

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación Microbiología Celular y Molecular**

---

**Análisis cuantitativo y cualitativo de la colonización rizosférica  
y endófito de bacterias nativas aisladas de *Solanum  
hindsianum* en distintas solanáceas de interés agrícola**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Jenny Jocabet Meza Contreras**

Ensenada, Baja California, México  
2022

Tesis defendida por  
**Jenny Jocabet Meza Contreras**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Director de tesis

**Dra. Rufina Hernández Martínez**

**Dra. Laura Gómez Consarnau**

**Dr. Alfonso Méndez Bravo**



---

**Dra. Ana Denise Re Arujo**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jenny Jocabet Meza Contreras** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida [con orientación en Microbiología Celular y Molecular](#)

**Análisis cuantitativo y cualitativo de la colonización rizosférica y endófitas de bacterias nativas aisladas de *Solanum hindsianum* en distintas solanáceas de interés agrícola**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo  
**Director de tesis**

Las plantas se relacionan estrechamente con la microbiota del suelo. Algunas bacterias tienen efectos benéficos sobre el crecimiento vegetal. Estas bacterias se conocen como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, o PGPB por sus siglas en inglés, y se utilizan en la agricultura como una alternativa sustentable al uso de agroquímicos. Sin embargo, su efectividad depende de su adaptación a las condiciones ambientales, por lo que se ha propuesto utilizar cepas nativas de la región, aisladas de plantas cercanas filogenéticamente al cultivo de interés. Previamente, en nuestro grupo se aislaron e identificaron bacterias rizosféricas y endófitas de la solanácea nativa *Solanum hindsianum* capaces de promover el crecimiento vegetal. De las bacterias identificadas se seleccionaron cuatro cepas, EBCAb1, EBCAe10, rbES061 y rbES087, todas pertenecientes al género *Pseudomonas*. En este trabajo se marcaron las cepas con un transposón Tn7, mediante electroporación y conjugación, este transposón confiere resistencia a un antibiótico y un fluoróforo. Se utilizaron cuatro fluoróforos para marcar las cepas teniendo un total de 11 cepas marcadas. Se seleccionaron las cepas EBCAe10 y rbES061, ambas marcadas con el transposón Tn7-152, para evaluar la colonización rizosférica, epífita y endófitas y la promoción de crecimiento, en dos condiciones de riego, en plantas de chile, tomate y tomatillo en cámara de crecimiento e invernadero. En cámara de crecimiento ambas cepas lograron colonizar de manera rizosférica y epífita las plantas de tomate, chile y tomatillo pero la cepa EBCAe10 fue la única con la capacidad de colonizar de manera endófitas. En invernadero la cepa EBCAe10 colonizó rizosféricamente el cultivo de chile y tomate en condiciones de riego bajo, y en riego alto, la cepa rbES061 colonizó chile y tomate en riego alto y tomate en riego bajo. La cepa EBCAe10 colonizó de manera endófitas y epífita en ambos cultivos y condiciones de riego en invernadero. Este trabajo provee información acerca de la colonización de dos cepas nativas de Baja California, siendo la cepa EBCAe10 la que obtuvo mejores niveles de colonización.

**Palabras clave:** PGPB, Solanaceae, colonización, zonas áridas.

Abstract of the thesis presented by **Jenny Jocabet Meza Contreras** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science Life Science

**Quantitative and qualitative analysis of the rhizospheric and endophytic colonization of native bacteria isolated from *Solanum hindsianum* in different Solanaceae of agricultural interest**

Abstract approved by:

---

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo  
**Thesis Director**

Plants interact closely with the soil microbiota. Some bacteria have beneficial effects on plant growth. These bacteria are known as growth-promoting bacteria, or PGPB, and are used in agriculture as an alternative to agrochemicals. However, its effectiveness depends on its adaptation to environmental conditions, due to it has been proposed to use native strains. Previously, our group isolated and identified rhizospheric and endophytic bacteria from the native nightshade *Solanum hindsianum*, characterized as PGPB. From them, four strains were selected, EBCAb1, EBCAe10, rbES061 and rbES087, all belonging to the *Pseudomonas* genus, which were promising in plant growth promotion assays. In this work, the strains were labeled with a Tn7 transposon by electroporation and conjugation, this transposon conferred resistance to an antibiotic and a fluorophore. Four fluorophores were used to label the strains, making a total of 11 labeled strains. Strains EBCAe10 and rbES061, both marked with the Tn7-152 transposon, were selected to evaluate their rhizospheric, epiphytic and endophytic colonization, and plant growth promotion, under two irrigation conditions in pepper, tomato and tomatillo plants in growth chambers and in greenhouse conditions. Strain EBCAe10 was the only one that colonized the endosphere of all plant species in greenhouse and growth chamber conditions; rbES061 had a rhizospheric and epiphytic colonization in growth chamber conditions. This work provides information about the colonization of two native Baja Californian strains, EBCAe10 being the one with the best colonization levels.

**Keywords: PGPR, Solanaceae, Colonization Arid zones**

## **Dedicatoria**

A mis padres.

José Jesús Meza Mayoral y Martha Alicia Contreras Meza.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por darme la oportunidad para realizar mi maestría en esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento durante mi estancia en la maestría.

A la Sociedad Max Planck a través del Grupo de Asociado Max Planck en Transducción de Señales y Microbiología Agrícola por el financiamiento para realizar este trabajo.

Al departamento de Microbiología de CICESE y al grupo de fitopatología.

A los miembros de mi comité, la Dra. Laura Gómez Consarnau, el Dr. Alfonso Méndez, gracias por darme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio y por su apoyo durante los ensayos realizados en ella. Y especialmente gracias a la Dra. Rufina Hernández por su apoyo y consejos en la realización de este proyecto.

Al Dr. Alejandro Méndez por su ayuda durante mis ensayos realizados en Morelia.

Al Dr. Edgardo Sepúlveda, por aceptarme como su alumna, por su apoyo incondicional durante estos dos años, por sus consejos, por ayudarme a plaquear las 1600 cajitas Petri en los ensayos de colonización y por compartirme su emoción por la ciencia, por ser tan buen asesor y profesor.

A Ana Corral por el aislamiento y caracterización de las cepas endófitas utilizadas para este proyecto.

A Carmen San Juan por el aislamiento y caracterización de las cepas rizosféricas, además por su ayuda y consejos (Carmen es mi pastor, nada me faltará).

A mis compañeras de laboratorio, especialmente a Yesi y Gema por hacer tan amenos y divertidos mis días en el laboratorio.

A mis compañeros del equipo de tochito y a la persona que tuvo la iniciativa de formar el equipo, conocí gente muy bonita y aprendí mucho de un nuevo deporte y de mí misma. Los recordare con cariño

A Luis Abraham, alias el tío Eibby por apoyarme desde la licenciatura. Por hacer un tiempo para mí y siempre estar presente en mis ensayos de presentaciones.

A mis vecinas, casi roomates, Lety y Narda, por las pláticas, chismecito y comidas que compartimos.

A mis compañeras y amigas de generación, Ana Karen y Lupita por estar siempre para mí, en mis días felices y mis días tristes, que a pesar que nos conocimos en persona hasta el segundo año de maestría, se volvieron amigas invaluable en el año que pasé con ustedes, las quiero con todo mi corazón.

A las personas que siempre me apoyaron y ayudaron, aunque estaban lejos de mí, Mariel, Geovanna (las spicy's), Eloísa y en especial a Memo. Gracias por siempre estar ahí para mí, por escucharme y darme palabras de aliento cuando sentía que no podía hacer las cosas y el síndrome del impostor se apoderaba de mí, cuando me daba miedo si quiera mandar los papeles para aplicar a la maestría porque creía que no iba a quedar. Siempre les estaré infinitamente agradecida.

A mis hermanos Erika, Anabel, Kareem y mi hermana menor Jaqueline, gracias hermanita por siempre ser mí soporte.

A mis padres por siempre apoyar mis decisiones y trabajar tanto para podernos dar la vida que tenemos, todos mis logros son gracias a su apoyo.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos generales.....	1
1.1.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB).....	1
1.1.2 Ácido indol-3-acético.....	2
1.1.3 Tolerancia al estrés abiótico.....	4
1.1.4 Uso de PGPB nativas.....	4
1.1.5 Bacterias del género <i>Pseudomonas</i> .....	6
1.1.6 Solanáceas de interés agrícola.....	8
1.1.7 <i>Solanum hindsianum</i> .....	9
1.1.8 Transposones.....	9
1.2 Justificación.....	10
1.3 Hipótesis.....	10
1.4 Objetivos.....	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	11
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>12</b>
2.1 Evaluación de resistencia a antibióticos y crecimiento a 37 °C.....	12
2.2 Marcaje de bacterias.....	12

2.2.1	Plásmidos pMRE-Tn7.....	12
2.2.2	Electroporación .....	14
2.3	Confirmación de la inserción del transposón Tn7 .....	15
2.4	Identificación molecular de aislados bacterianos .....	16
2.5	Germinación de Semillas .....	16
2.6	Ensayos <i>in vivo</i> .....	17
2.6.1	Ensayos en cámara de crecimiento.....	17
2.6.2	Ensayos en invernadero .....	17
2.6.3	Evaluación de la colonización de los ensayos en cámara de crecimiento .....	18
2.6.4	Evaluación de la colonización bacteriana bajo condiciones de invernadero .....	19
2.6.5	Evaluación de parámetros de promoción de crecimiento .....	20
2.7	Ensayos <i>in vitro</i> de promoción de crecimiento vegetal en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>DR5::gus</i> .....	20
2.7.1	Germinación de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>DR5::gus</i> .....	20
2.7.2	Ensayo de promoción de crecimiento temprano en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>DR5::gus</i> , por compuestos difusibles .....	21
2.7.3	Ensayos histoquímicos del gen reportero <i>uid2 (gus)</i> .....	21
2.7.4	Evaluación de parámetros morfométricos.....	22
2.8	Microscopía confocal de bacterias y raíces.....	22
2.9	Análisis estadísticos.....	23
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>		<b>24</b>
3.1	Evaluación de resistencia a antibióticos y temperatura .....	24
3.2	Marcaje de bacterias .....	25
3.3	Confirmación de la inserción del transposón Tn7 .....	26
3.4	Identificación molecular de las cepas marcadas .....	27
3.5	Microscopía confocal de las cepas .....	28
3.6	Respuesta a auxinas en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea <i>DR5::gus</i> .....	28

3.7	Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en ensayo de interacción por compuestos difusibles .....	30
3.8	Ensayos de germinación .....	33
3.9	Colonización rizosférica, endófito y epífita de las cepas rbES061 y EBCAe10 en distintos cultivos de la familia <i>Solanaceae</i> , en condiciones de cámara de crecimiento e invernadero .....	33
3.10	Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas tomate, chile y tomatillo en condiciones de cámara de crecimiento.....	37
3.11	Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas tomate, chile en condiciones de invernadero .....	43
3.11.1	Evaluación de la actividad de promoción del crecimiento en plantas tomate, en condiciones de invernadero .....	43
3.11.2	Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas chile, en condiciones de invernadero .....	46
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>57</b>
<b>Literatura citada .....</b>		<b>58</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>63</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Mecanismos bacterianos directos e indirectos de promoción vegetal .....	1
<b>Figura 2.</b> Vías de síntesis de ácido indolacético en bacterias.....	3
<b>Figura 3.</b> Mapa de plásmido pMRE-Tn7.....	13
<b>Figura 4.</b> Cepas transformadas observadas mediante un transiluminador de luz azul, donde se muestra la fluorescencia de algunas de las bacterias.....	25
<b>Figura 5.</b> Gel de electroforesis de la amplificación por PCR de la región del fluoróforo del transposón..	26
<b>Figura 6.</b> Microscopía confocal de las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp.....	28
<b>Figura 7.</b> Ensayos histoquímicos del gen reportero uid2 ( <i>gus</i> ) <i>Arabidopsis thaliana</i> línea DR5:: <i>gus</i> , en respuesta a la interacción con la cepa rbES061, la cepa EBCAe10 y el consorcio de ambas cepas.....	29
<b>Figura 8.</b> Evaluación de parámetros morfométricos en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea DR5:: <i>gus</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de supervivencia en el ensayo de interacción por compuestos volátiles .....	32
<b>Figura 10.</b> Colonización rizosférica de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate, chile y tomatillo con bajo riego alto (A) y con riego bajo (B) .....	33
<b>Figura 11.</b> Colonización epífita de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate, chile y tomatillo bajo con riego alto (A) y riego bajo (B).....	34
<b>Figura 12.</b> Colonización endófitas de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate, chile y tomatillo, con riego alto (A) y riego bajo (B).....	35
<b>Figura 13.</b> Colonización rizosférica de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate y chile, con riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. ....	36
<b>Figura 14.</b> Colonización epífita de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate y chile, con riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. ....	36
<b>Figura 15.</b> Colonización endófitas de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate y chile, bajo riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. ....	37
<b>Figura 16.</b> Peso seco de raíz en plantas de tomatillo inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo. ....	39
<b>Figura 17.</b> Peso seco de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo. ....	40

<b>Figura 18.</b>	Peso seco de tallo en plantas de tomatillo inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo. ....	40
<b>Figura 19.</b>	Largo de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo.....	41
<b>Figura 20.</b>	Número de hojas en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo .....	42
<b>Figura 21.</b>	Número de hojas en plantas de tomatillo inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego o alto. ....	42
<b>Figura 22.</b>	Número de flores en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero. ....	44
<b>Figura 23.</b>	Grosor de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego o alto con riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. ....	44
<b>Figura 24.</b>	Largo de raíz en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero.....	45
<b>Figura 25.</b>	Peso seco de raíz plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego alto en condiciones de invernadero. ....	45
<b>Figura 26.</b>	Peso seco de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero. ....	46
<b>Figura 27.</b>	Largo de tallo en plantas de chile inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego con riego alto en condiciones de invernadero. ....	47
<b>Figura 28.</b>	Número de hojas en plantas de chile inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero.....	47
<b>Figura 29.</b>	Peso seco de raíz en plantas de chile inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero.....	48
<b>Figura 30.</b>	Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego bajo en plantas de tomate.....	63
<b>Figura 31.</b>	Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego alto en plantas de tomate.. ....	63
<b>Figura 32.</b>	Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego alto en plantas de chile.....	64
<b>Figura 33.</b>	Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego bajo en plantas de chile.....	64
<b>Figura 34.</b>	Ensayo de interacción planta-bacteria por compuestos difusibles. Se utilizaron plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> línea DR5:: <i>gus</i> en cajas Petri con medio MS.....	65

**Figura 35.** Ensayo de interacción planta-bacteria por compuestos volátiles. Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *DR5::gus* en cajas Petri con medio MS..... 66

## Lista de tablas

Tabla		Página
<b>Tabla 1.</b>	Características de lo transposones Tn7 .....	13
<b>Tabla 2.</b>	Evaluación de crecimiento a 30 °C y 37°C. El signo .....	24
<b>Tabla 3.</b>	Evaluación de resistencia.....	24
<b>Tabla 4.</b>	Transformaciones para el marcaje de bacterias.....	25
<b>Tabla 5.</b>	Identificación molecular de las cepas marcadas .....	27
<b>Tabla 6.</b>	Morfométricos en plantas de tomate en condiciones de cámara de crecimeitno. Vía.....	38
<b>Tabla 7.</b>	Morfométricos en plantas de chile en condiciones de cámara de crecimeitno.....	38
<b>Tabla 8.</b>	Morfométricos en plantas de tomatillo en condiciones de cámara de crecimeitno.....	39
<b>Tabla 9.</b>	Morfométricos en plantas de tomate en condiciones de invernadero .....	43

## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 Aspectos generales

#### 1.1.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB)

La rizosfera es la región del suelo en contacto con la raíz, en esta zona las plantas se asocian al microbioma del suelo estableciendo relaciones antagonistas, mutualistas o simbióticas. Estas interacciones juegan un papel fundamental para el rendimiento de los cultivos. Un grupo de microorganismos que tienen un efecto benéfico sobre las plantas se conoce como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, o PGPB, por sus siglas en inglés. Estas bacterias pueden colonizar distintas partes de las plantas como la rizósfera, la endósfera o la filósfera (Hassani et al., 2018).

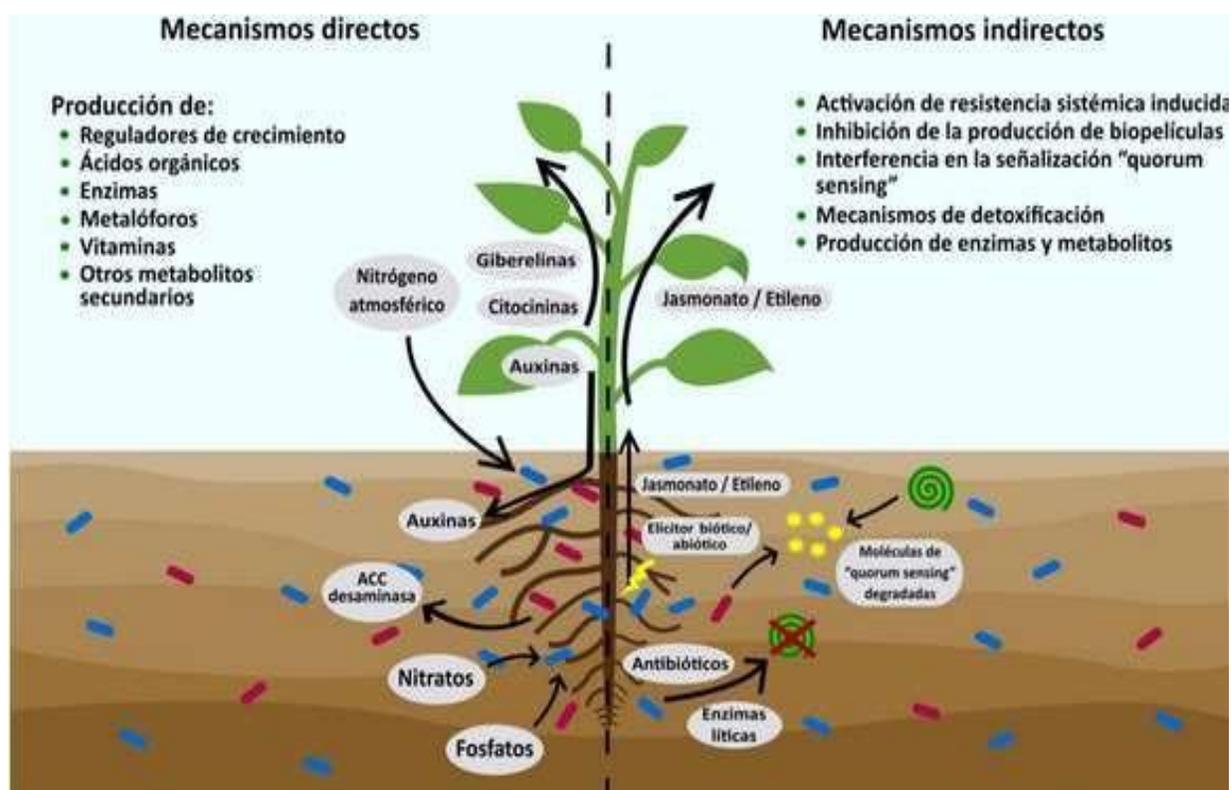


Figura 1. Mecanismos bacterianos directos e indirectos de promoción vegetal (Chávez-Díaz et al., 2020).

Estos microorganismos promueven el desarrollo de los cultivos a través de mecanismos directos o indirectos (figura 1). Entre los mecanismos directos, se encuentran la solubilización y el aumento de la disponibilidad de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, zinc, potasio y hierro, y la producción de fitohormonas, entre ellas las auxinas, citoquininas y giberelinas. Entre los mecanismos indirectos se encuentra el antagonismo a patógenos mediante la antibiosis, la producción de sideróforos y de enzimas líticas, la competencia por nutrientes y la inducción de la respuesta sistémica de la planta (Jha y Sara, 2015; Kumar y Verma, 2018).

Estas características hacen que las PGPB sean una opción viable para su uso en la agricultura como biofertilizantes o biopesticidas. Algunas especies pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Paenobacillus*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Rhizobia*, *Bacillus*, y *Pseudomonas* han sido utilizadas en formulaciones comerciales para uso agrícola (Glick, 2012)

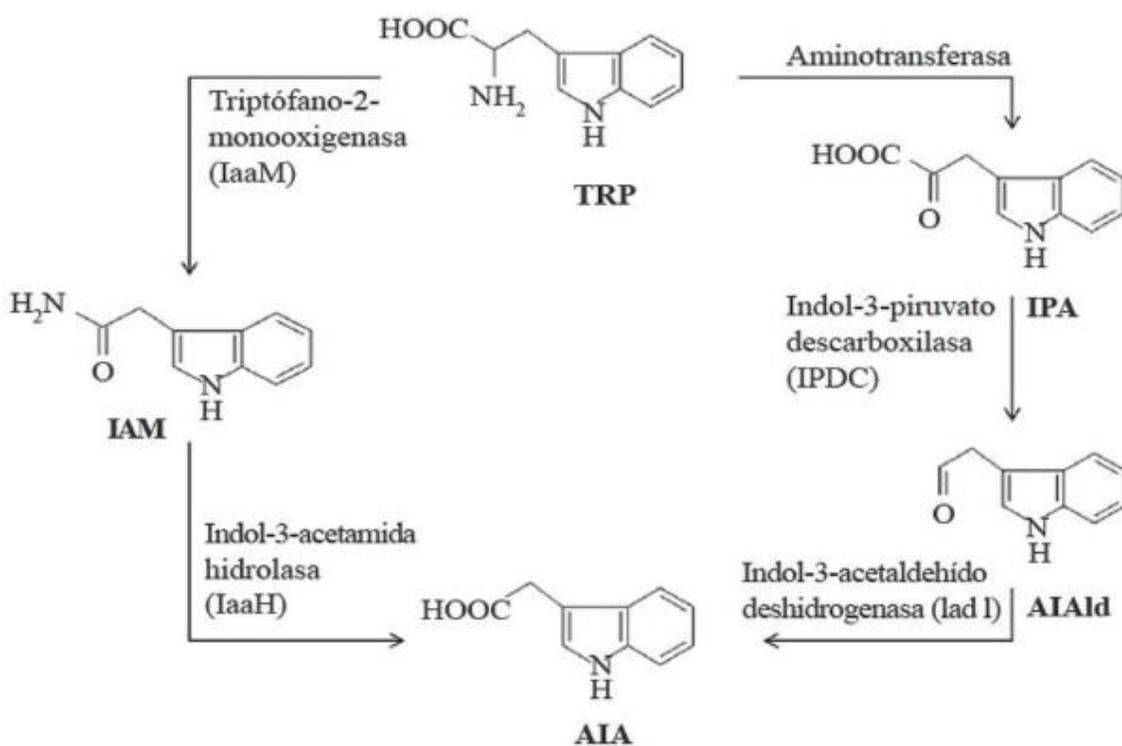
### 1.1.2 Ácido indol-3-acético

Las fitohormonas son compuestos producidos por las plantas, los cuales funcionan como señales químicas en respuesta a distintos factores ambientales. Estas moléculas son conocidas también como reguladores de crecimiento ya que tienen un efecto directo sobre el desarrollo de la planta, como la floración, la elongación de raíz y tallo, la producción de frutos, la respuesta a fitopatógenos, entre otros. Existe una gran variedad química y funcional de fitohormonas las cuales se clasifican en diferentes grupos, dentro de las más conocidas se encuentran las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico, el etileno, los jasmonatos y el grupo más estudiado que corresponde a las auxinas (Fahad et al., 2015).

La palabra auxina viene del griego "*auxein*" la cual significa "crecer". Este grupo de fitohormonas está involucrado en gran rango de procesos celulares, tales como la endocitosis, la polaridad de las células, la elongación celular y la diferenciación celular, entre otros. Las auxinas se conocen principalmente por estar relacionadas con el desarrollo de raíces y tallo, pero también están involucradas en la respuesta hacia el estrés abiótico, contra patógenos y en la formación de frutos (Sauer et al., 2013). Dentro de este grupo de hormonas vegetales, el compuesto más abundante, conocido y estudiado es el ácido indol-3-acético (AIA); el AIA estimula el crecimiento de la raíz y aumenta la formación de pelos radiculares y raíces laterales, siendo el triptófano la principal molécula precursora en la biosíntesis de esta hormona (Spaepen et al., 2007).

Las plantas no son los únicos organismos capaces de sintetizar el AIA, también existen microorganismos, principalmente bacterias y hongos que lo producen. Se ha estimado que cerca del 80% de las bacterias rizosféricas tienen la facultad de producir AIA (Spaepen et al., 2007). La producción de AIA es una de las características más evaluadas en las PGPR, debido al efecto de esta fitohormona en el desarrollo del sistema radicular.

Existen dos vías principales para la biosíntesis del AIA en bacterias, la vía indol-3-piruvato (IPA) y la vía indol-3-acetamida (IAM) (figura 2), ambas dependientes de triptófano. La vía IAM ha sido descrita principalmente en bacterias fitopatógenas, mientras que la vía IPA se ha reportado principalmente en PGPB. Entre los principales géneros de bacterias productoras de AIA se encuentran: *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Pantoea* y *Pseudomonas* (Duca et al., 2014)



**Figura 2.** Vías de síntesis de ácido indolacético en bacterias. TRP: triptófano, lado derecho, vía indol-3-piruvato (IPA), IPA: ácido indol-3-pirúvico, AIAld: ácido indol-3-acetaldehído, lado izquierdo, vía indol-3-acetamida (IAM), IAM: indol-3-acetamida.

### 1.1.3 Tolerancia al estrés abiótico

Existen diferentes retos a los cuales se enfrenta la agricultura actualmente, uno de ellos es el estrés abiótico. Dentro de los principales escenarios que afectan los cultivos se encuentran, el aumento de la salinidad del suelo, el incremento de temperatura y la disminución de nutrientes en el suelo y del agua disponible para el riego. Esto ha orillado a los productores a aumentar el manejo con agroquímicos. La microbiota asociada a los cultivos está en gran manera relacionada a la capacidad que tienen las plantas para soportar el estrés, y existe una gran variedad de microorganismos, tanto hongos como bacterias, que ayudan a aumentar la tolerancia de las plantas a condiciones abióticas como la sequía (Ease, 2013).

Existen distintos estudios donde se evalúa la promoción de crecimiento vegetal por bacterias, bajo condiciones de sequía, un ejemplo de estos trabajos fue el realizado por Marasco et al. (2012), en el cual evaluaron la estructura del microbioma asociado a la planta de pimiento (*Capsicum annuum* L.) sensible a la sequía. Ellos encontraron que cuando las plantas tienen escasez de agua, desarrollan una población enriquecida de bacterias promotoras del crecimiento de vegetal, las cuales tienen la capacidad de mejorar la actividad fotosintética de las plantas y la síntesis de biomasa.

### 1.1.4 Uso de PGPB nativas

La adaptación de los microorganismos a las condiciones climáticas y edáficas es un proceso regulatorio complejo en el que se involucran diferentes mecanismos. No todas las bacterias tienen las mismas adaptaciones o características para combatir el estrés (Grover et al., 2011). Existe una gran diversidad de bacterias endófitas y rizosféricas que están asociadas a las plantas y adaptadas a las condiciones climáticas de la región donde se encuentran, las cuales son conocidas como bacterias nativas. Estas usualmente toman nutrientes de su hospedera y pueden desempeñar un papel mutualista, ya que pueden beneficiarla al inducir su crecimiento, aumentar su tolerancia a estrés, además de producir metabolitos secundarios que le brindan protección y resistencia contra patógenos (Bojórquez et al., 2010). La colonización bacteriana es un proceso activo entre la planta y las bacterias, el cual involucra la reproducción de las bacterias dentro de la planta o alrededor de la raíz. Una parte clave de esta, es que las bacterias que logran colonizar la endosfera o rizosfera, deben hacerlo en presencia de la microflora nativa de la planta (Kloepper y Beachamp, 1992)

Los efectos que tienen las PGPB sobre las plantas no siempre son los mismos, sus mecanismos de acción responden a señales externas como pueden ser moléculas producidas por el hospedero, la presencia de patógenos, otras bacterias, o condiciones climáticas. La aplicación de PGPB en cultivos no asegura los efectos deseados en la promoción del crecimiento y la disminución de la incidencia de enfermedades en plantas, ya que deben competir con la microbiota nativa asociada a la planta. Así mismo, en ocasiones estas bacterias no logran adaptarse a las condiciones climáticas, físicas, químicas y biológicas del suelo, las cuales suelen ser muy diferentes a las de su procedencia (Dutta and Podile, 2010).

Por esta razón, se ha planteado el uso de bacterias nativas, ya que estas presentan una mayor posibilidad de colonización, adaptación al clima y al tipo de suelo cuando son inoculadas en la rizosfera de las plantas (Pérez-Rodríguez et al., 2020), además de tener un mejor funcionamiento que bacterias exóticas, principalmente en zonas que se encuentran constantemente bajo estrés abiótico, como las regiones semiáridas (Chenniappan et al., 2019; Pérez-Rodríguez et al., 2020). Por ejemplo, en estudios donde se evaluaron cuatro cepas aisladas de jitomate pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulosimicrobium* y *Ochrobactrum*, encontraron que las cepas nativas de jitomate aumentaron los niveles de nitrógeno y clorofila de las hojas entre un 50-80% y 26-33% respectivamente, en comparación al control. Además de aumentar el peso seco de la raíz, los brotes, la altura de tallo y el área foliar y obtener resultados muy similares al tratamiento con fertilizantes (Pérez-Rodríguez et al., 2020).

Existen algunos estudios que indican que las PGPB no tienen el mismo efecto en otras plantas o incluso pueden afectar su crecimiento. En un estudio publicado por Long et al. (2008), evaluaron PGPB endófitas de *Solanum nigrum* en la planta hospedera y en otra solanácea no hospedera, *Nicotiana attenuata*. Ellos encontraron que las cepas endófitas promueven el crecimiento, tallo y raíz y fruto en *S. nigrum*, pero en la planta no hospedera (*N. attenuata*) el crecimiento fue menor incluso en comparación del control (agua destilada). A pesar de que algunas colonizaron ambas plantas, como *Pseudomonas thivervalensis* DR5 que tuvo una colonización de  $1.46 \times 10^9$  cfu/g FM en *N. attenuata* y de  $1.06 \times 10^8$  cfu/gFM en *S. nigrum*. Los autores comentan que esto podría deberse a que *N. attenuata* identifica a las cepas endófitas de *S. nigrum* como patógenas.

Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo, Carmen Delgado aisló y evaluó la capacidad de biocontrol y promoción de crecimiento vegetal de bacterias rizosféricas de *Solanum hindsianum* (Delgado-Ramírez et al., 2021). En total se aislaron 343 cepas bacterianas, de las cuales, varias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* exhibieron características de promoción vegetal, como producción de ácido indolacético y solubilización de potasio y fosfato. Dos aislados del género *Pseudomonas*, rbES087

y rbES061 promovieron el crecimiento de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), lo que se reflejó en aumentos significativos en el peso fresco y seco de raíz y tallo con respecto al control. En ensayos *in vitro* se observó que estas cepas pueden solubilizar fósforo, potasio, zinc, y producen ácido indol-acético en una concentración de 12.09 µg/ml y 32.57 µg/ml para las cepas rbES061 y rbES087, respectivamente

Por otra parte, Corral Federico aisló y caracterizó bacterias endófitas de *Solanum hindsianum* y evaluó su capacidad fijar nitrógeno, producir biofilm, antagonismo contra hongos fitopatógenos y para promover el crecimiento vegetal, en plantas de chile, jitomate y berenjena. Algunos de los aislados que mostraron un mayor efecto de promoción vegetal fueron las cepas EBCAb1 y EBCAe10, las cuales pertenecen al género *Pseudomonas* (Corral-Federico, 2021). Estas cepas tienen la capacidad de solubilizar fósforo, potasio, producir biofilm y una alta producción de ácido indol-acético (AIA), con niveles de 29.31 µg/ml para la cepa EBCAb1 y 34.82 µg/ml para la cepa EBCAe10 (Corral-Federico, 2021). Sin embargo, no se hizo una caracterización de la colonización endofítica o rizosférica de la planta. Tampoco se evaluó si las cepas rbES087, rbES061, EBCAb1 y EBCAe10 al ser nativas de una zona árida, pueden promover el crecimiento vegetal bajo estrés abiótico, como lo es la sequía, una condición que se presenta comúnmente en el estado de Baja California. Por último, tampoco conocemos si dichas cepas pueden colonizar o tener efecto sobre la respuesta al estrés en otras plantas filogenéticamente cercanas a *Solanum hindsianum*, la planta hospedera.

### 1.1.5 El género *Pseudomonas* como PGPB

El género *Pseudomonas* está conformado por bacterias Gram negativas, no esporulantes, con forma de bacilo ligeramente curvado y que pueden tener uno o más flagelos. Este género bacteriano pertenece a la clase de las Gammaproteobacterias (Palleroni, 2015). Una de las principales características de *Pseudomonas* es la gran flexibilidad respecto a las fuentes de carbono que puede utilizar. Los miembros de este género se encuentran en grandes cantidades en todo tipo de ecosistemas terrestres, de agua dulce y marina, además de formar asociaciones íntimas con plantas y animales. Esta dispersión generalizada sugiere gran flexibilidad fisiológica y genética (Singh et al., 2016). Las bacterias de este género poseen distintas características que las hacen candidatas como biofertilizantes o biopesticidas. Presentan un crecimiento rápido, lo que facilita su producción en laboratorio, su amplia colonización y producción de metabolitos secundarios como antibióticos, sideróforos, compuestos volátiles y la competencia contra patógenos, la adaptación al estrés, además de ayudar a la planta a tolerar el estrés (Singh et al., 2016).

Existen distintos estudios que indican que especies de *Pseudomonas* promueven el crecimiento vegetal y ayudan a tolerar el estrés biótico y abiótico. Por ejemplo, Brill et al., en 2019, evaluaron la capacidad de una cepa de *P. chlororaphis* para mejorar la tolerancia al estrés hídrico en jitomate. Ellos encontraron que tras la exposición al estrés hídrico las plantas inoculadas con *P. chlororaphis* mejoraron su capacidad antioxidante y limitaron la acumulación de especies reactivas de oxígeno en las hojas.

Otra característica importante de las PGPB es la capacidad de solubilizar fosfatos mediante la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico (GA). El fósforo es un nutriente esencial para las plantas, pero se encuentra de manera insoluble en el suelo. Existen bacterias que son capaces de solubilizar el fosfato de manera que las plantas los pueden asimilar. Uno de los principales mecanismos para la solubilización es la disminución del pH en el suelo, lo que se lleva a cabo mediante la liberación de ácidos orgánicos por parte de la bacteria (Beltrán Pineda, 2015; Oteino et al., 2015).

En un estudio realizado en 2015, se inocularon cepas de *Pseudomonas* endófitas aisladas de *Miscanthus giganteus*, una especie de pasto de la familia de las Poáceas, en plantas de chícharo cultivadas en suelo bajo condiciones limitantes de fosfato soluble. Encontraron que los endófitos que produjeron niveles medios-altos de ácido giberélico (GA) mostraron efectos de promoción del crecimiento de las plantas (Oteino et al., 2015).

En otro estudio realizado en 2017, evaluaron 356 cepas de *Pseudomonas* fluorescentes aislados de distintos nichos ecológicos: rizosfera de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), rizosfera de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) y micosfera de *Claviceps gigantea* y evaluaron su antagonismo contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas vesicatoria*. Encontraron que 20 cepas tuvieron antagonismo contra una o ambas bacterias (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y/o *Xanthomonas vesicatoria*), posteriormente realizaron pruebas metabólicas para determinar si dichas cepas producían ácido indolacético (AIA) y sideróforos, sus resultados indicaron que 65% producía IAA y el 100% producía sideróforos (Rivera-Conde et al., 2018). El AIA es una fitohormona pertenece a la familia de las auxinas, estas desempeñan un papel importante en el desarrollo de las plantas, como en la formación de hojas, desarrollo embrionario, caída de las hojas, desarrollo de las frutas entre otros. El principal efecto del AIA en las raíces, es un aumento en longitud y de pelos radicales, lo que incrementa la absorción de nutrientes de las plantas (Chandra et al., 2018).

### 1.1.6 Solanáceas de interés agrícola

La familia Solanaceae consta de aproximadamente 100 géneros y 2500 especies, las cuales se encuentran en todo el mundo, principalmente en climas templados y tropicales (Olmstead et al., 2008). Dentro de las solanáceas se encuentra el género *Solanum*, este es el género más grande dentro de esta familia y es considerado uno de los más ricos en especies (Olmstead et al., 2008). *Solanum* alberga especies de gran importancia agrícola como el jitomate (*S. lycopersicum*), la patata (*S. tuberosum* L.) y la berenjena (*S. melongena*) (Weese and Bohs, 2007). Otro género con importancia comercial dentro de las solanáceas es *Capsicum*. Las distintas especies de chiles pertenecen a este género, siendo *Capsicum annuum* una de las especies más importantes para México, debido a que variedades como el chile morrón, de árbol, serrano entre otros se encuentran dentro de esta especie.

El jitomate o tomate (*S. lycopersicum*) es una hortaliza de gran importancia comercial, según reportes del servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP), fue el cuarto producto agroalimentario más exportado en 2019 con un valor de 1,980 millones de dólares. El tomate es la hortaliza de mayor producción, equivale aproximadamente al 22% de la producción nacional de hortalizas. México se encuentra en el puesto 9° a nivel mundial en producción de tomate, exportando principalmente a Estados Unidos. En 2019 se cosecharon 3 millones 442 mil toneladas, siendo los principales estados productores Sinaloa, 764,435 toneladas; San Luis Potosí, 391,719 toneladas; Michoacán 280,478 toneladas; Zacatecas, 180,319 toneladas; Jalisco, 175,999 toneladas; Baja California Sur, 159,423 toneladas y Baja California, 137,632 (SIAP, 2020).

A pesar de no ser uno de los principales cultivos en México, la producción de berenjena (*Solanum melongena*) ha crecido de manera considerable en los últimos años. Según el SIAP en 2010 la producción nacional de berenjena fue de 62,000 toneladas, y para 2019 la producción aumentó a 185,000 toneladas. México se encuentra en el puesto 12° en producción a nivel mundial. Los principales productores son Sinaloa 172,937 ton, Nayarit 5,221 ton, Michoacán 2,100 ton, San Luis Potosí 1,875 ton y Sonora 1,675 ton.

El chile verde (*Capsicum annuum*), es una de las hortalizas más utilizadas en la dieta mexicana y es uno de los cultivos más importantes, ocupa el segundo lugar de producción a nivel nacional. México es el segundo productor a nivel mundial, aportando 9.2% del volumen mundial, en el país se produce en promedio alrededor de 2,785 mil toneladas. Siendo los principales estados Sinaloa, Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí y Sonora con 757,769 ton; 682,085 ton; 450,099 ton; 323,142 ton y 192,365 ton, respectivamente.

El tomate verde (*Physalis ixocarpa*), también conocido como tomatillo, representa el 4.8% de la producción nacional de hortalizas. En promedio se producen 689 mil toneladas al año, siendo los principales productores los estados de Sinaloa con 160 771 ton, Zacatecas con 147 023 ton, Jalisco con 88 637 ton, Puebla con 53 632 ton y Michoacán con 46 154 ton (SIAP, 2018)

### 1.1.7 La solanácea nativa del noroeste de México *Solanum hindsianum*

*Solanum hindsianum* es un arbusto de aproximadamente 0.5 m de alto, color verde pálido, flores lila y pistilo amarillo. Es una planta nativa del desierto de Sonora pertenece a la familia de las solanáceas y está ampliamente distribuida a lo largo de la península de Baja California donde es conocida comúnmente como “Mariola”. *Solanum hindsianum* crece en ambientes con bajas precipitaciones, suelos salinos y altas temperaturas, en zonas de matorrales costeros con suelos rocosos o (Delgado-Ramírez et al., 2021; Knapp et al., 2017).

### 1.1.8 Transposones

Los elementos transponibles o TEs son regiones de ADN que son capaces de moverse dentro del genoma del hospedero, estos fueron descubiertos por la investigadora Barbara McClintock (McClintock, 1950). Estos “genes saltarines” se dividen en dos clases: los TEs clase I que corresponden a los retro-transposones y los TEs clase II que son los transposones, estos a su vez son clasificados dependiendo de la maquinaria enzimática codificada por el elemento (Augé-Gouillou, 2013). Los transposones codifican una transposasa que es la enzima encargada de la motilidad de la fracción de ADN. Adicionalmente, se encuentran flanqueados por repeticiones terminales invertidas, las cuales son reconocidas por la transposasa que las corta por ambos extremos para integrarlo, posteriormente, en otro *locus* del genoma.

Algunos transposones son muy impredecibles y no se sabe en qué lugar del genoma se pueden insertar, lo que suele derivar en mutaciones como en el caso del transposón Tn5. Sin embargo, también existen transposones como el Tn7, que a pesar de que puede transponerse a diferentes sitios a baja frecuencia, tienen una marcada preferencia por la inserción en una región específica. Esta se denomina attTn7, se localiza río abajo del gen *glmS* que codifica para la glucosamina-6 fosfato sintetasa (Choi and Schweizer, 2006), y se encuentra altamente conservada en el phylum *Proteobacteria* (Peters y Craig, 2001). Es por

esta razón que se han desarrollado una gran cantidad de herramientas genéticas basadas en el transposón Tn7 para generar marcajes estables en bacterias.

## 1.2 Justificación

Las PGPB son utilizadas con la finalidad de disminuir el uso de agroquímicos, mejorar la disponibilidad de nutrientes del cultivo y disminuir la susceptibilidad a patógenos. Sin embargo, para ser efectivos, estos microorganismos deben tener la capacidad de establecerse en la rizósfera o colonizar el interior de la planta e integrarse con la microbiota nativa. La respuesta y adaptación de las PGPB inoculadas varía considerablemente dependiendo del microorganismo, las condiciones ambientales y el tipo de suelo. Además, es importante considerar el genotipo de la planta y de donde fueron aisladas las cepas, ya que las bacterias inoculadas deben ser capaces de establecer una interacción con esta.

Aunque se espera que PGPB aisladas de plantas silvestres serán capaces de colonizar cultivos que estén relacionados filogenéticamente, de manera que expresen sus propiedades con la intensidad, en el lugar y el momento correcto, existe poca evidencia experimental al respecto. Por lo anterior se debe estudiar la persistencia y el efecto que tienen las cepas en distintos cultivos y bajo diferentes condiciones, por ejemplo, disponibilidad de riego. Adicionalmente, es de interés científico determinar si la promoción de crecimiento está condicionada únicamente a la colonización, lo que puede determinarse estudiando la promoción de crecimiento y el establecimiento bacteriano en plantas filogenéticamente cercanas

## 1.3 Hipótesis

Las PGPB aisladas de *Solanum hindsianum* colonizan la rizosfera y/o endosfera de distintos cultivos pertenecientes a la familia de las solanáceas y promueven su crecimiento bajo distintas condiciones de riego.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar la colonización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de *Solanum hindsianum* en distintas plantas solanáceas de interés agrícola, bajo distintas condiciones de riego y determinar si hay una relación entre ambas.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- 1.- Establecer un protocolo para marcar PGPB rizosféricas aisladas de *Solanum hindsianum* mediante la inserción de un transposón Tn7.
- 2.- Determinar cuantitativa y cualitativamente el establecimiento de las bacterias marcadas en la rizósfera y endósfera de diferentes solanáceas de interés agrícola bajo distintas condiciones de riego.
- 3.- Determinar si hay una relación entre la colonización por PGPBs y la promoción de crecimiento en plantas filogenéticamente relacionadas.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Evaluación de resistencia a antibióticos y crecimiento a 37 °C

Para determinar qué resistencias a antibióticos poseía cada cepa, las cepas rbES061, rbES087, EBCAb1 y EBCAe10 fueron sembradas en cajas con medio LB adicionado con un antibiótico. Se utilizaron los antibióticos kanamicina, tetraciclina, gentamicina y cloranfenicol con una concentración de 25µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, y 15 µg/ml respectivamente. También se realizó un ensayo para evaluar si las bacterias podían desarrollarse a temperaturas altas. Esto debido a que, para curar el plásmido, una vez que las bacterias fueran marcadas, estas deberían ser incubadas a 37 °C, por lo que las cepas sembradas en cajas con antibióticos fueron incubadas a 30 °C y 37 °C.

### 2.2 Marcaje de bacterias

Para analizar la colonización cualitativa y cuantitativa de las bacterias aisladas de *Solanum hindsianum*, las cepas fueron etiquetadas con un gen que codifica a una proteína fluorescente y una resistencia a antibiótico. Para ello, se utilizó un transposón Tn7 que se encuentra integrado en la familia de plásmidos pMRE-Tn7 diseñados por Schlechter et al. (2018). Para la incorporación del plásmido a la bacteria se utilizó el método de electroporación y conjugación. A continuación, se describen estos pasos.

#### 2.2.1 Plásmidos pMRE-Tn7

Los plásmidos pMRE-Tn7 poseen un transposón Tn7 que permite que una parte de la secuencia del plásmido se pueda insertar en el cromosoma de la bacteria. A su vez, el transposón contiene un gen de resistencia a un antibiótico como kanamicina, gentamicina, cloranfenicol y tetraciclina, además de un gen que codifica a una proteína fluorescente como mOrange2, sGFP2, mCardinal y mTagBFP2. En la figura 3 se observa un ejemplo de cómo está constituido el plásmido y en la tabla 1 se describen las características de cada plásmido.

### pMRE-Tn7-144 (15458 bp)

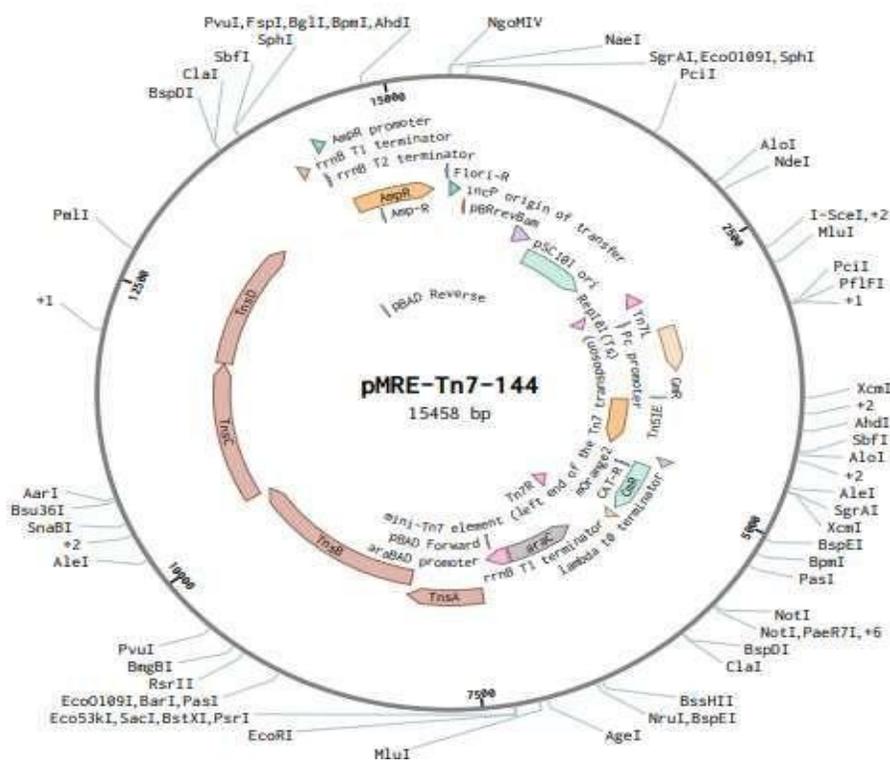


Figura 3. Mapa de plásmido pMRE-Tn7

Tabla 1. Características de los transposones Tn7

Plásmido	Fluoróforo	Pico de excitación	Pico de emisión	Color de emisión	Resistencia a antibiótico
pMRE-Tn7-144	mOrange2	604nm	659nm	Naranja	Cloranfenicol y gentamicina
pMRE-Tn7-152	sGFP2	495nm	512nm	Verde	Cloranfenicol y kanamicina
pMRE-Tn7-156	mCardinal	604nm	659nm	Infrarrojo cercano	Cloranfenicol y kanamicina
pMRE-Tn7-160	mTagBFP2	402nm	457nm	Azul	Cloranfenicol y tetraciclina

Los plásmidos que se utilizaron cuentan con un promotor inducible por arabinosa controlando los genes que codifican la transposasa. Estos promotores se localizan fuera del sitio attTn7, por lo cual no se transferirán al cromosoma bacteriano. Dichas características aseguran la estabilidad de la inserción. Los plásmidos pMRE-Tn7 tienen un origen de replicación pSC101, el cual no se replica a temperaturas superiores a 32°C; por lo que una vez que se ha inducido la transposición las bacterias marcadas deberán ser inoculadas a 37°C para eliminar el plásmido con los genes de la transposa (Schlechter y Remus-Emsermann, 2019).

### 2.2.2 Electroporación

La electroporación es un proceso donde se utilizan descargas eléctricas de un condensador, el cual forma un campo eléctrico que genera poros en la membrana celular, lo que permite que moléculas exógenas, como los plásmidos, puedan entrar a la célula. El voltaje de las descargas varía dependiendo de la especie bacteriana, si el voltaje es muy elevado puede matar a la bacteria.

Para obtener células competentes de las cepas EBCAb1, EEBCAe0, rbES061 y rbES087, se centrifugaron 50 ml de cultivo a 2500 RPM a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado resuspendiendo el pellet en agua destilada estéril, el lavado se repitió dos veces. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10%.

Para realizar la electroporación, se tomaron 40 µl de células competentes y se le agregaron 2 µl del plásmido, el cual fue purificado utilizando el kit de BIO BASIC, y se agregaron a una celdilla de electroformación de 2 mm fría. Los ajustes eléctricos fueron 2500 V, 25 µF y 400Ω.

Después de dar la descarga a las células, se agregaron 460 µl de SOC adicionado con 0.2% de arabinosa y se incubó durante 4 horas a 30 °C en agitación (Artiguenave et al., 1997). Posteriormente, las cepas fueron plaqueadas en medio LB con antibiótico, según la resistencia que otorga el transposón, y fueron incubadas a 37 °C por 1 día. Después de las 24 h de incubación las placas se observaron en un transiluminador de luz azul, para observar y seleccionar las colonias que presentaron fluorescencia.

### 2.2.1 Conjugaciones

La conjugación es un mecanismo promiscuo, dependiente de contacto celular, por el cual se da la transferencia de ADN principalmente entre bacterias. Este mecanismo es uno de los principales procesos por el cual se da la transferencia horizontal de genes, como la resistencia a antibióticos entre bacterias patógenas. Para este proceso se requiere de una cepa donadora y otra receptora. En el caso de las bacterias Gram-negativas la transferencia material genético está mediada a través de los sistemas de secreción tipo IV (Llosa et al., 2002; Sepúlveda, 2008).

Para la transferencia del plásmido a las cepas de interés, también se aplicó el método de conjugación. Para este procedimiento se utilizaron las cepas receptoras EBCAb1, rbES061, rbES087 y la cepa donadora *Escherichia coli* S17, la cual contenía el plásmido pMRE-Tn7-1xx (144,152, 156 o 160). Las cepas receptoras fueron sembradas en medio LB, e incubadas a 30 °C por 24 h. Posteriormente se realizaron inóculos de 5 ml con cada cepa y se incubaron a 30°C por 4 h en agitación. Pasado el tiempo indicado, las cepas fueron centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 ml de medio LB para su posterior centrifugación por 10 minutos a 5000 RPM, este paso se repitió una vez más. El pellet fue resuspendido en 500 µl de LB, seguidamente, se realizó una mezcla 1:1 de la cepa donadora más la cepa receptora (100 µl), esta mezcla se centrifugó y resuspendió en 100 µl de medio LB y finalmente se colocó una gota del cultivo en una caja con agar LB adicionado con arabinosa al 0.1% para inducir la transposición (Schlechter y Remus-Emsermann, 2019). Las cajas fueron incubadas a 30°C por 24 horas y posteriormente plaqueadas en medio mínimo (M9), e incubadas a 37°C.

### 2.3 Confirmación de la inserción del transposón Tn7

Para confirmar la inserción del transposón Tn7 en la bacteria, se realizó un PCR utilizando los primers FWD\_Tn5/7\_gt (ATGGTGAGCAAGGGCGAG) y REV\_Tn5/7\_gt (CAACAGGAGATCCAAGCTAG) (Schlechter et al., 2018). Se extrajo ADN genómico utilizando el kit One-Tube Bacterial Genomic DNA Extraction de BIO BASIC, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción se llevó a cabo con un volumen de 25µl, el cual constaba de 1 µL de ADN genómico, 2.5 µl de Buffer 10X DreamTaq Green, 0.5 µl de dNTP mix 10mM, 0.5 µl del primer FWD\_Tn5/7\_gt 10mM, 0.5 µl del primer REV\_Tn5/7\_gt 10mM, 0.125 µl de Dream Taq DNA polimerasa 1.25 U/µL y 20 µl de agua destilada estéril. La amplificación se realizó en un termociclador Bio-Rad T-100, las condiciones del termociclador fueron 95°C por 2 minutos, seguidos por

35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto y finalmente un ciclo de 72°C por 5 minutos. El resultado del PCR fue observado en un gel de agarosa al 1%.

## 2.4 Identificación molecular de aislados bacterianos

La identificación de las cepas se realizó a través de la secuenciación de los genes del 16S rRNA. Se purificó el ADN genómico de las cepas usando el kit One-Tube Bacterial Genomic DNA Extraction de BIO BASIC, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se amplificó el gen 16s mediante PCR, se utilizaron los primers 27F (5'- AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3') (Weisburg et al., 1991) y 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al., 1999). Cada reacción se llevó a cabo con un volumen total de 25 µl, conteniendo 1 µL de DNA genómico, 2.5 µl de Buffer 10X dream Taq Green, 0.5 µl de dNTP mix 10mM, 0.5 µl del primer 27F 10mM, 0.5 µl del primer 1492R 10mM, 0.125 µl de Dream Taq DNA polimerasa 1.25 U/µl y 20 µl agua destilada estéril. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad T-100, las condiciones del termociclador fueron: 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y un ciclo final 72°C por 10 minutos. El producto del PCR fue observado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Por último, se realizó la purificación del PCR con columnas de sílice y el producto se mandó a secuenciar a Etonbio Inc. (San Diego, USA) mediante el método de secuenciación Sanger.

## 2.5 Germinación de Semillas

Se utilizaron semillas comerciales de chile, tomate verde, jitomate y berenjena, las cuales fueron desinfectadas superficialmente dándoles un lavado con etanol al 70% por un minuto, se retiró y se les agregó hipoclorito de sodio por 5 minutos, se enjuago y se les dio un segundo lavado en etanol al 70% por 30 segundos. Para retirar el etanol, se realizaron 3 enjuagues seguidos con agua destilada estéril.

Para la germinación se colocaron 3 semillas del cultivo en macetas con peat moss Cosmopeat (Cosmocel, Nuevo Leon, México) y para darle las condiciones óptimas de crecimiento se utilizó una cámara de crecimiento, los ajustes fueron 30°C, 16 horas luz seguidas de 8 horas oscuridad y una humedad relativa de 70%.

## 2.6 Ensayos *in vivo*

### 2.6.1 Ensayos en cámara de crecimiento

Para realizar los ensayos en cámaras de crecimiento se procedió a desinfectar semillas de tomate, chile y tomatillo. Las semillas fueron sumergidas en etanol al 70% por un minuto, seguidamente se retiró y se le agregó hipoclorito de sodio (NaClO) al 10 % por 5 minutos, se enjuago con agua destilada estéril y se sumergieron nuevamente en etanol al 70% por 30 segundos. Para retirar el etanol, se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron colocadas en cajas Petri con agar agua, e incubadas a 25 °C por tres días, en el caso de las semillas de tomatillo, estas fueron incubadas a 30 °C. Una vez que las semillas germinaron fueron sembradas en charolas de germinación con sustrato estéril, el cual estaba conformado por una proporción 4:1 (Vol/Vol) de arena con peat moss Cosmopeat.

Las charolas de germinación se colocaron en una cámara de crecimiento, con periodos de luz/oscuridad de 16 h y 8 h respectivamente, a una temperatura de 26 °C. Las plántulas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril durante 21 días, hasta que surgieron las hojas verdaderas. Posteriormente fueron trasplantadas a macetas con sustrato estéril (4:1) e inoculadas con un mililitro de una suspensión de las cepas EBCAe10 o rbES061 a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Dos semanas después de la primera inoculación, las plantas se reinocularon.

Para este ensayo, se aplicaron tres tratamientos de inoculación: rbES061, EBCAe10 y tratamiento control sin inóculo, bajo dos condiciones de riego: bajo y alto (25 ml y 50 ml dos veces por semana, respectivamente). Los tratamientos se aplicaron durante 30 días después de la segunda inoculación y se evaluaron.

### 2.6.2 Ensayos en invernadero

Para el ensayo en invernadero, la germinación de las semillas se realizó de la misma forma que en el ensayo en cámaras de crecimiento. Tras la desinfección de las semillas de tomate y chile, estas fueron colocadas en cajas Petri con agar agua y se incubaron por tres días a 25 °C. las semillas germinadas fueron colocadas charolas de germinación con sustrato no estéril, el cual consistió en una mezcla de arena con peat moss

Cosmopeat a una proporción 3:1 (vol/vol) y se mantuvieron en cámara de crecimiento hasta que surgieron sus hojas verdaderas.

A continuación, fueron trasplantadas a macetas de 8 pulgadas con sustrato no estéril de arena con peat moss Cosmopeat (3:1) e inoculadas con 1 ml de una suspensión de las cepas EBCAe10 o rbES061 a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Las plantas control fueron inoculadas con agua estéril. Una segunda inoculación fue realizada dos semanas después de la primera, utilizando la misma concentración y volumen que en la primera inoculación.

En este ensayo se utilizaron los mismos tratamientos que en el ensayo en cámaras de crecimiento, con variación en los volúmenes de riego: para riego bajo se usaron 50 ml dos veces por semana y para riego alto 250 ml dos veces por semana. Se utilizaron once repeticiones para los tratamientos inoculados y nueve para los controles. Finalmente se realizó la aleatorización de las macetas utilizando la plataforma Excel.

### 2.6.3 Evaluación de la colonización de los ensayos en cámara de crecimiento

Para la evaluación cuantitativa de la colonización rizosférica y endófito por las cepas EBCAe10 y rbS061, se realizaron diluciones seriadas y el posterior conteo de UFC. Para la toma de muestra del suelo rizosférico, primero se descartó el suelo que no estaba adherido a las raíces sacudiendo la planta, posteriormente se sacudieron las raíces dentro de tubos de 50 ml estériles, para coleccionar el suelo que estuviera en contacto directo con la raíz. Finalmente, se tomó un gramo de suelo rizosférico obtenido, el cual se colocó en tubo de 50 ml con 10 ml de agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas, Finalmente, se plaquearon 100  $\mu$ l (para chile y tomate) y 50  $\mu$ l (para tomatillo) de las diluciones  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  y  $1 \times 10^{-4}$ .

Una vez que se retiró el suelo de las raíces, se procedió a lavar las plantas completas con abundante agua. Posteriormente se cortó 1 cm de la corona de la planta, la cual es la parte del tallo continua a la raíz. Estas muestras fueron utilizadas para evaluar la colonización endófito y epífita.

Para la evaluación del establecimiento epífita de las bacterias inoculadas, se tomó el centímetro de muestra de tejido vegetal y se colocó en un microtubo con 1 ml de agua destilada estéril, se agitó por 30 segundos a máxima velocidad en un vortex. A continuación, se retiró la muestra de tejido del tubo y realizaron diluciones seriadas, tomando 100  $\mu$ l del agua donde se agitó la muestra y transfiriendo en otro tubo con 900  $\mu$ l de agua estéril, así sucesivamente hasta obtener las diluciones  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^{-1}$  y  $1 \times 10^{-2}$ , de

las cuales se plaquearon 100  $\mu$ l para el ensayo con chile y tomate, y 50  $\mu$ l para el caso del ensayo con tomatillo.

La evaluación de la colonización endófito por las bacterias, se realizó tomando el mismo centímetro de tejido vegetal utilizado para la evaluación epífita. Para esterilizar superficialmente la muestra, esta fue sumergida en etanol al 96 y flameada aproximadamente por 1 s, posteriormente, el tejido fue colocado en un microtubo estéril y fue macerado, seguidamente se agregó 1 ml de agua destilada estéril, se mezcló mediante vortex por 30 segundos para posteriormente realizar diluciones seriadas, plaqueando las diluciones  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^{-1}$  y  $1 \times 10^{-2}$ . De igual manera se plaquearon 100  $\mu$ l para las muestras tomadas de las plantas de chile y tomate y 50  $\mu$ L para las de tomatillo.

Para todas las tomas de muestra se tomaron cuatro réplicas de las plantas en cámaras de crecimiento de los tratamientos inoculados. Todas las diluciones fueron plaqueadas por duplicado, en medio LB adicionado con kanamicina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml.

#### 2.6.4 Evaluación de la colonización bacteriana bajo condiciones de invernadero

Para la evaluación cuantitativa de la colonización rizosférica y endófito por las cepas EBCAe10 y rbS061, en plantas de chile y tomate, se realizaron diluciones seriadas y el posterior conteo de UFC. La toma de muestras de suelo rizosférico y tejido vegetal se hizo dos meses después de la segunda inoculación bacteriana.

Para el muestreo de suelo rizosférico, se descartó el suelo que no se encontraba adherido a la raíz, posteriormente, las raíces fueron colocadas en bolsas tipo ziploc para recolectar el suelo rizosférico. Se tomó un gramo del suelo rizosférico, el cual se colocó en tubo de 15 ml con 9 ml de agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas. Finalmente, se plaquearon 50  $\mu$ l de las diluciones  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  y  $1 \times 10^{-4}$ .

Para el muestreo de tejido vegetal, las plantas se lavaron con abundante agua y se cortó 1 cm de la corona, la cual se utilizó para evaluar la colonización epífita y endófito.

Para la evaluación de la colonización epífita y endófito, se realizaron diluciones seriadas repitiendo el procedimiento descrito previamente para evaluar la colonización en cámara de crecimiento, la única

modificación fue el volumen del plaqueo, para este ensayo se usó un volumen de 50  $\mu\text{l}$ . Se plaquearon las diluciones  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^{-1}$  y  $1 \times 10^{-2}$ , en el caso de las muestras epífitas. Para las muestras endófitas se plaquearon las diluciones  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^{-1}$ .

Para todos los ensayos se tomaron 5 réplicas de las plantas en cámaras de crecimiento de los tratamientos inoculados. Todas las diluciones fueron plaqueadas por duplicado, en medio LB adicionado con kanamicina a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y cicloheximida a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$

### 2.6.5 Evaluación de parámetros de promoción de crecimiento

Las variables evaluadas para la determinación de los cambios morfométricos entre los tratamientos fueron las siguientes: largo de raíz (cm), largo de tallo (cm), número de hojas, peso seco de raíz (g) y peso seco del tallo (g).

Para el ensayo en invernadero además de los parámetros morfométricos vegetales mencionados anteriormente, también se midieron número de flores, número de frutos, peso de fruto y ancho del tallo.

## 2.7 Ensayos *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea DR5::*gus*

### 2.7.1 Germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* línea DR5::*gus*

En un tubo de 1.5 ml se colocaron las semillas, que llevan la construcción reportera de la acumulación de auxinas endógenas generada por Ulmasov et al., 1997 y se lavaron con 400  $\mu\text{l}$  de etanol al 96% por 5 minutos. A continuación, se retiró el etanol, se agregaron 400  $\mu\text{l}$  de NaClO comercial al 15% y se dejaron en remojo durante 5 minutos para después aplicar 4 lavados con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas se suspendieron en 400  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril y fueron vernalizadas a 4 °C por 48 h. Transcurrido ese tiempo se colocaron las semillas en cajas Petri con medio MS y se colocaron en una cámara de crecimiento a 24 °C.

### 2.7.2 Ensayo de promoción de crecimiento temprano en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *DR5::gus*, por compuestos difusibles

Para este ensayo se aplicaron cuatro tratamientos, uno con la cepa EBCAe10 marcada con el transposón Tn7-152, otro con la cepa rbES061 marcada con el mismo transposón, un tratamiento donde se utilizó una combinación de las dos cepas y el tratamiento control.

Se colocaron ocho plántulas de *Arabidopsis thaliana*, de manera alineada aproximadamente a 1 cm de la parte superior en cajas Petri con medio Murashige & Skoog (MS) (medio Murashigue & skoog Phytotechnology M519 0.9g/L, sacarosa 6 g/L, agar 10 g/L). Se realizaron tres estriados horizontales, con las cepas de manera individual, aproximadamente a 1 cm en la parte inferior de la caja Petri.

En el caso del tratamiento donde se utilizó la inoculación de las dos cepas, se inocularon 1 ml de medio LB con las cepas de manera individual, este cultivo se dejó en agitación a 30°C toda la noche. Al día siguiente se hizo una mezcla 1:1 de las dos cepas, se tomaron 100 µl de este cultivo y se realizó una gota estriada de manera horizontal en la parte inferior de la caja Petri.

Este ensayo se mantuvo por 7 días en una cámara de crecimiento a 24°C con fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad. El crecimiento de la raíz principal se midió diariamente

### 2.7.3 Ensayos histoquímicos del gen reportero *uid2 (gus)*

En una caja de microtítulo se colocaron 200 µl de la solución sustrato X-gluc (50 de solución buffer de fosfato 1M, 50 mg de X-gluc y 180 µl de Ferrocianuro de potasio 500 mM), una vez colocado el X-gluc se colocaron las plántulas en los pozos de la caja, y se incubaron a 37 °C por toda la noche. Pasado el tiempo se retiró la solución X-gluc y se procedió al clareo de las muestras.

En cada celda con las plántulas se adicionó 1 ml de la solución 1 (500 ml de H<sub>2</sub>O desionizada, 3.7224 g de E.D.T.A. sal disódica, 1 ml de Triton (X-100) posteriormente se llevó a la incubadora a 62 °C por 1 h. Después de este tiempo se retiró la solución 1 y se agregó 1 ml de la solución 2 (500 ml de H<sub>2</sub>O desionizada, 5.9999 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13.4035 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente y se retiró la solución 2. Posteriormente se agregó a cada celda con las plántulas 1 ml de etanol al 40% y se dejó en reposo durante 1 h, se retiró la solución, se adicionó 1 ml de etanol al 20% se dejó en reposo 25 minutos,

se retiró la solución de etanol y, se dejó en reposo durante 25 minutos en etanol al 10%. Finalmente, se retiró la solución de etanol y se agregó 1ml de glicerol al 50% para observar las plántulas en un microscopio Zeiss AXIOZoom V16.

#### 2.7.4 Evaluación de parámetros morfométricos

Las variables evaluadas para la determinación los cambios morfométricos entre los tratamientos fueron los siguientes: número y largo de pelos radiculares (este parámetro se midió con la ayuda del programa ImageJ), número de raíces laterales, crecimiento de la raíz (cm), peso fresco del área foliar y peso fresco de las raíces

### 2.8 Microscopía confocal de bacterias y raíces

Para observar la fluorescencia de las bacterias marcadas y detectar si las raíces de las plantas tenían auto fluorescencia, estas fueron observadas con microscopía confocal en un microscopio invertido Olympues FV-1000.

Las bacterias marcadas fueron incubadas a 37°C por 24 h, en medio LB con el antibiótico correspondiente, posteriormente se tomó un poco del cultivo bacteriano y se inoculó en un microtubo de 1.5 ml con agua destilada estéril. Seguido a este paso, se colocó una gota de 20 µl en un portaobjetos y se cubrió la gota con un cubreobjetos circular y finalmente se observaron por microscopía. Para excitar el fluoróforo de las bacterias se utilizaron las siguientes longitudes de onda: 543 nm para observar las cepas marcadas con el transposón Tn7-156 (mCardinal), 533 para el Tn7-144 (mOrange), 488 para el Tn7-152 (GFP) y 405 para el transposón Tn7-160 (BFP).

Para observar las plantas bajo el microscopio de fluorescencia, estas primero se lavaron con abundante agua, después se colocaron en un portaobjetos y se agregaron unas gotas de agua destilada de manera que toda la planta estuviera cubierta. Finalmente se utilizaron longitudes de onda de 488 nm, 405 nm, 533 nm, y 543 nm para excitar a las plantas y observar su auto fluorescencia bajo el microscopio

## 2.9 Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos de los ensayos realizados en este trabajo, se utilizó el software GraphPad prism. Para los análisis estadísticos de los ensayos de colonización en invernadero y en cámara de crecimiento, se utilizó un ANOVA de dos vías. Para los análisis de los parámetros morfométricos y los ensayos con *Arabidopsis thaliana* se utilizó un ANOVA de una vía.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Evaluación de resistencia a antibióticos y temperatura

Todas las cepas evaluadas crecieron a 30 y 37°C (Tabla 2). En cuanto al ensayo de resistencia a antibióticos, las 4 cepas tuvieron resistencia al cloranfenicol, pero no lograron crecer en kanamicina, tetraciclina ni gentamicina después de 24 h de incubación (Tabla 3), lo que significa que fueron candidatas para recibir los transposones.

**Tabla 2.** Evaluación de crecimiento de cepas de *Pseudomonas* inoculadas a 30 °C y 37°C. + indica las cepas que crecieron a las 24 h de incubación

Cepa	30°C	37°C
<b>EBCAb1</b>	+	+
<b>EBCAe10</b>	+	+
<b>RbES061</b>	+	+
<b>RbES087</b>	+	+

**Tabla 3.** Evaluación de resistencia a antibióticos de cepas de *Pseudomonas*. + indica las cepas que crecieron en el medio LB adicionado con antibiótico después de 24 h de incubación; - indica que no se observó crecimiento.

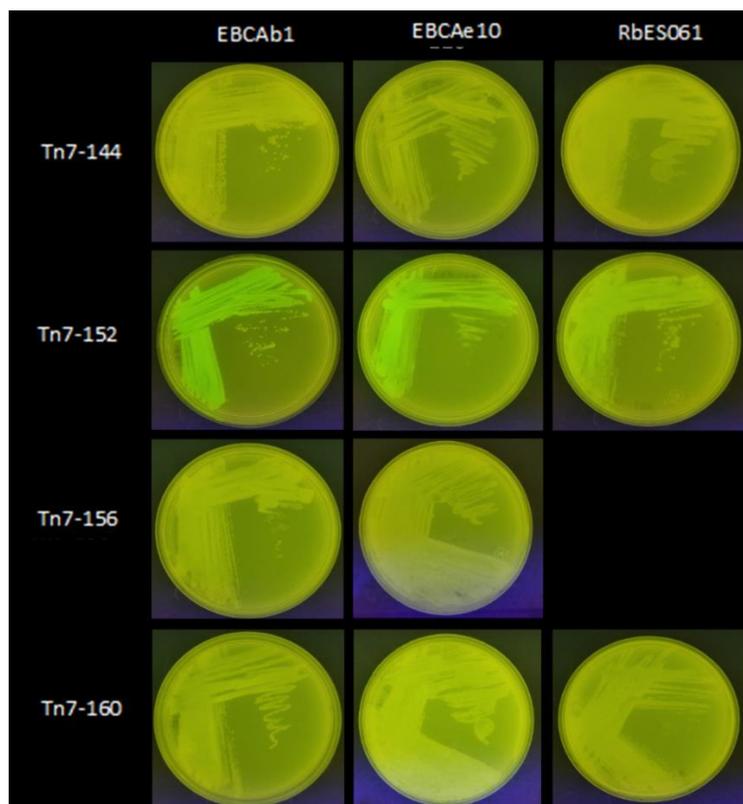
Cepa	Cloranfenicol	Tetraciclina	Kanamicina	Gentamicina
<b>EBCAb1</b>	+	-	-	-
<b>EBCAe10</b>	+	-	-	-
<b>RbES061</b>	+	-	-	-
<b>RbES087</b>	+	-	-	-

### 3.2 Marcaje de bacterias

En total se obtuvieron 11 cepas marcadas. La cepa B1 y E10, que corresponden a aislados endófitos, se marcaron con cuatro diferentes transposones: Tn7-144, Tn7-152, Tn7-156 y Tn7-160. La cepa rbES061 se marcó con tres transposones: Tn7-144, Tn7-152 y Tn7-160. En la tabla 4 se muestran con qué metodología se logró la transformación de cada cepa con su respectivo transposón Tn7.

**Tabla 4.** Transformación de bacterias usando transposones mediante conjugación o electroporación de plásmidos conteniendo el transposón Tn7. E: cepas transformadas mediante electroporación; C: cepas transformadas mediante conjugación; E-C: cepas transformadas mediante ambas metodologías; -: cepas que no lograron ser transformadas

Cepas	Plásmidos			
	Tn7-144	Tn7-152	Tn7-156	Tn7-160
EBCAb1	C	E-C	C	E-C
EBCAe10	E	E	E	E
rbE061	C	C	-	C

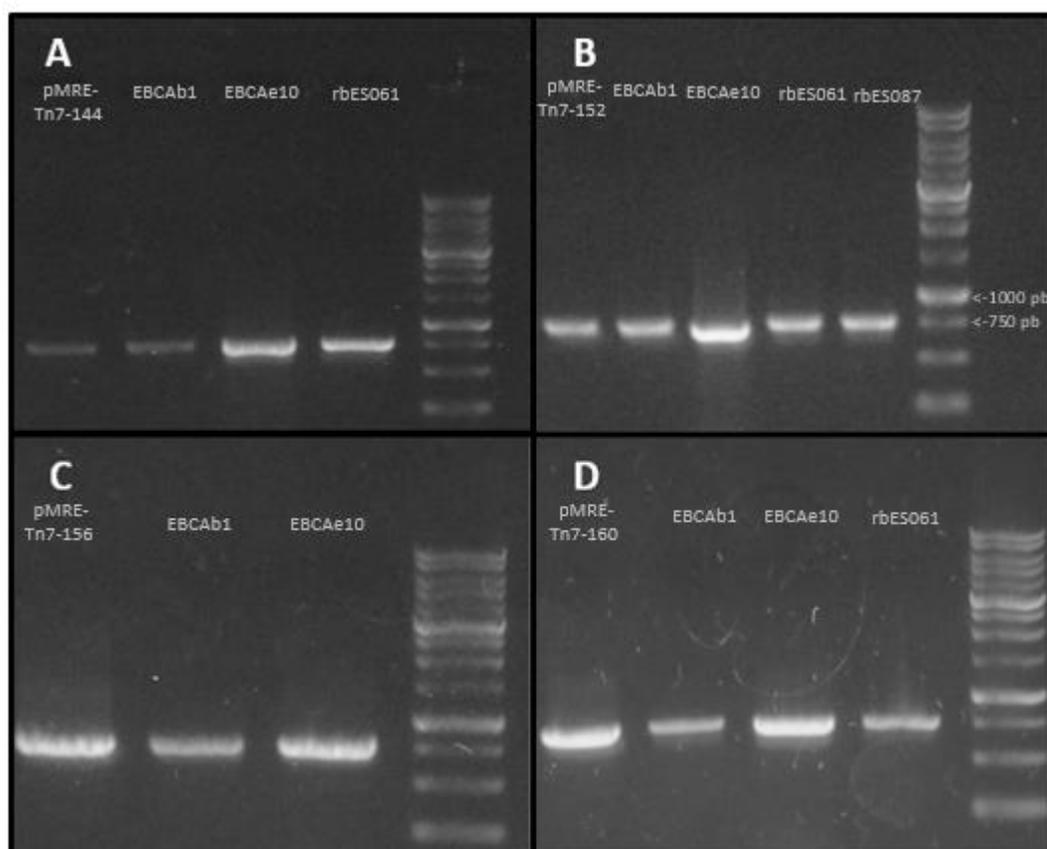


**Figura 4.** Cepas transformadas observadas mediante un transiluminador de luz azul, donde se muestra la fluorescencia de algunas de las bacterias. En el eje X superior de la imagen se muestra el nombre de la cepa mientras que en el eje de las Y se muestra el transposón utilizado para la transformación

En la figura 4 se muestran imágenes de las cepas transformadas en un transiluminador de luz azul, donde se muestra la fluorescencia de algunas de las bacterias.

### 3.3 Confirmación de la inserción del transposón Tn7

Para confirmar la inserción del transposón Tn7, además de sembrar las bacterias en cajas con antibiótico, según la resistencia que otorgara el transposón, y de observar la fluorescencia de las bacterias en el transiluminador de luz azul, se realizó un PCR utilizando los primers FWD\_Tn5/7\_gt, y REV\_Tn5/7\_gt, los cuales amplifican la región donde se encuentra el fluoróforo en el transposón, esta región consta aproximadamente de 770 pares de bases (767 pb, para el transposón Tn7-144; 789 pb, para el 152; 790 pb, para el 156 y 767 pb para el 160 ). En la figura 5 se muestra un gel de agarosa, donde se observa el resultado del PCR, el cual confirma la inserción del transposón Tn7 en las cepas EBCAb1, EBCAe10, rbES061.



**Figura 5.** Gel de electroforesis de la amplificación por PCR de la región del fluoróforo del transposón Tn7. A) Tn7-144; B) Tn7-152; C) Tn7-156; D) Tn7-160

### 3.4 Identificación molecular de las cepas marcadas

Se realizó la identificación molecular de las cepas marcadas y las no marcadas, con el fin de que la especie de las cepas marcadas coincidiera con las cepas originales aisladas por Carmen Delgado (Delgado-Ramírez et al., 2021)) y Ana Corral (Corral-Federico, 2021). Los resultados de la secuenciación fueron revisados en la base de datos de NCBI. En la tabla 5 se muestran los resultados arrojados por la base de datos. Con esta información se confirma que todas las cepas marcadas pertenecen al género *Pseudomonas*. El resultado de la identificación molecular para el caso de la cepa rbES087 marcada con el transposón Tn7-152, no coincidió con el reportado por Delgado-Ramírez en 2021, esto sugirió una contaminación, por lo que se descartó para el ensayo en cámara de crecimiento.

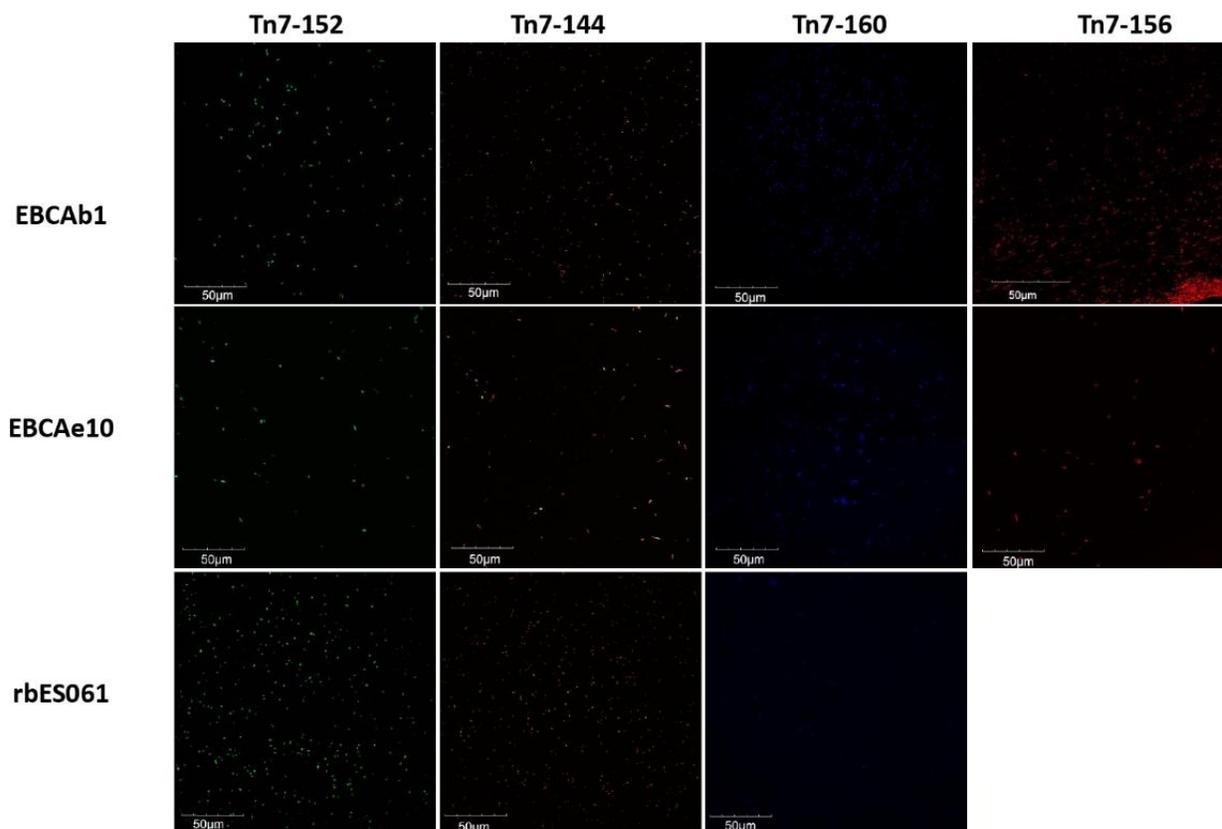
Se seleccionaron dos cepas de las 11 que se lograron marcar para el ensayo en cámara de crecimiento, Una rizosférica (rbSE061) y una endófito (EBCAe10), que estaban marcadas con el transposón Tn7-152, el cual otorga resistencia a kanamicina además de codificar para el fluoróforo sGFP2, la cual produce una fluorescencia fácilmente detectable bajo el transiluminador (Fig. 4).

**Tabla 5.** Identificación molecular de las cepas marcadas

<b>Cepa</b>	<b>Identificación en NCBI</b>
EBCAb1	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>
EBCAb1-Tn7-144	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>
EBCAb1-Tn7-152	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>
EBCAb1-Tn7-156	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>
EBCAb1-Tn7-160	<i>Pseudomonas ausensis</i>
EBCAb1e10	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
rbES061-Tn7-144	<i>Pseudomonas plecoglossida</i>
rbES061-Tn7-152	<i>Pseudomonas plecoglossida</i>
rbES061-Tn7-160	<i>Pseudomonas plecoglossida</i>
rbES087-Tn7-152	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>

### 3.5 Microscopía confocal de las cepas

Se realizó microscopía confocal para detectar la fluorescencia de las cepas marcadas, en la longitud de onda correspondiente según el transposón utilizado. En este ensayo se logró observar la fluorescencia esperada en todas las cepas marcadas (figura 6).

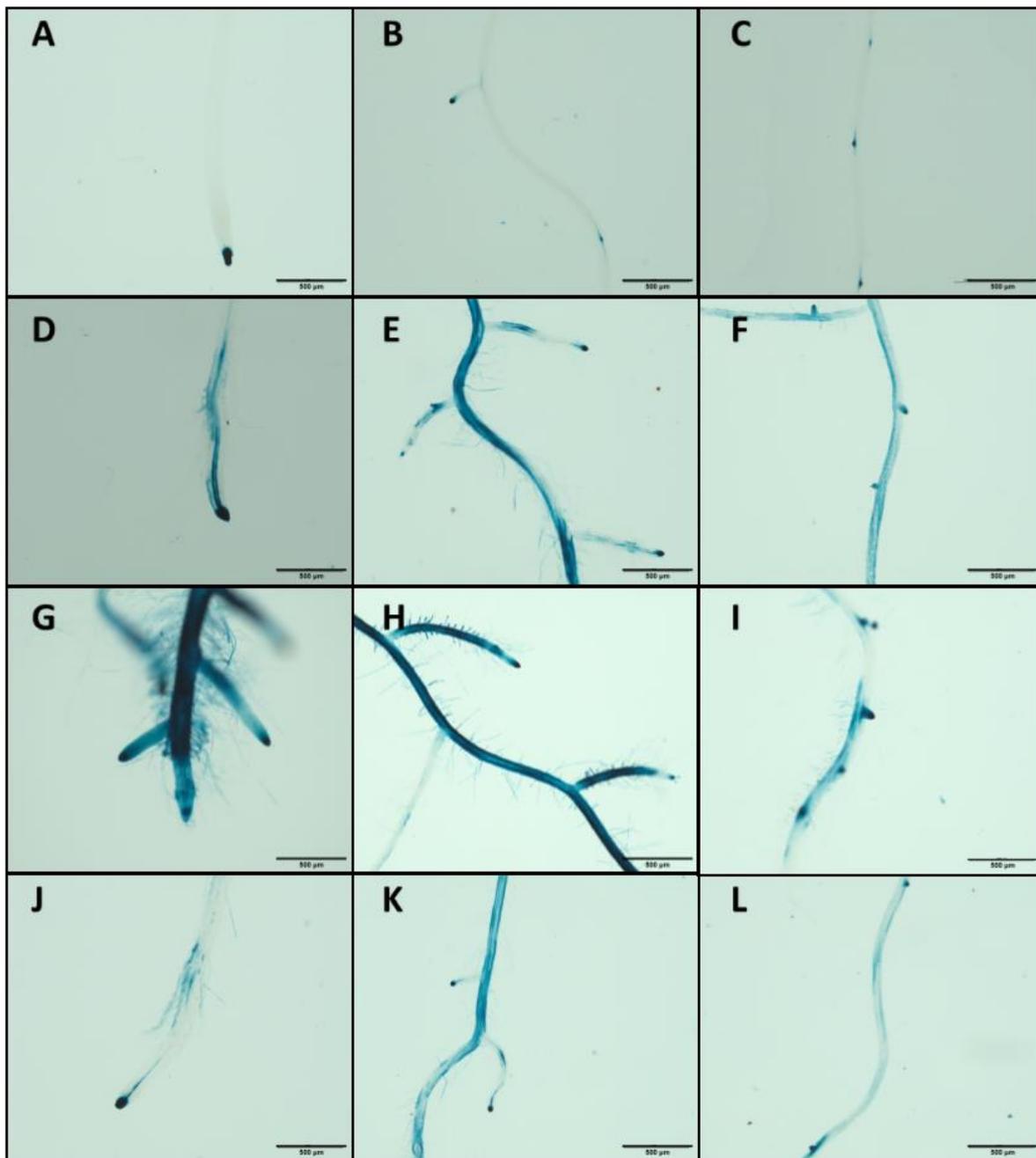


**Figura 6.** Microscopía confocal de las cepas de *Pseudomonas* spp. marcadas con Tn7-152 el cual codifica para el fluoróforo sGFP2, Tn7-144 marcada con mOrange2, Tn7-160 marcada con mTagBFP2 y Tn7-152 marcada con mCardinal. Microscopio: Olympus FV100; Objetivo 60X; Laser utilizados 488 nm, 543 nm, 405 nm y 488 (orden de izquierda a derecha). La barra de escala indica 50µm.

### 3.6 Respuesta a auxinas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea DR5::*gus*

Una de las principales características buscadas en PGPB es la producción de auxinas, ya que esta se relaciona con el crecimiento radicular de las plantas, sin embargo; el hecho que una bacteria produzca una alta cantidad de compuestos auxínicos no necesariamente se traduce en un mayor crecimiento de las

plantas. Debido a esto se realizó un ensayo de interacción planta-bacteria utilizando una línea transgénica de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, la cual es una reportera a la respuesta des auxinas endógenas.



**Figura 7.** Ensayos histoquímicos del gen reportero uid2 (*gus*) *Arabidopsis thaliana* línea DR5::*gus*, en respuesta a la interacción con la cepa rbES061, la cepa EBCAe10 y el consorcio de ambas cepas. Figura A-C, control (A: raíz principal de una raíz. figura B: raíces laterales. Figura C: primordios). Figuras D-F tratamiento con la cepa rbES061 (D: raíz principal de una raíz. E: raíces laterales. F: primordios). Figuras G-I consorcio usando las cepas EBCAe10 y rbES061 (G: raíz principal de una raíz. H: raíces laterales. I: primordios). Figuras J-L, tratamiento usando la cepa EBCAe10 (J: raíz principal de una raíz. K: raíces laterales. L: primordios). Barra de escala 500 µm.

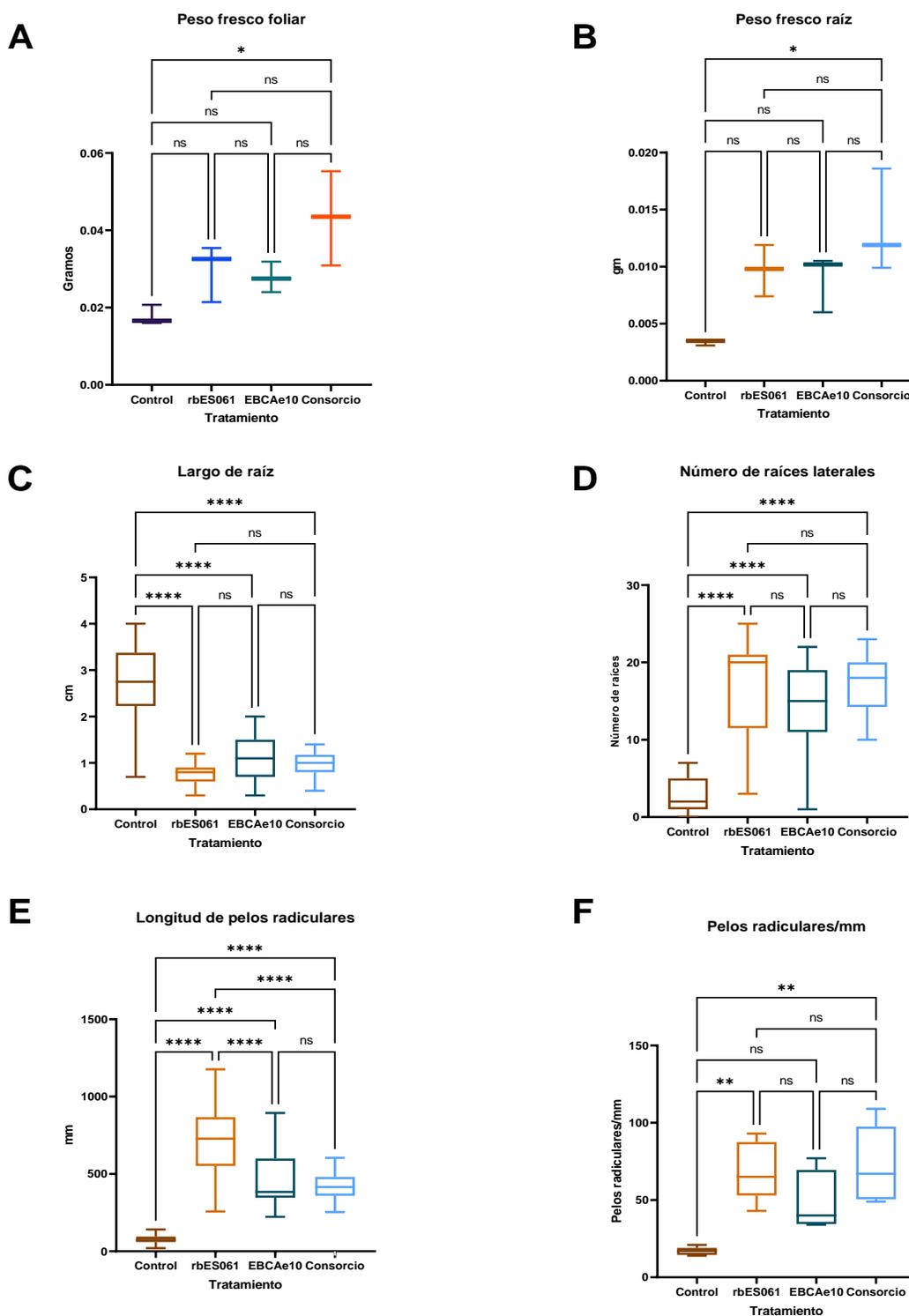
En la línea transgénica *DR5::gus* de la planta *Arabidopsis thaliana*, el color azul en la raíz indica la expresión de auxinas, entre más intenso sea el color azul en la raíz quiere decir que hay una mayor expresión de auxinas, las cuales están relacionadas con el crecimiento de pelos radiculares. Podemos observar que las plántulas que tuvieron una mayor expresión fueron las que tenían el tratamiento del consorcio donde se utilizó la cepa EBCAe10 y rbES061 (figura 7 G-F) en conjunto. Sin embargo, los tratamientos aplicados con las cepas individuales también tuvieron una expresión mucho mayor en comparación del control (figura 7 A-C).

### **3.7 Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en ensayos de interacción por compuestos difusibles**

Se evaluó la promoción de crecimiento en plántulas de *Arabidopsis* en respuesta a las cepas EBCAe10, rbES061 y un consorcio utilizando las dos cepas, para determinar qué efecto tendrían estas cepas (aisladas de una solanácea nativa del noroeste de México) en una planta que no hospedera y que no perteneciera a la familia solanácea. Estos parámetros se midieron después de 7 días de interacción plántula-bacteria. Dichos tratamientos indujeron el crecimiento vegetal en los distintos parámetros morfométricos. Los parámetros evaluados fueron: peso fresco foliar (figura 8-A), peso fresco radicular (figura 8-B), largo de raíz (figura 8-C), número de raíces laterales (figura 8-D), longitud de pelos radiculares (figura 8-E) y número de pelos radiculares por milímetro (figura 8-f)

En el caso del peso fresco foliar (figura 8-A) y el peso fresco de raíz (figura 8-B), los tratamientos con las cepas aplicadas de manera individual no presentaron diferencia significativa respecto al control. Solo el tratamiento con el consorcio presentó diferencias, siendo, en promedio, aproximadamente 2.5 veces mayor el peso fresco foliar y casi 4 veces mayor el peso fresco radicular en comparación al control. Al comparar el largo de la raíz y el número de raíces laterales todos los tratamientos con bacteria presentaron diferencias significativas respecto al control, pero no presentaron diferencia entre ellos. En el caso del largo de raíz, el control fue el que mostró una mayor longitud radicular respecto a los tratamientos donde se utilizaron las bacterias de manera individual y el consorcio. Caso contrario fue lo observado en el número de raíces laterales, en los cuales fueron los tratamientos inoculados los que presentaron un mayor orden de magnitud, de aproximadamente 14 veces más raíces laterales respecto al control. El tratamiento donde se observó una mayor elongación de los pelos radiculares fue utilizando la cepa rbES061, siendo ocho veces mayor la longitud de los pelos radiculares de las plántulas en comparación al control. El consorcio y la cepa EBCAe10 también presentaron diferencias significativas respecto al control, sin

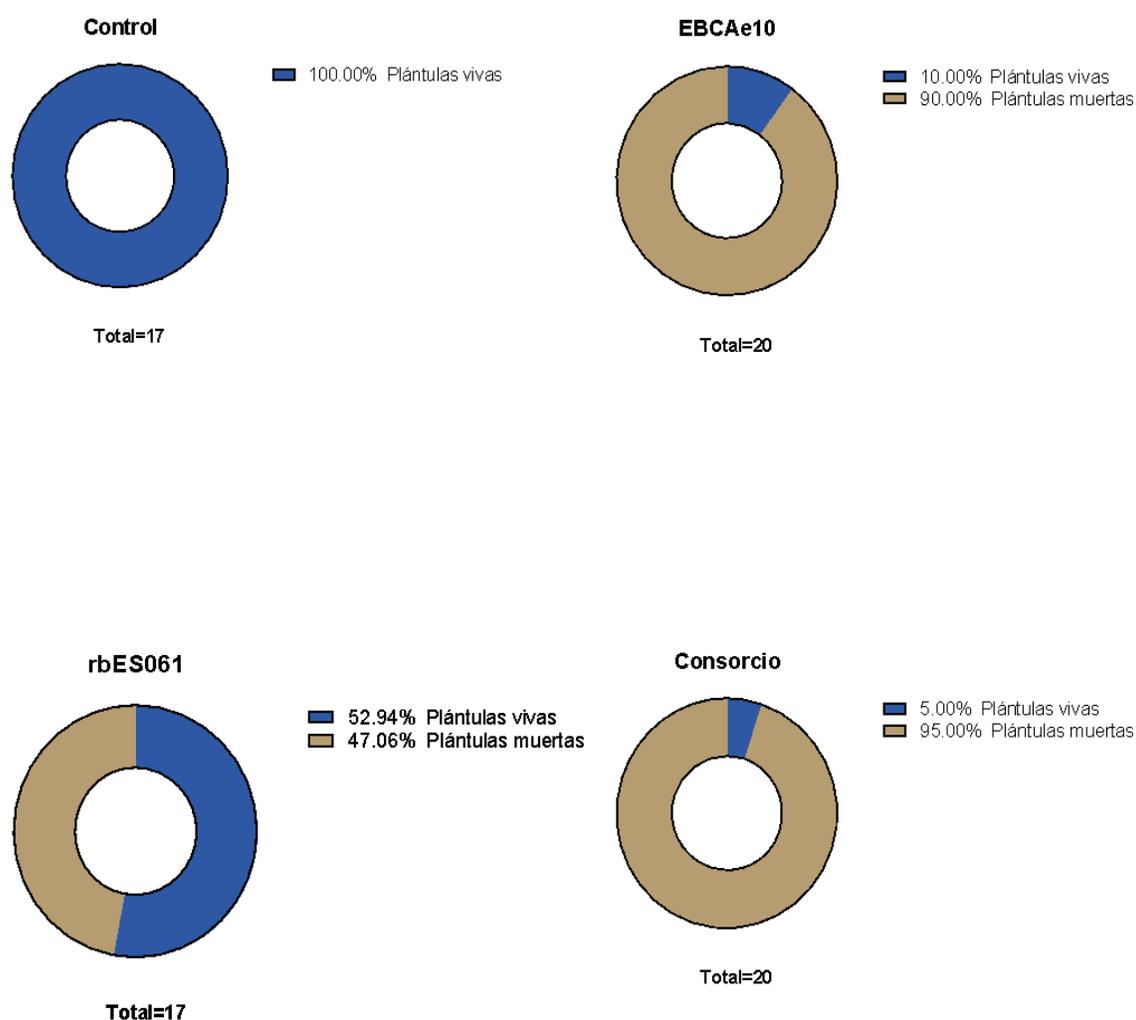
embargo, las plántulas bajo estos tratamientos tuvieron menor elongación de pelos radiculares en comparación a la cepa rbEs061.



**Figura 8.** Evaluación de parámetros morfométricos en plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *DR5::gus*. A y B peso fresco foliar y radicular, respectivamente (promedio de 8 plántulas), Largo de raíz (C), número de raíces laterales (D), longitud de pelos radiculares (E) y número de pelos radiculares por milímetro. (\*) indican las diferencias significativas entre tratamientos, (ns) no significativo. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , \*\* $p=0.01-0.001$ , \*\*\* $p=0.001-0.0001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Finalmente, en el caso del número de pelos radiculares por milímetro, los tratamientos que presentaron una diferencia significativa respecto al control fueron el consorcio y la cepa rbES061. La cepa EBCAe10 no presentó un mayor número de pelos radiculares en comparación con el control o en comparación a los tratamientos con la cepa rbES061 y el consorcio.

En el ensayo de interacción por compuestos volátiles (figura 9), se encontró que los compuestos producidos por ambas cepas afectaron a las plántulas de *Arabidopsis* donde la cepa EBCAe10 generó un 90 % de mortandad en las plántulas después de una interacción de 7 días, la cepa rbEs061 provocó una mortandad del 46.06 % y en el caso del consorcio el 95% de las plántulas murieron, mientras que en el tratamiento control (sin bacterias) todas las plántulas sobrevivieron.



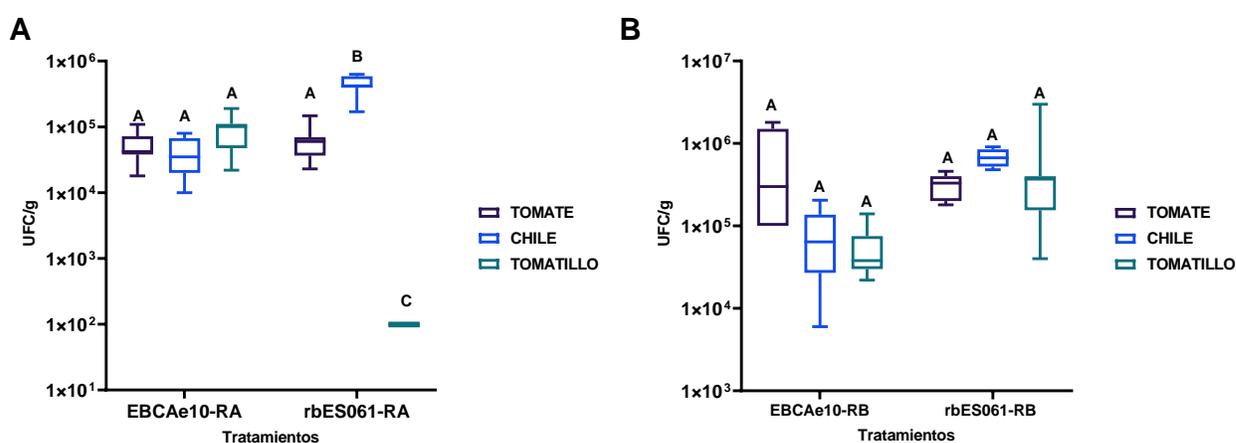
**Figura 9.** Porcentaje de supervivencia en el ensayo de interacción por compuestos volátiles

### 3.8 Ensayos de germinación

El ensayo de germinación se realizó para determinar las condiciones que se utilizarían en la cámara de crecimiento, el porcentaje de germinación de las semillas y qué especies de solanáceas serían utilizadas para el ensayo para evaluación de la colonización. En este experimento se observó una germinación del 100% en el caso del tomate, 45% en el caso del tomatillo, 22% en chile y 0% en berenjena, por su baja germinación y sus diferencias morfológicas, la berenjena fue descartada para el siguiente ensayo.

### 3.9 Colonización rizosférica, endófito y epífita de las cepas rbES061 y EBCAe10 en distintos cultivos de la familia *Solanaceae*, en cámara de crecimiento e invernadero

Las bacterias lograron establecerse en la rizosfera de las tres plantas bajo riego alto y bajo, a excepción de la cepa rbES061 en el tratamiento con riego alto en el cultivo de tomatillo (figura 10 A). En el caso del tratamiento con la cepa rbES061 en tomatillo, bajo condiciones de riego alto no fueron detectables colonias en las diluciones plaqueadas, por lo que se determinó como límite de detección <99 CFU/g de suelo.

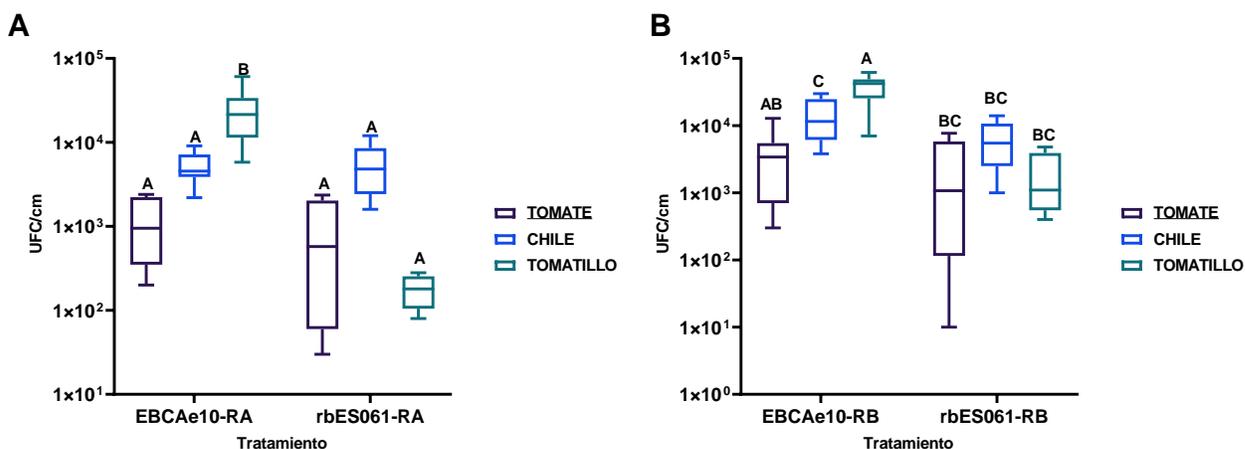


**Figura 10.** Colonización rizosférica de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate, chile y tomatillo con bajo riego alto (A) y con riego bajo (B). Las cajas en las gráficas que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

En el caso del tratamiento con riego bajo, no se presentaron diferencias significativas entre las cepas EBCAe10 y rbES061 en las diferentes plantas, por otra parte, en el tratamiento bajo riego alto, no hubo diferencia significativa entre especies vegetales inoculadas con la cepa EBCAe10 y los tratamientos en planta de tomate con la cepa rbES061. Sin embargo, las plantas de chile mostraron diferencia significativa de un orden de magnitud en la colonización por la cepa rbES061 (Figura 10B)

En la colonización epífita, la cepa EBCAe10 en plantas de tomatillo fue la que obtuvo una mayor colonización en ambos tratamientos de riego (figura 11). Sin embargo, solo la cepa EBCAe10 en tomatillo presentó una diferencia significativa en colonización respecto a los otros tratamientos, en condiciones de riego alto (figura 11 A), de aproximadamente  $1 \times 10^4$  UFC/cm mayor. Estos resultados se obtuvieron tras el lavado superficial de la corona de las plantas, lo que nos indica que las bacterias estaban adheridas a la superficie vegetal.

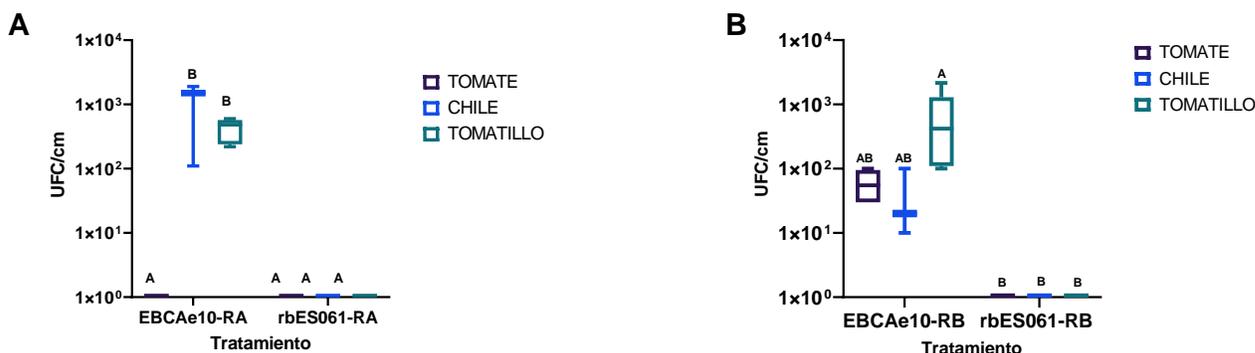
En el tratamiento con riego bajo (figura 11 B), no se observaron diferencias de colonización entre las plantas inoculadas con la cepa rbES061. La cepa EBCAe10 fue la que presentó una mayor colonización principalmente en las plantas de tomate y tomatillo.



**Figura 11.** Colonización epífita de las cepas EBCAe10 y rbES061 en plantas de tomate, chile y tomatillo bajo riego alto (A) y riego bajo (B). Las cajas en las gráficas que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

En cuanto a la colonización endófitra (figura 12), la cepa rbES061, que es un aislado rizosférico, no pudo colonizar el interior de ninguna planta independientemente de las condiciones de riego. La cepa EBCAe10, la cual es un aislado endófito, pudo colonizar al chile y al tomatillo en ambos tratamientos de riego. Curiosamente, en el caso del tomate, la cepa EBCAe10 no logró establecerse de manera endófitra en

condiciones de riego alto (figura 12 A), aunque sí lo hizo en el tratamiento con riego bajo ( $1.3 \times 10^1$  UFC/cm) (figura 12 B).

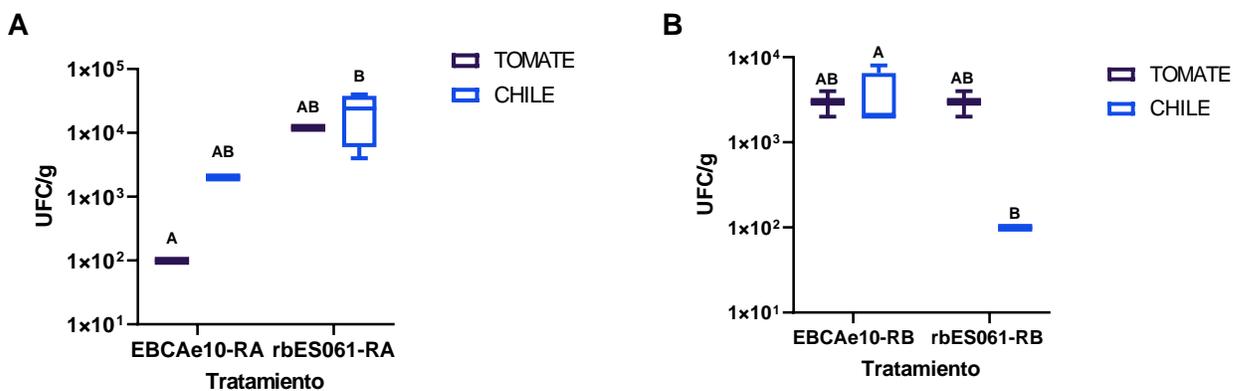


**Figura 12.** Colonización endófitica de las cepas EBCAe10 y rbES061 en plantas de tomate, chile y tomatillo, con riego alto (A) y riego bajo (B). Las cajas en las gráficas que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

El ensayo en invernadero fue una réplica del ensayo en cámara de crecimiento, respecto a los tratamientos utilizados, sin embargo, presentó diferencias importantes. El suelo utilizado para el ensayo en invernadero no fue esterilizado, y se usó una proporción de arena: cosmo peat de 3:1, mientras que, en el ensayo de cámara de crecimiento, el tamaño de las macetas utilizadas fue del doble (8") y el volumen de riego para los tratamientos de sequía era de 50 ml y para los tratamientos con riego alto fue de 250 ml.

En condiciones de riego alto (figura 13 A) las plantas de chile inoculadas con la cepa rbES061 fueron las que presentaron una mayor colonización, rizosférica con  $1 \times 10^4$  UFC/g de suelo, en contraparte, la cepa EBCAe10 no fue capaz de colonizar eficientemente la rizósfera de tomate en condiciones de riego alto, ya que no se observaron colonias en las diluciones más pequeñas plaqueadas ( $1 \times 10^{-2}$ ), por lo que en estos casos se consideraron 90 UFC/g de suelo, ya que es el valor por debajo del límite mínimo de detección en este ensayo (figura 13 A).

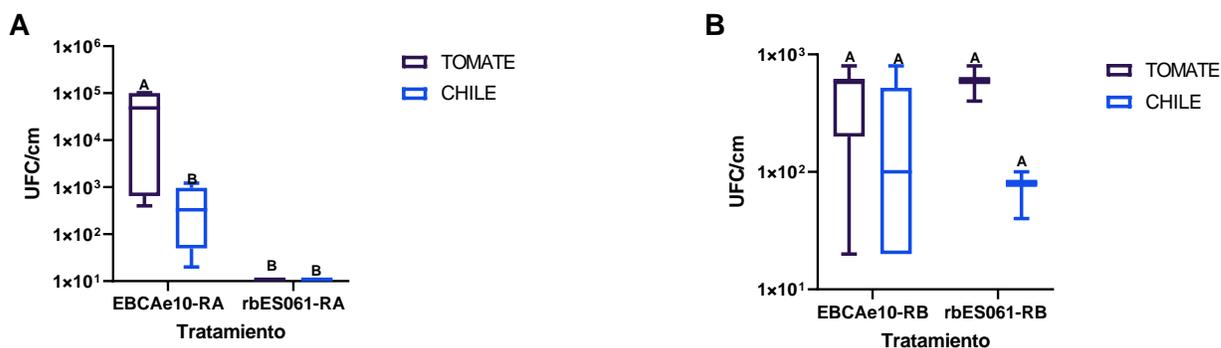
En el caso de los tratamientos con condiciones de riego bajo (figura 13 B), ocurrió lo opuesto, la cepa rbES061 no logró colonizar las plantas de chile a niveles mayores del límite mínimo de detección (90 UFC/g de suelo), mientras que las cepas EBCAe10 colonizó ambos cultivos (Figura 13 B).



**Figura 13.** Colonización rizosférica de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate y chile, con riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. Las cajas en las gráficas que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

En condiciones de riego alto (figura 14 A), solo la cepa EBCAe10 pudo colonizar epíticamente las plantas de tomate y chile, sin embargo, en plantas de tomate presentó una colonización significativa ( $1 \times 10^2$  veces mayor) en comparación de las plantas de chile en plantas de tomate en condiciones de riego

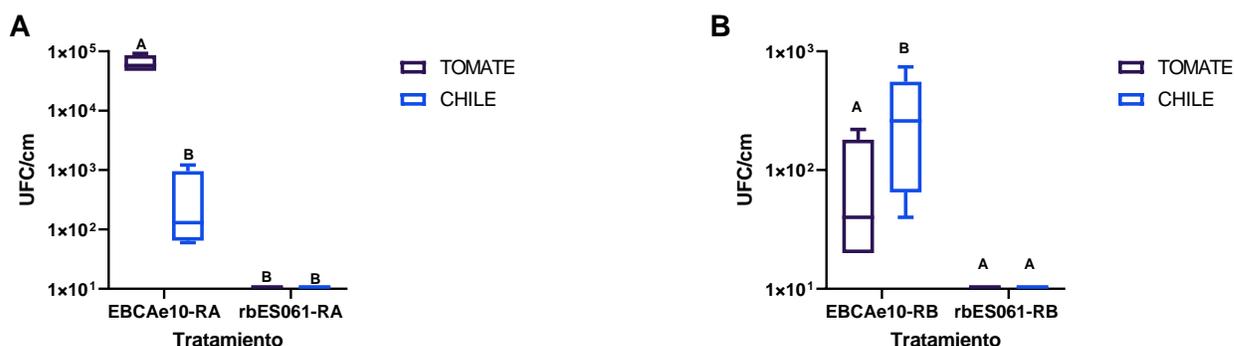
En el caso de los tratamientos con riego bajo ambas cepas se lograron establecer en ambos cultivos, sin embargo, no hubo diferencias significativas en colonización entre los distintos tratamientos (figura 14 B).



**Figura 14.** Colonización epífita de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de tomate y chile, con riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. Las cajas en las gráficas que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

En la evaluación de la colonización endófitra de las cepas EBCAe10 y rbEs061 en plantas de chile y tomate en invernadero (figura 15), se repitió lo encontrado en cámaras de crecimiento, solo la cepa EBCAe10 logró

establecerse dentro de las plantas de chile y tomate, en ambas condiciones de riego (figura 15). Sin embargo, en el caso de los tratamientos con riego alto (figura 15 A), solo en tomate se observó una diferencia significativa de dos órdenes de magnitud en la colonización en comparación con los otros tratamientos (figura 15 A). Por otra parte, en el caso de las plantas de riego bajo, solo en chile se observó una colonización significativa, en comparación con los otros tratamientos (figura 15 B).



**Figura 15.** Colonización endófitica de las cepas EBCAe10 y rbES061 en plantas de tomate y chile, bajo riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. Las cajas en las gráficas que tienen la misma letra, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

### 3.10 Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas tomate, chile y tomatillo en condiciones de cámara de crecimiento.

Se evaluó la promoción de crecimiento de plantas de tomate, chile y tomatillo (tabla 6, 7 y 8) en respuesta a la aplicación de las cepas EBCAe10 y rbES061 bajo condiciones con riego alto y riego bajo, respecto al control, las cuales indujeron un incremento en los distintos parámetros morfológicos medidos.

Los parámetros medidos fueron: peso seco de raíz, peso seco del tallo, largo de raíz, largo del tallo, y número de hojas. Las cuales se muestran en la tabla 6 (morfológicos de plantas de tomate), tabla 7 (morfológicos de plantas de chile) y tabla 8 (morfológicos de plantas de tomatillo), los tratamientos donde se encontraron diferencias significativas respecto al control están presentadas en gráficas (figura 16-21).

En el caso del peso seco de raíz en tomate y chile las plantas inoculadas no presentaron diferencia significativa respecto al control en ninguno de los dos tratamientos de riego. Sin embargo, en las plantas de tomate con riego bajo se observa una tendencia al aumento en comparación al control, siendo el

promedio de peso seco para las plantas con la cepa EBCAe10 y rbES06 1 0.042 g y 0.046g respectivamente, mientras que el promedio del control fue 0.23 g.

**Tabla 6.** Parámetros morfométricos evaluados en plantas de tomate en condiciones de cámara de crecimiento. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , en comparación con su respectivo control mediante un ANOVA de una vía.

Tratamiento	Número de hojas	Largo de raíz (cm)	Largo de tallo (cm)	Peso de raíz (g)	Peso de tallo (g)
Control riego normal	5 ± 1 ns	14.5 ± 4.5	25.5 ± 4.7	0.076 ± 0.03	0.332 ± 0.14
EBCAe10 riego normal	4 ± 1 ns	11.9 ± 3.9 ns	27.1 ± 5.4 *	0.070 ± 0.038 ns	0.349 ± 0.13*
rbES061 riego normal	4 ± 1 ns	12.5 ± 4.5 ns	28 ± 4.4 ns	0.082 ± 0.043 ns	0.341 ± 0.14 *
Control riego bajo	3 ± 1	9 ± 1	12.8 ± 3.1	0.023 ± 0.01	0.073 ± 0.03
EBCAe10 riego bajo	5 ± 1 ns	11 ± 1.9 ns	16.9 ± 2.4 ns	0.042 ± 0.01 ns	0.146 ± 0.02 ns
rbeES061 riego bajo	5 ± 2 ns	9.2 ± 3.2 ns	13.2 ± 2.4 ns	0.047 ± 0.03 ns	0.145 ± 0.06 ns

**Tabla 7.** Parámetros morfométricos evaluados en plantas de chile en condiciones de cámara de crecimiento. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , en comparación con su respectivo control mediante un ANOVA de una vía.

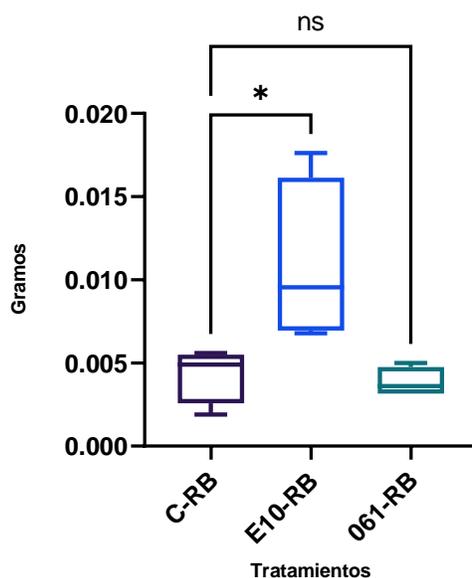
Tratamiento	N de hojas	Largo de raíz(cm)	Largo de tallo (cm)	peso de raíz (g)	peso de tallo (g)
Control riego normal	11.8 ± 1	18.4 ± 3.9 ns	15.5 ± 2.6 ns	0.115 ± 0.04 ns	0.234 ± 0.056 ns
EBCAe10 riego normal	13.8 ± 1 ns	22 ± 6 ns	17.5 ± 2.3 ns	0.215 ± 0.24 ns	0.298 ± 0.064 ns
rbES061 riego normal	14.8 ± 4 ns	18.6 ± 5.5 ns	16.3 ± 3.7 ns	0.077 ± 0.05 ns	0.224 ± 0.097 ns
Control riego bajo	11.3 ± 2	15.2 ± 5.3 ns	12.2 ± 1.9 v	0.072 ± 0.03 ns	0.103 ± 0.025 ns
EBCAe10 riego bajo	11 ± 1 ns	13.6 ± 2.5 ns	13.1 ± 1.8 ns	0.058 ± 0.029 ns	0.107 ± 0.020 ns
rbES061riego bajo	11.3 ± 1ns	14.7 ± 1.2 ns	12.6 ± 2 ns	0.037 ± 0.02 ns	0.153 ± 0.175 ns

El peso seco en raíces de plantas de tomatillo no presentó diferencia en condiciones con riego alto. Por otra parte, en condiciones con riego bajo (figura 16), las plantas inoculadas con la cepa EBCAe10 presentaron un mayor peso seco en raíces, en comparación del control, siendo 2.3 veces mayor que el control.

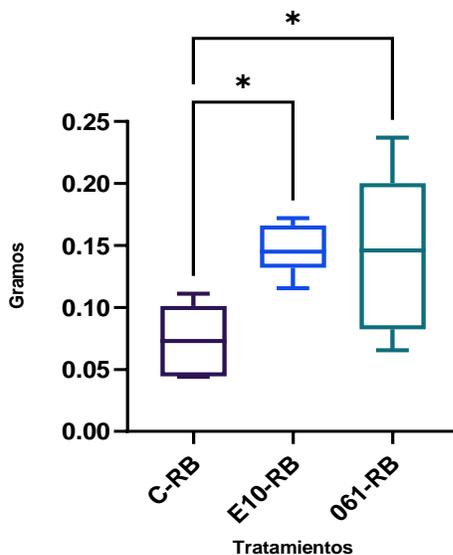
Para el peso seco del tallo en plantas de tomate, las plantas inoculadas en condiciones con riego alto no presentaron diferencias significativas respecto a su control. Caso contrario fue lo observado en las plantas inoculadas en condiciones de riego bajo (figura 17), en donde los tratamientos inoculados con las cepas EBCAe10 y rbES061 presentaron un mayor peso seco de tallo (dos veces mayor) en comparación al control

**Tabla 8.** Parámetros morfométricos evaluados en plantas de tomatillo en condiciones de cámara de crecimiento. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , en comparación con su respectivo control mediante un ANOVA de una vía.

TRATAMIENTO	N de hojas	largo raíz (cm)	largo tallo (cm)	peso seco raíz (g)	peso seco tallo (g)
Control riego normal	6 ± 1	11.7 ± 3.7	8.9 ± 3.7	0.011 ± 0.005	0.044 ± 0.020
EBCAe10 riego normal	7 ± 1 **	14.2 ± 3.6 ns	12.2 ± 4.9 ns	0.024 ± 0.01 ns	0.064 ± 0.018 ns
rbES061 riego normal	7 ± 2 ns	13.7 ± 5.6 ns	13.4 ± 5.2 ns	0.029 ± 0.022 ns	0.066 ± 0.028 ns
Control riego bajo	5 ± 2	8 ± 18	8 ± 2.5	0.004 ± 0.002	0.015 ± 0.007
EBCAe10 riego bajo	7 ± 1 *	9.5 ± 3.7 ns	11.1 ± 3.9 ns	0.011 ± 0.005 *	0.048 ± 0.014 **
rbES061 riego bajo	5 ± 2 *	6 ± 1 ns	10.6 ± 2.9 ns	0.004 ± 0.001 ns	0.023 ± 0.010 ns

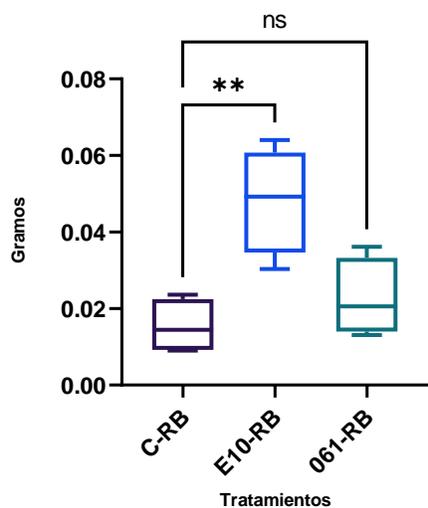


**Figura 16.** Peso seco de raíz en plantas de tomatillo inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo. C-RB: control con riego bajo. E10-RB: cepa EBCAe10 con riego bajo, 061-RB: cepa rbES061 con riego bajo. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA



**Figura 17.** Peso seco de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA

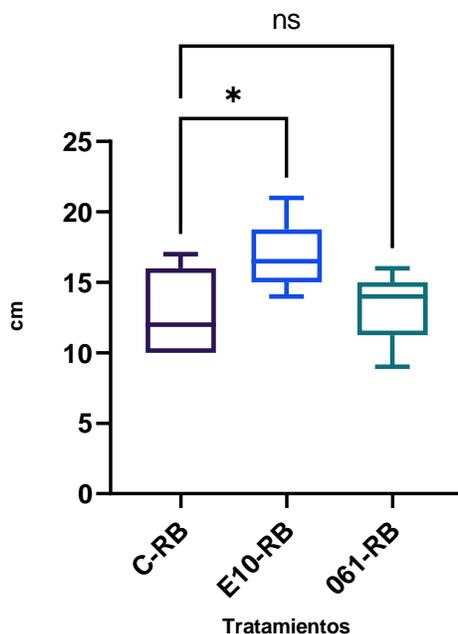
El peso seco de tallo en plantas de tomatillo (figura 18) se observaron diferencias significativas con respecto al control en el caso de las plantas tratadas con la cepa EBCAe10. En condiciones de riego bajo, siendo 3 veces mayor el peso seco respecto al control. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas (ns) respecto al control en el tratamiento con la cepa rbES061



**Figura 18.** Peso seco de tallo en plantas de tomatillo inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA

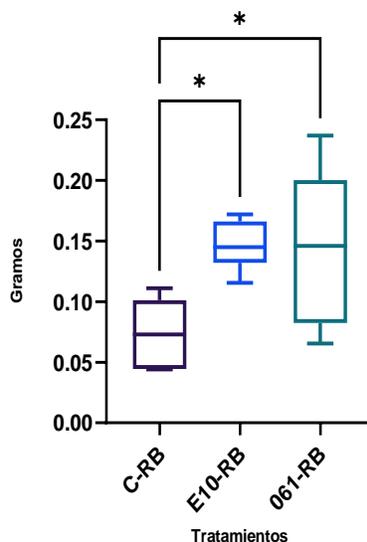
Respecto al largo de raíz en plantas de tomate, chile y tomatillo, las plantas inoculadas no presentaron diferencias en comparación al control, en ninguno de los dos tratamientos de riego (figura 19).

En el caso del largo de tallo en plantas de tomate, chile y tomatillo con riego alto y riego bajo, en el único tratamiento en el que se observó una diferencia respecto al control, fue en las plantas de tomate inoculadas con la cepa EBCAe10 en condiciones de riego bajo (figura 19) teniendo en promedio un largo de 16 cm, mientras que el control presentaba un promedio de 12 cm.



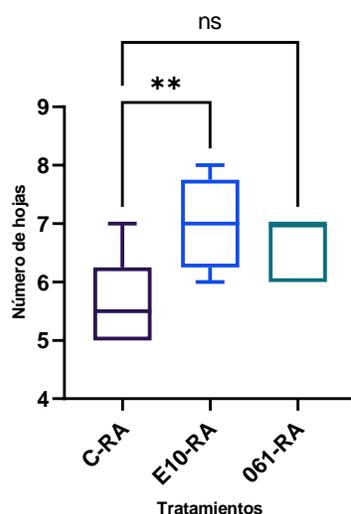
**Figura 19.** Largo de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA

El número de hojas en plantas de tomate en condiciones de cámara de crecimiento (figura 20), presentó diferencias significativas respecto al control, mostrando un aumento en el tratamiento con la cepa EBCAe10 y rbES061 en condiciones de riego bajo, en condiciones de riego alto no se observaron diferencia. Por otra parte, el número de hojas en plantas de chile no mostraron diferencias respecto al control en ninguno de los tratamientos



**Figura 20.** Número de hojas en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA

En cuanto al número de hojas en las plantas de tomatillo (figura 21) observamos un aumento altamente significativo ( $p=0.01-0.001$ ) en condiciones con riego alto en el tratamiento con la cepa EBCAe10, mientras que en el tratamiento con la cepa 061 no se encontraron diferencia respecto al control. En condiciones de riego bajo ninguna cepa generó un aumento significativo respecto al control.



**Figura 21.** Número de hojas en plantas de tomatillo inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego o alto. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , \*\* $p=0.01-0.001$ ; ANOVA

### 3.11 Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas tomate, chile en condiciones de invernadero

#### 3.11.1 Evaluación de la actividad de promoción del crecimiento en plantas tomate, en condiciones de invernadero

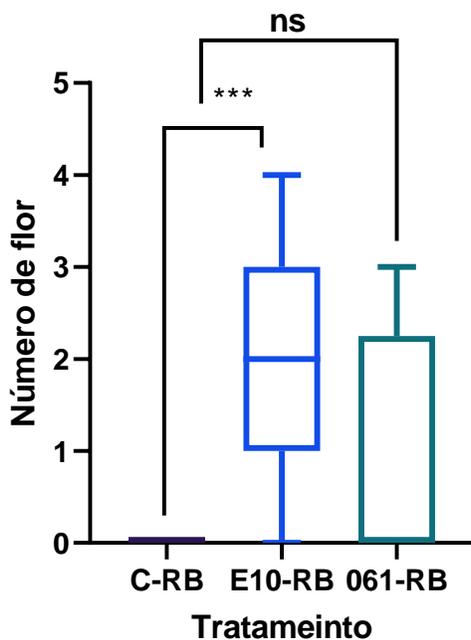
Para los ensayos de invernadero en tomate (Tabla 9), se observó un aumento en el número de flores en los tratamientos utilizando la cepa rbES061 en condiciones de riego alto siendo 9 veces mayor en comparación del control. Por otra parte, en condiciones de riego bajo las plantas control no presentaron flores, en contraste a las plantas inoculadas con la cepa EBCAe10 presentaron diferencia significativa respecto al control, con un promedio de 2 flores por planta (figura 22).

**Tabla 9.** Parámetros morfométricos evaluados en plantas de tomate en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , en comparación con su respectivo control mediante un ANOVA de una vía.

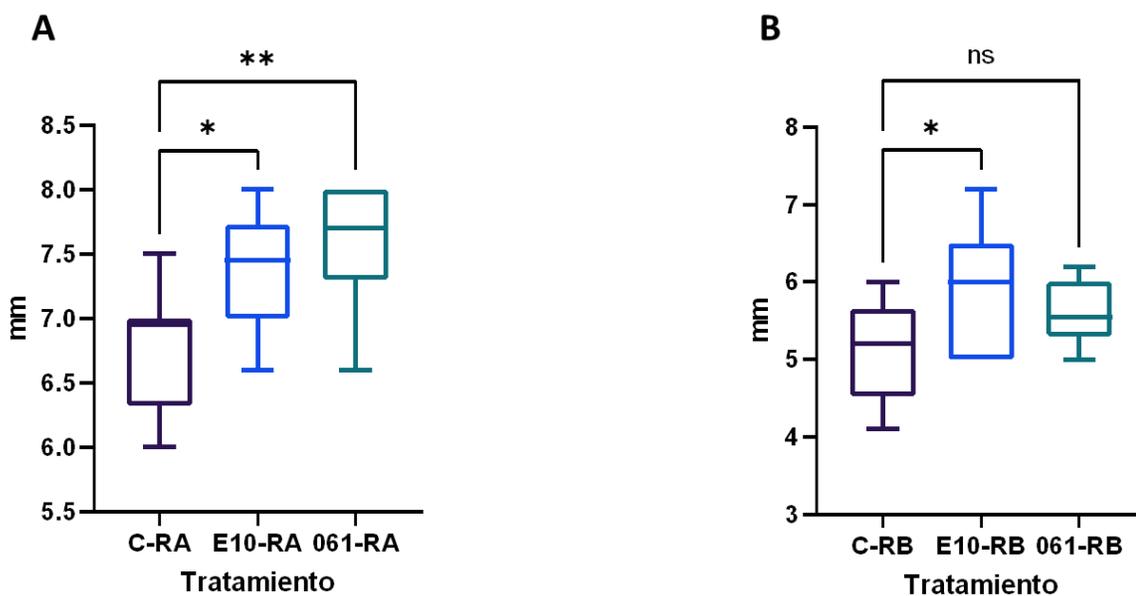
Tratamiento	Número de fruto	N de flores	Peso de fruto (g)	N de hojas	ancho del tallo mm	largo de raíz	largo del tallo	peso raíz	peso tallo
Control riego normal	1.3 ± 0.5	0.3 ± 0.7	13.33 ± 4	12 ± 2	6.8 ± 0.5	35.4 ± 3.6	34.7 ± 5.6	1.154 ± 0.18	4.83 ± 0.8
EBCAe10 riego normal	1 ± 0.4 ns	2.3 ± 2.2 ns	13.27 ± 6.7 ns	11.7 ± 3.9 ns	7.35 ± 0.4*	39.7 ± 7.9 ns	37.5 ± 5.5 ns	1.7 ± 0.6 *	5.9 ± 2 ns
rbES061 riego normal	1 ± 0.5 ns	3 ± 2 *	16.7 ± 8.8 ns	11 ± 3 ns	7.6 ± 0.5 **	39.5 ± 7.9 ns	36.1 ± 5 ns	1.42 ± 0.34 ns	5.86 ± 1.65 ns
Control riego bajo	0.6 ± 0.5	0	1.49 ± 0.8	6 ± 1	5.1 ± 0.67	31.7 ± 3.6	24.19 ± 2.8	0.925 ± 1.04	1.462 ± 0.33
EBCAe10 riego bajo	0.5 ± 0.7 ns	2 ± 1 ***	1.97 ± 2.7 ns	7 ± 2 ns	5.9 ± 0.7 *	38.6 ± 4.4*	27 ± 3.5 ns	0.93 ± 0.21 *	2.17 ± 0.55 **
rbES061 riego bajo	0.3 ± 0.6 ns	1 ± 1 ns	2.6 ± 1.6 ns	6 ± 1 ns	5.6 ± 0.4 ns	35.1 ± 8.8 ns	26.33 ± 3.6 ns	0.83 ± 0.23 ns	2.2 ± 0.5 **

Respecto al número y peso de frutos en plantas de tomate en invernadero, no se observaron diferencias respecto al control, en ninguna de las dos condiciones de riego (tabla 9).

En el caso del ancho de tallo en plantas de tomate se observó un aumento significativo en plantas inoculadas (ambas cepas) en comparación a las no inoculadas (figura 23-A), por otra parte, en el tratamiento con riego bajo solo se observó diferencia significativa en las plantas inoculadas con la cepa EBCAe10 (figura 23-B)



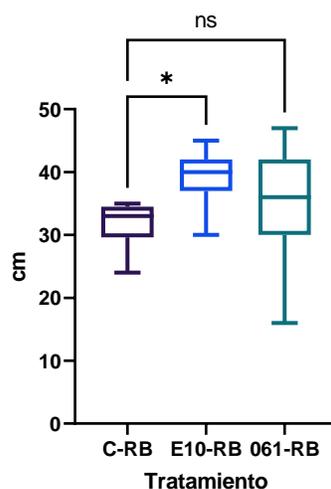
**Figura 22.** Número de flores en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA



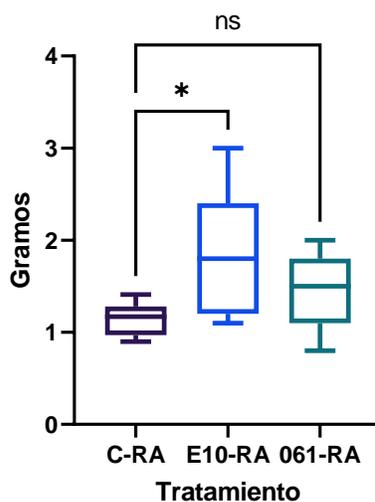
**Figura 23.** Grosor de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego o alto con riego alto (A) y riego bajo (B) en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , \*\* $p=0.01-0.001$ ; ANOVA

En el largo de raíz, se observó un aumento significativo promedio de 7 cm en longitud de raíz en condiciones de riego bajo (figura24) en comparación del control.

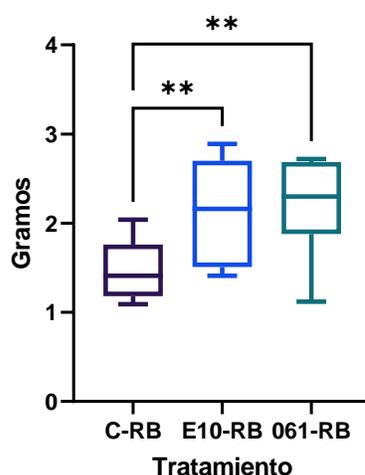
En el peso seco radicular solo observó un aumento en el tratamiento con la cepa EBCAe10 con riego alto (figura 25), en comparación al control. En contraste, en el caso del peso seco de tallo en condiciones de riego alto no se observaron diferencias significativas en comparación del control. Sin embargo, en condiciones de riego bajo ambos tratamientos inoculados presentaron significativamente un mayor peso seco de tallo en comparación del control (figura 26).



**Figura 24.** Largo de raíz en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA



**Figura 25.** Peso seco de raíz plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego alto en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA



**Figura 26.** Peso seco de tallo en plantas de tomate inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA

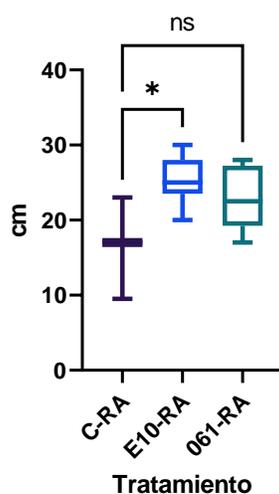
### 3.11.2 Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas chile, en condiciones de invernadero

En las mediciones morfométricas de plantas de chile en condiciones de invernadero (tabla 10), no se encontraron diferencias respecto al control en el ancho del tallo, largo de raíz o en el largo del tallo en condiciones de riego bajo. Si se observó un aumento significativo en el largo de tallo en condiciones de riego bajo en las plantas inoculadas con la cepa EBCAe10 teniendo un aumento de aproximadamente 10 cm respecto al control (figura 27).

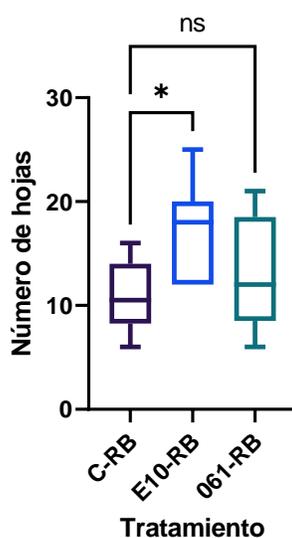
**Tabla 10.** Parámetros morfométricos evaluados en plantas de chile inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , en comparación con su respectivo control mediante un ANOVA de una vía.

tratamiento	N de hojas	Ancho del tallo (mm)	Largo de raíz (cm)	Largo del tallo (cm)	Peso raíz (cm)	Peso tallo (cm)
Control riego normal	20.25 ± 7.8	3.3 ± 0.9	33.1 ± 9	16.5 ± 6.8	0.72 ± 0.4	0.65 ± 0.4
EBCAe10 riego normal	31 ± 12 ns	4.9 ± 1.5 ns	42.6 ± 9 ns	25.2 ± 3 *	1.03 ± 0.5 ns	1.18 ± 0.4 ns
rbES061 riego normal	27 ± 15 ns	3.8 ± 0.3 ns	43.83 ± 7.6 ns	22.83 ± 4.16 ns	0.88 ± 0.38 ns	0.962 ± 0.42 ns
Control riego bajo	11 ± 3	2.75 ± 0.7	37.5 ± 5.5	13.75 ± 3	0.46 ± 0.3	0.37 ± 0.24
EBCAe10 riego bajo	16 ± 4 *	3.32 ± 0.5 ns	36.9 ± 5 ns	16.7 ± 3.2 ns	0.717 ± 0.1 *	0.52 ± 0.2 ns
rbES061 riego bajo	13 ± 6 ns	2.8 ± 0.4 ns	33.6 ± 5 ns	16 ± 5.6 ns	0.541 ± 0.204 ns	0.485 ± 0.22 ns

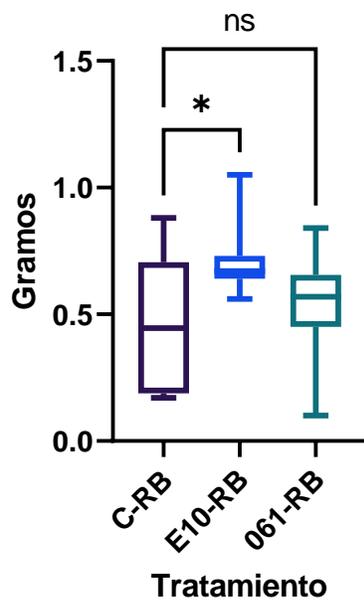
En el caso del número de hojas se encontró un aumento significativo respecto al control en condiciones de riego bajo en el tratamiento con la cepa EBCAe10, teniendo en promedio 16 hojas mientras que el control tenía 11 hojas en promedio (figura 28). De igual manera, en cuanto al peso seco de raíz se observaron diferencias en condiciones de riego bajo en las plantas inoculadas con la cepa EBCAe10, siendo 1.5 veces mayor en comparación al control (figura 29). Finalmente, respecto al peso seco de tallo en plantas de chile bajo condiciones de invernadero, no se observaron diferencias significativas respecto al control, en ninguna de las condiciones de riego



**Figura 27.** Largo de tallo en plantas de chile inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego con riego alto en condiciones de invernadero. En el eje X se muestran las abreviaturas de los tratamientos aplicados. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA



**Figura 28.** Número de hojas en plantas de chile inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA



**Figura 29.** Peso seco de raíz en plantas de chile inoculadas con las cepas EBCAe10 y rbEs061 con riego bajo en condiciones de invernadero. En el eje X se muestran las abreviaturas de los tratamientos aplicados. ns  $p \geq 0.05$ , \* $p=0.5-0.01$ , ANOVA

## Capítulo 4. Discusión

---

Este trabajo tuvo como objetivo determinar si existe una relación entre la colonización y la actividad de promoción de crecimiento de cepas aisladas de la solanácea nativa del noroeste de México *Solanum hindsianum*, en distintas plantas de interés agrícola pertenecientes a misma familia, y si la fitoestimulación involucra la activación de las vías de señalización dependientes de las auxinas. Se evaluó la colonización de dos cepas ambas pertenecientes al género *Pseudomonas*, un aislado rizosférico (cepa rbES061) y un aislado endófito (cepa EBCAe10), bajo dos condiciones de riego.

Las bacterias constantemente están produciendo compuestos que pueden alterar el comportamiento y desarrollo de otros seres vivos, ya sea de otros microorganismos o plantas, estas alteraciones pueden ser benéficas o antagónicas. Algunas bacterias facilitan o aumentan la disponibilidad de algunos nutrientes, como el nitrógeno, hierro o fósforo, o producen compuestos como el AIA o los sideróforos que inducen el crecimiento de las plantas o le ayudan a la adquisición de nutrientes. Otros compuestos producidos por las bacterias que son importantes para la interacción planta-bacteria son los compuestos volátiles, estos son sustancias de bajo peso molecular (<300 Da), que pueden promover el crecimiento de las plantas, disparar la respuesta sistémica o servir como antagonista de microorganismos fitopatógenos (Chung et al., 2016; Méndez-Bravo et al., 2018). Algunos ejemplos de estos compuestos volátiles son la acetoina, el amoníaco y el 1-hexanol (Kanchiswamy et al., 2015).

En los ensayos de interacción en etapas tempranas vegetativas, utilizando la línea transgénica *DR5::gus* de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, el tratamiento que presentó un aumento significativo del peso fresco foliar y peso fresco de raíz fue el consorcio. En cuanto al largo de la raíz, el tratamiento control fue el que presentó un aumento en la longitud radicular, lo cual se debe a un trade-off de crecimiento longitudinal por aumento en el número de raíces laterales y pelos radiculares. Un trade-off se basa en la suposición de que las plantas tienen una cantidad limitada de recursos, por lo que invierten energía en su crecimiento, desarrollo, reproducción o defensa dependiendo de las condiciones ambientales específicas (Huot et al., 2014). El número de raíces laterales fue mayor en los tres tratamientos donde se utilizaron bacterias en comparación al control ( $P= 0.0001$ ) y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con las cepas rbES061, EBCAe10 y el consorcio respectivamente.

En cuanto a la longitud de los pelos radiculares, fue la cepa rbES061 la que promovió el mayor aumento en la longitud radicular ( $P= <0.0001$ ) en comparación a los demás tratamientos, pero cabe mencionar que

el tratamiento con la cepa EBCAe10 y el consorcio también aumentó la longitud de raíces en comparación con el control. En las evaluaciones morfométricas se observó como todos los tratamientos donde se utilizaron bacterias presentaron diferencias significativas respecto al control, aumentando el peso fresco foliar y radicular, el número raíces laterales, la longitud y número de pelos radiculares. En general el tratamiento con el consorcio y el uso individual de la cepa rbES061 fueron los que presentaron mayores resultados de promoción.

Una de las principales características que tienen las PGPB es la producción de ácido indol acético (AIA), el cual es una hormona vegetal que tiene un efecto directo sobre el crecimiento radicular. Tanto la cepa EBCAe10 y la cepa rbES061 son productoras de esta hormona, lo que explica su efecto sobre las plántulas de *Arabidopsis* en condiciones in vitro. Interesantemente, es la cepa EBCAe10 produce mucho poco más del doble de AIA que la cepa rbES061 (Corral-Federico, 2021; Delgado-Ramírez et al., 2021), por lo que su producción no se traduce en una mayor promoción del crecimiento radicular. El impacto de la hormona que producen las bacterias está en función de la cantidad de AIA disponible para la planta y la sensibilidad de la misma a los cambios de concentración (Spaepen et al., 2007)).

En el ensayo de interacción por compuestos volátiles el efecto fue opuesto al observado en el ensayo por compuestos difusibles, ya que los tratamientos con las bacterias mataron a las plántulas de *Arabidopsis*, hasta en un 95% en el caso del consorcio, por lo que se puede inferir que estas bacterias producen algún compuesto que afecta a las plantas. En este ensayo, a diferencia del ensayo por compuestos difusibles, las bacterias no estaban en contacto directo con las plantas o con el medio en el que se encontraban las plántulas de *Arabidopsis*, sino que se encontraban en cajas Petri con división, lo que impedía una comunicación química por compuestos difusibles entre plantas y bacterias. Adicionalmente, el lado que contenía a las plántulas tenía medio MS y el lado donde fueron sembradas las bacterias tenía medio LB por lo que las condiciones de ambos organismos eran diferentes. Si bien, la mayoría de los compuestos volátiles producidos por las bacterias tienen un efecto positivo o neutro en las plantas, existen algunos compuestos que llegan a ser fitotóxicos (Garbeva y Weiskopf, 2020) como el cianuro de hidrógeno (Blom et al., 2011) y el amoníaco (Weise et al., 2013). Respecto a los resultados obtenidos en el ensayo por compuestos volátiles, en donde arriba del 80% de las plántulas de *Arabidopsis* murieron en los tratamientos con las cepas EBCAe10, rbES061 y el consorcio, se sugiere repetir el ensayo con mayor número de repeticiones y usando una menor concentración de bacterias, ya que según lo reportado por Blom et al., (2011), en dosis muy grandes hay efectos negativos sobre las plántulas. Otro ensayo que se debería realizar es una cromatografía de gases para identificar los compuestos volátiles producidos por estas dos bacterias.

La colonización de las plantas por bacterias es uno de los principales factores involucrados en la patogenicidad, y también es un paso crucial para la acción o eficacia de inoculantes microbianos utilizados como biofertilizantes o biopesticidas. Las bacterias pueden colonizar a las plantas en distintas partes del tejido vegetal, como en la raíz, el tallo, en hojas semillas o dentro de la planta de manera intravascular. Cada parte del tejido de la planta tiene características físico-químicas (como lo son los flujos de agua y nutrientes), que pueden beneficiar o perjudicar la colonización de ciertas especies bacterianas (Ramey et al., 2004). El ensayo para evaluar la colonización de las cepas EBCAe10 y rbES061 en cámara de crecimiento fue un experimento en condiciones ambientales controladas. La mezcla de arena turba fue esterilizada 4 veces en autoclave, el agua utilizada para el riego fue agua destilada estéril, la temperatura se mantenía constante a 28 °C, y la cámara de crecimiento solo se abría al momento de regar las plantas, para evitar en medida de lo posible la contaminación externa. Estas características disminuían los factores de competencia que pudieran afectar a la colonización de las cepas inoculadas. Por estas razones la colonización rizosférica de los aislados EBCAe10 fue homogénea. EBCAe10 colonizó a las tres especies de Solanáceas en ambas condiciones de riego (riego alto y riego bajo).

La colonización rizosférica de la cepa rbES061 también fue homogénea a excepción del tratamiento de riego bajo en el cultivo de tomatillo, donde no se lograron detectar colonias en ninguna de las diluciones plaqueadas, las cuales fueron  $1 \times 10^{-2}$ . En el caso de evaluación de la colonización rizosférica no se consideró realizar diluciones más pequeñas a  $1 \times 10^{-2}$  debido a que a pesar de que no se encontraron colonias de las cepas inoculadas, si había un gran crecimiento de otras bacterias y hongos, lo que posiblemente impedía la detección de las bacterias fluorescentes. Por lo anterior no se puede descartar por completo que esta cepa sí se encontrara en el suelo rizosférico, por lo que se debería considerar utilizar un método de muestreo más sensible, como lo es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Babalola, 2003), utilizando los primers FWD Tn5/7\_gt Tn5 y REV\_Tn5/7\_gt (Schlechter et al., 2018), los cuales son complementarios a los extremos del fluoróforo que se encuentran dentro del transposón Tn7 y por lo tanto serían específicos a nuestras cepas.

En condiciones de riego alto la cepa rbES061 presentó una mayor colonización en el cultivo de chile ( $4.4 \times 10^5$  UFC/g) y en condiciones de riego bajo aumentó a  $6.8 \times 10^5$ , sin embargo, no se observaron diferencias entre la colonización. Excluyendo el caso del tomatillo inoculado con la cepa rbES061 en condiciones de riego alto, podemos concluir que ambas cepas se establecieron en la rizósfera de las tres Solanáceas, sin verse afectadas por las condiciones de riego.

Si comparamos la colonización de las cepas en el mismo cultivo solo cambiando la condición de riego, se observó que no hubo diferencias significativas en colonización independientemente del volumen de riego. En rizosfera solo hubo diferencia en tomatillo con la cepa EBCAe10 de un orden de magnitud, teniendo un promedio de  $5.4 \times 10^4$  en condiciones de riego alto y  $7.2 \times 10^5$  en riego bajo, y con la cepa rbES061 en tomatillo donde en riego bajo no se logró detectar por lo que consideramos una colonización de 99 UFC/g (límite mínimo de detección) y en condiciones de riego bajo tuvo una colonización de  $6.17 \times 10^5$ , por lo que se puede inferir que al menos en rizosfera, la colonización se mantiene en condiciones de estrés por falta de agua o incluso aumenta, lo que podría deberse a que estas bacterias fueron aisladas de plantas creciendo en condiciones climáticas áridas. En cuanto a la colonización epífita, ambas cepas lograron establecerse en los tres cultivos independientemente de la condición de riego, además no se observaron diferencias en la colonización de las dos cepas independientemente de la condición de riego.

A pesar de que ambas cepas tuvieron en general una eficiente colonización rizosférica y epífita, la cepa EBCAe10 (aislado endófito) presentó mayores niveles de colonización en los diferentes cultivos y los dos riegos, en comparación a la cepa rbES061 (aislado rizosférico). Algunos de los factores involucrados en la colonización bacteriana en planta es la motilidad de las bacterias, la producción de lipopolisacáridos, una tasa de crecimiento rápido, la quimiotaxis hacia algunos ácidos orgánicos y la producción de biofilm (Lopes et al., 2016). Algunas especies de *Pseudomonas* responden de manera rápida a los exudados de las raíces, y colonizan las mismas al establecer biofilms estables (Ramey et al., 2004). Según lo reportado por Corral-Federico (2021), la cepa EBCAe10 produce biofilm, mientras que rbES061 no (Delgado-Ramírez et al., 2021), lo que podría explicar por qué la cepa endófito era una colonizadora más eficiente, ya que la formación de microcolonias en la superficie de la planta depende de la formación de biofilm (Lugtenberg et al., 2001)

Interesantemente, la colonización endófito de la cepa rizosférica (rbES061) fue nula en los tres cultivos bajo las dos condiciones de riego. La cepa endófito, EBCAe10, en condiciones de riego alto no colonizó el tomate, sin embargo, en condiciones de riego bajo colonizó los tres cultivos. Al momento de comparar la colonización en riego alto vs riego bajo solo se presentó diferencias significativas en chile, teniendo una colonización de  $1.7 \times 10^3$  en riego alto y  $4.3 \times 10^1$  en riego bajo. Una de las principales características para una colonización endófito exitosa, es la adherencia de las bacterias a la superficie del tejido vegetal. Existen dos maneras de colonizar de manera endófito, de manera activa a través de la producción de ciertas enzimas como pectinadas y endoglucanasas, o de manera pasiva, a través de las aberturas que tiene la planta en la raíz al momento de emerger las raíces laterales (Menese et al., 2011).

Una de las principales características que debe tener una PGPR para exhibir sus capacidades de promoción de crecimiento vegetal y/o protección, es colonizar la planta. La efectividad de los efectos que tienen las PGPR están fuertemente influenciados por la competencia y persistencia de las cepas, su capacidad de colonizar raíces o la planta per se, liberar distintos metabolitos en presencia de la microbiota de la planta y compitiendo con ella (Prashar et al., 2014).

En el ensayo en invernadero, las cepas inoculadas se encontraban en un ambiente más competitivo en comparación al ensayo en cámara de crecimiento, ya que el sustrato que fue utilizado en ese experimento tenía su propia comunidad microbiana establecida, lo que le agregaba competencia a la cepa EBCAe10 y rbES061, lo que puede explicar la disminución del establecimiento de las cepas en este ensayo. Al comparar la colonización de la misma cepa en el mismo cultivo, solo cambiando la condición de riego, no se observaron diferencias significativas de colonización en ninguno de los casos, a excepción de la cepa rbES061 en el cultivo de chile, donde en condiciones de riego alto tuvo una colonización de  $2.8 \times 10^4$  UFC/g de suelo y en condiciones de riego bajo no se encontraron colonias en ninguna de las diluciones, por lo que se consideró un establecimiento de 90 UFC/g (límite de detección mínimo para este método de muestreo).

Respecto a la colonización epífita y endófito en condiciones de invernadero se observó lo mismo, solo la cepa EBCAe10 se logró establecer en ambos cultivos en ambas condiciones de riego. Al comparar la colonización epífita en las distintas condiciones de riego, solo se encontraron diferencias en el cultivo de tomate, donde el establecimiento de la cepa EBCAe10 fue mayor en condiciones de riego bajo,  $4 \times 10^4$  UFC/g en riego alto y  $4.2 \times 10^2$  en riego bajo.

El tomate en condiciones de riego alto fue el cultivo que presentó una mayor colonización endófito de la cepa EBCAe10, que fue lo contrario a lo observado en cámara de crecimiento, donde esta cepa no se logró establecer en tomate en condiciones de riego alto. En condiciones de riego bajo la cepa EBCAe10 presentó una colonización similar en ambos cultivos  $1.7 \times 10^2$  UFC/cm en tomate y  $2.9 \times 10^2$  UFC/cm para el cultivo de chile.

Respecto al efecto de las cepas sobre las variables morfométricas de las plantas en condiciones de cámara de crecimiento y de invernadero, no se observaron diferencias sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos en las diferentes condiciones de riego en comparación al control. Sin embargo, en varios de los parámetros evaluados destacó la cepa EBCAe10, por ejemplo, en el largo de raíz, del tallo y peso seco de raíz. Esto puede deberse a que la cepa es endófito y pudo establecerse mejor en los cultivos.

El aumento en la ramificación de raíces puede ser causado por la acción de fitohormonas, como las auxinas, dentro de las que se encuentra el ácido indolacético. Es entonces importante remarcar nuevamente que tanto la cepa eBCAe10 como la rbES061 mostraron una alta producción de AIA y la capacidad de promover la ramificación de raíces de plantas de *Arabidopsis* en condiciones in vitro.

En el peso seco del tallo para el cultivo de tomate, se observó lo mismo tanto en cámara de crecimiento como en invernadero, ambas cepas generaron un aumento en el peso seco del tallo respecto al control en condiciones de riego bajo, mientras que en condiciones de riego alto no se observaron diferencias. El cultivo de chile, no mostró diferencias significativas en ninguno de los tratamientos ni en invernadero o cámara de crecimiento. Y en tomatillo solo se encontraron diferencias con la cepa EBCAe10 en condiciones de riego bajo ( $P=0.0036$ ).

Solo en el tomatillo se encontró un aumento en el número de hojas en los tratamientos inoculados, en condiciones de riego bajo, tanto la cepa EBCAe10 y la cepa rbES061 presentaron un mayor número de hojas respecto al control. En condiciones de riego bajo la cepa EBCAe10 presentó un aumento respecto al control. En condiciones de invernadero, solo la cepa EBCAe10 reflejó un aumento en el número de hojas en el cultivo de chile en condiciones de riego bajo.

En cuanto a los parámetros morfométricas en el ensayo en invernadero, el ancho del tallo no presentó diferencias en el cultivo de chile en ninguno de los tratamientos, en el cultivo de tomate en condiciones de riego alto, ambas cepas aumentaron el ancho del tallo, siendo mayor el aumento en el tratamiento con la cepa rbES061 ( $p=0.0016$ ). Sin embargo, en condiciones de riego bajo solo la cepa EBCAe10 presentó un aumento en el tallo de las plantas.

En el número de frutos, peso de frutos y el número de flores, solo se observaron diferencias en el cultivo de tomate, ya que este cultivo tiene un desarrollo mucho más rápido en comparación al chile. Respecto al número de flores, se observaron resultados contrarios en condiciones de riego bajo y alto. En condiciones de riego alto las plantas inoculadas con la cepa rbES061 mostraron mayor número de flores en el cultivo del tomate ( $p=0.0125$ ), mientras que en condiciones de riego el mismo efecto se observó con la cepa EBCAe10.

En cuanto al número de frutos y su peso, no se observaron diferencias significativas en los tratamientos. Sin embargo, también se debe tener en cuenta que este ensayo duró dos meses, tiempo insuficiente

para evaluar la producción del cultivo del tomate, por lo que el número de flores se consideró un mejor parámetro para calcular el impacto de la inoculación en la capacidad productiva de la planta.

Uno de los resultados más notorios en este trabajo fue la diferencia de colonización de las plantas en el ensayo en cámara de crecimiento comparado con el de invernadero que pueden explicarse por las diferencias en las condiciones usadas. Por lo que, al momento de inocular las plantas de tomate y chile, las cepas tenían que adaptarse y competir contra una comunidad bacteriana ya establecida en el sustrato, lo cual no ocurría en el ensayo in vitro con *Arabidopsis* ni en el ensayo en cámara de crecimiento

Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado por Delgado-Ramírez et al., 2021, y Corral-Federico, 2021, no se encontraron diferencias para la cepa EBCAe10, ya que esta principalmente promovió el aumento del peso seco de raíz, y no hubo diferencia significativa en las otras variables medidas (Corral-Federico, 2021). De manera interesante la cepa rbES061 aumentó todas las variables morfométricas evaluadas en un estudio previo en tomate (Delgado-Ramírez et al., 2021). Las diferencias observadas pueden deberse a la forma de inoculación empleada. En ese trabajo la inoculación se hizo por inmersión de 10 s en un cultivo de  $2 \times 10^4$  UFC/ml, seguida de una segunda inoculación con 20 ml del inóculo 8 días después; se utilizó como sustrato turba estéril y no había un volumen de riego definido. Mientras que, en este trabajo, en el ensayo de invernadero además de turba se utilizó arena de río sin esterilizar, se hicieron dos inoculaciones de 1 ml al suelo a una concentración de  $1 \times 10^6$  y con 15 días de diferencia, y además los riegos eran de un volumen fijo. Por lo que es probable que no haya habido una buena colonización de la cepa.

A pesar de que se esperaba que la cepa rbES061 tuviera un mayor efecto por lo mencionado anteriormente, en este experimento fue la cepa EBCAe10 la que tuvo un mayor rango de colonización y de promoción de crecimiento, sobre todo en condiciones de riego bajo que es donde se observaron principalmente los aumentos en comparación del control. Esto podría deberse a las condiciones a las que está adaptada esta cepa, la cual fue aislada del ejido San Lucas en BCS, donde las temperaturas llegan a los 40 °C y se observan lluvias de entre 180 mm -250 mm al año (Gámez et al., 2012).

En rizosfera ambas cepas lograron establecerse en los diferentes cultivos, sin embargo, la cepa EBCAe10 colonizó mejor y fue la única que logró colonizar de manera endófito los diferentes cultivos. A pesar de que la cepa EBCAe10 tuvo buenos resultados de colonización, en cuanto a la promoción de crecimiento no se observaron diferencias entre los diferentes cultivos y condiciones de riego. De igual forma se necesita

hacer ensayos durante periodos más largos para evaluar si tienen un efecto en la producción de fruto y promover la colonización por inmersión de la semilla en la suspensión bacteriana.

Al final los resultados mostraron que ambas cepas se establecieron en los tres cultivos en cámara de crecimiento, en ambas condiciones de riego (a excepción de la cepa rbES061 en tomatillo riego alto) y que en general no se observó una disminución de la colonización en condiciones de riego bajo. En condiciones de invernadero los resultados de colonización fueron mucho menos homogéneos. Esta observación sugiere que a pesar de que estas bacterias con características de promoción de crecimiento fueron aisladas de una planta de la familia solanácea, no necesariamente tienen un efecto al ser aplicadas en otras solanáceas. No todas las PGPB tienen efectos predecibles y generalizables a todos los hospederos, a pesar de que las bacterias sean aisladas en de plantas relacionadas filogenéticamente a la que se quiere aplicar (Long et al., 2008). La relación entre la colonización bacteriana de distintas cepas, en diferentes condiciones de riego y diferentes hospederos es muy compleja y tiene muchas variaciones, como se pudo observar en este trabajo. Como lo indican los resultados las bacterias aisladas de una Solanacea silvestre mantuvieron la capacidad de establecerse en la rizófera de diferentes Solanaceas domesticadas bajo diferentes condiciones de riego. Sin embargo, alguna de las actividades que se pueden realizar para asegurar su establecimiento y la promoción del crecimiento vegetal es hacer aplicaciones con una mayor concentración de UFC/ml o realizar la inoculación de las cepas de manera regular y periódica.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Ambas cepas, de manera aislada o en consorcio, promovieron el crecimiento y formación de órganos en condiciones in vitro en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, en el ensayo de compuestos volátiles se encontró que, las cepas EBCAe10 y rbES061 afectan el desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Por otra parte, en los ensayos de colonización se observó que las cepas EBCAe10 y rbES061 tienen la capacidad de establecerse en la rizosfera de plantas de tomate, chile y tomatillo en cámara de crecimiento, en condiciones de riego bajo. En el caso del ensayo en condiciones de invernadero, al ser menos favorables y presentar más competencia con otras bacterias ya establecidas, las cepas PGPB tuvieron una colonización menos homogénea en la rizosfera. Solo la cepa EBCAe10, la cual es un aislado endófito, logró colonizar de manera endófitas las plantas de tomate, chile o tomatillo. Se sugiere investigar el uso del consorcio con las dos cepas (EBCAe10 y rbES061), porque en condiciones in vitro con plántulas de *Arabidopsis* el consorcio obtuvo muy buenos resultados. Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo se puede determinar que no existe una relación clara entre el nivel de colonización y la promoción de crecimiento vegetal.

## Literatura citada

---

- Artiguenave, F., Vilaginès, R., and Danglot, C. 1997. High-efficiency transposon mutagenesis by electroporation of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 153(2), pp. 363–369. doi: 10.1016/S0378-1097(97)00275-9
- Augé-Gouillou, C. 2013. Transposons. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 7, pp. 166–169. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01574-6
- Babalola, O. O. 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), pp. 879–886. doi: 10.5897/AJB2003.000-1127
- Beltrán Pineda, M. E. 2015. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), pp. 101. doi: 10.21930/rcta.vol15\_num1\_art:401
- Blom, D., Fabbri, C., Connor, E. C., Schiestl, F. P., Klauser, D. R., Boller, T., Eberl, L., and Weiskopf, L. 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*, 13(11), pp. 3047–3058. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x
- Bojórquez, A., Gutiérrez, A., García, C., Báez, J. R. C., Ángel, Miguel Sánchez, Apodaca Gerardo, L., and Nava, E. N. P. 2010. BIOFERTILIZANTES EN EL DESARROLLO AGRÍCOLA DE MÉXICO. *Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*, 6, pp. 51–56. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46112896007.pdf>
- Brilli, F., Pollastri, S., Raio, A., Baraldi, R., Neri, L., Bartolini, P., Podda, A., Loreto, F., Maserti, B. E., and Balestrini, R. 2019. Root colonization by *Pseudomonas chlororaphis* primes tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants for enhanced tolerance to water stress. *Journal of Plant Physiology*, 232(October 2018), pp. 82–93. doi: 10.1016/j.jplph.2018.10.029
- Chandra, S., Askari, K., and Kumari, M. 2018. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. Academy of Scientific Research & Technology*, 16(2), pp. 581–586. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.09.001
- Chávez-Díaz, I. F., Zelaya Molina, L. X., Cruz Cárdenas, C. I., Rojas Anaya, E., Ruíz Ramírez, S., and De los Santos Villalobos, S. 2020. Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agrobiotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), pp. 1423–1436. doi: 10.29312/remexca.v11i6.2492
- Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G. M., Ramaraj, G. B., Ponnusamy, P., Sekar, J., and Vaiyapuri Ramalingam, P. 2019. Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. *Biological Control. Elsevier*, 129(July 2018), pp. 55–64. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.07.002
- Choi, K. and Schweizer, H. P. 2006. *mini-Tn 7 insertion in bacteria with single att Tn 7 sites: example Pseudomonas aeruginosa*. 1(1), pp. 153–161. doi: 10.1038/nprot.2006.24

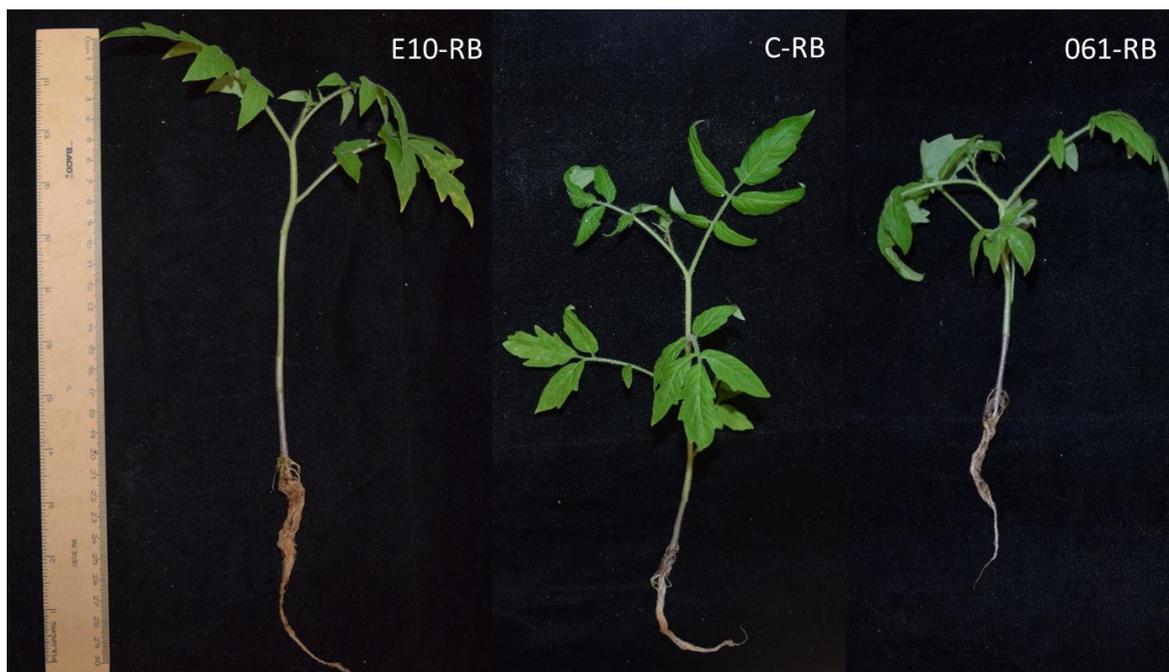
- Chung, J. hui, Song, G. C., and Ryu, C. M. 2016. Sweet scents from good bacteria: Case studies on bacterial volatile compounds for plant growth and immunity. *Plant Molecular Biology*. Springer Netherlands, 90(6), pp. 677–687. doi: 10.1007/s11103-015-0344-8
- Corral-Federico, A. G. 2021. Bioprospección y caracterización de bacterias endófitas de *Solanum hindsianum* como promotoras de crecimiento vegetal en solanáceas de interés agrícola en Baja California. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California Tesis de Maestría. Recuperada el 25 de marzo de 2022 [https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3628/1/tesis\\_Ana\\_Guadalupe\\_Corral\\_Federico\\_25 oct 2021.pdf](https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3628/1/tesis_Ana_Guadalupe_Corral_Federico_25_oct_2021.pdf)
- Delgado-Ramírez, C. S., Hernández-Martínez, R., and Sepúlveda, E. 2021. Rhizobacteria Associated with a Native Solanaceae Promote Plant Growth and Decrease the Effects of *Fusarium oxysporum* in Tomato. *Agronomy*, 11(3), pp. 579. doi: 10.3390/agronomy11030579
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., and Glick, B. R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 106(1), pp. 85–125. doi: 10.1007/s10482-013-0095-y
- Dutta, S. and Podile, A. R. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), pp. 232–244. doi: 10.3109/10408411003766806
- Ease, R. 2013. Soil science comes to life. *Nature*, 501, pp. 18–19. doi: <https://doi.org/10.1038/501S18a>
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Khan, M. R., Tareen, A. K., Khan, A., Ullah, A., Ullah, N., and Huang, J. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, 75(2), pp. 391–404. doi: 10.1007/s10725-014-0013-y
- Gámez, A. E., Geiger, A., Ivanova, A., Trasviña, A., Muhlia, A., Breceda, A., Lluch, D., Romero, E., Reyes, H., Wurl, J., Angeles, M., Cariño, M., Arizpe, O., Lluch, S., Díaz, S., Gamez, A., Geigner, A., De la Toba, D., Diaz, S., and Zenteno, T. 2012. Plan Estatal de Acción ante el Cambio Climático para Baja California Sur. [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/35983367/PEACC\\_BCS-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1668492828&Signature=ee9eb9oNJDtRfF3d2OmbFH2xJsucP6Q~yQ-7QwJmyNypFMdu8M~pzLKu6A~2oYLW3fkZjKpINyiZnBbHIFqne7HBISXpB1eYizkgxo9JD6ZtX5EqQ0z2UPppZ0idTjHJFohKpGHvI9K18ghEBn](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/35983367/PEACC_BCS-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1668492828&Signature=ee9eb9oNJDtRfF3d2OmbFH2xJsucP6Q~yQ-7QwJmyNypFMdu8M~pzLKu6A~2oYLW3fkZjKpINyiZnBbHIFqne7HBISXpB1eYizkgxo9JD6ZtX5EqQ0z2UPppZ0idTjHJFohKpGHvI9K18ghEBn)
- Garbeva, P. and Weiskopf, L. 2020. Airborne medicine: bacterial volatiles and their influence on plant health. *New Phytologist*, 226(1), pp. 32–43. doi: 10.1111/nph.16282
- Glick, B. R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., and Venkateswarlu, B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), pp. 1231–1240. doi: 10.1007/s11274-010-0572-7
- Hassani, M. A., Durán, P., and Hacquard, S. 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*. *Microbiome*, 6(1):58, pp. 902–902. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>  
REVIEW

- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., and He, S. Y. 2014. Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*. The Authors. All rights reserved., 7(8), pp. 1267–1287. doi: 10.1093/mp/ssu049
- Jha, C. K. and Sara, M. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Agricultural Research and Development*, 5(2), pp. 0108–0119. doi: 10.1006/rwgn.2001.1636
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., and Maffei, M. E. 2015. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAR). doi: 10.3389/fpls.2015.00151
- Kloepper, J. W. and Beauchamp, C. J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(12), pp. 1219–1232. doi: 10.1139/m92-202
- Knapp, S., Sagona, E., Carbonell, A. K. Z., and Chiarini, F. 2017. A revision of the *Solanum elaeagnifolium* clade (*Elaeagnifolium* clade; subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae). *PhytoKeys*, 2017(84), pp. 1–104. doi: 10.3897/phytokeys.84.12695
- Kumar, A. and Verma, J. P. 2018. Does plant — Microbe interaction confer stress tolerance in plants : A review ? *Microbiological Research*. Elsevier, 207(October 2017), pp. 41–52. doi: 10.1016/j.micres.2017.11.004
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., and De la Cruz, F. 2002. Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, 45(1), pp. 1–8. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x
- Long, H. H., Schmidt, D. D., and Baldwin, I. T. 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS ONE*, 3(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002702
- Lopes, L. D., Pereira e Silva, M. de C., and Andreote, F. D. 2016. Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2016.01341
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L., and Bloemberg, G. V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39(1), pp. 461–490. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.461
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vignani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A. F., El-Beairy, U. A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., and Daffonchio, D. 2012. A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0048479
- McClintock, B. 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(6), pp. 344–355. doi: 10.1073/pnas.36.6.344
- Méndez-Bravo, A., Cortazar-Murillo, E. M., Guevara-Avenidaño, E., Ceballos-Luna, O., Rodríguez-Haas, B., Kiel-Martínez, A. L., Hernández-Cristóbal, O., Guerrero-Analco, J. A., and Reverchon, F. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLoS ONE*, 13(3), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0194665

- Menese, C. H. S. G. , Rouws, L. F. M., Simões-Araújo, J. L., Vidal, M. S., and Baldani, J. I. 2011. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12), pp. 1448–1458. doi: 10.1094/MPMI-05-11-0127
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., and Collier, S. M. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, 57(4), pp. 1159–1181. doi: 10.1002/tax.574010
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., and Dowling, D. N. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2015.00745
- Palleroni, N. J. 2015. *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01210
- Pérez-Rodríguez, M. M., Piccoli, P., Anzuay, M. S., Baraldi, R., Neri, L., Taurian, T., Lobato Ureche, M. A., Segura, D. M., and Cohen, A. C. 2020. Native bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. increase tomato seedling growth under a reduced fertilization regime. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-72507-4
- Peters, J. E. and Craig, N. L. 2001. Tn7: Smarter than we thought. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), pp. 806–814. doi: 10.1038/35099006
- Prashar, P., Kapoor, N., and Sachdeva, S. 2014. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1), pp. 63–77. doi: 10.1007/s11157-013-9317-z
- Ramey, B. E., Koutsoudis, M., Bodman, S. B. V., and Fuqua, C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), pp. 602–609. doi: 10.1016/j.mib.2004.10.014
- Rivera-Conde, M. I., Aranda-Ocampo, S., Carrillo-Castañeda, G., Gijón-Hernández, A. R., and Bueno-Aguilar, G. M. 2018. Effect of fluorescent *Pseudomonas* on seed germination and vigor of tomato seedlings. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 24(2). doi: 10.5154/r.rchsh.2017.06.023
- Sauer, M., Robert, S., and Kleine-Vehn, J. 2013. Auxin: Simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), pp. 2565–2577. doi: 10.1093/jxb/ert139
- Schlechter, R. O., Jun, H., Bernach, M., Oso, S., Boyd, E., Muñoz-Lintz, D. A., Dobson, R. C. J., Remus, D. M., and Remus-Emsermann, M. N. P. 2018. Chromatic bacteria – A broad host-range plasmid and chromosomal insertion toolbox for fluorescent protein expression in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2018.03052
- Schlechter, R. and Remus-Emsermann, M. 2019. Delivering “Chromatic Bacteria” Fluorescent Protein Tags to Proteobacteria Using Conjugation. *Bio-Protocol*, 9(7), pp. 1–19. doi: 10.21769/bioprotoc.3199
- Sepúlveda, E. A. 2008. La transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de rhizobium etli es modulada por medio de interferencia transcripcional y represión. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Doctorado consultada en noviembre de 2021 de: [http://132.248.9.195/ptd2008/noviembre/0635712/0635712\\_A1.pdf](http://132.248.9.195/ptd2008/noviembre/0635712/0635712_A1.pdf)

- SIAP. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. In Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (Vol. 1). doi: 10.1111/resp.12002
- SIAP. 2020. Panorama agroalimentario 2020. In Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (Vol. 4, Issue 3). <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/11/Atlas-Agroalimentario-2020.pdf>
- Singh, D. P., Singh, H. B., and Prabha, R. 2016. *Pseudomonas fluorescens* : A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (1st ed.). doi: 10.1007/978-81-322-2647-5
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), pp. 425–448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. 1997. Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE. *Society*, 9(November), pp. 1963–1971. doi: 10.1105/tpc.9.11.1963
- Weese, T. L. and Bohs, L. 2007. A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 32(2), pp. 445–463. doi: 10.1600/036364407781179671
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), pp. 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- Weise, T., Kai, M., and Piechulla, B. 2013. Bacterial Ammonia Causes Significant Plant Growth Inhibition. *PLoS ONE*, 8(5), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0063538

## Anexos



**Figura 30.** Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego bajo en plantas de tomate. En la imagen se muestran la cepa EBCAe10, control y la cepa rbES061 respectivamente.



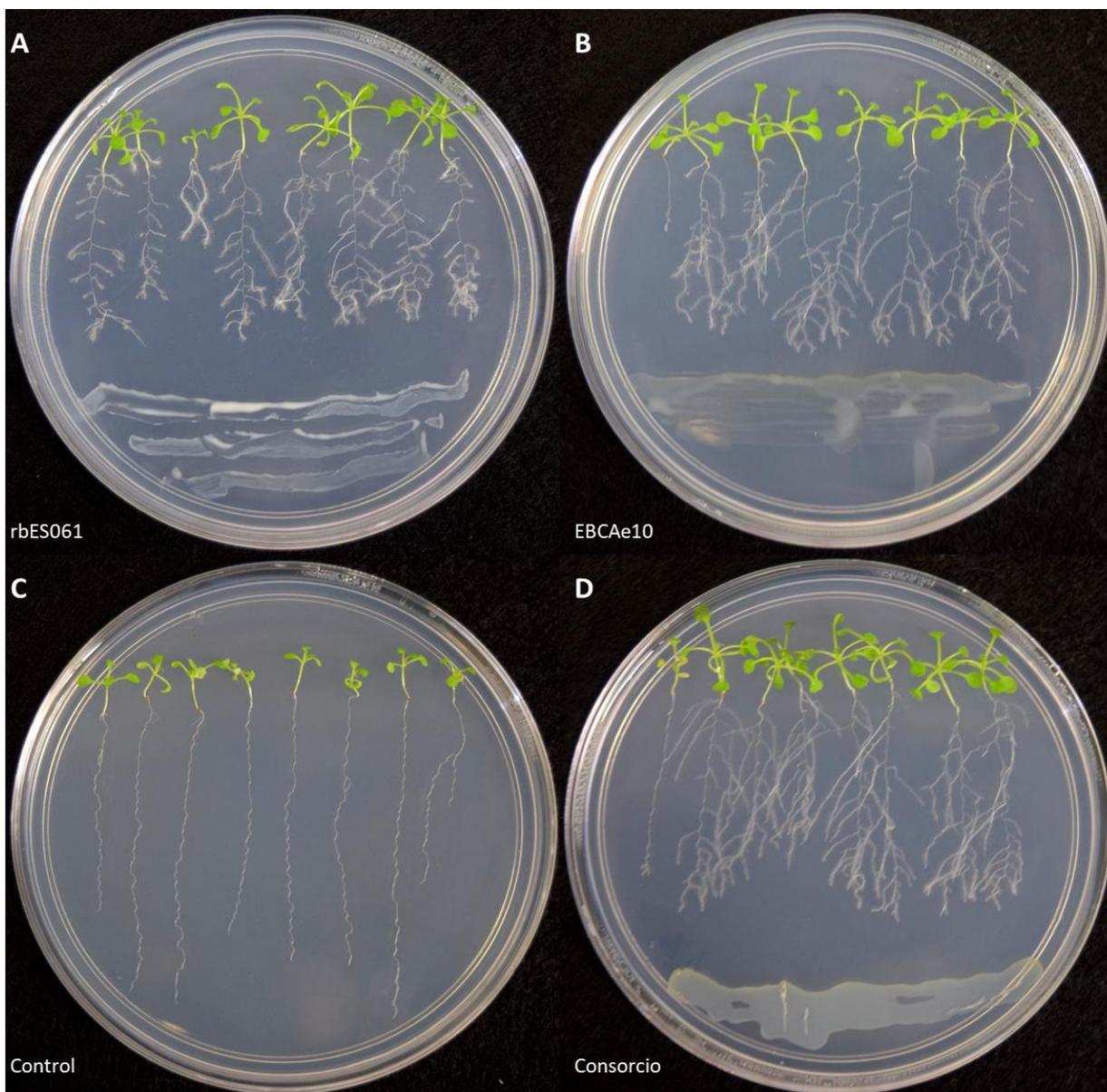
**Figura 31.** Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego alto en plantas de tomate. En la imagen se muestran la cepa rbES061, control y la cepa EBCAe10 respectivamente.



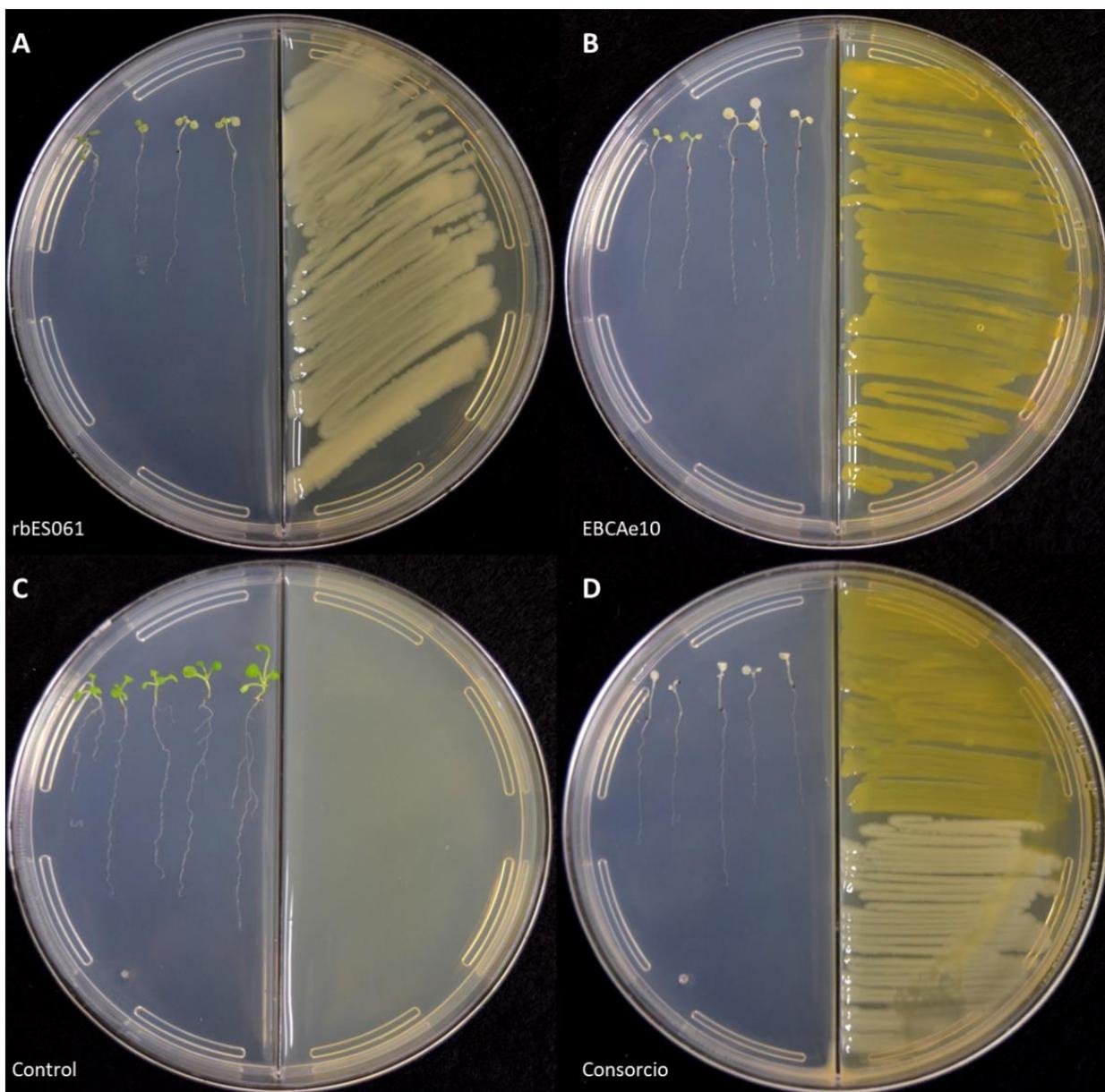
**Figura 32.** Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego alto en plantas de Chile. En la imagen se muestran la cepa rbES061, control y la cepa EBCAe10 respectivamente.



**Figura 33.** Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de los aislados bacterianos bajo condiciones de riego bajo en plantas de Chile. En la imagen se muestran la cepa rbES061, control y la cepa EBCAe10 respectivamente.



**Figura 34.** Ensayo de interacción planta-bacteria por compuestos difusibles. Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea *DR5::gus* en cajas Petri con medio MS. En la figura la figura A: cepa rbES061, B: cepa EBCAe10, la C: control y la figura D: consorcio.



**Figura 35.** Ensayo de interacción planta-bacteria por compuestos volátiles. Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* línea DR5::*gus* en cajas Petri con medio MS. En la figura la figura A: cepa rbES061, B: la cepa EBCAe10, la C el control y la figura D: el consorcio.