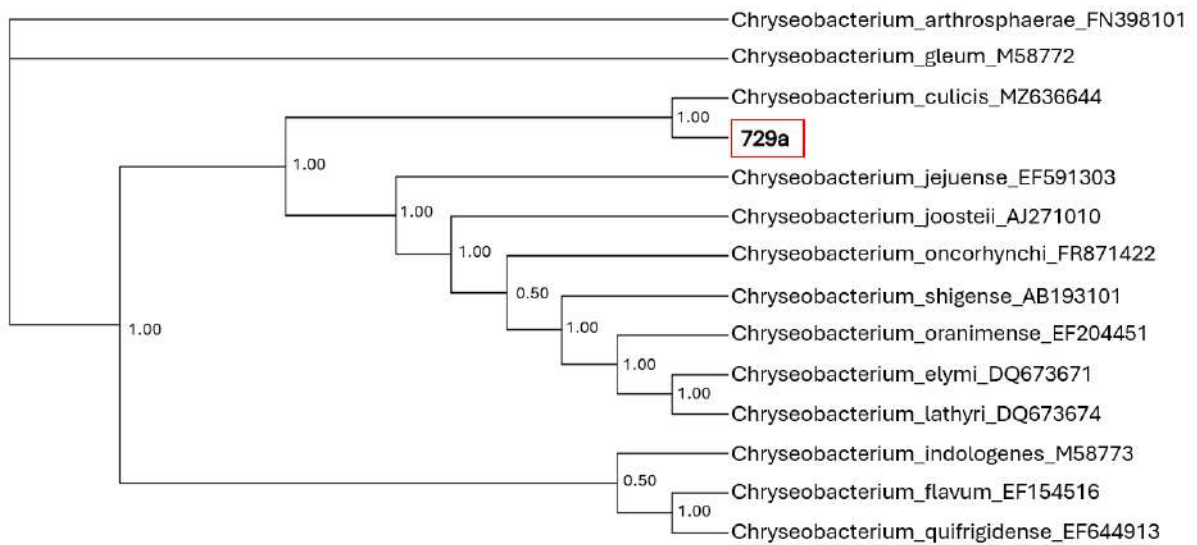
Cepa	IDENTIDAD
1286	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
1288	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
1290	<i>Pantoea ananatis</i>
712	<i>Achromobacter marplatensis</i>
728 <sup>a</sup>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
1193	<i>Pseudomonas putida</i>
726 <sup>a</sup>	<i>Enterobacter hormaechei</i>
729 <sup>a</sup>	<i>Chryseobacterium culicis</i>
1217	<i>Pseudomonas putida</i>
1218	<i>Klebsiella pneumoniae</i>



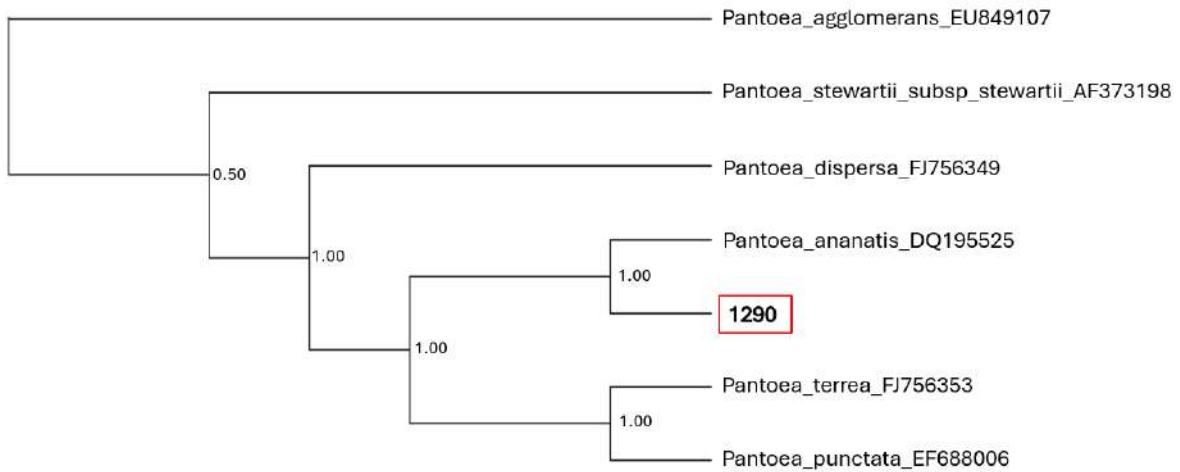
**Figura 8.** Relación filogenética entre la cepa 712 y *Achromobacter marplatensis* (KC790296), se emplearon otras cepas basadas en secuencias del gen 16s rRNA generadas por el método de máxima verosimilitud empleando un bootstrap de 1000 réplicas.



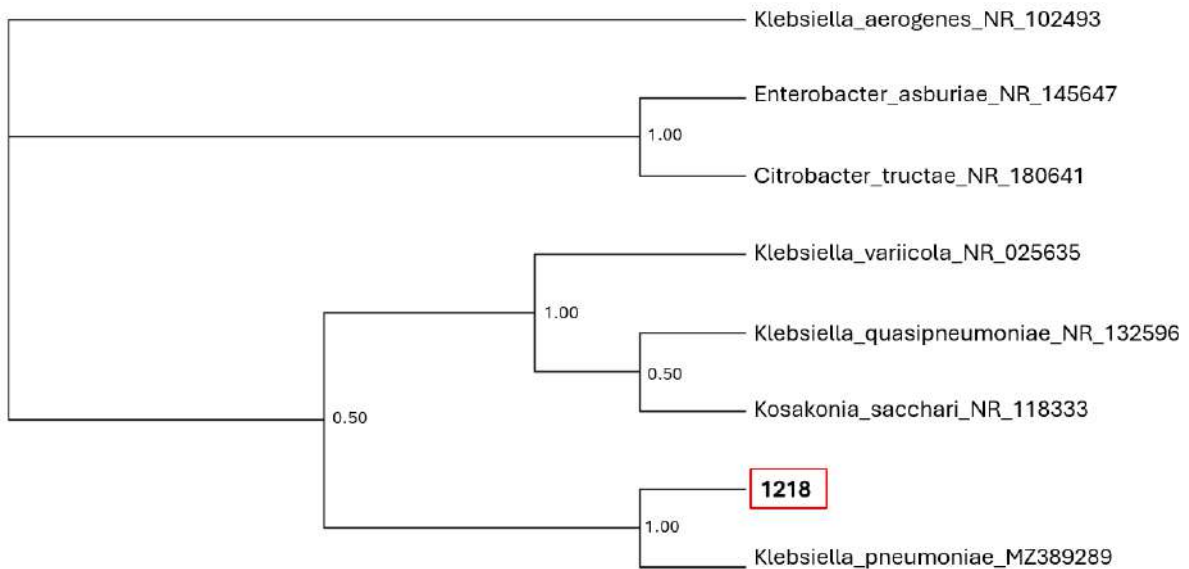
**Figura 9.** Relación filogenética entre la cepa 728A y *Bacillus thuringiensis* (KC692184), además se emplearon otras cepas tipo basadas en secuencias del gen 16s rRNA generadas por el método de máxima verosimilitud empleando un bootstrap de 1000 réplicas.



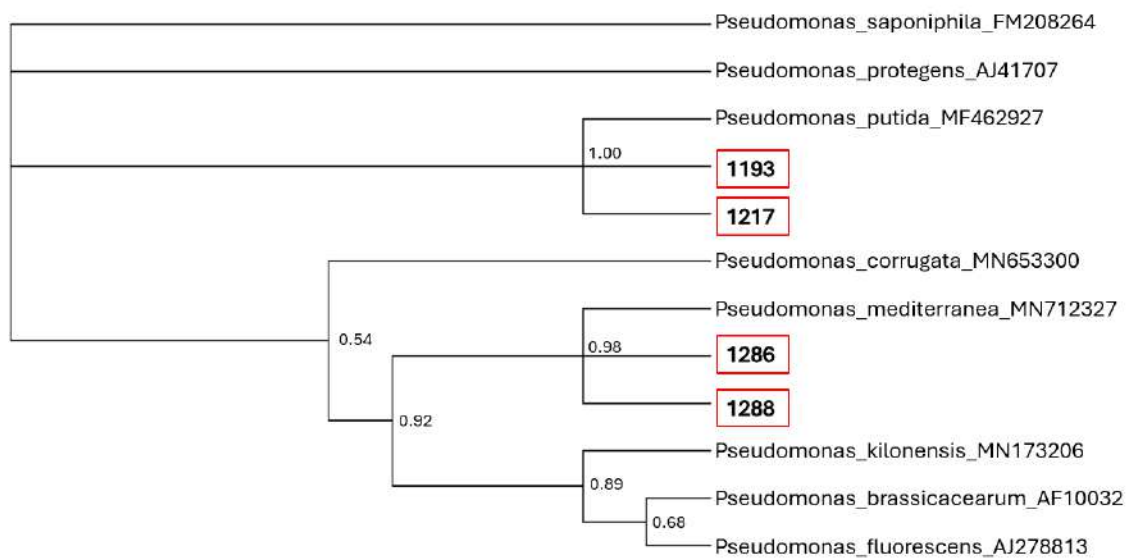
**Figura 10.** Relación filogenética entre la cepa 729A y *Chryseobacterium culicis* (MZ636644), además se emplearon otras cepas tipo basadas en secuencias del gen 16s rRNA generadas por el método de máxima verosimilitud empleando un bootstrap de 1000 réplicas.



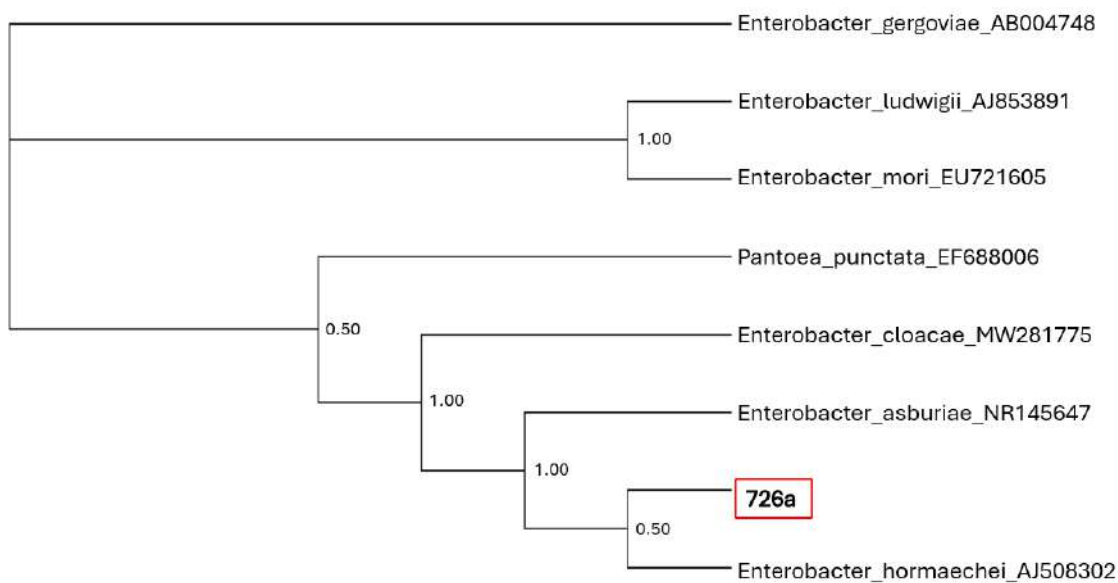
**Figura 11.** Relación filogenética entre la cepa 1290 y *Pantoea ananatis* (DQ195525), además se emplearon otras cepas tipo basadas en secuencias del gen 16s rRNA generadas por el método de máxima verosimilitud empleando un bootstrap de 1000 réplicas.



**Figura 12.** Relación filogenética entre la cepa 1218 y *Klebsiella pneumoniae* (MZ389289), además se emplearon otras cepas tipo basadas en secuencias del gen 16s rRNA generadas por el método de máxima verosimilitud empleando un bootstrap de 1000 réplicas.



**Figura 13.** Relación filogenética entre la cepa 1286, 1288, 1193, y 1217 y *Pseudomonas mediterranea* (MN712327), *Pseudomonas putida* (MF462927), además se emplearon otras cepas tipo basadas en secuencias del gen 16s rRNA generadas por el método de máxima verosimilitud empleando un bootstrap de 1000 réplicas.



**Figura 14.** Relación filogenética entre la cepa 726a *Enterobacter hormaechei* (AJ508302) además se emplearon otras cepas tipo basadas en secuencias del gen 16s rRNA generadas por el método de máxima verosimilitud empleando un bootstrap de 1000 réplicas.

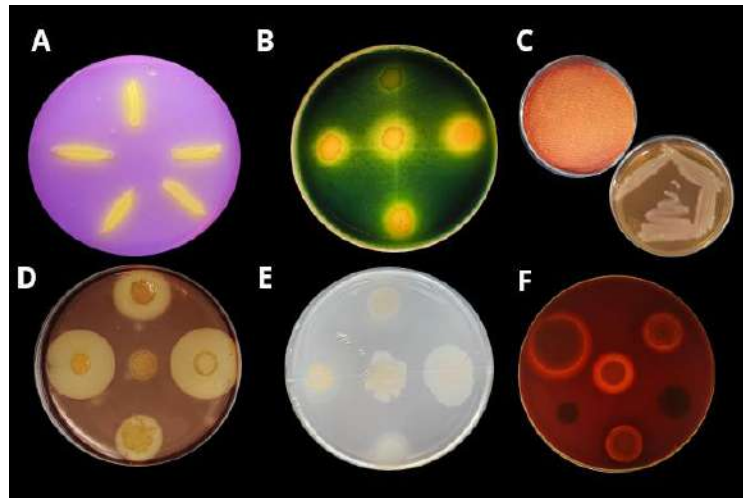
### 5.3 ANÁLISIS DEL PERFIL BIOQUÍMICO QUE CORRESPONDE A BACTERIAS PGPR

Una vez realizada la identificación molecular de cada una de las PGPR se procedió a evaluar las actividades metabólicas características de las PGPR como lo son la solubilización de fosfatos, potasio, producción de ácido indol-3-acético (INDOL), ácido cianhídrico (HCN), sideróforos y su poder antagonista en contra de *F. oxysporum* (Tabla 6, anexo II) (Gu et al., 2020; Lotfi & Soleimani, 2022).

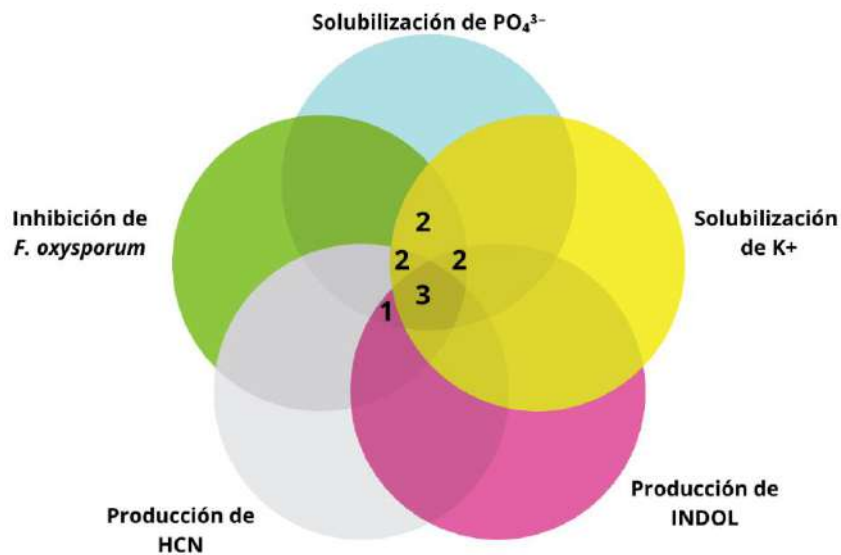
Se determinó el perfil bioquímico de cada una de las PGPR con relación a su capacidad para promover el crecimiento en plantas y capacidad de antagonizar el crecimiento de *F. oxysporum*. Se analizó su capacidad de solubilizar fosfatos, potasio, producción de ácido indol-3-acético (INDOL), producción de ácido cianhídrico (HCN), además de su capacidad de producir diversas enzimas responsables en la actividad antagonista (lipasas, proteasas, celulasas, quitinasas, hemolisinas) datos representativos (Fig. 15), su capacidad de inhibir el desarrollo de *F. oxysporum* por medio de la producción de compuestos antifúngicos y por medio de la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs). Una vez obtenidos los datos del perfil bioquímico, se realizó una agrupación de conjuntos utilizando el sistema de Diagrama de Venn para conocer cuántas, y cuales características bioquímicas comparten cada una de las PGPR aisladas. De la colección de 10 PGPR solamente 3 resultaron positivos para todos los mecanismos bioquímicos analizados, las cuales corresponden a los aislados 712, 1193 y 1218 (Fig. 16). Es de suma importancia el conocer los mecanismos de acción que ejecuta cada una de las PGPR debido a que nos brinda información de acerca de cómo estarían participando en el desarrollo óptimo de la planta; el fósforo al ser un macronutriente esencial se encuentra en la mayoría de las veces escaso en el suelo debido a que su disponibilidad va a depender directamente de diversos factores como lo es: la actividad microbiana, el pH del suelo, el tipo de suelo, la cantidad de materia orgánica, y la capacidad de intercambio catiónico (CIC). Por lo tanto, aquellas PGPR capaces de solubilizar este mineral inorgánico (apatitas, la estregita y la variscita) poseen un mecanismo que implica la síntesis y exudación de ácidos orgánicos, y/o

la producción de las enzimas fosfatasas las cuales catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico, dando lugar al proceso de mineralización del fósforo orgánico, a sus formas asimilables de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) específicamente en los iones monobásicos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y dibásicos ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), los géneros de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Klebsiella* son capaces de solubilizar este tipo de mineral. Además del fósforo, el nitrógeno es un macronutriente esencial para el desarrollo de las plantas, existen un género de PGPR simbiótica (*Rhizobium*) capaz de desarrollar nódulos en las plantas en donde se lleva a cabo la transformación del  $\text{N}_2$  atmosférico a amoníaco ( $\text{NH}_4^+$ ) y después convertirlo a nitratos o nitritos según sea la necesidad de la planta en ese momento, sin embargo, también existen aquellas PGPR de vida libre como lo son las *Azotobacter*, *Azospirillum* y algunas del género de *Pseudomonas* capaces de cumplir esta misma función. (Khosro et al., 2024; Saeed et al., 2021; Santoyo, Alberto Urtis-Flores, et al., 2021).

Por otro lado, las PGPR producen diversas enzimas (lipasas, proteasas, celulasas, quitinasas, hemolisinas) las cuales están implicadas con la actividad antagonista a diversos agentes fitopatógenos, por tal razón se realizó el análisis para conocer su capacidad enzimática de cada una de ellas. En este caso, la agrupación por el sistema de Diagrama de Venn (Fig. 17) se identificó que solamente los aislados 1286, 1288, 728a comparten todas estas características (Tabla 6, Anexos). Un ejemplo común son las quitinasas las cuales son enzimas destruyen la pared celular fúngica y a su vez actuar como agentes de biocontrol para combatir las enfermedades de los cultivos, el género de *Streptomyces* en una bacteria promotora del crecimiento vegetal que secreta este tipo de enzimas en grandes cantidades, Wang en el 2023 mediante el uso de las quitinasas extraídas de una especie de *Streptomyces* observó que inhiben el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* hasta un 45% (Wang et al., 2023). Demostrando así que las PGPR no solo por los mecanismos de secreción de compuestos químicos con actividad antifúngica son capaces de inhibir el crecimiento de los agentes patógenos, sino que también la producción de este tipo de enzimas ayuda a contrarrestar el desarrollo de este tipo de microorganismos.

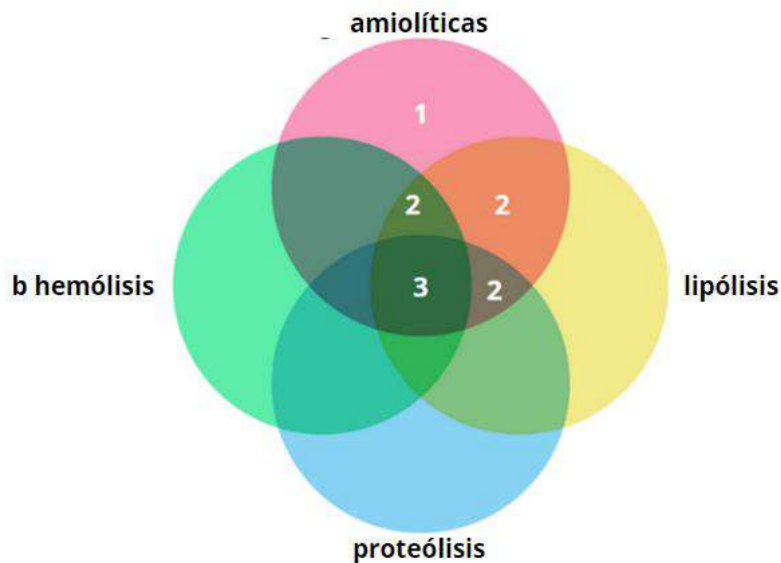


**Figura 15.** Pruebas bioquímicas para la identificación de mecanismos de acción de las PGPR. A) solubilización de fosfatos en medio Pikovskaya, B) solubilización de potasio en medio Alexander, C) detección de HCN en medio LB enriquecido con glicina, D) degradación de almidón teñido con Lugol, E) medio Tween 80 para la detección de lipasas, F) Producción de hemólisis en agar sangre.



**Figura 16.** Diagrama de Venn para la agrupación de las actividades metabólicas e inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* de las PGPR seleccionadas.





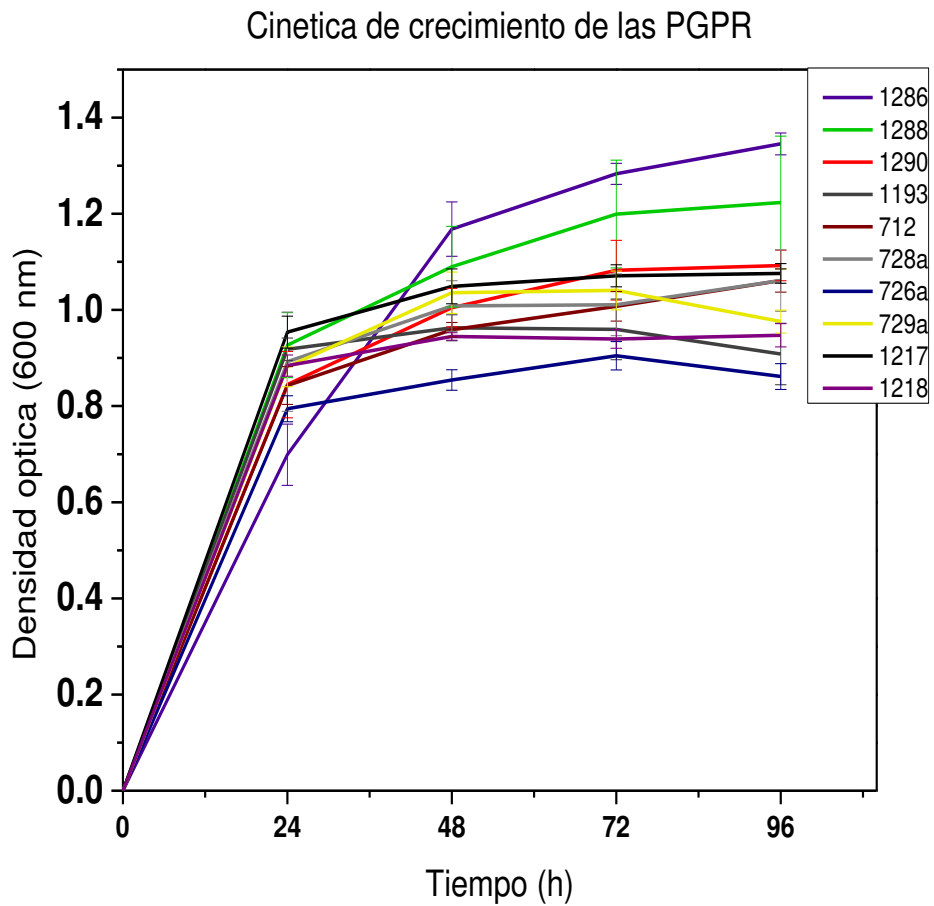
**Figura 17.** Diagrama de Venn para la agrupación de las actividades líticas presentes en las PGPR sujeto de estudio.

#### 5.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS PGPR

La curva de crecimiento de las PGPR puede variar según la especie y las condiciones específicas de cultivo, pero en términos generales, su estudio es crucial para entender cómo estas bacterias producen metabolitos secundarios para otorgar protección a las plantas en presencia de un ataque por algún agente fitopatógeno.

La cinética de crecimiento comenzó ajustando todas las PGPR a una DO inicial de 0.05, la cinética realizada nos muestra que la fase exponencial para la mayoría de las PGPR termina alrededor de las 48 h de crecimiento (Fig. 18), entrando enseguida a lo que es la fase de estacionaria que es aquella etapa donde se producen la mayor cantidad de metabolitos secundarios que van a ser útiles para la protección de la planta al verse atacada por algún agente patógeno y que además influyen el desarrollo de la planta (Khosro et al., 2024). De igual manera podemos observar que la mayoría de las cepas tienen un comportamiento similar de crecimiento llegadas las 96 h. Para este trabajo es de importancia el conocer el punto en donde va a comenzar la fase estacionaria, esto debido a que lo que estamos buscando es obtener la mayor cantidad de los metabolitos secundarios (antibióticos)

que puedan ser capaces de detener el crecimiento de los agentes fitopatógenos causales de algunas de las enfermedades en plantas, además que este tipo de compuestos también son señalizadores para la activación del sistema de defensa de la planta.



**Figura 18.** Cinética de crecimiento en caldo nutritivo de las PGPR empleadas en las bioformulaciones. Las PGPR se ajustaron a una  $DO_{inicial}=0.05$ , se incubaron durante 96 h a 28 °C/150 rpm. Se tomó muestra a lectura cada 24 h, se midió el valor de  $DO_{600}$ . El experimento se realizó por triplicado.

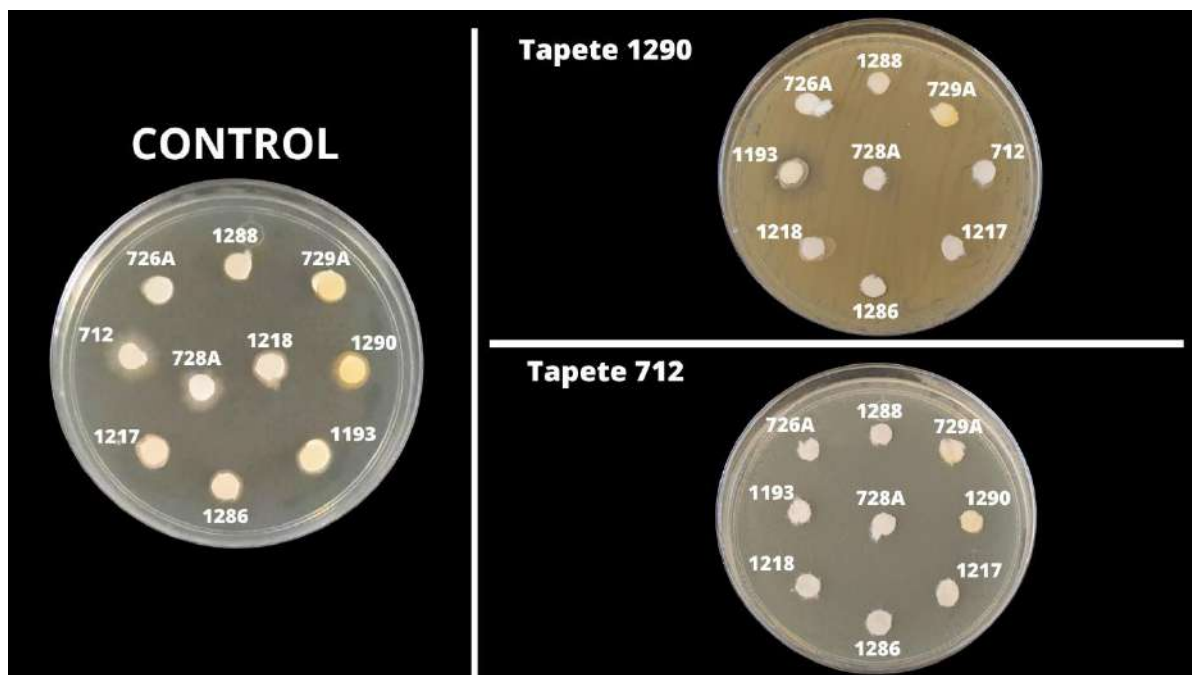
## 5.5 PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD ENTRE PGPR: FORMACIÓN DE CONSORCIOS (BIO-FORMULACIÓN)

Las comunidades microbianas sobreviven en la naturaleza interactuando entre sí de forma positiva o negativa, dando posibles tipos de asociaciones cooperativas entre especies en condiciones naturales, cuando existe una asociación entre individuos de diferentes especies, se denomina mutualismo que es donde ambas especies individualmente proporcionan beneficios a su contraparte al tiempo que mantienen el beneficio de la asociación. Para determinar si en la colección de PGPR (1286, 1288, 1290, 1193, 728a, 712, 729a, 726a, 1217, 1218) son compatibles entre sí, se aplicó la técnica de Kirby Bauer con ciertas modificaciones, la cual tiene como fundamento el determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico, en este caso se aplicó otro microorganismo, de esta forma fue posible identificar a aquellas PGPR cuyo crecimiento no es antagonizado por otras PGPR, aquellas bacterias que no fueron inhibidas se seleccionaron formar un consorcio (bio-formulación) que nos permita analizar su efectividad para combatir a *F. oxysporum* y a su vez que posea la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas; en la figura 19 se observa la técnica de Kirby-Bauer aplicada a las PGPR de estudio, en donde se aprecia el crecimiento de los aislados 1290 y 712 utilizados como tapete; sobre el cual se observó un halo de inhibición en respuesta al aislado 1193 en el caso de la bacteria 1290, además de un crecimiento nulo de las cepas 1288 y 729a indicando que estas 3 bacterias no podrían estar interactuando en un consorcio. En el caso de la PGPR 712, no se observó inhibición en respuesta de las demás PGPR de estudio dándonos un indicio de coexistencia entre ellas mismas, es decir sin existir efecto antagónico, una vez analizados los datos obtenidos, fue posible establecer dos bio-formulaciones denominadas DM1 y DM2 (Fig. 20).

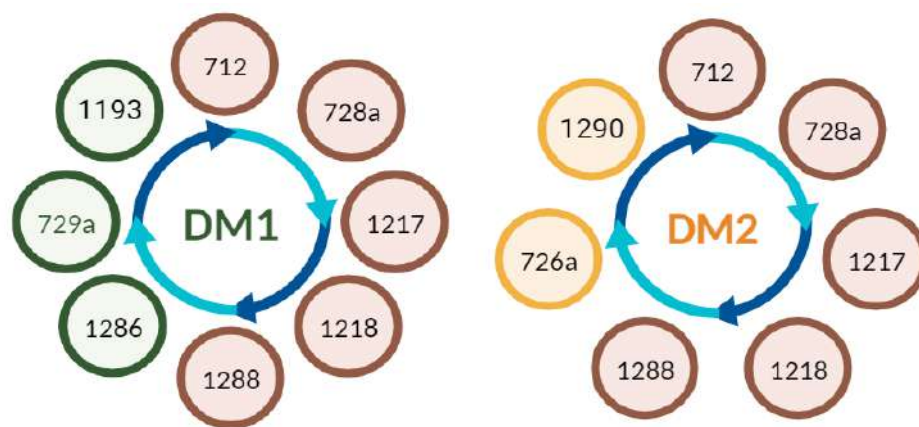
El implemento de consorcios bacterianos es más efectivo que el uso de bacterias individuales, impactando significativamente tanto en el manejo de cultivo como en el control de fitopatógenos, en el año 2018 Berendsen analizó la microbiota de *Arabidopsis* cuando se infectó con el hongo fitopatógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis*, descubriendo que las bacterias pertenecientes a los géneros de

*Xanthomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. y *Microbacterium* sp., juntas inducían a la ISR contra el mildiú y promovían el crecimiento de la planta, mostrando que las cepas de este consorcio bacteriano para el control de fitopatógenos son claramente compatibles debido a que por sí solas no lograban inducir la ISR, este dato refuerza el hecho de que un consorcio puede llegar a ser más eficaz con respecto al uso individual de las PGPR (Berendsen et al., 2018).

En general, las PGPR que se utilizan hoy en día para el desarrollo de consorcios bacterianos pertenecen al género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum* estos son algunas de los ejemplos mayormente estudiados de interacciones positivas entre plantas y PGPR que mejoran la disponibilidad de nutrientes en el suelo y favorecen el control de enfermedades causadas por fitopatógenos (Ghoghari et al., 2022; Santoyo, Guzmán-Guzmán, et al., 2021). En nuestro caso el consorcio DM1 está conformado por: PGPR del género *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Chryseobacterium*; y el DM2 está formado por PGPR del género *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*. Ambas bio-formulaciones tienen una base de PGPR en común la única diferencia entre ellas (DM1, DM2) radica que para el caso de DM1 se tiene la presencia de una PGPR fijadora de N<sub>2</sub> aislada de nódulo de frijol.



**Figura 19.** Determinación de la compatibilidad entre PGPR por el método de Kirby Bauer.- Se inoculó la PGPR de interés a manera de tapete sobre agar Müller Hinton, se inocularon en papel filtro el resto de PGPR. Posterior a la incubación de 48 h/28 °C, la ausencia de halo de inhibición indica compatibilidad.



**Figura 20.** Esquema gráfico de la conformación de la bio-formulación DM1 y DM2, los círculos en color café indican las PGPR que comparten ambas bio-formulaciones, en DM1 los círculos de color verde muestran las 3 diferentes PGPR con respecto a DM2 los círculos amarillos.

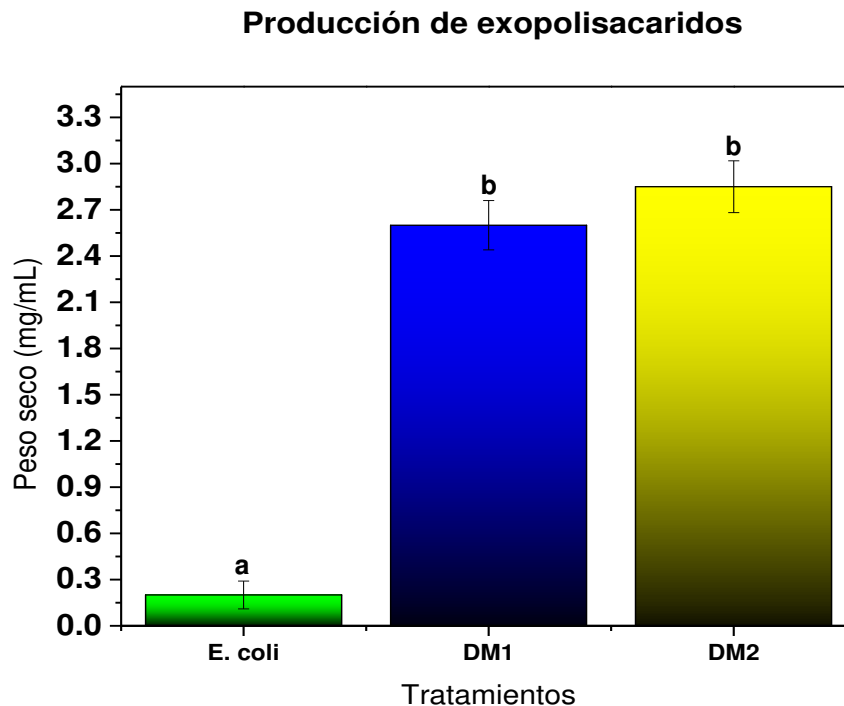
## 5.6 PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

La producción de exopolisacáridos (EPS) por las PGPR tiene relación con la su capacidad para llevar a cabo la colonización en la planta, la producción de estos polisacáridos tiene una ventaja selectiva otorgando a las bacterias asociadas a la zona radicular mayor eficacia en el proceso de nodulación, colonización endofítica y supervivencia. A este tipo de exopolisacáridos se unen cationes como lo es el  $\text{Na}^+$  disminuyendo su concentración en el suelo evitando que las plantas enfrenten estrés salino, grandes concentraciones de estos polisacáridos permiten a las plantas sobrellevar el efecto negativo de los factores abióticos presentes en la rizosfera. En esta zona los EPS entran en contacto con agregados del suelo alterando así la porosidad de éste teniendo así un mejor manejo de la traslocación del agua en dirección suelo-planta (Aeron et al., 2021). Se ha estudiado el género *Pseudomonas* sp. debido a su gran capacidad de secretar los tres tipos principales exopolisacáridos de mayor importancia como lo son: el Psl es un polisacárido rico en galactosa y manosa, que contribuye principalmente a la adhesión inicial y a la formación de biofilms maduros, el Pel polímero similar a la celulosa necesario para la formación de película en la interfaz aire-líquido, y los alginatos lineales formados por ácido  $\beta$ -1,4-mannurónico y ácido  $\alpha$ -L-glucurónico este último polisacárido solo es producido únicamente por dos géneros bacterianos de *Pseudomonas* y *Azotobacter*, en conjunto estos EPS son responsables de un fenotipo de colonia mucóide y también son los principales componentes de los biofilms bacterianos (Upadhyay et al., 2017).

Se evaluó la capacidad de las bio-formulaciones de producir exopolisacáridos los cuales se obtuvieron en medio YEM posterior a 72 h de incubación a 28 °C para después ser precipitados con acetona fría. El resultado obtenido indicó que DM1 produjo 2.44 mg/mL: mientras el caso de DM2 se obtuvieron 2.85 mg/mL, como control negativo se utilizó una cepa de *Escherichia coli* que produjo solamente 0.175mg/mL (Fig. 21).

En un estudio de Upadhyay en el 2014, evaluó la capacidad de *P. fluorescens* de crecer en un medio enriquecido con  $\text{Zn}^{2+}$  a una concentración de 5 mM donde encontró que el ion metálico ve favorecida la producción de EPS debido al proceso

de biosorción del  $Zn^{2+}$ . Además, en su estudio demostraron aumento en la presencia de alginato a diferentes concentraciones de iones metálicos ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ ) se unen a los EPS en respuesta a las interacciones electrostáticas, este tipo PGPR con propiedades promotoras del crecimiento en planta, y bio-controladoras de *F. graminearum* y *F. oxysporum*, se les puede dar un uso en el ámbito de la bio-remediación (Upadhyay et al., 2017; Upadhyay & Srivastava, 2014).



**Figura 21.** Producción de exopolisacáridos. El EPS sintetizado por las bacterias que conforman a DM1 y DM2 en medio YEM el cual se precipitó con acetona fría. Como control negativo se incluyó a *E. coli*. El experimento se realizó por triplicado. Datos analizados por el método de Tukey, confianza de 95%. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## 5.7 CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LA BIO-FORMULACIÓN DE PGPR EN CONTRA DE *F. oxysporum*

### 5.7.1 Antibiosis y cultivo dual

Las PGPR se caracterizan por su capacidad de protección que brindan a las plantas contra patógenos mediante diversos mecanismos, como lo son la antibiosis,

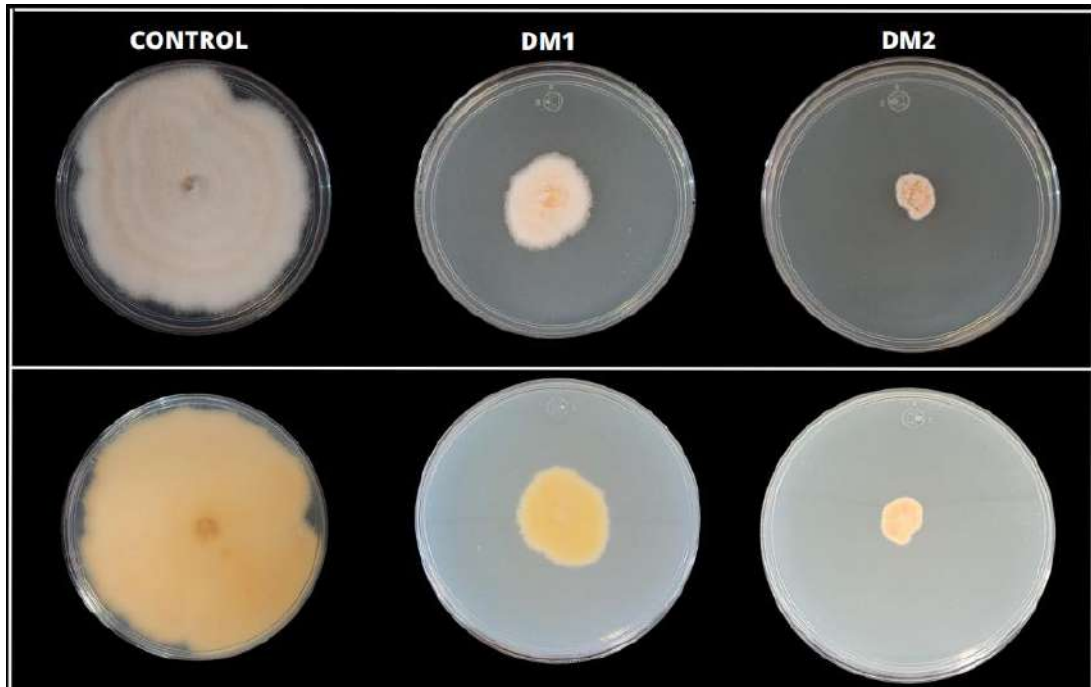
producción de sideróforos, producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) y enzimas degradadoras; la antibiosis es posiblemente el mecanismo más conocido y estudiado empleado por las PGPR para limitar la invasión del patógeno en los tejidos de la planta, la cual está dada por compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Narasimha Murthy et al., 2020). Para evaluar el efecto de las bio-formulaciones DM1 y DM2 en contra de *F. oxysporum* se realizaron diversos ensayos de antagonismo como lo es la prueba de antibiosis, cultivo dual (PGPR- *F. oxysporum*), efecto de los COVs, y el uso del extracto libre de células.

Los resultados obtenidos del efecto antagónico de DM1, DM2 para la prueba de antibiosis en la cual se midió el crecimiento radial del patógeno en respuesta a los exudados producido por la bio-formulación al medio de cultivo arrojaron un porcentaje de inhibición del  $83.3\% \pm 1.1b$  y  $91.1\% \pm 1.15a$  respectivamente para DM1 y DM2. Además del efecto inhibitor se observaron alteraciones en la coloración del micelio, reducción del tamaño de la colonia y en cuanto a la morfología de la colonia se logró apreciar un micelio endurecido en toda la zona de crecimiento solamente en el tratamiento con DM2, la bio-formulación DM1 solamente ocasionó una reducción del tamaño de la colonia manteniendo la morfología algodonosa característica de este patógeno (Fig. 22).

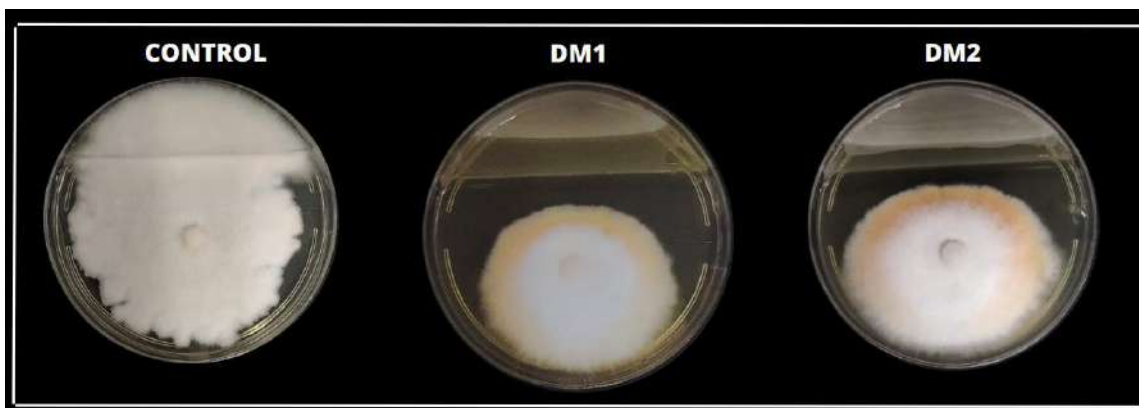
Para evaluar cómo es la interacción entre la bio-formulación (PGPR)/*F. oxysporum* se usó el método del cultivo dual (Fig. 23) donde se observó como la presencia de las bacterias generó una barrera evitando que el patógeno siga creciendo en la placa, mientras más cercano se encuentra el patógeno a la zona en donde se encuentra DM1 y DM2 se observaron cambios morfológicos en el micelio del hongo apreciando una mayor pigmentación en sus bordes, esto puede ser debido a los compuestos que están secretando las PGPR al medio de cultivo (enzimas, proteínas, metabolitos secundarios) que comienzan a difundir, así como un gradiente de COVs, en un estudio del 2022 realizado por el grupo de trabajo de Azeem se encontraron algunos aislados bacterianos provenientes del cultivo de maíz con fuerte actividad antifúngica los cuales fueron identificados como *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, ambos inhibieron a *F. oxysporum* en un 80% (Azeem et al., 2022). Barrera



en el 2021 seleccionó algunas PGPR del género *Burkholderia* determinó su efecto antagónico contra *F. oxysporum* en un sistema dual, observó que se genera una barrera que impide que el patógeno establezca contacto con las PGPR, así mismo observó cambios morfológicos en el hongo (Barrera-Galicia et al., 2021).



**Figura 22.** Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo producidos por las bio-formulaciones DM1, DM2 en contra *F. oxysporum*. Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Las bio-formulaciones se crecieron a 28 °C por 96 h sobre una membrana semipermeable. Posteriormente se retiró la membrana de celofán y sobre la caja impregnada de compuestos difusibles se sembró un disco de micelio del hongo. La placa se incubó por una semana a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por triplicado.



**Figura 23.** Ensayo del cultivo dual (PGPR-*F. oxysporum*). La bio-formulación se creció en la zona superior en medio nutritivo, mientras que en la zona inferior se creció a *F. oxysporum* en medio PDA. La placa se incubó por una semana a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por triplicado.

### 5.7.2 Compuestos orgánicos volátiles (COVs)

El papel de los COVs y el HCN en las interacciones PGPR-planta son fundamentales para activar el mecanismo de defensa de las plantas ante el ataque de los agentes patógenos. Varias especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* producen diferentes COVs, como lo son la 2-propanona, compuestos fenólicos, 1-decanol, entre otros. La producción de HCN es una importante actividad promotora del crecimiento de las plantas, a la vez que es tóxica significativamente contra varios fitopatógenos siendo efectivo en el control de infecciones fúngicas, inhibe a la enzima citocromo-C oxidasa en la cadena respiratoria y causa daño al metabolismo. Además, los COVs influyen en la expresión de genes implicados en la señalización hormonal, las vías defensivas y la tolerancia microbiana al estrés, la virulencia y la formación de biofilms.

Por esta razón se realizó un ensayo para analizar el efecto de COVs en el desarrollo de *F. oxysporum*. Se observó una disminución en el crecimiento de la colonia, y también cambio en la pigmentación de ésta, en el control se aprecia una tonalidad rosada, pero en los tratamientos el micelio pierde esta tonalidad quedando un micelio blanco algodonoso (Fig. 24), la presencia de los COVs arrojó una inhibición para DM1 de  $45.19\% \pm 3.39a$  y DM2 de  $34.07\% \pm 3.46b$ , las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Azeem en el 2022 probó el

efecto de los COVs para combatir a *F. oxysporum* mediante la técnica de la placa dividida, en un lado de la placa se coloca la PGPR de interés y en la otra zona se deposita al patógeno, encontrando que *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* reducen en un 25% el desarrollo de *F. oxysporum* (Azeem et al., 2022).



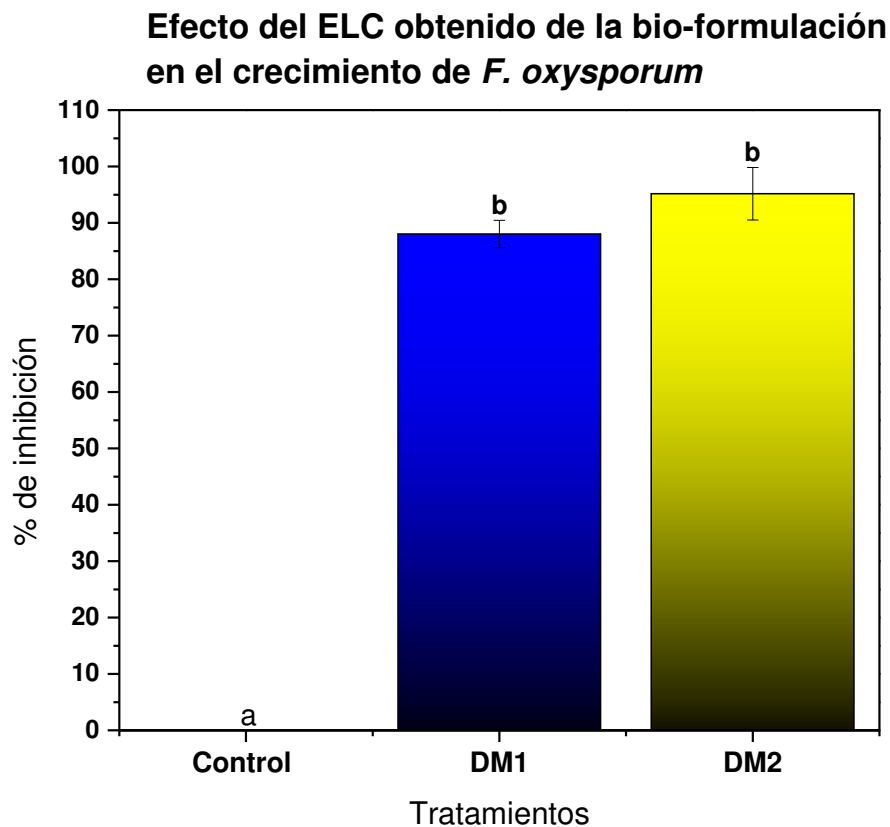
**Figura 24.** Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por las bio-formulaciones DM1, DM2 en contra *F. oxysporum*. La bio-formulación se creció en la zona superior en medio nutritivo, mientras que en la zona inferior se creció a *F. oxysporum* en medio PDA. La placa se incubó durante una semana a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por triplicado.

### 5.7.3 Efecto del extracto libre de células (ELC) en el crecimiento de *F. oxysporum*

En la actualidad en el ámbito de la postcosecha se usan recubrimientos en los alimentos (hortalizas) los cuales otorgan brillo, protección a agentes físicos y biológicos, sin embargo, algunos de estos pueden ser tóxicos sino se realiza un manejo correcto del alimento, es por eso por lo que se está buscando una alternativa amigable para el manejo postcosecha, por tal razón el uso del extracto libre de células es una técnica que se está usando hoy en día para combatir este problema. Se realizó la obtención del extracto libre de células (ELC) para cada bio-formulación y así evaluar si es capaz de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*, como se muestra en la figura 27 el uso de este extracto tuvo valores de inhibición para las bio-formulaciones de: DM1 88.03%  $\pm$ 2.43a y DM2 95.16% $\pm$ 4.65a.

En un estudio de Chávez en el 2019 donde evaluó el efecto de los ELC provenientes de *B. subtilis* contra *R. stolonifer*, permitió confirmar que pueden ser

eficaces para controlar la enfermedad en el cultivo de zarzamora (Chavez-Diaz et al., 2019). En una investigación del 2023 por parte de Liu evaluaron la eficacia de *Bacillus velezensis* en contra *P. digitatum* donde encontraron que *Bacillus* inhibió el crecimiento micelial, la germinación de esporas y efecto el desarrollo y alargamiento del tubo germinal de manera in vitro. En la parte de postcosecha el ELC otorgó una protección a los cítricos (mandarina) con hasta un 95% de sobrevivencia del fruto (Liu et al., 2023).



**Figura 25.** Efecto de inhibición del ELC obtenido de la bio-formulación en la producción de biomasa de *F. oxysporum*, el ELC se suplementa con Medio Mínimo y se inoculó micelio del hongo, posteriormente a una semana de incubación a 28 °C en agitación (150 rpm) se recuperó la biomasa producida. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%. El ensayo se realizó por triplicado.

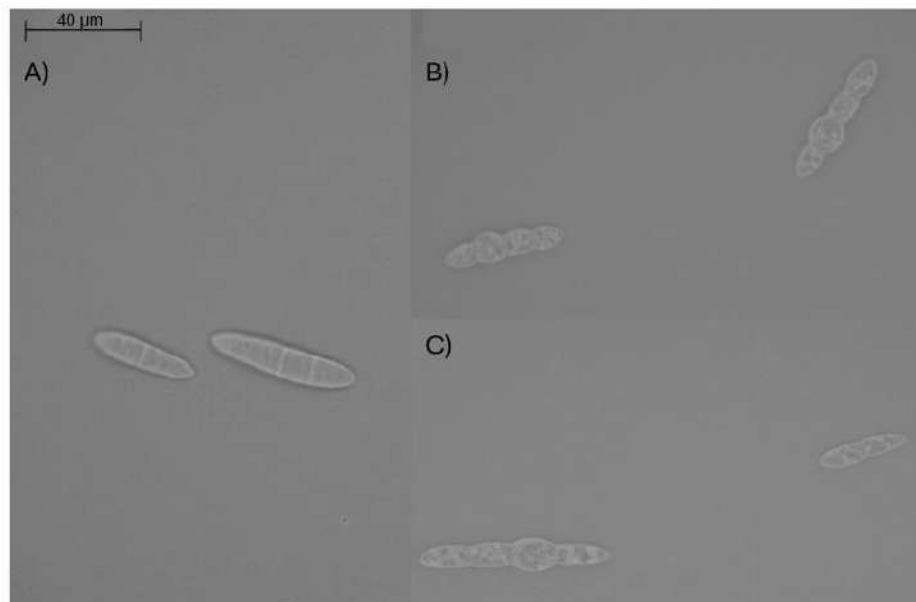
#### **5.7.4 Evaluación de los metabolitos producidos por la bio-formulación en la germinación de conidios de *F. oxysporum***

Para conocer si las bio-formulaciones producen metabolitos secundarios (MS) capaces de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*, se crecieron por 4 días en placas de PDA a DM1 y DM2 para posteriormente extraer los metabolitos secretados usando acetato de etilo y hexano de manera independiente para finalmente probarlos en contra de conidios del patógeno. Los resultados mostraron que los MS aplicados a una concentración superior a 0.3 mg con ambos solventes tanto para DM1 y DM2 ocasionaron daños en las conidias de *F. oxysporum* imposibilitando su germinación (Fig. 26). Así mismo como en la figura 27 se observan cambios estructurales en la forma de la conidia con respecto al control, ya no existe una uniformidad, los septos del conidio se logran ver rotos, la presencia de la hinchazón se aprecia al compararlos con el control además de lograrse apreciar una forma uniforme por todo el borde del conidio.

Previamente se han identificado varios metabolitos secundarios producidos por diferentes PGPR, los cuales tienen efecto antibiótico, por ejemplo, la kanosamina, butirrolactonas, ácido pseudomonico, pseudobactina, ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), fenazina-1-carboxamida (PCN), pioluteorina, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos entre otros. Los lipopéptidos (LP) se han estado estudiado últimamente debido al impacto en su modo de acción mediante la formación de poros en las membranas que causa una diferencia en los flujos de iones transmembrana que conduce a la muerte de la célula. También se ha informado que muchos LP tienen actividades antifúngicas inhibiendo el desarrollo de hongos por medio de la hinchazón de las hifas, degradación y ruptura de las membranas (D. Kumar et al., 2021; Patel et al., 2020; Tyc et al., 2016).



**Figura 26.** Actividad antifúngica de los metabolitos producidos por la bio-formulación en conidias de *F. oxysporum*. Los metabolitos se ajustaron a una concentración de  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , 2500 conidias fueron tratadas con la concentración indicada durante 8 h/  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente se inocularon gotas de  $15 \mu\text{L}$  en PDA, se incubaron por una semana a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por triplicado.



**Figura 27.** Cambios estructurales en las conidias de *F. oxysporum* expuestos a los metabolitos extraídos de las bio-formulaciones. Imagen tomada en el microscopio Leica LAS EZ (100x). A) Control B) Conidias expuestas a 1.2 mg de los MS de DM1 extraídos con Acetato de Etilo, C) Conidias expuestas a 1.2 mg de los MS de DM2 extraídos con Hexano.  $40 \mu\text{m}$

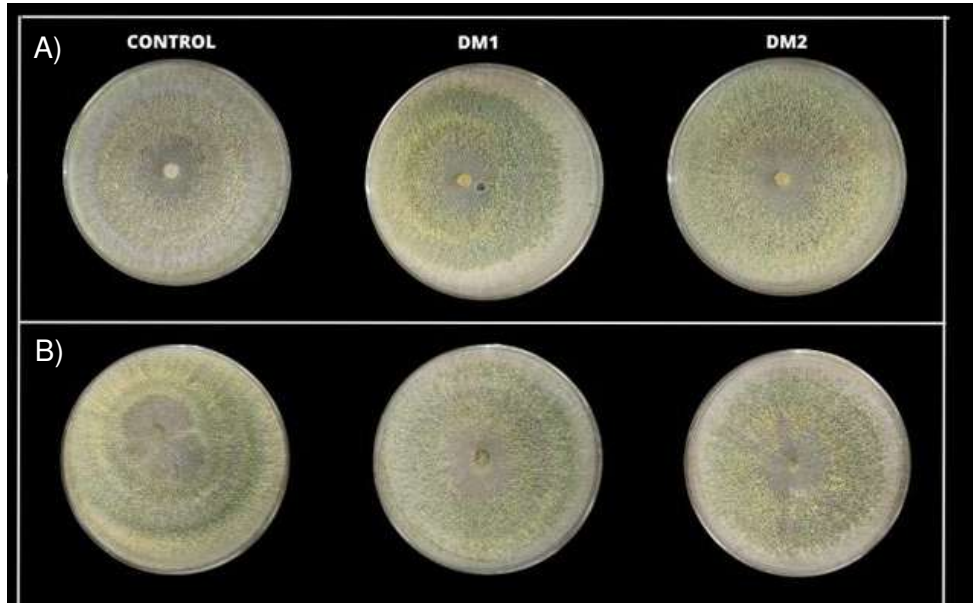
## 5.8 EFECTO DE LA BIO-FORMULACIÓN EN CONTRA DE *Trichoderma* sp .

*Trichoderma* es un género de hongos estudiado por su capacidad para colonizar las raíces de las plantas y además por sus propiedades antagónicas contra otros agentes fitopatógenos, es un hongo benéfico utilizado en la agricultura como un agente de control biológico y promotor del crecimiento vegetal (Guzmán-Guzmán et al., 2023; Izquierdo-García et al., 2020; Ponsankar et al., 2023). Las bio-formulaciones establecidas además de poseer diversos mecanismos de acción promotores del crecimiento, y ser capaces de antagonizar a agentes patógenos como *F. oxysporum* surgió la pregunta ¿Tendrá la bio-formulación algún efecto negativo a agentes beneficios que se encuentran en el suelo? Por tal razón se decidió usar a *Trichoderma* como aquel microorganismo benéfico que se encuentra asociado al desarrollo de las plantas.

Para ello realizamos un ensayo de antibiosis, en la figura 28 se observa la confrontación de la bio-formulación (DM1, DM2) en contra de dos cepas de éste hongo: El resultado obtenido indicó que ambas bio-formulaciones no tuvieron un impacto considerable en la disminución en la cantidad de conidia producidas por ambas especies de *Trichoderma* (Fig. 29) si bien la cantidad de conidias recuperadas en los tratamientos fue menor con respecto al control para cada uno de los tratamientos, esta cantidad de conidias no supera ni un orden de magnitud en la escala logarítmica, esto podría deberse a que ambos organismos que se confrontaron (PGPR-*Trichoderma*) tienden a tener una relación simbiótica con la planta, esto podría traducirse que al ser ambos organismos benéficos no sean capaces de antagonizarse debido a la presencia de alguna molécula señalizadora que les indique que realizan un función similar, o bien que el hongo tiene la capacidad de remodelar su pared celular ante la presencia de ciertos metabolitos (Guzmán-Guzmán et al., 2023).

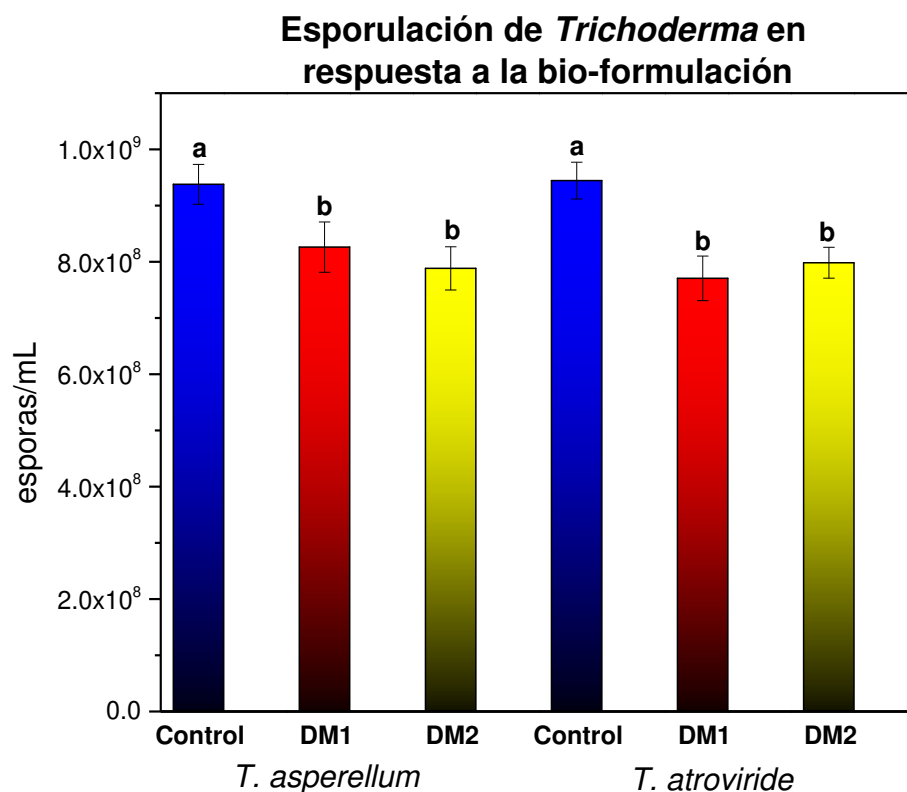
Otro efecto importante ejercido por parte de DM1 y DM2 en contra de *F. oxysporum* fue la producción de COVs. Analizamos la respuesta de *Trichoderma* ante éstos, en este caso como se logra apreciar como el hongo no es capaz de colonizar la zona en donde se encuentra presente la bio-formulación (Fig. 30), esto

podría deberse a que los COVs actúan como moléculas señalizadoras en respuesta a la presencia de otro microorganismo, ambos al poseer características similares en función a la asociación con la planta no son capaces de antagonizarse uno al otro.

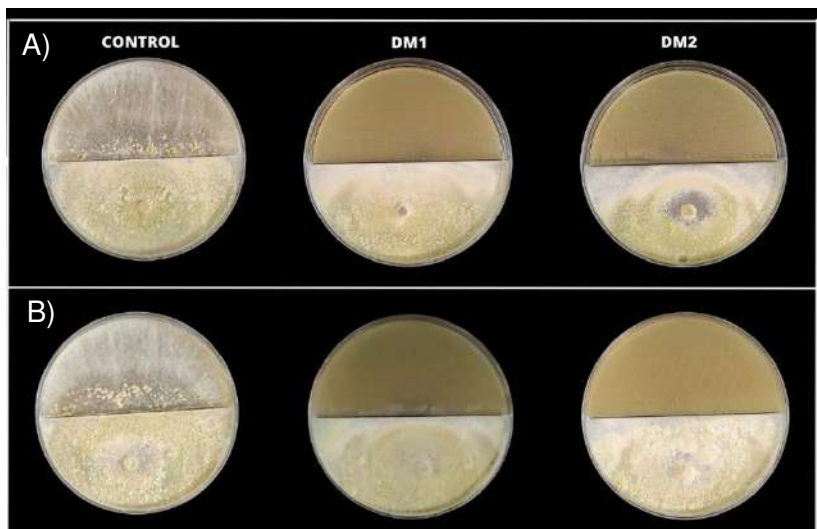


**Figura 28.** Efecto de la bio-formulación DM1, DM2 en el desarrollo de *T. asperellum* y *T. atroviride* por la técnica de antibiosis la cual consiste en la producción de metabolitos difusibles al medio de cultivo. Las bio-formulaciones se crecieron a 28 °C por 96 h sobre una membrana semipermeable, para después retirar esta e inocular una cantidad 500 conidias, la placa se incubó por 15 días a temperatura ambiente. Donde: A) *T. asperellum* B) *T. atroviride*.





**Figura 29.** Efecto de la antibiosis por parte de la bio-formulación en la esporulación de *Trichoderma*, las esporas se recolectaron con PBS a los 15 días de crecimiento por la técnica de raspado con varilla de triangulo, se procedió a realizar el conteo con la ayuda de la cámara de Neu-Bauer. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%. El experimento se realizó por triplicado.



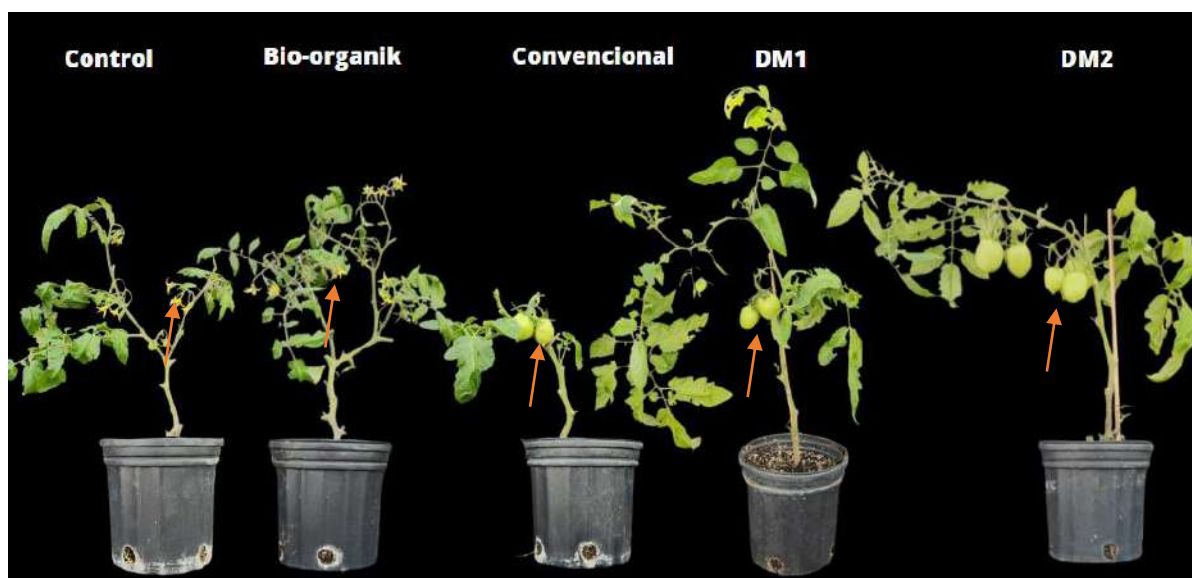
**Figura 30.** Efecto de los COVs producidos por la bio-formulación en el desarrollo de *Trichoderma*. La bio-formulación se creció en la zona superior en medio nutritivo, mientras que en la zona inferior se creció a *Trichoderma* en medio PDA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante una semana. El experimento se realizó por triplicado.

### 5.9 MANEJO DEL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

El tomate es hoy en día una de las principales hortalizas que se cultivan tanto en invernadero como a cielo abierto en México. Debido a su impacto en la exportación a países como EUA, Rusia, Reino Unido, China principalmente; para el año 2023 en México la superficie total cultivada con tomate fue de 44,814 Ha, representando el cultivo a campo abierto un 66% de la superficie total sembrada con tomate, mientras que el cultivo en invernadero representó el 16%. Sin embargo, la cosecha de tomate a campo abierto contribuyó con el 33% del total de tomate producido ese año, con respecto a la cosecha del cultivo en invernadero la contribución fue superior del 40% (Guía para producción de tomate, INIFAP). Por tal motivo en la agricultura moderna se están buscando nuevas metodologías para aumentar la producción del cultivo evitando de igual manera el uso irracional de compuestos químicos (fertilizantes, fungicidas) que están afectando la fertilidad de suelo, contaminando los mantos acuíferos y la diversidad del microbiota del suelo; es por eso por lo que en los últimos años se ha empezado a manejar los cultivos orgánicos y el manejo biológico de enfermedades.

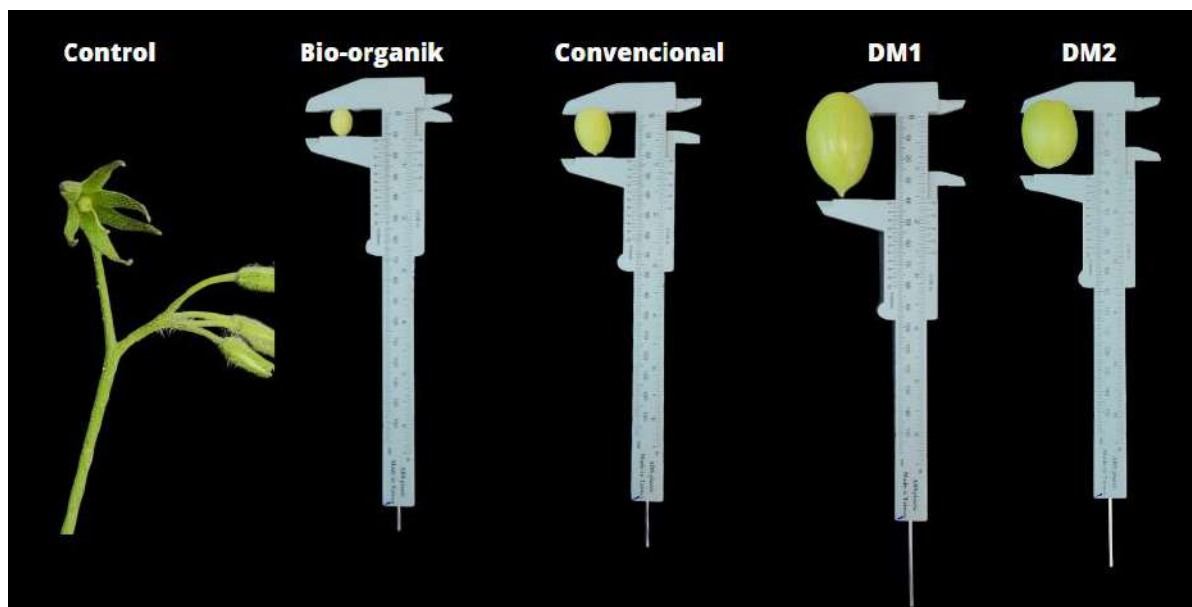
### **5.9.1 Efecto promotor del crecimiento de la bio-formulación en el cultivo de tomate**

Para conocer la capacidad de la bio-formulación (DM1, DM2) de promover el crecimiento vegetal se evaluó su efectividad con respecto a un método convencional usando fertilizantes (dosis de fertilizantes tomada del INIFAP para cultivo de tomate) y un producto orgánico comercial Bio-Organik (biofertilizante líquido a base de *Bacillus subtilis*, *Nitrobacter*). En la figura 31 se observa como posterior a los 130 días de crecimiento del cultivo, los tratamientos donde se está suministrando a DM1, DM2 ya se encuentran en la etapa de fructificación del segundo corte, mientras que el método convencional se encuentra en la primera etapa de fructificación, sin embargo los tratamientos usando Bio-Organik y el control se encuentran aún en la etapa de floración, este dato sugiere que las PGPR alteran las vías hormonales de la planta acelerando así su ciclo fenológico; el cultivo donde se implementan los fertilizantes muestra un desarrollo óptimo del cultivo encontrándose ya en la etapa de fructificación, sin embargo este tiene un retraso de aproximadamente 3 semanas en la etapa de fructificación con respecto al tratamiento de las bio-formulaciones. Al comparar el efecto obtenido con el producto Bio-Organik este aún se encuentra en la maduración de las flores para proceder al cuaje del fruto, mostrando así un retraso de aproximadamente 5 semanas con respecto a las bio-formulaciones.



**Figura 31.** Desarrollo del cultivo de tomate a los 130 días de crecimiento donde se aprecian las diferentes etapas fenológicas del cultivo, los tratamientos que llevan la bio-formulación se encuentran en la etapa de fructificación con respecto a los demás tratamientos.

Respecto al fruto (Fig. 32), en el caso del uso de la bio-formulación estimula claramente su desarrollo, puesto que los datos obtenidos a los 145 días de crecimiento muestran que el control se encuentra entrando a la etapa de amarre del fruto sin embargo en el tratamiento orgánico (Bio-Organik) y el convencional (fertilizantes) ya se encuentran en la etapa de fructificación pero al comparar estos resultados con las bio-formulaciones (DM1, DM2) los frutos de estos tratamientos ya se encuentran en un pleno desarrollo con una diferencia de tamaño contrastante con todos los demás tratamientos, esto podría deberse a la capacidad de este tipo de bacterias de estimular la producción de fitohormonas presentes en cada una de las etapas fenológicas (Lee et al., 2022). En la tabla 6 se encuentra resumida todas las etapas fenológicas del ciclo de cultivo. En un estudio de Lee en el 2022 encontró que la inoculación con *Rhodopseudomonas palustris* y una mezcla orgánica de fertilizantes (N/P/K 4:2:6) mejoró significativamente la cantidad de frutos de tomate (37%) con respecto al control y la calidad postcosecha (dulzor, sabor, vitamina C, compuestos fenólicos totales y licopeno) (Lee et al., 2022) .



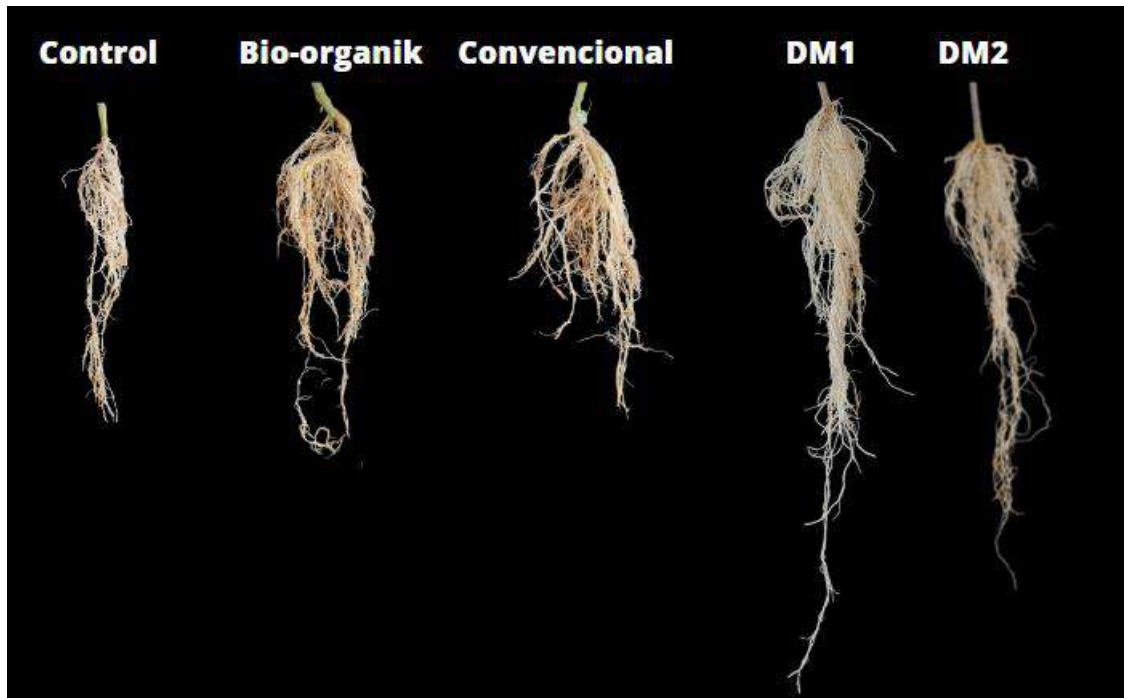
**Figura 32.** Etapa de fructificación en el cultivo de tomate. Se aprecia el efecto benéfico de la bio-formulación, la cual acelera el ciclo fenológico produciendo un fruto de mayor tamaño en menor tiempo.

**Tabla 6.** Efecto en los tratamientos en el ciclo fenológico del cultivo de tomate.  
\*Experimento realizado en el 2023.

Etapa/Tratamiento	Control	DM1	DM2	Convencional	Bio-Organik
<b>Siembra</b>	21 Agosto	21 Agosto	21 Agosto	21 Agosto	21 Agosto
<b>Trasplante</b>	16 Septiembre	16 Septiembre	16 Septiembre	16 Septiembre	16 Septiembre
<b>Floración</b>	15 Noviembre	19 Octubre	19 Octubre	31 Octubre	11 Noviembre
<b>Fructificación</b>	21 Diciembre	11 Noviembre	11 Noviembre	25 Noviembre	13 Diciembre

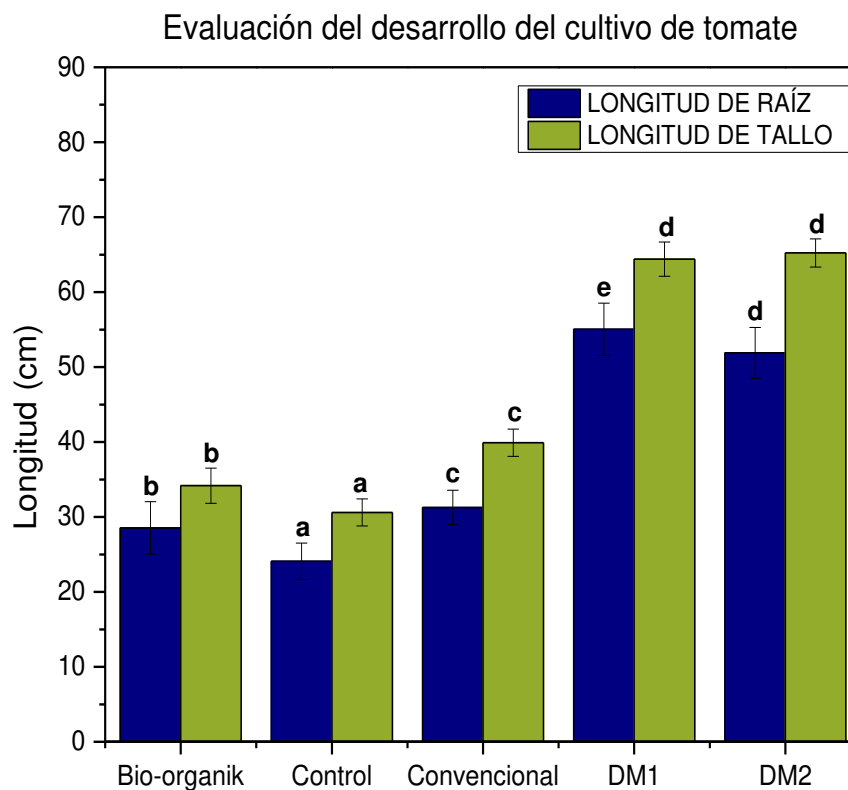
Al analizar el efecto ejercido por DM1 y DM2 en la zona radicular al compararlo con los tratamientos control podemos notar como las plantas donde se suministra DM1, DM2 poseen un mayor crecimiento en las raíces secundarias, esto debido a que las PGPR comienzan a asociarse en esta zona generando un acolchado de las raíces para que así exista una mejor toma de recursos por parte de

la planta, además se sabe que la zona radicular tiene que ser de buen espesor, tamaño para poder soportar el peso de la planta; al ver la zona radicular del tratamiento convencional solo se observa como esta tiene un desarrollo diminuto debido a que no existe una presencia microbiana que pueda ayudar al desarrollo de esta zona (Fig. 33).



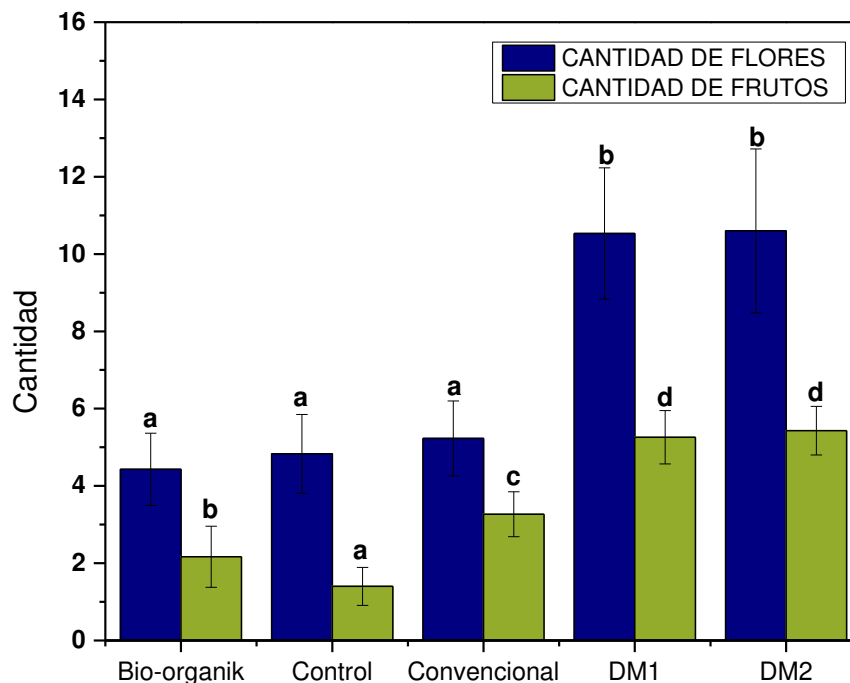
**Figura 33.** Desarrollo del sistema radicular del cultivo de tomate a los 130 días de crecimiento, donde se logra apreciar un incremento en el tamaño (volumen) en los tratamientos que llevan la bio-formulación.

Para corroborar que el uso de las bio-formulaciones incrementan el desarrollo vegetativo y aceleran el ciclo fenológico se realizaron los análisis estadísticos para cada uno de los puntos evaluados demostrando que los datos obtenidos del tratamiento DM1, DM2 se encuentran por encima de los tratamientos: convencional Bio-Organik y control, tanto en el desarrollo vegetativo como en la producción del fruto (Fig. 34, 35).



**Figura 34.** Efecto en el desarrollo de la zona radicular y sistema vegetativo del cultivo de tomate por medio del uso de la bio-formulación. Para la evaluación de la zona radicular se obtuvo lo siguiente: Control ( $24.06 \pm 2.343e$ ), Bio-Organik ( $28.53 \pm 3.51d$ ), Convencional ( $31.27 \pm 2.303c$ ), DM1 ( $55.03 \pm 3.49a$ ), DM2 ( $51.9 \pm 2.297b$ ). La evaluación del desarrollo vegetativo indico: Control ( $30.6 \pm 1.81d$ ), Bio-Organik ( $34.167 \pm 2.35c$ ), Convencional ( $39.9 \pm 1.82b$ ), DM1 ( $64.43 \pm 2.28a$ ), DM2 ( $65.23 \pm 1.88a$ ). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.

### Evaluación del desarrollo flor-fruto en el cultivo de tomate



**Figura 35.** Evaluación de los cambios fisiológicos (floración-fructificación) del cultivo de tomate mediante el uso de la bio-formulación. Indicando que los datos obtenidos para el estado de floración fueron: Control (4.83±21.02b), Bio-Organik (4.43±0.93b), Convencional (5.23±0.97b), DM1 (10.53±1.77a), DM2 (10.6±2.12a), mientras que en la etapa de fructificación se obtuvo que: Control (1.4±0.48d), Bio-Organik (2.167±0.79c), Convencional (3.26±0.58b), DM1 (5.26±0.60a), DM2 (5.43±0.62a). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.

El género *Bacillus* es reconocido por ser un agente promotor del crecimiento en plantas al tener la capacidad de asociarse al sistema radicular (bacteria epifita) y así establecer los mecanismos de acción directos mejorando así la absorción de nutrientes como el nitrógeno (N<sub>2</sub>) y fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), a su vez son capaces de aumentar la producción de fitohormonas como las auxinas, giberelinas, etileno, también producen la enzima ACC deaminasa, compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Ansari & Ahmad, 2019; Balderas-Ruíz et al., 2021; Drago, 2021;



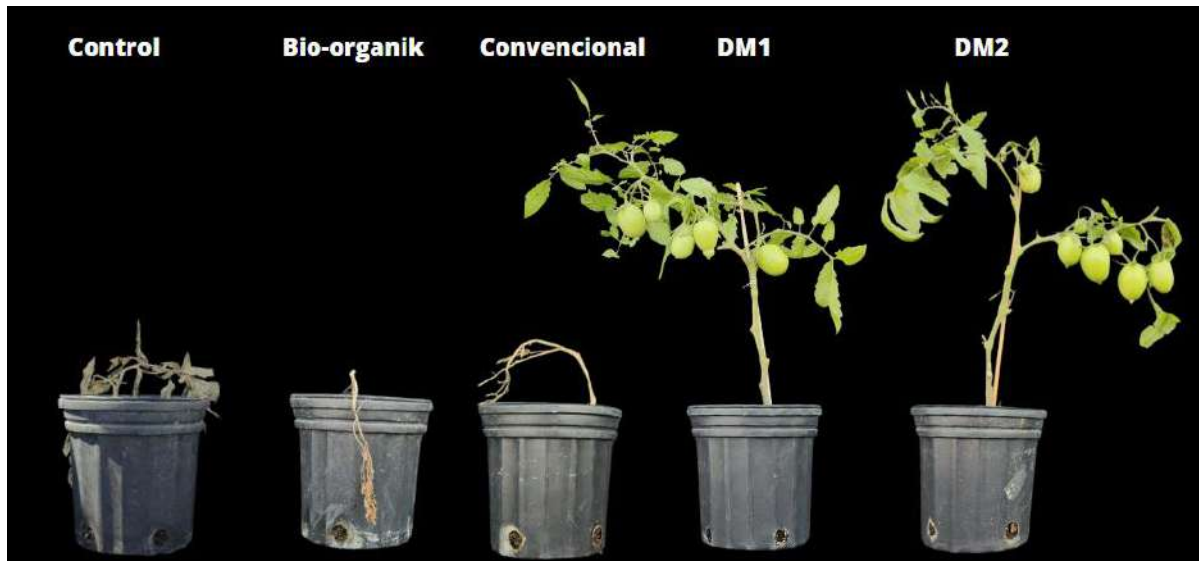
Prabhukarthikeyan et al., 2022). Otro género de gran importancia es *Pseudomonas*, existen diversas especies que son habitantes de la rizosfera y ostentan la capacidad de potenciar el crecimiento de las plantas, a través de mecanismos como la producción de fitohormonas (auxinas, ác. abscísico), biocontrol de fitopatógenos mediante la producción de toxinas, antibióticos y sideróforos y la mejora de la adquisición de nutrientes, además últimamente se han estado utilizando como agentes de biorremediación en aguas contaminadas de metales pesados (Álvarez-García et al., 2020; Ansari & Ahmad, 2019; D. Liu et al., 2017; Molina et al., 2020).

### **5.9.2 Manejo de la marchitez vascular en cultivo de tomate**

Otro aspecto de importancia en la producción agrícola es disminuir la pérdida económica debido a las enfermedades en plantas, su tratamiento ha ocasionado grandes daños en el ecosistema por el uso inconsciente de grandes cantidades de fungicidas principalmente aquellos del grupo de los carbamatos, organoclorados y organofosforados los cuales tienen residuos tóxicos que se persisten en los suelos.

Por ello se decidió evaluar su capacidad bio-controladora de las bio-formulaciones en contra de *F. oxysporum*, este hongo produce la enfermedad conocida como la marchitez vascular en este cultivo, principalmente ataca la zona radicular, para posteriormente continuar la infección al sistema vascular ocasionando la muerte de la planta. La enfermedad de la marchitez vascular en el cultivo de tomate se indujo por la infección de las plantas con  $2 \times 10^6$  conidias de *F. oxysporum* en la zona de la rizosfera de la planta, tanto la bio-formulación (DM1, DM2) como el producto comercial Bio-Organik elaborados a base de PGPR se evaluó su efecto protector a la planta, mientras que para el tratamiento convencional (fertilizante) se aplicó el producto PreVicur® energy (fungicida sistémico) como agente controlador de la enfermedad. Una evaluación realizada a los 130 días de crecimiento del cultivo

indica que a excepción de las bio-formulaciones (DM1, DM2) las plantas de ningún tratamiento lograron sobrevivir a la infección producida por *F. oxysporum* (Fig. 36)



**Figura 36.** Evaluación del efecto protector de la bio-formulación en contra de la marchitez vascular en tomate ocasionada por *F. oxysporum*. La infección del cultivo se realizó con  $2 \times 10^6$  conidias en la zona de la rizosfera a los 70 días de germinación. Posterior a los 130 días después del trasplante La bio-formulación DM1 y DM2 logró disminuir la incidencia a la enfermedad, permitiendo que las plantas completaran su ciclo fenológico.

Tanto DM1 como DM2 contrarrestaron la infección del patógeno llevando al cultivo a su etapa de fructificación, esto es debido a que este tipo de bacterias poseen ciertas características que ayudan a inhibir el desarrollo de enfermedades como lo es la producción de COVs las cuales son moléculas señalizadoras para la activación del sistema ISR el cual es el sistema de defensa propio de las plantas, este solamente se activa por la presencia de las PGPR en asociación a la planta, el cual induce las vías de defensas tanto físicas como químicas de la planta para así evitar que la enfermedad progrese, otro COV de importancia es el HCN el cual es una toxina para diferentes agentes fitopatógenos (Khosro et al., 2024), cabe mencionar que las bacterias (1286, 1288, 712, 1217, 1218, 1193) mostraron una elevada producción de HCN. Otro mecanismo involucrado en la protección es la producción de metabolitos secundarios que segregan las PGPR en presencia de este tipo de patógenos. Las plantas de los tratamientos con manejo convencional y Bio-Organik

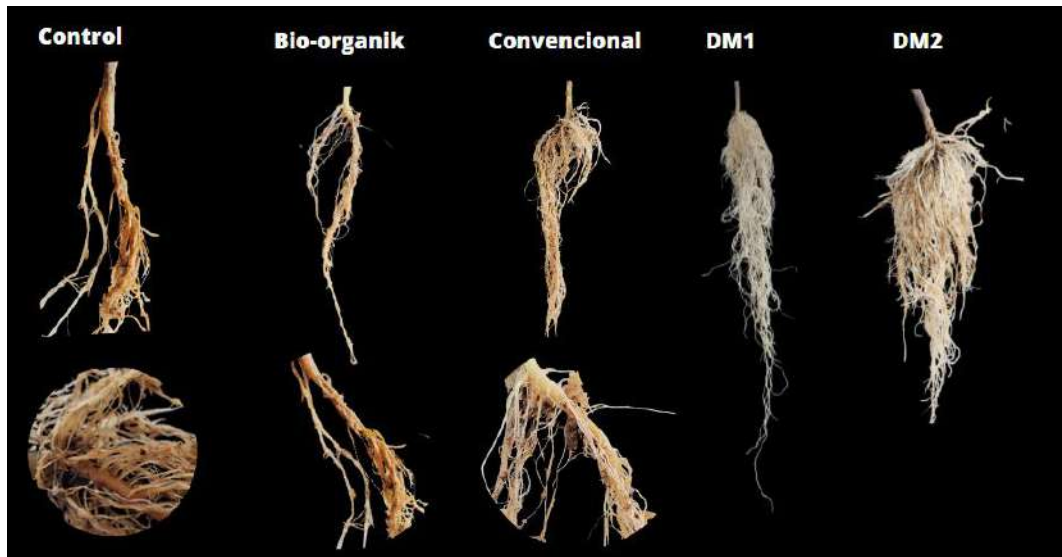
llegaron hasta la etapa de la floración, pero al tener el sistema vascular dañado, y un patógeno que se sigue alimentando de la poca savia bruta que está generando la planta imposibilita la maduración de las flores para un futuro cuaje del fruto. Al analizar los datos de supervivencia de las plantas infectadas se obtuvo que ambos tratamientos (DM1, DM2) tuvieron un valor arriba del 90% de tolerancia a la enfermedad con respecto a los demás tratamientos (Control, Bio-Organik y Manejo convencional (PreVicur® energy)) el cual fue menor al 10%. La tabla 7 muestra el calendario en resumen de las etapas presentes en el cultivo de tomate.

**Tabla 7.** Ciclo fenológico del cultivo de tomate expuesto a la marchitez vascular

Etapa/Tratamiento	Control	DM1	DM2	Convencional	Bio-Organik
<b>Siembra</b>	21 Agosto	21 Agosto	21 Agosto	21 Agosto	21 Agosto
<b>Trasplante</b>	16 Septiembre	16 Septiembre	16 Septiembre	16 Septiembre	16 Septiembre
<b>Infección con esporas de <i>F. oxysporum</i></b>	14 Octubre	14 Octubre	14 Octubre	14 Octubre	14 Octubre
<b>Floración</b>	13 Noviembre	19 Octubre	19 Octubre	31 Octubre	11 Noviembre
<b>Fructificación</b>	<b>X</b>	11 Noviembre	11 Noviembre	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Muerte de la planta</b>	19 Noviembre	<b>X</b>	<b>X</b>	21 Noviembre	21 Noviembre

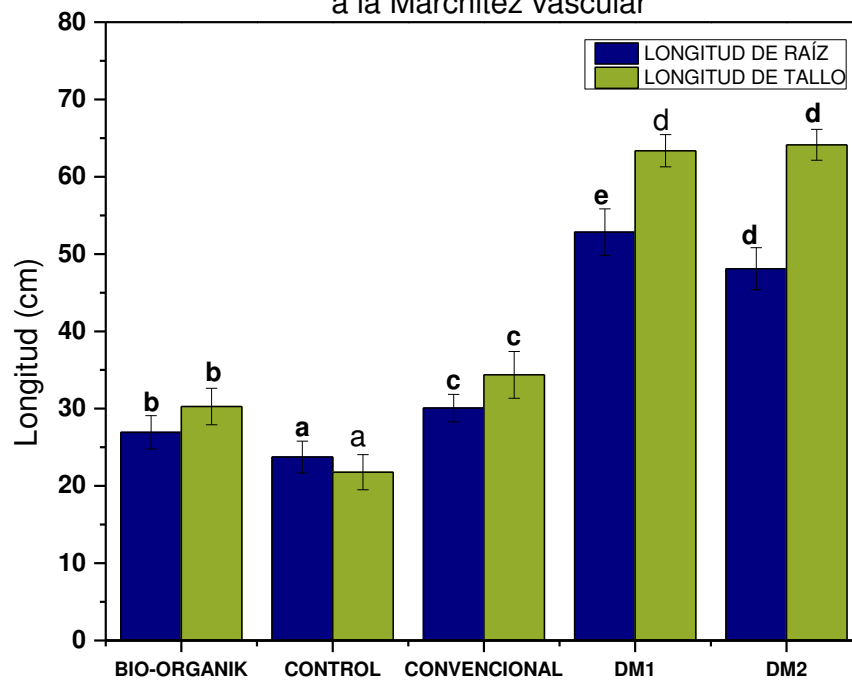
Por otra parte, el desarrollo del sistema radicular es vital para un buen crecimiento, producción, maduración de frutos (Afzal et al., 2019). En el ensayo de la marchitez se observa que el sistema radicular de las plantas enfermas (CONTROL, BIO-ORGANIK, CONVENCIONAL) está completamente dañado, hay oscurecimiento, pérdida de turgencia en todo el sistema vascular, sintomatología típica de la marchitez vascular, mientras que en los tratamientos en donde se inoculó a la bio-formulación podemos observar para DM1 un crecimiento normal de forma vertical con la presencia de raíces secundarias alargadas y cada una recubierta con

una gran cantidad de pelos absorbentes, mientras que para DM2 lo que se observó fue un crecimiento de manera horizontal donde para este caso las raíces secundarias son de un mayor grosor con respecto al tratamiento con DM1, aunque la presencia de pelos absorbentes fue menor (Fig. 37). Una vez realizados los análisis estadísticos para la medición del sistema radicular y tamaño de la planta se observa que los tratamientos donde se emplea la bio-formulación son estadísticamente diferentes con respecto a todos los demás tratamientos (Fig. 38-39).



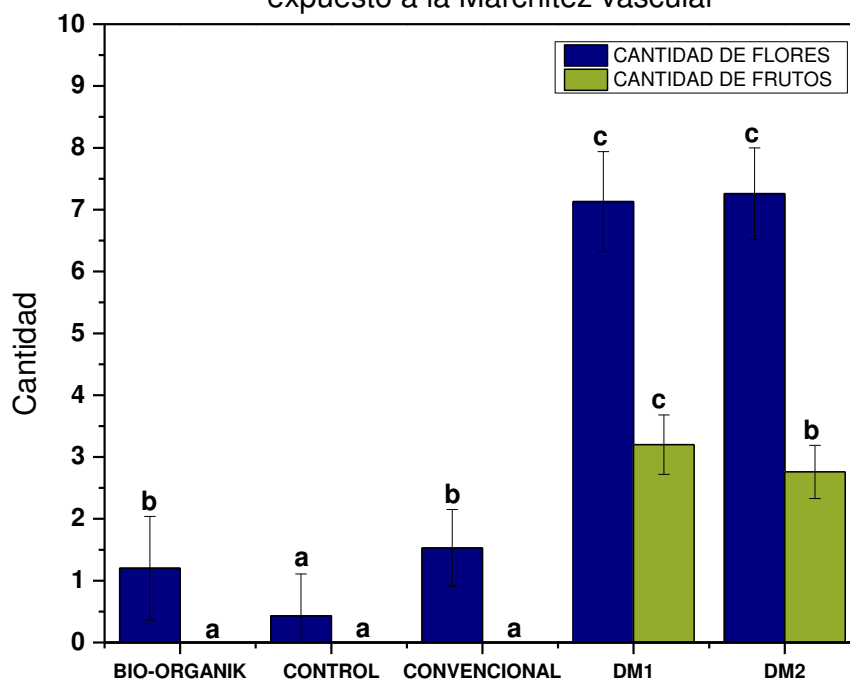
**Figura 37.** Efecto de la marchitez vascular en la zona radicular del cultivo de tomate a los 130 días de crecimiento, donde se observa como los tratamientos Control, Bio-Organik y Convencional muestran la sintomatología característica de esta enfermedad.

Evaluación del desarrollo del cultivo de tomate expuesto a la Marchitez vascular



**Figura 38.** Evaluación del desarrollo del cultivo de tomate expuesto a la marchitez vascular donde se evaluó la zona radicular indicando los siguientes resultados: Control ( $23.73 \pm 2.06e$ ), Bio-Organik ( $26.93 \pm 2.164d$ ), Convencional ( $30.06 \pm 1.78c$ ), DM1 ( $52.83 \pm 3.00a$ ), DM2 ( $48.1 \pm 2.72b$ ), la evaluación del desarrollo vegetativo indico: Control ( $21.76 \pm 2.26d$ ), Bio-Organik ( $30.26 \pm 2.363c$ ), Convencional ( $34.36 \pm 3.02b$ ), DM1 ( $63.36 \pm 2.0a$ ), DM2 ( $64.13 \pm 1.95a$ ). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.

Evaluación del desarrollo flor-fruto en el cultivo de tomate expuesto a la Marchitez vascular



**Figura 39.** Evaluación de los cambios fisiológicos (floración-fructificación) del cultivo de tomate expuesto a la marchitez vascular. Indicando que los datos obtenidos para el estado de floración fueron: Control ( $0.43 \pm 0.67c$ ), Bio-Organik ( $1.2 \pm 0.847b$ ), Convencional ( $1.5 \pm 0.62b$ ), DM1 ( $7.13 \pm 0.81a$ ), DM2 ( $7.26 \pm 0.74a$ ), mientras que en la etapa de fructificación se obtuvo que: Control ( $0 \pm NDc$ ), Bio-Organik ( $0 \pm NDc$ ), Convencional ( $0 \pm NDc$ ), DM1 ( $3.2 \pm 0.48a$ ), DM2 ( $2.76 \pm 0.43b$ ). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.

En el 2021 Minchev realizó una investigación de un sistema de suelo de tomate-Fusarium, comparó el efecto de biocontrol de las cepas microbianas individuales y los consorcios entre (*Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma*), alcanzando una tasa de supervivencia de las plantas por encima del 80%. (Minchev et al., 2021). En un estudio de Chen en el 2022 utilizó a *B. velezensis* como PGPR de estudio debido a su capacidad de antagonizar agentes fitopatógenos, encontrando que al realizar 3 inoculaciones con  $10^8$  UFC/mL en el cultivo de tomate

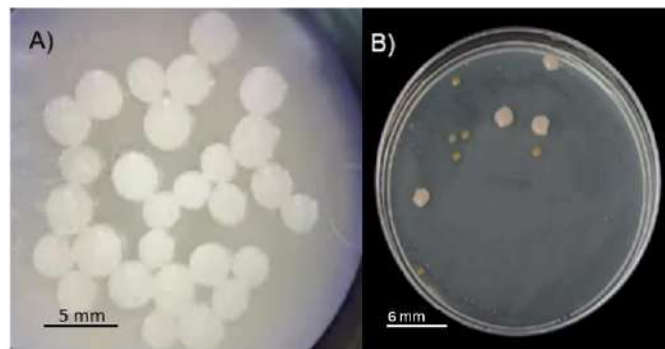
este es capaz de promover el crecimiento de la planta y a su vez de evitar el desarrollo micelial de *F. oxysporum*, esto lo asumen debido a la capacidad de esta PGPR de disminuir la concentración de ROS en la planta y a su capacidad de producir INDOL, también argumentan que *B. velezensis* se transloca desde la zona radicular por todo el sistema vascular (Chen et al., 2022).

## **5.10 ENCAPSULACIÓN, ESTABILIDAD Y LIBERACIÓN DE LAS DE PGPR**

### **5.10.1 Encapsulación de PGPR**

En la agricultura moderna, la encapsulación de las PGPR desempeña un papel trascendente para extender su viabilidad y mejorar su supervivencia frente a condiciones ambientales desfavorables; la encapsulación se basa en que una capa de recubrimiento envuelva a una sustancia activa o una mezcla de materiales, dicho esto las cápsulas protegen a todo aquello que se encuentra en su interior (PGPR) frente a las condiciones tanto bióticas como abióticas. Para la inmovilización de microorganismos se usa de manera común el polímero de alginato de sodio, para poder asegurar que las células resistan los cambios osmóticos se adiciona un compuesto osmoprotector (trehalosa) la cual ayuda a mantener la viabilidad después de tiempos prolongados, cambios a temperaturas etc (Li & Lucchesi, 2018; Panichikkal & Prathap, 2021; Vassilev, Vassileva, Martos, Garcia del Moral, et al., 2020b). En este caso se encapsularon los aislados 1288 (*P. mediterranea*) -1290 (*P. ananatis*) en alginato de sodio, se obtuvieron cápsulas esféricas (Fig. 40). Se eligieron estas dos PGPR debido a que se busca comprobar la eficiencia del proceso de encapsulamiento y liberación, estos dos aislados poseen la particularidad de ser morfológicamente distintos, lo que nos permite monitorearlos a lo largo del experimento. Aunado a ello, en un estudio previo se comprobó que este consorcio de 2 bacterias tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de varias cepas de *Fusarium* y de promover el crecimiento vegetal en Chile (Mendoza Jiménez, 2021). Posterior a realizar las pruebas de liberación determinamos que la eficiencia de encapsulación fue del  $98.7 \pm 0.411$  %. En un estudio previo de Panichikkal en 2021 evaluó la eficiencia de encapsular *Bacillus licheniformis* suplementadas con nanopartículas de quitosano y almidón de arroz obteniendo una eficiencia de

encapsulación del 99.66% mientras que en su estudio sin suplementos se obtuvo una eficiencia del 96.6% (Panichikkal et al., 2021). Pour describe una microencapsulación de *B. velezensis* usando una combinación de gomas naturales con hasta un 92% de eficiencia (Moradi Pour et al., 2024). En nuestro caso, el porcentaje de encapsulación alcanzó un nivel aceptable por arriba del 98% el cual logra ser competitivo con los datos reportados con otros sistemas de encapsulación, aunque es importante destacar que fueron otras las bacterias encapsuladas.



**Figura 40.** Cápsulas y liberación del consorcio 1288 (*P. mediterranea*)-1290 (*P. ananatis*). Se utilizó al alginato de sodio como agente encapsulante suplementado con trehalosa al 10%, la encapsulación se realizó en una solución de  $\text{CaCl}_2$  pH 4. La liberación se realizó en PBS (Phosphate buffer saline). La placa se incubó a 28 °C por 48 h. A) Cápsulas de alginato observadas en el estereoscopio Leyca (60x), B) Morfología de las 2 PGPR encapsuladas, colonia color amarillo (*Pantoea ananatis*), colonia color crema (*Pseudomonas mediterranea*).

#### 5.10.2 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA VIABILIDAD DE LAS PGPR ENCAPSULAS A DIFERENTES TEMPERATURA Y TIEMPO

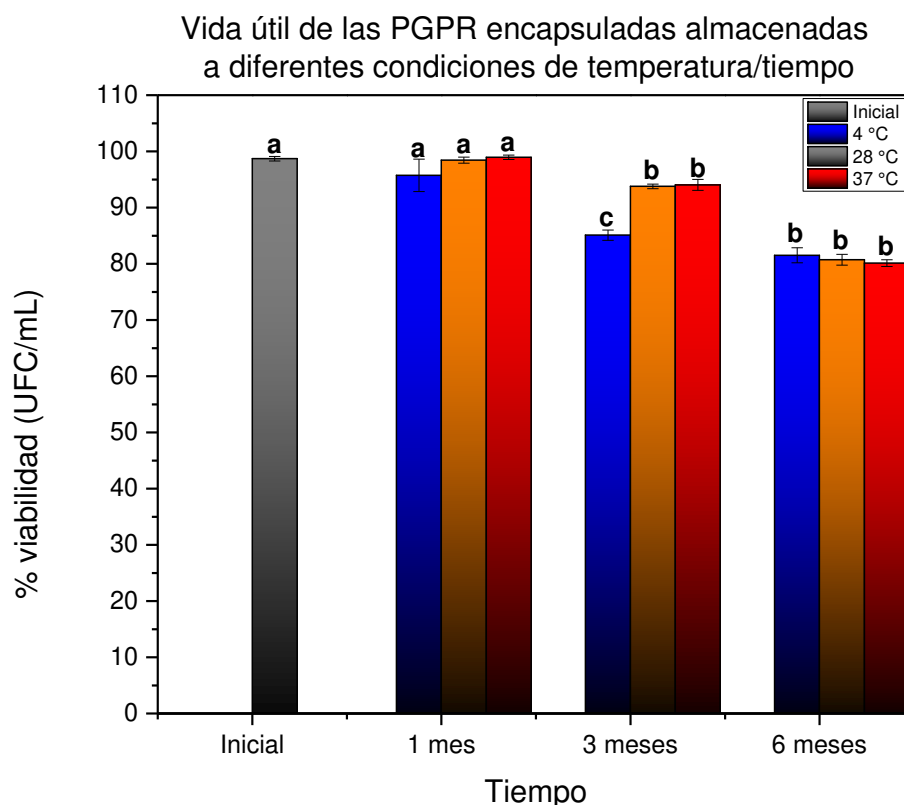
Un aspecto importante al realizar un bio-inoculante es evaluar la vida útil de los microorganismos con los que se está trabajando, por esta razón se determinó la viabilidad celular de las PGPR encapsuladas expuestas a diferentes condiciones de almacenamiento (tiempo/temperatura), los tiempos de almacenamiento fueron un mes, 3 meses y 6 meses posterior a llevarse a cabo la encapsulación, a sí mismo se evaluaron tres temperaturas de almacenamiento (4, 28 y 37 °C) por cada uno de los tiempos indicados.



A los 30 días de almacenamiento se observó que a una condición de temperatura de 4 °C el porcentaje de viabilidad fue de  $(95.81 \pm 2.88a)$ , para 28 °C de  $(98.47 \pm 0.543a)$  y para 37 °C de  $(95.81 \pm 2.88a)$  esto nos indica que las PGPR encapsuladas en este primer periodo de almacenamiento logran mantener la viabilidad reportada inicialmente que fue del 98.7%. Sin embargo, a los 3 meses de almacenamiento se determinó nuevamente el porcentaje de viabilidad celular donde se obtuvo lo siguiente: para 4 °C fue del  $(85.44 \pm 0.913c)$ , a 28 °C de  $(93.77 \pm 0.393b)$  y a 37 °C de  $(94.03 \pm 0.98b)$ , se aprecia que para las temperaturas altas (28, 37 °C) la viabilidad celular se mantuvo con respecto a la inicial (98.7%), sin embargo, las cápsulas que se mantuvieron a 4 °C mostraron una disminución de más del 10% (Fig. 41), esto podría deberse al almacenamiento en una temperatura fría (4 °C) debido a que los microorganismos al encontrarse en un ambiente desfavorable para su desarrollo entran en un estado de latencia el cual les permite ahorrar la mayor cantidad de energía posible, por lo tanto, se puede suponer que al entrar nuevamente a un estado en donde se encuentren con los recursos necesarios para su desarrollo estas deberán de adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento, por lo tanto su desarrollo óptimo se ve retrasado en comparación con los demás tratamientos que se encuentran a unas condiciones de temperatura más favorables para su desarrollo. En el 2021 Fathi evaluó la sobrevivencia a los 60 días posterior a la encapsulación de *P. flourecens* usando concentrado de proteína de suero de leche como aditivo de mejora, encapsulado en una matriz de alginato de sodio, el cual se almacenó a 4 °C, sin embargo, posterior a 90 días el valor del porcentaje de sobrevivencia de esta bacteria bajó a un 75% (Fathi et al., 2021).

Finalmente se realizó la evaluación de la viabilidad celular a los 6 meses de almacenamiento, en este punto se observó como el índice de viabilidad bajo significativamente con respecto al reportado inicialmente (98.7%), se encontró que para una temperatura de 4 °C el valor de la viabilidad fue de  $(81.5 \pm 1.33)$ , a 28 °C fue de  $(80.72 \pm 0.954)$  y para 37 °C de  $(80.12 \pm 0.614)$ , con estos resultados se logra apreciar una reducción del 19% con respecto a lo reportado inicialmente, se conoce que la adición de aceites brindan un efecto protector para los microorganismos

encapsulados debido a que este se va reduciendo en primera instancia evitando daños celulares a los microorganismos encapsulados, a su vez el uso de la trehalosa como aditivo para las capsulas está actuando como un agente osmoprotector debido a que los microorganismos que se enfrentan a condiciones de estrés abiótico la trehalosa actúa y protege la membrana plasmática sustituyendo moléculas de agua mediante enlaces H y uniendo grupos de cabezas polares de los fosfolípidos u otras macromoléculas localizadas en la membrana celular (Corcoran et al., 2007; Onwe et al., 2022). Riaz y su equipo de trabajo en el 2023 realizó el encapsulamiento de *Azospirillum brasilense* en una matriz de alginato de sodio en donde se evaluó el % de viabilidad al mes posterior a realizar la encapsulación descubriendo que la misma concentración se mantuvo, disminuyó un 5% a los tres meses y se redujo a un 76% a los siete meses de almacenamiento a temperatura ambiente, ellos proponen que el alginato aporta nutrientes en forma de almidón, proteínas, lípidos y azúcares a las células encapsuladas (Riaz et al., 2023).

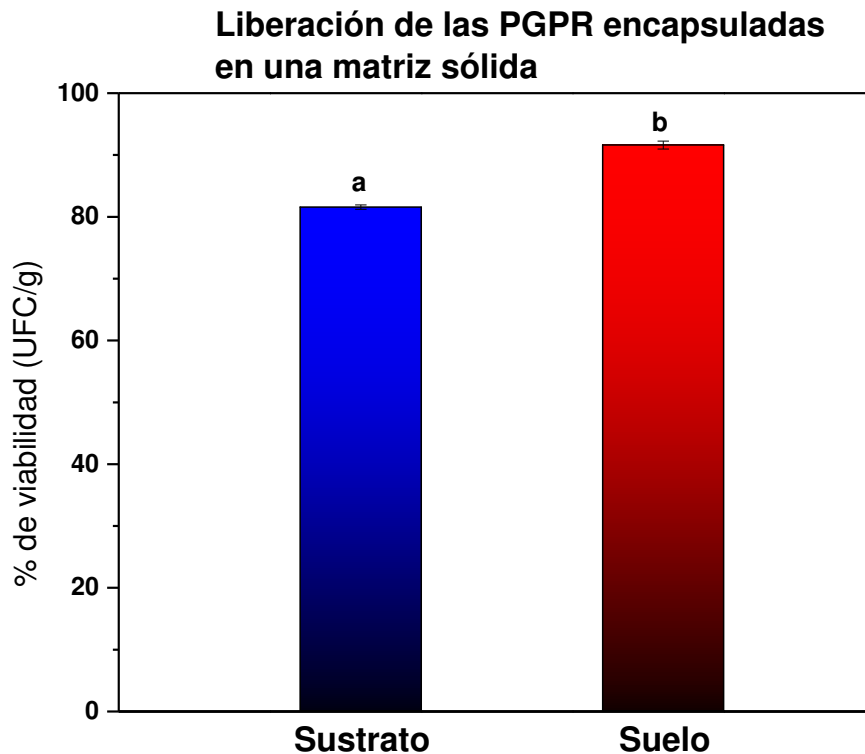


**Figura 41.** Representación gráfica de la vida útil de las PGPR encapsuladas en una red polimérica de alginato de sodio adicionada con trehalosa al 10% expuestas a diferentes condiciones de almacenamiento (tiempo/temperatura). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.

### 5.10.3 Liberación de las PGPR en una matriz sólida (mezcla de sustrato y suelo arcilloso)

Para asegurar que esta encapsulación puede tener un uso en la aplicación de cultivos es necesario evaluar el porcentaje de liberación en una matriz sólida, en este caso se decidió usar sustrato comercial (peat moss-agrolita) y un suelo arcilloso, se eligieron estas matrices debido a su uso en el cultivo de tomate tanto en invernadero como a cielo abierto. Para ello se utilizaron cápsulas con una semana de preparación. El porcentaje de liberación en sustrato fue de  $(81.54\% \pm 0.646b)$ , mientras que en el suelo arcillosos alcanzó hasta un  $(91.06\% \pm 0.363a)$  (Fig. 42), para que proceda a

disolverse la cápsula es necesario que ocurra un intercambio iónico adentro de la matriz de alginato, esto se debe que en el proceso de encapsulación (gelificación) una fuente externa del ion  $\text{Ca}^{2+}$  se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica del ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel, por lo tanto para que se lleve a cabo la liberación se ocupa de un intercambio iónico para liberar al  $\text{Ca}^{2+}$  el cual funge como puente de enlace entre las 2 moléculas de alginato, para esto es común el uso de soluciones que contengan iones intercambiables como es el PBS el cual posee grandes cantidades del ion  $\text{PO}_4^{3-}$  el cual sería la molécula que podría capturar al ion  $\text{Ca}^{2+}$ , como el suelo posee una diversidad de iones tales como fosfatos  $\text{PO}_4^{3-}$ , sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), etc., estos iones tendrían la función de romper la capsula en el proceso de liberación, por ese motivo se obtuvo un mayor porcentaje de liberación con respecto al sustrato debido a que este carece de grandes cantidades de estos iones intercambiables (Ravichandran et al., 2022; Riaz et al., 2023).



**Figura 42.** Liberación de las PGPR encapsuladas en la red polimérica de alginato disueltas tanto en sustrato (peat moss-agrolita-vermiculita) ( $81.54 \pm 0.646$ ), suelo (arcilloso) ( $91.06 \pm 0.363$ ). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.

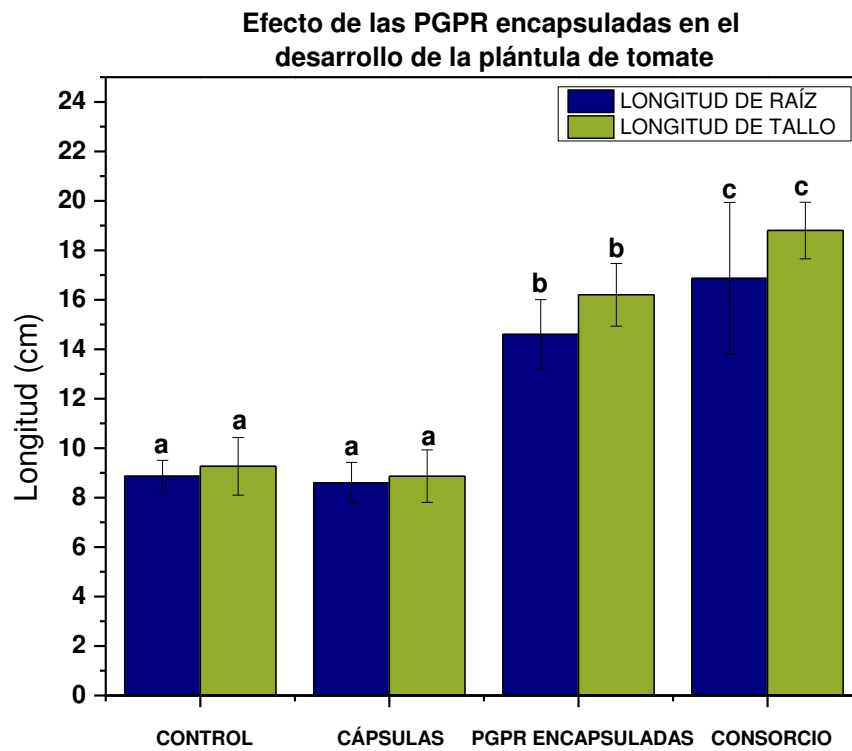
### **5.11 ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA PLÁNTULA DE TOMATE POR EL EFECTO DE LA LIBREACIÓN DE LAS PGPR ENCAPSULADAS**

Las PGPR se emplean hoy en día como una alternativa para el manejo agroecológico con el fin de mejorar el rendimiento de los cultivos y disminuir la incidencia de las enfermedades de las plantas. El uso indiscriminado de compuestos agroquímicos (fertilizantes, fungicidas) están afectando negativamente la fertilidad del suelo y el funcionamiento del microbiota del suelo, es por ello por lo que se están generando métodos innovadores para poder introducir a las PGPR en el suelo y así poder asegurar su rendimiento óptimo.

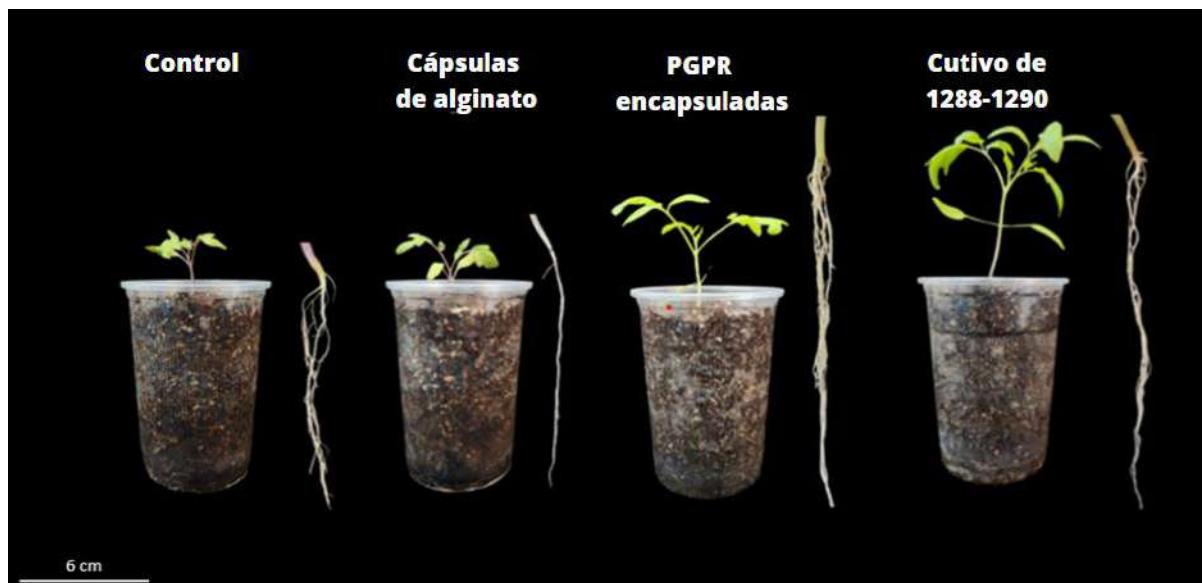
Para poder saber que las PGPR encapsuladas están teniendo un efecto benéfico en la planta primero se debe de conocer como es la liberación de estas en la matriz solida (sustrato o suelo) donde se quiera llevar a cabo el ensayo en planta.

#### **5.11.1 Efecto de las PGPR encapsuladas en el desarrollo de la plántula de tomate**

Evaluamos el efecto promotor de crecimiento en el desarrollo de la plántula de tomate al usar las cápsulas que contienen en su interior a las PGPR. Para este ensayo se utilizaron los siguientes tratamientos: control, cápsula de alginato vacía, PGPR encapsuladas y el consorcio 1288-1290 en cultivo líquido. El experimento tuvo una duración de 40 días aproximadamente, posterior a ello se tomaron mediciones de la zona radicular y de la longitud del tallo (Fig. 43, 44). Se observa como el tratamiento en el cual se usa el cultivo líquido de las PGPR tiene un mayor efecto tanto en el crecimiento del tallo como en la zona radicular, se observa una gran cantidad de hojas verdaderas, un tallo grande y rígido de aproximadamente 18 cm y una zona radicular de gran extensión vertical (16 cm) con gran cantidad de raíces secundarias. Por otro lado, las PGPR que se liberaron de las capsuladas también mostraron un efecto benéfico en el desarrollo de la plántula con un tallo de aproximadamente 16 cm y una zona radicular de 14 cm aproximadamente ambos análisis mostraron una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, que al compararse con el control se logra observar un aumento en ambos parámetros establecidos. Ambas PGPR usadas en el estudio presentan diversos mecanismos promotores del crecimiento como por ejemplo *P. ananatis* solubiliza fosfatos, produce ácido indol-3-acético y en estudios previos se conoció la inoculación de esta PGPR al cultivo de arroz mejoró de forma evidente el crecimiento de las raíces y los brotes además de ser una PGPR con características endófitas (Lu et al., 2021b).



**Figura 43.** Efecto en el desarrollo de la plántula de las PGPR (encapsuladas y en cultivo líquido). Se realizaron aplicaciones semanales de las PGPR encapsuladas y libres en cultivo en plántulas de tomate. El experimento duró 45 días posteriores a la germinación.



**Figura 44.** Efecto en el desarrollo radicular y del tallo de la plántula de tomate por acción de las PGPR encapsuladas. Los resultados de longitud en la zona radicular fueron: Control ( $8.86 \pm 0.64c$ ), Cápsulas vacías ( $8.6 \pm 0.828c$ ), PGPR encapsuladas ( $14.6 \pm 1.40b$ ), PGPR en cultivo líquido ( $16.867 \pm 3.06a$ ). Las mediciones de la longitud del tallo: Control ( $9.267 \pm 1.16c$ ), Cápsulas vacías ( $8.86 \pm 1.06c$ ), PGPR encapsuladas ( $16.2 \pm 1.26b$ ), PGPR en cultivo líquido ( $18.8 \pm 1.14a$ ). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.



## 6 CONCLUSIONES

La identificación molecular de las bacterias utilizadas indicó que corresponden a los géneros: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter* y *Pantoea*, todas ellas tienen características bioquímicas para ser consideradas PGPR.

Fue posible establecer dos consorcios bacterianos DM1 (describir) y DM2 (describir), los cuales mostraron actividad antagónica en contra de *F. oxysporum* superior al 85% en experimentos *in vitro*.

Los metabolitos secretados al medio de cultivo PDA por los consorcios DM1 y DM2 extraídos tanto con acetato de etilo como con hexano inhibieron la germinación de los conidios de *F. oxysporum*.

El efecto promotor de crecimiento ejercido por DM1 y DM2 se evidenció en el desarrollo de la estructura radicular y el crecimiento vegetativo del cultivo de tomate, en donde se observó una zona radicular de mayor tamaño, una mejora en el crecimiento vegetativo y por último una aceleración en la floración y fructificación.

Las bioformulaciones DM1 y DM2, son capaces de proteger el cultivo del tomate en contra de la marchitez del tomate producida por *F. oxysporum*, esta puede estar relacionada con la producción de HCN, producción de metabolitos secundarios (antibiosis) y COVs por parte de las PGPR.

Se obtuvo un porcentaje de encapsulación de PGPR en la matriz de alginato de sodio como red polimérica en un 98%. La vida de anaquel de las PGPR encapsuladas medida a los 3 meses de almacenamiento no se vio comprometida, demostrando la eficacia de este sistema de protección.

Las PGPR son liberadas de la matriz de alginato tanto en buffer PBS como en suelo. Las PGPR liberadas de las cápsulas promovió el desarrollo de la plántula de tomate, observando un mayor tamaño de la planta, mayor número de hojas y aumento del desarrollo radicular.

## 7 PERSPECTIVAS

Establecer la dosis del bio-inoculante capaz de estimular el desarrollo del cultivo y que a su vez otorgue resistencia en contra de la marchitez vascular.

Identificar las moléculas orgánicas producidas por DM1 y DM2 responsables de la actividad antifúngica en contra de *F. oxysporum*.

Determinar cambios en los patrones de expresión génica en la planta de tomate por la presencia de DM1 y DM2 en genes relacionados a defensa (activación del ISR), floración y fructificación.

Realizar análisis proximales de los frutos de tomate obtenidos de plantas sometidas al tratamiento con DM1 y DM2.

Explorar la efectividad de DM1 y DM2 contra otros hongos fitopatógenos como *S. rolfsii*, *F. graminearum*, así como su efecto benéfico en otras plantas de interés agrícola.

## 8 REFERENCIAS

- Aeron, A., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2021). Next-generation biofertilizers and novel biostimulants: documentation and validation of mechanism of endophytic plant growth-promoting rhizobacteria in tomato. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3715–3726. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02344-0>
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. In *Microbiological Research* (Vol. 221, pp. 36–49). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Agroalimentario, P. (n.d.). *SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP)*.
- Azeem, S., Agha, S. I., Jamil, N., Tabassum, B., Ahmed, S., Raheem, A., Jahan, N., Ali, N., & Khan, A. (2022). Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(3), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.10.005>
- Barrera-Galicia, G. C., Peniche-Pavía, H. A., Peña-Cabriales, J. J., Covarrubias, S. A., Vera-Núñez, J. A., & Délano-Frier, J. P. (2021). Metabolic footprints of burkholderia sensu lato rhizosphere bacteria active against maize fusarium pathogens†. *Microorganisms*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102061>
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., De Jonge, R., Burgman, W. P., Burmølle, M., Herschend, J., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME Journal*, 12(6), 1496–1507. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0093-1>
- Borrajó, M. P., Mondino, E. A., Maroniche, G. A., Fernández, M., & Creus, C. M. (2022). Potential of rhizobacteria native to Argentina for the control of *Meloidogyne javanica*. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(3), 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.010>
- Carballo, M. E., Chicapa, D. N., Martínez, A., Salgado, I., Pérez, L., Cruz, M., Guillen, C., Soria, A. L., & Garza, Y. (2016). *REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ARTÍCULO ORIGINAL REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Producción de*

*lipasas por bacterias aisladas de efluente de productos lácteos Lipases productions by bacterial isolate from dairy products effluents.* <http://www.rccb.uh.cu>

Carmona, S. L., Villarreal-Navarrete, A., Burbano-David, D., & Soto-Suárez, M. (2020). Cambios fisiológicos y mecanismos genéticos asociados a la marchitez vascular causada por *Fusarium* en tomate: una revisión actualizada. *Temas Agrarios*, 25(2), 166–189. <https://doi.org/10.21897/rta.v25i2.2457>

Chavez-Diaz, I. F., Mena-Violante, H. G., Hernandez-Lauzardo, A. N., Oyoque-Salcedo, G., Oregel-Zamudio, E., & Angoa-Perez, M. V. (2019). Postharvest control of rhizopus stolonifer on blackberry (*Rubus fruticosus*) by blackberry native crop bacteria. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 51(2), 360–317.

Chen, Q., Qiu, Y., Yuan, Y., Wang, K., & Wang, H. (2022). Biocontrol activity and action mechanism of *Bacillus velezensis* strain SDTB038 against *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994716>

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). *A review on the plant microbiome : Ecology , functions , and emerging trends in microbial application.* 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>

Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2007). Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. *Microbiology*, 153(1), 291–299. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28966-0>

*DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Micología.* (n.d.).

Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects-a review. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 17, Issue 4).

Fathi, F., Saberi-Riseh, R., & Khodaygan, P. (2021). Survivability and controlled release of alginate-microencapsulated *Pseudomonas fluorescens* VUPF506 and their effects on biocontrol of *Rhizoctonia solani* on potato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.159>

Fernandes, L. B., & Ghag, S. B. (2022). Molecular insights into the jasmonate signaling and associated defense responses against wilt caused by *Fusarium oxysporum*. In *Plant*

- Physiology and Biochemistry* (Vol. 174, pp. 22–34). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.01.032>
- Flores-Gallegos, A. C., & Nava-Reyna, E. (2018). Plant growth-promoting microbial enzymes. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects* (pp. 521–534). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00030-X>
- Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., & Balaban, N. Q. (2017). *TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay*. February, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep41284>
- Ghoghari, N., Bharwad, K., Champaneria, A., & Rajkumar, S. (2022). Chapter14 - Microbial consortia for augmentation of plant growth—revisiting the promising approach towards sustainable agriculture. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 231–256. <https://doi.org/10.1016/B978-0-32-385163-3.00014-4>
- Gob. (n.d.). *EXPECTATIVAS AAAAAAAAAAAAAAAAAA 2 23*.
- González-Ista, N. S., Castro-Mercado, E., la Cruz, H. R. de, Campos-García, J., López-Bucio, J., & García-Pineda, E. (2023). Comparison of the Rhizobacteria *Serratia* sp. H6 and *Enterobacter* sp. L7 on *Arabidopsis thaliana* Growth Promotion. *Current Microbiology*, 80(4). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03227-x>
- Gu, Y., Wang, J., Xia, Z., & Wei, H. L. (2020). Characterization of a versatile plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas mediterranea* strain s58. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030334>
- Gutiérrez-Sánchez, A., Plasencia, J., Monribot-Villanueva, J. L., Rodríguez-Haas, B., Ruíz-May, E., Guerrero-Analco, J. A., & Sánchez-Rangel, D. (2023). Virulence factors of the genus *Fusarium* with targets in plants. In *Microbiological Research* (Vol. 277). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127506>
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. del C., Fadiji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., & Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. In *Plants* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>
- Hami, A., Rasool, R. S., Khan, N. A., Mansoor, S., Mir, M. A., Ahmed, N., & Masoodi, K. Z. (2021). Morpho-molecular identification and first report of *Fusarium equiseti* in causing

- chilli wilt from Kashmir (Northern Himalayas). *Scientific Reports*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82854-5>
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L. (2020). Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, *8*. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00279>
- Khoso, M. A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., Poudel, T. R., Manghwar, H., & Liu, F. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, *11*, 100341. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100341>
- Kim, B., Park, A. R., Song, C. W., Song, H., & Kim, J. C. (2022). Biological Control Efficacy and Action Mechanism of *Klebsiella pneumoniae* JCK-2201 Producing Meso-2,3-Butanediol Against Tomato Bacterial Wilt. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.914589>
- Kumar, D., Kumar, S., & Kumar, A. (2021). Extraction and characterization of secondary metabolites produced by bacteria isolated from industrial wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, *40*. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101811>
- Kumar, M., Charishma, K., Sahu, K. P., Sheoran, N., Patel, A., Kundu, A., & Kumar, A. (2021). Rice leaf associated *Chryseobacterium* species: An untapped antagonistic flavobacterium displays volatile mediated suppression of rice blast disease. *Biological Control*, *161*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104703>
- Lee, S. K., Chiang, M. S., Hseu, Z. Y., Kuo, C. H., & Liu, C. Te. (2022). A photosynthetic bacterial inoculant exerts beneficial effects on the yield and quality of tomato and affects bacterial community structure in an organic field. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.959080>
- Lephatsi, M., Nephali, L., Meyer, V., Piater, L. A., Buthelezi, N., Dubery, I. A., Opperman, H., Brand, M., Huyser, J., & Tugizimana, F. (2022). Molecular mechanisms associated with microbial biostimulant-mediated growth enhancement, priming and drought stress tolerance in maize plants. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14570-7>

- Li, A. S., & Lucchesi, G. I. (2018). *Alginate-perlite encapsulated Pseudomonas putida A ( ATCC 12633 ) cells : Preparation , characterization and potential use as plant inoculants. 278(April), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.019>*
- Liu, F., Gao, R., Zhang, F., Ren, Y., Li, W., & He, B. (2023). Postharvest biocontrol of green mold (*Penicillium digitatum*) in citrus by *Bacillus velezensis* strain S161 and its mode of action. *Biological Control*, 105392. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105392>
- Lotfi, N., & Soleimani, A. (2022). Characterization of plant growth - promoting rhizobacteria ( PGPR ) in Persian walnut associated with drought stress tolerance. *Scientific Reports*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16852-6>
- Lu, L., Chang, M., Han, X., Wang, Q., Wang, J., Yang, H., Guan, Q., & Dai, S. (2021a). Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1919–1931. <https://doi.org/10.1111/jam.15082>
- Lu, L., Chang, M., Han, X., Wang, Q., Wang, J., Yang, H., Guan, Q., & Dai, S. (2021b). Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1919–1931. <https://doi.org/10.1111/jam.15082>
- Malla Sombra San Luis Potosí, D. E., Jasso Chaverría, C., Ángel Martínez Gamiño, M., Régulo Chávez Vázquez, J., & Alberto Ramírez Télles Enrique Garza Urbina, J. (n.d.). *GUÍA PARA CULTIVAR JITOMATE EN CONDICIONES.*
- Mehmood, S., Ilyas, N., Akhtar, N., Chia, W. Y., Shati, A. A., Alfaifi, M. Y., Sayyed, R. Z., Pusparizkita, Y. M., Munawaroh, H. S. H., Quan, P. M., & Show, P. L. (2023). Structural breakdown and phytotoxic assessments of PE degradation through acid hydrolysis, starch addition and *Pseudomonas aeruginosa* bioremediation. *Environmental Research*, 217. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114784>
- Minchev, Z., Kostenko, O., Soler, R., & Pozo, M. J. (2021). *Microbial Consortia for Effective Biocontrol of Root and Foliar Diseases in Tomato. 12(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.756368>*
- Moradi Pour, M., Hassanisaadi, M., Kennedy, J. F., & Saberi Riseh, R. (2024). A novel biopolymer technique for encapsulation of *Bacillus velezensis* BV9 into double coating

- biopolymer made by in alginate and natural gums to biocontrol of wheat take-all disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128526. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128526>
- Morales-García, Y. E., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Molina-Romero, D., Rivera-Urbalejo, A. P., Pazos-Rojas, L. A., & Muñoz-Rojas, J. (2019). *Bacterial Mixtures, the Future Generation of Inoculants for Sustainable Crop Production*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8_2)
- Narasimha Murthy, K., Soumya, K., Udayashankar, A. C., Srinivas, C., & Jogaiah, S. (2020). Biocontrol potential of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) against *Ralstonia solanacearum*: Current and future prospects. In *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites: Applications and Immunization for Plant Growth and Protection* (pp. 153–180). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00007-7>
- Onwe, R. O., Onwosi, C. O., Ezugworie, F. N., Ekwealor, C. C., & Okonkwo, C. C. (2022). Microbial trehalose boosts the ecological fitness of biocontrol agents, the viability of probiotics during long-term storage and plants tolerance to environmental-driven abiotic stress. In *Science of the Total Environment* (Vol. 806). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150432>
- Panichikkal, J., & Prathap, G. (2021). International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of plant probiotic performance of *Pseudomonas* sp . encapsulated in alginate supplemented with salicylic acid and zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.110>
- Panichikkal, J., Puthiyattil, N., Raveendran, A., Nair, R. A., & Krishnankutty, R. E. (2021). Application of Encapsulated *Bacillus licheniformis* Supplemented with Chitosan Nanoparticles and Rice Starch for the Control of *Sclerotium rolfsii* in *Capsicum annum* (L.) Seedlings. *Current Microbiology*, 78(3), 911–919. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02361-8>
- Patani, A., Prajapati, D., Ali, D., Kalasariya, H., Yadav, V. K., Tank, J., Bagatharia, S., Joshi, M., & Patel, A. (2023). Evaluation of the growth-inducing efficacy of various *Bacillus* species on the salt-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1168155>



- Patel, J. S., Yadav, S. K., Bajpai, R., Teli, B., & Rashid, M. (2020). PGPR secondary metabolites: an active syrup for improvement of plant health. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 195–208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00017-1>
- Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. del R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J. A., & Baez, A. (2022). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(1), 470–482. <https://doi.org/10.1111/jam.15179>
- Ranawat, B., Bachani, P., Singh, A., & Mishra, S. (2021). *Enterobacter hormaechei* as Plant Growth-Promoting Bacteria for Improvement in *Lycopersicon esculentum*. *Current Microbiology*, *78*(4), 1208–1217. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02368-1>
- Rani, R., Kumar, V., & Gupta, P. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria-assisted bioremediation of toxic contaminant: recent advancements and applications. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 327–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85455-9.00003-5>
- Ravichandran, M., Samiappan, S. C., Rangaraj, S., Murugan, K., Al-Dhabi, N. A., & Karupppiah, P. (2022). Nanoemulsion formulations with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. In *Bio-Based Nanoemulsions for Agri-Food Applications* (pp. 207–223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89846-1.00017-6>
- Reed, L., & Glick, B. R. (2023). The Recent Use of Plant-Growth-Promoting Bacteria to Promote the Growth of Agricultural Food Crops. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agriculture13051089>
- Riaz, G., Shoaib, A., Javed, S., Perveen, S., Ahmed, W., El-Sheikh, M. A., & Kaushik, P. (2023). Formulation of the encapsulated rhizospheric *Ochrobactrum ciceri* supplemented with alginate for potential antifungal activity against the chili collar rot pathogen. *South African Journal of Botany*, *161*, 586–598. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.08.048>
- Roy, S., Bhowmik, S., Chowdhury, A. D., Dhara, B., & Mitra, A. K. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria: an alternative for NPK fertilizers. In *Microbes and Microbial*

*Biotechnology for Green Remediation* (pp. 149–167). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90452-0.00007-4>

Saberi Riseh, R., Hassanisaadi, M., Vatankhah, M., & Kennedy, J. F. (2023). Encapsulating biocontrol bacteria with starch as a safe and edible biopolymer to alleviate plant diseases: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 302). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120384>

Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2021). *Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion , Biocontrol , and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms*.

Sahu, P. K., & Brahma Prakash, G. P. (2016). Formulations of biofertilizers - Approaches and advances. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications* (pp. 179–198). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_12)

Santos, R. M. dos, & Rigobelo, E. C. (2021). Growth-Promoting Potential of Rhizobacteria Isolated From Sugarcane. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.596269>

Santoyo, G., Alberto Urtis-Flores, C., Damián Loeza-Lara, P., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2021). *biology Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)*. <https://doi.org/10.3390/biology>

Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Plant growth stimulation by microbial consortia. *Agronomy*, 11(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>

Shameem M, R., Sonali J, M. I., Kumar, P. S., Rangasamy, G., Gayathri, K. V., & Parthasarathy, V. (2023). *Rhizobium mayense* sp. Nov., an efficient plant growth-promoting nitrogen-fixing bacteria isolated from rhizosphere soil. *Environmental Research*, 220. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115200>

Silva, F. P. Da, Vechiato, M. H., Harakava, R., Pires, F., Vechiato, M. H., Harakava, R., Biológico, I., & Paulo, S. (2014). EF-1 $\alpha$  gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium*

- oxysporum polyphyletic origin of strains. *Tropical Plant Pathology*, 39(1), 64–73. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000100008>
- Singh, D., Singh, S. K., Singh, V. K., Gupta, A., Aamir, M., & Kumar, A. (2019). Plant growth-promoting bacteria and their role in environmental management. In *Abatement of Environmental Pollutants: Trends and Strategies* (pp. 161–175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00008-4>
- Slama, H. Ben, Cherif-silini, H., Bouket, A. C., & Qader, M. (2019). *Screening for Fusarium Antagonistic Bacteria From Contrasting Niches Designated the Endophyte Bacillus halotolerans as Plant Warden Against Fusarium*. 9(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
- Sriwati, R., Maulidia, V., Intan, N., Oktarina, H., Syamsuddin, Khairan, K., Skala, L., & Mahmud, T. (2023). Endophytic bacteria as biological agents to control fusarium wilt disease and promote tomato plant growth. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.101994>
- Tang, A., Haruna, A. O., Majid, N. M. A., & Jalloh, M. B. (2020). Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms*, 8(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030442>
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2016). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*, xx, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>
- Upadhyay, A., Kochar, M., Rajam, M. V., & Srivastava, S. (2017). Players over the surface: Unraveling the role of exopolysaccharides in zinc biosorption by fluorescent *Pseudomonas* strain Psd. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00284>
- Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2014). Mechanism of zinc resistance in a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(8), 2273–2282. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1648-6>
- Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Garcia del Moral, L. F., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020a). Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. In

*Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Garcia del Moral, L. F., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020b). Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Garcia, L. F., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020). *Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides : Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives*. 11(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

Wang, J. Le, Chen, Y. C., Deng, J. J., Mo, Z. Q., Zhang, M. S., Yang, Z. D., Zhang, J. R., Li, Y. W., Dan, X. M., & Luo, X. C. (2023). Synergic chitin degradation by *Streptomyces* sp. SCUT-3 chitinases and their applications in chitinous waste recycling and pathogenic fungi biocontrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 987–996.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.161>

Wani, S. H., Ahmar, S., Adnan, M., & Ali, B. (n.d.). *Bacillus thuringiensis* PM25 ameliorates oxidative damage of salinity stress in maize via regulating growth, leaf pigments, antioxidant defense system, and stress responsive gene expression.

Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal*, 10(3), 249–268. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x>

Zhao, L., Xu, Y., & Lai, X. (2017). *Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean ( Glycine max L .) and plant growth-promoting properties*. 9, 269–278.

## 9 ANEXOS

**Tabla 8.** Pruebas bioquímicas para caracterización de PGPR

Cepa	Solubilización de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Solubilización de K <sup>+</sup>	INDOL	Producción de VOCs	Inhibición del crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	HCN	Almidón	Producción de proteasas	Producción de lipasas	Hemólisis	Producción de quitinasas	Producción de celulasas
1286	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
1288	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
1290	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
712	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
728a	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
726a	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo
1217	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo
1218	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
1193	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
729a	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo

Positivo	Verde
Negativo	Rojo

### Secuencias ensambladas del gen 16s rRNA

712

TGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCTAGTAGCGGGGGA  
 TAACTACGCGAAAGCTAGCTAATACCGCATACCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGAC  
 CTTGCACTATTAGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGCTCACCAAGCGC  
 ACGATCCGTAGCTGGTTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC  
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGGAACCTGATCCAGCCATCCCGCGT  
 GTGCGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAACGTCATGGGTAAATAC  
 CCCGTGAAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 ATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTCCGGAA  
 AGAAAGGTGAAATCCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTAACTACCGAGCTAGAGTGTGTC  
 AGAGGGAGGTGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAATATGCGGAGGAACACCGATGGC  
 GAAGGCAGCCTCCTGGGATAAACTGATCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCTTCGGGCTTGGTAGCG  
 CATAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGAC  
 GGGGCGGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACC  
 CTTGACATGTCTGGAATTCCGAAGAGATTTGGAAGTGTCTCGCAAGAGAACCAGAACACAGGTG  
 CTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
 CTTGTCAATTAGTTGCTACGAAGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
 GGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCCG  
 GACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCAGAAACCCGATCGTAGTCCGGATC  
 GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT

726<sup>a</sup>

CAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAG  
 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAC  
 ACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGG  
 GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTC  
 AGCGGGGAGGAAGGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC  
 CGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGT  
 CTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCT  
 AGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA

TACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCT  
TGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT  
TAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCA  
ACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTACCAGAGATGTTTGGTGCCTTCGG  
GAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCC  
CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTG  
CCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGC  
TACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCAT  
AAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGA

728<sup>a</sup>

TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAGACTGGGATAACTCCG  
GGAAACCGGGGCTAATACCAGATTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTG  
TCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC  
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG  
TGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAATAAGCTGCA  
CCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT  
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG  
GAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTG  
CTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAGGAA  
TTGACGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGGAGAACCTTA  
CCAGTCTTGACATCTCTGAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAC  
GTGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGATAAGTCCCAGCAAGGAGCCCA  
CCCTTGATCTAGTGCATCATAAGTGGGCACTCTGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGAAGGTGG  
GATGACGTATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACCCACGTGCTACATGAACGTACAAAAGAC  
CTGCCCGCGAGTTGCACTATCCTA

729<sup>a</sup>

CCGAGCGGTAGAGATCTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGCTG  
TGCAACCTGCCTATCTGGGGGATAGCCTTCGAAAGGAAGATTAATACCATAATATTTTGAATGG  
CATCATTTAAAATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTG  
AGGTAACGGCTCACAAGTCTCGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCACACTGGTACT  
GAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGC  
CTATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAACTCTTTTGTATAGGGAT  
AACCTGGAAGCTGAAGTACTATACGAATAAGCACCGGCTACTCCGTGCCAGCAGCCATACGG  
AGGTGCAGCGTTATCCGATTTATTGGGTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATCTGTAAGTCAGTGTG  
AAATCTCACAGCTTAACTGTGAACTGCCTTGATACTGCAGGTCTTGAGTGTATTGAAGTAGCTG  
GAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTT  
ACTAAGCAACAACCTGACGCTGATGGACAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT  
AGTCCACCTAACGATGCTAACTCGTTTTTTGGGTTTTGGCTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAA  
GTTAGCCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGCACAAGCGG  
GGATTATGTGGTTAATTCGATTACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAAATGACAGG  
TTAGAAATAGACTTCTTCGGACATTTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGA  
GGTGTTAAAGTCTCAACGAGCGCAACCCCTGTCACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTCT  
AGTGAGACTGCCTACGCAAGTAGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATACGGCCCTTA  
CGCCTTGGGCCACACACGTAATACAATGGCCAGTACAGAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATG  
CAAATCTCGAAAGCTGCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTGACTCTATGAAGCTGGAATCGC  
TAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAAT

1218

TCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGG  
GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTC  
GGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCT  
AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCA  
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATG  
CCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCGTTAAGG  
TTAATAACCTTAGGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG  
CGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCT  
GTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGA  
GTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA  
CCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCCAAAGCGTGGGGAGCA  
AACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTG  
AGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA  
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAA  
CGCAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCTTGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGG  
AACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC  
GCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGC  
CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATA  
AAGTATGTCGTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  
CGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCGGGCCTTGTACACCCGCCCGTC

1299

TGCAAGTCGGACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGT  
GAGTAATGTCTGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAACCGGTGGCTAATACCG  
CATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGATG  
GGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAACGGCCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG  
ATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTG  
TAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCGCGATTGACGTTACCCGAG  
AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCG  
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTT  
AACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACG  
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG

1286

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG  
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCATTACCTAATACGTGATGGT  
TTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAT  
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAGTGTGAGCTAGAGTATGGTAGAG  
GGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCA

1288

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG  
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCATTACCTAATACGTGATGGT  
TTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG

GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTCGTTAAGTTGGAT  
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACCTGTCGAGCTAGAGTATGGTAGAG  
GGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCA

1217

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG  
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGT  
TTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTTGTAAAGTTGGAT  
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAG  
GGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCA

1193

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG  
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGT  
TTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTTGTAAAGTTGGAT  
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAG  
GGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCA