

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



***“Activación del microbioma endófito de banano Cavendish por tierras raras,
bacterias endófitas y de suelo.”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Ileana Olmos Arriaga

Director de tesis: Dr. Benjamín Valdez Salas

Co-director: Dr. Miguel Juan Beltrán García

Mexicali, B. C., agosto del 2022

Índice

Capítulo 1	12
1.1 Introducción	13
1.2 Justificación	17
1.3 Hipótesis.....	19
1.4 Objetivo general.....	19
1.5 Objetivos específicos	19
Capítulo 2	20
2.1 Antecedentes	21
Banana: importancia en la seguridad alimentaria	21
Condiciones de estrés que afectan el cultivo de banana.....	23
Microbioma de las plantas de banana.	28
Microbioma endófito.....	29
Bacterias del suelo en banana y como la fertilización perturba el equilibrio de los endófitos y los microorganismos del suelo.	31
Microorganismos Keystone o piedras angulares en el microbioma.....	32
Hipótesis asociadas al rescate de las plantas bajo condiciones de estrés.	33
Tierras raras: química, biología e importancia en la agricultura.....	38
Capítulo 3	44
3.1 Materiales	45
Medios de cultivo	45
Equipo de laboratorio	45
Reactivos	45
3.2 Metodología	46
Material biológico	46
Plantas y su origen.....	47
3.2.1 Crecimiento y determinación de UFC aplicadas en los tratamientos.....	47
3.2.2 Ajuste de la población bacteriana para el inoculo inicial.....	47

3.2.3 Inoculación de medios en harina de soya comercial.	47
3.2.4 Diluciones seriadas y medición de absorbancia.	48
3.2.5 Determinación de la curva crecimiento bacteriano por enumeración de las unidades formadoras de colonias (UFCs) por diluciones seriadas y plaqueo	48
3.2.6 Adaptación de las plantas antes de la inoculación de bacterias y la aplicación de las tierras raras.....	48
3.2.7 Tratamiento de las plantas.....	49
3.2.8 Determinación de parámetros de crecimiento en plantas tratadas.	50
3.2.9 Recuperación y enumeración de las bacterias endófitas activadas.	50
3.2.10 Identificación de bacterias aisladas recuperadas de los tejidos internos tratados con bacterias y tierras raras por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	52
3.2.11 Pruebas agronómicas.....	53
3.2.12 Pruebas de antagonismo e inhibición con hongos y bacterias patógenas.	58
Capítulo 4.....	60
4.1 Resultados	61
4.1.1 Determinación de la cinética de crecimiento y de UFC de bacterias endófitas aplicadas en las plantas de banana.	61
4.1.2 Efecto en el crecimiento de las plantas de banana por la aplicación de bacterias endófitas y lantánidos.....	63
4.1.3 Contenido de UFCs en tejidos de plantas tratadas después de 5, 10, 15 y 20 semanas de aplicaciones de los tratamientos químicos y biológicos	70
4.1.4 Análisis de la diversidad filogenética (taxonómica) de los aislados cultivables derivados de los tratamientos biológicos y químicos.....	73
4.1.5 Antagonismo e inhibición de hongos y bacterias patógenas.....	84
4.2 Discusión.....	89
4.2.1 Estandarización del tratamiento biológico y químico	90
4.2.2 Determinación del efecto en el crecimiento de las plantas.	92
4.2.3 Evaluar la colonización de las bacterias al cuantificar el contenido de bacterias internalizadas después de 5, 10,y 15 semanas de aplicación	93

4.2.4 Identificación de la diversidad del microbioma activado por tratamientos biológicos y químicos.....	95
4.2.5 Análisis de la diversidad funcional de las bacterias endófitas	101
4.2.6 Antagonismo e inhibición	103
4.3 Conclusión.....	105
Referencias	107
Anexos	120

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentaje de producción por país de banano a nivel mundial en el año 2018 basado en 88'304,335 toneladas (FAO, 2018).....	21
Tabla 2. Bacterias endófitas del banano y su función como promotoras del crecimiento. .	30
Tabla 3. Uso de tierras raras en diferentes tipos de plantaciones comerciales y sus efectos.	41
Tabla 4. Número de lote y especificaciones de los tratamientos para las plantas, en el lote 2 de plantas. En este ensayo se añadió un lote extra que incluía la aplicación de una bacteria comercial.	49
Tabla 5. Valoración de las pruebas agronómicas promotoras del crecimiento de plantas..	57
Tabla 6. Resultados de las pruebas de antagonismo de las bacterias endófitas activadas por <i>B. velezensis</i> ante <i>Kosakonia cowanii</i> aisladas de agave y cepas de hongos fitopatógenos (M2) de mango, 6octDC4 de coco y <i>Phytophthora cinnamoni</i> (<i>P. cinna</i>) un hongo patógen	86

Índice de figuras

Figura 1. Planta de banana afectada por la sequía. Se observa la pérdida de la turgencia en las hojas. Este es un estrés que va siendo común en las plantaciones debido a los cambios en la frecuencia y cantidad de lluvia.	24
Figura 2. Plantas dañadas por <i>Fusarium oxysporum cubense</i> , raza 4, agente causal del mal de Panamá (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020)..	26
Figura 3. Hoja banana Cavendish enano gigante con lesiones causadas por <i>Pseudocercospora fijiensis</i> el hongo causal de la Sigatoka negra.	27
Figura 4. Representación gráfica del “Cry for help” en las plantas en respuesta a la tensión abiótica y biótica y el auxilio de microorganismos en la rizosfera (ver explicación en el texto).	36
Figura 5. Tabla periódica con los elemento lantánidos remarcados en café. Incluyen elementos desde el número atómico 57 hasta el 71, empezando por Lantano, Cerio, pPraseodimio, Neodimio, Prometio, Samario, Europio, Gadolinio, Terbio, Disprobio, Holmio, Erblio, Tulio, Iterbio y Lutecio.	38
Figura 6. Secciones de tejido de las plantas de banana que fueron colectadas para la enumeración. aislamiento y caracterización funcional de bacterias endófitas post-tratamiento.	51
Figura 7. Protocolo del lavado de plantas para eliminar microorganismos epifitos y recuperar los microorganismos endófitos activados de las plantas tratadas y el control.	51
Figura 8. Esquema de la metodología para la extracción y análisis de proteínas ribosomales bacterianas usando espectrometría de masas MALDI-TOF.	52
Figura 9. Características de las pruebas de funcionalidad agronómica consideradas positivas y negativas en los diferentes medios utilizados. a) proteasas, b) NBrip, c) sideróforos, d) ACC deaminasa, e) auxinas y f) NFB	57
Figura 10. Cinética de crecimiento (Log_{10}) de 4 bacterias inoculadas en medio de cultivo harina de soya 1% + 0.1% MgSO_4 adicionado con harina de jaiba (0.1%) a las 16 horas. La tabla insertada en la figura muestra los numeros de UFC’s alcanzados en el cultivo durante 20 horas de incubación.	62

Figura 11. Comportamiento en los parámetros de crecimiento de plantas de banana Cavendish inducidos por la aplicación de bacterias y tierras raras desde la semana 0 hasta la semana 15. En este análisis se observan diferencias entre lotes de tratamiento (letras minúsculas) y las diferencias a través del tiempo de cada tratamiento (letras mayúsculas).	65
Figura 12. Aspecto del crecimiento aéreo de plantas con tratamientos químicos y biológicos después de 15 semanas. Las plantas tratadas con las bacterias endófitas C2 y P1vb presentaron el mayor crecimiento aéreo. Por otra parte las plantas con menor crecimiento fueron tratadas con <i>B. oceanisediminis</i> , agua y NPK.	66
Figura 13. Influencia de los tratamientos químicos y biológicos sobre el crecimiento de las raíces. Los tratamientos con nitrato de lantano y P1vb, muestran la mayor inducción en el crecimiento de la masa radicular.	68
Figura 14. Comportamiento de la formación de raíces (número de raíces totales para cada tiempo) desde el tiempo 0 hasta la semana 15. Se observa que el mayor número de raíces formadas se presenta en el tratamiento con nitrato de lantano.	69
Figura 15. Número de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) de plantas tratadas desde el tiempo 0 hasta las semanas 0, 5, 10 y 15. El comportamiento entre tratamientos es variable.	72
Figura 16. Comparativo de la diversidad taxonómica a nivel de filo y clase de las bacterias identificadas en las plantas bajo diferentes tratamientos durante 15 semanas. La composición taxonómica fue dinámica y tuvo cambios drásticos entre los mismos tratamientos por semana.	76
Figura 17. Diversidad del bacterioma activado (género y especie) en plantas de banana de acuerdo al tratamiento y la semana de aislamiento. Los generos fueron distribuidos principalmente entre <i>Bacillus</i> (Firmicutes), <i>Pseudomonas</i> (Gammaproteobacteria), <i>Paenibacillus</i> (Firmicutes) y <i>Lactobacillus</i> (Firmicutes).....	79
Figura 18. Mapa de calor representativo de los valores porcentuales de la pruebas de funcionalidad del bacterioma aislado en los tratamientos de plantas. El incremento en el tono de morado representa un mayor rango de porcentaje de bacterias positivas a las pruebas agronómicas durante las semanas de tratamiento.	84
Figura 19. Actividad antagónica de cepas endófitas recuperadas de plantas tratadas con <i>B. velezensis</i> (P1vb). La mayor actividad antagónica fue ejercida por <i>B. amyloliquefaciens</i> . La	

formación de halos de inhibición derivados del co-cultivo en algunas de las cepas endófitas sugieren que la inoculación de P1Vb activa un microbioma con capacidades de control antimicrobiano en bacterias diferentes al inductor..... 85

Figura 20. Comportamiento antifúngico de las cepas endofitas recuperadas del microbioma activado por *B. velezensis*. Se encontro que las cepas de *B. amyloliquefaciens* son las que mayor efecto de inhibicion tuvieron contra las tres cepas de hongos fitopatógenos. 88

Figura 21. Comportamiento temporal de los géneros bacterianos aislados de las plantas de banano entre los diferentes tratamientos. En los tratamientos no biológicos se observa que el cambio más drástico en el número de cepas que correlaciona con la diversidad ocurre en la semana 10..... 100

Índice de anexos

Anexo 1. Diferencial del crecimiento (altura de tallo, ancho de tallo, número de hojas, número de raíces, peso fresco y peso seco) conforme el paso de las semanas 0-5, 5-10 y 10-15, dependiendo del tratamiento.	120
Anexo 2. Microscopía (10X) de las raíces con tinciones DAB + azul de anilina 1% en los diferentes tratamientos.	121
Anexo 3. Número de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) en el lote 1 de plantas en la semana 0, 10, 15 y 20.....	124
Anexo 4. Gráfico representativo de los filos encontrados en los tratamientos y en el paso de las semanas.....	127
Anexo 5. Cuadro representativo de la funcionalidad del microbioma aislado en cada tratamiento del lote uno de plantas, cada tono de morado representa un rango de porcentaje de bacterias que dieron positivos a las pruebas en las diferentes semanas de tratamiento.	129
Anexo 6. Inhibición de las bacterias aisladas del tratamiento con <i>Bacillus velezensis</i> contra la bacteria patógena <i>Kosakonia cowanii</i>	130
Anexo 7. Inhibición de 40 bacterias aisladas del tratamiento con <i>Bacillus velezensis</i> contra hongo patógeno de mango.....	131
Anexo 8. Inhibición de las 40 bacterias aisladas de P1vb contra hongo patógeno de coco.	132
Anexo 9. Inhibición de 22 bacterias aisladas de tratamiento de P1vb contra hongo patógeno de aguacate.	133
Anexo 10. Bacterias identificadas y no identificadas en las diferentes semanas.....	133

Resumen

En los últimos años se ha buscado tener una agricultura donde haya un menor uso de agroquímicos y se tengan diferentes opciones para la fertilización y la protección a la planta contra estrés biótico y abiótico, donde haya una mejor producción y mejor rendimiento de las plantas con interés comercial, sin poner en riesgo la fertilidad del suelo de las plantaciones. El uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal ha sido una de las opciones que muchos científicos han recurrido e investigado por su ayuda a la asimilación de nutrientes y mejorar los cultivos, también se ha buscado usar lantánidos como promotores de crecimiento, donde se ha demostrado que tiene un efecto en raíces, así como mejora en los rendimientos.

En esta investigación se buscó el efecto de cloruro y nitrato de lantano, así como de bacterias endófitas, una comercial y una de suelo para ver el efecto de promoción de crecimiento en plantas de banano, en la morfología de la planta así como en la morfología de la raíz. Durante el desarrollo de la investigación se observó la activación del microbioma endófito de la planta de banano, al hacer el análisis de la activación se puede entender la funcionalidad y el cómo las bacterias activadas ayudan a la planta a sobrellevar el estrés biótico como abiótico al que pueda estar sometida, lo que puede ser una estrategia para permitir a la planta sobrellevar el efecto del cambio climático y ataque de patógenos, dado que estos microorganismos activados pueden producir moléculas antibacterianas y antifúngicas haciendo que se inhiban las bacterias y hongos causantes de enfermedades en plantas de interés comercial.

En la tesis desarrollada se llevaron a cabo acercamientos de microbiología, bioquímica microbiana y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Abstract

In recent years, it has been sought to have an agriculture where there is less use of agrochemicals and there are different options for fertilization and protection of the plant against biotic and abiotic stress, where there is better production and better yield of plants with interest commercial, without putting at risk the fertility of the soil of the plantations. The use of plant growth promoting bacteria has been one of the options that many scientists have resorted to and investigated for their help in the assimilation of nutrients and improve crops, it has also been sought to use lanthanides as growth promoters, where it has been shown that It has an effect on roots, as well as improving yields.

In this investigation, the effect of lanthanum chloride and nitrate, as well as endophytic bacteria, one commercial and one soil bacteria, was sought to see the effect of promoting growth in banana plants, in the morphology of the plant as well as in the morphology from the root. During the development of the research, the activation of the endophytic microbiome of the banana plant was demonstrated. By analyzing the activation, it is possible to understand the functionality and how the activated bacteria help the plant to cope with biotic and abiotic stress. be subjected, which may be a strategy to allow the plant to cope with the effect of climate change and attack by pathogens, since these activated microorganisms can produce antibacterial and antifungal molecules, inhibiting the bacteria and fungi that cause diseases in plants. commercial interest.

In the developed thesis, microbiology, microbial biochemistry and MALDI-TOF mass spectrometry approaches were carried out.

Capítulo 1

Introducción

Justificación

Hipótesis

Objetivo general

Objetivo específicos

1.1 Introducción

En la actualidad, la agricultura es una de las actividades del hombre que más contamina el medio ambiente, principalmente por el uso de fertilizantes nitrogenados y pesticidas químicos. Este tipo de prácticas ha causado la pérdida de diversidad microbiana en los suelos, lo cual influye en la fertilidad de los mismos, la contaminación del agua subterránea por nitrógeno, así como un impacto en el calentamiento global y el cambio climático (Beltrán-García *et al.*, 2021; Grageda, *et al.*, 2012). Por otra parte, con el incremento que se prevé de la población en los próximos años de hasta 2.5 billones de personas en 2050, la agricultura también debe de incrementar su producción. Esto representa un gran reto debido a que cada vez hay menos tierras cultivables y fértiles debido a la sobreexplotación a través de los años del suelo, por lo que se tiene que encontrar una estrategia en la que los cultivos tengan mayor producción, bajo un esquema de fertilizantes caros y que las plantas sean eficientes en la toma de nutrientes y el agua. (FAO, 2009)

Por otro lado, el cambio climático ha traído consecuencias como el aumento de temperatura, cambios en el patrón de lluvias, disminución de la calidad de los cultivos y un cambio en la dinámica de las asociaciones que hay entre las plantas y microorganismos (Abba, 2022). Este tipo de cambios afectan la agricultura negativamente en la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas, ya que están compuestas por microorganismos que tienen diferentes tolerancias térmicas y tasas de crecimiento, con modificaciones en las estructuras microbianas por ejemplo, se ha observado un aumento en la proporción de hongos a bacterias. (DeAngelis, *et al.*, 2015)

Otros efectos que se observan ligados al cambio climático es el aumento de las plagas de insectos, hongos y bacterias,. Estos factores hacen que los cultivos sean vulnerables (DeAngelis, *et al.*, 2015). Las modificaciones en el patrón de lluvias provocan que las plantaciones sufran de sequías o de inundaciones que causan estrés hídrico en las plantas, haciendo que haya una menor producción (Dubey, *et al.*, 2019).

Se ha determinado que el uso excesivo y prolongado de los fertilizantes nitrogenados modificó el valor del pH del suelo, así como la disponibilidad de nutrientes y la humedad (Beltrán-García *et al.*, 2021). Hemos observado una alteración en la diversidad y la

composición funcional del microbioma de los suelos, por lo que se tiene que aplicar con mayor frecuencia los fertilizantes químicos y en consecuencia los cultivos se vuelven dependientes (Bargett, *et al.*, 2014; Beltrán-García, *et al.*, 2021). Los cambios en la estructura de la comunidad microbiana del suelo también tienen un impacto en los procesos evolutivos, incluidos los patrones de selección natural en los rasgos de las plantas y las respuestas de las plantas al cambio ambiental (Bebber, *et al.*, 2022). Estudios metagenómicos muestran que hay diferencias de la diversidad de microorganismos funcionales entre suelos con fertilizantes nitrógenados (NPK) y un suelo fertilizado orgánicamente de hasta un 2.8% (Bebber, *et al.*, 2022).

La comunidad científica está en la búsqueda de una agricultura más amigable con el medio ambiente, donde se aplique una fertilización orgánica con microorganismos promotores del crecimiento vegetal, así como la fertilización química regulada, haciendo que la planta tenga una mejor absorción de nutrientes dado que los microorganismos ayuden para que sea más asimilable para la planta. Estos microorganismos utilizados en la agricultura sostenible son conocidos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Hafeez, *et al.*, 2006; Jiménez, *et al.*, 2022; Yankey, *et al.*, 2022). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, establecen relaciones favorables con las plantas que estimulan su crecimiento mediante mecanismos directos e indirectos. Entre estos, la fijación de nitrógeno atmosférico, la síntesis de ácidos orgánicos, modulación y síntesis de fitohormonas y la actividad de la ACC deaminasa. Algunos mecanismos indirectos incluyen la inhibición de patógenos, antibiosis por metabolitos secundarios, compuestos orgánicos volátiles y enzimas líticas (Jiménez, *et al.*, 2022).

En la actualidad, se sabe que las bacterias promotoras del crecimiento de plantas no solo son aquellas encontradas en la rizosfera, también se consideran a los microorganismos endófitos como parte de un microbioma funcional. Las bacterias endófitas, son microorganismos encontrados en diferentes tejidos de las plantas, en la región intercelular de estas y algunas veces se encuentran como endosimbiontes, su colonización provee grandes beneficios, las cuales ayudan a la nutrición de la planta, promueven el crecimiento y son fuente de nuevas moléculas, ayudan a la defensa de la planta contra patógenos, la diversidad y estructura del

microbioma endófito puede definir la salud de la planta. (Pious, *et al.*, 2009, Beltrán-García, *et al.*, 2021, Goswami, *et al.*, 2016).

Por otra parte, la comunidad científica en China en los últimos 50 años ha estado experimentando con un tipo de fertilización química que utiliza tierras raras o lantánidos. Las tierras raras son elementos químicos con diferentes propiedades magnéticas, eléctricas y ópticas, se han utilizado mucho en la industria electrónica y de alta tecnología (Kotelnikova, *et al.*, 2020). En la agricultura, se ha usado principalmente Lantano (La) y Cerio (Ce) . Estos elementos se han utilizado durante los últimos años en la agricultura y se ha demostrado que dependiendo del compuesto químico aplicado será el efecto que tendrá en el crecimiento de las plantas (Redling, 2006).

Existe poca información sobre los mecanismos por los cuales estas moléculas favorecen los cultivos. Algunos reportes muestran que en los cultivos de maíz con una aplicación de lantano y cerio en partes por millón, tuvieron un efecto en el crecimiento de raíz y un aumento en la productividad de los cultivos. Otro ejemplo es la soya roja, donde la aplicación de lantano ayudó a la deficiencia de fósforo, mejoró la fotosíntesis y disminuyó el estrés oxidativo (Zhengyi, *et al.*, 2004; Lian, *et al.*, 2019).

En un trabajo previo perteneciente a la tesis de licenciatura, titulado “Diversidad del bacterioma cultivable del suelo de una plantación bananera: identificación y selección con fines del desarrollo de un bioinoculante” (Olmos-Arriaga, 2020), analizamos la diversidad del bacterioma cultivable de un suelo de una plantación bananera, para poder marcar las diferencias de suelos perturbados y otra con baja aplicación de fertilizantes y pesticidas, como resultado encontramos diferencias en la diversidad del microbioma de los suelos y como esto influye en la salud de las plantaciones así como en la productividad. De ahí se aislaron algunas bacterias que son prometedoras como bioestimulantes y en la bioprotección. Sin embargo en el análisis de la literatura, se halló que existe un concepto actual que busca explicar cómo los microorganismos del suelo apoyan a las plantas cuando las plantas están sometidas a estrés biótico y abiótico, este fenómeno conocido como “cry for help” o pidiendo ayuda ocurre debido a la exudación de diferentes metabolitos a través de las raíces, dependiendo del tipo de estrés a la que este expuesta, se hace el “llamado de auxilio” a los

microorganismos de la rizosfera, comenzando así un reclutamiento que las ayuda a sobrevivir o minimizar el daño causado (Rizaludin, *et al.*, 2021).

Esto nos lleva a pensar en que estas mismas bacterias que fueron llamadas por la planta para ayudarla a sobrellevar el estrés, pueden ser internalizadas hacia la planta y por lo tanto, favorecer con lo que nosotros llamamos la activación del microbioma. A diferencia de nuestra propuesta, el cry for help, se basa en el reclutamiento de los microorganismos de la rizosfera, mientras que la activación del microbioma es la respuesta general o particular de los microorganismos que ya se encuentran dentro de la planta, ambas situaciones pasan cuando la planta está bajo un tipo estrés o incluso cuando aplicamos fertilizantes o agentes de control biológico (Beltrán-García, comunicación personal).

Durante muchos años en el laboratorio se ha investigado el efecto que tienen los microorganismos endófitos promotores del crecimiento vegetal en el crecimiento aéreo (ancho de tallo, alto de tallo y número de hojas) y de las raíces de las plantas. En esta investigación se analizó el efecto en el crecimiento de la planta y en el crecimiento de las raíces, en respuesta a la aplicación de bacterias endófitas (*Bacillus velezensis*, *Enterobacter cloacae*), bacterias del suelo (*Bacillus oceanisediminis*) y una cepa comercial, así como de las tierras raras (cloruro de lantano y nitrato de lantano) en las plantas de banana. Al valorar la colonización de las bacterias endófitas mediante un proceso de extracción de endófitos en diferentes tejidos, observamos que se aumentó la cantidad de bacterias, pero también hubo una diferencia en la diversidad del microbioma endófito. Por lo que también se analizó la respuesta de la planta a la aplicación de los lantánidos y se observó el mismo fenómeno. A partir de ahí, la investigación se enfocó en analizar exclusivamente la diversidad y funcionalidad de los microorganismos cultivables que son activados en respuesta a la aplicación de los inoculantes biológicos y químicos y poder relacionar esto con los efectos en la morfología de la planta en diferentes tejidos conforme el paso de las semanas.

1.2 Justificación

La agricultura es una de las principales causas antropogénicas del cambio climático, esto es dado el uso excesivo y sin rigor técnico de los agroquímicos como lo son fertilizantes, pesticidas e insecticidas, causando la contaminación de los suelos, agua y aire. Por otra parte, la agricultura es una de las actividades mayormente afectada por el cambio climático. La emisión de gases de efecto invernadero (CO_2 , CH_4 y N_2O) en especial el CH_4 y N_2O se emiten principalmente por las prácticas agrícolas. De manera particular, la agricultura contribuye con el 12% de los gases de efecto invernadero de origen antropogénico, por lo que los buenos manejos y las buenas prácticas en esta actividad ayudaran a limitar el calentamiento global (FAOSTAT, 2017).

Por otra parte, producto del cambio climático, el incremento de la temperatura ha afectado a los cultivos en su desarrollo, y predisponen a las plantas al ataque por plagas, afecta el potencial fotosintético, la acumulación de biomasa y la producción de los frutos. Debido al cambio climático, muchas zonas productoras del mundo experimentan sequía y alta salinidad en los suelos, haciendo que los suelos sean menos eficientes para soportar cultivos con buenos rendimientos para la demanda de los alimentos de la sociedad actual (Beltran-Garcia, *et al.*, 2021). Sabemos que bajo distintos acercamientos las bacterias endófitas y las tierras raras apoyan el crecimiento de las plantas. En los últimos años en el laboratorio hemos estudiado a las bacterias endófitas de diversos cultivos y se ha demostrado que ayudan en la asimilación y transformación de los nutrientes y hacen que las plantas soporten de mejor manera ambos tipos de estrés: el biótico (afectaciones por patógenos), como el abiótico (falta de nutrientes, sequía y salinidad). Mientras que las tierras raras han sido investigadas en plantaciones como la del maíz y se ha demostrado que su uso mejora el rendimiento y producción de las plantaciones. Pensamos que la utilización de estos componentes biológicos y químicos podran mejorar los cultivos influyendo en el uso de insumos, especialmente la disminución de la fertilización nitrogenada, al impactar en su asimilación, sin embargo tambien creemos que son potencialmente protectores de las plantas ante el estrés causado por el cambio climático, sin embargo desconocemos como la aplicación individual de las bacterias o en una mezcla, así como la aplicación de lantanidos influyen en el crecimiento de las plantas, en especial en el modelo de banana.

El desarrollo del presente trabajo basa su razón de ser en comprender como estos elementos químicos y biológicos afectan el crecimiento de las plantas. Sin embargo pensamos que tanto las bacterias como las tierras raras pueden estimular la activación del microbioma endófito en las plantas de banano. Pensamos que al hacer un análisis del microbioma cultivable post-aplicación, podremos tener un acercamiento del como y el por qué se activan los microorganismos en las plantas según su necesidad de nutrientes o estrés a la que fuese sometida. Al entender la diversidad de microorganismos activados y su funcionalidad podremos entender de cómo las bacterias o tierras raras apoyan que las plantas soporten algún tipo de tensión a la que pueda estar sometida y esto pueda ser una estrategia que permita la tolerancia de las plantas al efecto del cambio climático y a la disminución de los insumos que inducen el cambio climático.

1.3 Hipótesis

La aplicación de bacterias endófitas, del suelo y las sales de cloruro y nitrato de lantano soportan el desarrollo de las plantas en suelos limitados de nutrientes basados en la activación de un microbioma funcional endófito.

1.4 Objetivo general

Evaluar el efecto sobre el crecimiento de plantas de banano, así como en la activación del microbioma endófito por la aplicación periódica de tierras raras, bacterias endófitas y del suelo.

1.5 Objetivos específicos

- Determinar la cantidad de UFC de bacterias endófitas (C2 - *Enterobacter cloacae*, P1vb – *Bacillus velezensis*), comercial (F1N) y del suelo (109.1 – *Bacillus oceanisediminis*) que serán aplicadas a las plantas de banana y la cinética de crecimiento previamente seleccionadas en plantas de banana.
- Evaluar el efecto en el crecimiento (alto y ancho) del tallo y emergencia de hojas de las plantas de banana por la aplicación las bacterias, C2 - *Enterobacter cloacae*, P1vb – *Bacillus velezensis*, F1N, 109.1 – *Bacillus oceanisediminis*, y los lantánidos a una concentración de 8 μM
- Evaluar la colonización de las bacterias aplicadas al extraerlas de los tejidos internos después de 5, 10, 15 y 20 semanas de aplicación.
- Identificar la correspondencia de aislamientos de acuerdo a los tratamientos biológicos y químicos por espectrometría de masas MALDI-TOF y el uso del software de identificación Biotyper de Bruker.
- Determinar la diversidad funcional de las bacterias endófitas y del suelo recuperadas mediante el uso de pruebas agronómicas como: la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, producción de proteasas, ACC deaminasa y producción de auxinas.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Antecedentes

Banana: importancia en la seguridad alimentaria

La agricultura es una actividad de suma importancia para mantener la alimentación de la población mundial. El banano es el cuarto cultivo de mayor importancia en el mundo después del maíz, arroz y trigo. La banana es un cultivo rico en carbohidratos, vitaminas, potasio y magnesio. La superficie de cosecha alcanza hasta los 5.1 millones de hectáreas y una producción aproximada de 116 millones de toneladas anualmente. Los principales continentes productores de este fruto son Asia con una aportación de 63 millones de toneladas, América con 29 millones de toneladas y África con 21 millones de toneladas. (FAOSTAT, 2018). En la tabla 1 se presentan los principales países que producen banana en el mundo. Esta tabla es diferente cuando se presenta a los principales exportadores de la fruta, donde Ecuador es considerado el principal país exportador.

Tabla 1. Porcentaje de producción por país de banano a nivel mundial en el año 2018 basado en 88'304,335 toneladas (FAO, 2018)

País	Porcentaje de producción (%)
India	26.1
China	10.2
Indonesia	6.2
Brasil	5.8
Ecuador	5.6
Filipinas	5.1
Guatemala	3.7
Angola	3.4
Tanzania	2.9
Colombia	2.4
Costa Rica	2
México	1.9

En México, la banana ocupa el primer lugar en la producción de frutas tropicales, debido a que es un alimento básico en la dieta de los mexicanos por su sabor, nutrición, la sensación de saciedad; además de la disponibilidad en todo el año. El consumo per cápita promedio de este fruto es de 14.4 kg al año. La producción de este fruto aumentó un 2.9% en el 2020, alcanzando las 2 millones 469 mil toneladas (SADER, 2021).

La banana, no solo es importante en la nutrición de los mexicanos, es importante para la economía de varios estados del país como Chiapas y Tabasco, que son los principales productores. En el 2018, el valor de la producción de banana en Tabasco fue de 2.1 mil millones de pesos. Los principales estados productores son Chiapas con un 29%, Tabasco con el 26%, Veracruz con un 12%, Colima con un 9%, Jalisco con un 8% y Michoacán con un 7% de la producción (CEDRSSA, 2019).

Por otra parte, las exportaciones mexicanas de banana han incrementado significativamente. Por ejemplo, en el año 2016, México fue el décimo país con mayores exportaciones de banana con 448 mil toneladas aproximadamente que se vendieron en el mercado internacional. En el 2018, México se situó en el lugar doceavo de producción de banano y se exportaron 552 mil 398 toneladas con un costo de 250 millones de dólares, el 75% de las exportaciones son para Estados Unidos, Japón 5%, Países Bajos 4%, Italia 2%, Rusia 2%, entre otros países. En este mismo año se llevó a cabo la primera exportación de banana desde Colima hasta China abriendo las puertas para el comercio internacional (CEDRSSA, 2019).

En el 2020, la producción de plátano en México aumentó un 2.9% alcanzando los dos millones 469 mil toneladas de producción, llegando a tener presencia en mercados globales. El 30% de la producción se destina a la exportación a diferentes países como China, Japón, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Italia y Corea del Sur, siendo el valor total de las exportaciones en 274 millones de dólares (SADER, 2021)

Condiciones de estrés que afectan el cultivo de banana.

Las plantas de banano, así como otros cultivos se ven afectados por condiciones de estrés abiótico y biótico. Ambas condiciones de estrés provocan un efecto negativo en el crecimiento, desarrollo y productividad de los cultivos. Cualquier tipo de estrés desencadena diferentes respuestas, desde la activación de genes, alteraciones en el metabolismo, cambios en el crecimiento y la disminución del rendimiento en el cultivo (Gull, 2019). Existen dos tipos de estrés: el biótico y abiótico. El biótico ocurre cuando microorganismos vivos como bacterias, hongos, virus, nemátodos e insectos, privan a la planta en la nutrición o destruyen sus tejidos. Mientras que el abiótico es el tipo de estrés causado por condiciones climáticas como sequía, inundaciones, salinidad, bajas temperaturas o aumento de la luz solar, este tipo de estrés puede causar pérdidas de los cultivos desde un 65 hasta un 87% (Gull, 2019).

El estrés biótico y abiótico se consideran factores que afectan la producción de banana en mayor medida. La sequía es uno de los problemas a nivel mundial en la agricultura que afecta la producción de alimentos (Zhang, *et al.*, 2022). El 28% de los cultivos se ve afectado por este fenómeno, lo que causa esto al tener menos agua se aumenta la temperatura de los tejidos, causando deshidratación y pérdidas en el rendimiento de los cultivos. También se ha mostrado que durante la sequía el aire jala agua del suelo y las plantas. Los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua, pero esto detiene la absorción del CO₂, por lo que la planta puede morir si agota sus reservas alimentarias. En el banano se ha demostrado que los estomas se cierran en condiciones de estrés por sequía. Esta señal se transmite de la raíz hasta las hojas, manteniendo la planta hidratada, sin embargo como mencionamos la asimilación de carbono se reduce. Se ha demostrado que en un cultivo de banano sometido a estrés hídrico el rendimiento de las plantaciones se reduce en aproximadamente un 66%, el peso del racimo disminuye entre un 25-42% y la longitud en un 11-14% y el calibre en un 5-16% (Ravi, *et al.*, 2016)

El requerimiento de agua de este cultivo es alto, siendo este entre 1200-2200 mm³ por año. El suministro de agua y nutrientes en la fase vegetativa y tardía es crucial para el desarrollo de la planta y para los rendimientos (Panigrahi, *et al.*, 2021). Unos de los síntomas del estrés hídrico son la reducción de la emergencia de hojas, pérdida de turgencia, caída de las hojas,

senescencia prematura, amarillamiento, reducción del tallo y secado de las hojas jóvenes (Figura 1).



Figura 1. Planta de banana afectada por la sequía. Se observa la pérdida de la turgencia en las hojas. Este es un estrés que va siendo común en las plantaciones debido a los cambios en la frecuencia y cantidad de lluvia.

La salinidad es otro de los problemas abióticos de mayor importancia. Es un factor que limita la producción de alimentos, pues los cultivos pierden su potencial de rendimiento.

Los suelos afectados por salinidad limitan la producción agrícola a la deficiencia de nutrientes esenciales y los altos niveles de sal. Los problemas relacionados con la salinidad surgen bajo un clima seco en suelos salinos y por el uso de agua de riego de baja calidad. La salinidad excesiva aumenta el contenido de sodio en las raíces con una marcada depresión en la absorción de potasio (K^+), reduciendo la tasa de crecimiento, retrasa la floración y disminuye el rendimiento del cultivo. El valor óptimo para la relación K^+/Na^+ del suelo es de 2.5 y los rendimientos de banano disminuyen cuando la proporción de sodio supera el 8% (Lehav, 1995). El crecimiento de las plantas es inhibido por las sales presentes en el agua del suelo debido a un potencial osmótico más negativo en la solución del suelo que en el agua de las plantas, por lo que se reduce la absorción de agua por parte de la planta (Ravi, *et al.*, 2016).

Los síntomas principales de la salinidad en las plantas de banano son lesiones o necrosis en la orilla de la hoja progresando al centro de la hoja, se reduce el grosor del tallo, duración

prolongada de la floración, los frutos no logran tener un desarrollo normal y se producen racimos de baja calidad. También la salinidad afecta la asimilación de CO₂, síntesis de proteínas, la respiración, la producción de fitohormonas y reducción de la fotosíntesis.

Por otra parte, el control de las plagas en el cultivo de banano representa entre el 40 al 60% del gasto de la producción. (FAO, 2019). Las plagas y las enfermedades se han diseminado en muchos casos por la distribución del germoplasma de musáceas nativas del sureste de Asia a las nuevas zonas agrícolas en América Latina y el Caribe. Las principales enfermedades que afectan el cultivo son el mal de Panamá, el Moko del plátano, marchitez bacteriana del plátano, virus del Bunchy top, virus del mosaico de la bráctea, virus del estriado del plátano, virus del mosaico del plátano (Manzo, *et al.*, 2016).

El Mal de Panamá-FOC raza 4.

Desde hace más de 20 años la aparición del hongo *Fusarium oxysporum Cubense* (FOC) raza 4, ha puesto en peligro la producción de banana. Para lograr el control de esta enfermedad se debe de tener una buena vigilancia fitosanitaria, buen drenaje, rotación del cultivo, el uso de agentes de control biológico, el uso de fungicidas químicos y actualmente se busca mediante ingeniería genética, el desarrollo de variedades resistentes, pero principalmente mantener equilibrado la composición microbiana del suelo (Effendi, *et al.*, 2019, Li, *et al.*, 2020, Dita, *et al.*, 2020).

La infección comienza por la penetración del hongo en la raíz de la planta colonizando el xilema y avanzando al rizoma. El hongo forma clamidosporas que pueden llegar a durar hasta 30 años en el suelo. En las etapas iniciales de la enfermedad, las hojas adultas muestran un amarillamiento uniforme por la orilla de la hoja el cual se extiende hacia el centro de la hoja hasta que la hoja queda completamente seca (Figura 2). Un agrietamiento en la base de pseudotallo es evidente y los racimos de frutos son pequeños, por lo que pierden valor comercial (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020).



Figura 2. Plantas dañadas por *Fusarium oxysporum cubense*, raza 4, agente causal del mal de Panamá (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020).

La Sigatoka negra

Otro de los factores bióticos que afectan los cultivos de banana es la Sigatoka negra causada por el hongo hemibiótrofico *Pseudocercospora fijiensis*, causando pérdidas millonarias. La presencia de este hongo en los cultivos ha provocado que haya cambios en los manejos de los cultivos, haciendo que el manejo sea más caro con agroquímicos.

Actualmente, la producción de bananos no se puede llevar a cabo sin un programa de manejo de la Sigatoka negra, la pérdida de rendimiento de producción es de 20 a 50% durante el ciclo de cultivo de la planta, desde la aparición del hongo en México se han perdido alrededor de 2000 hectáreas en Tabasco y 3000 hectáreas en Colima. Para lograr controlar este hongo lo han tenido que hacer mediante fungicidas químicos causando problemas ambientales y de salud humana, se estima que el costo de producción es de un 27% para el control de la Sigatoka negra (Orozco, *et al.*, 2013).

El hongo afecta la productividad de la planta ya que reduce la capacidad fotosintética de las hojas, El desarrollo de la enfermedad se encuentra directamente influenciado por las condiciones climáticas, susceptibilidad de la variedad sembrada y el manejo del cultivo.

Sin embargo, tiempo después el hongo provoca daños a la hoja y su cambio a la etapa necrotrofica (que destruye células para obtener nutrientes) se ve ligada a la secreción de melanina, que funciona como un fotosensibilizador que destruye a las células (Beltrán-García, *et al.*, 2014). La destrucción foliar incide en la reducción del tamaño del racimo y del fruto.

La enfermedad es más agresiva en época de lluvia, debido a la presencia continua de una lámina de agua sobre las hojas, que favorece los procesos de liberación e infección de las ascosporas. La figura 3, presenta los síntomas correspondientes a las etapas 3-6 de la escala de Fouré, donde se observan:

1. Manchas ovaladas de color café
2. Manchas negras rodeadas de un anillo negro y a veces un halo amarillento y centro seco y semihundido.
3. Manchas con centro seco y hundido, de coloración marrón clara, rodeadas de tejido clorótico.

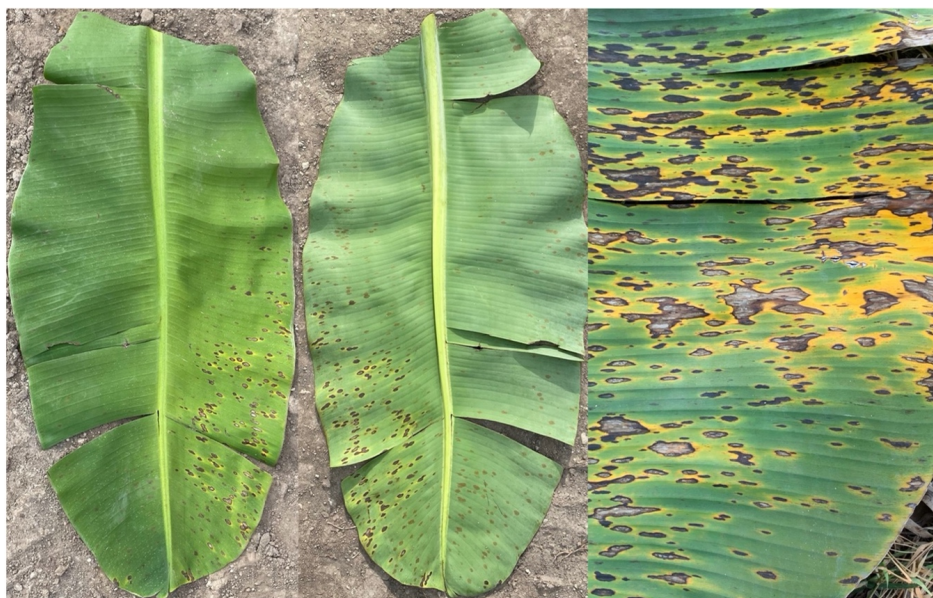


Figura 3. Hoja banana Cavendish enano gigante con lesiones causadas por *Pseudocercospora fijiensis* el hongo causal de la Sigatoka negra.

Microbioma de las plantas de banana.

El microbioma de una planta esta caracterizado por el ambiente donde se encuentra y por distintas propiedades fisicoquímicas en la rizosfera (suelo que es influenciado por la raíz), el rizoplaneo (superficie de la raíz), filosfera (tallo y hojas) y endosfera (parte interna de la planta). Generalmente el microbioma de una planta viene desde la semilla o la planta madre. Sin también se puede reclutar microbioma de la tierra o del agua de la irrigación.

El estudio de los microbiomas se puede realizar mediante diferentes técnicas. Dado a que no todos los microorganismos que están presentes son cultivables en el laboratorio se han desarrollado otras técnicas como:

- Análisis de genes marcadores: abarcan la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S para bacterias y la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno para hongos.
- Metagenómica: secuenciación masiva de todos los genomas encontrados en la muestra.
- Metatranscriptómica: captura el ARN transcrito de las células microbianas, lo que permite evaluar las actividades de expresión de estos organismos.
- Metabolómica: se centran en perfilar los metabolitos que produce la microbiota y cómo estos productos interactúan tanto con la microbiota como con el metabolismo del huésped.
- Metaproteómica: usa espectrometría de masas, pero se enfoca en identificar y cuantificar las proteínas presentes dentro de un microbioma (Galloway, et al., 2020).

También hay técnicas donde se analizan solamente las bacterias cultivables en el laboratorio, donde se cultivan la muestra en medios nutritivos, se aíslan las diferentes colonias del primer cultivo y finalmente se hacen identificación mediante secuenciación del 16s o análisis de proteínas mediante espectrometría de masas.

Microbioma endófito

Las bacterias endófitas colonizan el espacio intercelular de los tejidos en las plantas. También se sugiere que las raíces es uno de los puntos principales de entrada y el nicho donde se encuentran. Los microorganismos endófitos se han encontrado en los distintos tejidos como tallo, hojas, flores y hasta frutos (Pious, *et al.*, 2009, Beltran-Garcia, *et al.*, 2021)

Por otra parte, los microorganismos endófitos han adquirido una gran importancia en la agricultura debido a su gran potencial en la nutrición de las plantas, promoción de crecimiento, fuente de nuevas biomoléculas, agentes de biorremediación, determinación de la salud del suelo y de defensa de la planta (Pious, *et al.*, 2009). Se ha demostrado que esta interacción del microorganismo con la planta depende mucho de las condiciones ambientales, genotipo de la planta y bacteria y tipo de estrés (biótico y abiótico) en el que esté sometido la planta. La diversidad y estructura del microbioma puede definir la salud y estado de una planta (Beltrán-García, *et al.*, 2021).

Algunos de estos microorganismos endófitos se pueden utilizar como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, ya que aportan nutrición a la planta mediante mecanismos directos (que ocurren dentro de la planta y afectan directamente el metabolismo) e indirectos (fuera de la planta). Los mecanismos directos son la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción fitohormonas como las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico para mediar en el agrandamiento, la división y la extensión de las células vegetales. Los mecanismos indirectos como producción de ACC deaminasa, proteasas, antibióticos y sideróforos (Goswami, *et al.*, 2016).

También estas bacterias son importantes para la línea de defensa de la planta ante patógenos o estrés abiótico como lo es el cambio de temperatura y de clima, salinidad en el suelo, cambio de pH o el manejo de la tierra donde se planea cultivar (Nisrina, *et al.*, 2021; Beltrán-García, *et al.*, 2021; Pious, *et al.*, 2009).

Se han desarrollado varios estudios sobre la composición del microbioma endófito de las plantas, donde se ha demostrado que está compuesto principalmente por α -, β -, γ -, δ - y ϵ -

Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes, siendo algunas de estas cultivables en el laboratorio. Sin embargo, un estudio más completo involucra llevar a cabo un análisis metagenómico donde se analizan los microorganismos no cultivables, donde se observan filos como Acidobacterias, Verrucomicrobia y Planctomycetes (Beltrán-García, *et al.*, 2021).

En banana, los filos más predominantes son las Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes. Las Proteobacterias tienen un rol muy importante en el ciclo de carbono, nitrógeno y azufre (Afzal, *et al.*, 2019). Las Actinobacterias en la sustitución del carbono, proporcionando nutrientes al suelo y produciendo metabolitos secundarios como antibióticos (Singh, *et al.*, 2018). Las Acidobacterias pueden usar nitrito como fuente de N, proporcionar micro y macronutrientes al suelo, acidez del suelo, y producir exopolisacáridos.

En el microbioma de la planta de banano *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus* son los géneros más reconocidos por tener las capacidades de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos, mientras que *Streptomyces* es capaz de controlar nematodos y producir muchos metabolitos secundarios como compuestos orgánicos volátiles (COV), que pueden inhibir el crecimiento de hifas fúngicas (Nisrina, *et al.*, 2021). Las bacterias incluidas en la clase β -proteobacterias juegan un papel destacado en el proceso de nitrificación; por lo tanto, es necesario para la sostenibilidad de las tierras agrícolas (Afzal, *et al.*, 2019). Los Rhizobiales aportan servicios simbióticos para producir auxinas, vitaminas, fijación de nitrógeno y proteger a las plantas contra el estrés. Además, los Burkholderiales pueden aumentar la abundancia de microbios alrededor de las raíces de las plantas y tener interacciones beneficiosas con las plantas. (Nisrina, *et al.*, 2021). En el cuadro 2, se presenta un resumen de las bacterias endófitas comúnmente reportadas por ser promotoras del crecimiento en las plantas de banana.

Tabla 2. Bacterias endófitas del banano y su función como promotoras del crecimiento.

Bacteria endófitas	Función	Referencias
--------------------	---------	-------------

<i>Bacillus</i>	Producción de exopolisacáridos, sideróforos, ácido indol acético, ácido giberélico, ACC deaminasa, solubilizan fosfatos y producen enzimas como celulasa, quitonasa, proteasas y gluconasa.	Radharakrishnan, <i>et al.</i> , 2017 Beltran-Garcia, <i>et al.</i> , 2021
<i>Pseudomonas</i>	Promueven el crecimiento de las plantas al suprimir patógenos, sintetizan hormonas, funcionan como control biológico, promueven una mayor resistencia a enfermedades	Preston, 2004. Beltran-Garcia, <i>et al.</i> , 2021
<i>Klebsiella</i>	Fijan el nitrógeno atmosférico y es antagonista de <i>P. fijiensis</i> .	Iñiguez, <i>et al.</i> 2007. Beltran-Garcia, <i>et al.</i> , 2021
<i>Enterobacter</i>	Fija nitrógeno, producción de ácido indol acético, solubiliza fosfatos y es antagonista antes <i>P. fijiensis</i> .	Macedo, <i>et al.</i> , 2019. Beltran-Garcia, <i>et al.</i> , 2021
<i>Rhizobium</i>	Produce ácido indol acético, fija nitrógeno, ayuda a retener agua, y que la planta sobreviva en condiciones de estrés hídrico.	Tanveer, <i>et al.</i> , 2022 Beltran-Garcia, <i>et al.</i> , 2021

Bacterias del suelo en banana y como la fertilización perturba el equilibrio de los endófitos y los microorganismos del suelo.

La demanda y la producción mundial de alimentos aumenta conforme el paso de los años. La fertilización es la principal práctica agrícola y utiliza compuestos ya sean orgánicos o inorgánicos con fines de nutrición de las plantas y la productividad de los cultivos. Sin embargo, la fertilización nitrogenada a largo plazo va a afectando la comunidad y diversidad de microorganismos de la rizosfera y de la planta. La inhibición del microbioma promueve que las plantas se vuelvan dependientes de los nutrientes aplicados, sean más susceptibles a las enfermedades y menos resistentes al estrés abiótico (Beltrán, *et al.*, 2021). La aplicación

constante de este tipo de fertilizantes suprimen la respiración de los microorganismos, alteran los valores de pH llegando a la acidificación de estos, inhiben las bacterias que secretan ácidos orgánicos que afectan directamente a la absorción de fosfatos (Beltrán, *et al.*, 2021). A pesar de la cantidad aplicada de fertilizantes por los agricultores, las plantas no suelen absorber todo lo aplicado, solo del 10-30% son utilizados, por lo que el restante se filtra al suelo y al agua.

Los fertilizantes nitrogenados inducen un cambio en el contenido de α -proteobacteria a β -proteobacteria y γ -proteobacteria, lo que promueve cambios en la desnitrificación, nitrificación y fijación de nitrógeno (Beltrán-García, *et al.*, 2021). La fertilización prolongada con amonio, también causa cambios aumentando la abundancia de bacterias oxidantes de amonio. La adición de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados minerales, aumenta la abundancia relativa de Proteobacteria, Bacteroidetes y Gemmatimonadetes, y provoca una reducción de Chloroflexi, Acidobacteria, Nitrospirae y Planctomycetes (Beltrán-García, *et al.*, 2021).

Microorganismos Keystone o piedras angulares en el microbioma

Los microorganismos keystones o piedras angulares son aquellos que tienen una mayor influencia en la composición y función del microbioma en un espacio o tiempo particular, su pérdida compromete la estabilidad del microbioma y los servicios que ofrecen a las plantas (Banerjee, *et al.*, 2018). Los “keystones” están conectados y llevan a cabo funciones críticas en la organización de la estructura del microbioma del suelo, estos mismos indican cambios en la composición de esta. Participan del mantenimiento de las comunidades microbianas, también son responsables de ciertos metabolismos como el del nitrógeno y el del fósforo, donde *Nitrospira*, *Rhizobacter* y *Burkholderia* fueron reconocidos como los principales contribuyentes al metabolismo del nitrógeno, y los géneros *Gemmatimonas*, *Solirubrobacter* y *Brevundimonas* contribuyen al metabolismo del fósforo, estos grupos siendo los principales “keystone” de los suelos (Beltrán-García, *et al.*, 2021)

Los keystones de banana incluyen los siguientes géneros, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Sphingophix*, *Micrococcus* y *Rhizobium*, siendo estos microorganismos de suma importancia para la planta ya que son los encargados de protección

contra patógenos, fijación del nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de enzimas líticas, producción de hormonas, síntesis de ACC deaminasa y producción de sideróforos (Beltran-Garcia, *et al.*, 2021).

Hipótesis asociadas al rescate de las plantas bajo condiciones de estrés.

A) “Cry for help”

Como hemos mencionado anteriormente, los cultivos se ven constantemente afectadas por el estrés biótico y estrés abiótico causando pérdidas del 10-30% en cultivos de gran importancia. El estudio del microbioma de la planta ha abierto el entendimiento del funcionamiento del microbioma de la planta y simultáneamente abrió la posibilidad de utilizar estos conocimientos y aplicarlos a una agricultura sostenible (Rizaludin, *et al.*, 2021). Las plantas sintetizan alrededor de 200,000 metabolitos primarios y secundarios, los metabolitos primarios son compuestos importantes para el crecimiento, desarrollo y reproducción de la planta (Rizaludin, *et al.*, 2021). Para poder contrarrestar el estrés tanto biótico como abiótico, las plantas han desarrollado mecanismos de producción de metabolitos secundarios bioactivos, que son los que pueden actuar directamente como línea de defensa, mientras otros pueden advertir a las plantas vecinas para que mejoren su línea de defensa o comiencen con un proceso de reclutamiento de microorganismos benéficos para minimizar la intensidad los daños (Rolli, *et al.*, 2021).

En años recientes, se ha observado que las plantas cuando están sometidas a un tipo de estrés, la planta comienza a tener cambios en su metabolismo y en su expresión génica liberando una cantidad suficiente de metabolitos tipo ácidos orgánicos influyentes en la atracción y reclutamiento de microorganismos especializados del suelo que ayudan a la sobrevivencia bajo esa condición existente, a este proceso se le ha denominado “Cry for help” (Rizaludin, *et al.*, 2021).

Diversos grupos de investigación a nivel mundial ven en el “cry for help”, una explicación al por qué algunas plantas sobreviven a situaciones donde la gran mayoría dentro de una misma plantación que presenta muerte, en especial en aquellos cultivos donde no existe una diversidad genética, considerados actualmente como monocultivos. Mas allá de la identificación de las bacterias y hongos que son reclutados y la determinación de sus funciones, se considera que el reconocimiento de las moléculas exudadas permitirá establecer

condiciones de manejo fitosanitario ante enfermedades, usando sustancias naturales de las propias plantas que tienen una menor agresividad con respecto a los productos químicos que se usan en la agricultura extensiva.

Algunos de los metabolitos son exudados por las raíces, considerándose como un papel crucial para la estructura, funcionalidad y microbioma asociado a este. Los metabolitos exudados varían dependiendo de la edad, exposiciones al estrés e interacciones con microorganismos tanto benéficos como patógenos. La química de la raíz impulsa el bienestar del holobionte, el flujo de exudados ayuda a reclutar a microorganismos para que se establezcan en la rizosfera y ayudan a la homeostasis de la planta (Rolli, *et al.*, 2021).

De acuerdo con la figura 4, las plantas liberan una fracción del carbono que fue fijado fotosintéticamente en forma de exudados, consistiendo en un arreglo de compuestos volátiles y no volátiles, que incluyen azúcares y polisacáridos (arabinosa, fructuosa, glucosa, manosa, maltosa y oligosacáridos), aminoácidos (arginina, asparagina, cisteína y glutamina), ácidos orgánicos (ácido acético, ascórbico, benzoico y málico) y compuestos fenólicos los cuales tienen funciones demostradas. Los exudados a través de las raíces es una estrategia para sobrevivir en un ambiente cambiante. La cantidad y composición de los exudados cambia dada la exposición al estrés, edad e interacciones con los microorganismos benéficos (Rolli, *et al.*, 2021).

Diversas publicaciones han reportado moléculas y condiciones que muestran un incremento de ácidos orgánicos (Rolli, *et al.*, 2021). Por ejemplo, en plantas de soya cultivadas bajo privación de fósforo induce la producción de ácidos tipo cítrico o málico. La exudación de ácidos orgánicos a la rizosfera también ha sido reportada como una estrategia de supervivencia en plantas para la adquisición de nutrientes cuando están en suelos contaminados por metales pesados, en este caso se busca el enriquecimiento de bacterias que poseen maquinaria enzimática capaz de degradar el contaminante que pueda disminuir la concentración local logrando la desintoxicación de la raíz y de la rizosfera (Rolli, *et al.*, 2021).

También en las plantas de tomate, se demostró un aumento de un ácido graso, “la oxilipina” cuando la planta fue expuesta a estrés biótico. El compuesto actuó como un quimioatrayente del hongo *Trichoderma harzianum* utilizado ampliamente como control biológico. Los

benzoxanoides, son una clase de metabolitos secundarios defensivos, comúnmente liberado por las raíces de maíz tras ataques de herbívoros que pueden reclutar la bacteria benéfica *Pseudomonas putida*, también se demostró que las mismas bacterias desencadenan una resistencia sistémica inducida contra *Colletotrichum graminicola* (Rizaludin, *et al.*, 2021).

Otro caso fue reportado en plantas de pepino con raíces infectadas por *Fusarium oxysporum* (hongo patógeno causante de enfermedades en varias especies vegetales) que aumentan el triptófano y disminuye la exudación de rafinosa, mejorando la capacidad de colonización de *Bacillus amyloliquefaciens* (bacteria benéfica también utilizada como control biológico) y contrarrestando la proliferación del patógeno (Rizaludin, *et al.*, 2021).

La exudación de ácidos orgánicos a la rizosfera también ha sido reportada como una estrategia de supervivencia en plantas para adquisición de nutrientes cuando están en suelos contaminados por metales pesados, en este caso se busca el enriquecimiento de bacterias que poseen maquinaria enzimática capaz de degradar el contaminante que pueda disminuir la concentración local logrando la desintoxicación de la raíz y de la rizosfera.

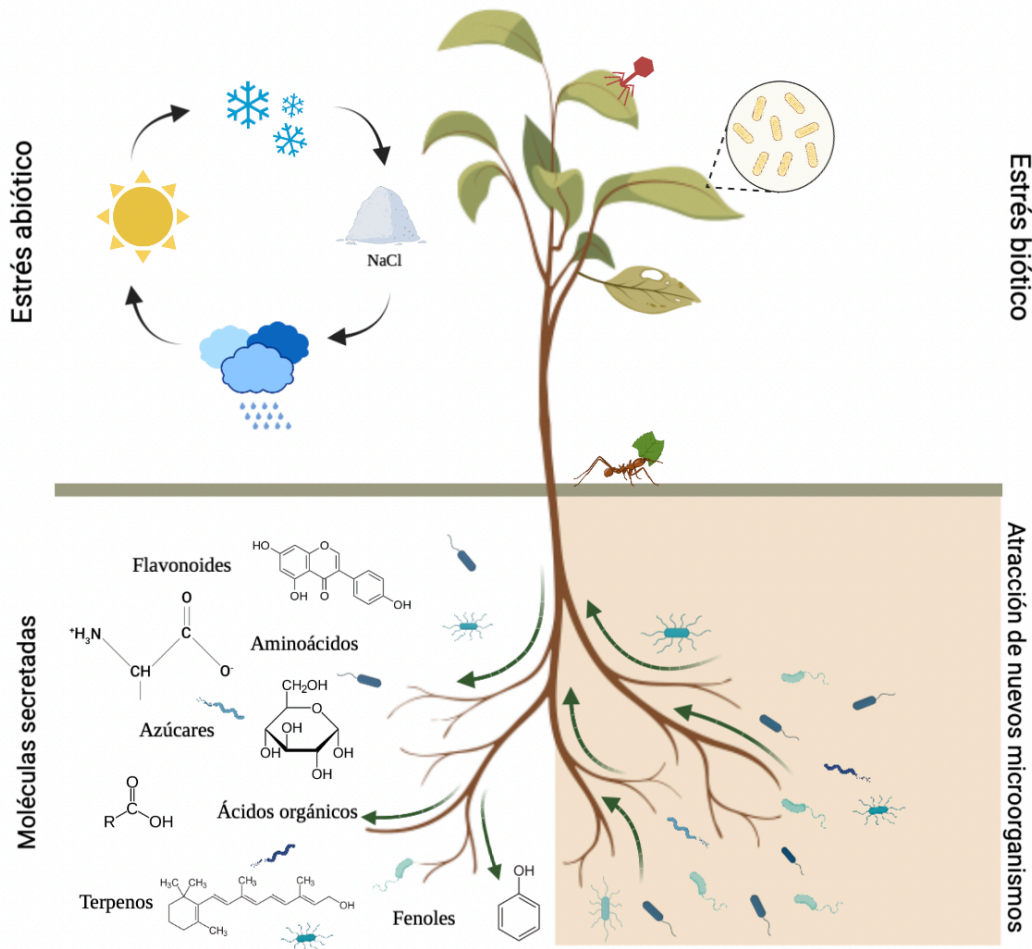


Figura 4. Representación gráfica del “Cry for help” en las plantas en respuesta a la tensión abiótica y biótica y el auxilio de microorganismos en la rizosfera (ver explicación en el texto).

B) Activación del microbioma endófito

La mayoría de los inoculantes microbianos o fertilizantes con base en bacterias influyen en la planta huésped al estimular la respuesta de defensa de la planta, la producción de hormonas, resistencia a patógenos y la absorción de nutrientes (Bakker, *et al.*, 2020).

Tras la aplicación de fertilizantes bacterianos, las plantas suelen tener cambios fuertes en el microbioma, generalmente se han descrito 6 tipos de modulaciones: cambios transitorios, aumento de la diversidad microbiana, aumento de la uniformidad del microbioma, restauración de un cambio inducido por patógenos, cambios dirigido hacia filos beneficiosos y agotamiento de patógenos potenciales (Berg, *et al.*, 2009). Los inoculantes microbianos

son una forma de gestionar los microbiomas, también las condiciones ambientales causan una modificación en la estructura y función de los microbiomas. Sin embargo, se ha demostrado que la reproducción de las plantas causa cambios a largo plazo, un ejemplo de esto es el fitomejoramiento ya que para mejorar los rendimientos se debe inducir resistencia a los patógenos con microorganismos antagonistas y enriquecimiento de promotores del crecimiento vegetal (Pérez, *et al.*, 2018).

Schwieger, *et al.*, 2000, analizaron el efecto de la inoculación de *Sinorhizobium*, describiendo así por primera vez cambios en el microbioma. En pepino se describió una estabilización del microbioma, logrando una resistencia al estrés biótico y abiótico, tras la aplicación de *Bacillus subtilis*, en este estudio aumento la diversidad microbiana y resulto en una mayor protección contra *Fusarium oxysporum f.sp. cucumeris*.

En plantas de jitomate infectadas por *Ralstonia*, se observó que con la aplicación de *Bacillus velezensis*, hubo un cambio de microbioma hacia géneros que son cepas conocidas como promotoras del crecimiento vegetal, como *Arthrobacter* (actinobacteria) y *Ochrobactrum* (alfa proteobacteria) (Elsayed, *et al.*, 2020).

En plantas de pimiento infectadas con *Phytophthora capsici*, hubo un aumento significativo de la actividad microbiana tras la aplicación de *Pseudomonas corrugata* o *Chryseobacterium indologenes*, ambos considerados controles biológicos, de bacterias como *Pseudomonas* y *Actinomycetes*, conocidas por su potencial antagónico (Sang, *et al.*, 2012).

En otro estudio, se identificaron una mayor abundancia relativa de Actinobacterias y Firmicutes en plantas de jitomate sanas, donde estas bacterias fueron capaces de inducir una activación inmunológica contra *Ralstonia* (Lee, *et al.*, 2021).

La modulación o activación del microbioma por fertilizantes microbianos puede brindar una opción muy importante para la agricultura sostenible, esto nos puede ayudar a la restauración de la diversidad reducida, sin embargo aún falta una mayor comprensión en los mecanismos y comunicaciones dentro del microbioma (Berg, *et al.*, 2021)

Tierras raras: química, biología e importancia en la agricultura.

Los lantánidos son un grupo de metales que van en los números atómicos del 57 al 71 que incluyen al Lantano, Cerio, Europio, Gadolinio, Terbio, Erbio, Iterbio entre otros (figura 5). Estos elementos tienen diferentes propiedades magnéticas, eléctricas y ópticas, gracias a estas son de gran utilidad en la industria, en el desarrollo de aplicaciones electrónicas modernas y muchas otras industrias de alta tecnología. Los usos donde las tierras raras son indispensables son múltiples y comprenden catalizadores, cerámica, tecnología nuclear, tratamiento de agua, fertilizantes, exámenes médicos y tratamiento. (Haneklaus, *et al.*, 2007)

Metal																		Semimetal		No metal												
Lantánidos																		Metal del bloque p		Otros no metales												
Actínido																																
1 H Hidrógeno 1,008	Atomic Símbolo Nombre Peso																	2 He Helio 4,0026														
3 Li Litio 6,94	4 Be Berilio 9,0122																	5 B Boro 10,81	6 C Carbono 12,011	7 N Nitrógeno 14,007	8 O Oxígeno 15,999	9 F Flúor 18,998	10 Ne Neón 20,180									
11 Na Sodio 22,990	12 Mg Magnesio 24,305																	13 Al Aluminio 26,982	14 Si Silicio 28,085	15 P Fósforo 30,974	16 S Azufre 32,06	17 Cl Cloro 35,45	18 Ar Argón 39,948									
19 K Potasio 39,098	20 Ca Calcio 40,078	21 Sc Escandio 44,956	22 Ti Titanio 47,867	23 V Vanadio 50,942	24 Cr Cromo 51,996	25 Mn Manganeso 54,938	26 Fe Hierro 55,845	27 Co Cobalto 58,933	28 Ni Níquel 58,693	29 Cu Cobre 63,546	30 Zn Zinc 65,38	31 Ga Galio 69,723	32 Ge Germanio 72,630	33 As Arsénico 74,922	34 Se Selenio 78,971	35 Br Bromo 79,904	36 Kr Kriptón 83,798															
37 Rb Rubidio 85,468	38 Sr Estroncio 87,62	39 Y Itrio 88,906	40 Zr Circonio 91,224	41 Nb Niobio 92,906	42 Mo Molibdeno 95,95	43 Tc Tecnecio (98)	44 Ru Rutenio 101,07	45 Rh Rodio 102,91	46 Pd Paladio 106,42	47 Ag Plata 107,87	48 Cd Cadmio 112,41	49 In Indio 114,82	50 Sn Estaño 118,71	51 Sb Antimonio 121,76	52 Te Telurio 127,60	53 I Yodo 126,90	54 Xe Xenón 131,29															
55 Cs Cesio 132,91	56 Ba Bario 137,33																	72 Hf Hafnio 178,49	73 Ta Tántalo 180,95	74 W Wolframio 183,84	75 Re Renio 186,21	76 Os Osmio 190,23	77 Ir Iridio 192,22	78 Pt Platino 195,08	79 Au Oro 196,97	80 Hg Mercurio 200,59	81 Tl Talio 204,38	82 Pb Plomo 207,2	83 Bi Bismuto 208,98	84 Po Polonio (209)	85 At Ástato (210)	86 Rn Radón (222)
87 Fr Francio (223)	88 Ra Radio (226)																	104 Rf Rutherfordio (267)	105 Db Dubnio (268)	106 Sg Seaborgio (269)	107 Bh Bohrio (270)	108 Hs Hasio (277)	109 Mt Meitnerio (278)	110 Ds Darmstatio (281)	111 Rg Roentgenio (282)	112 Cn Copernicio (285)	113 Nh Nihonio (286)	114 Fl Flerovio (289)	115 Mc Moscovio (290)	116 Lv Livermorio (293)	117 Ts Teneso (294)	118 Og Oganésor (294)
																		57 La Lantano 138,91	58 Ce Cerio 140,12	59 Pr Praseodimio 140,91	60 Nd Neodimio 144,24	61 Pm Prometio (145)	62 Sm Samario 150,36	63 Eu Europio 151,96	64 Gd Gadolinio 157,25	65 Tb Terbio 158,93	66 Dy Disproso 162,50	67 Ho Holmio 164,93	68 Er Erbio 167,26	69 Tm Tulio 168,93	70 Yb Iterbio 173,05	71 Lu Lutecio 174,97
																		89 Ac Actinio (227)	90 Th Torio 232,04	91 Pa Protactinio 231,04	92 U Uranio 238,03	93 Np Neptunio (237)	94 Pu Plutonio (244)	95 Am Americio (243)	96 Cm Curio (247)	97 Bk Berkelio (247)	98 Cf Californio (251)	99 Es Einsteinio (252)	100 Fm Fermio (257)	101 Md Mendelevio (258)	102 No Nobelio (259)	103 Lr Lawrencio (266)

Figura 5. Tabla periódica con los elemento lantánidos remarcados en café. Incluyen elementos desde el número atómico 57 hasta el 71, empezando por Lantano, Cerio, pPraseodimio, Neodimio, Prometio, Samario, Europio, Gadolinio, Terbio, Disproso, Holmio, Erbio, Tulio, Iterbio y Lutecio.

Los lantánidos son elementos electropositivos y sus compuestos son de naturaleza iónica. Según los estados de oxidación se pueden distinguir los elementos de tierras raras en cuanto

a su comportamiento bioquímico en plantas y animales (Kotelnikova, *et al.*, 2020). El tamaño de los átomos y de iones está determinado por su carga nuclear y número de capas electrónicas ocupadas. Los iones de las tierras raras muestran una característica fisicoquímica única en la que una disminución de los radios iónicos se asocia con un número atómico creciente.

Los comportamientos de los enlaces químicos como los compuestos químicos es esencial para la predicción del comportamiento fisiológico en las plantas. Los compuestos se basan en la unión iónica, por lo que las tierras raras atraen moléculas de agua en soluciones acuosas para formar una copa de hidratación (Redling, 2006).

Por ejemplo, los cationes de los lantánidos tienen afinidad a los fluoruros, hidróxidos y otros ligandos con oxígeno. En condiciones fisiológicas los átomos donantes de oxígeno son suministrados por grupos carboxilo o fosfatos presentados en proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. Los enlaces iónicos conducen la formación de un gran número de sales, se ha demostrado que las propiedades que tienen efectos para mejorar el rendimiento del crecimiento en las plantas de las tierras raras, dependen del compuesto que se aplica. Las tierras raras también pueden unirse a grupos carboxilo, formando complejos con ligandos biológicos con aminoácidos, nucleótidos o péptidos.

La investigación agrícola en China se centró en la experimentación con estos elementos para aumentar la productividad y la calidad de los cultivos. Un proceso que comenzó en 1980 con experimentos de campo y aumentó rápidamente. En 1980, se trataron 1330 hectáreas de tierras agrícolas con tierras raras (Zhengyi, *et al.*, 2004). Esta área continuó aumentando rápidamente durante los últimos 20 años. Se han tratado más de 100 especies de cultivos con lantánidos en forma de aerosoles foliares, como tratamientos de semillas o con fertilizantes. Esto dio como resultado un aumento medio de la productividad del 5 al 15% (Zhengyi, *et al.*, 2004). El cuadro 3, presenta algunos ejemplos de cultivos que han sido tratados con tierras raras y la concentración a la cual se observó un estímulo.

En China, se han publicado efectos benéficos de dosis bajas de lantánidos para varios cultivos, pero también se han reportado efectos tóxicos (Vodyanitskii, 2012). Por encima de una concentración, se activan los mecanismos de defensa, lo que da como resultado un mayor crecimiento y un aumento del rendimiento. Una mayor absorción eventualmente producirá efectos perjudiciales y reducirá el crecimiento y el rendimiento de los cultivos.

El contenido de lantánidos en tallos y hojas de plantas vasculares es mayor que el de frutos y semillas, que regularmente muestran la concentración más baja. Alrededor del 20% de los lantánidos móviles en los suelos son absorbidos por las plantas. Después de la fertilización aplicada al suelo, este valor aumenta a 55%–60%. Las concentraciones más altas de lantánidos se pueden encontrar regularmente en las raíces si esta es la vía principal de entrada sin embargo, si los lantánidos se aplican foliarmente, las hojas mostrarán las concentraciones más altas (Zhengyi, *et al.*, 2004).

En general, la absorción de los lantánidos está relacionada con el tipo de especie de planta y su aplicación en el suelo. Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos de absorción de los lantánidos es limitado. Varios estudios proponen que las tierras raras pueden ingresar a las plantas a través de los tejidos de la raíz y el follaje. Se absorben por los pelos radiculares hacia el xilema a través de células de pared delgada, y luego pueden trasladarse a otros órganos de la planta. Las plantas también pueden absorber rápidamente los lantánidos rociados sobre el follaje.

Varios autores han reportado una mejor absorción de nutrientes de las plantas tras la aplicación de lantánidos (Hu, *et al.*, 2002). Después de usar tierras raras, la absorción de nitrógeno por el arroz aumentó en un 16.4%. Los jitomates absorbieron un 8.1% más de NO₃ (Hu, *et al.*, 2004) Los experimentos de cultivo en solución con algodón mostraron que la absorción de N fue acelerada por el suministro de La. La aplicación de lantanos mezclados con nitrato aumentó la absorción de N por parte del trigo. La aplicación aumentó la eficiencia del N utilizado por el trigo del 20.2 al 26.3 %. La absorción de fósforo por el arroz aumentó un 12% después de fertilizar con fertilizante. La aplicación de nitratos de lantánidos aumentó la absorción de P en el trigo en un 10.9–12.3 % (Hu, *et al.*, 2007). El cuadro 3, presenta

algunos ejemplos del efecto de las tierras raras sobre diversos cultivos de importancia alimentaria.

Tabla 3. Uso de tierras raras en diferentes tipos de plantaciones comerciales y sus efectos.

Planta	Efecto	Referencias
Soya	Bajas concentraciones de lantano estimularon la tasa fotosintética y el contenido de clorofila, hubo un aumento de raíces y brotes.	de Oliveira, <i>et al.</i> , 2015
Arroz	Cerio (25 – 100 μM) estimuló la germinación y el crecimiento.	Ramírez, <i>et al.</i> , 2018
	Lantano y cerio afecto positivamente la germinación de semillas viejas y el crecimiento de plántulas.	Fashui, <i>et al.</i> , 2000 Fashui, 2002 Fashui, <i>et al.</i> , 2003
Lenteja	Cerio a una concentración de 0.1 μM aumentó el crecimiento.	Zicari, <i>et al.</i> , 2018
Soya roja	El lantano alivia la deficiencia de fosforo, mejora la fotosíntesis y disminuye el estrés oxidativo	Lian, <i>et al.</i> , 2019
Maíz	El lantano a concentraciones de 0.5 – 1 μM tuvo un incremento en el crecimiento de raíces hasta un 10%.	Liu, <i>et al.</i> , 2005
Coco	A bajas concentraciones de lantano hubo un crecimiento en las raíces	Wahid, <i>et al.</i> , 2000

Los efectos benéficos de los lantánidos se han atribuido a una biodisponibilidad mejorada de calcio y manganeso en los suelos, la estimulación de la síntesis de clorofila, la mejora del desarrollo de plántulas y la promoción del crecimiento de raíces y brotes (Haneklaus, *et al.*, 2007). Los lantánidos también tienen influencia en los procesos fisiológicos de las plantas, como en la acción de las hormonas. Por ejemplo, el tratamiento de las plántulas de trigo con $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ incrementó el contenido de ácido indolacético (AIA) de las plantas. En maíz, el

efecto de los lantánidos resultó en un aumento de triptófano (Pastawan, *et al.*, 2020). Las tierras raras disminuyeron la actividad enzimática para la descomposición de AIA, promoviendo así la síntesis de AIA. El LaCl_3 aumentó la captación y translocación de AIA. El Lantano y el Cerio disminuyeron la actividad de la peroxidasa y la amilasa en trigo, por lo que, promovieron el crecimiento de las plantas (Hu, *et al.*, 2007).

También se ha mostrado que la aplicación de lantánidos aumenta la tasa fotosintética entre un 11.5–31.2%. Los efectos de las tierras raras en la fotosíntesis de las plantas están relacionados con el desarrollo de cloroplastos, el contenido de clorofila y la actividad enzimática (Pastawan, *et al.*, 2020). En estudios experimentales, las plantas de trigo tratadas aumentaron el número de cloroplastos. En el trigo, la aplicación de tierras raras (Lantano y Cerio) en forma de nitrato mejoró el contenido de clorofila en un 29.6%, en la soya en un 8%, en el maíz en un 15.2%, y en la remolacha azucarera en un 5–7%. El suministro de estos tratamientos a las plantas demostró mejorar los rendimientos y la calidad de los cultivos, y su efecto sobre la tasa e intensidad fotosintética (Hu, *et al.*, 2007). Otro experimento demostró también que la aplicación de Lantano a plantas bien regadas no mostró diferencias significativas en la eficiencia del uso del agua, pero bajo condiciones de déficit de agua, la eficiencia del uso del agua fue 21% superior que el control.

Los impactos negativos de los lantánidos en el metabolismo de las plantas pueden resultar de la interferencia con algunas funciones enzimáticas, el reemplazo de metales esenciales en los pigmentos y la síntesis de especies reactivas de oxígeno (Kotenilkova, *et al.*, 2021). En las plantas, se demostró que los lantánidos se unen no solo a proteínas, ácidos nucleicos y aminoácidos, sino también a pigmentos y celulosa. Por lo tanto, se ha sugerido que los lantánidos compiten con el calcio por los sitios de unión en las proteínas y reemplazan el nutriente, estabilizando así las membranas celulares. Las tierras raras cambiaron la fluidez de la membrana para que se restringiera su fuga. Este efecto depende de la dosis, ya que las altas concentraciones de lantánidos pueden aumentar la permeabilidad celular y en consecuencia, destruir la estabilidad de la membrana. Otra implicación más podría ser que una mayor estabilidad de la membrana es eficaz contra el estrés oxidativo. Los cambios en las características fisiológicas de la membrana también podrían resultar de la unión a hormonas y de las interacciones con sus receptores. La aplicación de Lantano aumentó el

contenido de ácidos grasos insaturados y, por lo tanto, aumentó los valores de irradiación de reflujo en las plántulas de trigo (Kotenilkova, *et al.*, 2021). La aplicación de Lantano y Cerio incrementaron el contenido de lípidos polares y no polares en las membranas celulares, evitando la senescencia de las hojas. Los iones mejoraron la estabilidad de las membranas celulares y disminuyeron la penetración de electrolitos, lo que aumentó la resistencia a las adversidades por bajas temperaturas en las plantas (Hu, *et al.*, 2007; Haneklaus, *et al.*, 2007).

Varios autores han reportado una mejor absorción de nutrientes de las plantas tras la aplicación de lantánidos. Después de usar tierras raras como fertilizantes, la absorción de nitrógeno por el arroz aumentó en un 16.4%. Los jitomates absorbieron un 8.1% más de NO_3 . Los experimentos de cultivo en solución con algodón mostraron que la absorción de N fue acelerada por el suministro de La. La aplicación de lantanos mezclados con nitrato aumentó la absorción de N por parte del trigo. La aplicación aumentó la eficiencia del N utilizado por el trigo del 20.2 al 26.3 %. La absorción de fósforo por el arroz aumentó un 12% después de fertilizar con fertilizante. La aplicación de nitratos de lantánidos aumentó la absorción de P en el trigo en un 10.9–12.3 % (Hu, Z., *et al.* 2007).

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1 Materiales

Medios de cultivo

Agar soya tripticaseína (BD Bioxon)
Agar bacteriológico (BD Bioxon)
Agar para métodos estándar (BD Bioxon)
Caldo soya tripticaseína (BD Bioxon)
Skim milk (BD Bioxon)

Equipo de laboratorio

Balanza analítica (OHAUS)
Campana de flujo laminar (ESCO)
Incubadora Modelo 3015 (VWR)
Espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex Speed (BRUKER Daltonics)
Plates Ground (BRUKER Daltonics)
Microcentrífuga (miniSpin)
Microscopio Óptico (ZEISS)
Autoclave (FELISA)
Vortex (SCIENTIFIC INDUSTRIES)
Potenciómetro (OAKTON)
Equipo de filtración MilliQ
Espectrometro de masas MALDI-TOF (Bruker, Daltonics)

Reactivos

ACC (SIGMA-ALDRICH)	Ácido perclórico (J.T. Baker)
Acetonitrilo HPLC (GOLDEN BELL)	Ácido trifluoroacético (SIGMA-ALDRICH)
Ácido bórico (MERCK)	Alcohol 96% (AZ)
Ácido cítrico (J.T. Baker)	Biotina (SIGMA-ALDRICH)
Ácido clorhídrico (GOLDEN BELL)	Bromotimol (SIGMA-ALDRICH)
Ácido fórmico (GOLDEN BELL)	Carbonato de calcio (HYCEL)
Ácido glucónico (SIGMA-ALDRICH)	Cloruro de calcio (GOLDEN BELL)
Ácido málico (J.T. Baker)	

Cloruro de hierro (MACRON CHEMICALS)	Kit de tinción de gram (HYCEL)
Cloruro de lantano (SIGMA-ALDRICH)	L-Triptófano (SIGMA-ALDRICH)
Cloruro de magnesio (MERCK)	Matriz HCCA (ácido- α -ciano-4-hidroxicinámico) (SIGMA-ALDRICH)
Cloruro de potasio (J.T. Baker)	Molibdato de sodio (J.T. Baker)
Cloruro de sodio (GOLDEN BELL)	Nitrato de Lantano (SIGMA-ALDRICH)
Dextrosa Anhidra (J.T. Baker)	NPK (Vigoro)
Etanol grado HPLC (GOLDEN BELL)	Óxido de molibdeno (SIGMA-ALDRICH)
FeEDTA (SIGMA-ALDRICH)	Piridoxina (SIGMA-ALDRICH)
Fosfato de calcio (SIGMA-ALDRICH)	Sulfato de amonio (J.T. Baker)
Fosfato de potasio dibásico (MACRON CHEMICALS)	Sulfato de amonio (J.T. Baker)
Fosfato de sodio (J.T. Baker)	Sulfato de cobre (J.T. Baker)
Fosfato monopotásico (MERCK)	Sulfato de hierro (J.T. Baker)
Harina de jaiba	Sulfato de magnesio (GOLDEN BELL)
Harina de soya (PISA)	Sulfato de manganeso (GOLDEN BELL)
Hidróxido de potasio (GOLDEN BELL)	Sulfato de zinc (GOLDEN BELL)
Hipoclorito de sodio (Clorox)	Sulfato ferroso (J.T. Baker)

3.2 Metodología

Material biológico

Las bacterias endófitas aisladas de tejidos y suelo de banana usadas en este trabajo como inoculantes fueron obtenidas del cepario del laboratorio 309 de la Universidad Autónoma de Guadalajara, derivadas de investigaciones previas, algunas de estas bacterias componen una formula que se aplica a plantaciones comerciales, la bacteria comercial se aisló de un producto comercializado como FungiFree de FMC que fue utilizado exclusivamente con fines de investigación, y la bacteria de suelo se obtuvo del cepario de bacterias de suelo de una plantación bananera derivado del trabajo de tesis de licenciatura (Olmos-Arriaga, 2020). Las bacterias utilizados fueron *Bacillus velezensis* (P1Vb), *Enterobacter cloacae* (C2) que son endófitas de banana, y la cepa de *B. oceanisediminis* 109.1, proviene de un suelo bananero del Estado de Colima.

Plantas y su origen

Plantas *ex-vitro* de 12 meses de edad fueron compradas en los Asmoles, Colima y transportadas al laboratorio para ser aclimatadas en macetas con un sustrato a base de fibra de coco y perlita y agua corriente.

3.2.1 Crecimiento y determinación de UFC aplicadas en los tratamientos.

Cultivo y activación de cepas bacterianas

Se activaron las bacterias directamente del cepario de agar de soya tripticaseína, se tomó un fragmento de agar de un cultivo almacenado en un vial de plástico y se colocó en una caja Petri para ser incubado por 16 horas. Se sembraron las 3 bacterias en agar soya tripticaseína mediante la técnica de aislado como en la figura. Se incubó durante 18 horas a 30°C hasta tener la certeza de que la bacteria estaba pura, evaluando tal pureza mediante una tinción de Gram. Se inoculó el medio de cultivo caldo de soya tripticaseína al 50% mediante rayado en placa y se incubó durante 18 horas en un agitador orbital a 150 rpm a 30°C.

3.2.2 Ajuste de la población bacteriana para el inóculo inicial.

En un matraz de Erlen-Meyer con 45 mL de caldo de soya tripticaseína estéril, se inocularon 5 mL de cada bacteria ajustada con solución salina glucosada. Después de la incubación por 16 horas, se tomó el cultivo bacteriano del incubador y se centrifugaron 10 mL en un tubo cónicos tipo Falcon a 7,000 rpm, 7 minutos a 4°C. Se realizaron 2 lavados con solución salina al 0.9%, la biomasa se resuspendió en solución salina glucosada 0.9%. Para el ajuste se utilizó como blanco la solución salina glucosada, en el espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 25). Se midió la absorbancia del concentrado y a partir de ahí se ajustó la bacteria hasta tener una absorbancia de 1 a una OD_{600 nm}.

3.2.3 Inoculación de medios en harina de soya comercial.

Se preparó el medio de harina de soya comercial al 1%, el cual fue esterilizado y este fue inoculado con la bacteria ajustada a una OD_{600 nm} 1. Se incubó por 16 horas a 30°C y 150 rpm, después de este tiempo se añadió harina de jaiba al 0.1% previamente esterilizada al medio y se incubó por otras 4 horas.

3.2.4 Diluciones seriadas y medición de absorbancia.

Para la medición de la absorbancia en cada tiempo para la construcción de la curva de crecimiento, se tomó el medio de cultivo directamente del agitador orbital 10 minutos antes de la toma de muestra, esta se dejó en reposo para que las bacterias inactivadas sedimentaran y se tomó 1 mL de medio que fue colocado en las celdas para poder medir la absorbancia a 600 nm.

3.2.5 Determinación de la curva crecimiento bacteriano por enumeración de las unidades formadoras de colonias (UFCs) por diluciones seriadas y plaqueo

Se hicieron diluciones seriadas para el tiempo 0 (T_0) correspondiente al tiempo de la inoculación de la bacteria. Se realizaron plaqueos de las diluciones desde la dilución 2 hasta la 5 en agar para métodos estándar. En el tiempo 16 horas (T_{16}) de incubación se tomó una muestra de 100 μ L, antes de la aplicación de la harina de jaiba. Las diluciones seriadas se realizaron colocando 900 μ L de solución salina y 100 μ L del tubo anterior, se agitó con la ayuda del vortex y así sucesivamente. En esta hora se realizaron plaqueos dependiendo del crecimiento de la bacteria, se hicieron de la 6-10. A las 20 horas (T_{20}) se tomó muestra para realizar el plaqueo muy similar al de las 16 horas, plaqueos de la dilución 6 a la 10. Los tiempos de colecta para la construcción de la curva de crecimiento fueron cada 4 horas.

3.2.6 Adaptación de las plantas antes de la inoculación de bacterias y la aplicación de las tierras raras.

Las plantas utilizadas, fueron plantas de banano micropropagadas de 12 meses de edad, en ambiente controlado. Se pasaron a macetas con fibra de coco con perlita (75/25) estéril. Se mantuvieron durante 2 semanas en adaptación a una temperatura de 30° C, 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad. Se irrigaron con 50 mL de agua cada tercer día.

a) Irrigación de las plantas

Tras 2 semanas de adaptación se realizaron (7 o 9) grupos de 10 plantas cada uno.

3.2.7 Tratamiento de las plantas.

Aplicación de los biológicos y los químicos

Los tratamientos se aplicaron cada semana, se colocó 30 mL cercano al tallo, no se irriego con agua hasta después de dos días del riego con el tratamiento.

En la tabla 4 se presentan las especificaciones de cada lote de plantas y sus tratamientos durante 15 semanas. Cada 5 semanas se tomaron 3 plantas para recolectar microorganismos y hacer mediciones de crecimiento. Se realizaron 9 tratamientos.

a) Fechas de aplicación.

Fechas de aplicación y las semanas en las que se aplicaron los 7 tratamientos del primer lote de plantas.

Tabla 4. Número de lote y especificaciones de los tratamientos para las plantas, en el lote 2 de plantas. En este ensayo se añadió un lote extra que incluía la aplicación de una bacteria comercial.

Lote	Especificaciones
Lote 1	Agua
Lote 2	NPK al 10%
Lote 3	Cloruro de lantano 10 ppm
Lote 4	Nitrato de lantano 10 ppm
Lote 5	Harina de soya estéril 1% y harina de jaiba al 0.1%
Lote 6	P1vb – <i>Bacillus velezensis</i> (3.20x10 ⁹ UFC/mL)
Lote 7	C2 – <i>Enterobacter cloacae</i> (6.70x10 ⁸ UFC/mL)
Lote 8	F1N – Bacteria comercial (2.70x10 ⁷ UFC/mL)
Lote 9	109.1 – <i>Bacillus oceanisediminis</i> (6.30x10 ⁸ UFC/mL)

3.2.8 Determinación de parámetros de crecimiento en plantas tratadas.

Se realizaron mediciones de las plantas cada dos semanas iniciando en la semana 0. Con ayuda de un Vernier se tomaron las medidas del ancho del tallo de todas las plantas, con una regla de 30 cm se midió el alto de tallo.

En la semana 0 se contaron el número de hojas totales y se marcó la última hoja formada. Posteriormente cada semana se contaban cuantas hojas nuevas tenía la planta después del punto más alto.

- a) Las raíces fueron contadas cada 5 semanas de la misma planta para evitar que las plantas se estresaran cada dos semanas.
- b) Los pelos radiculares se observaron en el microscopio con tinción diaminobencidina (DAB) con azul de anilina al 1%.

3.2.9 Recuperación y enumeración de las bacterias endófitas activadas.

Se seleccionaron plantas de cada lote de tratamiento que se usaron para la recuperación de microorganismos endófitos (activados) a las 5, 10, 15 y 20 semanas de tratamiento. Primeramente, una vez separadas las plantas de las macetas, fueron lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de sustrato y polvo. Posteriormente se lavaron en orden secuencial con hipoclorito de sodio al 0.6% durante tres minutos, alcohol al 80% durante un minuto y tres lavados con agua destilada estéril durante un minuto cada uno, con la finalidad de eliminar los agentes sanitizantes (Figura 7). Las plantas fueron secadas del exceso de agua con una toalla de papel estéril bajo campana de flujo laminar.

Posteriormente, las plantas fueron cortadas en secciones correspondientes a las hojas, tallo y raíces hasta tener 1 gramo de cada sección de tejido (Figura 6). El tejido fue macerado con 9 mL de solución salina estéril (0.9%) y se plaquearon 100 μ L de la dilución madre y las diluciones 1, 2 o 3 en medio tripticaseína de soya. También se plaquearon las diluciones 2, 3 y 4 de la tierra cercana a la raíz. Las muestras incubaron por 72 horas, para obtener el número de unidades formadores de colonia sobre gramo (UFC/gr).

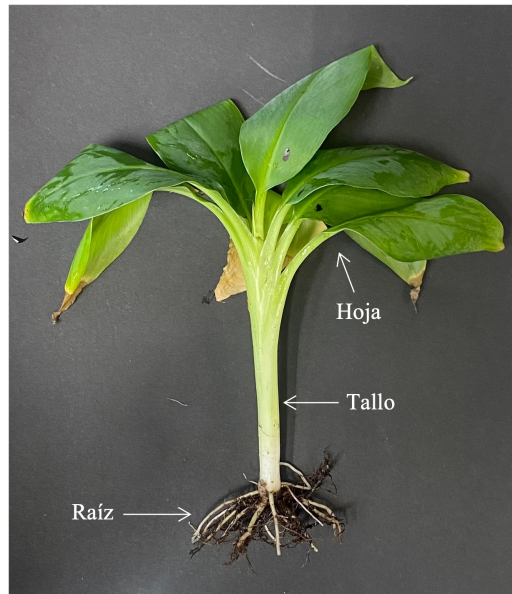


Figura 6. Secciones de tejido de las plantas de banana que fueron colectadas para la enumeración, aislamiento y caracterización funcional de bacterias endófitas post-tratamiento.

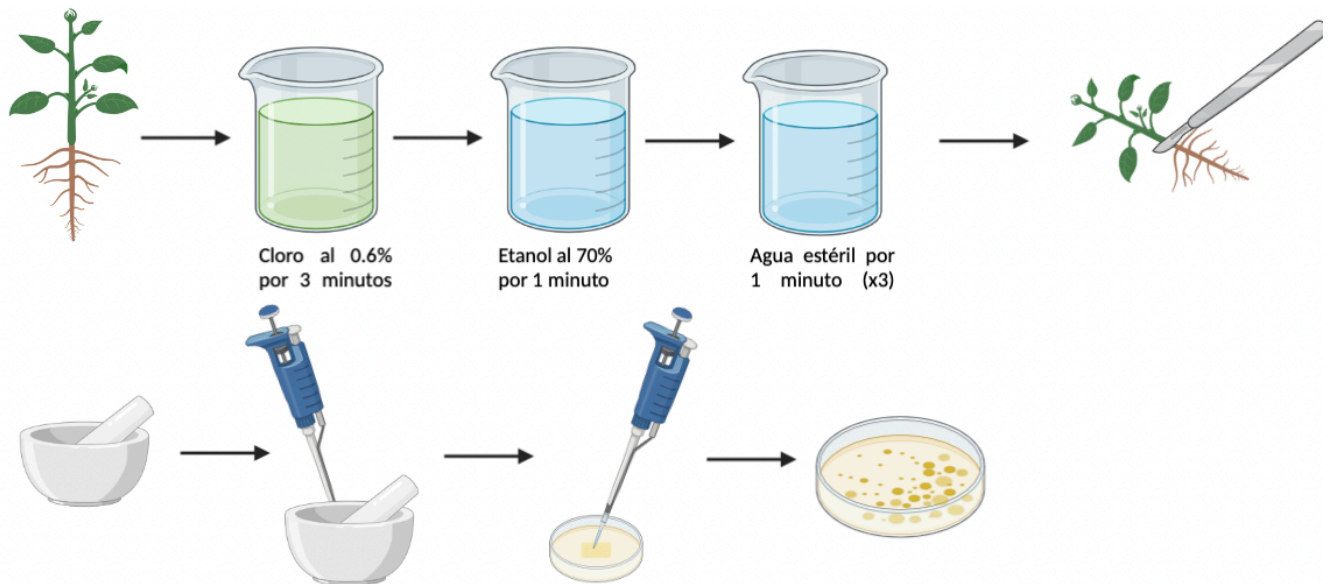


Figura 7. Protocolo del lavado de plantas para eliminar microorganismos epifitos y recuperar los microorganismos endófitos activados de las plantas tratadas y el control.

3.2.10 Identificación de bacterias aisladas recuperadas de los tejidos internos tratados con bacterias y tierras raras por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Se seleccionaron las colonias con características de morfología colonial diferente del medio de cultivo y estas fueron resembradas mediante aislados secuenciales hasta obtener cultivos puros. Se confirmó la pureza de los aislados por el análisis microscópico de células bacterianas fijadas y teñidas con Gram.

a) Preparación de la matriz HCCA para el análisis de espectrometría de masas.

En un tubo Eppendorf nuevo, se pesó 10 mg de alfa-ciano-4-hidroxi-ácido cinámico (HCCA) y en el mismo tubo se agregó 500 μL de acetonitrilo, 475 μL de agua MilliQ y 25 μL de ácido trifluoroacético. Posteriormente, se colocó en el vortex y se guardó en el refrigerador a 3°C.

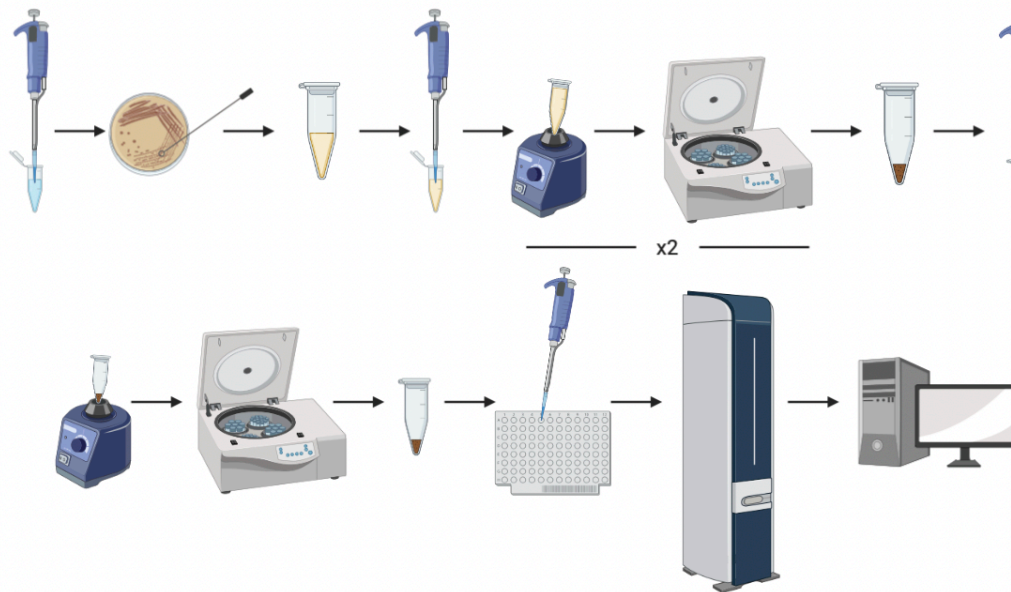


Figura 8. Esquema de la metodología para la extracción y análisis de proteínas ribosomales bacterianas usando espectrometría de masas MALDI-TOF.

b) Extracción de proteínas ribosomales de células bacterianas.

En tubos cónicos tipo Eppendorf de 1.6 mL nuevos se añadieron 300 μ L de agua MilliQ para suspender de 3 a 4 colonias provenientes de un cultivo de 14-16 horas y se agitaron vigorosamente por 10 segundos. Se adicionó a la suspensión bacteriana 700 μ L de etanol grado HPLC y fueron agitados en un vortex durante 5 segundos. La suspensión fue centrifugada por 2 minutos a 12,000 rpm en una microcentrífuga. Se eliminó el sobrenadante con cuidado para no eliminar el pellet. El tubo se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, para fines de eliminar todo el líquido y dejar el pellet celular libre. Los tubos se dejaron secando al aire por espacio de 10-20 minutos. Al pellet se le colocó ácido fórmico y acetonitrilo grado HPLC (10-40 μ L) dependiendo del tamaño del pellet y este fue agitado hasta resuspender, para después centrifugarlo a las mismas condicionadas mencionadas anteriormente, para obtener las proteínas ribosomales en el sobrenadante y residuos de la célula como la pared celular en el pellet (Figura 7).

c) Análisis en el espectrómetro de masas MALDI-TOF e identificación.

Se colocó 1 μ L del sobrenadante de cada extracto de proteínas de cada una de las bacterias purificadas en la placa de acero inoxidable conocida como “plate ground”. Una vez seca la muestra de proteínas, se añadió 1 μ L de la matriz HCCA. Se colocó el plate ground en el espectrómetro de masas MALDI Autoflex Speed (Bruker, Daltonics) y se utilizó el programa Flex Control – Auto Flex TOF/TOF para poder obtener los picos de absorbancia, se utilizó el método MBT_FC, la intensidad del láser se ajustó entre 15 a 50% dependiendo de los picos que se obtuvieron con los primeros disparos (1000 disparos) y se dispararon 4 veces. Se analizaron con el programa MALDI Biotyper Compass Explorer (Bruker, Daltonics) para tener un resultado y un score de identificación de las bacterias analizadas superior o igual a 2.

3.2.11 Pruebas agronómicas.

Preparación de los medios de cultivo para cada prueba.

1. Medio NBrip (solubilización de fosfatos)

Se colocó 200 mL de agua destilada en un vaso de precipitado en una plancha de agitación con mosca. Posteriormente, se agregó 20 g/L de dextrosa anhidra, 5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L KCl, 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se agregó 300 mL

de agua destilada, se ajustó el pH hasta llegar a 7 y posteriormente se agregó 15 g/L de agar bacteriológico.

2. Medio NFB-malato (fijación de nitrógeno)

Medio base – Se agregó 5 g/L de ácido málico, 0.5 g/L de K_2HPO_4 , 0.2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/L NaCl, 0.02 g/L CaCl.

Elementos traza – Se colocó 0.2 g/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.235 g/L de $MnSO_4$, 0.2 g/L H_3BO_3 , 0.25 g/L $CuSO_4 \cdot 7H_2O$.

FeEDTA 1.64%

KOH 2N con bromotimol al 5X

Solución vitamínica – Se agregó 0.1 g/L de biotina y 0.2 g/L de piridoxina.

Se colocó en un matraz 991 mL/L de medio base, 2 mL/L de elementos traza, 2 mL/L de KOH con bromotimol, 4 mL/L de FeEDTA, se aforó al volumen deseado y se ajustó el pH a 5.5, se agregó 15 g/L de agar bacteriológico. Después de esterilizarse se agregó 1 mL/L de solución vitamínica previamente esterilizada por filtración con membrana. Tras la esterilización se colocó 1 mL de agar en tubos Eppendorf.

Un resultado positivo de este medio es el crecimiento de la colonia en el tubo y un cambio de color del medio de verde a azul.

3. Medio para valoración de la producción de auxinas

Se realizó el medio de caldo de tripticaseína de soya al 50% para poder inocular las bacterias, posteriormente se realizó un caldo de tripticaseína de soya al 50% adicionado con L-Triptófano al 5mM, esterilizando la solución de L-Triptófano mediante filtración para posteriormente adicionarla al caldo. Se inoculó el caldo tripticaseína de soya al 50% mediante asada y se dejó incubando durante 18 horas. Posteriormente, se inoculó el caldo de tripticaseína de soya al 50% adicionado con L-Triptófano con 1 mL del caldo anterior y se dejó incubando durante 3 días.

Pasados los 3 días, se centrifugaron las muestras durante 7 minutos a 7,000 rpm a 4°C y se tomaron 450 μ L, se reveló mediante el reactivo de Salkowski (0.26 gramos de $FeCl_3$ en 2mL de agua, se tomó 400 μ L de la solución y se agregó a 20 mL de una solución de ácido

perclórico al 35%) agregando 450 μ L del reactivo al sobrenadante previamente tomado. Se dejaron reaccionar durante 40 minutos.

Un resultado positivo de esta prueba es que la solución tenga un viraje de color a rosa que nos indica positivo a producción de ácido indolacético, un color naranja o rojo nos indica positivo a alguna auxina no específica en esta prueba.

4. Medio de ACC deaminasas (1-aminociclopropano-1-carboxilato)

Se realizó la solución de elementos traza con 0.1 g/L de H_3BO_3 , 0.1119 g/L de $MnSO_4$, 1.246 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.7822 mg/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.1 g/L de MoO_3 . Después se hizo la solución de sulfato de hierro, colocando 100 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en 10 mL.

Posteriormente se hizo el medio DF, colocando 4 g/L de KH_2PO_4 , 6 g/L de $NaHPO_4$, 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L de glucosa, 2 g/L de ácido glucónico, 2 g/L de ácido cítrico, 0.1 mL/L de solución de elementos traza, 0.1 mL/L de solución de sulfato de hierro, se ajustó el pH a 6.8, posteriormente se agregó 15 g/L de agar bacteriológico, se aforó al volumen deseado y se esterilizó en la autoclave.

Una vez estéril se añadió 6 mL/L de ACC 0.5 M, previamente esterilizado mediante filtración por membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m, al medio DF para después vaciarlo a cajas.

5. Medio de Sideróforos

Antes de la preparación del medio, se lavaron todos los materiales con HCl al 6M durante una hora, después se enjuagaron con agua MilliQ y se dejaron secar.

Se prepararon dos soluciones para un volumen total de 300 mL, la solución uno se preparó 0.018 g de CAS en 15 mL de agua MilliQ, se preparó un stock de $FeCl_3$ en 10mM de HCl con 0.0027 g de $FeCl_3$ en 10 mL de HCl al 10mM de donde solo se tomaron 2.7 mL, posteriormente se pesó 0.0219 g de CTAB (HDTMA) para 12 mL de agua MilliQ, se vaciaron en un matraz y se le agregó 30 mL de agua MilliQ, mientras se mantuvo en agitación. Para la solución 2, se disolvió 7.25 g de PIPES en 225 mL de agua MilliQ, se ajustó el pH a 6.7 - 6.8 (la solución se torna transparente) con NaOH al 50%. Una vez ajustado se agregó 4.5 g de agar bacteriológico. Ambas soluciones se meten a esterilizar por separado. Una vez estériles, ambas soluciones se mezclan con el cuidado de no formar espuma, se vierte

la solución conteniendo el CAS en la de PIPES y se le agregan 3 mL de glucosa al 20% esterilizada por filtración.

6. Procedimiento de inoculación de la bacteria en la prueba.

Se activaron las bacterias seleccionadas para las pruebas agronómicas del cepario en agar tripticaseína de soya, se dejaron 18 horas incubando y se hicieron dos resiembras previas a las pruebas se dejaron incubando durante 18 horas a 30°C.

7. Descripción de la prueba de auxinas y ácido indol acético

Se inoculó 5 mL de medio tripticaseína de soya, a las 18 horas de incubación, se tomó 1 mL del caldo y se inocularon 3 mL de medio tripticaseína de soya al 50% y se incubó durante 18 horas. Se inocularon 3 mL de caldo tripticaseína de soya al 50% adicionado con 5mM de L-Triptofano, se dejaron en incubación durante tres días. Pasados los tres días se realiza el revelado con el reactivo de Salkowsky.

8. Descripción del procedimiento de la prueba de solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, proteasas y ACC deaminasa.

Del caldo tripticaseína de soya inoculado para la prueba de auxinas, se tomó 1 mL del medio y se centrifugó a 12,000 rpm por dos minutos. Se decantó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con solución salina con 500 µL. Tras los lavados se le agregó 500 µL de solución salina y se agitó vigorosamente hasta tener las células resuspendidas. Una vez las células se encontraban resuspendidas, se tomó un asa de nicromo para picado y se picó por duplicado cada medio. El medio de proteasas se incubó durante 20 horas, todos los medios restantes se dejaron incubando 3 días.

En la tabla 5 y la figura 9, se presenta la descripción y aspecto del medio de la valoración de cada prueba agronómica (positiva o negativa) realizada para caracterizar la funcionalidad de las bacterias endófitas obtenidas de cada tratamiento. Las pruebas de sideróforos, NFB-malato y auxinas se consideran positivas cuando hay un cambio de color en el medio. En la prueba de proteasas y NBrip se considera positivo cuando se observa la formación de un halo en un medio con fondo turbio o el crecimiento de las colonias en un medio libre de nitrógeno y suplementado con ACC (ACC deaminasa).

Tabla 5. Valoración de las pruebas agronómicas promotoras del crecimiento de plantas

Medio	Valoración positiva
NBrip	Formación de halo transparente en el medio
NFB-malato	Viraje de coloración de verde a azul
Auxinas	Tras revelado, coloración rosa indica ácido indol acético.
ACC deaminasa	Crecimiento en el medio
Sideróforos	Viraje de color de azul a rojo en forma de halo
Proteasas	Formación de halo transparente en el medio

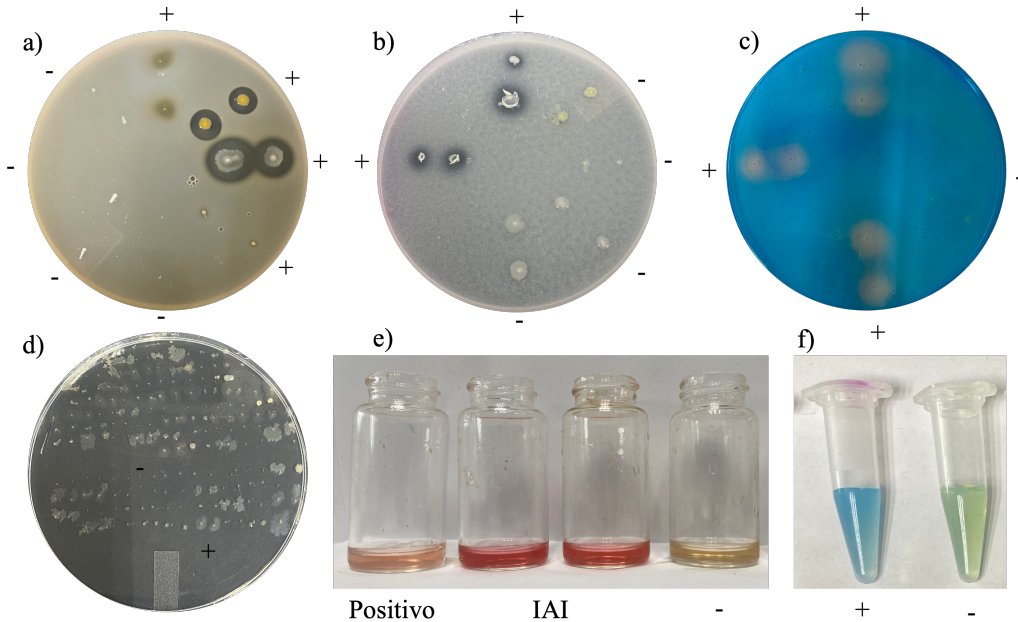


Figura 9. Características de las pruebas de funcionalidad agronómica consideradas positivas y negativas en los diferentes medios utilizados. a) proteasas, b) NBrip, c) sideróforos, d) ACC deaminasa, e) auxinas y f) NFB

3.2.12 Pruebas de antagonismo e inhibición con hongos y bacterias patógenas.

Se realizó una selección de microorganismos patógenos de plantas aislados en el laboratorio, para las pruebas de inhibición con bacterias se probaron 40 bacterias aisladas de los tratamientos con *Bacillus velezensis* enlistadas en el cuadro 9. La evaluación se hizo utilizando una cepa de *Kosakonia cowanii* aislada de lesiones de agave (pudrición del cogollo), *Colletotrichum sp.* aislado de lesiones antracnoticas de mango (M2), *Phytophthora cinnamoni* aislado de aguacate y un hongo aislado de lesiones en flores de coco (6octDC4).

a) Inhibición de bacterias

Para la prueba de inhibición de la cepa de *Kosakonia*, se inocularon 40 bacterias endófitas aisladas de las plantas tratadas con *Bacillus* en 5 mL de caldo de tripticaseína de soya al 50% y se dejaron 16 horas en incubación a 30°C a 130 rpm. Después de la incubación se centrifugaron a 7,000 rpm por 7 minutos a 4 °C y se lavaron 3 veces con solución salina y después las células se ajustaron a una absorbancia de 0.2 a 600 nm. Una vez ajustadas todas las bacterias 10 µL de cada bacteria fueron inoculados en círculos de papel filtro y se dejaron reposar durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, los discos fueron colocados e incubados sobre agar tripticaseína de soya (TSA) y se dejaron en incubación por 16 horas. Por otro lado, células de *Kosakonia* se inocularon en 5 mL de caldo tripticaseína de soya al 50%. La bacteria se dejó en incubación 16 horas a 130 rpm a 30°C. Se realizaron 3 lavados y se ajustó a 0.2 de absorbancia y se colocó 100 µL en una caja con agar casoy al 50% y se colocó un disco de papel de cada bacteria sobre el agar y se dejaron incubar durante 18 horas hasta la aparición de los halos de inhibición. Este mismo procedimiento fue realizado para determinar si las cepas endófitas recuperadas son inhibidoras de la cepa de *B. velezensis*.

b) Inhibición de hongos

Para las pruebas de inhibición de hongos, las cepas fueron resembradas en agar de papa dextrosa y se colocó un fragmento circular del hongo + agar en la mitad de la caja nuevas. Se incubó hasta por 5 días hasta tener micelio activo. Se marcaron líneas a una distancia de 1 cm y con 3 cm de largo. En cada línea se inoculó una bacteria. Las placas se incubaron durante 4 días hasta que se observara la inhibición, retención o no efecto sobre el crecimiento del hongo.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1 Resultados

Los objetivos principales de esta investigación fue evaluar el efecto en el crecimiento en las plantas de banano y la activación del microbioma endófito en respuesta a la aplicación de tratamientos biológicos y químicos, incluyendo dos tipos de fertilización. Para llevar a cabo estos ensayos se decidió utilizar dos bacterias que provienen de la endosfera de las hojas y una del suelo de una plantación bananera; así también dos sales de lantano que fueron seleccionadas en un modelo de maíz y que de acuerdo con la literatura tienen un efecto en la fertilización de las plantas.

Nuestro primer objetivo de este proyecto fue determinar la cinética de crecimiento de las bacterias utilizadas en este estudio y además conocer el número de unidades formadoras de colonias que fueron aplicadas en cada tratamiento.

4.1.1 Determinación de la cinética de crecimiento y de UFC de bacterias endófitas aplicadas en las plantas de banana.

En la figura 9 se muestra que la bacteria C2 (*E. cloacae*) inicia (T_0) con una cantidad de 1.06×10^8 UFC/mL. De acuerdo con el incremento de UFCs observado, la bacteria completa su fase logarítmica en las primeras 4 horas (T_4), en las que se alcanza un valor de hasta 5×10^8 UFC/mL. La cinética de crecimiento no presenta cambios sustanciales en el número de UFCs/ml hasta una vez alcanzadas las 16 horas de cultivo, donde el número de UFCs entre T_{12} y T_{16} llega a las 9.50×10^8 UFC/mL. Después de este tiempo la cantidad de UFCs baja a 6.7×10^8 UFC/mL. No se observa un incremento después de la adición de harina de jaiba como fuente de quitina y proteína. También en la bacteria P1vb (*B. velezensis*) se determinó su cinética de crecimiento. El cultivo en T_0 arranca con 2.3×10^6 UFC/mL y después de las primeras 4 horas de cultivo, llega a una cantidad de 3.80×10^6 UFC/mL, por lo que consideramos este tiempo como la fase Lag. De acuerdo a los números de UFCs, la fase logarítmica tiene una duración de 8 horas (T_4 hasta T_{12}). En el T_8 , que es la fase media logarítmica se contaron 2.40×10^7 UFC/mL. La fase estacionaria inicia en el T_{12} con un total de 3.2×10^8 UFC/mL. En el tiempo T_{16} se aplicó la harina de jaiba al 0.1% donde se observa un incremento de una unidad llegando hasta 3.2×10^9 UFC/mL. La bacteria comercial (F1N) comienza el T_0 con 2×10^6 UFC/mL y se mantiene hasta 5.65×10^6 UFC/mL en el T_4 . desde T_8 hasta la T_{16} completa la fase logarítmica alcanzando hasta 1.15×10^9 UFC/mL. La adición de

harina de soya no tiene un efecto sobre el crecimiento y después de T16, el cultivo decae a una cantidad de 2.5×10^7 UFC/mL.

La bacteria de suelo *B. oceanisediminis* (109.1), inicia con 6.20×10^5 UFC/mL, teniendo desde este momento hasta las T₁₂ una fase logarítmica que llegó a 5.5×10^8 UFC/mL, desde las 12 horas hasta las 20 horas se mantuvo una fase estacionaria terminando con 6.3×10^8 UFC/mL.

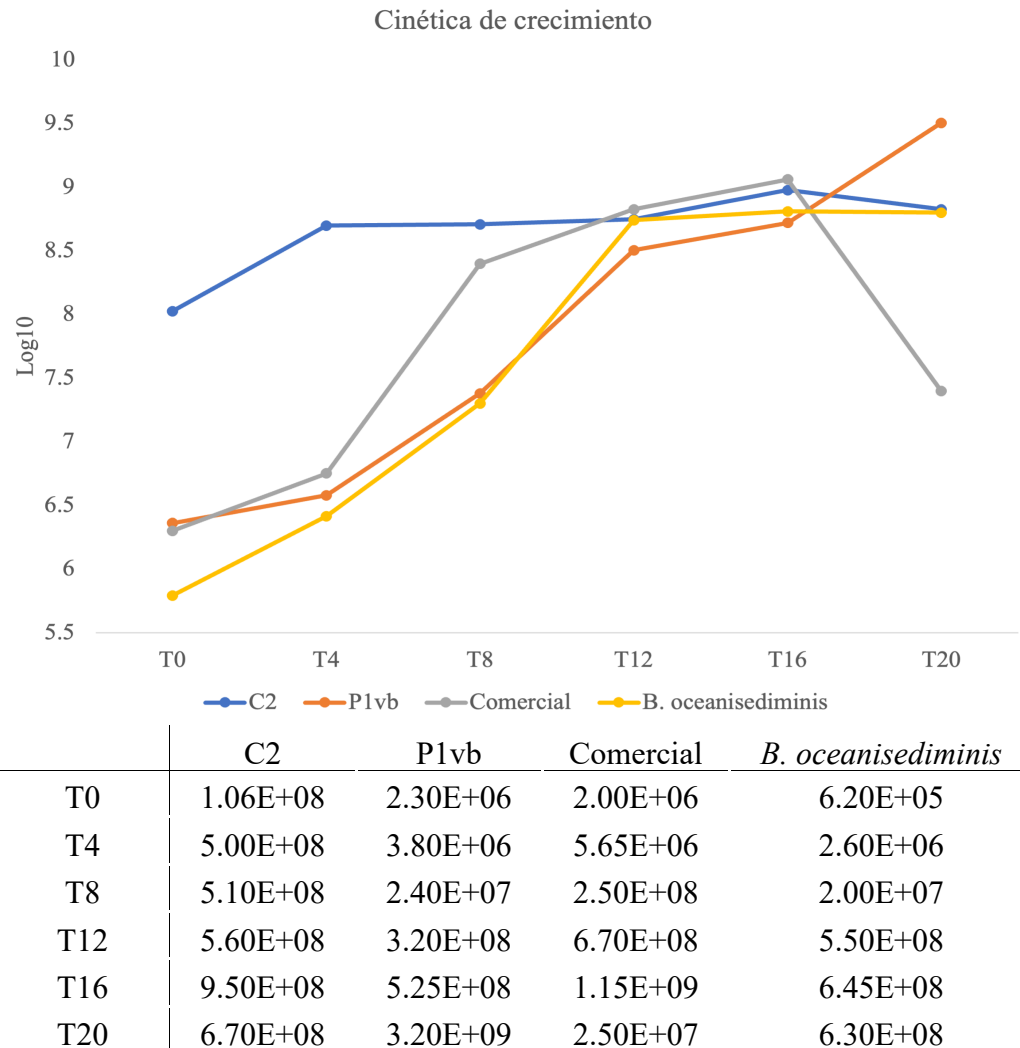


Figura 10. Cinética de crecimiento (Log_{10}) de 4 bacterias inoculadas en medio de cultivo harina de soya 1% + 0.1% MgSO_4 adicionado con harina de jaiba (0.1%) a las 16 horas. La tabla insertada en la figura muestra los números de UFC's alcanzados en el cultivo durante 20 horas de incubación.

Una vez estandarizadas las cantidades de bacterias y lantánidos se hicieron aplicaciones semanales hasta por 15 semanas, para medir los efectos sobre el crecimiento de las plantas midiendo distintos parámetros y observando el comportamiento de vigor y clorosis de las hojas.

4.1.2 Efecto en el crecimiento de las plantas de banana por la aplicación de bacterias endófitas y lantánidos.

Las plantas usadas para la experimentación, fueron tratadas semanalmente y por cada 5 semanas hasta la semana 15. En cada tiempo se midieron parámetros del crecimiento incluida la altura y ancho del tallo, número de hojas nuevas (emergencia de hojas), y el número de raíces, peso fresco y peso seco total únicamente en la semana 15.

La figura 11, muestra el análisis estadístico del comportamiento del crecimiento de las plantas tratadas con bacterias y tierras raras. En este análisis se presentan las diferencias entre lotes de tratamiento (letras minúsculas) y las diferencias a través del tiempo de cada tratamiento (letras mayúsculas). Con respecto a la diferencia del crecimiento basado en la altura del tallo, observamos que a las 5 semanas existen diferencias estadísticamente significativas entre los lotes de plantas tratadas con la harina de soya como fertilizante orgánico (2.05 ± 0.98 cm), así como en las bacterias P1Vb (*B. velezensis*) con un tamaño de 2.35 ± 1.16 cm y la bacteria comercial (*B. amyloliquefaciens*) con 2.15 ± 0.75 cm. Observamos que el incremento en la altura del tallo inducida por C2 (*E. cloacae*) de aproximadamente 3.05 ± 0.55 cm fue superior a los otros grupos de plantas en este tiempo. Sin embargo, el lote tratado con nitrato de lantano $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ presentó el menor crecimiento del tallo con 0.75 ± 0.72 cm, seguido del tratamiento con LaCl_3 (1.1 ± 0.57 cm) y la bacteria de suelo (*B. oceanisediminis*) con 1.15 ± 0.71 cm. A las 10 semanas se comienzan a observar diferencias significativas con el crecimiento a las 5 semanas. Entre grupos las respuestas a la inoculación fueron agrupadas en 4, que incluyen al agua (control), LaCl_3 y $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ en el primer grupo, a NPK y *B. oceanisediminis* en el segundo, harina de soya, P1vb y F1N en el tercero y a C2 en un cuarto grupo. Entre el tiempo 5 y 10, los grupos que tuvieron un estancamiento en el crecimiento fueron el control (H_2O) y los lantánidos.

Las plantas tratadas con harina de soya y C2 tuvieron un crecimiento ligeramente mayor a 1 cm. Después de 15 semanas, observamos diferencias significantes nuevamente en los grupos

correspondientes a la harina de soya, P1vb C2 y F1N quienes incrementaron respectivamente 1.31 ± 0.84 , 1.56 ± 0.56 , 1.75 ± 0.71 y 1.50 ± 0.89 centímetros. Los lotes que tuvieron el menor incremento fueron el control (0.56 ± 0.42 cm), Nitrato de lantano (0.63 ± 0.52 cm) y 109.1 (0.63 ± 0.58 cm). Los unico lotes que al final muestran diferencias con respecto al tiempo fueron la harina de soya, P1Vb y C2.

El segundo parametro de medición sobre el efecto de las inoculaciones en las plantas fue el grosor del tallo. En la semana 5, los grupos que no presentan diferencia significativa fueron el control de agua, NPK, LaCl₃, y 109.1. Por otra parte los grupos que si mostraron una diferencia pertenecen a la harina de soya que mostro un aumento de 2 ± 0.46 mm, la bacteria C2 con 2.75 ± 0.83 mm, F1N 2.28 ± 0.71 mm, 1.83 mm en P1vb y LaCl₃ con 1.69 ± 0.95 , siendo este ultimo dentro de este grupo de pruebas, el que menor efecto tuvo en el tiempo. Se observo la misma tendencia del grosor del tallo respecto en las siguientes semanas de medición, con una disminución en la tasa de crecimiento respecto a la semana 5, lo que sugiere nuevamente un estancamiento del crecimiento como se observa claramente en los tiempos 10 y 15. Aparentemente los tratamientos que indujeron la mayor altura se observo en las plantas tratadas con C2 y harina de soya.

La emergencia de hojas aumento en las primeras 5 semanas y después se detiene. En el número de hojas los tratamientos biológicos (C2, F1N, P1vb y 109.1) presentan diferencias significativas entre la semana 10 y 15 de seguimiento y en la aplicación de harina de soya. En el seguimiento se observó en promedio que durante todo el ensayo el mayor número de hojas nuevas fueron formadas en el lote de la harina de soya con 3.24 hojas y las bacterias F1N 3.48 hojas, P1vb con 4 hojas nuevas, C2 con 4.2 hojas nuevas totales. Este conjunto de ensayos muestra también que aunque la soya es el vehículo de aplicación de las bacterias, entres estas se mantienen comportamientos diferentes, lo cual diferencia el efecto de las bacterias con respecto a la harina.

La figura 12, presenta los aspectos macroscópicos de plantas de los lotes tratados. En resumen, el crecimiento aéreo fue ligeramente mayor en los tratamientos con P1vb, C2 y harina de soya y *B. amyloliquefaciens*. Los dos tratamientos con menor crecimiento aéreo fueron con el nitrato de lantano y la bacteria 109.1.

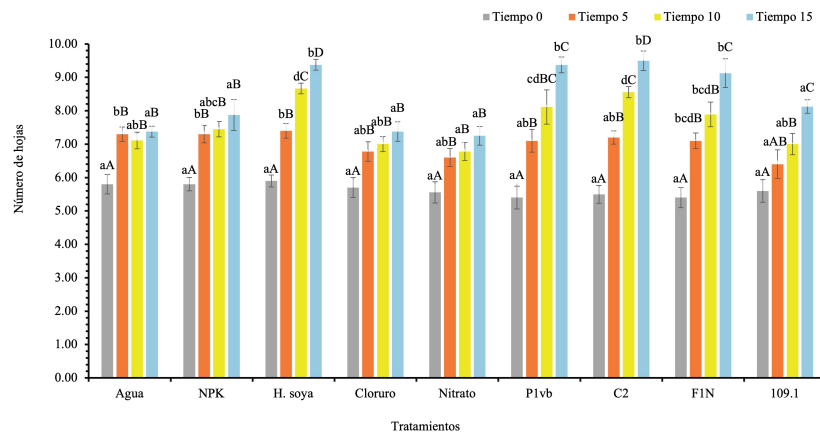
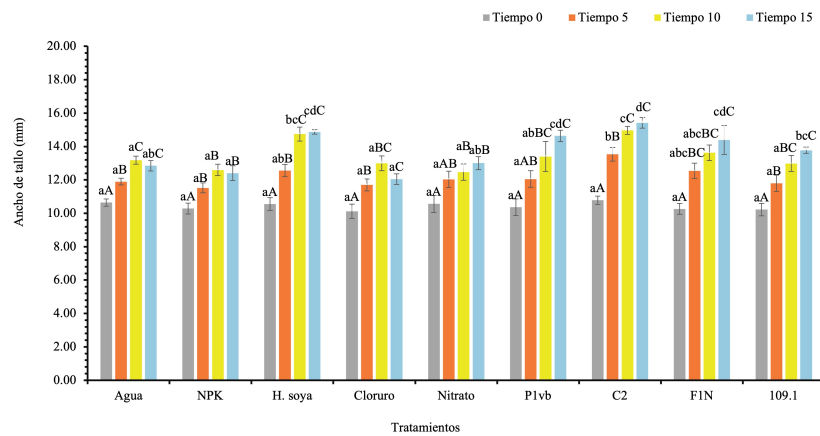
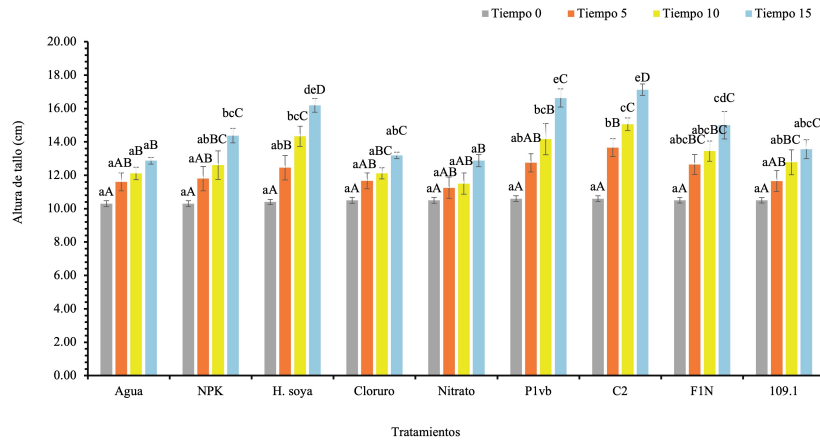


Figura 11. Comportamiento en los parámetros de crecimiento de plantas de banana Cavendish inducidos por la aplicación de bacterias y tierras raras desde la semana 0 hasta la semana 15. En este análisis se observan diferencias entre lotes de tratamiento (letras minúsculas) y las diferencias a través del tiempo de cada tratamiento (letras mayúsculas).



Figura 12. Aspecto del crecimiento aéreo de plantas con tratamientos químicos y biológicos después de 15 semanas. Las plantas tratadas con las bacterias endófitas C2 y P1vb presentaron el mayor crecimiento aéreo. Por otra parte las plantas con menor crecimiento fueron tratadas con *B. oceanisediminis*, agua y NPK.

En la figura 13 y 14 se presenta tanto el aspecto macroscópico del tipo y el número de raíces en todos los lotes tratados. El número final de la raíces en las plantas tratadas con nitrato de lantano tuvieron hasta 16 raíces, seguido de P1vb y F1N con 13 raíces, cloruro de lantano y 109.1 con 12 raíces, C2, agua y harina de soya con 11 raíces y NPK con 9 raíces.

En la figura 14, se muestra el comportamiento en el número de raíces vivas desarrolladas en las semanas 0, 5, 10 y 15. Donde podemos ver que en el tratamiento de nitrato de lantano hay un mayor número de raíces desde la semana 5 (13 raíces) teniendo un incremento de 6 raíces desde la semana 0, en las semanas posteriores aumentó hasta 14 en la semana 10 y 16 en la semana 15. En el tratamiento de agua y NPK, inicialmente con 7 y 5 raíces respectivamente, se observa que en las primeras dos mediciones, semana 5 y 10, hay 10 raíces en promedio en las plantas de agua y 8 raíces en NPK, se mantuvo durante la semana 10 y en la semana 15 hubo un incremento de una sola raíz, con 10 y 9 raíces.

En el tratamiento de harina de soya, inició con 7 raíces en la semana 0, presenta 9 raíces en la semana 5, 11 en la semana 10 y 15. En el tratamiento de cloruro de lantano tiene inicialmente 6 raíces, en la semana 5 fueron 8 raíces, en la semana 10 11 raíces y en la semana 15 alcanza hasta 12 raíces. En los tratamientos de bacterias endófitas, P1vb y C2, se iniciaron con 5 raíces, en la semana 5 hay 8 y 6 raíces respectivamente, en la semana 10 aumentan 3 y 5 raíces alcanzado hasta 9 y 11 raíces. Finalmente en la semana 15 estas plantas formaron 13 y 11 totales.

En el tratamiento con la bacteria comercial las comenzó con 5 raíces, hubo un aumento de 7 raíces en la semana 5 y en la semana 15 hubo un incremento de 6 raíces, terminando con 13. Con la bacteria de suelo se comenzó el tratamiento con 5 raíces, se tuvieron 7 raíces en la semana 5, 10 raíces en la semana 10 y se obtuvieron 12 raíces finales.

La figura 13, se muestra un comparativo de la morfología de las raíces y su longitud. Como se puede observar el control de agua tiene poca cantidad de raíces vivas, sin embargo, tiene raíces muertas que sirven para anclaje. En el tratamiento de NPK cuenta con raíces con una buena longitud, tiene raíces muertas y raíces vivas. En el tratamiento de harina de soya tiene un mayor número de raíces vivas y tienen una mayor longitud que los otros dos controles. Ambos tratamientos de tierras raras tiene buena longitud de las raíces vivas y tienen una

mayor concentración de raíces vivas a comparación de raíces de anclaje. En los tratamientos de bacteria, se puede recalcar la longitud de las raíces de P1vb y C2, también se puede notar que tienen mayor cantidad de raíces vivas a comparación de los otros dos tratamientos de bacterias que son la bacteria comercial (F1N) y la bacteria de suelo (109.1).

En cuanto las raíces, nitrato de lantano y P1vb fueron los tratamientos con mayor longitud, después fueron NPK, C2 y harina de soya se observan a una longitud similar, por último el de agua, cloruro de lantano, *B. amyloliquefaciens* y *B. oceanisediminis* fueron las que se observan con raíces más pequeñas.



Figura 13. Influencia de los tratamientos químicos y biológicos sobre el crecimiento de las raíces. Los tratamientos con nitrato de lantano y P1vb, muestran la mayor inducción en el crecimiento de la masa radicular.

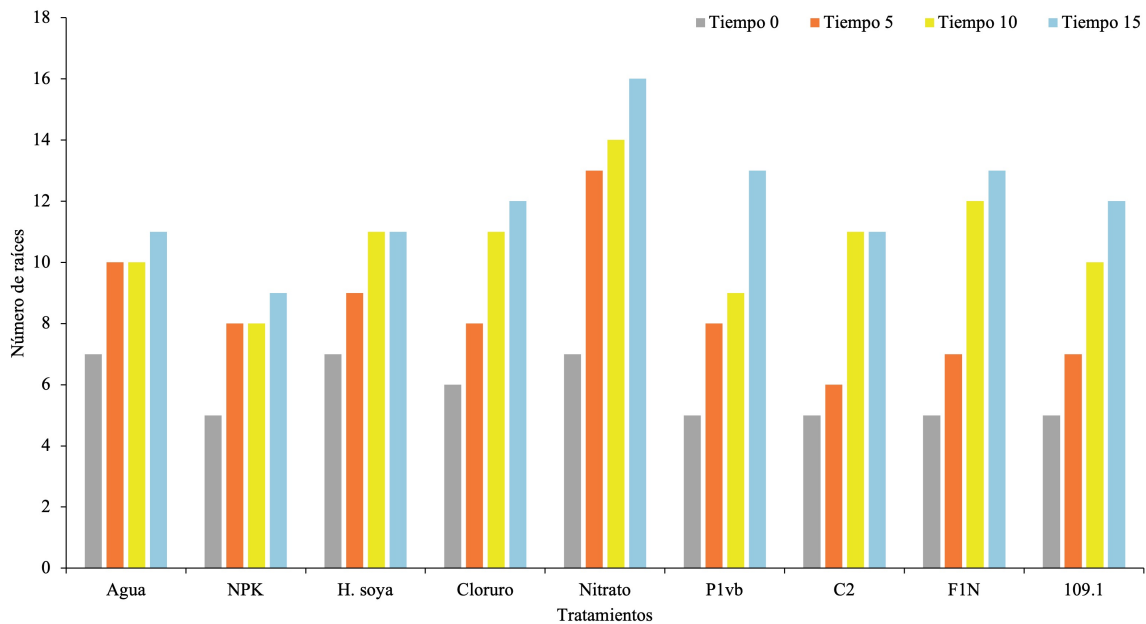


Figura 14. Comportamiento de la formación de raíces (número de raíces totales para cada tiempo) desde el tiempo 0 hasta la semana 15. Se observa que el mayor número de raíces formadas se presenta en el tratamiento con nitrato de lantano.

Con respecto al peso fresco de las plantas, el tratamiento que indujo el mayor peso fresco fue C2 con 55.39gr, seguido de P1vb con 52.60gr, posteriormente harina de soya con 43.23 gr, F1N con 37.14gr, NPK con 32.74gr, 109.1 con 30.39gr, nitrato de lantano con 27.02 gr, cloruro de lantano con 21.93 gr y finalmente agua con 19.36gr.

Por ultimo el panel C, presenta el peso seco donde C2 fue el que tuvo un mayor peso con 3.28gr, P1vb con 3.10gr, harina de soya con 2.72gr, F1N con 2.20gr, 109.1 con 2.14gr, NPK con 2.09 gr, nitrato de lantano con 1.99gr, agua con 1.46gr y nitrato de lantano con 1.37gr.

4.1.3 Contenido de UFCs en tejidos de plantas tratadas después de 5, 10, 15 y 20 semanas de aplicaciones de los tratamientos químicos y biológicos.

El objetivo de enumerar la cantidad de UFCs en los diversos tejidos post-tratamiento se realizó con la intención de medir la colonización en aquellos lotes que fueron inoculados con bacterias endófitas. Sin embargo la oscilaciones en el contenido de bacterias por tratamientos con las tierras raras o el NPK, sugiere que ante el estímulo, existe una respuesta del microbioma, en donde este se activa y en consecuencia crea una respuesta que beneficia a la planta.

En la figura 15, se presentan las diferencias de unidades formadoras de colonias en el tejido de la hoja en la semana 0 se encontró un valor inicial de hasta 1.6×10^2 UFC/gr en casi todos los tratamientos. En la semana 5, el tratamiento control y la cepa comercial mostraron un incremento de hasta 2 ordenes en el número de UFCs alcanzando un valor de 2.99×10^4 por gramo, siendo este el mayor incremento observado en todos los lotes, seguido por el tratamiento con la bacteria *B. velezensis*. En el tratamiento control (agua) en la semana 10 la cantidad de UFCs se redujo a 2.99×10^4 y esta tendencia se mantuvo hasta la semana 15 con 3.07×10^3 UFCs. Para el tratamiento con el fertilizante NPK el mayor incremento de UFC observado ocurre en la semana 10, con hasta 2.03×10^4 UFC/gramo de tejido. Los valores UFC en este tratamiento decaen en la semana 15 casi al mismo número de UFCs presentes en la semana 0.

El tratamiento con harina de soya, aumento la cantidad de bacterias en un orden en la semana 5 (hasta 2.79×10^3 UFC/g) y después bajó en la semana 15 a un valor casi idéntico al inicial. Los cambios en el contenido de UFC por la aplicación de cloruro de lantano muestran una disminución ligera del valor inicial y sube hasta un orden logarítmico hasta la semana 15 (2.75×10^3). El nitrato de lantano, tuvo un incremento de UFCs de casi dos órdenes con respecto al contenido inicial de bacterias comparado con su mismo tratamiento en la semana 10. La enumeración llego 3.04×10^4 , mientras que en la semana 15 regreso a los valores iniciales.

Por otra parte, los tratamientos biológicos también influenciaron en el contenido de UFC en las hojas. Sin embargo el número de UFCs no fue diferente al reportado en los tratamientos no biológicos.

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 15, la cantidad de bacterias cultivables y recuperadas del tallo, fue bastante similar a los números de UFC's encontrados en las hojas, con la diferencia de que las plantas tienen un número mayor de UFC en esta sección de la planta de aproximadamente un orden con respecto a las hojas. Los cambios más significativos ocurrieron en las plantas tratadas con nitrato de lantano en la semana 10 y 15 donde el número de UFCs es de 1 orden superior al inicio de las aplicaciones. Prácticamente todos los lotes comenzaron con una cantidad similar a 3.8×10^3 UFCs.

Solo aquellas plantas tratadas con C2 tuvieron un incremento de casi un orden en la semana 5 (2.52×10^4). En la semana 15 los tratamientos con C2 y 109.1 tuvieron una disminución por debajo del tiempo cero.

En la raíz, el número de UFC en todos los lotes fueron similares a $\text{Log}_{10}=3$ en la semana 0. En los tratamientos con NPK, harina de soya LaCl_3 y 109.1 no se observó un aumento significativo en el número de UFCs en las primeras 5 semanas. Por el contrario los tratamientos con mayor incremento en el número de UFCs en las raíces fue la cepa comercial, seguida de C2, nitrato de lantano y *B. velezensis* (P1vb).

Posterior a la semana 5, solo los tratamientos con C2 y P1vb y la cepa comercial mantuvieron los mismos niveles de UFC durante todo el ensayo, por ejemplo en la semana 15 C2 tuvo 8.3×10^4 UFC/gr de raíz, P1vb (6.85×10^4), F1N (6.8×10^4). el resto de los tratamientos tuvieron una disminución del contenido de bacterias.

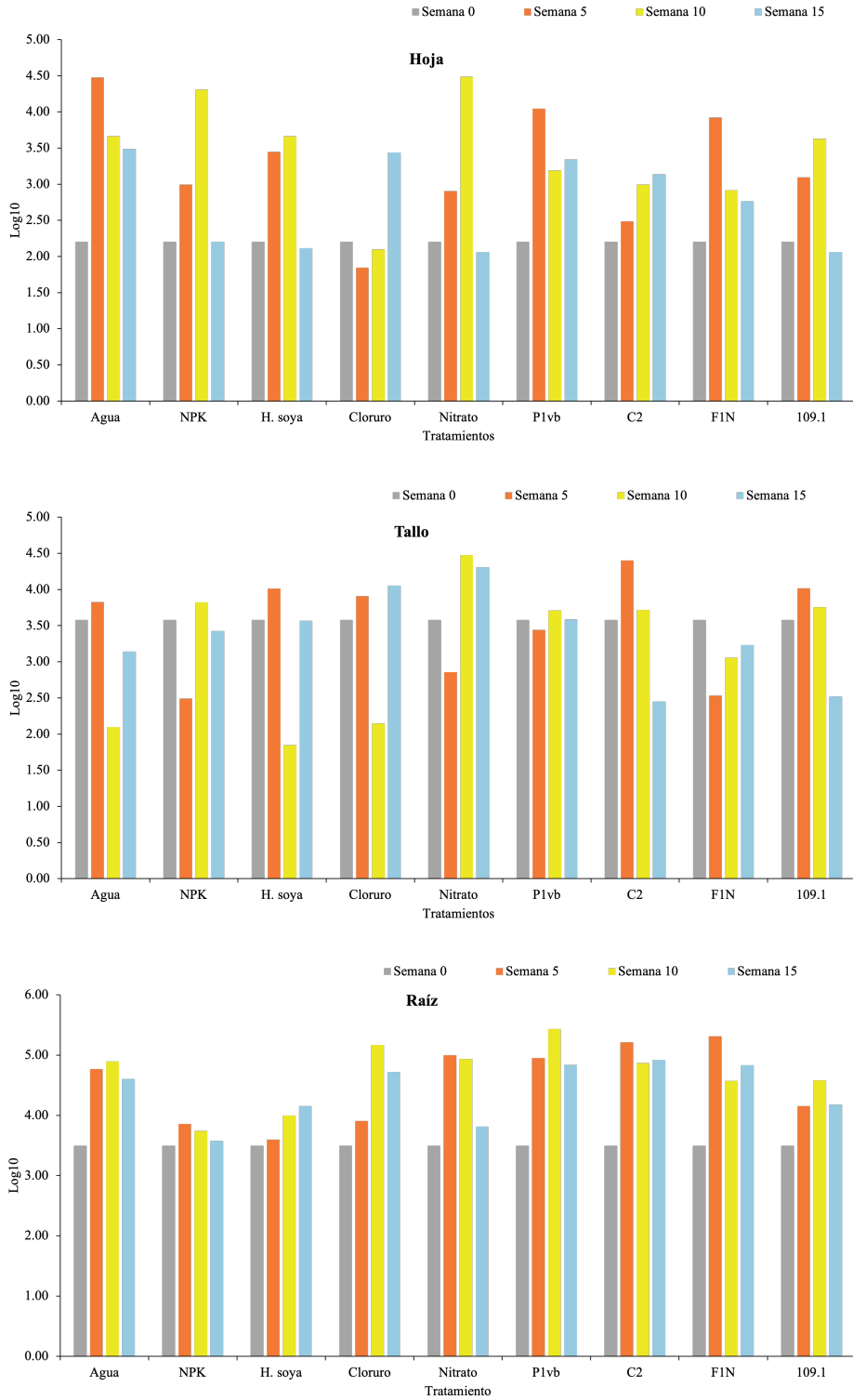


Figura 15. Número de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) de plantas tratadas desde el tiempo 0 hasta las semanas 0, 5, 10 y 15. El comportamiento entre tratamientos es variable.

4.1.4 Análisis de la diversidad filogenética (taxonómica) de los aislados cultivables derivados de los tratamientos biológicos y químicos.

Las plantas albergan una gran cantidad de microorganismos en los tejidos internos, este espacio en las plantas es conocido como la endosfera y los microorganismos que la habitan los nombramos endófitos. Actualmente se ha intensificado el conocimiento de los taxos de grupos microbianos específicos en las plantas, mismos que pueden ser modificados en respuesta a estímulos. Bajo el concepto del “cry for help”, las plantas reclutan microorganismos del suelo que alteran positivamente sus respuestas a patógenos o condiciones como estrés salino o la sequía. Por otra parte el concepto de activación del microbioma no está totalmente entendido y algunas veces puede ser confundido con el reclutamiento. En nuestro caso hemos propuesto que la activación del microbioma involucra microorganismos que no son cultivables y que posteriormente a un estímulo, estos se pueden aislar y al evaluar sus capacidades funcionales contribuyen positivamente a la respuesta que los “despertó”.

Se aislaron bacterias endófitas de las plantas de los 9 lotes tratados, tres plantas por tratamiento por semana. En la figura 16 se muestran la representación de los porcentajes de los filos encontrados en las plantas del segundo lote, donde se hicieron 9 tratamientos diferentes. En las plantas antes de iniciar los tratamientos (semana 0) se aislaron e identificaron la cantidad 16 bacterias, donde de acuerdo a los géneros y especies identificadas, las bacterias fueron clasificadas en un 26.67% como Firmicutes, 13.33% como Betaproteobacteria, 46.67% de Gammaproteobacteria y 13.33% como Actinobacteria. De acuerdo a reportes previos en banana (Beltran-Garcia et al., 2021) esta es una composición cultivable típica en plantas micropropagadas. A continuación se presenta la diversidad taxonómica de acuerdo a las semanas de tratamiento. Los géneros y especies identificados en cada tratamiento con respecto a la semana se presentan en la figura 17.

a) Cambios en la diversidad taxonómica a las 5 semanas.

A las 5 semanas de tratamiento, en las plantas control irrigadas con agua, a partir de una identificación de 25 bacterias derivadas del aislamiento, se encontró una modificación en la composición de las Gammaproteobacteria quienes tienen una abundancia del 66.67%. El filo

de los Firmicutes representaron un 11% juntos con las clases Alfa y Betaproteobacteria completan el 100% de la diversidad.

En contraste en esta semana el tratamiento con NPK presento un 80% de Firmicutes y un 20% de Gammaproteobacterias. Este análisis fue hecho a raíz de una identificación de 26 bacterias. Las plantas tratadas con harina de soya como vehículo de las bacterias y nutriente orgánico a partir de 21 aislados, tuvo una composición taxonómica del 31.58% de Firmicutes, 10.53% de Alfaproteobacteria, 15.79% Betaproteobacteria, 21.05% Gammaproteobacteria, 5.26% Actinobacterias y un 15.79% de bacterias pertenecientes al filo de los Bacteroidetes.

El tratamiento con cloruro de Lantano y a partir de 28 bacterias aisladas mostró una composición del 31.82% Firmicutes, 9.09% de Alfaproteobacterias, 4.55% Betaproteobacterias, 40.91% de Gammaproteobacterias y un 13.64% Actinobacteria. En el tratamiento de nitrato de lantano, se lograron identificar 31 bacterias y se halló que el 21.43% pertenece al filo Firmicutes, 14.29% a la clase Alfaproteobacteria, 3.57% Betaproteobacterias, 42.86% de Gammaproteobacteria y un 17.86% al filo Actinobacteria.

Por otra parte, los tratamientos biológicos mostraron diferencias principalmente en el contenido de Firmicutes inducidos específicamente por los tres tipos de *Bacillus*. En las plantas del tratamiento con la cepa P1vb (*B. velezensis*) se identificaron 32 bacterias que en conjunto muestran una distribución taxonómica de Firmicutes con el 47.06%, 11.76% de Betaproteobacteria, 23.53% Gammaproteobacteria y 17.65% Actinobacteria. El tratamiento con C2, presenta un 37.93% de Firmicutes, 13.79% de Alfaproteobacteria, 3.45% de Betaproteobacteria, 17.24% de Gammaproteobacteria y 27.59% Actinobacteria. Este arreglo fue hecho a partir de 30 aislados identificados representativos del total de microorganismos aislados.

En la bacteria comercial (F1N) en la semana 5, se identificaron 31 bacterias y se encontró que la composición taxonómica fue del 42.11% Firmicutes, 10.53% Alfaproteobacteria, 5.26% Betaproteobacteria, 26.32% Gammaproteobacteria, 5.26% Actinobacteria y un 10.53% de Bacteroidetes. Al igual que la harina de soya y el tratamiento con la cepa 109.1 En este tratamiento con la cepa de suelo bananero (*B. oceanisediminis*), se identificaron 34 bacterias de las cuales el 34.48% pertenecen a los Firmicutes, el 6.9% son Alfaproteobacteria, 27.59% Gammaproteobacteria, 17.24% Actinobacteria y 13.79% Bacteroidetes

b) Cambios en la diversidad taxonómica después de 10 semanas de tratamiento.

El tratamiento con agua, presento a partir de 22 bacterias identificadas un comportamiento de diversidad taxonómica del 44.83% pertenecientes al filo de los Firmicutes, 10.34% de Alfabroteobacteria, 3.45% de Betaproteobacteria, 17.24% de Gammaproteobacteria y un 24.14% Actinobacteria. En las plantas tratadas con el NPK se encontró que la distribución tuvo cambios con respecto a las 5 semanas, en este tiempo a partir de una identificación de 29 bacterias, se halló una composición del 53.55% Firmicutes, 13.33% de Alfabroteobacteria, 26.67% Gammaproteobacteria y un 6.67% Actinobacteria. Por lo que la reducción de Firmicutes es sobresaliente.

Las plantas tratadas con harina de soya tuvieron una composición del 25.93% de Firmicutes, las Alfa, Beta y Gammaproteobacteria tuvieron una proporción del 7.41%, 11.11% de Actinobacteria y 3.70% Bacteroidetes. Las plantas con sales de Lantano presentan diferencias significativas en la composición representativa de las bacterias identificadas, por ejemplo el cloruro de Lantano a partir de 31 cepas identificadas se halló que el 52% pertenecen a los Firmicutes, 12% de Alfabroteobacterias, 4% de Betaproteobacteria, 28% de Gammaproteobacterias y 4% del filo Actinobacteria. Por el contrario el nitrato de Lantano presento derivado de la identificación de 33 bacterias aisladas tuvo la mitad de los Firmicutes (25.93%), 3.70% de Alfa y Betaproteobacteria, y un aumento del 30% de Gammaproteobacteria con un 48.15%, 7.41% de Actinobacteria y la presencia de bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes en un 11.11% con respecto al cloruro de Lantano.

Las plantas tratadas con la bacteria *B. velezensis*, tuvieron 63.64% de firmicutes y 36.36% de Gammaproteobacterias, siendo este un cambio drástico con respecto a la semana 5. Las plantas tratadas con la cepa C2 o *E. cloacae*, presentaron un 50% de Firmicutes, 40% de Gammaproteobacterias y un 10% de Actinobacteria.

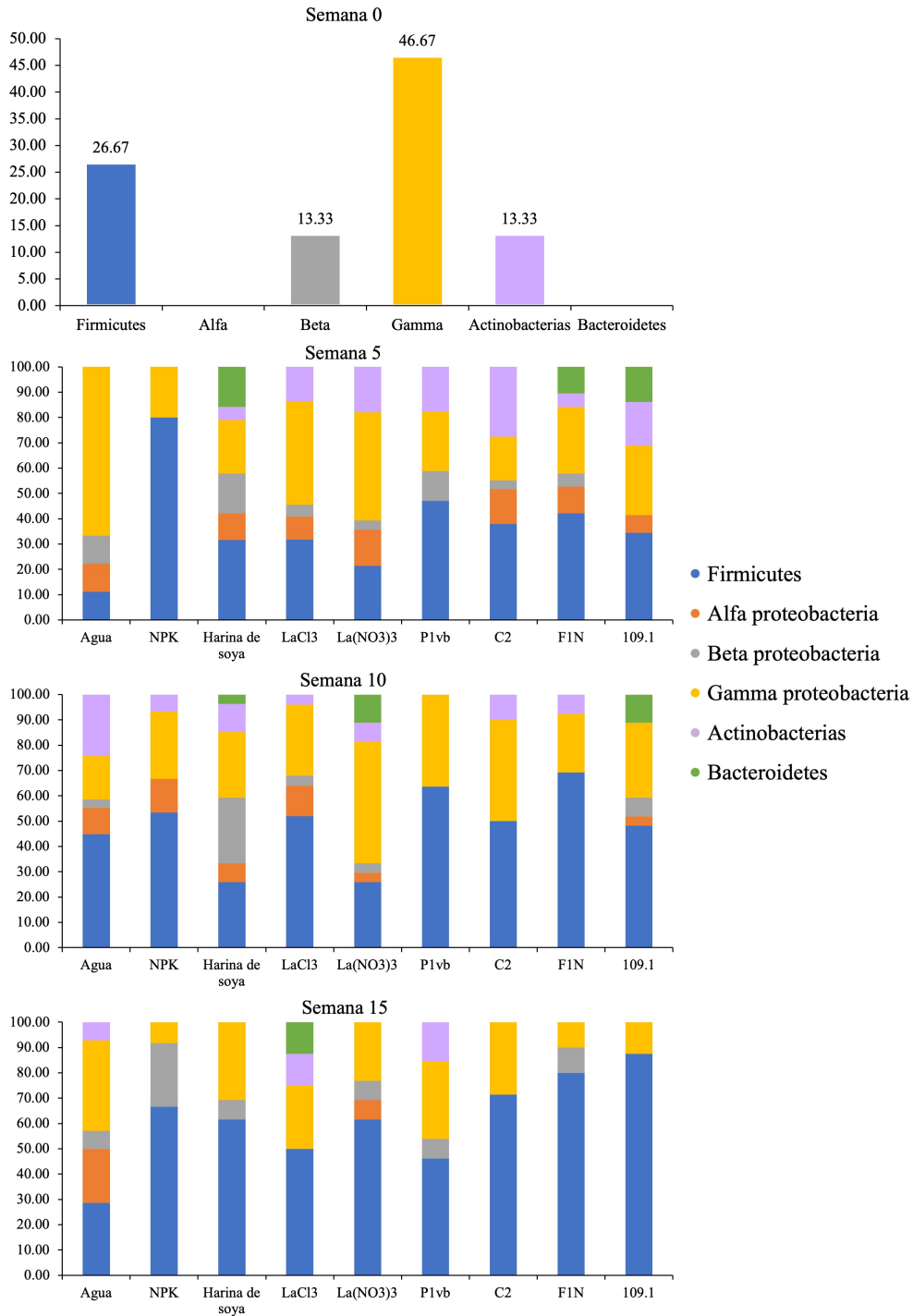


Figura 16. Comparativo de la diversidad taxonómica a nivel de filo y clase de las bacterias identificadas en las plantas bajo diferentes tratamientos durante 15 semanas. La composición taxonómica fue dinámica y tuvo cambios drásticos entre los mismos tratamientos por semana.

En el tratamiento con la bacteria comercial (F1N), las bacterias identificadas presentan una diversidad taxonómica de 69.23% Firmicutes, 23.08% de Gammaproteobacteria y un 7.69% de Actinobacteria.

El tratamiento con la bacteria de suelo 109.1 (*B. oceanisediminis*), se identificaron en total 30 cepas de las cuales el 48.15% fueron Firmicutes, 3.7% de Alfaproteobacteria, 7.41% Betaproteobacteria, 29.63% Gammaproteobacteria y un 11% de Bacteroidetes.

c) Diversidad taxonómica después de 15 semanas de tratamiento.

En la semana 15 se tuvieron menos aislados y correlaciona con el número de UFC's, que tuvo una tendencia a disminuir, alcanzando valores de microorganismos cultivables similares al de la semana 0. El tratamiento control presento en su composición un 28.57% de Firmicutes, 21.43% Alfaproteobacteria, 7.14% de Betaproteobacteria, 35.17% Gammaproteobacteria y un 7.14% del filo Actinobacteria. Las plantas tratadas con NPK tuvieron un 66.67% Firmicutes, 25% de Betaproteobacteria y 8.33% de Gammaproteobacteria. En la plantas con Harina de soya a partir de 17 bacterias identificadas representaron un 62.54% Firmicutes, 7.69% Betaproteobacteria y un 30.77% Gammaproteobacteria. Por otra parte, las sales de Lantano, en especial el cloruro de Lantano tuvo una diversidad taxonómica diferente a los tiempos anteriores de colecta. En la semana 15 se presentó un 50% Firmicutes, 25% Gammaproteobacteria, y un porcentaje igual al 12.55% tanto de Actinobacteria y Bacteroidetes. En el tratamiento con nitrato de Lantano, no presento bacterias pertenecientes al filo de los Bacteroidetes y Actinobacteria. Por otra parte, encontramos un 61.54% de Firmicutes, 7.69% de Alfa y Betaproteobacteria y el 23.08% de Gammaproteobacteria. Las plantas tratadas con *B. velezensis* tuvieron un 46.15% fueron Firmicutes, 7.69% de Betaproteobacteria, 30.77% de Gammaproteobacteria y 15.38% de Actinobacteria. Las plantas con aplicaciones de C2, manifestaron la menor diversidad ya que practicamente las bacterias identificadas se distribuyeron en un 71.43% Firmicutes y un 28.57% Gammaproteobacteria. Las plantas tratadas con la cepa comercial también presentó cambios en la composición microbiana, donde el 80% fueron Firmicutes, el 10% Betaproteobacteria y 10% de Gammaproteobacteria. Por último, la cepa de suelo 109.1 en la semana 15 se encontró un 87.5% Firmicutes y 12.5% de Gammaproteobacterias.

d) Bacterioma cultivable identificados en las plantas tratadas.

En la figura 17, se representa la diversidad del bacterioma cultivable de las plantas en las 15 semanas de experimentación a nivel de género y especie. Los colores en los cuadros indican el tratamiento del cual se aisló la bacteria. La semana 0 se representa en color rosa, el tratamiento con agua en amarillo, el NPK en amarillo-limón, cloruro de lantano en azul, nitrato de lantano en gris, harina de soya en verde tenue, P1vb en verde oscuro, C2 en morado, FIN en azul claro y 109.1 en naranja.

En la figura 17, se representa los cambios en la activación del microbioma a través de las semanas de tratamiento, empezando desde la semana 0 donde se observó la presencia de 14 géneros y especies diferentes, entre estos: *Acinetobacter junii*, *Aeromonas jandaei*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sonorensis*, *Curtobacterium sp.*, *Herbaspirillum aquaticum*, *Herbaspirillum huttiense*, *Microbacterium paraoxydans*, *Pseudomonas citronellolis*, *P. monteili*, *P. mendocina*, *P. stutzeri* y *Stenotrophomonas sp.* En la semana 5, hubo un incremento de las bacterias cultivables y dependieron del tratamiento aplicado (diferenciar entre tratamientos). donde podemos ver que aparecen nuevas especies de *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Chryseobacterium*, *Cupriavidus*, *Curtobacterium*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Falsibacillus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Herbaspirillum*, *Hydrogenaphaga*, *Lactobacillus*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenarthrobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pichia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Terrimonas* y *Thauera*. En la semana 10 y 15 se activaron otros géneros como *Acidovorax*, *Azoarcus*, *Bacteroides*, *Burkholderia*, *Candida*, *Castellaniella*, *Corynebacterium*, *Cryptococcus*, *Glutamicibacter*, *Pandoraea*, *Paraburkholderia* y *Rhodospiridium*, también se activaron diferentes especies de los géneros ya mencionados en la semana 5.

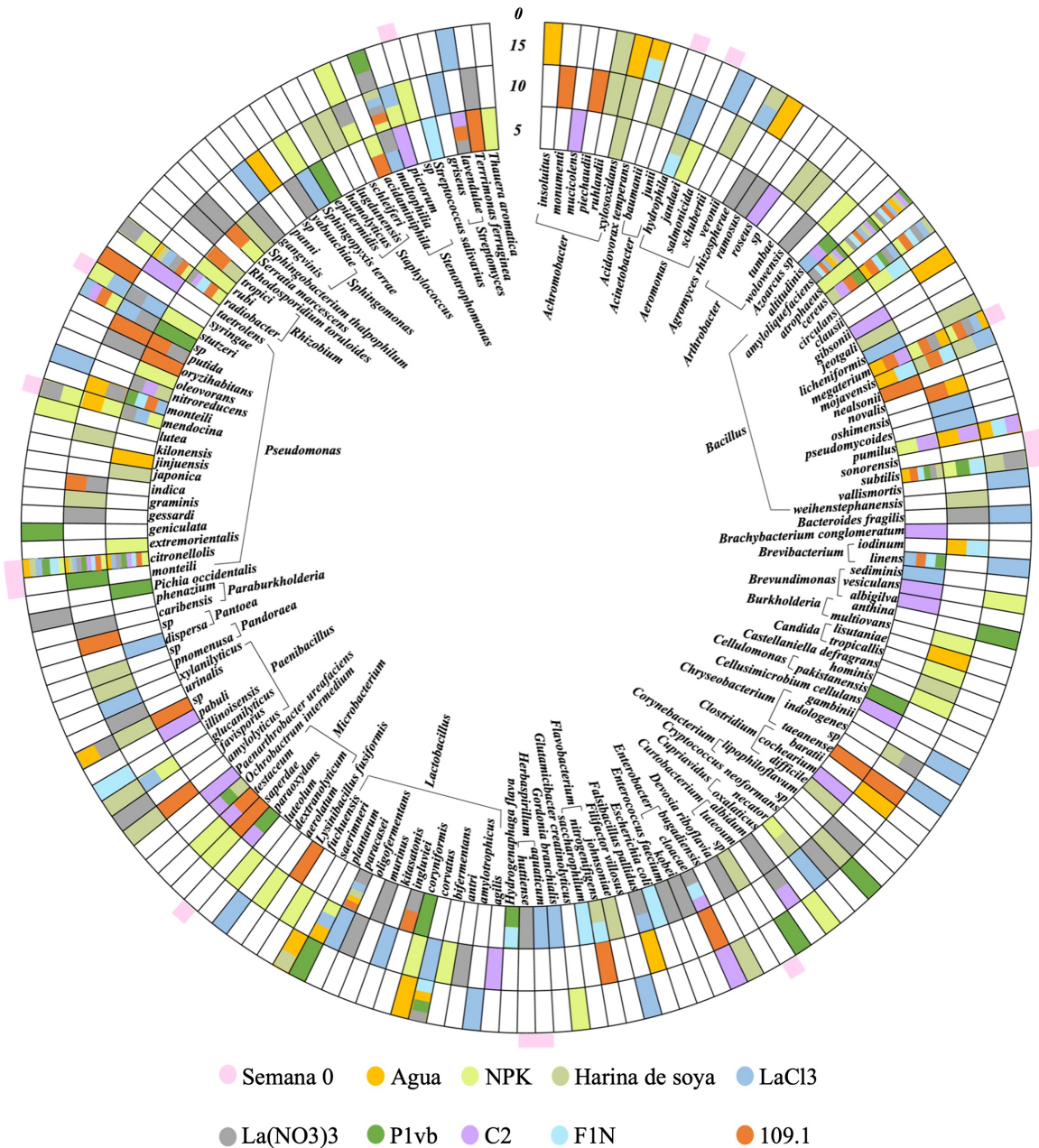


Figura 17. Diversidad del bacterioma activado (género y especie) en plantas de banana de acuerdo al tratamiento y la semana de aislamiento. Los generos fueron distribuidos principalmente entre *Bacillus* (Firmicutes), *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria), *Paenibacillus* (Firmicutes) y *Lactobacillus* (Firmicutes)

e) Diversidad funcional de las cepas aisladas de cada tratamiento.

En la figura 18 se muestra una representación de la funcionalidad de las bacterias aisladas e identificadas en cada tratamiento por semana, cada tono de violeta representa un rango de porcentaje en orden creciente de la tonalidad. En total se analizaron 351 bacterias identificadas de un total 679 bacterias identificadas (a partir de un total de 728, solo 49 cepas no fueron identificadas) para las distintas pruebas agronómicas, este número de bacterias representa un 40% del total de los microorganismos identificados. En las plantas antes del tratamiento (tiempo 0) se halló que el 30.77% de las bacterias son positivas a proteasas, 46.15% a NBrip, 61.54% a la prueba de ACC deaminasa, 38.46% a sideróforos, 53.85% de NFB y 53.84 % de positivas a ácido indol acético (auxinas).

La funcionalidad de las bacterias esta presentada de acuerdo al tratamiento:

A) En las plantas tratadas con agua la diversidad funcional de las bacterias a lo largo de las semanas de tratamiento presentan un 26.67% de bacterias positivas para la actividad de proteasas, 41.18% en la semana 10 y un 22.22% en la semana 15. Las bacterias positivas a la prueba de solubilización de fosfatos o NBrip disminuyeron conforme el paso de las semanas de 40% en la semana 5, a un 29.41% en la semana 10 y finalmente un 22.22% en la semana 15. Las bacterias positivas a la prueba de ACC también tuvieron una caída con respecto a las semanas de tratamiento, por ejemplo pasaron de un 93.33% positivas a un 64.71% y finalmente un 55.56% con respecto a las semanas muestreadas. La prueba de sideróforos tuvo una diversidad funcional cercana al 60% y está bajo hasta un 33.33% en NFB fue desde un 80% hasta un 66.67%, en auxinas hubo un incremento pasando de un 13.33% hasta un 44.44%.

B) Las plantas tratadas con NPK en general tuvieron bacterias que fueron positivas a la prueba de proteasas, que disminuyeron con el paso de las semanas desde un de 88.89% en la semana 5, a un 66.67% en la semana 10 y hasta un 55.56% en la semana 15. Para las bacterias positivas a NBrip observamos un incremento de un 11.11%, a un 50%, hasta el 55.56% en la semana 15, esto sugiere la necesidad de obtener fosfato eficientemente a través de la activación de este tipo de bacterias. Las bacterias positivas a la ACC deaminasa también fueron disminuyendo desde un 100% positivas en la semana 5 hasta el 44.44% en la semana 15. Por otro lado, aquellas bacterias que dieron positivas a la síntesis de sideróforos tuvieron

un incremento con respecto a las semanas y aplicaciones ya que en la semana 5 tuvieron un valor cercano al 11.11% hasta el 33.33% mismo que se mantuvo desde la semana 10 a la 15. Por último, las bacterias que dieron positivo a la fijación biológica del nitrógeno NFB en la semana 5 fueron de un 3.33% hasta el 66.67%. Para la producción de auxinas, la bacterias recuperadas mostraron que en la semana 5 no existían activadas bacterias con estas capacidades. En la semana 10 aumento al 25% y en la semana 15 fue del 22.22%.

C) Plantas tratadas con harina de soya.- en la prueba de proteasas en la semana 5, el porcentaje de bacterias positivas fue del 23.08%, en la semana 10 del 33.33% y en la semana 15 aumentó hasta un 70%. Para el NBrip, las bacterias positivas oscilaron con respecto a las semanas y esta fueron del 15.38%, 26.67% y 20% ACCdeaminasa aumentó conforme a las semanas, pasando del 38.46% a un 50% final. Los sideróforos en la semana 5 tuvieron un 53.85% de bacterias funcionales, mismas que pasaron al 40% en la semana 10 y 50% en la semana 15. En el porcentaje de bacterias positivas al NFB hubo una disminución de un 76.92% a un 73.33% y a un 50% con respecto al paso de las semanas de tratamiento. Para auxinas hubo 23.08% de positivos en la semana 5, 13.33% en la semana 10 y un aumento al 50% en la semana 15.

D) Plantas tratadas con tierras raras.- en los tratamientos con tierras raras, las plantas tratadas con cloruro de lantano presentaron una disminución del porcentaje de positivos para la prueba de proteasas de un 62.5% a un 60% en la semana 10 y hasta 56.25% en la semana 15. En la prueba de NBrip en la semana 5 hubo un 37.5% de positivos y un incremento a la siguiente semana del 60%, con una caída en la semana 15 hasta del 31.25%. Las bacterias que tienen actividad de ACCdeaminasa manifestaron un incremento entre la quinta semana y la semana 10 del 68.75% a un 80%, y en la semana 15 una disminución al 62.50%. En la prueba de sideróforos, el número de bacterias que dio positivo a la prueba fue del 50% hasta un 43.75% en la semana 15. En la prueba de auxinas se encontraron bacterias positivas desde un 31.35% en la semana 5, con oscilaciones de 13.33% en la semana 10 y en la semana 15 fue del 43.75%.

E) Plantas tratadas con sales de Lantano.- en el tratamiento con nitrato de lantano, las proteasas tuvieron cambios mínimos entre las semanas 5, a la 10 y a la 15 siendo de 56.25%

a 47.37% a 50%. Las cepas activas para NBrip aumentaron un 10% entre la semana 5 y 10 y después disminuyeron de un 47.37% a un 40%. Las bacterias positivas a ACCd disminuyeron del 81.25% al 47.37% después de la semana 5 y posteriormente subió al 60%. Para la prueba de sideróforos las cepas positivas bajaron de un 50% al 40%, con un pequeño incremento en la semana 10. Las bacterias positivas a NFB incrementaron del 62.50% a un 78.95% en las primeras dos. La presencia de bacterias positivas a las auxinas en los aislados fue aumentando conforme el paso de las semanas de un 12.5% a un 60%.

F) Plantas tratadas con P1vb.- en las pruebas de proteasas se presentó que en la semana 5 hubo un 50% de positivas, en la semana 10 fue del 72.73%, en la semana 15 del 69.23%. La prueba de NBrip tuvo oscilaciones con respecto al número de aislados positivos desde 21.43% al 54.55% y regreso a un 23.08%. En la prueba de ACCd obtuvimos un 85.71% en el aislado de las primeras 5 semanas, 90.91% y 76.92% en la semana 15. Los sideróforos tuvieron el mayor porcentaje de positivos en la semana 10 moviendo valores del 42.86%, 63.64% y hasta un 53.85% en la semana 15. Por último, las bacterias positivas a la fijación de nitrógeno disminuyeron del 64.29% hasta el 53.85% en la semana 15 y los valores porcentuales de bacterias productoras de auxinas fue de 21.43% a 18.18% a un 38.46% en la semana 15.

G) Plantas bajo tratamiento con la bacteria C2.- las bacterias positivas a la prueba de proteasas fueron incrementando de 29.42% hasta 80% de la semana 5 a la semana 15. En la prueba de NBrip las variaciones fueron del 47.06%, 28.57% y 40%. En la prueba de ACC se encontró un incremento de 64.71% al 71.43% y hasta un 100% a las 15 semanas. En la prueba de sideróforos en la semana 5 el porcentaje de bacterias positivas encontrado un 41.18%, para la semana 10 este valor fue del 14.29% y en la semana 15 de un 40%. Para NFB fue de 64.71% a un 42.86% y a un 100% en la semana 15, en auxinas, fue incrementando de un 11.76% a un 42.86% y finalmente a un 60%.

H) Plantas tratadas con la bacteria comercial.- presentaron bacterias positivas a la prueba de proteasas que tuvieron un incremento del 46.67% hasta un 71.43% desde la semana 5 hasta la semana 15. Las bacterias positivas al NBrip en la semana 5 fueron el 40%; en la semana

10 tuvo un 10% de positivos a la prueba y en la semana 15 fue del 28.57%. Las bacterias con actividad de ACCdeaminasa en la semanas 5 y 10 fueron un 80% de positivos y en la semana 15 fue del 71.43%. En la prueba de sideróforos las bacterias positivas fueron del 40% a un 30% y a un 57.14% con respecto a las semanas. las bacterias que dieron positivas a la prueba de NFB fueron aumentando de un 66.67% al 80% hasta un 100%. Para las auxinas las bacterias positivas incrementaron de un 0% en la semana 5, hasta un 60% en la semana 10 y tuvo un decaimiento en la semana 15 fue de 28.57%.

I) Plantas tratadas con la bacteria de suelo 109.1.- Las bacterias con actividad de proteasas aumento del 41.18% a un 87.5% en las 15 semanas, para la prueba de solubilización de fosfatos(NBrip), en la semana 5 fue del 17.65% subió a un 50% en la semana 10 y bajo al 25% en la semana 15. Para la prueba de ACC el porcentaje de bacterias positivas fue aumentando conforme el paso de las semanas desde un 64.71% hasta el 87.5%. En la prueba de NFB en la primera semana de análisis presento un 64.71%, subió a un 76.92% y bajo hasta un 37.5%, en prueba de las auxinas las bacterias analizadas aisladas el porcentaje de positivos en la primera semana fue del 17.65%, un 26.92% y el 12.5% en la semana 15.



Figura 18. Mapa de calor representativo de los valores porcentuales de la pruebas de funcionalidad del bacterioma aislado en los tratamientos de plantas. El incremento en el tono de morado representa un mayor rango de porcentaje de bacterias positivas a las pruebas agronómicas durante las semanas de tratamiento.

4.1.5 Antagonismo e inhibición de hongos y bacterias patógenas.

En la figura 19, se representan las pruebas de inhibición de 40 bacterias endofitas recuperadas de los tejidos bajo tratamiento con la cepa endófito P1Vb clasificada como *B. velezensis*. Las bacterias recuperadas fueron retadas contra una *K. cowanii* una bacteria aislada de una hoja de *Agave tequilana* con manifestaciones de pudrición blanda. En la parte superior de la figura se presentan 9 de las 15 bacterias que desarrollaron un halo de inhibición. Dentro de las bacterias que pudieron inhibir a *K. cowanii* se encontró a las bacterias *B. amyloliquefaciens* de hoja (numero de cepa en la figura 4, 9, 14), *B. amyloliquefaciens* aisladas del sustrato de

las plantas (cepas 5 y 19), *B. amyloquefaciens* aislada del tallo (cepa 7) y *B. amyloquefaciens* aislada de la raíz (cepa 13). También presentaron actividad antagónica una cepa de *B. subtilis* aislada de tierra (10) y una *Pseudomonas monteili* de tierra (15). Además *Hydrogenophaga flava* del tallo (cepa 21), *P. citronellolis* de tierra (cepa 25), *B. subtilis* de hoja (cepa 28), *Corynebacterium sp.* de raíz (cepa 37) y *Curtobacterium luteoum* del tallo (cepa 39), ver anexo 6, 7, 8 y 9. El 37.5% de las bacterias recuperadas tuvieron un efecto de inhibición. En el panel inferior, se presentan aquellas bacterias que sobresalieron en la inhibición de *B. velezensis*. Se observó la inhibición ejercida por las bacterias *B. cereus* de raíz (cepa 2) y de hoja (cepa 3), una cepa de *Pseudomonas sp.* aislada del tallo (cepa 8) y una cepa *Staphylococcus epidermidis* de hoja (cepa 20), *Pseudomonas citronellolis* de tierra y *L. plantarum* colectada de la raíz. En general se observó que el 15% de las bacterias aisladas tuvieron inhibición contra el endófito. La tabla 6 presenta los resultados completos del efecto antimicrobiano de las cepas activadas y recuperadas.

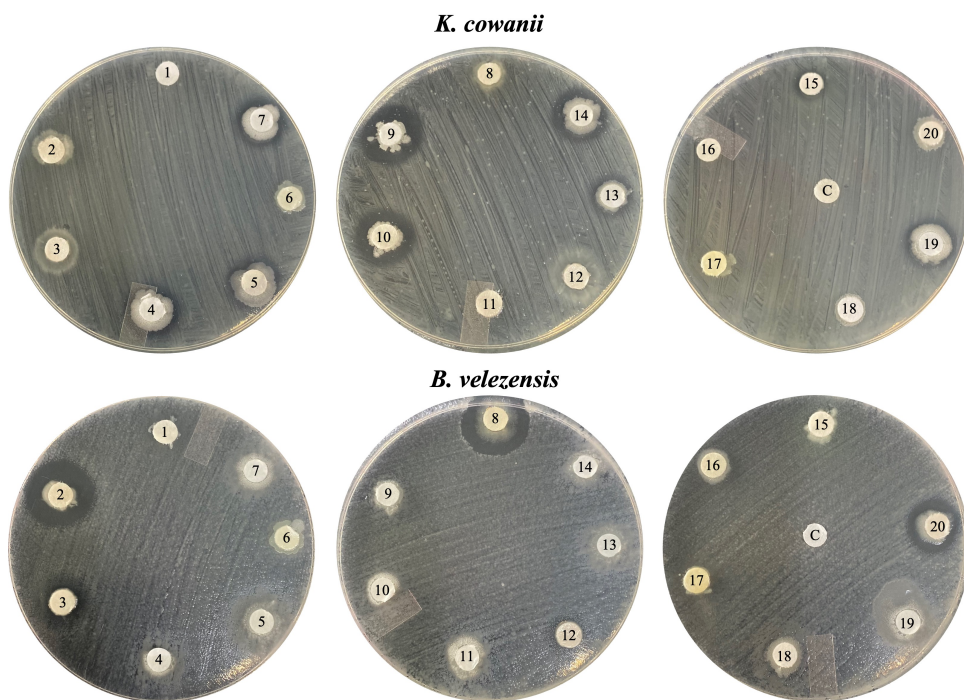


Figura 19. Actividad antagónica de cepas endófitas recuperadas de plantas tratadas con *B. velezensis* (P1vb). La mayor actividad antagónica fue ejercida por *B. amyloquefaciens*. La formación de halos de inhibición derivados del co-cultivo en algunas de las cepas endófitas

sugieren que la inoculación de P1Vb activa un microbioma con capacidades de control antimicrobiano en bacterias diferentes al inductor.

Tabla 6. Resultados de las pruebas de antagonismo de las bacterias endófitas activadas por *B. velezensis* ante *Kosakonia cowanii* aisladas de agave y cepas de hongos fitopatógenos (M2) de mango, 6octDC4 de coco y *Phytophthora cinnamoni* (P. cinna) un hongo patógeno

Bacteria endófitas					Bacteria endófitas				
	<i>Kosakonia</i>	M2	6octDC4	P. cinna		Kosa	M2	6octDC4	P. cinna
1	-	-	-	-	21	+	+	-	+
2	-	-	-	-	22	-	-	-	-
3	-	-	-	-	23	-	-	-	-
4	+	+	+	+	24	-	-	-	-
5	+	+	-	+	25	+	-	-	-
6	-	-	+	-	26	-	-	-	-
7	+	+	+	+	27	-	-	-	-
8	-	+	+	+	28	+	+	+	+
9	+	+	-	+	29	-	+	-	-
10	+	+	+	+	30	-	+	-	-
11	-	-	-	-	31	-	-	-	-
12	-	-	-	-	32	-	-	-	-
13	+	+	+	+	33	-	+	+	-
14	+	+	+	+	34	-	+	-	-
15	+	-	-	-	35	+	+	+	+
16	-	-	-	-	36	-	-	-	-
17	-	+	+	-	37	+	+	-	+
18	-	+	-	+	38	-	+	-	+
19	+	+	+	+	39	+	+	+	+
20	-	-	-	-	40	-	-	-	-

La figura 20, muestra el efecto antifúngico ejercido por las bacterias endófitas activadas durante el tratamiento con *B. velezensis* (P1vb). En el hongo fitopatógeno de mango identificado en el laboratorio como *Colletotrichum sp.* se presenta un efecto de inhibición en las 3 cepas de *B. amyloliquefaciens* aisladas de hojas, dos del suelo, una del tallo y una de la raíz (cepas 4, 9,14, 5,19, 7 y 13 respectivamente). También se observa un efecto de inhibición ejercido por diferentes cepas entre estas *Pseudomonas sp.* del tallo (8), *B. subtilis* de tierra (10), *Stenotrophomonas maltophilia* de raíz (17, 35), *Burkholderia anthina* de tierra (19), *Hydrogenophaga flava* de tallo (21), *B. subtilis* de hoja (28), *Lactobacillus coryniformis* de hoja (29), *Pseudomonas citronellolis* de raíz (30), *Stenotrophomonas maltophilia* de tallo (33

y 34), *Corynebacterium sp.* de raíz (37), *Pichia occidentalis* de tallo (38) y *Curtobacterium luteoum* del tallo (39). En resumen el 52.5% de las bacterias inducidas por la aplicación de *B. velezensis* tienen actividad antagónica.

El hongo no identificado y que fue aislado del coco fue inhibido por un 32.5% del total de bacterias probadas. Entre estas las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* de la hoja 4 y 14, del tallo cepa 7, las cepas 13 y 35 aisladas de la raíz y la cepa 19 de tierra. Así también cepas de *B. cereus* del tallo (cepa 6), *Pseudomonas sp* del tallo (cepa 8), *B. subtilis* de tierra (cepa 10) y de hoja (cepa 28). Las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* de la raíz (cepa 17) y del tallo (cepa 33) , así como la cepa de *Curtobacterium luteoum* del tallo (cepa 39).

Finalmente, el hongo *Phytophthora cinnamoni* fue inhibido por un 40% de las cepas endófitas recuperadas. Como se observa en el panel inferior de la figura 20, las cepas de *B. amyloliquefaciens* aisladas de las hojas (4, 9, 14), tierra (5, 19), tallo (7) y de raíces (13, 35) también presentan actividad contra este hongo. Las cepas de *Pseudomonas sp.* del tallo (8), *B. subtilis* de tierra (10), *Burkholderia anthina* de tierra (18), *Hydrogenophaga flava* de tallo (21), *Corynebacterium sp.* de raíz (37), *Pichia occidentalis* de tallo (38) y *Curtobacterium luteoum* de tallo (39) también son inhibidoras.

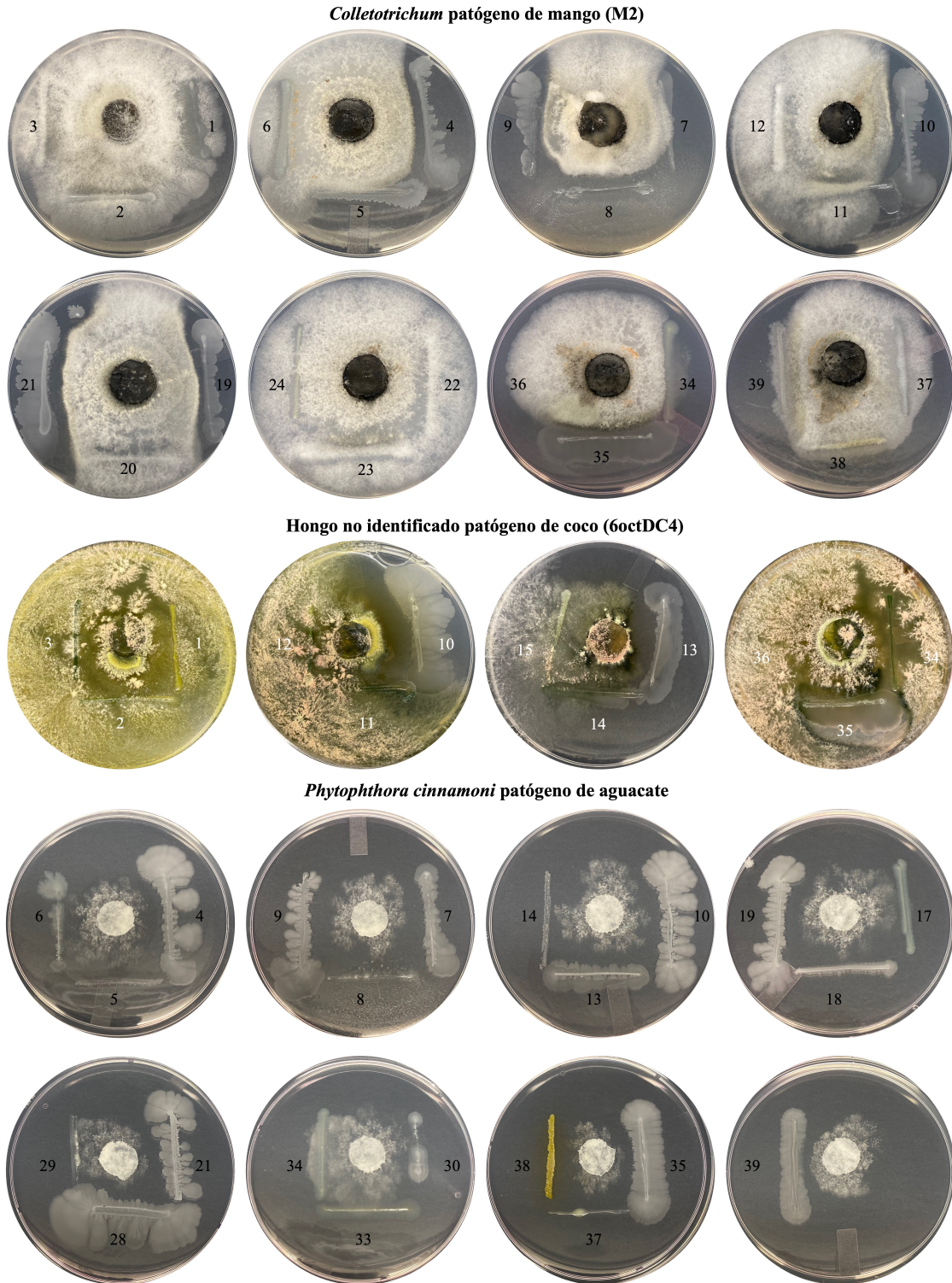


Figura 20. Comportamiento antifúngico de las cepas endofitas recuperadas del microbioma activado por *B. velezensis*. Se encontró que las cepas de *B. amyloliquefaciens* son las que mayor efecto de inhibición tuvieron contra las tres cepas de hongos fitopatógenos.

4.2 Discusión.

Estudios realizados en el laboratorio han mostrado el potencial benéfico de las bacterias endófitas como probióticos de las plantas de banano enano gigante Cavendish (Beltran-Garcia et al., 2021, Macedo-Raygoza et al., 2019). Las bacterias endófitas pueden alterar respuestas fisiológicas en las plantas posterior a su inoculación, muchas de estas respuestas son relacionadas con la resistencia al estrés o en la promoción del crecimiento. Sin embargo, más allá de los estudios genéticos y las relaciones simbióticas existentes entre las bacterias y las plantas, mismas que han co-evolucionado por más de 400 millones de años hasta formar un holobionte, desconocemos a ciencia cierta como la inoculación de un solo microorganismo (endófito o no) de manera particular genera los efectos reconocidos en las plantas. Actualmente la manipulación del microbioma es un tema de interés desde un acercamiento ambiental para proteger a las plantas de enfermedades y promover la productividad agrícola (Berg et al., 2021).

El ensamblaje de los microbiomas se forma por múltiples factores que incluyen desde la selección por parte del hospedante, clima, tipo de suelo, insectos herbívoros, la invasión de patógenos, entre otros factores. Sin embargo la exposición a patógenos es considerado como el más influyente para los cambios en la composición del microbioma Carrion et al., 2019). Por otra parte, dos estrategias pretenden explicar los cambios en la composición del microbioma y la diversidad funcional inducida por los patógenos. Estas hipótesis involucran al “cry for help” (Rizaludin et al., 2021) y otra conocida como “activación del microbioma” (Carrión et al, 2019). Ambas situaciones ocurren cuando las plantas se encuentran bajo estrés biótico, pero la principal diferencia es que el “cry for help o llamado de auxilio” es un proceso que se centra en las raíces donde se piensa que la exudación de ciertas moléculas atraen microbios del suelo que son reclutados para proteger a las plantas en respuesta al ataque de los patógenos (Abedini et al., 2021, Cordovez et al., 2019, Chowdury et al., 2013).

Algunos ejemplos muestran que las bacterias benéficas aumentan en la enfermedad (activación del microbioma) y se han identificado como bacterias núcleo “core” dentro de la diversidad de los microbiomas. Así también, análisis metagenómicos revelan un enriquecimiento de genes bacterianos que participan en la detoxificación, formación de

biopelículas y señalización en el microbioma, incluyendo la quimiotaxis (Gao et al., 2021). Estudios recientes sugieren que infección en las partes aéreas de las plantas también inducen un ensamblaje de consorcios microbianos en el microbioma de las raíces.

Por otra parte, en el laboratorio de manera aplicada se diseñan comunidades sintéticas microbianas derivadas de colectas de bacterias cultivables de plantaciones estables o afectadas por las enfermedades (Beltran-García, et al., 2021b, Fonseca y Beltran-Garcia Patentes). Estas formulaciones han sido aplicado en plantaciones comerciales y han tenido un efecto de disminución del impacto de enfermedades como la Sigatoka negra del banano y además las plantas se vuelven robustas por la estimulación en el crecimiento.

Uno de nuestros objetivos de investigación es reducir el impacto contaminante de los fertilizantes y la afectación en la salud de los pesticidas. Los fertilizantes nitrogenados sin duda impactan en el cambio climático y en modificaciones de las comunidades microbianas del suelo afectando el comportamiento de las plantas (Beltran-Garcia et al., 2021a).

Ante el desconocimiento de los procesos por los cuales funciona la aplicación de bacterias endófitas hemos desarrollado en este trabajo una serie de ensayos para entender los efectos de promoción de crecimiento de plantas de banano en sustratos con limitación de nutrientes; sumado a esto hemos añadido a estos ensayos el uso de las “tierras raras” como el cloruro de Lantano y el nitrato de Lantano, un elemento utilizados en la agricultura como fertilizantes. Pensamos que la activación de un microbioma funcional más que el reclutamiento podría explicar el porqué las plantas modifican comportamientos fisiológicos y sobreviven a condiciones de deficiencia nutricional u otro tipo de estres.

4.2.1 Estandarización del tratamiento biológico y químico.

Se midió la cinética de crecimiento de las bacterias utilizadas en este trabajo para poder determinar la cantidad de bacterias que fueron inoculadas en las plantas y además estandarizar los cultivos para la serie de aplicaciones durante 15 semanas de tratamiento. En la cinética el incremento de la biomasa microbiana fue monitoreada en función del tiempo. En este trabajo utilizamos harina de soya comercial suplementada con sulfato de magnesio formulados a una concentración de 1% y 0.1% respectivamente durante 16 horas del cultivo, y posteriormente se añadió harina de jaiba, al 0.1% con la finalidad de medir si la adición de material quitinoso funcionaba como un estimulante del crecimiento bacteriano. Destacamos

que *E. cloacae* endófito de hoja de banana (C2) fue la bacteria que tuvo el menor cambio en la acumulación de biomasa activa durante el tiempo de crecimiento. El cambio en el crecimiento fue de 1 orden logarítmico en aproximadamente 20 horas. Ahora bien, la cantidad de inóculo es mayor comparado con las otras cepas utilizadas a pesar de que el ajuste del inóculo fue el mismo ($OD_{600nm}=1$); sin embargo estos números indican que aunque la bacteria tiene baja tasa de multiplicación en este medio, el contenido de nutrientes soporta a la bacteria viable y con cierta estabilidad durante las 20 horas. La adición de quitina de jaiba no tuvo un efecto en el crecimiento, por lo que la accesibilidad de esta bacteria a la quitina como fuente de carbono es limitada. Por otra parte, estudios hechos en el laboratorio usando el medio comercial tripticaseína de soya (CASOY) para el cultivo de esta cepa muestra resultados similares, una baja proliferación de la cepa (Zaizar, 2018). La cepa de *B. velezensis* (P1vb) endófito tuvo un comportamiento diferente a C2. Esta cepa presenta cambios durante el transcurso de la cinética de crecimiento de 6.4 a 8.3 Log_{10} , y se ve estimulada por la adición de quitina. Los ensayos de capacidades bioquímicas de esta bacteria ha mostrado tener actividad proteolítica y quitinolítica. La adición de la harina de jaiba incrementa 1 orden la cantidad de biomasa en 4 horas. No se observó que la bacteria entrara a la fase estacionaria. Este comportamiento de crecimiento puede ser comparado con el crecimiento mostrado por la cepa comercial (*B. subtilis*) y la cepa de suelo (*B. oceanisediminis*). El cambio de incremento de biomasa de la cepa comercial y P1vb durante las primeras 12 horas fue similar. La cepa de suelo alcanza aproximadamente el mismo número de UFC's en este tiempo, sin embargo, el inóculo inicial de esta cepa fue ligeramente menor aproximadamente de 0.5 Log_{10} . El crecimiento de las tres bacterias en las siguientes 4 horas (hasta el T_{16}) se hizo lento y constante sin cambios en el número de células viables, por lo que consideramos que estas cepas entraron en fase estacionaria en este tiempo. El diferencial que se presenta entre las tres bacterias está ligado probablemente a la actividad o proteolítica o quitinolítica como mencionamos anteriormente. Por ejemplo, la cantidad de células de *B. oceanisediminis* se mantiene hasta el T_{20} , *B. velezensis* se incrementa y *B. subtilis* cae estrepitosamente aproximadamente 1.4 Log_{10} . Los cultivos de todas las cepas utilizadas fueron estandarizados a 16 horas, manteniendo el número de UFC's en el mismo orden durante todo el ensayo. La concentración de cloruro y nitrato de lantano (10 μM), fue seleccionada primariamente basada en los experimentos realizados en el laboratorio en plántulas de maíz. La

concentración seleccionada para la planta de banana muestra un muy buen desarrollo del crecimiento aéreo y de raíz en la plántula de maíz (Silva Reséndiz, comunicación personal). La concentración utilizada de lantánidos no mostró algún efecto fitotóxico en las plantas de banana en el transcurso del ensayo y las aplicaciones constantes.

4.2.2 Determinación del efecto en el crecimiento de las plantas.

Después de la estandarización del número de UFC/mL y la concentración de las tierras raras aplicadas en las plantas de banana, se procedió a determinar el efecto en el crecimiento de las plantas en un ambiente controlado (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a 30°C. De acuerdo a los datos de altura, número de hojas formadas y raíces se encontró que los mejores tratamientos fueron harina de soya y las bacterias P1vb y C2, mostrando un efecto diferencial entre las tres, por lo que el efecto se atribuye directamente a las bacterias y no a su vehículo (harina de soya). La harina de soya como estimulante del crecimiento y tiene un efecto en inducir el ancho y la altura del tallo. La harina de soya es considerada un fertilizante orgánico, el cual tiene la ventaja que tiene menor fitotoxicidad que los fertilizantes químicos, es más biocompatible con la mayoría de los cultivos, esta aporta nitrógeno, aminoácidos, y carbohidratos que pueden ser asimilables a las plantas. La fertilización con harina de soya ha sido probada de manera foliar en cultivos de café (Navaéz, et al., 2017).

En cuanto los tratamientos con las bacterias, se observó que las bacterias endófitas del banana fueran las que tuvieran un mejor efecto en el crecimiento aéreo de la planta, especialmente C2 en el tamaño y ancho del tallo, superando a la harina de soya ligeramente. La promoción de crecimiento y colonización de esta bacteria es superior a otras probadas en estudios anteriores en el laboratorio (Macedo-Raygoza et al., 2019). El hecho de ser endófito nativo de la planta aumenta la compatibilidad. Se ha descubierto que las bacterias endófitas aplicadas en este trabajo de investigación participan en los ciclos de los nutrientes y hacen que sean más asimilables para la planta especialmente los nutrientes del suelo y la harina de soya. Ahora bien, también ha sido demostrado que las bacterias endófitas una vez colonizado el tejido pueden servir de nutriente en respuesta a una limitación de nitrógeno (Beltrán-García et al., 2014).

La bacteria de suelo presentó a pesar de que presentó el mayor número de pruebas agronómicas positivas (Olmos-Arriaga, 2020), no fue una de las bacterias sobresalientes en

la inducción del crecimiento, ya que estuvo por debajo del *Enterobacter* (C2) y el *B. velezensis*. La bacteria comercial, tuvo un efecto en el crecimiento de la planta, pero realmente no fue sobresaliente con respecto a las otras bacterias utilizadas, esto nos hace pensar en que la fertilización con microorganismos idealmente tendría que ser con endófitos de la misma especie de planta para que pueda tener un mayor impacto en el crecimiento y en la productividad de los cultivos (Beltran-Garcia, *et al.* 2021).

La inducción del crecimiento con tierras raras no se ha reportado en banano,. Existen publicaciones de sales de lantano en cultivos como el maíz, arroz, soya, lenteja, coco y el frijol rojo, demostrando que tiene efectos benéficos para los cultivos, como el aumento del crecimiento en las raíces, mayor fotosíntesis, menor estrés oxidativo, estimulación de la germinación y alivio de la deficiencia de fosforo (de Oliveira, *et al.*, 2015; Ramírez, *et al.*, 2018; Fashui, *et al.*, 2000; Fashui, 2002; Fashui, *et al.*, 2003; Zicari, *et al.*, 2018; Lian, *et al.*, 2019; Liu, *et al.*, 2005; Wahid, *et al.*, 2000). En este trabajo quedo demostrado su efecto en el crecimiento de las raíces a comparación del resto de los tratamientos, en especialmente el efecto ejercido por el nitrato de lantano. El crecimiento aéreo de la planta (número de hojas, ancho de tallo y alto de tallo) fue deficiente en ambas sales.

Una observación continua producto de los experimentos realizados con bacterias endófitas y plantas de maíz y agave es la poca inducción del crecimiento de raíces en las plantas cuando se aplican cepas de los generos *Enterobacter* o *Bacillus*, por lo que el efecto bioestimulante se observa principalmente en la parte aérea. Este fenómeno representara quizas un problema una vez aplicadas las bacterias a los cultivos comerciales, dado que en inundaciones o fuertes aires causados. Ante los resultados obtenidos, es probable que la combinación de tierras raras y bacterias tandrán un efecto en el crecimiento potencializado.

4.2.3 Evaluar la colonización de las bacterias al cuantificar el contenido de bacterias internalizadas después de 5, 10,y 15 semanas de aplicación.

Se realizó un análisis de las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido encontradas en cada tratamiento y en cada tejido analizado con la intención principal de determinar si las

bacterias endofitas aplicadas colonizaban los tejidos y en qué tiempo ocurría dicha colonización.

De acuerdo a los resultados presentados en la figura 15, se encontró que el mayor número de UFC/gr de tejido superior a un valor de 4 Log_{10} fue en el tratamiento control en la semana 5 alcanzando hasta $\text{Log}_{10} 4.5$, el tratamiento con nitrato de Lantano con el mismo número de UFC's en la semana 10 y el tratamiento con NPK con aproximadamente 4.25 Log_{10} . Con respecto a las bacterias y en un número menor de UFC las cepas de *Bacillus* P1vb y la cepa comercial 4.04 Log_{10} y 3.91 Log_{10} UFC respectivamente. Este resultado fue sorprendente ya que las hojas que presentaron un mayor número de bacterias colonizantes fueron de las plantas con los tratamientos no biológicos. Además la respuesta entre la semana cero y la semana fue con tendencia a aumentar entre un 50% y 100% del valor inicial, salvo el tratamiento con C2 que fue del 24% (2.48 Log_{10}) y en el caso extremo del tratamiento con el cloruro de Lantano que se observó una reducción en esta semana del -8%.

Para el tallo se observa que en los lotes tratados con NPK, nitrato P1vb, la bacteria comercial FIN se observó una disminución en el número de UFCs. En este tejido los incrementos notables se observaron en las plantas tratadas con C2 pasando de 3.57 Log_{10} a 4.40 Log_{10} . Valores de UFCs similares a este número se obtuvieron en el tratamiento con nitrato de Lantano con 4.47 Log_{10} y 4.30 Log_{10} en las semanas 10 y 15 respectivamente. Por lo que es notoria la diferencia entre lotes entre una sección del tejido de la planta Tallo y hoja).

En referencia a la raíz, se observó que inicialmente las plantas mantienen un mayor número de UFCs con respecto a los otros tejidos, lo cual resulta lógico, ya que las raíces generalmente alberga un mayor número de microorganismos endófitos (Santos-Medellin et al., 2021, Zhang et al., 2019, Kong et al., 2021). En este tejido, la respuesta generalizada a los tratamientos fue incrementar el número de UFC's. Los mayores incrementos fueron observados en la semana 5 en el control y los tratamientos con nitrato de Lantano, P1vb, C2 y la cepa comercial (4.76 Log_{10} , 4.99 Log_{10} , 4.95 Log_{10} , 5.21 Log_{10} y 5.30 Log_{10} respectivamente). Para el tiempo de 10 semanas de tratamiento se halló que cloruro de Lantano (5.16 Log_{10}) y 5.43 Log_{10} en P1vb fueron los datos de UFC's más altos.

En este tejido además se observó un comportamiento más estable con respecto al mantenimiento de la cantidad de bacterias una vez inducidas.

Como mostraremos más adelante el incremento de UFCs no se debe directamente a la colonización de las bacterias endófitas añadidas y el hecho que las plantas con tratamientos no biológicos aumentarían el número de UFCs, sugiere la activación de un microbioma endófito más que una posible colonización o reclutamiento de bacterias del suelo. Como hemos mencionado el reclutamiento de bacterias ocurre principalmente a nivel de la raíz bajo condiciones de estrés por patógenos (Erlacher et al., 2014, Carrion et al., 2019). Los resultados observados en el cambio del número de UFCs en las raíces coinciden con otros reportes, donde se ha observado que las plantas irrigadas tienen un rápido recambio de microorganismos endófitos, por ejemplo en arroz se ha observado que ante diversos estímulos el cambio de composición en la raíz incluyen un aumento en el número de bacterias pertenecientes a los filos Actinobacteria, Chloroflexi y Firmicutes aerobios (Santos-Medellin et al., 2021). Por otro lado, nuestros datos también correlacionan con la respuesta del microbioma de las plantas de arroz a la presencia de tierras raras en el suelo modificando la diversidad y el número de bacterias como se ha publicado recientemente (Zhang et al., 2022)

4.2.4 Identificación de la diversidad del microbioma activado por tratamientos biológicos y químicos.

La actividad microbiana es un indicador biológico de la salud de la planta, que en cierta forma son los actores más sensibles y vulnerables que otros factores medibles tradicionales como el contenido de carbono y nutrientes. Sabemos que los microorganismos tienen una inmensa diversidad taxonómica y juegan un papel importante en los procesos biogeoquímicos globales, así como en los suelos agrícolas los microbios son críticos para la productividad del cultivo al participar en la descomposición de la materia orgánica, la formación de humus y transformación de nutrientes (Beltran-Garcia, *et al.*, 2021)

En este trabajo las bacterias fueron identificadas usando como herramienta la espectrometría de masas MALDI-TOF, la cual en los últimos años ha sido aceptada para identificar los microbiomas cultivables de las plantas (Lopez et al., 2018, LaMontagne et al., 2021, Jakubska-Busse et al., 2021). Una vez aisladas las bacterias estas fueron identificadas y de acuerdo al género se hicieron clasificaciones de acuerdo al filo al que pertenecen. El arreglo por filos procariontes nos permite reconocer el comportamiento o predominancia de la

diversidad taxonómica del microbioma cultivable y poder asociarlo a un evento o condición (incluyendo estrés) en la planta.

De acuerdo al tiempo cero se encontró que el 60% del microbioma cultivado pertenece al filo Proteobacteria, 26.67% a los Firmicutes y el 13.33% pertenecen a filo Actinobacteria. Esta diversidad en las plantas es diferente la reportada en la variedad enano gigante (Beltran-Garcia et al., 2021, Figura 2). Sin embargo, en general las plantas tiene una composición aproximada de los tres filos predominantemente.

Estos filos fueron cambiando temporalmente en el cultivo inducidos por los tratamientos. Por ejemplo figura 16, presenta que las comunidades microbianas en la semana en el tratamiento con NPK cambian a una predominancia de Firmicutes de hasta el 80%, con una reducción al 20% de las Gammaproteobacterias totales, 5 semanas después el recambio indica una reducción de los Firmicutes al 50%, un aumento de las Proteobacterias (entre estas las Alfaproteobacterias) en general y la presencia nuevamente de Actinobacterias en un 10%; en la última semana evaluada (semana 15) la comunidad microbiana nuevamente sufre un cambio composicional drástico con la aparición de bacterias perteneciente a la clase Betaproteobacteria del filo Proteobacteria en un 28% aproximadamente, los Firmicutes aumentaron al 60% y las Gammaproteobacteria se reducen a un 10%. Existen reportes que indican modificaciones en la composición microbiana inducidas en el suelo y en los endófitos por efectos de la fertilización química (Beltran-Garcia et al., 2021, Bai et al., 2021, Collavino et al., 2020, Ren et al., 2015). Por ejemplo, Collavino y cols. (2020), mostro que la fertilización inorgánica afecta negativamente la diversidad, induciendo la desaparición de poblaciones que incluyen a los géneros *Burkholderia* y *Geobacter*. La presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en las plantas se afecta por los fertilizantes nitrogenados. Los fertilizantes nitrogenados potencializan el incremento de Firmicutes y esto puede deberse a la capacidad que tienen estas bacterias de consumir nitrógeno y multiplicarse competitivamente.

Con respecto a los genero y especie, en el tratamiento con NPK se encontraron bacterias en la semana 5 como *Aeromonas jandaei*, *Bacillus atrophaeus*, *B. pumilus*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas citronellolis*, *P. extremorientalis*, *P. mendocina*, *P. oleovornas*, *P.*

stutzeri, *Rhizobium radiobacter*, *R. rubi*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas acidaminiphila* y *Thauera aromatica*. La diversidad con respecto al género aumento un 84% en la semana 10, encontrando *Azoarcus sp.*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Burkholderia multiovans*, *Candida tropicallis*, *Cellulomonas hominis*, *Lactobacillus bifermentans*, *L. coryniformis*, *L. plantarum*, *L. fuchuensis*, *Microbacterium aerolatum*, *M. luteolum*, *M. saperdae*, *M. testaceum*, *Paenibacillus glucanilyticus*, *Sphingopyxis terrae*, *Staphylococcus schleiferi*, *Stenotrophomonas maltophilia* *S. pictorum* y *Stenotrophomonas sp.* En la semana 15, se volvió a reducir el número de microorganismos predominando bacterias como *Bacillus cereus*, *Brevundimonas vesiculans*, *Cupriavidus oxalaticus*, *Glutamicibacter creatinolyticus*, *Pseudomonas lutea* y *Pseudomonas sp.* (presentadas en la figura 17).

En contraste con la fertilización usando harina de soya como un fertilizante orgánico encontramos una mayor diversidad que se mantiene o no recambia tan rápido como con el fertilizante inorgánico. Por ejemplo los Firmicutes se mantienen entre el 20 y 30% en las semanas 5 y 10, y aumenta hasta un 55% en la semana 15. Las plantas presentan una mejor distribución entre Alfa, Beta y Gammaproteobacteria.

Por ejemplo, la clase Alfaproteobacterias entre el 5 y el 10% del total del microbioma endófito activado de las plantas, ya que debemos recordar que antes de cualquier tratamiento las bacterias no se pudieron aislar géneros pertenecientes a esta clase de bacterias, sin embargo en la tercer semana este tipo de bacterias desaparecen. La clase Betaproteobacteria se mantiene entre un 15% y un 25%, siendo mayor en la semana 10 y se reduce a un valor menor al 10% en la tercer semana. Las Gammaproteobacteria están presentes en todo el seguimiento, siendo el 30% en la semana 15, considerado como el mayor porcentaje de las 3 semanas analizadas. También bacterias que pertenecen al filo Actinobacteria se presentan en este tratamiento, aunque en menor proporción en las semanas 5 y 10 y desaparecen en la semana 15. Llamo nuestra atención la aparición de bacterias que pertenecen al filo Bacteroidetes en la primer semana superiores al 10% y después se reducen al 5% en la semana 10. Este tratamiento, la bacteria comercial y la cepa de suelo 109.1 presentan bacterias de este filo en la semana 5, así como el nitrato de Lantano y el cloruro de Lantano muestran bacterias de este grupo taxonómico en la semana 10 y 15 respectivamente.

Tal y como se presenta en la figura 17, se hallaron que el tratamiento con harina de soya bacterias como *Achromobacter xylosoxidans*, *Aeromonas hycrophila*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. jeotgali*, *B. subtilis*, *Clostridium difficile*, *Cupriavidus necator*, *Curtobacterium sp.*, *Flavobacterium johnsoniae*, *F. nitrogenifigens*, *Lactobacillus paracasei*, *Ochrobactrum intermedium*, *Pseudomonas japónica*, *P. nitroreducens*, *Rhizobium tropici* y *Sphingobacterium thalpophilium*, aumentando en la diversidad a la semana 10, donde se identificaron las siguientes bacterias *Achromobacter piechaudii*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas schubertii*, *Arthrobacter sp.*, *A. tumbae*, *Bacillus mojavenensis*, *B. weihenstephanensis*, *Castellaniella defragans*, *Chryseobacterium indologenes*, *Corynebacterium sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Pandoraea pnomenusa*, *Pandoraea sp.*, *Pseudomonas graminis*, *P. kilonensis*, *Rhizobium radiobacter*, *Staphylococcus hamolyticus*, *S. lugdunensis* y *Stenotrophomonas maltophilia* y en la semana 15 se recuperaron bacterias tipo *Aeromonas veronii*, *Bacillus licheniformis*, *Enterobacter bugadiensis*, *Lactobacillus saerimneri*, *Paenibacillus amylolyticus*, *P glucanilyticus* y *Pseudomonas citronellolis*.

Respecto a las tierras raras que se usaron en este proyecto como “inductores” del crecimiento en este proyecto, no se observaron diferencias drásticas en la composición del microbioma activado. En la semana 5, la principal diferencia observada es en el contenido de Proteobacterias y Actinobacteria. Ambos filos son mayores en el $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, pero la diferencia más aparente es en el contenido de la clase Alfaproteobacteria. Los Firmicutes son mayores en el LaCl_3 en un 10% comparados con el otro lantánido. En la semana 10, la principal diferencia observada es el contenido de Gammaproteobacteria y Bacteroidetes que se alcanzó en el nitrato de lantano de hasta un 50% y un 10% respectivamente. Cabe señalar la diferencia respecto a las Gammaproteobacteria es compensado por el porcentaje de la clase Alfaproteobacteria y el aumento de los Firmicutes. Los Bacteroidetes solo aparecen en el tratamiento con nitrato de Lantano, como ya fue mencionado. En la semana 15 la principal diferencia es el cambio en el contenido de Firmicutes, la aparición de Bacteroidetes en el tratamiento con cloruro de Lantano y la desaparición de cepas pertenecientes a la clase Alfaproteobacteria.

Respecto al genero y especie el tratamiento con cloruro de lantano no presenta tan drásticos en el paso de las semanas; en la semana 5 se halló *Bacillus altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Brevibacterium linens*, *Brevundimonas sediminis*, *Falsibacillus pallidus*, *Gordonia branchialis*, *Herbaspirillum aquaticum*, *Lactobacillus paracasei*, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas citronellolis*, *P. mendocina*, *P. monteili*, *Sphingopyxis terrae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, en la semana 10 *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *B. oshimensis*, *B. pseudomcoides*, *Cupriavidus necator*, *Lactobacillus corvatus*, *L. kitasatonis*, *L. plantarum*, *Paenibacillus glucanilyticus*, *P. xylanilyticus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium radiobacter*, *Sphingomonas sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces griseus* y en la semana 15 *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas veronii*, *Bacillus megaterium*, *B. mojavenensis*, *B. vallismortis*, *Bacteroides fragilis*, *Chryseobacterium gambinii*, *Chryseobacterium sp.*, *Filifactor villosus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Microbacterium dextranolyticum*, *Pseudomonas nitroreducens* y *Streptomyces lavendulae*.

Por otro lado, el tratamiento con nitrato de lantano presenta bacterias como *Agromyces rhizosphaerae*, *A. ramosus*, *Arthrobacter wolowensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Curtobacterium albidum*, *Devosia riboflavia*, *Enterobacter cloacae*, *E. kobei*, *Enterococcus faecium*, *Falsibacillus pallidus*, *Herbaspirillum huttiense*, *Lactobacillus ingluviei*, *L. murinus*, *L. paracasei*, *Pseudomonas citronellolis*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*, *P. putida*, *Sphingomonas gangvinis*, *S. yabuuchiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces lavendulae*, consideramos a este tratamiento como ya se menciona el de mayor diversidad en la semana 10 con bacterias tipo *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *Bacteroides fragilis*, *Chryseobacterium lipophiloflavum*, *Cryptococcus neoformans*, *Lactobacillus antri*, *L. oligofermentans*, *Paenibacillus urinalis*, *Paraburkholderia caribensis*, *Pseudomonas gessardi*, *P. indica*, *P. monteili*, *P. oryzihabitans*, *Pseudomonas sp.*, *P. stutzeri*, *Rhodosporidium toruloides*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus schleiferi*, *Terrimonas ferruginea* y en la semana 15 hay un decremento de bacterias y se determinó la presencia de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus corvatus*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus sp.* y *Paraburkholderia phenazium*.

En la figura 21 se presenta el comportamiento con respecto al número de géneros y especies colectados a lo largo del tiempo de experimentación.

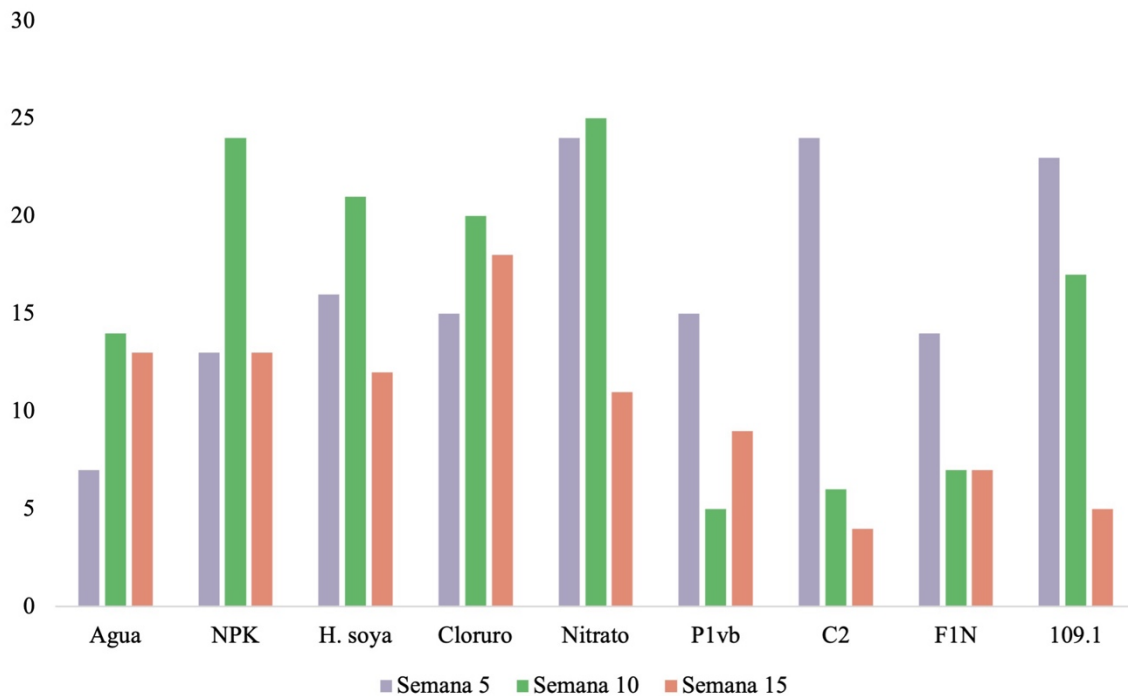


Figura 21. Comportamiento temporal de los géneros bacterianos aislados de las plantas de banano entre los diferentes tratamientos. En los tratamientos no biológicos se observa que el cambio más drástico en el número de cepas que correlaciona con la diversidad ocurre en la semana 10.

En resumen, hubo una mayor cantidad de bacterias del filo de firmicutes y Gammaproteobacterias. También se identificaron bacterias de otros filos importantes para el microbioma del banano como fueron Alfa, Beta proteobacterias, Actinobacteria y Bacteroidetes, los cuales todos tienen función en el microbioma como defensa ante microorganismos y ayuda en la toma de nutrientes. Ligeros cambios en el estrés de la planta afectan hasta en un 50% las actividades bacterianas, pero cambios bruscos afectan la composición (Qi, *et al*, 2018). Es notable que las bacterias endófitas que están presentes en la etapa de la semana cero y semana 5 desaparecieron, y en su lugar, aparecieron otras

bacterias endofitas. En conclusión, la diversidad bacteriana endofítica aumentó temporalmente hasta la semana 10 y luego disminuyó en una etapa posterior.

En la identificación de los generos y las especies se encontraron mucha diversidad, esta activandose dependiendo del tratamiento aplicado en las plantas (figura 17), en ambos lotes el genero *Bacillus* fue el más común, este genero es utilizado actualmente para su uso en la agricultura biorracional, en los agrosistemas y en el control de enfermedades, ya que este género es conocido por sus mecanismos de acción, tales como la excreción de antibióticos, toxinas, sideróforos y enzimas líticas (Villareal, et al., 2018).

El género de *Paenibacillus* se encuentra registrado en la literatura como fijador de nitrógeno, encontrado en la rizósfera de plantaciones de algodón (Hussien, et al., 2011), mientras que el género de *Pseudomonas* se ha registrado para su uso como biofertilizantes sumado a sus propiedades de control biológico y son catalogados como microorganismos de promotores de crecimiento vegetal (Cano, 2011). *Acinetobacter*, siendo un género registrado como un patógeno oportunista responsable de varias enfermedades como infecciones en la piel, tracto urinario, infecciones respiratorias e infecciones postquirúrgicas (Rada, 2016), lo cual resulta un dato interesante ya que en las pruebas agronómicas mostraron capacidad de producir auxinas y ACC deaminasa. También encontramos cepas de *Cupriavidus* agrupada como β -Proteobacteria, el cual ha sido utilizado para su uso en biorremediación que es degradador de petroquímicos, halobenzoatos, clorofenoles, polifenoles y compuestos aromáticos (Pérez, et al., 2008).

4.2.5 Análisis de la diversidad funcional de las bacterias endófitas.

La prueba de producción de proteasas, se realizó con el medio Skim Milk, el cual es un medio selectivo para bacterias ácido lácticas o bacterias que produzcan enzimas proteolíticas: como las proteasas y peptidasas. En este caso midió la prueba de producción de proteasas, para determinar la capacidad de estas bacterias en transformar material orgánico proteinaceo. El análisis de la fijación biológica de nitrógeno en las bacterias caracterizadas en este trabajo se realizó a través de la evaluación de la capacidad de crecimiento en un medio selectivo conocido como NFB-malato. *Bacillus* y *Pseudomonas*, ambos generos han sido reportados en la literatura que son fijadores de nitrógeno en la rizósfera y que actualmente son

consideradas microorganismos promotores del crecimiento (Massoda et al., 2020; Orozco, *et al.*, 2009; Corrales, et al., 2017).

Los microorganismos solubilizadores de fosforo secretan ácidos orgánicos y fosfatasas capaces de convertir fosfatos insolubles en solubles, que son utilizados por las plantas. La disponibilidad del fósforo en los suelos es esencial para el crecimiento vegetal ya que constituye el 0.2% del peso seco de la planta, aparte que está involucrado en el desarrollo de raíz, en el crecimiento y en la floración. Las plantas adquieren el fosfato a partir de la solución del suelo en forma inorgánica en estado soluble, la disposición de este elemento cada vez es más limitada debido a la progresiva insuficiencia de sus fuentes naturales, es por esto que cada vez se agregan más fertilizantes fosfatados de manera desmedida provocando cambios en el suelo y su fertilidad (Beltrán-García et al., 2014). La solubilización de fosfatos se evaluó en este trabajo al valorar la solubilización en el medio NBrip.

El uso indiscriminado del uso de fertilizantes químicos ha ocasionado un cambio al microbioma nativo de los suelos, provocando bajos rendimientos y aumento en los costos de producción. Las algunas bacterias nativas del suelo que son consideradas como bacterias promotoras de crecimiento son productoras de auxinas. Las auxinas son hormonas de crecimiento de plantas, debido a su capacidad de estimular el crecimiento diferencial en respuesta a estímulos de luz. El ácido indolacético (AIA) es una de las auxinas más conocidas y con un rol muy importante ya que está involucrado en procesos fisiológicos que incluyen el alargamiento, división celular, diferenciación de tejido, fototropismo, gravitropismo y en respuesta en defensa (Vega, *et al.*, 2016).

Las plantas viven en un ambiente cambiante e impredecible, causando un estrés en ellas. Los factores ambientales son clasificados como bióticos y abióticos, los factores bióticos son los que implican la presencia de agentes biológicos, mientras que los abióticos son considerados la concentración de CO₂, temperatura, pH, salinidad, presencia de contaminantes, contenido de macro y micronutrientes. En respuesta a tales factores las plantas incrementan la biosíntesis de etileno, lo que induce ciertos cambios característicos en la planta, como detener la elongación de la planta y raíces, acelerar la senescencia de las flores y provocar la muerte

de la planta, entre otros efectos. Sin embargo, las plantas han desarrollado diversas estrategias para sobrellevar todo ese estrés ambiental. La producción de la enzima ACC desaminasa (la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) es un mecanismo que usan las PGPR para promover el crecimiento de las plantas influenciadas por el estrés ambiental, la cual lleva a dos ventajas: disminuir las concentraciones de etileno en la planta y aumentar la concentración de amonio en el suelo. (Esquivel, R., *et al.*, 2013)

Esto nos puede ayudar a determinar la funcionalidad de las bacterias que se activan en cada tratamiento y la semana en la que se presentan, pensando en el estrés a la que pueda estar sometida la planta. Como se puede observar en la figura 18, en la semana 0 tenemos bacterias que nos ayudan a la promoción del crecimiento vegetal, mientras que conforme el paso de las semanas hay un incremento en el porcentaje de bacterias positivas a la prueba de ACC deaminasa, que ayudan a las plantas a soportar el estrés abiótico (causado por el espacio limitado en la maceta y por el limitante de nutrientes) y en la prueba de proteasas que nos puede

4.2.6 Antagonismo e inhibición.

En estudios anteriores se ha demostrado que en el momento de el ataque de microorganismos patógenos a plantas existe una activación de genes de defensa para contrarrestar el estrés biótico. En esta prueba de inhibición de bacterias activadas en los tratamientos contra los hongos y bacterias patógenas de diferentes plantas, se pudo observar que los microorganismos activos trabajan en la defensa de la planta con distintos mecanismos como la producción de moléculas con propiedades antifúngicas y antibacterianas.

Durante varios años se han investigado géneros de bacterias que se pueden utilizar como control biológico contra hongos patógenos como pueden ser *Bacillus* y *Pseudomonas*, estos son los que se han dado a conocer por sus mecanismos antagónicos contra patógenos y los que se han comercializado con estos fines (Villareal, et al., 2018, Cano, 2011).

El objetivo de hacer esta prueba de inhibición y antagonismo contra la bacterias patógena *K. cowanii*, el endófito *B. velezensis* y los tres hongos patógenos de diferente origen, fue demostrar que las bacterias activadas del microbioma endófito del tratamiento de *B. velezensis* (P1vb) podrían tener una actividad antagónica contra los patógenos, por el hecho

de que *B. velezensis* se comporta como un agente de control biológico, debido a que varios estudios han reportado que la planta activa sus genes de defensa contra estos microorganismos patógenos y son los que hace que contrarreste el estrés biótico y que tengan una respuesta de ataque, con esta prueba lo que se buscó evidenciar es que, al momento de la activación del microbioma con los tratamientos aplicados, aparte de la activación de los genes, lo que ayuda a la defensa de la planta son estas bacterias que salen de dormancia y tienen un efecto de crecimiento (solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno) así como para tolerar estrés tanto biótico como abiótico (ACC deaminasa y proteasas), también se puede llegar a pensar que secretan moléculas con propiedades antibióticas y antifúngicas. Al observar que el 37.5% de las bacterias probadas inhibieron a la bacteria patógena *K. cowanii*, el 53% inhibieron al hongo del mango, el 32.% al de coco y 40% al de aguacate, siendo estos porcentajes altos, se puede llegar a deducir que los microorganismos activos de este tratamiento pueden tener un efecto en contra de patógenos para hacer que no afecte tanto el estrés biótico así como para ayudar a la sobrevivencia de la planta.

El efecto de antagonismo que se ha observado de las bacterias endófitas realmente no se puede asociar a las semanas de tratamiento dado que se presentaron bacterias de las tres semanas de extracción, en el momento de observar las pruebas de inhibición se podría llegar a concluir que las cepas de *B. amyloliquefaciens* es la misma dada a las propiedades antagonicas que tienen contra los microorganismos patógenos, sin embargo al comparar las pruebas agronómicas podemos ver que no son las mismas ya que no coinciden con las propiedades que tienen de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, etc.

Al hacer el analisis de que bacterias son capaces de inhibir a los hongos y a las bacterias, se observa que las que inhiben a los tres hongos y a la *Kosakonia*, son bacterias de los generos *Curtobacterium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, como se mencionó anteriormente, estos dos generos son los que son considerados como control biológico y tienen capacidad de producir moléculas que funcionan como antimicrobianas y antifúngicas. Kuddus, et al., 2008, demostró que hay cepas de *Curtobacterium* que secretan proteasas extracelulares, lo que nos puede hacer pensar que esta bacteria puede ser utilizada como antimicrobiano por su capacidad de producir la enzima proteasa generando una protección a la planta.

4.3 Conclusión

En el presente trabajo se aislaron e identificaron caso 800 bacterias pertenecientes a un microbioma activado en respuesta a estímulos biológicos y químicos.

Los tratamientos tienen una influencia indirecta sobre el soporte del crecimiento y supervivencia de la planta, debido a que cada tratamiento induce diferencialmente un microbioma con diversidad taxonómica y funcional.

Con el trabajo presentado podemos concluir que las bacterias endófitas de la planta de banano solo influye en el crecimiento aéreo (tamaño de tallo y foliaje). Las tierras raras promueven el crecimiento de las raíces en plantas de banano con inoculación de 20 semanas, a partir de este periodo no se puede determinar el efecto que se tiene en la planta o si pueda llegar a tener un efecto fitotóxico.

Uno de los puntos más importantes concluidos en el trabajo es que el microbioma endófito de las plantas se ve afectado por el estrés o tipo de tratamiento con el cual esté siendo sometido para tener una mejor supervivencia y poder estar en un estado latente donde no hay crecimiento, pero tampoco muerte de la planta. Este microbioma activado ayuda a la planta a sobrevivir contra ataque de patógenos y nos hace pensar que no solo es la activación de los genes de defensa.

Referencias

Abbas, S. (2022). Climate change and major crop production: evidence from Pakistan. *Environmental Science and Pollution Research*. 29, 5406–5414.

Abedini, D., Jaupitre, S., Bouwmeester, H.J., Dong, L. (2021). Metabolic interactions in beneficial microbe recruitment by plants. *Current opinion in biotechnology*. 70, 241-247.

Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*. 221:36-49.

Bakker, P., Berendsen, R., Van Pelt, J., Vismans, G., Yu, K., Li, E., Van Bentum, S., Poppeliers, S., Sanchez, J., Zhang, H., Goossens, P., Stringlis, I., Song, Y., de Jonge, R., Pieterse, C. (2020). The soil-borne identity and microbiome-assisted agriculture: looking back to the future. *Molecular Plant*. 13, 1394–1401.

Bai, L., Zhang, X., Li, B., Sun, F., Zhao, X., Wang, Y., Lu, Z., Zhang, D., Fang, J. (2022). Fungal communities are more sensitive to nitrogen fertilization than bacteria in different spatial structures of silage maize under short-term nitrogen fertilization. *Applied Soil Ecology*. 170:104275.

Bardgett, R., Van Der Putten, W. (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*. 515, 505–511.

Bebber, D., Richards, V. (2022). A meta-analysis of the effect of organic and mineral fertilizers on soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*. 175.

Beilsmith, K., Perisin, M., Bergelson, J. (2021). Natural bacterial assemblages in *Arabidopsis thaliana* tissues become more distinguishable and diverse during host development. *American Society of Microbiology*. 12:e02723-20.

Beltrán-García, M.J., Prado, F.M., Oliveira, M.S., Ortiz, D., Scalfio, A.C. Pessoa Jr, A., Medeiros, M.H.G., White, J.F., Di Mascio, P., (2014) Singlet Molecular Oxygen Generation by Light-Activated DHN-Melanin of the Fungal Pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in Black Sigatoka Disease of Bananas. *PLOS ONE* 9(3): e91616.

Beltrán, M., Martínez, A., Olmos, I., Valdez, B., Chavez, Y.Y., Di Mascio, P., White, J. (2021). Probiotic Endophytes for More Sustainable Banana Production. *Microorganisms*. 9(9):1805.

Beltrán, M.E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15(1):101-113.

Berg, G., Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 68, 1–13.

Berg, G., Kusstatscher, P., Abdelfattah, A., Cernava, T., Smalla, K. (2021) Microbiome Modulation—Toward a Better Understanding of Plant Microbiome Response to Microbial Inoculants. *Frontiers in Microbiology*. 12:650610

Bienert, M., Diehn, T., Richet, N., Chaumont, F., Bienert, Gerd. (2018). Heterotetramerization of Plant PIP1 and PIP2 Aquaporins Is an Evolutionary Ancient Feature to Guide PIP1 Plasma Membrane Localization and Function. *Front. Plant Sci*. 9.

Callejas, R., Rojo, E., Benavidez, C., Kania E. (2012). Crecimiento y distribución de raíces y su relación con el potencial productivo de parrales de vides de mesa. *Agrociencia*. 23-35.

Cano, M.A. (2011) Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 14(2): 15 – 31.

Carrión, V., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., de Hollander, M., Ruiz-Buck, D., Mendes, L., van Ijcken, W., Gomez-Exposito, R., Elsayed, S., Mohanraju, P., Arifah, A.,

van der Oost, J., Paulson, J., Mendes, R., van Wezel, G., Medema, M., Raaijmakers, J. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*. 366(6465):606-612.

CEDRSSA. (2019). La producción el comercio del plátano. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria.

Collavino, M., Cabrera, E., Bruno, C., Aguilar, O. (2020). Effect of soil chemical fertilization on the diversity and composition of the tomato endophytic diazotrophic community at different stages of growth. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51(4):1965-1975.

Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V., Raaijmakers, J. (2019). Ecology and Evolution of Plant Microbiomes. *Annual Review of Microbiology*. 73:69-88.

Corrales, L.C., Caycedo, L., Gómez, M.A., Ramos, S.J., Rodríguez, J.N. (2017) *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA*, 15 (27): 45-65.

de Oliveira, C., Ramos, S.J., Siqueira, J.O., Faquin, V., de Castro, E.M., Amaral, D.C., Techio, V.H., Coelho, L.C., e Silva, P.H., Schnug, E., Guilherme, L.R. (2015) Bioaccumulation and effects of lanthanum on growth and mitotic index in soybean plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122, 136– 144.

DeAngelis K. M., Pold G., Topçuoğlu B. D. van Diepen L. T. A., Varney1 R. M., Blanchard J. L, Melillo J., Frey S. D. (2015) Long-term forest soil warming alters microbial communities in temperate forest soils. *Frontiers in Microbiology*. 6.

Dita, M., Teixeira, L.A.J., O'Neill, W., Pattison, T., Weinert, M.P., Li, C.Y., Zheng, S.J., Staver, C., Thangavelu, R., Viljoen, A. (2020). Current state of *Fusarium* wilt of banana in the subtropics. *Acta Horticulturae*. 45-56.

Du, Y., Wang, P., Chen, J., Song, C. (2008). Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol.* 50(10):1318-1326.

Dubey, A., Malla, M. A., Khan, F., Chowdhary, K., Yadav, S., Kumar, A., Sharma, S., Khare, P. K., Khan, M. L. (2019) Soil microbiome: a key player for conservation of soil health under changing climate. *Biodiversity Conservation.* 28, 2405–2429.

Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi, K. (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 751-763.

Effendi, Y., Khalish, A., Pambudi, A. (2019). Characterization of soil microbes in an indicated fusarium wilt-suppressive and conducive soils in banana plantation at Sukabumi, West Java. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 468.

Elsayed, T., Jacquiod, S., Nour, E., Sørensen, S., Smalla, K. (2020). Biocontrol of Bacterial Wilt Disease Through Complex Interaction Between Tomato Plant, Antagonists, the Indigenous Rhizosphere Microbiota, and *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology.* 10:2835.

Erlacher A, Cardinale M, Grosch R, Grube M and Berg G (2014) The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology.* 5:175.

Esquivel, R., Gavilanes, M., Cruz, R., Huante, P. (2013) Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 36 (3): 251 – 258.

FAO (2018), Situación del mercado del banano, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, Roma, Italia.

FAO, (2009), La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050, en *Cómo alimentar al mundo en 2050*, Secretaría del Foro de Alto Nivel de Expertos, Italia, Roma, pp. 4.

FAO, (2019), *Fertilizer: trends and outlook to 2022*, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, Roma, Italia.

Fashui H, Ling W, Chao L (2003) Study of lanthanum on seed germination and growth of rice. *Biological Trace Element Research*. 94, 273–286.

Fashui H, Zhenggui W, Guiwen Z (2000) Effect of lanthanum on aged seed germination of rice. *Biological Trace Element Research*. 75, 205–213.

Fashui, H. (2002). Study on the mechanism of cerium nitrate effects on germination of aged rice seed. *Biological Trace Element Research*. 87, 191–200.

Forrest, K.L., Bhave, M. (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct Integr Genomics*. 263-289.

Galloway-Peña, J., Hanson, B. (2020). Tools for Analysis of the Microbiome. *Digestive diseases and sciences*. 65(3), 674–685.

Gao, M., Xiong, C., Gao, C., Tsui, C., Wang, M., Zhou, X., Zhang, A., Cai, L. (2021). Disease-induced changes in plant microbiome assembly and functional adaptation. *Microbiome*. 9, 187.

Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*. 2:1.

Grageda-Cabrera, O., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J., Vera-Nuñez, J. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(6).

Gull, A., Lone, A., Wani, N. (2019). Biotic and Abiotic Stresses in Plants. In (Ed.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen.

Hafeez, F., Yasmin, S., Ariani, D., Renseigné N., Zafar, Y., Malik, Y. (2006) Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA*. 26(2), 143-150.

Haneklaus, S., Schnug, E., Lottermoser, B., Hu, Z. (2007). Lanthanides. Barker, A., Pilbeam, D. (CR. Press). *Handbook of Plant Nutrition*. 625-650.

Hu, X., Ding, Z., Wang, X., Chen, Y., Dai, L. (2002). Effects of lanthanum and cerium on the vegetable growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 69 (5), 727–733.

Hu, Z., Richter, H., Sparovek, G., Schnug E. (2004) Physiological and Biochemical Effects of Rare Earth Elements on Plants and Their Agricultural Significance: A Review. *Journal of Plant Nutrition*. 27:1, 183-220.

Hu, Z., Richter, Z., Sparovek, G., Schnug, E. (2004). Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and their agricultural significance: a review. *Journal of Plant Nutrition*. 27 (1), 183–220.

Hussien, A.I., El-Ghaffar, I.A., El-Sayed, A., Aldebis, H.K., Vargas, E. (2011) Actividad insecticida y fijadora de nitrógeno de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa* que expresa Cry1C. *Revista Colombiana de Entomología* 37 (2): 192-19.

Iniguez, L., Dong, Y., Triplett, E. (2004). Nitrogen Fixation in Wheat Provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17, 1078-1085.

Jiménez, R., Medina, R., Carballar, S., Orozco, M., Santoyo, G., Loeza, P. (2022). Teamwork to Survive in Hostile Soils: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Ameliorate Soil Salinity Stress in Crops. *Microorganisms*. 10, 150.

Kong, H., Song, G., Sim, H, Ryu, C. (2021) Achieving similar root microbiota composition in neighbouring plants through airborne signalling. *The ISME journal*. 15, 397–408.

Kotelnikova, A., Rogova, O., Stolbova, V. (2020). Lanthanides in the Soil: Routes of Entry, Content, Effect on Plants, and Genotoxicity (a Review). *Eurasian Soil Science*. 54:1, 117–134.

Kuddus, M., Ramteke, P. (2008). Purification and properties of cold-active metalloprotease from *Curtobacterium luteum* and effect of culture conditions on production. *Chinese Journal of Biotechnology*. 24(12):2074-2080.

Lahav, E. (1995). Banana nutrition. En *Bananas and plantains* (pp. 258-316). Springer.

Lee, S., Kong, H., Song, G., Ryu, C. (2021). Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease. *The ISME Journal*. 15, 330–347

Li, H., Qiu, Y., Yao, T., Ma, Y., Zhang, H., Yang, X. (2020). Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil and Tillage Research*. 199. 104577.

Lian, H., Qin, C., Zhang, L., Zhang, C., Li, H., Zhang, S. (2019). Lanthanum nitrate improves phosphorus-use efficiency and tolerance to phosphorus-deficiency stress in *Vigna angularis* seedlings. *Protoplasma*. 256, 383–392.

Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S., & Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3730–3734.

Liu, M., Hasenstein, K. H. (2005). La³⁺ uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays* L. *Planta*. 220(2), 658 – 666.

Macedo, G., Valdez, B., Prado, F., Prieto, K., Yamaguchi, L., Kato, M., Canto, B., Carrillo, M., Di Mascio, P., White, J., Beltrán, M. (2019). *Enterobacter cloacae*, an Endophyte That Establishes a Nutrient-Transfer Symbiosis With Banana Plants and Protects Against the Black Sigatoka Pathogen. *Frontiers in Microbiology*. 10:804.

Manzo Sánchez, G., Orozco Santos, M., Martínez Bolaños, L., Garrido Ramírez, E., Canto Canche, B. (2016). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa* sp.) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 89- 107.

Masooda, S., Zhaoa, X.Q., Shen, R.F. (2020). *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. *Scientia Horticulturae*, 272: 109581.

Narvaéz, J., Andrade, R. (2017). Fertiliser composition comprising of soy hydrolysates. (Patente internacional, no. PCT/MX2016/050007. Azul Natura SA de CV.

Nisrina, L., Effendi, Y., Pancoro, A. (2021). Revealing the role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in suppressive soils against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* based on metagenomic analysis. *Heliyon*. 7, e07636.

Olmos, I. (2020). Diversidad del bacterioma cultivable del suelo de una plantación bananera: identificación y selección con fines del desarrollo de un bioinoculante. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Guadalajara.

Orozco-Santos, M., García-Mariscal, K., Manzo-Sánchez, G., Guzmán-González, S., Martínez-Bolaños, L., Beltrán-García, M., Garrido-Ramírez, E., Torres-Amezcu, J., Canto-Canché, B. (2013). La Sigatoka negra y su manejo integrado en banano. Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México.

Orozco, C., Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *BOSQUE* 30(2): 70-77.

Panigrahi, N., Thompson, A., Zobelzu, S., Knox, J. (2021). Identifying opportunities to improve management of water stress in banana production. *Scientia Horticulturae*. 276.

Park, C. J., Seo, Y. S. (2015). Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *The plant pathology journal*, 31(4), 323–333.

Pastawan, V., Fitriyanto, N., Nakagawa, T. (2020). Biological Function of Lanthanide in Plant-Symbiotic Bacteria: Lanthanide-Dependent Methanol Oxidation System. *Reviews in Agricultural Science*. 8, 186–198,

Pérez, D., de la Iglesia, R., Pieper, D.H., González, B. (2008) Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant- degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5): 736–794

Pérez, J., Carrión, V. J., de Hollander, M., Raaijmakers, J. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome* 6:143.

Pious, T., Thyvalappil, A.S. (2009). Endophytic Bacteria Associated with Growing Shoot Tips of Banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine and the Affinity of Endophytes to the Host. *Microb Ecol*. 58: 952–964.

Preston G. M. (2004). Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 359(1446), 907–918.

Qi, D., Wieneke, X., Tao, J., Zhou, X., Desilva, U. (2018). Soil pH Is the Primary Factor Correlating with Soil Microbiome in Karst Rocky Desertification Regions in the Wushan County, Chongqing, China. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1027.

Rada, J. (2016) *Acinetobacter* un patógeno actual. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 55(1): 29 – 48.

Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd Allah, E. (2017). *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Frontiers in Physiology*. 8:667.

Ramírez, S.M., Trejo, L.I., García, S., Pérez, J.A., Gómez, F.C. (2018). Cerium enhances germination and shoot growth, and alters mineral nutrient concentration in rice. *PLoS ONE* 13:e0194691.

Ravi, I., Vaganan, M. (2016). Abiotic Stress Tolerance in Banana. Srinivasa, N. Shivashankara, K., Laxman, R. (eds). *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops* (207 – 218). Springer.

Redling, K. (2006). Rare earth elements in agriculture with emphasis on animal husbandry. (Tesis de doctorado). Universidad Ludwig Maximilians de Munich.

Ren, G., Zhang, H., Lin, X., Zhu, J., Jia, Z. (2015). Response of leaf endophytic bacterial community to elevated CO₂ at different growth stages of rice plant. *Frontiers in Microbiology*. 6:855.

Rizaludin, M. S., Stopnisek, N., Raaijmakers, J. M. y Garbeva, P. (2021). The Chemistry of Stress: Understanding the ‘Cry for Help’ of Plant Roots. *Metabolites*, 11(6), 357.

Rolli, E., Vergani, L., Ghitti, E., Patania, G., Mapelli, F., Borin, S. (2021). “Cry-for-help” in contaminated soil: a dialogue among plants and soil microbiome to survive in hostile conditions. *Environmental Microbiology*. 23(10), 5690–5703.

Santos-Medellín, C., Liechty, Z., Edwards, J., Nguyen, B., Huang, B., Weimer, B., Sundaresan, V. (2021). Prolonged drought imparts lasting compositional changes to the rice root microbiome. *Nature Plants*. 7, 1065–1077.

Sang, M. K., and Kim, K. D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria suppressive to *Phytophthora* blight affect microbial activities and communities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum* L.) in the field. *Applied Soil Ecology*. 62, 88–97.

Schwieger, F., Tebbe, C. (2000). Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant *Medicago sativa* and a non-target plant *Chenopodium album*—linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 3556.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (20 de marzo del 2021). Aumentó 2.9 por ciento producción de plátano mexicano en 2020. Gobierno de México. Recuperado el 28 de abril del 2022. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/aumento-2-9-por-ciento-produccion-de-platano-mexicano-en-2020>

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). FUSARIOSIS DE LAS MUSÁCEAS *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen Raza 4 Tropical. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Mal de Panamá. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Singh, A., Singh, P. K., Sharma, A. K., Singh, N. K., Sonah, H., Deshmukh, R., & Sharma, T. R. (2019). Understanding the Role of the WRKY Gene Family under Stress Conditions in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plants* (Basel, Switzerland), 8(7), 214.

Singh, R., Dubey, A. (2018). Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. *Frontiers in Microbiology*. 9:1767.

Tanveer, S., Ali, B. (2022). Evaluation of Bacillus and Rhizobium Strains to Enhance the Growth of *Vigna radiata* (L.) under Drought Stress. *Pak-Euro Journal of Medical and Life Sciences*. 5(1), 101-112.

Vega, P., Chanchignia, H., González, M., Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol- 3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37(1).

Villareal, M.F., Villa, E.D., Cira, L.A., Estrada, M.I., Parra, F.I., de los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36 (1): 95 – 130.

Vodyanitskii, Y. (2012). Soil lanthanides and their effect on plants. *Agrokhimiya*. 4, 84–96.

Wahid, P.A., Valiathan, M.S., Kamalam, N.V., Eapen, J.T., Vijayalakshmi, S., Prabhu, R.K., Mahalingam, T. R. (2000). Effect of rare earth elements on growth and nutrition of coconut palm and root competition for these elements between the palm and *Calotropis gigantea*. *Journal of Plant Nutrition*. 23(3), 329 – 338.

Yankey, R., Omoor, I., Karanja, J. Wang, L., Urga, R., Fang, C., Dongmei, L., Lin, H., Okal, J., Datti, I., Nsanzinshuti, A., Rensing, C., Lin, Z. (2022). Metabolic properties, gene functions, and biosafety analysis reveal the action of three rhizospheric plant growth-promoting bacteria of Jujuncao (*Pennisetum giganteum*). *Environmental Science and Pollution Research*. 29, 38435–38449.

Zhang, J., Liu, YX., Zhang, N. Hu, B., Jin, T., Xu, H., Qin, Y., Yan, P., Zhang, X., Guo, X., Hui, J., Cao, S., Wang, X., Wang, C., Wang, H., Qu, B., Fan, G., Yuan, L., Garrido-Oter, R., Chu, C., Bai, Y. (2019). NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nature Biotechnol.* 37, 676–684

Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., Zhu, J. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics.* 23, 104–119 (2022).

Zhengyi, H., Herfried, R., Gerd, S., Ewald S. (2004). Physiological and Biochemical Effects of Rare Earth Elements on Plants and Their Agricultural Significance: A Review. *Journal of Plant Nutrition*, 27:1, 183-220.

Zhou, S.G. (1993). Energy table analysis and orientation of La in plants. *J. Electron Microscope.* 5, 400–403.

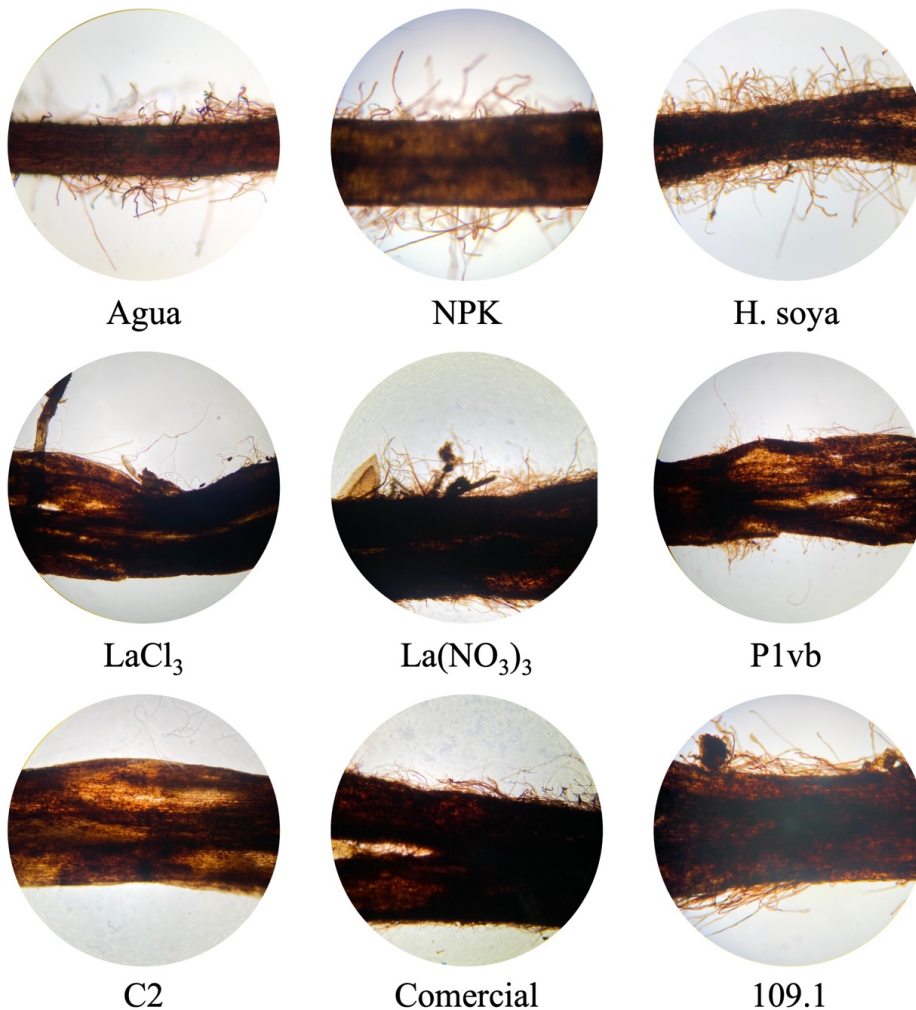
Zicari, M.A., d'Aquino, L., Paradiso, A., Mastrolitti, S., Tommasi, F. (2018). Effect of cerium on growth and antioxidant metabolism of *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 163

Anexos

Anexo 1. Diferencial del crecimiento (altura de tallo, ancho de tallo, número de hojas, número de raíces, peso fresco y peso seco) conforme el paso de las semanas 0-5, 5-10 y 10-15, dependiendo del tratamiento.

Tratamiento	Semana	Altura de tallo (cm)	Ancho de tallo (mm)	# hojas	# raíces	Peso fresco (gr)	Peso seco (gr)
Agua	5	1.3 ± 0.54	1.25 ± 0.45	1.5 ± 0.53	10		
	10	0.17 ± 0.25	1.26 ± 0.62	0.11 ± 0.78	10		
	15	0.56 ± 0.42	0.20 ± 0.16	0.25 ± 0.71	11	19.36	1.46
NPK	5	1.5 ± 0.88	1.24 ± 0.56	1.5 ± 0.85	8		
	10	0.78 ± 0.57	0.89 ± 0.59	0.11 ± 0.78	8		
	15	0.88 ± 0.35	0.29 ± 0.25	0.38 ± 0.74	9	32.74	2.09
Harina de soya	5	2.05 ± 0.98	2 ± 0.46	1.5 ± 0.71	9		
	10	1.33 ± 0.71	1.94 ± 0.88	1.11 ± 0.78	11		
	15	1.31 ± 0.84	0.38 ± 0.35	0.63 ± 0.52	11	43.23	2.72
LaCl₃	5	1.1 ± 0.57	1.69 ± 0.95	1.1 ± 0.88	8		
	10	0.28 ± 0.36	1.06 ± 0.92	0.22 ± 0.67	11		
	15	0.81 ± 0.59	0.24 ± 0.22	0.50 ± 0.53	12	21.93	1.37
La(NO₃)₃	5	0.75 ± 0.72	1.47 ± 0.52	1.6 ± 1.96	13		
	10	0.33 ± 0.43	0.6 ± 0.63	0.22 ± 0.67	14		
	15	0.63 ± 0.52	0.18 ± 0.09	0.25 ± 0.89	16	27.02	1.99
P1vb	5	2.35 ± 1.16	1.83 ± 0.84	1.7 ± 0.82	8		
	10	1 ± 0.83	1.21 ± 0.84	1 ± 0.71	9		
	15	1.56 ± 0.56	0.55 ± 0.40	0.75 ± 0.71	13	52.60	3.10
C2	5	3.05 ± 0.55	2.75 ± 0.83	1.7 ± 0.67	6		
	10	1.06 ± 0.73	1.27 ± 0.93	1.33 ± 0.71	11		
	15	1.75 ± 0.71	0.81 ± 0.60	0.88 ± 0.83	11	55.39	3.28
F1N	5	2.15 ± 0.75	2.28 ± 0.71	1.7 ± 0.82	7		
	10	0.61 ± 0.42	0.88 ± 0.54	0.78 ± 0.97	12		
	15	1.50 ± 0.89	0.96 ± 1	1 ± 0.53	13	37.14	2.20
109.1	5	1.15 ± 0.71	1.59 ± 0.98	0.8 ± 1.23	7		
	10	0.89 ± 0.89	1.02 ± 0.61	0.56 ± 0.88	10		
	15	0.63 ± 0.58	0.44 ± 0.27	0.88 ± 0.35	12	30.39	2.14

Los pelos radiculares son la parte de la raíz en la que se absorben la mayor parte de nutrientes y agua, si la plantas carece de alguno de estos producirá un mayor número de pelos radiculares hasta que se logre el transporte de lo que la planta necesita, por lo que también se analizaron las raíces mediante microscopía con tinción DAB y azul de anilina al 1%, se observaron las raíces con el objetivo 10X. En las imágenes de las microscopías se pueden observar que en los tratamientos de agua, NPK, harina de soya y nitrato de lantano se tiene un mayor número de pelos, mientras que en las bacterias 109.1 y la comercial se observan pelos radiculares, pero en menor concentración. Los tratamientos de cloruro de lantano, P1vb y C2 fueron los que tienen una mínima población de pelos radiculares.



Anexo 2. Microscopía (10X) de las raíces con tinciones DAB + azul de anilina 1% en los diferentes tratamientos.

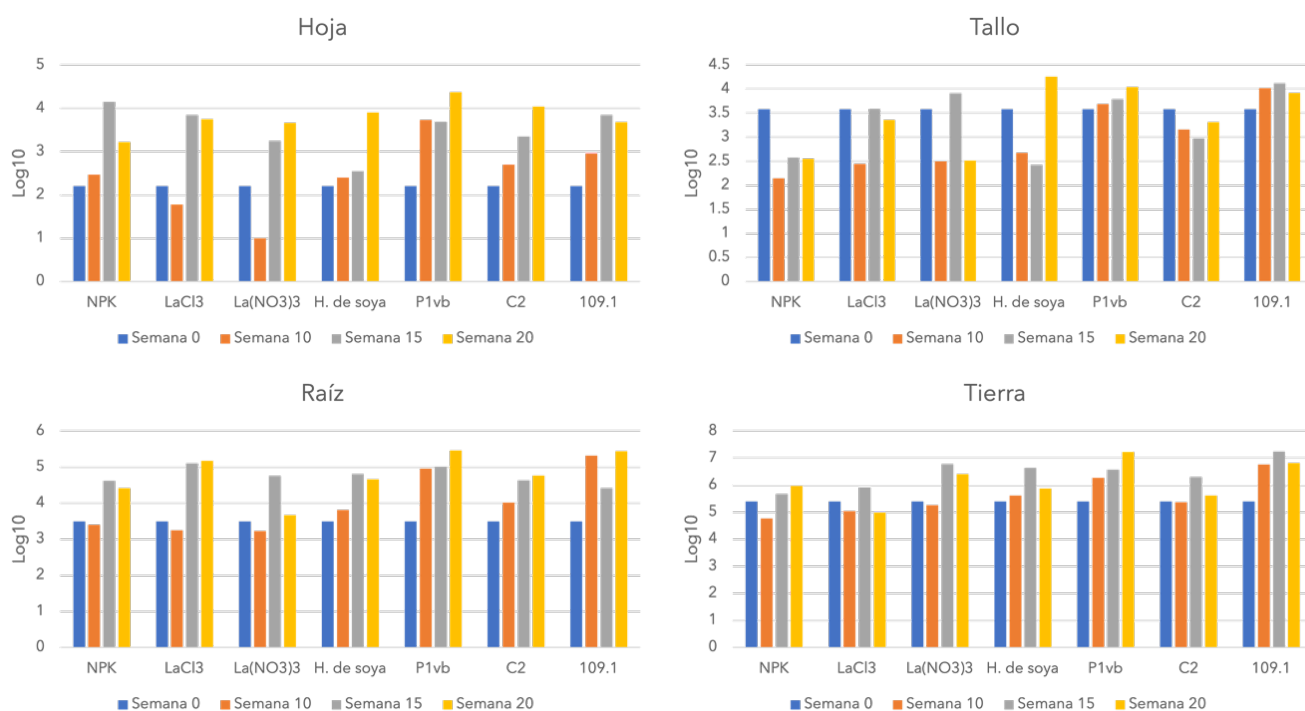
En el anexo 3 se presentan el número de unidades formadoras de colonias que se obtuvieron de los diferentes tejidos a lo largo del tratamiento. En el tejido de la hoja en la semana 0 se tuvieron 1.60×10^2 UFC/gr. En el tratamiento de NPK en la semana 10 se tuvieron 2.97×10^2 teniendo un aumento de la semana 0 a la 5, después hubo un aumento a 1.43×10^4 y en la semana 20 disminuyeron las UFCs a 1.67×10^3 . En el tratamiento de cloruro de lantano a la semana 10 teníamos 6×10^1 UFC/gr, a la semana 15 hubo un incremento llegando a 7×10^3 y en la semana 20 hubo una disminución hasta 5.63×10^3 . En nitrato de lantano hubo 1×10^1 de UFCs en la semana 10, mientras que en la semana 15 incrementó a 1.78×10^3 y a la semana 20 hubo incremento hasta 4.63×10^3 . En el control de harina de soya en la semana 10 se tuvieron 2.52×10^2 UFC, a la semana 15 hubo un incremento de 3.5×10^2 y en la semana 20 incrementó hasta 7.98×10^3 . P1vb fue el tratamiento que tuvo un mayor incremento conforme el paso de las semanas, iniciando con 5.37×10^3 en la semana 10 y llegando hasta 2.35×10^4 UFC. En el tratamiento de C2 también tuvo un incremento muy notorio de la semana 10 a la 20, pasando de 5.03×10^2 hasta 1.11×10^4 , mientras que el tratamiento de 109.1 tuvo su mayor número de UFCs en la semana 15, iniciando con 8.97×10^2 en la semana 10 y en la semana 15 llegó a 7×10^3 .

En el tallo a la semana 0 se tuvieron 3.8×10^3 UFC/gr, en la semana 10 solo dos tratamientos tuvieron un incremento de las UFCs que fueron P1vb y 109.1 teniendo 4.9×10^3 y 1.05×10^4 respectivamente, después C2 tuvo 1.45×10^3 , y por último harina de soya 4.72×10^2 , nitrato de lantano con 3.17×10^2 , 2.77×10^2 en cloruro de lantano y en el tratamiento de NPK 1.40×10^2 UFC/gr. En la semana 15, 109.1 y P1vb fueron los que mantuvieron su número de microorganismos cultivables, cloruro de lantano, nitrato de lantano, NPK y C2 aumentaron sus UFCs llegando 3.9×10^3 , 8.19×10^3 , 3.78×10^2 y 9.40×10^2 , mientras que la harina de soya disminuyó hasta 2.65×10^2 . En la semana 20, el tratamiento de harina de soya, P1vb y C2 tuvieron un aumento hasta 1.81×10^4 , 1.10×10^4 y 2.07×10^3 respectivamente, mientras los demás tratamientos como NPK, cloruro de lantano, nitrato de lantano y 109.1 tuvieron una disminución llegando a 3.58×10^2 , 2.28×10^3 , 3.3×10^2 y finalmente 8.29×10^3 .

En las raíces en la semana 0 tuvimos 3.10×10^3 UFC/gr de tejido. En el tratamiento de NPK a la semana 10, disminuyó un 82% llegando a 2.55×10^3 , la semana 15 aumentó llegando a 4.20×10^4 y finalmente a la semana 20 volvió a disminuir un 62%. En el tratamiento de tierras

raras, en la semana 10 ambos disminuyeron un 54-57% en la semana 10 y a la semana 15 cloruro de lantano tuvo un incremento llegando a 1.28×10^5 y nitrato de lantano un 5.75×10^4 , en la semana 20 en cloruro de lantano incrementó llegando a 1.51×10^5 , mientras que nitrato tuvo una disminución a 4.73×10^3 . En harina de soya aumentó a 6.55×10^3 , a la semana 15 volvió a tener un aumento a 6.35×10^4 y a la semana 20 disminuyó 4.6×10^4 . En los tratamientos de bacteria, todos incrementaron desde la semana 10, hasta llegar a 9.23×10^4 , 1.04×10^4 y 2.09×10^5 en P1vb, C2 y 109.1 respectivamente, finalmente en la semana 20 llegaron hasta 2.94×10^5 , 5.79×10^4 y 2.77×10^5 .

En la tierra se tuvieron 2.50×10^5 UFCs, en los tratamientos de harina de soya, P1vb y 109.1 fueron los que tuvieron un incremento a la semana 10 con 4.2×10^5 , 1.88×10^6 y 5.85×10^6 . En la semana 15 volvió a tener un incremento 4.40×10^6 , 3.7×10^6 y 1.73×10^7 , en la semana 20 solo P1vb volvió a tener un incremento 1.67×10^7 mientras que harina de soya y 109.1 bajar el número de UFCs con 7.65×10^5 y 6.65×10^6 . NPK en la semana 15 hubo 4.73×10^5 y en la semana 20 9.31×10^5 . En los tratamientos de tierras raras (cloruro y nitrato de lantano) hubo 1.11×10^5 y 1.85×10^5 en la semana 10, en la semana 15 hubo incremento en ambos tratamientos llegando a 8.35×10^5 y 5.65×10^6 respectivamente, en la semana 20 ambos bajaron hasta 9.68×10^4 y 2.57×10^6 . El tratamiento de C2 se mantuvo en la semana 10, en la semana 15 hubo un incremento de 2.02×10^6 y en la semana 20 bajó a 4.11×10^5 .



Anexo 3. Número de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) en el lote 1 de plantas en la semana 0, 10, 15 y 20.

En el anexo 4 se representó el porcentaje de los filos que se han encontrado en los diferentes tratamientos que se les dieron a las plantas en el primer lote de plantas. En la semana 0, se tuvieron 16 aislados, de los cuales el 26.67% de las bacterias fueron firmicutes, 13.33% beta proteobacterias, 46.67 gamma proteobacterias y 13.33 de actinobacterias. En la semana 10 se aislaron 179 bacterias, en el lote de NPK fueron 24 aislados, donde el 62.5% fueron firmicutes, 6.25% alfa proteobacterias, 25% gamma proteobacterias y 6.25% actinobacterias. En la semana 15, se aislaron 25 bacterias, hubo una disminución de firmicutes a 57.69%, disminuyeron las alfa proteobacterias a 3.85%, sin embargo se presentaron un 11.54% de beta proteobacterias, también se disminuyeron las gamma proteobacterias a 23.08%, no hubo actinobacterias y hubo 3.85% de bacteroidetes. En la semana 20 hubo 10 aislados, donde el 56.67% fueron firmicutes, un aumento de alfa proteobacterias a 10%, una disminución a 6.67% de beta proteobacterias, aumento de gamma proteobacterias a 26.67%.

En el de cloruro de lantano, a la semana 10, fueron 26 aislados, 62.50% firmicutes, 4.17% beta proteobacterias, 25% gamma proteobacterias, 8.33% actinobacterias. Mientras que en la semana 15, se obtuvieron 31 aislados, bajando el porcentaje de firmicutes a 56%, mostrando un 8% de alfa proteobacterias, 32% de gamma proteobacterias y 4% de actinobacterias. En la semana 20 fueron 14 aislados, en los cuales el 55.17% fue de firmicutes, 6.9% de alfa proteobacterias, 31.03% gamma proteobacterias y 6.9% actinobacterias.

En nitrato de lantano a la semana 10 fueron 27 aislados, con 54.55% de firmicutes, 4.55% de alfa proteobacterias, 22.73% de beta proteobacterias, 9.09% de gamma proteobacterias y actinobacterias. En la semana 15, fueron 30 bacterias con 45.71% de firmicutes, 11.43% de alfa proteobacterias, 25.71% de gamma proteobacterias, 11.43% de actinobacterias y se presentó un 5.71% de bacteroidetes. En la semana 20, se tuvieron solo 14 aislados, teniendo un incremento de firmicutes de la semana 15 a 47.22%, 8.33% de alfa y beta proteobacterias, 27.78% de gamma proteobacterias, 5.56% de actinobacterias y 2.78% de bacteroidetes.

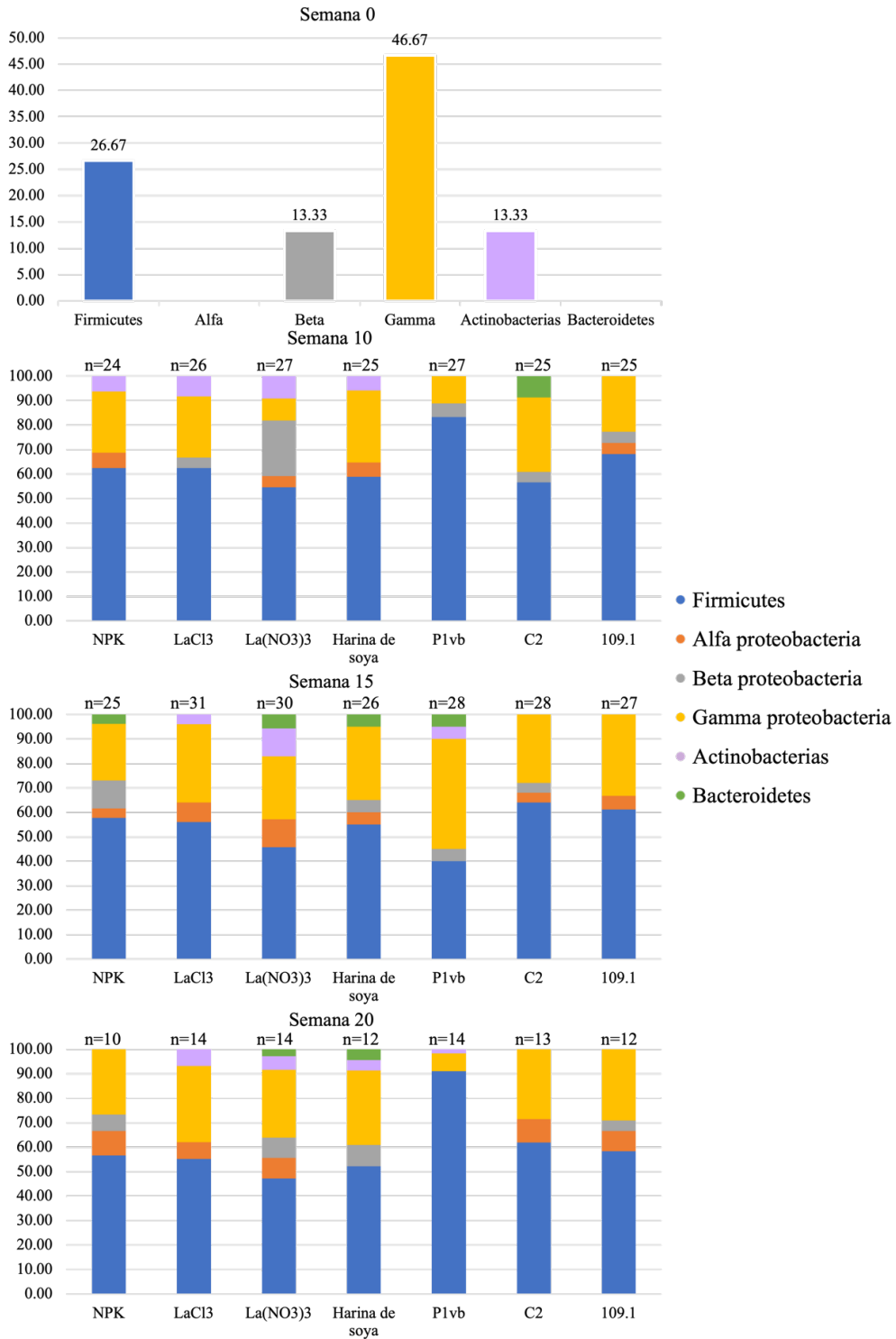
En el control de harina de soya, se tuvieron 25 aislados en la semana con 58.82% de firmicutes, 5.88% de alfa proteobacterias y actinobacterias, 29.41% de gamma proteobacterias. En la semana 15 fueron 26 aislados, donde el 55% fueron firmicutes, 5% de alfa proteobacterias, beta proteobacterias y actinobacterias, el 30% de gamma proteobacterias. Fueron 12 aislados en la semana 20, teniendo el 52.17% de firmicutes, , 8.7% en beta proteobacterias, 30.43% gamma proteobacterias y 4.35% de actinobacterias y bacteroidetes.

Para P1vb en la semana 10 se tuvieron 27 aislados, con el 83.33% de firmicutes, 5.56% de beta proteobacterias y 11.11% de gamma proteobacteria. En la semana 15 hubo 28 aislados, con 40% de firmicutes, 5% de beta proteobacterias, actinobacterias y bacteroidetes y 45% de gamma proteobacteria. En la semana 20 fueron 14 bacterias, con 91.06% firmicutes, 7.32% de gamma proteobacteria y el 1.63% de actinobacterias.

En el tratamiento de C2 para la semana 10 hubo 25 aislados con un 56.52% de firmicutes, 4.35% de beta proteobacterias, 30.43% de gamma proteobacterias y 8.70% de bacteroidetes.

En la semana 15 hubo 28 bacterias con 64% de firmicutes, 4% de alfa y beta proteobacterias y 28% de gamma proteobacterias. En la semana 20 hubo 13 aislados, con 61.90% de firmicutes, 9.52% de alfa proteobacterias y 28.57% de gamma proteobacterias.

Finalmente en el tratamiento 109.1 en la semana 10 hubo 25 bacterias aisladas con 68.18% de firmicutes, 4.55% de alfa y beta proteobacterias y 22.77% de gamma proteobacterias. En la semana 15 fue de 27 aislados con un porcentaje de 61.11% firmicutes, 5.56% de alfa proteobacterias y 33.33% de gamma proteobacterias. En la semana 20 se obtuvieron 12 aislados, con 58.33% de firmicutes, 8.33% de alfa proteobacterias, 4.17% de beta proteobacterias y 29.17% de gamma proteobacterias.



Anexo 4. Gráfico representativo de los filos encontrados en los tratamientos y en el paso de las semanas

Se realizaron las pruebas agronómicas para la semana 0, donde el 30.77% de las bacterias dieron positivo a proteasas, 46.15% a NBrip, 61.54% en ACC deaminasas, 38.46% de sideróforos, 53.85% de NFB y de positivas a ácido indol acético.

En el tratamiento de NPK, en ambas semanas fueron el 50% de positivos a proteasas, en NBrip en la semana 10 fue de 57.14% y en la semana 15 se redujó al 50%, en ACC la semana 10 fue de 78.57% y se redujo a 64.28% en la semana 15, en la prueba de sideróforos ambas semanas fue de 28.57%, en NFB fue de 50% en la semana 10 y en la semana 15 aumentó hasta 78.57%, finalmente en la prueba de auxinas hubo 14.28% de bacterias que dieron positivo a ácido indol acético y en la semana 15 fue el doble de un 28.57%.

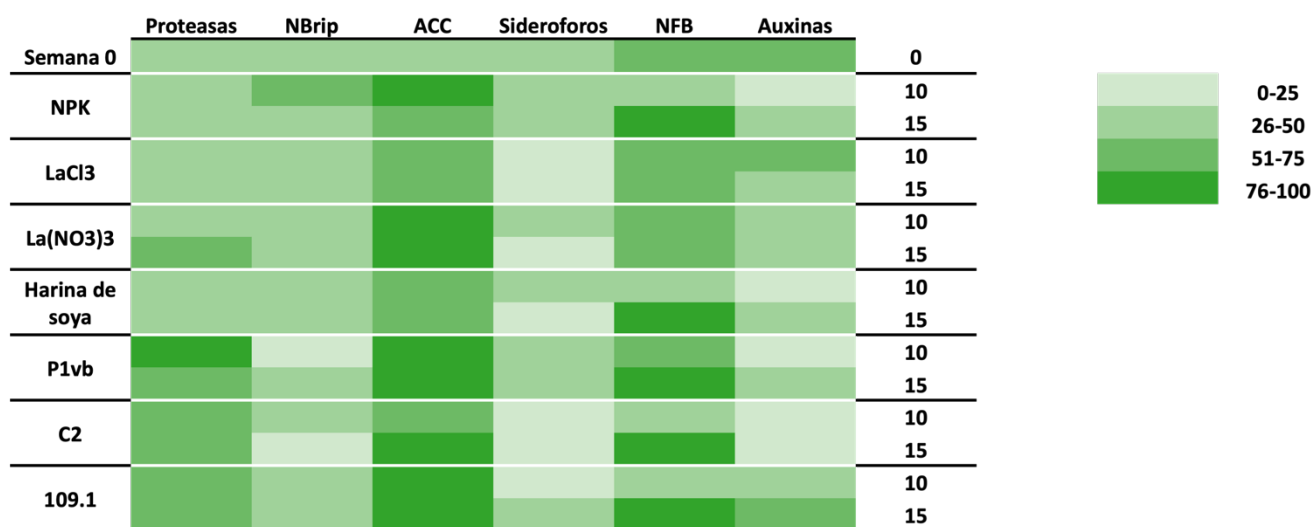
En los tratamientos de tierras raras, en cloruro de lantano en ambas semanas dieron 50% de positivas a proteasas y de NBrip, en ACC ambas dieron 71.43%, en sideróforos fueron de 21.43% en las dos semanas, en el de NFB hubo un incremento de la semana 10 a la semana 15 de un 57.14% a un 71.43%, en la prueba de auxinas. En nitrato de lantano en la semana 10 hubo un 35.71% de positivos a proteasas a un 57.14% en la semana 15, en NBrip dieron en ambas semanas 42.86%, en ACC un 78.57%, en la prueba de sideróforos hubo una reducción de 35.71% a 14.28%, en NFB fue un aumento de 64.28% a 78.57%, en las auxinas hubo una disminución del 50% a 35.71%.

En el tratamiento de harina de soya fue un 50% de positivos en la prueba de proteasas en ambas semanas, en NBrip paso de un 42.86% a un 28.57% de positivos, en ACC fue de 64.28% a un 57.14%, en sideróforos hubo un 35.71% en la semana 10 y 0% en la semana 15, en NFB hubo 50% de positivos en la semana 10 y un incremento del 35.71% a la semana 15, en auxinas fueron 21.43% en la semana 10 y 42.86% en la semana 15.

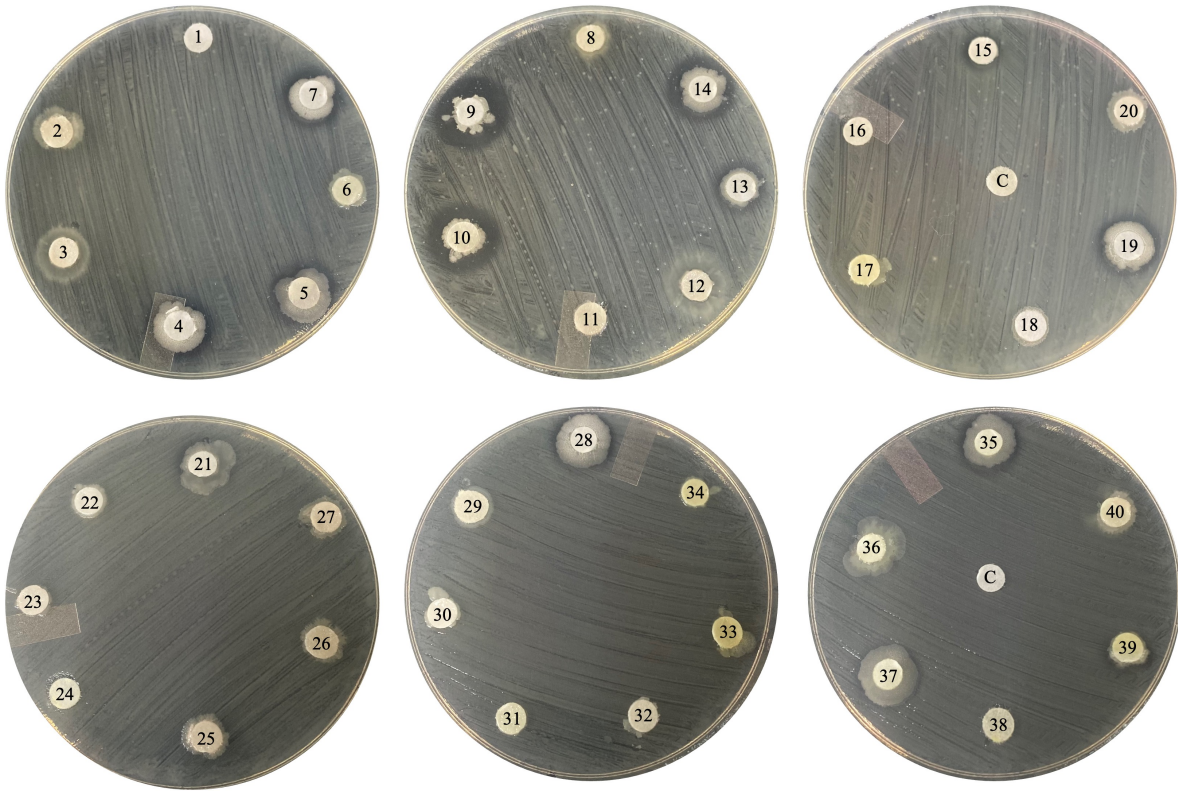
En los tratamientos de bacteria, P1vb en la prueba de proteasas en la semana 10 hubo un 78.57% de positivos y un 35.71% en la semana 15, en NBrip pasó de 21.43% a un 42.86%, en ACC fue un incremento de 78.57% a 85.71%, en sideróforos ambas semanas fue de 28.57%, en NFB de 71.43% en la semana 10 a 85.71% en la semana 15 y finalmente en auxinas fue el doble en la semana 15 llegando hasta 28.57% a comparación de la semana 10. En la bacteria endófito C2, fue de un 64.28% a un 75% de proteasas, del 28.57% a un 16.67% en NBrip, en 64.18% en la semana 10 de ACC y un 100% en la semana 15, en sideróforos

fue de 28.57% en ambas semanas, en NFB fue de 42.86% paso a 83.33%, en auxinas fue una reducción del 14.28% hasta un 8.33% de positivas a ácido indol acético.

En la bacteria 109.1 de suelo, paso de un 71.43% a un 61.54% en proteasas, en la prueba de NBrip fue un aumento de 28.57% a un 38.46%, en ACC fue de 85.71% en la semana 10 y en la semana 15 bajó solo 1.10%, en la prueba de sideróforos tuvo un aumento del 7.14% a 30.77%, en NFB también hubo un incremento notorio pasando de 28.57% a un 92.31%, en auxinas pasó de 71.43% a un 61.54%.



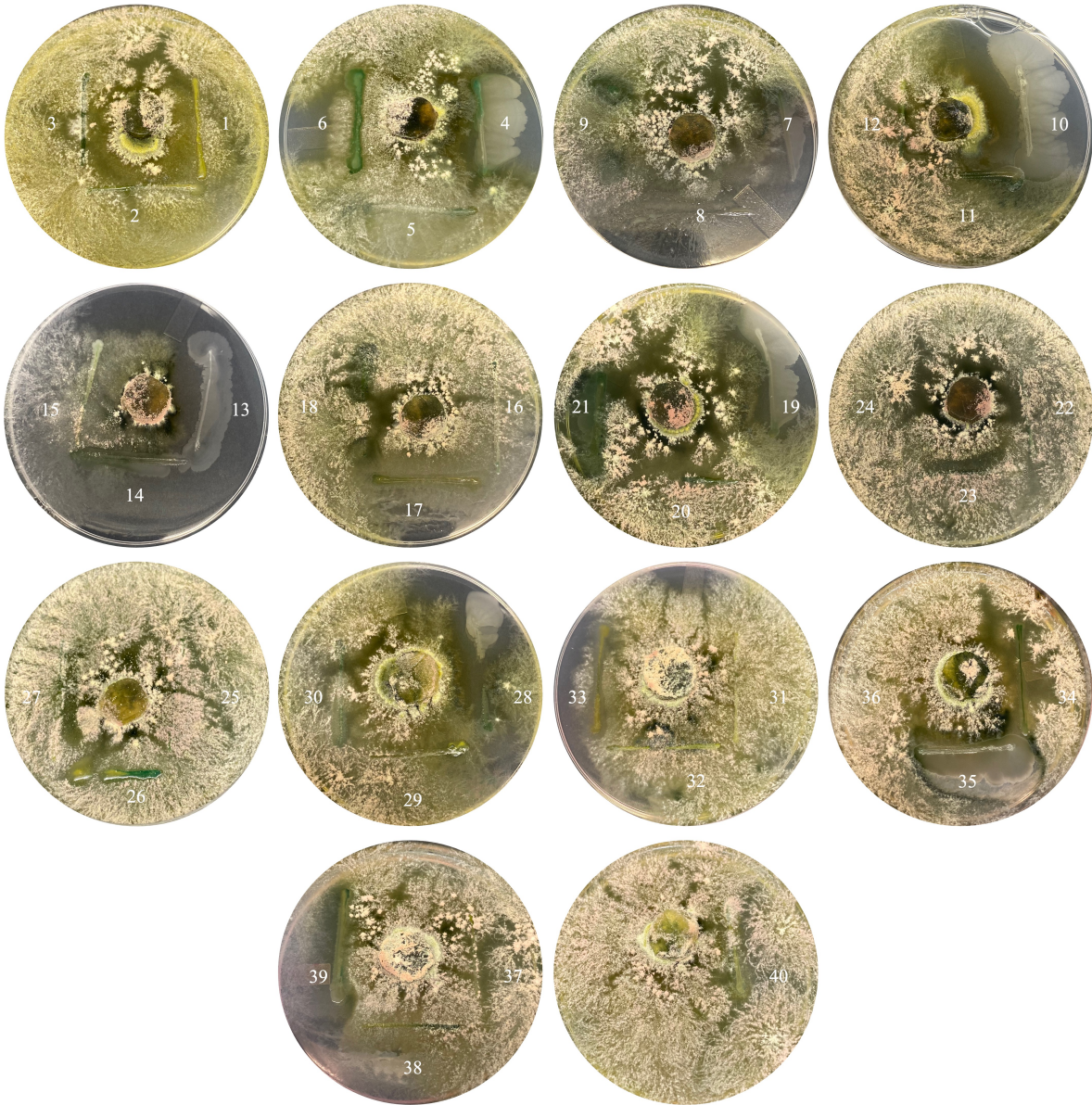
Anexo 5. Cuadro representativo de la funcionalidad del microbioma aislado en cada tratamiento del lote uno de plantas, cada tono de morado representa un rango de porcentaje de bacterias que dieron positivos a las pruebas en las diferentes semanas de tratamiento.



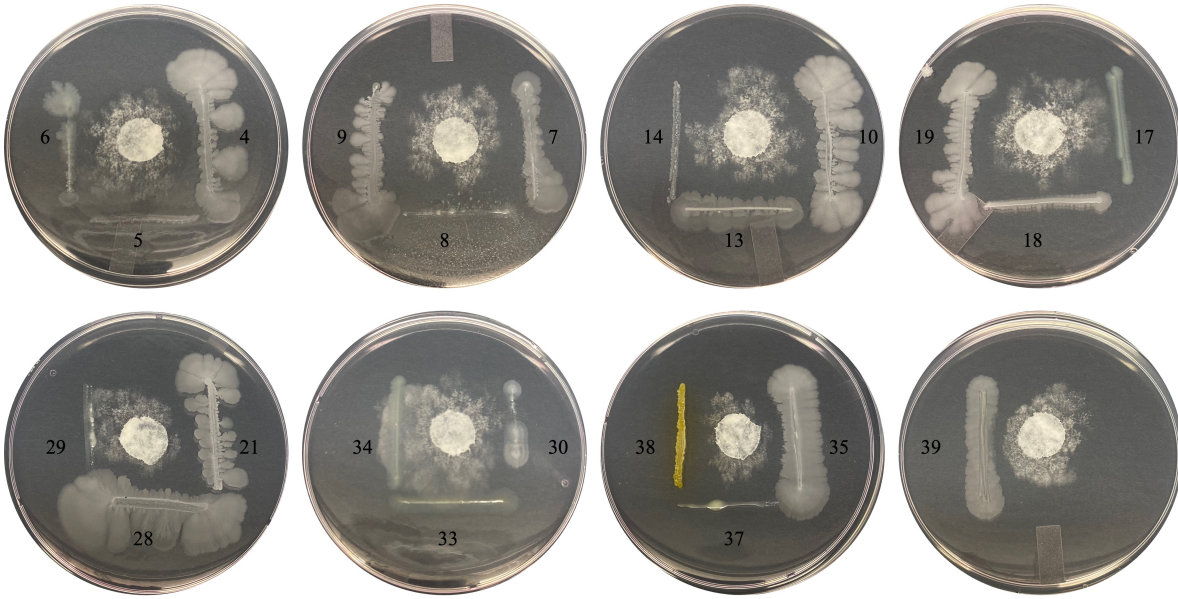
Anexo 6. Inhibición de las bacterias aisladas del tratamiento con *Bacillus velezensis* contra la bacteria patógena *Kosakonia cowanii*.



Anexo 7. Inhibición de 40 bacterias aisladas del tratamiento con *Bacillus velezensis* contra hongo patógeno de mango.



Anexo 8. Inhibición de las 40 bacterias aisladas de P1vb contra hongo patógeno de coco.



Anexo 9. Inhibición de 22 bacterias asiladas de tratamiento de P1vb contra hongo patógeno de aguacate.

<https://drive.google.com/drive/folders/1-K-RfYcc8s60rWIAJQXCBGKbdmskgIp8?usp=sharing>

Anexo 10. Bacterias identificadas y no identificadas en las diferentes semanas