

Juan Antonio
Valencia Hernández

Efecto de la exposición al cadmio en maíz (*Zea mays*) y tomate (*Solanum lycopersicum*)

2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

“Efecto de la exposición al cadmio en maíz (*Zea mays*) y
tomate (*Solanum lycopersicum*)”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en

Ingeniería de Biosistemas

Presenta

M. en C. Juan Antonio Valencia Hernández

Nombre del aspirante

Dirigido por

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Querétaro, Qro. a 10 de junio de 2022



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

“Efecto de la exposición al cadmio en maíz (*Zea mays*) y tomate (*Solanum lycopersicum*)”.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

Juan Antonio Valencia Hernández

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

SINODALES

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Presidente

Firma

Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez
Secretario

Firma

Dr. Enrique Rico García
Vocal

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Suplente

Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
10 de junio de 2022
México

DEDICATORIAS

A mi padre Juan Antonio Valencia Ugalde, quien con su ejemplo y mucho cariño siempre supo guiarme.

A mi hermana Ana Julia Valencia Bautista, quien siempre ha estado a mi lado apoyándome sin importar las circunstancias.

A Paola Scarlet Puga Guzmán, quién me ha brindado su apoyo y amistad incondicional, sin los cuales me sería más complejo seguir mis metas. A Nallely, Fabiola, Eduardo, Cecilia, María y Santiago quienes me han brindado su apoyo en mi formación académica y profesional.

A Alejandra Rosillo, quien con mucho cariño, siempre me ha apoyado en las decisiones que he tomado.

A mi abuelo Ángel Valencia y a toda mi familia Valencia, quienes fueron y han sido mi ejemplo y siempre me han apoyado.

A todos y cada uno de mis amigos, quienes en su momento han influenciado con su apoyo para la toma de decisiones y para superar todos aquellos momentos difíciles.

A todos y cada uno de mis maestros que en su momento han influenciado en mi formación y vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

Mi principal agradecimiento es para la Universidad Autónoma de Querétaro, institución que apreciamos mucho mi familia y yo. Institución que me ha dado mi formación profesional desde la preparatoria hasta el doctorado.

Al CONACyT, institución que me ha brindado el apoyo para el estudio de mis posgrados.

Al Dr. Ramón Gerardo Guevara, quien me ha brindado su apoyo para el estudio de mis posgrados, y además ha sido una inspiración por ser un excelente y destacado hombre de ciencia.

Al Dr. Miguel Ángel Rico, quien ha creído en mí desde el estudio de la licenciatura y a través de los años me ha brindado su apoyo.

A mis sinodales, la Dra. Angélica, el Dr. Enrique y el Dr. Irineo, por su guía y apoyo para el estudio y culminación del doctorado.

Índice

ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTE.....	3
2.1 Cadmio.....	3
2.2 Toxicidad por cadmio en plantas.....	4
2.3 Hormesis.....	5
2.4 Metabolitos especializados (secundarios) de las plantas.....	7
2.5 Actividad antioxidante.....	8
2.6 Importancia económica del tomate y maíz.....	9
2.7 Estrés biótico en tomate causado por <i>Clavibacter michiganensis</i> ...	9
2.8 Estrés abiótico causado por déficit hídrico.....	10
2.9 Efecto eustresor y distresor del cadmio y otros metales pesados en plantas.....	10
III. HIPÓTESIS.....	12
IV. OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos específicos.....	12
V. METODOLOGÍA.....	13
5.1 Ubicación del área del proyecto de investigación.....	13
Objetivo 1.....	12
5.2 Obtención de la curva hormética.....	12
5.2.1 Prueba con plántula de tomate.....	12
5.2.2 Prueba con plántula de maíz.....	13
5.3 Prueba de estrés biótico en tomate causado por <i>Clavibacter Michiganensis</i>	14
5.3.1 Índice de severidad de daño causado por <i>C. Michiganensis</i>	14
5.4 Prueba de estrés abiótico causado por déficit hídrico en tomate y maíz.....	15
Objetivo 2.....	16
5.5 Actividad enzimática y expresión de genes.....	16
Objetivo 3.....	17
5.6 Obtención de rendimiento y toxicidad en fruto del tomate y grano del maíz.....	17

5.6.1 Bioacumulación de cadmio.....	18
5.6.2 Determinación de variables de calidad en fruto de tomate...	18
5.7 Análisis estadístico.....	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Objetivo 1.....	20
6.1 Determinación de la curva hormética en plántula.....	20
6.1.1 Obtención de la dosis eustresica en plántula de tomate.....	20
6.1.2 Obtención de la dosis eustresica en plántula de maíz.....	21
6.2 Efecto de la exposición del Cd ante el estrés biótico en tomate causado por <i>C. Michiganensis</i>	23
6.3 Efecto del Cd en planta ante estrés abiótico en tomate causado por déficit hídrico.....	25
6.3.1 Efecto del Cd ante el estrés abiótico en tomate causado por déficit hídrico.....	25
6.3.2 Efecto del Cd ante el estrés abiótico en maíz causado por déficit hídrico.....	26
Objetivo 2.....	27
6.4 Actividad enzimática en tomate inoculado con <i>C. michiganensis</i> ...	27
6.5 Actividad enzimática en pruebas con planta expuesta a Cd ante estrés hídrico.....	30
6.5.1 Actividad enzimática en planta de tomate expuesta a Cd y sometida a estrés hídrico.....	30
6.5.2 Actividad enzimática en maíz sometido a estrés hídrico.....	31
6.6 Actividad enzimática en planta expuesta a Cd llevada a cosecha..	32
6.6.1 Actividad enzimática en planta de tomate expuesta a Cd hasta cosecha.....	32
6.6.2 Actividad enzimática en planta de maíz expuesta a Cd hasta cosecha.....	33
Objetivo 3.....	36
6.7 Obtención del rendimiento y toxicidad en cultivos expuestos a Cd	36
6.7.1 Obtención de rendimiento y toxicidad en tomate.....	36
6.7.2 Obtención del rendimiento y toxicidad en maíz.....	39
VII. CONCLUSIONES.....	44
VIII. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Página
6.1.	Mediciones en plántula de jitomate.	20
6.2.	Resultados de las variables fisiológicas de las plantas de jitomate sometidas a estrés abiótico por déficit hídrico.	25
6.3.	Resultados de las variables fisiológicas de las plantas de maíz sometido a estrés abiótico por déficit hídrico.	26
6.4.	Resultados para planta y fruto de tomate.	37
6.5.	Resultados para el cultivo de maíz.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1.	Curva hormética bifásica dosis-respuesta.	6
5.1.	Ubicación del sitio experimental.	13
6.1.	Resultados de las evaluaciones en plántula de maíz.	22
6.2.	Resultados para planta de jitomate inoculada con <i>Clavibacter michiganensis</i> .	24
6.3.	Planta de maíz sometida a estrés hídrico.	27
6.4.	Actividad enzimática y expresión de genes para planta con estrés biótico causado por <i>C. michiganensis</i> .	29
6.5.	Actividad enzimática en plántula de tomate expuesta a Cd sometida a estrés por déficit hídrico.	31
6.6.	Actividad enzimática en plántula de maíz expuesta a Cd sometida a estrés por déficit hídrico.	32
6.7.	Actividad enzimática en hoja de planta de tomate expuesta a Cd hasta cosecha.	33
6.8.	Actividad enzimática en parte aérea de planta de maíz expuesta a Cd hasta cosecha.	34
6.9.	Contenido de Cd en el fruto del tomate.	36
6.10.	Fruto del tomate.	38
6.11.	Contenido de Cd en planta de maíz.	40
6.12.	Resultados para grano de maíz.	42
6.13.	Planta de maíz sometida a dosis eustresicas de Cd llevada hasta rendimiento.	43

RESUMEN

Existe contenido de metales pesados, incluyendo el cadmio (Cd), en los recursos e insumos utilizados para la agricultura. Algunas de las sustancias químicas que provocan fitotoxicidad, a bajas concentraciones pueden generar respuestas favorables para la planta activando mecanismos de defensa contra estrés biótico o abiótico o bien favoreciendo su crecimiento y desarrollo; a esto se le llama dosis eustresica. El cadmio a altas concentraciones puede ser fitotóxico, causando desde clorosis hasta la muerte de la planta. El objetivo de éste trabajo fue encontrar una dosis en la que no se generara una fitotoxicidad y se evaluó la actividad enzimática de las plantas cultivadas en suelo con diferentes concentraciones de Cd ante estrés biótico y abiótico, además, se determinó la cantidad de Cd en el grano del maíz y el fruto del tomate para determinar si éste pudiera ser tóxico para su consumo. Se utilizaron plantas de jitomate y maíz como modelos de estudio ya que son de gran importancia agrícola para México. La dosis eustresica se buscó exponiendo plántulas de maíz a las dosis de 0, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 μM Cd y plántulas de jitomate a las dosis de 0, 30, 60, 100, 120, 160, 180 y 200 μM Cd en el riego, utilizando un diseño completamente al azar, tomando como variables de respuesta la altura, clorofila y diámetro del tallo. De acuerdo a las variables de respuesta evaluadas, se encontró una mejor respuesta para las plántulas a dosis de 0, 60 y 100 μM Cd. Se realizó el cultivo de las plantas bajo invernadero, utilizando un diseño completamente al azar, a una concentración de 0, 60 y 100 μM Cd, las variables de respuesta que se evaluaron fueron rendimiento, altura, la actividad enzimática PAL, CAT y SOD, las cuales son actividades enzimáticas antioxidantes. El jitomate se sometió a estrés biótico inoculándolo con *Clavibacter michiganensis*, utilizando una dosis 60 μM de Cd, aplicado antes y después de la inoculación del patógeno, con un total de 6 tratamientos incluyendo los diferentes controles, las variables de respuesta fueron clorofila, altura, biomasa, PAL, SOD, CAT, índice de daño, unidades formadoras de colonia (UFC) del patógeno y expresión de los genes CHS y Pr1a. Ambos cultivos se sometieron a estrés hídrico a una dosis de

0, 60 y 100 μM , utilizando la mitad de la lámina de riego, las variables de respuesta fueron altura, clorofila, PAL, SOD y CAT. De 14 mediciones que se tomaron para elegir la dosis eustresica en ambos cultivos, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al control, a una concentración de 60 y 100 μM . Para el maíz, se obtuvo un mayor rendimiento en los tratamientos con Cd con respecto al control, obteniendo para la concentración de 60 μM , 116 g de grano/mazorca, para 100 μM , 128.7 g de grano/mazorca y para el control 95.1 g de grano/mazorca. El contenido de Cd en grano fue no cuantificable. Para el contenido de Cd en raíz de planta llevada hasta grano fue mayor conforme se aumentó la concentración, sin embargo, para la parte aérea, fue menor a mayor concentración siendo 45.2 mg de Cd/kg de planta a 60 μM y 31.8 mg de Cd/kg de planta a 100 μM , para la etapa de grano duro se encontró un aumento en la actividad enzimática CAT para 60 μM (2.50 U/g de planta) con respecto al control (1.98 U/g de planta). Para tomate, en el rendimiento no hubo diferencia significativa y el contenido de Cd en fruto que se encontró para los tratamientos de 60 y 100 μM de Cd fue de 0.12 y 0.18 mg de Cd/kg de planta, un valor menor al que permite el CODEX (2019) (0.20 mg/kg de fruto). Para el cultivo de tomate llevado hasta fruto, se obtuvo un aumento en la actividad enzimática CAT y en la expresión del gen Pr1a con el tratamiento a 60 μM . Para la respuesta a estrés por *C. michiganensis* se encontró una disminución hasta del 52 % en UFC.

Palabras clave: Dosis eustresica, déficit hídrico, *Clavibacter michiganensis*

ABSTRACT

There is content of heavy metals, including cadmium (Cd), in the resources and inputs used for agriculture. Some of the chemical substances that cause phytotoxicity, at low concentrations, can generate favorable responses for the plant, activating defense mechanisms against biotic or abiotic stress or favoring its growth and development; this is called the eustress dose. Cadmium at high concentrations can be phytotoxic, causing everything from chlorosis to plant death. The objective of this work was to find a dose that did not generate phytotoxicity and the enzymatic activity of plants grown in soil with different concentrations of Cd in the face of biotic and abiotic stress was evaluated, in addition, the amount of Cd in the corn grain and tomato fruit to determine if it could be toxic for consumption. Tomato and corn plants were used as study models since they are of great agricultural importance for Mexico. The eustress dose was sought by exposing corn seedlings to doses of 0, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 and 200 μM Cd and tomato seedlings at doses of 0, 30, 60, 100, 120, 160, 180 and 200 μM Cd in irrigation, using a completely randomized design, taking height, chlorophyll and stem diameter as response variables. According to the response variables evaluated, a better response was found for seedlings at doses of 0, 60 and 100 μM Cd. The plants were grown under greenhouse, using a completely randomized design, at a concentration of 0, 60 and 100 μM Cd, and the response variables that were evaluated were yield, height, PAL, CAT and SOD enzymatic activity, which are antioxidant enzymatic activities. The tomato was subjected to biotic stress by inoculating it with *Clavibacter michiganensis*, using a 60 μM dose of Cd, applied before and after the inoculation of the pathogen, with a total of 6 treatments including the different controls, the response variables were chlorophyll, height, biomass, PAL, SOD, CAT, damage index, CFU of the pathogen and expression of the CHS and Pr1a genes. Both crops were subjected to water stress at a dose of 0, 60 and 100 μM , using half of the irrigation layer, the response variables were height, chlorophyll, PAL, SOD and CAT. Of 14 measurements that

were taken to choose the eustress dose in both cultures, the best results were obtained in terms of the control, at a concentration of 60 and 100 μM . For corn, a higher yield was obtained in the treatments with Cd with respect to the control, obtaining for the concentration of 60 μM , 116 g of grain/cob, for 100 μM , 128.7 g of grain/cob and for the control 95.1 g of grain/cob. The content of Cd in grain was not quantifiable. For the content of Cd in the root of the plant taken to the grain, it was higher as the concentration increased, however, for the aerial part, it was lower at a higher concentration, being 45.2 mg of Cd/kg of plant at 60 μM and 31.8 mg of Cd /kg of plant at 100 μM , for the hard grain stage, an increase in CAT enzymatic activity was found for 60 μM (2.50 U/g of plant) with respect to the control (1.98 U/g of plant). For tomato, there was no significant difference in yield and the content of Cd in the fruit found for the 60 and 100 μM Cd treatments was 0.12 and 0.18 mg of Cd/kg of plant, a lower value than that allowed by the CODEX (2019) (0.20 mg/kg of fruit). For the tomato crop grown to fruit, an increase in the CAT enzymatic activity and in the expression of the Pr1a gene was obtained with the treatment at 60 μM . For the response to stress by *C. michiganensis*, a decrease of up to 52% CFU was found.

Keywords: Eustressic dose, water deficit, *Clavibacter michiganensis*.

I. INTRODUCCION

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos; los cuales, dependiendo de las condiciones edáficas, son absorbidos por las plantas e incorporados a las cadenas tróficas (Rooney *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2006), o pasar a la atmósfera por volatilización y, moverse hacia el agua superficial o subterránea (Abollino *et al.*, 2002). El cadmio forma parte de la composición natural de algunas rocas y suelos, provocando una liberación al medio ambiente de aproximadamente 25000 toneladas a nivel mundial. Por otra parte, por vía antrópica, las concentraciones en el ambiente pueden ser incrementadas considerablemente, ya que es un metal ampliamente utilizado en la industria y productos agrícolas. Esto ha producido un aumento progresivo en su producción, provocando una importante contaminación ambiental (Reyes *et al.*, 2016).

La toxicidad por cadmio en plantas puede causar severos desequilibrios en los procesos de nutrición y transporte de agua en las plantas (Singh *et al.*, 2003), inactivación de la fotosíntesis, formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) causando un estrés oxidativo (González *et al.*, 2007; Kovacik *et al.*, 2009). Al cadmio se le reconoce como uno de los metales pesados con mayor tendencia a acumularse en las plantas. (Singh *et al.*, 2003). En consecuencia, ha sido tóxico al consumidor (Satarug *et al.*, 2010).

Acorde al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), para el año 2021, se obtuvo una producción estimada de tomate de 3 409 224 toneladas, de las cuales se exportó 1 671 050 toneladas.

El maíz es un cultivo representativo de México por su importancia económica, social y cultural, su producción se divide en blanco y amarillo (ASERCA, 2018). El servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera reportó que en el año agrícola 2020 la producción de maíz grano fue de 27 707 775 toneladas, un aumento del 1.8 % en comparación con 2019.

Por otro lado, Cervantes-García *et al.* (2016), encontraron un incremento significativo en el contenido de flavonoides y fenoles totales en el alga *E. gracilis* al ser expuesta a Cadmio in vitro, estimando que los fenoles y flavonoides totales pueden desempeñar un papel importante en la tolerancia de *E. gracilis* a rangos definidos de concentraciones de cadmio. Bai *et al.* (2014) y Dai *et al.* (2015) sugieren propiedades antioxidantes y quelantes de metales de compuestos fenólicos y flavonoides totales en plantas expuestas al cadmio. El cadmio tiende a acumularse principalmente en la raíz de la papa (*Solanum tuberosum* L.) y esto es más marcado cuando se presentan altos contenidos de cadmio en la planta, estando la mayoría de las veces el cadmio presente en las partes superiores en menor cantidad a las que tolera la norma (Luna, 2017). De lo anterior se desprende que puede haber efectos favorables, tanto para la planta como para el consumidor.

En la presente propuesta se buscó determinar la concentración y disponibilidad de cadmio que permitiera a las plantas de maíz y tomate superar los efectos negativos del estrés abiótico (déficit hídrico) y biótico (cáncer bacteriano, solo para tomate).

II. ANTECEDENTES

2.1 Cadmio

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos; pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas (Rooney *et al.* 2006, Zhao *et al.*, 2006), pasar a la atmósfera por volatilización y moverse hacia el agua superficial o subterránea (Abollino *et al.*, 2002). El cadmio forma parte de la composición natural de algunas rocas y suelos, lo que provoca una liberación al medio ambiente cercana a 25000 toneladas a nivel mundial. Por vía antrópica las concentraciones en el ambiente pueden ser incrementadas considerablemente, ya que es un metal ampliamente utilizado en la industria y productos agrícolas, esto ha producido un aumento progresivo en su producción, provocando una importante contaminación ambiental (Reyes *et al.*, 2016).

El cadmio (Cd), es un metal pesado que se obtiene como subproducto del procesamiento de metales como el zinc (Zn) y el cobre (Cu). Se acumula en el ambiente como resultado de las actividades industriales que involucran la fabricación de baterías níquel-cadmio, la quema de combustibles fósiles, la generación de polvos por el proceso de fabricación de cemento y fertilizantes fosfatados. Se utilizan pigmentos a base de Cd para crear tintes, pinturas, plásticos y cerámica. Estas actividades industriales son consideradas como una gran fuente de emisión a la atmósfera y de contaminación para mantos acuíferos y suelos. Los ríos contaminados con Cd pueden irrigar tierras de cultivos, además de que el Cd es capaz de combinarse con otros elementos y formar compuestos tales como cloruros, óxidos, sulfuros y de esta manera unirse fuertemente a las partículas del suelo. A nivel mundial se ha estimado que el uso de Cd en la actividad industrial se ha incrementado de 18400 toneladas en 2003 a 20400 toneladas en el 2007 (Farkas *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009). Se considera que la mayor cantidad de Cd en el suelo proviene del uso de fertilizantes de fosfatos para la agricultura, los cuales contienen de 0.20 mg/kg a 0.60 mg/kg. Al requerirse

aproximadamente 500 kg/ha de fertilizante fosforado para hortalizas se están incorporando de 100 g/ha a 300 g/ha cada ciclo (Moulis *et al.*, 2010).

El área susceptible a contaminación por Cd en México se estima de 9.8 millones de hectáreas debido a la fertilización fosforada que es de un mínimo de 40 kg/ha, por lo que se estima que la contaminación a nivel nacional es de 112 toneladas de cadmio por año, siendo éste valor acumulable (FAO., 2014; Moulis *et al.*, 2010). El límite máximo permisible de cadmio para agua de uso agrícola por el CODEX 1995, UE 2016 es de 0.01 mg/l. La NOM-001-SEMARNAT-1996 maneja un límite máximo permisible promedio diario para el agua de uso agrícola de 0.4 mg/kg. El límite máximo permisible de cadmio para hortalizas de acuerdo al CODEX es de 0.05 mg/l (U. E., 2017). Para suelo de uso agrícola, de acuerdo la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, el límite máximo de Cd permisible es de 37 mg/kg. La cantidad de Cd incorporada al suelo por los fertilizantes fosforados es de 3.2 µg/kg, valor por debajo del permitido por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

2.2 Toxicidad por cadmio en las plantas

El Cd puede causar toxicidad en plantas reflejado en severos desequilibrios en los procesos de nutrición y transporte de agua en las plantas (Singh *et al.*, 2003), inactivación de la fotosíntesis, formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) causando un estrés oxidativo (González *et al.*, 2007; Kovacik *et al.*, 2009). Además, el estrés causado por la toxicidad de los metales puede provocar alteraciones en la acumulación de azúcares solubles en las plantas, ya sea que aumente o disminuya en los brotes (Mishra *et al.*, 2014; Shackira and Puthur, 2017). Al cadmio se le reconoce como uno de los metales pesados con mayor tendencia a acumularse en las plantas. (Singh *et al.*, 2003).

2.3 Hormesis

La hormesis es el proceso por el cual, la exposición a una dosis baja de un agente químico como los metales pesados o bien, a un factor ambiental, ya sea físico, químico o biológico, que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo (Calabrese, *et al*, 2007; Calabrese *et al.*, 2008).

La respuesta hormética involucra la expresión de una gran cantidad de genes que codifican para proteínas citoprotectoras como las chaperonas del tipo de las que responden a estrés térmico (heat shock proteins, HSP), las enzimas antioxidantes, los factores de crecimiento y las metalotioneínas. La evidencia experimental sugiere que no existe un mecanismo único sino varias vías que son capaces de desencadenar la hormesis (Calabrese *et al.*, 2011). La dosis hormética a la cual responde una célula u organismo podrá variar dependiendo del individuo y sus características (Kouda *et al.*, 2010).

La curva en forma de «J» (Figura 1.1.A) representa una respuesta disfuncional, como por ejemplo la carcinogénesis, mientras que la curva en forma de «U» invertida (Figura 1.1.B) representa una función biológica normal como el crecimiento de un organismo o la proliferación celular. En ambas curvas la línea horizontal muestra el nivel en el que ocurriría el evento de manera espontánea. La zona hormética (la zona rayada) muestra una frecuencia menor a la que ocurriría de manera espontánea sin exposición al agente hormético. Este efecto se observa en la Figura 1.1.C (Calabrese *et al.*, 2011).

Como se señaló, este proceso que se describe mediante una forma U o J hay una interrupción inicial de la homeostasis (es decir, toxicidad) seguida de una respuesta de sobrecompensación modesta que finalmente conduce a un restablecimiento de la homeostasis. Los cambios sufridos en las células u organismos a bajas dosis de una condición de estrés se reflejan en el fenotipo alterado inducido por el medio ambiente, lo anterior puede traducirse en un incremento en el potencial de plasticidad cuantitativa (Calabrese *et al*, 2011; Calabrese *et al.*, 2014).

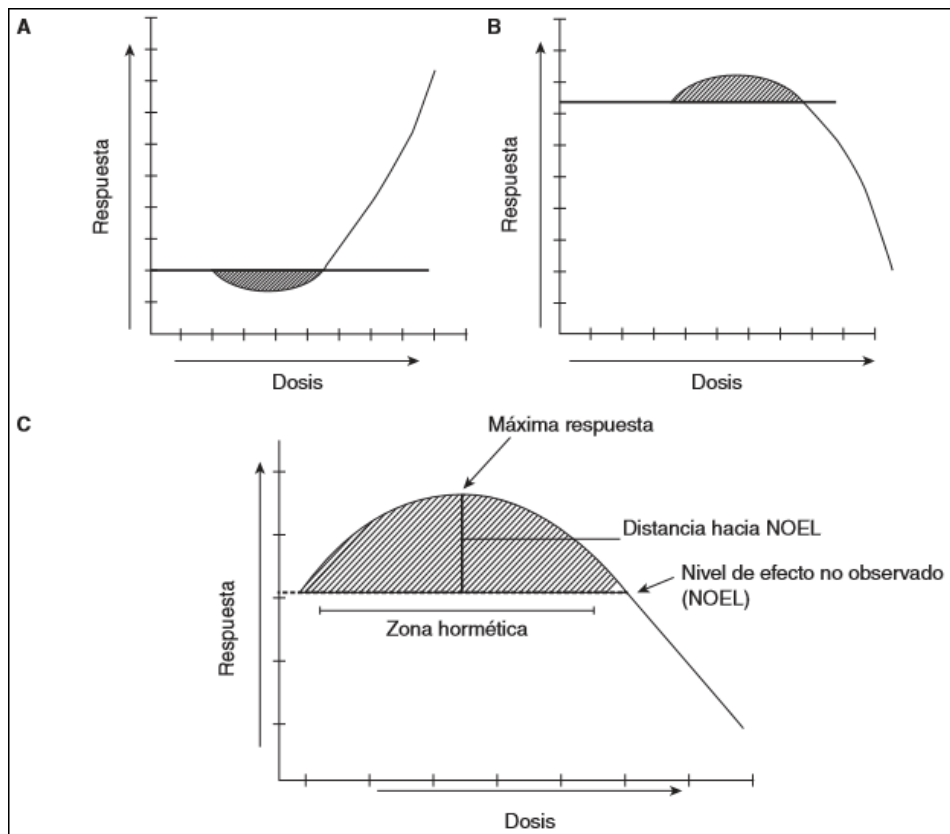


Figura 2.1. Curva hormética bifásica dosis-respuesta. **A:** curva en forma de «J» describiendo un fenómeno asociado a una disfunción biológica o daño tóxico. **B:** curva en forma de «U» invertida representando una función biológica normal como por ejemplo el crecimiento. **C:** detalle de la zona hormética en la curva «U» invertida (Calabrese *et al.*, 2011).

La respuesta hormética es transitoria, dinámica y puede ser mediada por la activación o inactivación de enzimas, por la modificación de una gran cantidad de genes o bien por ambos procesos (Luna-López *et al.*, 2010; Grune *et al.*, 2011).

La respuesta hormética no guarda memoria a largo plazo (más allá de las 30 h), y para volver a tener el efecto hormético, las células u organismos deben volver a exponerse al agente inductor (Banerjee, *et al.*, 2012).

La exposición continua a dosis bajas de estrés oxidante, agentes citostáticos, choque térmico, restricción calórica o hipoxia, entre otros, puede generar una respuesta hormética o de adaptación, haciendo que el organismo responda de mejor manera a eventos posteriores de mayor estrés (Blagoskonny,

et al., 2011). Estos agentes estresantes horméticos, en general, hacen que el organismo maneje sus efectos y se activen mecanismos de señalización y reparación (Calabrese *et al.*, 2011).

Las tensiones que enfrentan las plantas pueden tener un origen biótico o abiótico que provoca un aumento en los metabolitos para hacer frente al estrés (Tierranegra-García *et al.*, 2011; Mejía-Teniente *et al.*, 2013; Baenas *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016); sin embargo, cuando un individuo se alimenta de una "planta estresada" es bueno para la salud; a este beneficio se le conoce como "xenohormesis". El potencial xenohormético de los cultivos se puede aumentar mediante el manejo de hormesis debido a que la planta posee receptores para patrones moleculares (MP) de diferente origen como patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), patrones moleculares asociados a patogenicidad (PAMP), patrones moleculares asociados al daño (DAMP) y patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMP) que potencialmente, desencadenan vías secundarias de metabolitos (Hooper *et al.*, 2010).

Los estudios en plantas se han llevado a cabo principalmente midiendo el punto final de crecimiento, metabolismo, mutágeno, supervivencia, reproducción, mientras que las respuestas inmunes son menos conocidas (Calabrese *et al.*, 2005). La hormesis vegetal puede suceder cuando se utilizan metales iónicos, herbicidas o fitotoxinas (Poschenrieder *et al.*, 2013; Belz *et al.*, 2014).

La hormesis ha sido ampliamente caracterizado en el campo de la toxicología, sin embargo, ha aumentado el interés del estudio de este proceso en la biología de las plantas y las áreas agrícolas con el fin de mejorar la producción de cultivos (Calabrese *et al.*, 2014).

2.4 Metabolitos especializados (secundarios) de las plantas

Tres grupos químicos importantes son producidos por las plantas: fenoles, terpenoides y compuestos orgánicos que contienen nitrógeno. Los terpenos son sintetizados a partir de la ruta del mevalonato o la del metileritritol fosfato (Taiz *et al.*, 2010; Walters *et al.*, 2010). El primero se encuentra en el citosol y es

precursor en la producción de sesquiterpenos, triterpenos, esteroides y politerpenos, mientras que el último se encuentra generalmente en los plastidios, y es precursor en la ruta que lleva a isoprenos, monoterpenos, diterpenos y carotenoides (Lichtenthaler *et al.*, 1999; Taiz *et al.*, 2010). Un segundo grupo de metabolitos son los compuestos fenólicos, los cuales son sintetizados a partir de la ruta del ácido shikímico o la del ácido malónico (Taiz *et al.*, 2010; Walters *et al.*, 2010). Por último, tenemos los compuestos orgánicos que contienen nitrógeno o azufre y que son sintetizados a partir de aminoácidos e incluyen glucósidos cianogénicos, glucosinolatos o alcaloides (Jahangir *et al.*, 2009; Anjum *et al.*, 2011).

Los flavonoides son un grupo representativo de metabolitos secundarios que se han denominado "metabolitos especializados" porque las plantas sintetizan metabolitos específicos de especie (Harborne *et al.*, 2000). El Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América ha reconocido una serie de subgrupos de flavonoides como flavonoles, flavonas (iso), flavanonas, flavan-3-oles, proantocianidinas y antocianinas en más de 500 alimentos como flavonoides dietéticos con evidencia consistente de efectos beneficiosos en humanos. Se espera que tales metabolitos sean útiles para la reproducción de cultivos porque juegan un papel en la alelopatía, que tiene efectos positivos o negativos en el crecimiento de organismos patógenos tales como hongos, insectos y plantas (Bais *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2006).

2.5 Actividad antioxidante

El estrés abiótico, como la salinidad, la sequía, las inundaciones, la temperatura, la radiación UV y los metales pesados, causa la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) como el radical oxígeno, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos. El equilibrio entre la producción de EROs está controlado por el sistema de defensa antioxidante (Caverzan *et al.*, 2016). Las plantas utilizan las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) para superar el estrés oxidativo. La

fenilalanina amoníaco liasa (PAL) es una vía metabólica secundaria operativa en plantas superiores y la enzima clave en la síntesis de fenol. PAL involucrado en la biosíntesis de compuestos fenólicos en las plantas es una parte del mecanismo de defensa y los fenoles se conocen como la respuesta inducible primaria en las plantas contra una serie de estreses bióticos y abióticos (MacDonald y D'Cunha, 2007).

2.6 Importancia económica del tomate y maíz

Acorde al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), para el año 2021, se obtuvo una producción estimada de tomate de 3 409 224 toneladas, de las cuales se exportó 1 671 050 toneladas.

El maíz es un cultivo representativo de México por su importancia económica, social y cultural, su producción se divide en blanco y amarillo (ASERCA, 2018). El servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera reportó que en el año agrícola 2020 la producción de maíz grano fue de 27 707 775 toneladas, un aumento del 1.8 % en comparación con 2019.

2.7 Estrés biótico en tomate causado por *Clavibacter michiganensis*

El cáncer bacteriano del tomate producido por *Clavibacter michiganensis* (*C. michiganensis*) se considera la enfermedad bacteriana más importante que afecta a los cultivos de tomate (EPPO, 2016). Las plantas infectadas con este patógeno transmitido principalmente por las semillas, manifiestan daños físicos en la planta y mueren pronto (Hausbeck *et al.*, 2000). La infección sistémica produce síntomas característicos, como el marchitamiento de los folíolos y el cáncer de los tallos y pecíolos. Cuando la infección ocurre después de la propagación epifítica del patógeno, la necrosis marginal de las hojas y pequeñas manchas blancas tipo ampolla son comunes, y las lesiones, denominadas manchas de ojo de pájaro, aparecen ocasionalmente en los frutos. Después de esto, las bacterias pueden

penetrar en los tejidos vasculares y las plantas desarrollan síntomas sistémicos (Carlton *et al.*, 1998).

2.8 Estrés abiótico causado por déficit hídrico.

La sequía es la causa de estrés que mayor impacto tiene sobre el crecimiento y desarrollo en las plantas, limitando la producción en todo el mundo. Se ha estimado que casi un tercio de los suelos son demasiado secos para apoyar el desarrollo y la productividad normales de la planta (Golldack *et al.*, 2014). Además, el cambio climático global está extendiendo este problema del déficit hídrico a las regiones donde en el pasado los impactos de la sequía fueron insignificantes (Trenberth *et al.*, 2014).

Anualmente en México, se extraen 80.6km³ de agua de la cual se destina el 76.7% para uso agrícola (FAO 2010). SEMARNAT (2012) estima que para el año 2030 la disponibilidad del agua será baja.

La superficie potencial de riego en función de la aptitud de la tierra es de 13.5 millones de ha, que se reducen a 9.8 millones de ha si se tiene en cuenta la disponibilidad de agua. A nivel nacional se cuenta con 9766000ha de los cuales se destina 513867 ha a hortalizas (FAO, 2014). Para el año 2010 se reportó un área siniestrada por sequía del 23.3% del territorio nacional.

2.9 Efecto eustresor y distresor del cadmio y otros metales pesados en planta

Cervantes-García *et al.* (2016) encontraron un incremento significativo en el contenido de flavonoides y fenoles totales en el alga *E. gracilis* al ser expuesta a Cadmio in vitro, el fenol y el flavonoide pueden jugar un papel importante en la tolerancia de *E. gracilis*. El cadmio tiende a acumularse principalmente en la raíz de la papa (*Solanum tuberosum* L.) y esto es más marcado cuando se presentan altos contenidos de cadmio en la planta, estando la mayoría de las veces el cadmio presente en las partes superiores en menor cantidad a las que tolera la norma (Luna., 2017).

Godinho *et al.* (2018) encontraron una disminución en plaga de ácaros en tomate a concentraciones mayores de 0.5 mM de cadmio, así como un efecto del suministro de Cd sobre la cantidad de azúcares solubles y, la planta, no presentó síntomas de toxicidad, además, encontraron un mayor tamaño y mayor peso en el fruto.

III. HIPÓTESIS

La aplicación de cadmio en dosis eustrésicas, permitirá a la planta de tomate y maíz, una mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico mediante el incremento de las actividades enzimáticas y expresión de genes asociados a respuesta inmune vegetal, sin afectar significativamente el crecimiento y rendimiento.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la concentración y disponibilidad de cadmio que permita a las plantas de maíz y tomate superar los efectos negativos del estrés abiótico (déficit hídrico) y biótico (cáncer bacteriano, para el caso de tomate).

4.2 Objetivos específicos

1. Encontrar la dosis eustrésica que induzca tolerancia a cáncer bacteriano causado por *C. michiganensis* en tomate, y a déficit hídrico en tomate y maíz.
2. Determinar niveles de expresión de actividad enzimática y expresión genética asociada a respuesta por estrés en plantas.
3. Evaluar efectos en el rendimiento y toxicidad del grano de maíz y fruto del tomate de plantas expuestas a dosis eustrésicas de cadmio.

V. METODOLOGIA

5.1 Ubicación del área del proyecto de investigación

El experimento se desarrollará en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Amazcala. El poblado de Amazcala (Figura 5.1) pertenece al municipio del Marqués, Querétaro., el cual se localiza en el sector Suroeste del estado, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud Norte. Su longitud se encuentra entre los 100° 24' del Oeste a 1850 msnm. Colinda al Oeste con el municipio de Querétaro, al Norte con el estado de Guanajuato, el Este con el municipio de Colón, y al Sur con los municipios de Huimilpan y Pedro Escobedo. La temperatura media oscila entre los 18°C y los 24°C, con un clima predominante subtropical, templado semiseco.

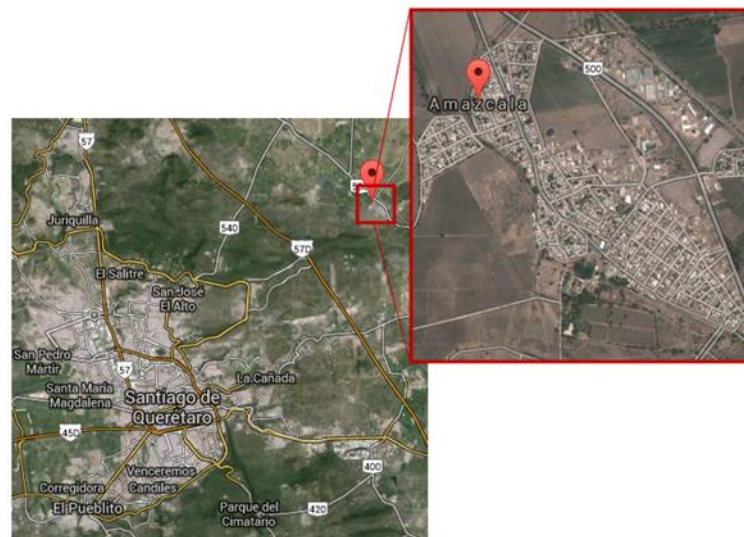


Figura 5.1. Poblado de Amazcala, municipio de El Marqués, estado de Querétaro (Google Maps, 2021)

Objetivo 1

5.2 Obtención de la curva hormética

5.2.1 Prueba con plántula de tomate

La experimentación en plántula de jitomate (cv. Optimax) se realizó dos veces con un diseño experimental completamente al azar, por triplicado con una unidad experimental de tres plantas. Las concentraciones evaluadas fueron: 0, 30,

60, 100, 120, 160, 180 y 200 μM Cd. Las variables de respuesta evaluadas fueron: altura, clorofila y biomasa.

Se utilizó almácigos de cavidades de 300 mL, utilizando arenilla como sustrato y se mantuvo la plántula bajo invernadero. La lámina de riego fue de 40 ml cada dos días en solución Hoagland a un pH de 6.8, durante tres semanas.

Se realizó una primera prueba utilizando dosis en un intervalo de 0 a 200 μM de Cd basadas en las metodologías de Vatehová - Vivodová *et al.* (2016) y Vatehová – Vivodová *et al.* (2018). De este ensayo, se eligieron las concentraciones con un mejor resultado con respecto a las variables de respuesta evaluadas (altura de planta, clorofila y biomasa), para ser utilizadas en las pruebas de estrés biótico, estrés abiótico y toxicidad en el fruto.

5.2.2. Prueba con plántula de maíz

La experimentación en plántula de maíz (cv. Antílope) se realizó en dos experimentos independientes utilizando un diseño experimental completamente al azar, por triplicado con una unidad experimental de tres plantas. Las concentraciones evaluadas fueron: 0, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 μM Cd [dosis de Cd basadas en las metodologías de Vatehová - Vivodová *et al.* (2016) y Vatehová – Vivodová *et al.* (2018)]. Las variables de respuesta evaluadas fueron: altura, clorofila y calcio en planta (Ca). Se utilizaron almácigos de cavidades de 300 mL, utilizando arenilla como sustrato y se mantuvo la plántula bajo invernadero. La lámina de riego fue de 40 ml cada dos días en solución Hoagland a un pH de 6.8, durante tres semanas.

De estos ensayos se eligieron las concentraciones con un mejor resultado con respecto a las variables de respuesta evaluadas (altura, clorofila y Ca), para ser empleadas en las pruebas de estrés biótico, estrés abiótico y toxicidad en el fruto.

5.3 Prueba de estrés biótico en tomate causado por *C. Michiganensis* (Cmm)

El *Cmm* AcR42 aislado de campos de tomate infectados en el centro de México fue proporcionado por el Instituto Potosino de Investigaciones Científicas y

Tecnológicas A. C., (IPICYT). Las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) utilizadas en los experimentos fueron cv. Optimax (Sakata, Kakegawa, Japón). Para la evaluación del efecto preventivo de Cd, se trataron plántulas de tomate de 21 días de edad con Cd 60 µM, 15 días antes de la inoculación de *Cmm* a una concentración de 3×10^8 UFC/mL (cuantificada por diluciones seriadas en placas en medio Luria Bertani según Solano-Alvarez *et al.*, 2021) por inyección en el tallo. Para el tratamiento correctivo/curativo se aplicó el Cd 60 µM 72 h después de la inoculación de *Cmm*. Las plantas se incubaron durante 15 días en un invernadero a 23-26°C, humedad relativa 70-80% y fotoperiodo natural de 16/8-h (luz/oscuridad) y luego se revisaron para determinar la severidad del daño. Como controles del experimento “control 60” (plantas no infectadas con *Cmm* y tratadas con Cd 60 µM), “Control Cu” [plantas inoculadas con *Cmm* y tratadas con CuSO₄ 0.5% (p/v)], “control de enfermedades” (plantas inoculadas únicamente con *Cmm*), y “control absoluto” (plantas no inoculadas con *Cmm* ni tratadas con Cd). Las variables evaluadas fueron altura de planta (cm), diámetro de tallo (mm), contenido de clorofila (unidades SPAD), y UFC/cm² de *Cmm* en planta (determinado por diluciones seriadas según Solano-Álvarez *et al.*, 2021) en las secciones de planta con características típicas de sintomatología del cancro bacteriano. También se evaluaron las actividades enzimáticas fenilalanina amonio liasa (PAL), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT),

5.3.1 Índice de severidad de daño por *C. michiganensis*

La severidad del daño causado por *C. michiganensis* se evaluó usando la escala propuesta por Baysal *et al.* (2003):

0 = Planta sana

1 = 1 a 10 % de hojas enfermas

2 = 11 a 25 % de hojas enfermas

3 = 26 a 49 % de hojas enfermas

4 = 50 a 74 % de hojas enfermas

5 = Planta muerta

5.4 Prueba de estrés abiótico causado por déficit hídrico en tomate y maíz

De las pruebas para la obtención de las dosis eustresicas (curva hormética), tanto para tomate como para maíz, se eligieron las concentraciones con un mejor resultado con respecto a las variables de respuesta evaluadas (altura, clorofila, biomasa y Ca) para las pruebas de estrés abiótico por déficit hídrico. Las concentraciones elegidas fueron 60 y 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$.

Para ambos cultivos, se utilizó un arreglo bifactorial con un diseño completamente al azar, con tres repeticiones y una unidad experimental de tres plantas de tres semanas de edad. Los factores fueron dos lámina de riego (lámina de riego completa de 40 mL cada 48 horas y la mitad de la lámina de riego de 20 mL cada 48 horas) y tres dosis de Cd (0, 60 y 100 μM). Se llevó por tres semanas y se evaluaron las siguientes variables: altura, contenido de clorofila, y actividades enzimáticas fenilalanina amonio liasa (PAL), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

Para jitomate, las mediciones de todas las variables fueron evaluadas el último día y se midió clorofila tanto en hojas viejas (hoja 2) como en hojas nuevas (hoja 4), para detectar translocación de nutrientes. Para maíz, se reportan las mediciones de altura de los días 39, 40 y 42 de edad de la planta.

Objetivo 2

5.5 Actividad enzimática y expresión de genes

PAL

Para la determinación de PAL, se añadió 2.3 mL de búfer de reacción y 0.2 mL de extracto enzimático. La mezcla se incubó a 40 °C durante 60 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadió 0.5 mL de solución de HCl 1 N (para detener la reacción) y se dejó reposar durante 10 min. Se midió la absorbancia a $\lambda 290\text{nm}$ (Toscano *et al.*, 2018).

CAT

Para la determinación de CAT, se agregó 2 mL de búfer de reacción, 0.2 mL de solución de peróxido de hidrógeno y 0.1 mL de extracto enzimático. Se midió el cambio de absorbancia λ 240nm durante 6 min (una lectura cada minuto) (Afiyanti y Chen, 2014).

SOD

Para la determinación de SOD, se añadió 1.5 mL, 0.3 mL de EDTA-Na₂ 0.1 mM, 0.3 mL de Metionina 0.13 M, 0.3 mL de NBT 0.75 mM, 0.3 mL de Riboflavina, 0.05 mL del extracto enzimático y 0.25 mL de agua destilada. Mezclar por inversión de los tubos. Se expuso los tubos aluz fluorescente durante 30 min (desarrollo de color). Medir la absorbancia a λ 560nm (Ayat *et al.*, 2018).

Expresión de genes Chalcona sintasa (CHS) y PR1a.

En el estudio se evaluaron marcadores moleculares para la biosíntesis de fenilpropanoides (chalcona sintasa, CHS, número de acceso NM_001247104.2) y un marcador molecular de la vía de defensa vegetal del ácido salicílico (proteína relacionada con la patogénesis 1^a (Pr1a), número de acceso XM_004242627.4; como indicadores de inducción de inmunidad en las plantas de tomate. El gen de la actina (act. número de acceso AB199316.1) se usó como control doméstico (housekeeping). Muestras de hojas superiores por triplicado de plantas a los 15 días de la inoculación con *Clavibacter michiganensis michiganensis* (Cmm) se molieron en nitrógeno líquido y se extrajo el ARN (PureZOL™ RNA Isolation, Bio-Rad). La integridad del ARN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y en un NanoDrop se evaluó su pureza y concentración. Se utilizó 1 µg de ARN total de alta pureza (relación de absorbancia de 260/280 nm superior a 2,0 y relación de absorbancia de 260/230 nm de 1,8 a 2,0) para sintetizar ADNc siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher™). El cDNA se diluyó a 400 ng μ L⁻¹ y se almacenó a -20 °C para posteriormente realizar el análisis por

qPCR. Se utilizaron primers con secuencias para amplificar pr1a (delantero: 50-GCCAAGCTATAACTACGCTACCAAC-30; reversa: 50-GCAAGAAATGAACCACCATCC-30), chs (delantero: 50-CCAAGGACTTGGCTGAGAAC-30; reversa: 50-TATCGGGGACAAGAGTTTGG-30) y actina (act) como gen de control de limpieza (delantero: 50-ATGTGACGTGGATATTAGGAAAG-30; reversa: 50-AGGGAAGCCAAGATAGAGCC-30). El análisis de qPCR se realizó en un sistema en tiempo real (BIORAD Laboratories) utilizando sybr green como fluoróforo. Las condiciones de reacción para todos los genes fueron 5 s a 94 °C y 40 ciclos de 5 s a 94 °C y 30 s a 57 °C. Los niveles relativos de expresión génica se calcularon utilizando el método $\Delta\Delta^{Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Objetivo 3

5.6 Obtención de rendimiento y toxicidad en fruto del tomate y grano del maíz.

De las pruebas para la obtención de las dosis eustresicas (curva hormética), tanto para tomate como para maíz, se eligieron las concentraciones con un mejor resultado con respecto a las variables de respuesta evaluadas (altura, clorofila, biomasa y Ca) para las pruebas de rendimiento toxicidad por déficit hídrico. Las concentraciones elegidas fueron 60 y 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$.

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones y una unidad experimental de cinco plantas. Se realizaron los siguientes tratamientos: 0, 60 y 100 $\mu\text{M Cd}^{2+}$. A partir de la semana tres se realizaron mediciones de altura hasta la hoja bandera, grosor del tallo y clorofila de la hoja más vieja y la hoja más joven. Se dejó la planta hasta grano y fruto, respectivamente, y se hizo análisis de acumulación de Cd en parte aérea, raíz y grano o fruto. Además se realizó un análisis fisicoquímico del fruto. Otras variables de respuesta evaluadas fueron las actividades enzimáticas: PAL, SOD y CAT. Para el tomate, el muestreo de hojas se realizó en la época de cosecha de las plantas para determinar las actividades

enzimáticas. Para el maíz, el muestreo de hojas de las plantas se realizó en la etapa fenológica de madurez para determinar la actividad enzimática,.

5.6.1. Bioacumulación de cadmio

La planta, seca y triturada se sometió a digestión ácida asistida (HCl 2M) durante 30 minutos para la extracción de los metales; la determinación de Cd se realizó por espectrometría de absorción atómica con atomización en flama (Arroyave *et al.*, 2009).

5.6.2 Determinación de variables de calidad en fruto de tomate.

Sólidos solubles totales (SST) y pH en fruto de tomate

Para la determinación de SST, se preparó una muestra homogénea del fruto, se licuaron los frutos por algunos minutos, después la muestra se mezcló vigorosamente y se tomó una alícuota, la cual fue colocada en el prisma del refractómetro, posteriormente se registró la lectura directa como se describe en la NMX-F-112-NORMEX-2010.

El pH de las muestras de fruto fue determinado según lo descrito en el método de la NOM-F-317-S-1978.

Acidez titulable (AT) en fruto de tomate

La acidez titulable AT se reportó como porcentaje de ácido málico, de acuerdo a la NMX-F-102-NORMEX-2010. Se redujo a pulpa fina unos 400 g y se mezcló bien, efectuando la operación tan rápidamente como fue posible para evitar pérdida de humedad. Se tomó 20 ml de muestra y se tituló con una solución de NaOH 1N, utilizando como indicador fenoftaleina.

El cálculo de acidez titulable se hizo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez} = (V \text{ NaOH}) (N \text{ NaOH}) (\text{meq ácido málico}) * 100 / V \text{ muestra}$$

Donde;

V NaOH = Volumen de la solución de NaOH utilizado (ml)

N NaOH = Normalidad de la solución de NaOH
meq ác. máł = Miliivalentes ácido málico = 0.067
V muestra = Volumen de muestra (ml)

Índice de madurez (IM)

La determinación del índice de madurez se realizó con la siguiente fórmula (Casierra-Posada y Aguilar-Avenidaño, 2008):

IM = SST/AT

5.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para la detección de diferencias en tre los tratamientos se empleo la prueba de Tukey para con un nivel de significancia de $p=0.05$ utilizando el paquete estadístico Graph Pad PRISM software, versión 7.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados y su discusión son presentados en base a los objetivos específicos del trabajo.

Objetivo 1: Encontrar la dosis eustrésica que induzca tolerancia a cáncer bacteriano causado por *C. michiganensis* en tomate, y a déficit hídrico en tomate y maíz.

6.1 Determinación de la curva hormética en plántulas

6.1.1 Obtención de la dosis eustresica en plantula de tomate

Para la medición de la altura, no hubo diferencia entre la planta que no contenía Cd (21.5 cm) con respecto a la planta para el tratamiento con 60 μM Cd,

para todos los demás tratamientos se obtuvo una altura menor que la planta que no contenía Cd. Sin embargo, para biomasa y clorofila, ninguno de los resultados para planta que fue sometida con Cd fue menor que el tratamiento que no contenía Cd (Cuadro 6.1). Para el contenido de clorofila, a 60 μM (41.7 unidades SPAD) se obtuvo un mayor valor que para el tratamiento que no contenía Cd (32.8 unidades SPAD). La mayor biomasa fue obtenida a 60 μM (8.3 g/planta) y 100 μM (8.4 g/planta) Cd, incluso el valor fue mayor que para el tratamiento que no contenía Cd (6.2 g/planta) (Cuadro 6.1).

Cuadro 6.1. Mediciones en plántula de jitomate.

Variable evaluada	$\mu\text{M Cd}$								
	0	30	60	100	120	160	180	200	
Altura (cm)	21.5±1.3 a	18.4±2.2 c	24.6±1.8 a	21±1.6 b	20.5±1.5 bc	21.0±1.9 b	21.8±1.2 b	21.4±1.4 b	
Clorofila (unidades SPAD)	32.8±3.1 b	33.3±4.9 b	41.7±6.0 a	37.0±7.0 ab	35.7±5.6 ab	36.3±2.1 ab	35.6±3.2 ab	36.4±1.2 ab	
Biomasa (g/planta)	6.2±0.3 c	7.3±0.5 b	8.3±0.7 a	8.4±0.1 a	6.7±0.1 bc	6.2±0.2 c	6.7±0.2 bc	6.3±0.4 c	

Para cada variable, los resultados muestran la media \pm error estándar. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

6.1.2 Obtención de la dosis eustresica en plántula de maíz.

Para la evaluación de altura, la planta de maíz con menor altura (24.8 cm) fue la que no contenía Cd^{+2} , por lo que el Cd^{+2} podría estar estimulando el crecimiento, la altura promedio para las plantas con Cd^{+2} fue de 29.6 cm (figura 6.1A).

En la evaluación de clorofila, se encontró la menor cantidad (29.2 unidades SPAD) a una concentración de 60 $\mu\text{M Cd}^{+2}$, mientras que a mayor cantidad (34.4 unidades SPAD) se encontró a una concentración de 40 $\mu\text{M Cd}^{+2}$. Ambas concentraciones no tienen diferencia significativa con los demás tratamientos (figura 6.1B).

En la evaluación de Ca, a una concentración de 80 $\mu\text{M Cd}^{+2}$, se encontró la cantidad más baja de Ca (0.0082 mg/kg). La cantidad promedio de Ca para los demás fue de 0.0672 mg/kg. Esto, probablemente, se debe a que al tener el Ca la misma valencia que el Cd (+2) hubo una sustitución a una concentración de 80 $\mu\text{M Cd}^{+2}$ y a una concentración más alta (100 $\mu\text{M Cd}^{+2}$) hubo un bloqueo por parte de la pared celular contra el Cd (figura 6.1C).

Para las pruebas en un rango de 0 a 200 $\mu\text{M Cd}^{+2}$ el tercer muestreo solo hubo diferencia significativa para la cantidad de clorofila, en la cual se encuentra un comportamiento exponencial continuo, donde los dos puntos más bajos fueron a una concentración de 30 y 160 $\mu\text{M Cd}^{+2}$ con un valor de 13.2 y 12.6 unidades SPAD, respectivamente, para la cual, el punto más alto fue de 17.7 unidades SPAD a una concentración de 200 $\mu\text{M Cd}^{+2}$ (Figura 6.1D).

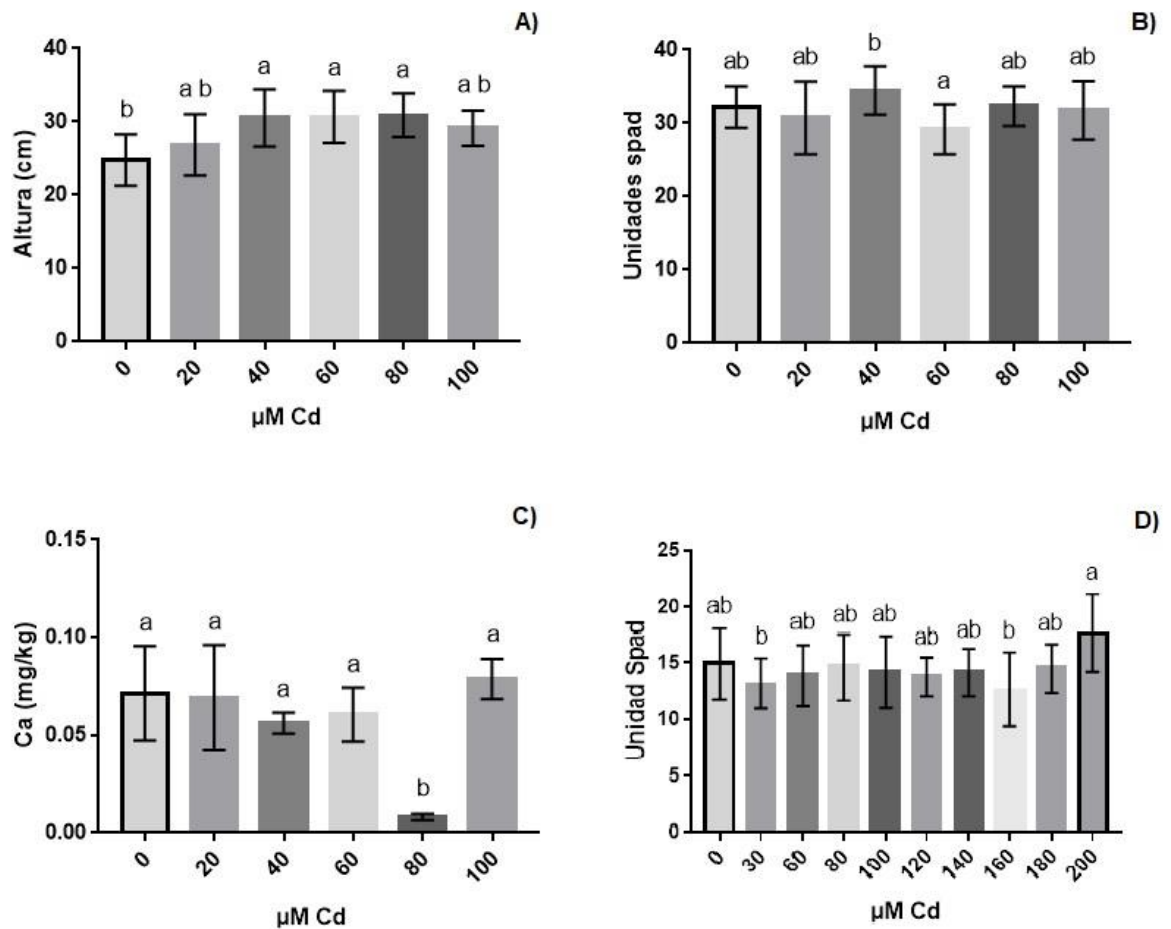


Figura 6.1. Resultados de las evaluaciones en plántula de maíz. A) Altura de la planta; B) Clorofila en planta en curva de 0 a 100 μM Cd; C) Calcio en planta; D) Clorofila en planta en curva de 0 a 200 μM Cd. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

Estudios en varios cultivos han evidenciado que el Cd reduce el crecimiento, la actividad fotosintética, el contenido de clorofilas, también, provoca clorosis y desequilibrios nutricionales. La toxicidad por Cd puede llevar a la muerte de la planta (Hernández-Baranda *et al.*, 2019; Jinadasa *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Nogueirol *et al.*, 2016; Hediji *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015). Contrario a lo antes mencionado por los diferentes autores, en la mayoría de las respuestas fisiológicas, no hubo un efecto negativo. En algunos casos, incluso, la respuesta fisiológica fue positiva y mayor en los tratamientos que contenían Cd, con

respecto al control, ejemplo de ello la altura registrada para el maíz en la Figura 6.1a, donde la altura es mayor que el control a una dosis de 60 μM Cd. De todos los resultados obtenidos, solo en alturas para el tomate, se obtuvo un menor resultado para la altura en algunos de los tratamientos con Cd con respecto a la planta que no contenía Cd, sin embargo, en la biomasa no se vio ningún resultado menor por parte de la planta que contenía Cd (Cuadro 6.1). Los resultados obtenidos (Figura 6.1.) coinciden con lo descrito por Eroofeva (2020), la cual menciona que un aumento en el nivel de contaminación no siempre irá acompañado de deterioros de las plantas.

De acuerdo a lo descrito, se encontraron respuestas positivas, con respecto a las variables medidas, aunque, no se llegó a un daño para la planta. Esto indica que para obtener la curva hormética completa que incluya dosis distresicas se debe aumentar las concentraciones de Cd, tanto en jitomate como en maíz.

6.2 Efecto de la exposición del Cd ante el estrés biótico en tomate causado por *C. michiganensis*

Al realizar el conteo UFC de colonia de *C. michiganensis* en la planta de jitomate, se encontró un valor menor en el tratamiento curativo (15 UFC) con respecto al tratamiento preventivo (30 UFC) y la planta que solo contenía *C. michiganensis* (31 UFC) (Figura 6.2a). Con respecto a la masa, fue menor en la planta inoculada con *C. michiganensis* (5.5241 g), con respecto al tratamiento curativo (7.1795 g) y al control (7.0245 g). Entre el tratamiento con sulfato de cobre y el resto de los tratamientos, no hubo diferencia significativa para la variable masa por planta (Figura 6.2b). El índice de daño fue menor para el tratamiento preventivo con respecto al tratamiento que solo estaba inoculado con *C. michiganensis* y entre la planta del tratamiento curativo y la planta con *C. michiganensis*, no hubo diferencia significativa (Figura 6.2c). El daño en planta se puede apreciar en la Figura 6.2d, en donde, se observa un mayor daño, presentando mayor clorosis, para la planta inoculada con *C. michiganensis* y sin ningún otro tratamiento.

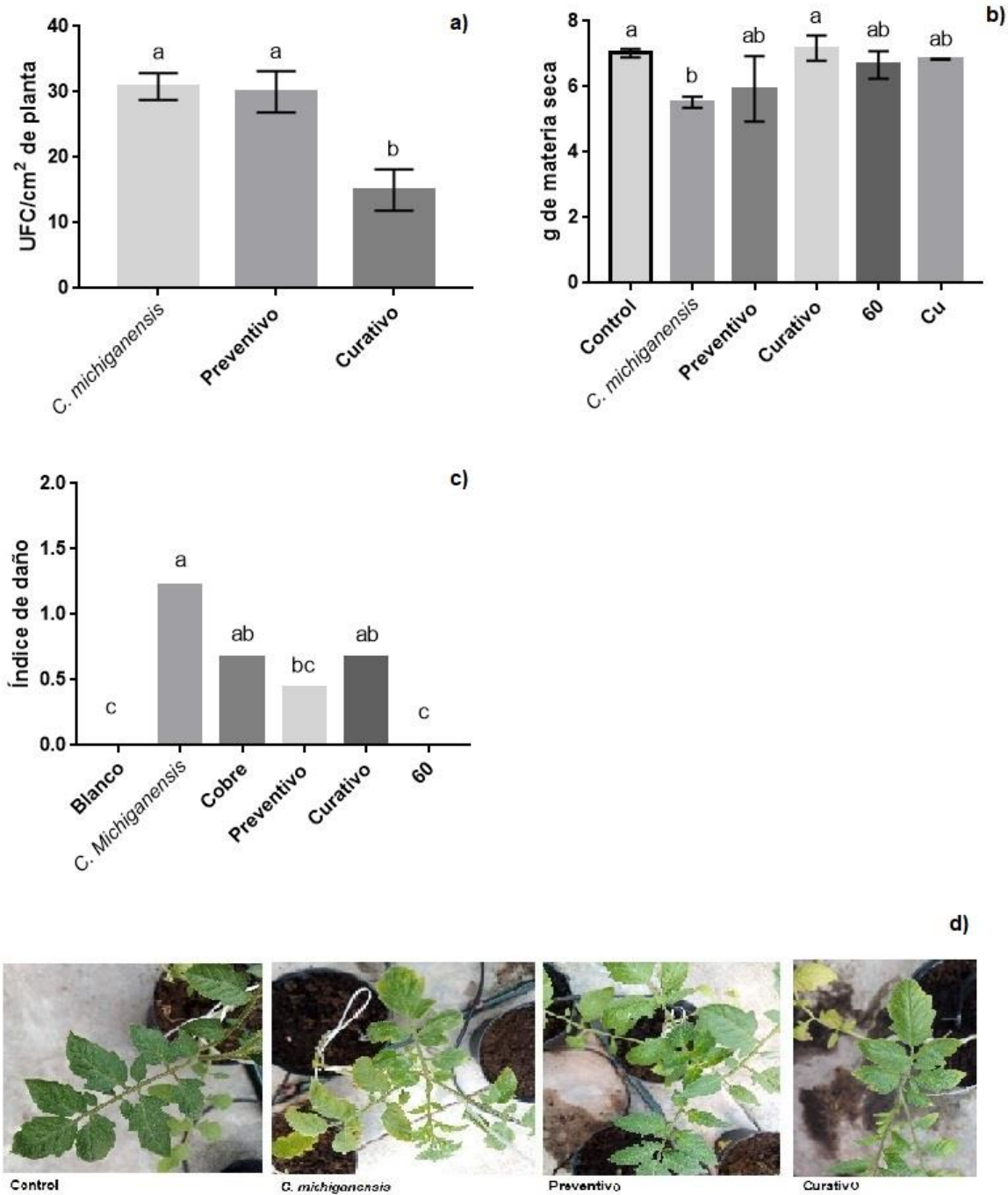


Figura 6.2. Resultados para planta de jitomate inoculada con *C. michiganensis*. a) UFC en planta; b) Masa en planta; c) Índice de daño; d) Imágenes de los diferentes tratamientos. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

6.3 Efecto del Cd en planta ante estrés abiótico causado por déficit hídrico

6.3.1 Efecto del Cd ante el estrés abiótico en tomate causado por déficit hídrico

Los resultados de las variables fisiológicas evaluadas en planta de jitomate, en la última medición, se pueden observar en el Cuadro 6.2. Para la altura, no hay diferencia significativa entre tratamientos con Cd, pero si para las diferentes láminas de riego. Para los tratamientos que contenían Cd y la mitad de la lámina de riego, no mostraron diferencia significativa con respecto al control con la lámina de riego completa para la altura, cantidad de clorofila y número de hojas.

Cuadro 6.2. Resultados de las variables fisiológicas de las plantas de jitomate sometidas a estrés abiótico por déficit hídrico.

	Riego	Tratamiento		
		0	60	100
Altura (cm)	100 %	12.1 ± 3.0 a	11.4 ± 1.6 a	12.7 ± 2.4 a
	50 %	8.4 ± 1.4 b	7.5 ± 2.3 b	8.0 ± 2.3 b
Diámetro del tallo (mm)	100 %	2.11 ± 0.20 ab	2.15 ± 0.22 a	2.08 ± 0.23 ab
	50 %	1.70 ± 0.32 bc	1.50 ± 0.47 b	1.71 ± 0.33 ab
Número de hojas	100 %	5 ± 1 ab	6 ± 0 a	6 ± 1 a
	50 %	5 ± 0 b	4 ± 1 b	4 ± 1 b
Clorofila en hoja 2 (Unidades SPAD)	100 %	24.9 ± 4.9 ab	15.1 ± 4.4 b	20.2 ± 5.5 ab
	50 %	27.4 ± 3.8 a	20.4 ± 6.0 abc	27.9 ± 4.1 a
Clorofila en hoja 4 (Unidades SPAD)	100 %	30.7 ± 2.7 a	30.5 ± 4.2 a	29.3 ± 4.3 a
	50 %	35.3 ± 3.5 a	31.6 ± 4.1 a	36.4 ± 8.1 a

Para cada variable, los resultados muestran la media ± error estándar. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

6.3.2 Efecto del Cd ante el estrés abiótico en maíz causado por déficit hídrico

Al realizar la medición de la altura en el tiempo 1 y 2, no se obtuvo diferencia significativa en los tratamientos que contienen Cd y con la mitad de la lámina de riego con respecto al control que contiene la lámina de riego completa (Cuadro 6.3). Para la tercera medición, no se encontró diferencia significativa entre el control con riego completo (23.9 cm) con respecto a la planta con la mitad de la lámina de riego y Cd 100 μ M (25.0 cm), sin embargo, la altura de la planta con déficit hídrico (DH) con 60 μ M (23.7 cm) fue menor con respecto al control con riego completo (Cuadro 6.3). En la Figura 6.3, podemos observar el maíz al momento del término de la experimentación, en la cual no se notan cambios visuales drásticos entre tratamientos.

Cuadro 6.3. Resultados de las variables fisiológicas de las plantas de maíz sometido a estrés abiótico por déficit hídrico.

	Riego	Tratamiento		
		0	60	100
Altura (cm) Medición 1	100 %	22.0 \pm 2.2 abc	24.2 \pm 2.4 a	24.0 \pm 2.9 ab
	50 %	22.2 \pm 0.8 abc	20.8 \pm 2.3 c	20.4 \pm 1.7 c
Altura (cm) Medición 2	100 %	23.9 \pm 1.5 bcd	25.9 \pm 2.2 a	25.3 \pm 2.4 ab
	50 %	24.4 \pm 1.4 abc	23.2 \pm 1.5 cd	22.3 \pm 1.4 d
Altura (cm) Medición 3	100 %	26.6 \pm 1.4 ab	28.6 \pm 2.8 a	28.1 \pm 2.2 a
	50 %	24.9 \pm 1.1 bc	23.7 \pm 2.1 c	25.0 \pm 0.3 bc
Clorofila (Unidades SPAD)	100 %	15.0 \pm 1.0 b	14.8 \pm 2.4 b	17.9 \pm 1.2 a
	50 %	12.9 \pm 2.9 b	15.5 \pm 3.4 ab	11.8 \pm 4.2 b

Para cada variable, los resultados muestran la media \pm error estándar. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

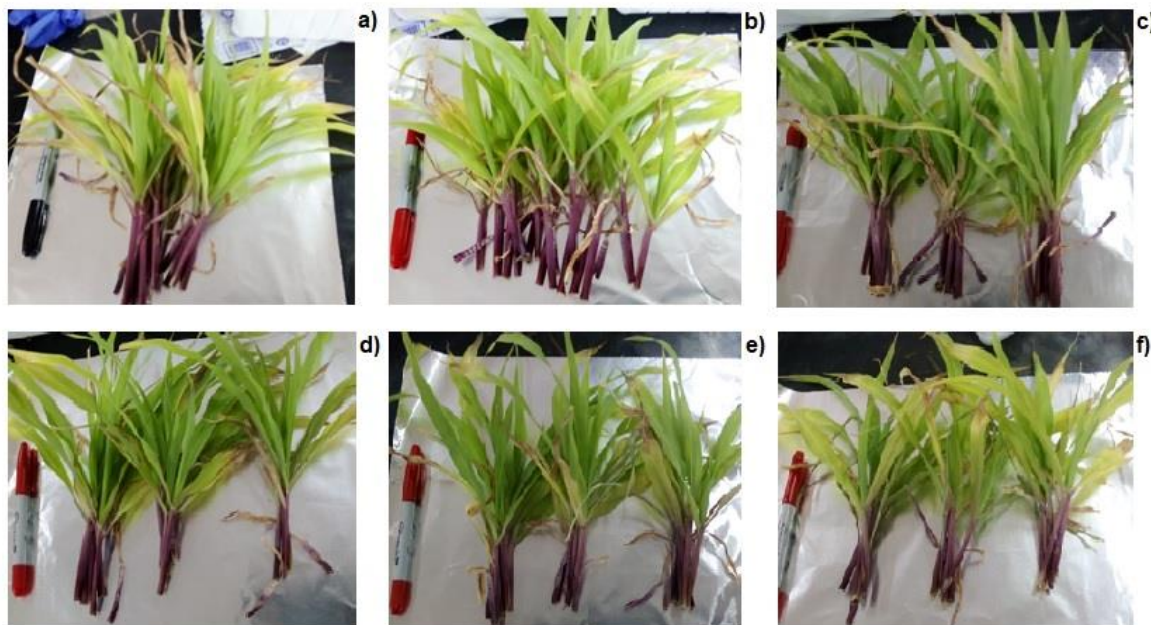


Figura 6.3. Planta de maíz sometida a estrés hídrico. Tratamientos con riego completo a) 0 μM Cd, b) 60 μM Cd, c) 100 μM Cd. Tratamientos sometidos a estrés hídrico d) 0 μM Cd, e) 60 μM Cd, f) 100 μM Cd.

Objetivo 2: Determinar niveles de expresión de actividad enzimática y expresión genética asociada a respuesta por estrés en plantas.

6.4 Actividad enzimática asociada a respuesta a estrés en tomate inoculado con *C. michiganensis*

En las pruebas enzimáticas, para PAL, se obtuvo un aumento en la de actividad enzimática para el tratamiento preventivo (178 U/g de planta) y curativo (127.7 U/g de planta) con respecto a la planta que solo contiene el inóculo de *C. michiganensis* (92.0 U/g de planta). También hubo un aumento del tratamiento preventivo con respecto el control (120.7 U/g de planta), mientras que no hubo diferencia entre el control y el tratamiento curativo, ni respecto al control y a la planta con solo el inóculo (Figura 6.4a). En la actividad enzimática CAT no se observó diferencia significativa para el tratamiento curativo con respecto al control

(1.62 U/g de planta), la planta con solo el inoculo (1.96 U/g de planta) y el tratamiento preventivo (1.79 U/g de planta), sin embargo, disminuyó para el tratamiento curativo (1.11 U/g de planta) (Figura 6.4b). La actividad enzimática SOD fue mayor en la planta que solo contenía el inoculo de *C. michiganensis* (1179.3 U/g de planta) y en la planta que solo contenía Cd (1067.3 U/g de planta) (entre los cuales no hubo diferencia significativa) que en el control (734.2 U/g de planta) y los tratamientos preventivo (851.6 U/g de planta) y curativo (272.3 U/g de planta), sin embargo, el tratamiento curativo tuvo una menor actividad enzimática que el control y el tratamiento preventivo, en donde, no hay diferencia significativa entre los dos últimos (Figura 6.4c).

Para la expresión de genes, para ChS no hubo diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo, para el gen pr1 si hubo una mayor expresión para el tratamiento preventivo (4.9402) con respecto al control (1.0156) (figura 6.4d). El aumento significativo en la expresión del gen pr1a detectado en el tratamiento preventivo con Cd para hacer frente a la infección por *C. michiganensis* indica la inducción del sistema de defensa de la planta frente a patógenos como lo demuestran otros autores (Ali *et al.*, 2018).

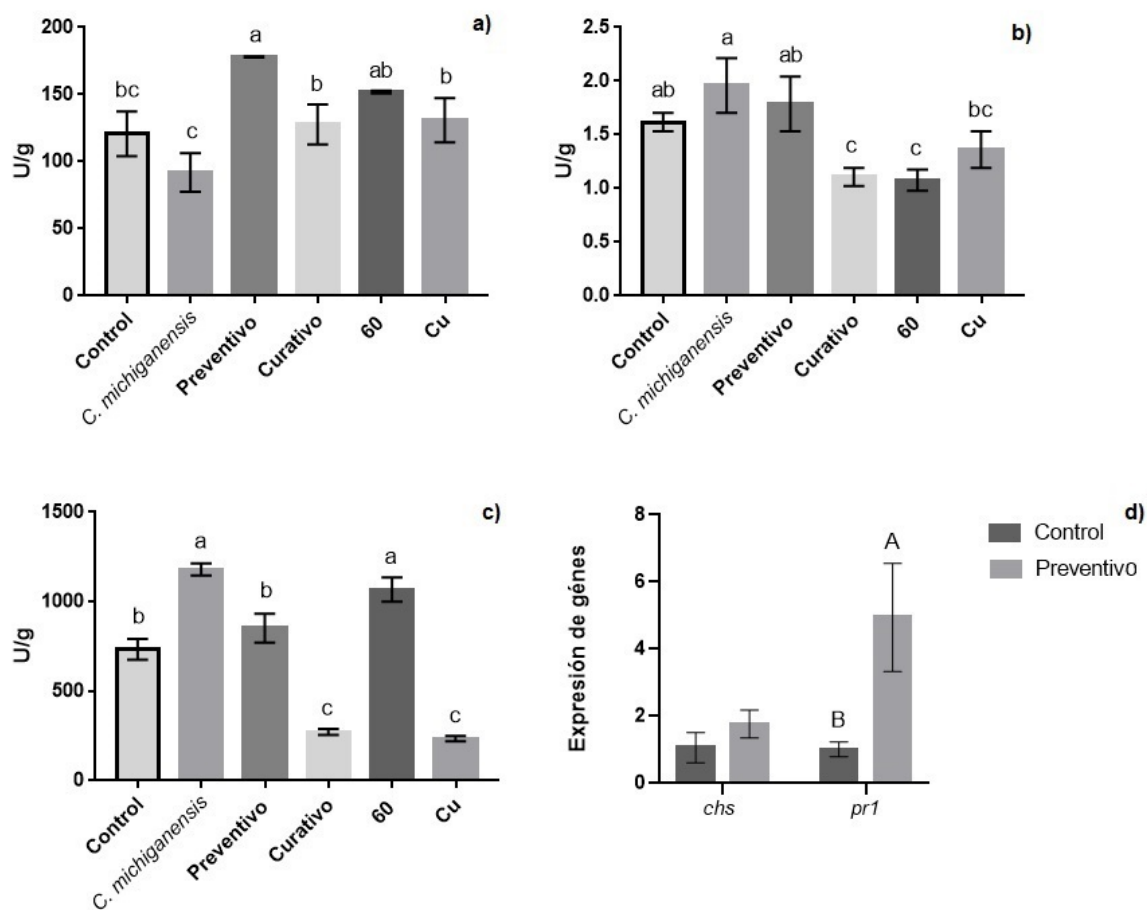


Figura 6.4. Actividad enzimática y expresión de genes para planta con estrés biótico causado por *C. michiganensis*. a) PAL; b) CAT; c) SOD; d) Expresión de los genes CHS y Pr1a. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

Boyd (2012), propone la "hipótesis de defensa elemental", en la cual menciona que el metal acumulado proporciona una defensa contra los herbívoros patógenos. Boyd (2012) demostró que el acumulador de metal *Noccaea caerulescens* muestra una mayor resistencia a patógenos como el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* cuando crece en niveles crecientes de zinc, níquel o cadmio. En plantas cultivadas con concentraciones de metales moderadamente altas, la concentración de metal en el compartimento apoplástico de las plantas, en el que se multiplica esta bacteria, supera las concentraciones requeridas para inhibir el crecimiento bacteriano en *in vitro*.

Fones *et al.* (2010), comentan también que los mutantes bacterianos con tolerancia a metales reducida, mostraron una capacidad reducida para infectar estas plantas. Por lo tanto, Fones y Preston (2013), mencionan que es posible que estas plantas hayan evolucionado para explotar las altas concentraciones de metal presentes en algunos suelos como un microbicida o pesticida ambientalmente disponible. Ling *et al.* (2017) reportaron disminución en la cantidad de clorofila en planta de maíz expuesta a Cd.

6.5 Actividad enzimática en pruebas con planta expuesta a Cd ante estrés hídrico

6.5.1 Actividad enzimática en planta de tomate expuesta a Cd y sometida a estrés hídrico

Para la actividad enzimática SOD (Figura 6.5a), el valor mayor fue para 100 $\mu\text{M Cd}^{+2}$ (0.9231 U/g de planta) con lámina de riego completa, en donde podemos observar que la actividad enzimática SOD aumenta a mayor concentración de Cd, lo mismo sucede con la mitad de la lámina de riego. Para la mitad de lámina de riego, el tratamiento que contenía 100 $\mu\text{M Cd}^{+2}$ (0.7078 U/ g de planta) fue mayor que el resto de los tratamientos con la misma lámina de riego. Sin embargo, el valor de SOD es menor con la mitad de la lámina de riego, con respecto a la lámina de riego completa, a una concentración de 100 μM .

Para la actividad enzimática PAL (Figura 6.5b), con respecto a la planta que no contiene Cd con riego completo (62.3 U/g de planta), el valor aumenta para la planta sin cadmio con déficit hídrico (196.6 U/g de planta) y disminuye para la planta con 100 $\mu\text{M Cd}^{+2}$ con déficit hídrico (2.8 U/g de planta). La actividad enzimática PAL aumentó cuando se sometió a estrés hídrico y disminuyó cuando se sometió a Cd y estrés hídrico.

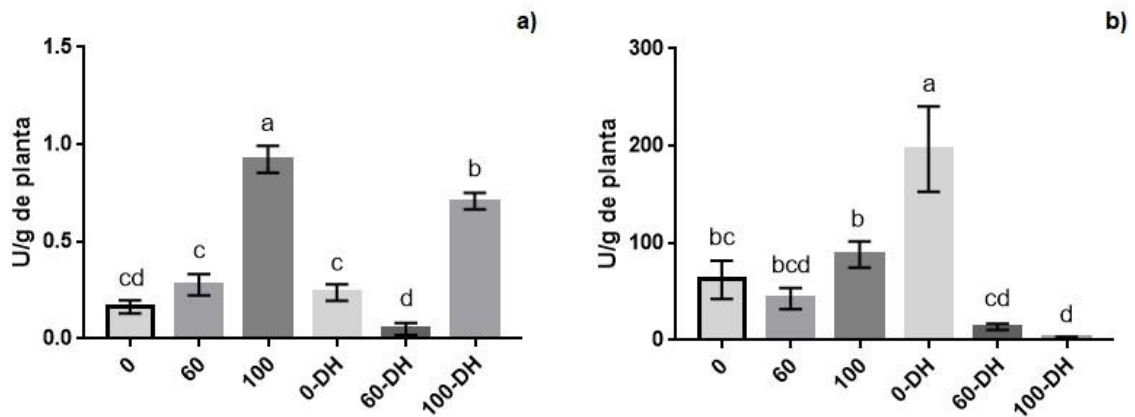


Figura 6.5. Actividad enzimática en plántula de tomate expuesta a Cd sometida a estrés por déficit hídrico. a) SOD; b) PAL; DH.- Déficit hídrico. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

6.5.2 Actividad enzimática en maíz sometido a estrés hídrico

Para la actividad enzimática SOD (Figura 6.6a), el mayor valor obtenido se obtuvo en la planta que no contenía Cd con riego completo (191.1 U/g de planta), disminuyendo el valor para todos los demás tratamientos, con y sin déficit hídrico, con o sin Cd.

Para la actividad enzimática PAL (Figura 6.6b), el valor mayor de la variable con respecto al resto, fue para la planta que no contenía cadmio con déficit hídrico (226.1 U/g de planta). Entre el tratamiento que no contiene Cd y con riego completo (94.9 U/g de planta), no mostró diferencia con los resultados de los tratamientos con riego completo a 60 μM Cd (58.1 U/g de planta), 100 μM Cd (92.1 U/g de planta) y con déficit hídrico con 100 μM Cd (136.9 U/g de planta). El valor mayor para la variable con respecto al resto, fue para el tratamiento con déficit hídrico con 100 μM Cd. El valor menor de la variable fue para el tratamiento con déficit hídrico con 60 μM Cd (0.7 U/g de planta).

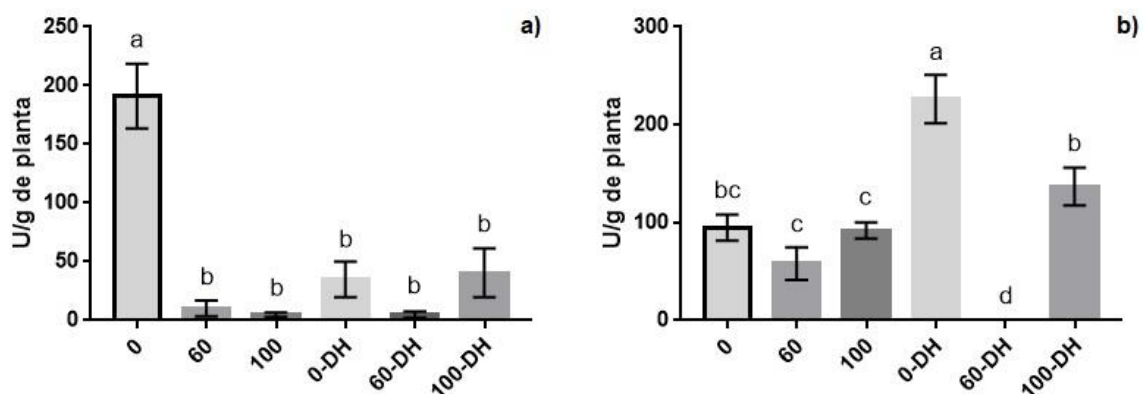


Figura 6.6. Actividad enzimática en plántula de maíz expuesta a Cd sometida a estrés por déficit hídrico. a) SOD; b) PAL; DH.- Déficit hídrico. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

6.6 Actividad enzimática en plantas expuestas a Cd llevada a cosecha

6.6.1 Actividad enzimática en planta de tomate expuesta a Cd hasta cosecha

En los resultados de actividad enzimática en la parte aérea de la planta de jitomate, para PAL se observó un valor menor en el tratamiento de 100 μM de Cd (498.2 U/g de planta) con respecto al resto de los tratamientos. Entre el control (0 μM de Cd) (623.0 U/g de planta) y el tratamiento de 60 μM de Cd (651.6 U/g de planta) no hubo diferencia significativa (Figura 6.7a).

La actividad enzimática de CAT es mayor a una concentración de 60 μM de Cd (2.44 U/g de planta) con respecto al control (0 μM de Cd) (1.38 U/g de planta) y el tratamiento con 100 μM de Cd, en donde no hay diferencia con respecto a los dos últimos (Figura 6.7b). Para la actividad enzimática SOD no hubo diferencia significativa entre tratamientos, con un valor de 2695.9, 2286.3 y 2092.7 U/ g de planta para 0, 60 y 100 μM de cadmio, respectivamente.

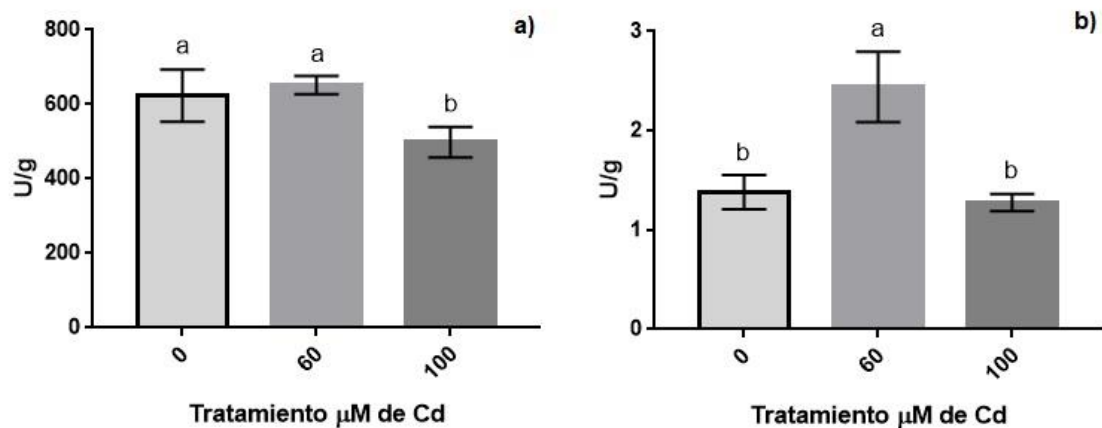


Figura 6.7. Actividad enzimática en hoja de planta de tomate hasta cosecha. a) PAL; b) CAT. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

El Cd causa efectos variados en las actividades enzimáticas, por ejemplo, las enzimas que contienen grupos sulfidrilos son las más propensas a la oxidación provocada por el Cd, el mismo destruye los puentes disulfuro, provocando la desnaturalización de las proteínas y sus consecuentes actividades enzimáticas (Hernández-Baranda *et al.*, 2019; Lösch, 2004). Varios autores han sugerido que la toxicidad por Cd provoca estrés oxidativo en las plantas, ya sea por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno, o por un déficit de la respuesta antioxidante (Sandalio *et al.*, 2001).

6.6.2 Actividad enzimática en planta de maíz expuesta a Cd hasta cosecha

En los resultados de actividad enzimática en la parte aérea de la planta de maíz, para PAL no se obtuvo una diferencia significativa entre tratamientos, obteniendo los resultados 323.8, 378.8 y 369.6 U/g de planta para 0, 60 y 100 µM de cadmio, respectivamente. Para la actividad enzimática CAT hubo una mayor actividad para la concentración 60 µM de Cd (2.50 U/g de planta) con respecto a la concentración 100 µM de Cd (0.96 U/g de planta) y el control (1.98 U/g de planta), entre los tratamientos con 100 µM y el control no hubo diferencia

significativa (Figura 6.8a). La actividad enzimática SOD fue menor a una concentración de 100 μM de Cd (24.2 U/g de planta) con respecto al control (1550.0 U/g de planta) y el tratamiento 60 μM de Cd (1751.4 U/g de planta), entre 60 μM de cadmio y el control no hubo diferencia (Figura 6.8b).

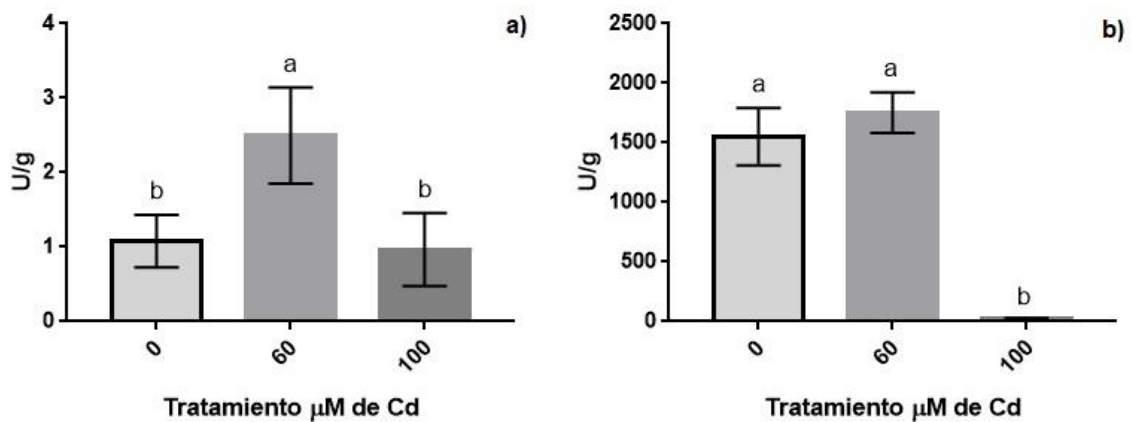


Figura 6.8. Actividad enzimática en parte aérea de planta de maíz expuesta a Cd hasta cosecha. a) CAT; b) SOD. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

De manera general, para el tomate, la actividad enzimática PAL en la etapa fenológica de plántula fue de 111.4 U/g de planta (Figura 6.4a y 6.5b), mientras que en la etapa fenológica de cosecha fue de 590.3 U/g de planta (Figura 6.7a). Para las pruebas con 0, 60 y 100 μM , no hubo diferencia en la actividad enzimática PAL (Figura 6.5b), sin embargo, para la planta llevada hasta cosecha, la actividad enzimática disminuyó a 100 μM de Cd, y a 60 μM , no hubo diferencia con respecto a 0 μM de Cd (Figura 6.7a). Para el estrés biótico, la mayor actividad enzimática se presentó en el tratamiento preventivo (Figura 6.4a). Para el estrés abiótico, la menor actividad se presentó en las plantas con déficit hídrico (Figura 6.5b).

Para el maíz, la actividad enzimática PAL promedio en la etapa fenológica de plántula fue de 101.5 U/g de planta (Figura 6.6b), mientras que en la etapa fenológica de cosecha fue de 357.4 U/g de planta. Para las plantas con 0, 60 y 100 μM de Cd, no hubo diferencia entre tratamientos tanto en plántulas como en planta adulta, respectivamente. Para la prueba por estrés abiótico, la menor actividad enzimática se encontró a 60 μM Cd con déficit hídrico.

Para el tomate, la actividad enzimática SOD promedio en la etapa fenológica de plántula fue de 586.7 U/g de planta (Figuras 6.4c y 6.5a), mientras que en la etapa fenológica de cosecha fue de 2358.3 U/g de planta. Para las plantas con 0, 60 y 100 μM de Cd, el valor mayor para la actividad enzimática SOD en plántula fue a 100 μM de Cd (Figura 6.5a), mientras que en la etapa fenológica de cosecha, no hubo diferencia entre tratamientos. Para las plantas sometidas a estrés biótico, la mayor actividad se dio a 60 μM de Cd y con solo *C. michiganensis*, mientras que el menor valor se obtuvo con el tratamiento curativo (Figura 6.4c). Para la prueba ante estrés abiótico, la mayor actividad enzimática se encontró a 100 μM , para las plantas sometidas a estrés hídrico (Figura 6.5a).

Para el maíz, la actividad enzimática SOD promedio en la etapa fenológica de plántula fue de 49.1 U/g de planta (Figura 6.6a), mientras que en la etapa fenológica de cosecha fue de 1180.5 U/g de planta (Figura 6.8b). Para las plantas con 0, 60 y 100 μM de Cd, en estado fenológico de plantula, las plantas con Cd tienen una actividad enzimática menor que la planta sin Cd (Figura 6.6a), mientras que en la etapa fenológica de cosecha, la actividad enzimática SOD, solo disminuye a 100 μM de Cd (Figura 6.8b). Para la prueba por estrés abiótico, la actividad enzimática para toda la planta con Cd fue menor que la encontrada en la planta con 0 μM de Cd, no habiendo diferencia entre plantas con diferentes dosis de Cd sometidas a déficit hídrico (Figura 6.6a).

Para el tomate, la actividad enzimática CAT promedio en la etapa fenológica de plántula fue de 1.62 U/g de planta (Figura 6.4b), mientras que en la etapa fenológica de cosecha fue de 1.91 U/g de planta (Figura 6.7b). Para las plantas sometidas a estrés biótico, la mayor actividad enzimática, con respecto a las

plantas con Cd, se dio para el tratamiento preventivo (Figura 6.4b). Para la etapa fenológica de cosecha, la actividad enzimática CAT fue mayor a una concentración de 60 μM de Cd, tanto para el jitomate (Figura 6.7b) como para el maíz (Figura 6.8a).

Objetivo 3: Evaluar efectos en el rendimiento y toxicidad del grano de maíz y fruto del tomate de plantas expuestas a dosis eustresicas de cadmio.

6.7 Rendimiento y toxicidad en cultivos expuestos a Cd

6.7.1 Rendimiento y toxicidad en tomate

Para el análisis de contenido de Cd en la parte aérea de la planta de jitomate, el valor fue aumentando a mayor concentración, obteniendo 1.1627 (NC), 62.0995 y 99.5237 mg de Cd/ kg de planta para 0, 60 y 100 μM de Cd, respectivamente (Figura 6.9a). Para el análisis de Cd en fruto de jitomate, el contenido del metal fue aumentando conforme fue aumentando la concentración, obteniendo 0.052 (NC), 0.1267 y 0.1778 mg de Cd/ kg de fruto fresco para 0, 60 y 100 μM de Cd. Los resultados obtenidos para los tratamientos con Cd, son menores a los que permite el CODEX (2019), el cual es de 0.2 mg de Cd/kg de jitomate (Figura 6.9b).

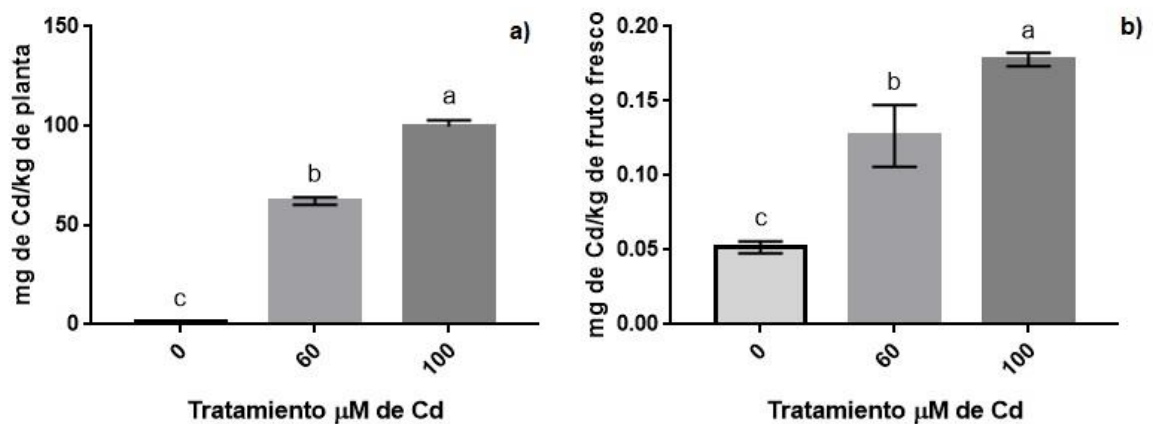


Figura 6.9. Contenido de cadmio en el fruto del tomate. a) Contenido de Cd en parte aérea de la planta de jitomate; b) Contenido de Cd en fruto de jitomate. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

En el cuadro 6.4 se muestran los resultados para el rendimiento en kg de fruto por planta de jitomate, frutos por planta, peso por fruto y altura final de la planta, de los cuales, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos. Esto muestra que no hubo alguna respuesta visible de intoxicación en la planta. Contrario a lo reportado por Hédiji *et al.* (2015), los cuales, a una concentración de 100 μM de Cd, encontraron deficiencias de nutrientes en el cultivo de tomate, incluso se retrasó y disminuyó la producción de fruto. Esto sugiere una mayor tolerancia al Cd por parte de la variedad optimax con respecto a la variedad Thomas, utilizada por Hédji *et al.* (2015).

Todos los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos (Cuadro 6.4), indican que tenemos frutos de calidad, de acuerdo al CODEX STAN 57-1981 el % de acidez, SST y pH debe ser menor o igual a 1%, 4.5% y 4.5, respectivamente. En la Figura 6.10, se muestran los frutos de tomate cosechados, en donde no se observa, de manera visual, ninguna diferencia entre tratamientos. Para el pH no hubo diferencia entre tratamientos, con un valor promedio de 4.5, obteniendo el valor límite de pH de acuerdo al CODEX STAN 57-191. Para acidez titulable, el resultado para el tratamiento con 100 μM Cd^{+2} (0.123 %) fue menor que los tratamientos 0 (0.242 %) y 60 μM Cd^{+2} (0.257 %). Para SST, se obtuvo un mayor resultado para el tratamiento con 100 μM Cd^{+2} (3.9 %) que para los tratamientos 0 (2.0 %) y 60 μM Cd^{+2} (2.1 %). Los resultados antes descritos, indican una mayor madurez para el tratamiento con 100 μM Cd^{+2} .

Cuadro 6.4. Resultados para planta y fruto de tomate

Variable	[μM Cd^{+2}]		
	0	60	100
Altura final de la planta (m)	1.60 \pm 0.49	1.49 \pm 0.32	1.69 \pm 0.42
Frutos por planta	28 \pm 8	27 \pm 9	32 \pm 8

Peso por fruto (g)	57.3 ± 10.8	53.4 ± 7.6	53.6 ± 10.9
Rendimiento (kg/planta)	1.581 ± 0.336	1.471 ± 0.370	1.699 ± 0.090
Rendimiento (Ton/ha)	94.9 ± 20.1	88.3 ± 31.1	101.9 ± 5.4
Sólidos solubles totales (%)	2.0 ± 0.2 b	2.1 ± 0.1 b	3.9 ± 0.2 a
pH	4.5 ± 0.0	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1
Acidez titulable (%)	0.242 ± 0.023 a	0.257 ± 0.039 a	0.123 ± 0.019 b
Sólidos solubles totales (%)	2.0 ± 0.2 b	2.1 ± 0.1 b	3.9 ± 0.2 a
Índice de madurez	8.1 ± 0.4 b	8.4 ± 1.0 b	29.5 ± 2.0 a

Para cada variable, los resultados muestran la media ± error estándar. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).



Figura 6.10. Fruto del tomate. 100 μM Cd; 60 μM Cd; 0 μM Cd.

Algunos mecanismos de tolerancia son, el aumento del sistema de defensa antioxidante, la homeostasis celular, el aumento de la producción endógena de reguladores del crecimiento vegetal y la modificación del metabolismo en función de reparar la estructura celular dañada (Wang *et al.*, 2011). Algunas variedades reportadas de tomate tolerante a Cd son Río Grande (Sbartai, 2017; Andal, 2016), Shenbaofen-2 (He *et al.*, 2009), Tres Cantos (López-Millan *et al.*, 2009), por otro lado, Hasán *et al.* (2009) reportaron que los genotipos 9086, Roma, Sitara TS-01, pak0010990, CLN-2123A, PICDENEATO, 0.006231 y 7035 mostraron los mejores rendimientos mientras que los genotipos 42-07, 17883, BL-1176-Riostone-1-1, MARMANDE y 17882 mostraron rendimientos bajos.

6.7.2 Obtención del rendimiento y toxicidad en maíz

En el análisis de Cd en raíz, la concentración mayor fue para el tratamiento 100 μM de Cd con 97.88 mg de Cd/kg de raíz, para el tratamiento con 60 μM fue de 47.47 mg de Cd/kg de raíz (Figura 6.11a). Sin embargo, en la parte aérea de la planta, se encontró un menor contenido de Cd en el tratamiento de 100 μM (31.83 mg/kg) con respecto al tratamiento de 60 μM (45.21 mg/kg) (Figura 6.11b). En cuanto a grano, no se detectó Cd, con un LD de 0.2 mg/kg. Todo esto sugiere un bloqueo a nivel celular por parte de la planta que no permite que el Cd llegue hasta el grano. Para el caso de la parte aérea, se sugiere que a mayor concentración mayor va siendo el bloqueo, disminuyendo la translocación hacia las partes aéreas, en las dosis de 60 y 100 μM de Cd. La planta de maíz tiene un factor de translocación de Cd bajo, es decir, la absorción y el transporte desde las raíces hasta los brotes es bajo (Yang *et al.*, 2014), por lo tanto, acumulan la mayor concentración de Cd en sus raíces que en sus brotes (Tanwir *et al.*, 2015; Lux *et al.*, 2010).

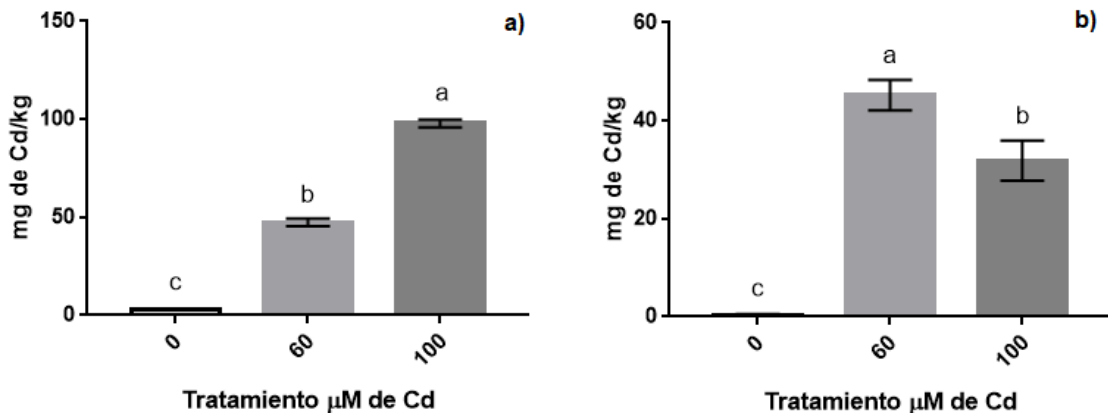


Figura 6.11. Contenido de Cd en planta de maíz. a) Cd en raíz; b) Cd en parte aérea. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

Del Cd total detectado en la planta de maíz, el 48.8 % para el tratamiento con 60 μM y el 24.5 % para el tratamiento con 100 μM se encontró en la parte aérea (Figura 6.9), dicho resultado en planta de maíz, fue mayor que el obtenido por Vatehová *et al.* (2016) y Dresler *et al.* (2015), lo cuales reportan menos del 10 % del Cd total en la parte aérea.

La retención se realiza por parte de las barreras apoplásticas y la quelación en vacuolas, entre los principales quelantes de metales pesados (incluyendo el Cd) en las células vegetales son las fitoquelatinas y otros tioles (Nocito *et al.*, 2011; Cobbett y Goldsbrough, 2002). Otro mecanismo propuesto para la retención de Cd en la raíz es a través de la impregnación de la suberina en la pared celular durante la maduración de exodermis y endodermis, lo cual afecta la plasticidad y restringe su movimiento a la estela (Nocito *et al.*, 2011; Lux *et al.*, 2010). Las plantas evitan la entrada de Cd inmovilizándolo en la pared celular de las raíces a través de enlaces con exudados extracelulares, como ácidos poligalacturónidos y esto limita su transporte a la parte aérea (Wang *et al.*, 2015). Algunas plantas han desarrollado tolerancia al estrés, acumulando los metales en las hojas, en forma de complejos metálicos estables no tóxicos, con diferentes quelantes, como son, ácidos orgánicos, aminoácidos, ferritinas, fitoquelatinas y metalotioneínas (Hall, 2002).

El rendimiento fue menor para el control (95.1 g de grano/mazorca), con respecto a los tratamientos que contenían Cd se da un mayor valor de la variable para los tratamientos con Cd, 116 g de grano/mazorca para 60 y 128.7 g de grano/mazorca para 100 μM de Cd (Figura 6.12a). Estos resultados por unidad experimental fueron 475.5, 580.0 y 643.5 y en ton/ha son 11.4, 13.4 y 15.4 para 0, 60 y 100 μM (Figura 6.12b), considerando 120 000 plantas/ha. Para el peso de grano, fue mayor para los tratamientos de 60 (46.9 g/200 granos) y 100 μM (46.9 g/200 granos) con respecto al control (35.9 g/200 granos) (Figura 6.12c). En todos los resultados mostrados en la figura 8 no hubo diferencia entre los tratamientos que contienen Cd.

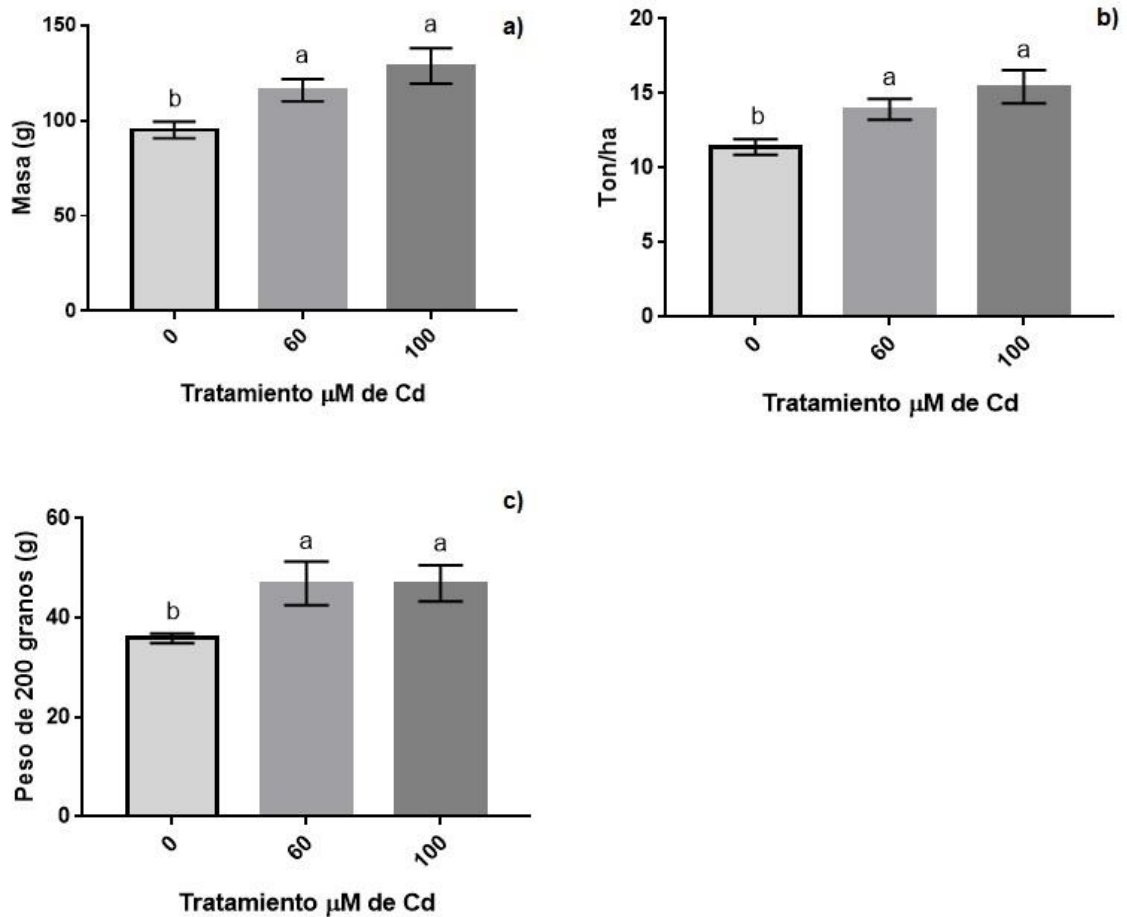


Figura 6.12. Resultados para grano de maíz. a) Masa del grano por mazorca; b) Rendimiento de grano por hectarea; c) Peso del grano por 200 granos. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

Los resultados de largo de mazorca, altura de la planta, altura a la mazorca y biomasa no dieron una diferencia significativa (Cuadro 6.5), por lo que no se mostró tampoco ningún daño de fitotoxicidad por Cd al ser dichas variables, indicadoras de crecimiento. En la Figura 6.13, podemos observar la planta de maíz en etapa fenológica vegetativa (Figura 6.13a) y en la etapa fenológica de madurez (Figura 6.13b). En la figura 6.13, para ambas etapas fenológicas, se pueden observar las plantas con los tres tratamientos (0, 60 y 100 μM) debido a

que están en un acomodo completamente al azar. Los resultados fueron contrarios a los reportados por Ling *et al.* (2017) los cuales encontraron un retraso en el crecimiento de la planta de maíz al ser expuesta a Cd.

Cuadro 6.5. Resultados para el cultivo de maíz

Variable	[$\mu\text{M Cd}^{2+}$]		
	0	60	100
Largo de mazorca (cm)	14.5 \pm 1.4	15.1 \pm 1.1	15.2 \pm 1.6
Altura de la planta (m)	2.49 \pm 0.13	2.37 \pm 0.09	2.40 \pm 0.39
Altura a la mazorca (m)	1.56 \pm 0.09	1.84 \pm 0.42	1.56 \pm 0.09
Biomasa (ton/ha)	30.4 \pm 4.3	33.8 \pm 2.4	32.7 \pm 5.6

Para cada variable, los resultados muestran la media \pm error estándar. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$).

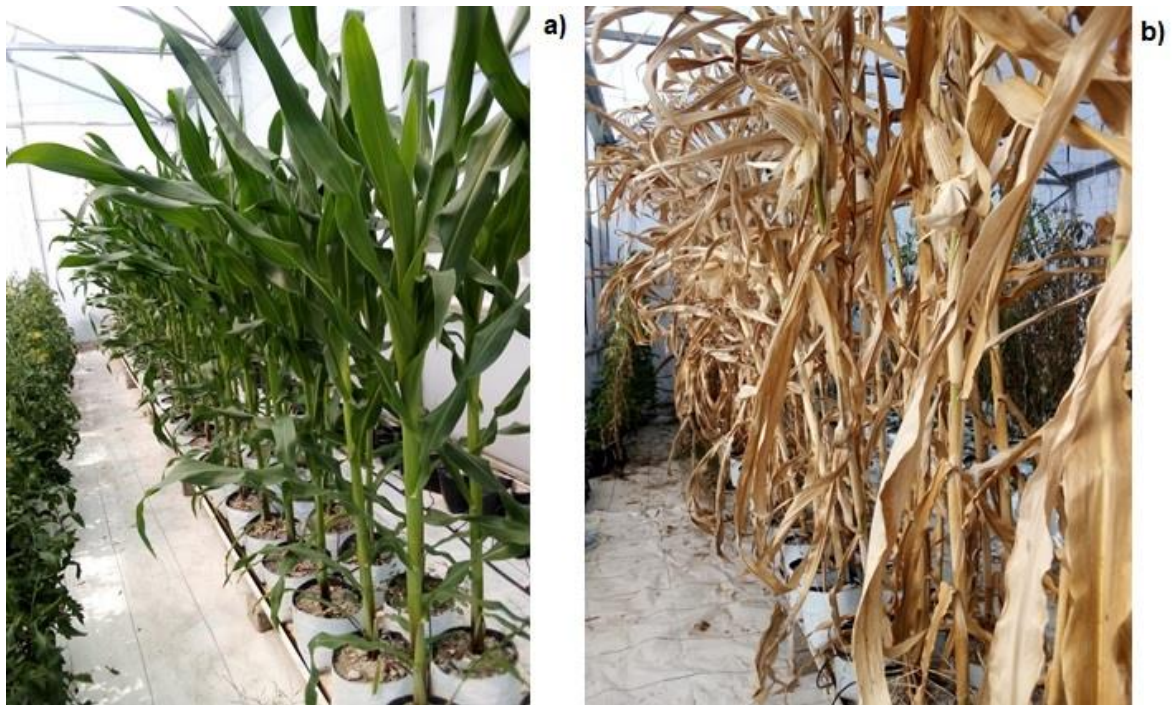


Figura 6.13. Planta de maíz sometida a dosis eustrésicas de Cd llevada hasta rendimiento. a) Etapa fenológica vegetativa; b) Etapa fenológica madura.

Algunos estudios han reportado que el maíz podría tolerar ciertos niveles de Cd sin ningún síntoma tóxico y puede cultivarse en suelos contaminados con Cd reemplazando otros cultivos principales como el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.) (Yang et al. 2014; Xu et al., 2013; Thewys et al., 2010; Zhang et al., 2009).

Como comentario final de discusión de los resultados obtenidos en este trabajo doctoral, se puede sugerir que es posible utilizar suelos o agua para riego con contenidos bajos de Cd para cultivar maíz y tomate (al menos las variedades estudiadas y bajo las condiciones del presente estudio), ya que estos pueden presentar una función eustrésica, aumentando los mecanismos de defensa de las plantas (elicitación) e incluso el rendimiento (bioestimulación) para algunos de los cultivos, sin que se presenten niveles tóxicos de Cd para humanos. En base a esto, se puede recomendar que no siempre será necesario realizar gastos para remediación de suelos (o agua para riego) que presenten Cd, todo dependerá de la dosis en la que este presente para tomar esa decisión. También existen algunos manejos agrícolas que se pueden implementar para disminuir el impacto del Cd en la alimentación humana, como es el aumento de la CIC mediante la incorporación de materia orgánica así como el manejo del pH, siendo el Cd menos disponible a pH alcalino.

VII. CONCLUSIONES

La actividad enzimática PAL y la expresión del gen Pr1a, los cuales están relacionados con el sistema inmune de las plantas aumentaron al exponer plántula de tomate a Cd y posteriormente a *C. michiganensis*, disminuyendo los daños por el fitopatógeno, por lo que la hipótesis, con respecto al estrés biótico se cumple. Por otro lado, para el estrés por déficit hídrico, para tomate, fisiológicamente la planta no mostró diferencia, sin embargo, a una concentración de 100 μM de Cd, aumentó la actividad enzimática SOD con respecto a los demás tratamientos expuestos a déficit hídrico, por lo que también se cumple la hipótesis.

Para plántula de maíz sometida a estrés por déficit hídrico, no se observó aumento en la actividad enzimática, al contrario, en la actividad enzimática PAL disminuyó en los tratamientos con Cd, por lo que no se cumple la hipótesis en este caso. Las plantas evaluadas de maíz y jitomate no presentaron daños por fitotoxicidad significativos, así como, no se encontraron cantidades significativas de Cd que sugieran toxicidad en el grano del maíz y en el fruto del tomate, sin embargo, en el caso del maíz se obtuvo un mayor rendimiento y en el caso del jitomate se encontró una respuesta positiva en los mecanismos de defensa contra *C. michiganensis*.

VIII. REFERENCIAS

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C., Barberis, R., 2002. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environ. Pollut.* 119-127.
- Agrios, G.N., 2004. *Plant Pathology*. Fourth Ed. Academic Press. New York, USA 635 p.
- Ali, S., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Chandrashekar, N., Yadav, P., Rawat, S., Sultana, M., Grover, A., 2018. Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene PR1 and its promoter from *Brassica juncea*. *Biotech* 8:10. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1027-8>
- Andal, F.A., 2016. Assessment of the possible utilization of tomato as a phytoremediant in soils artificially contaminated with heavy metals. *International Journal of Applied Environmental Sciences*. 11(1):193–209.
- Arroyave, Q.C., Arraque, M.P., Pelaez, J.C., 2009. Evaluación de la bioacumulación y toxicidad de cadmio y mercurio en pasto llanero. *Vitae*. Volumen 17, No 1. 45-49.
- ASERCA, 2018, <https://www.gob.mx/aserca/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-de-mexico?idiom=es>. Visto en noviembre de 2021.
- Bai, Y., Song, F., Chen, M., Xing, J., Liu, Z., Liu, S., 2004. Characterization of the rutin-metal complex by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences*. 20:1147-1151.
- Banerjee, R., 2012. Redox outside the box: linking extracellular redox remodeling with intracellular redox metabolism. *J Biol Chem*. 287:4397-402.
- Baysal, Ö., Soyulu, E.M., Soyulu, S., 2003. Induction of defense-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathol* 52(6):747–753. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2003.00936.x>

- Beltrán, V. M., 2001. Fitoextracción En suelos contaminados con cadmio y zinc usando especies vegetales comestibles. División de Ciencias Básicas e Ingeniería. UAM.
- Blagoskonny M.V., 2011. Hormesis does not make sense except in the light of TOR-driven aging. *Aging*. 3:1052-62.
- Boyd, R.S., 2007. The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant and Soil* 293, 153–76.
- Calabrese, E.J., Bachmann, K.A. Bailer, A.J., 2007. Biological stress response terminology. *Toxicol Appl Pharm.*; 222:122-128.
- Calabrese, E. J., 2008. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis. *Ageing Res Rev.*; 7:8-20. 3.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., Calabrese E.J., 2011. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Aspects Med*. 32:279-304.
- Calabrese, E.J., 2014. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb. Cell* 1, 145–149.
- Cárdenas, V.J.O., 2000. Eficacia en el control químico de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* en los cultivos de tomate, chile y sandía. Tesis de Maestría de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 156 p.
- Carrillo, F.J.A., Montoya, R.T., García, E.R.S., Cruz, O.J.E., Márquez, Z.I., Sañudo, B.J.A., (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, núm. 2, pp. 123-127.
- Carlton, W. M.; Braun, E. J.; Gleason, M. L. 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* 88:525-529.

Casierra-Posada, F., Aguilar-Avendaño, O.E., 2008. Calidad en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cosechados en diferentes estados de madurez. *Agronomía Colombiana*, vol. 26, núm. 2, pp. 300-307.

Caverzan, A., Casassola, A., Brammer, S.P., 2016. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. In: Shanker, A., Shanker, C. (Eds.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*. InTech, Croatia, pp. 463–480. <https://doi.org/10.5772/61368>

Cervantes, G.D., Troncoso, R.R., Sánchez, E.M., Gutierrez M.F., Ceceña, D.C., Grimaldo, J.O., 2016. Effects of Cadmium on total phenolic compounds and flavonoids in *Euglena gracilis*. *Gayana* 80(1): 1-5.

Cobbett, C., Goldsbrough P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 53, 159-182.

CODEX STAN 57-1981, 2013. Norma para el concentrado de tomate elaborado.

Dai, L.P., Dong, X.J., Ma, H.H., 2012. Antioxidative and chelating properties of anthocyanins in *Azolla imbricate* induced by cadmium. *Polish Journal Environmental Studies* 21:837–844.

Dresler, S., Wójcik, M., Bednarek, A., Hanaka, A., Tukiendorf, A., 2015. The effect of silicon on maize growth under cadmium stress. *Russ J Plant Physiol* 62:86–92. <https://doi.org/10.1134/S1021443715010057>

Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 1998. Phytoextraction of zinc by Oat (*Avena sativa*), Barley (*Hordeum vulgare*), and Indian Mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Sci. Technol.*, 32 (6), 802-805.

EPPO., 2016. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12302/full>

Erofeeva, E.A., 2020. Estimating the frequency of hormesis and other non-monotonic responses in plants experiencing road traffic pollution in urban areas and experimental pollutant exposure. *Environ Monit Assess* 192, 460. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08418-8>

http://www.fao.org/nr/water/aquastat/countries_regions/MEX/indexesp.stm

Feregrino-Perez, A.A., Torres-Pacheco, I., Vargas-Hernandez, M., Munguia-Fragoso, P.V., Loarca-Piña, G.F., Mendoza-Diaz, S.O., Ocampo-Velazquez, R.O., Rico-Garcia, E., Guevara-González, R.G., 2011. Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods. *J. Sci. and Ind.Res*, 859-864.

Fones, H., Davis, C.A.R., Rico, A., Fang, F., Smith, J.A.C., Preston, G.M., 2010. Metal hyperaccumulation armors plants against disease. *PLoS Pathogens* 6, e1001093.

Fones, H.N., Preston, G.M. 2013. Trade-offs between metal hyperaccumulation and induced disease resistance in metal hyperaccumulator plants. *Plant Pathology*, 62 (1), 63–71. <https://doi.org/10.1139/O07-018>.

Golldack, D.L., 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci*, 151-160.

González, G.R., 1974. Estudio sobre marchitez del tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, en el valle de Culiacán, Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México.

Gonzalez-Mendoza, D., Santamaría, J.M., Zapata, P.O., 2007. Multiple effects of cadmium on the photosynthetic apparatus of *Avicennia germinans* L. as probed by OJIP chlorophyll fluorescence measurements. *Zeitschrift für Naturforschung B* 62:265–272.

Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., 2011. HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 51:1355-64.

Hall, J.L., (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53(366):1–11. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>

Hasan, S.A., Hayat, S., Ahmad, A., 2009. Screening of tomato *Lycopersicon esculentum* cultivars against cadmium through shotgun approach. *Journal of Plant Interactions*. 4(3):187–201. <https://doi.org/10.1080/17429140802474412>

Hausbeck, M. K.; Bell, J.; Medina-Mora, C.; Podolsky, R., and Fulbright, D. W. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *C. michiganensis*

subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology* 90:38-44.

Hédiji, H., Djebali, W., Belkadhi, A., Cabasson, C., Moing, A., Rolin, D., Brouquissec, R., Galluscib, P., Chaïbiun, W., 2015. Impact of long-term cadmium exposure on mineral content of *Solanum lycopersicum* plants: consequences on fruit production. *South African Journal of Botany*. 2015; 97:176–81. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.01.010>

Hernández-Baranda, Y., Rodríguez-Hernández, P., Peña-Icart, M., Meriño-Hernández, Y., Cartaya-Rubio, O., 2019. Toxicidad del Cadmio en las plantas y estrategias para disminuir sus efectos. Estudio de caso: El tomate. *Cultivos Tropicales*, vol. 40, no. 3, e10. 1-19.

Huang, B., Xin, J., Dai, H., Liu, A., Zhou, W., Yi, Y., Lia, K., 2015. Root morphological responses of three hot pepper cultivars to Cd exposure and their correlations with Cd accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(2):1151–9. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3405-7>

Jahangir, M., Abdel-Farid, I.B., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte R., 2009. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environ Exp Bot* 67(1): 23-33.

Jinadasa, N., Collins, D., Holford, P., Milham, P.J., Conroy, J.P., 2016. Reactions to cadmium stress in a cadmium-tolerant variety of cabbage (*Brassica oleracea* L.): is cadmium tolerance necessarily desirable in food crops? *Environmental Science and Pollution Research*. 23(6):5296–306.

Kouda, K., Iki, M., 2010. Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *J Physiol Anthropol*. 29:127-32.

Kovacik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Stork, F. Backor, M., 2009. Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria camomilla* plants. *Plant and Soil* 320:231–242.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 25:402–408.

Lösch, R., 2004. Plant mitochondrial respiration under the influence of heavy metals. In: Heavy Metal Stress in Plants. Springer; 2004. p. 182–200.

Luna-López, A., Triana-Martínez, F., López-Diazguerrero, N.E., 2010. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Radic Biol Med.*; 49:1192-204.

Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., White, P.J., 2010. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of experimental botany.* 62(1):21–37.

MacDonald, M.J., D’Cunha, G.B., 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* 85, 273–282. <https://doi.org/10.1139/O07-018>.

Mattson, M.P., 2008. Hormesis defined. *Ageing Res Rev.* 2008; 7:1-7. 4.

Hoffmann G.R., 2009. A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose-Response.* 7, 1-51.

Li, X., Zhou, Q., Sun, X., 2016. Ren W. Effects of cadmium on uptake and translocation of nutrient elements in different welsh onion *Allium fistulosum* L.) cultivars. *Food chemistry.* 2016; 194:101–10.

Ling, T., Gao, Q., Du, H., Zhao, Q., Ren, J., 2017. Growing, physiological responses and Cd uptake of Corn (*Zea mays* L.) under different Cd supply, *Chemical Speciation & Bioavailability,* 29:1, 216-221. <https://doi.org/10.1080/09542299.2017.1400924>

López-Millán, A.F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., Abadía, J., 2009. Cadmium toxicity in tomato *Lycopersicon esculentum* plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany.* 65(2–3):376–85.

Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., White, P.J., 2010. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot* 62:21–37.

Nocito, F.F., Lancilli, C., Dendena, B., Lucchini, G., Sacchi, G.A., 2011. Cadmium retention in rice roots is influenced by cadmium availability, chelation and translocation. *Plant, cell & environment.* 34(6):994–1008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02299.x>Citas: 129

Nogueirol, R.C., Monteiro, F.A., Gratão, P.L., da Silva, B.K. de A., Azevedo, R.A., 2016. Cadmium application in tomato: nutritional imbalance and oxidative stress. *Water, Air, & Soil Pollution*. 227(6):210.

NMX-F-102-NORMEX-2010, 2010. Alimentos-determinación de acidez titulable en alimentos-Método de ensayo (prueba).

NMX-F-112-NORMEX-2010, 2010. Determinación de sólidos solubles – método refractométrico.

NOM-001-SEMARNAT-1996, 1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, 2004. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.

NOM-157-SEMARNAT-2009, 2009. Que establece los elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros.

NOM-F-317-S-1978. NORMA OFICIAL MEXICANA "Determinación de pH en Alimentos" NOM-F-317-S-1978.

Ramírez, V.J., 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. pp. 29-49. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.

Rattan, S.I., Fernandes, R.A., Demirovic, D., Dymek, B., Lima, C.F., 2009. Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose-Response*. 7:90-103.

Reyes, Y.C., Vergara. I., Torres, O.E., Díaz, M., González, E.E. (2016) Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*. Vol. 16-2. Colombia. Pp. 66-67.

Rico R.M.A., 2006. Evaluación de las posibles alteraciones gaméticas en tradescantia producidas por insecticidas piretroides liberados por vaporizaciones eléctricas. Tesis. Facultad de ciencias. Posgrado en Ciencias biológicas, UNAM.

Rodriguez-Salus, M., Bektas, Y., Schroeder, M., Knoth, C., Vu, T., Roberts, P., Kaloshian, I., Eulgem, T., 2016. The synthetic elicitor 2-(5-bromo-2-hydroxy-phenyl)-thiazolidine-4- carboxylic acid links plant immunity to hormesis. *Plant Physiol.* 170, 444–458. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01058>

Rooney C.P., Zhao F.J. y McGrath S.P., 2006. Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 726-732.

SAGARPA, 2018.
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/Boletines/Paginas/201208B058.aspx>. Visto en abril de 2018.

Sánchez, C.M.A., 1998. Enfermedades causadas por hongos en tomate. pp. 17-28. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). *Enfermedades de las Hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.

Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany.* 52(364):2115–26. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2115>

Satarug, S., Garrett, S.H., Sens, M.A., Sens, D.A., 2010. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect* 118:182–190.

Sbartai, H., Sbartai, I., Djebbar, M.R., Berrebbah, H., 2017. Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals - “Case Tomato” | International Society for Horticultural Science. *Acta Horticulturae.* 95–100.

Scott L.E.H., 2007 Las metalotioneínas y el estrés quirurjico. *REB* 26(2): 67-72.

SIAP, 2021. Escenario mensual de productos agroalimentarios. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/653162/Escenario_jitomate_jun21.pdf Consultado en abril de 2022.

SIAP, 2021. Estadística de producción agrícola. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php> Consultado en abril de 2022.

Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja R. and Jain, R.K., 2003. Phytoremediation: An overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 405-412.

Solano-Alvarez, N., Valencia-Hernández, J.A, Rico-García, E., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R.V., Escamilla-Silva, E.M., Romero-García, A.L., Alpuche-Solís, A.G., Guevara-González, R.G., 2021. A Novel Isolate of *Bacillus cereus* Promotes Growth in Tomato and Inhibits *Clavibacter michiganensis* Infection under Greenhouse Conditions. *Plants* 10:506. <https://doi.org/10.3390/plants10030506>

Tablante, R., Matos, A.A., 2014. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y CoCl₂ sobre la producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. F. regeneradas in vitro. *Serbiluz* 12: 57 – 66.

Tanwir, K., Akram, M.S., Masood, S., Chaudhary, H.J., Lindberg, S., Javed, M.T., 2015. Cadmium-induced rhizospheric pH dynamics modulated nutrient acquisition and physiological attributes of maize (*Zea mays* L.). *Environ Sci Pollut Res* 22:9193–9203.

Thewys, T., Witters, N., Van Slycken, S., Ruttens, A., Meers, E., Tack, F.M. G., Vangronsveld, J., 2010. Viabilidad económica de la fitorremediación de una zona agrícola contaminada con cadmio utilizando maíz energético. Parte I: Efecto sobre los ingresos del agricultor. *Revista Internacional de Fitorremediación*, 12, 650–662.

Trenberth, K. D., 2014. Global warming and changes in drought. *Nature Clim. Chan*, 17-22.

Vasak, M., 1997. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*. 19:13-7.

Vatehova-Vivodová, Z., Kollarová, K., Lisková, D., 2018. Maize shoot cell walls under cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(22):22318-22322. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2602-1>

- Vatehová-Vivodová, Z., Malovíková, A., Kollárová, K., Kučerová, D., Lišková, D., 2016. Impact of cadmium stress on two maize hybrids. *Plant Physiol Biochem.* 108:90–98
- Wang, P., Deng, X., Huang, Y., Fang, X., Zhang, J., Wan, H., Yang, D., 2015. Comparison of subcellular distribution and chemical forms of cadmium among four soybean cultivars at young seedlings. *Environmental Science and Pollution Research.* 22(24):19584–95. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5126-y>
- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R., Jin, L., 2011. Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa *Medicago sativa* (L.). *Environmental pollution.* 159(12):3627–33.
- Xu, W., Lu, G., Dang, Z., Liao, C., Chen, Q., Yi, X., 2013. Absorción y distribución de Cd en maíz dulce cultivado en suelos contaminados: un estudio a escala de campo. *Química Bioinorgánica y Aplicaciones.* doi:10.1155/2013/959764.
- Yang, Y., Nan, Z., & Zhao, Z., 2014. Bioaccumulation and translocation of cadmium in wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) from the polluted oasis soil of Northwestern China. *Chem Speciat Bioavailab* 26(1):43–51
- Zhang, H., Dang, Z., Zheng, L.C., Yi, X.Y., 2009. Remediación de suelos co-contaminados con pireno y cadmio mediante el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Ambientales*, 6, 249–258
- Zhao, F.J., Rooney, C.P., Zhang, H., McGrath, S.P., 2006. Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 733-742.