

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“TRANSFERENCIA DE ^{15}N -ORGÁNICO Y COLONIZACIÓN INDUCIDA CON
NANOPARTÍCULAS POR BACTERIAS ENDÓFITAS EN PLANTAS DE
BANANO”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

***DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA***

Gloria Margarita Macedo Raygoza

DIRECTOR

Dr. Miguel Juan Beltrán García

CODIRECTOR

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, B. C.

Septiembre, 2018

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a las dos personas que se fueron sin ver terminado este logro y que ahora son las dos estrellas más brillantes de mí cielo, sé que desde donde estén estarán alegres y orgullosos de mí. No hay día en que no los extrañe, el esfuerzo de este trabajo es para ustedes.... LOS AMO.

AGRADEZCO A CONACYT POR EL FINANCIAMIENTO DE ESTA TESIS MEDIANTE EL APOYO DE LOS SIGUIENTE PROYECTOS:

Adquisición de equipo MALDI-TOF/TOF para impulsar la investigación y competitividad científica multidisciplinaria y la vinculación interinstitucional con otros grupos de investigación de la región occidente-noreste. **APOYOS COMPLEMENTARIOS PARA LA ADQUISICIÓN DE EQUIPO EICNTÍFICO 2013-205520**

Transferencia de nitrógeno orgánico a través de simbiosis bacteriana diseñada, como una estrategia para evitar la degradación de suelos por fertilizantes nitrogenados y aumenta la productividad de cultivos con importancia alimenticia. **PROYECTOS DE DESARROLLO CIENTIFICO PARA ATENDER PROBLEMAS NACIONALES 2013-212875**

Microorganismos endófitos de banana y agave *tequilana*: bio-producción e identificación de moléculas antifúngicas y evaluación de la transferencia de nitrógeno orgánico usando espectrometría de masas MALDI-TOF e MALDI-IMAGEN. **COOPERACION BILATERAL México-Brasil 207400.**

Fortalecimiento y ampliación de las capacidades analíticas de equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF a MALDI-IMAGING para su uso en grupos de investigación de las áreas agro biotecnológicas, microbiológicas y de biotecnología farmacéutica. Apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica. **CONVOCATORIO 2016-269607.**

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ponerme en este camino, permitirme llegar al final y darme fuerza y paciencia cuando más la necesite.

A **mi mamá Margarita, a mi hermano Gustavo y a mi nina Gloria**, por siempre estar y soportarme en mis humores tan cambiantes. Ustedes han sido, son y serán siempre mi motor. Gracias por darme su apoyo en los buenos y malos momentos, darme palabras de aliento o esos abrazos cuando son indispensables y sobre todo por enseñarme a ser fuerte, los amo.

A usted **Dr. Miguel J. Beltrán García**, por abrirme la puerta de su laboratorio hace más de 8 años. Ha sido un viaje que se dice bastante largo pero que se ha sentido tan corto. Hemos compartido tantos momentos (buenos, divertidos, malos y terribles) que no se como agradecerle el apoyo y la motivación para llegar a este punto culminante de mi vida, ¡gracias infinitas!

A **Dr. Benjamín Valdez**, por abrirme las puertas del programa de posgrado una vez más y brindarme un punto de vista diferente para mejorar.

Al **Dr. Paolo Di Mascio**, por recibirme en su laboratorio en la USP en Sao Paulo, Brasil y brindarme su amistad. Obrigada professor.

A la **Dra. Katia y Dra. Fernanda**, muito obrigada pela ajuda, gracias por su ayuda en mi estancia en Brasil y por su amistad.

A el equipo de la oficina de dirección de investigación: **Don David, Alfredo y Berenice**, ya son varios años conociéndonos y aguantándonos, les agradezco enormemente el apoyo y el cariño que me tienen, sin ustedes no sé qué haríamos.

A mi girl gang VIP: **Anea, Anita, Aurorax y mi socia favorita Clau**, que les puedo decir que no les haya dicho ya, no saben lo afortunada que me siento de tenerlas en mi vida, han sido un apoyo enorme durante estos años que siento que no me alcanzarían las palabras si quisiera agradecerles. Simplemente las amo. También agradezco a los miembros honorarios de este gang: **chinito y mi macho Kike**, a

ustedes no puedo amarlos porque me golpearían, pero saben que se les quiere y aprecia mucho.

A mi otro girl gang no perteneciente al laboratorio: **Brenda, Abril, Celene, Alexis, Zu y Lety**, otro grupo de personas por el cual estoy inmensamente agradecida a la vida de tener a mi lado, gracias por traerme siempre a la realidad y escucharme aunque no supieran de que estaba hablando, sin ustedes estaría un poquito más loca. Las amo.

A mis amigos incondicionales: **Pollo y Olga**, no cabe duda de cuando una amistad es para siempre la distancia no importa, gracias por estar siempre al pendiente de mí y brindarme su ayuda, apoyo y amor incondicional aun estando lejos, son los mejores y por eso los amo.

Al grupo de estudiantes que durante esto 8 años en el laboratorio han estado bajo mi cuidado y que me atrevo a llamar hijos: **Willy, Paco, Anita, Félix, Caro C. y Sergio**, gracias por permitirme entrar a sus vidas y aprender de ustedes, no cabe duda de cada uno me dejo un pedazo de su ser que siempre atesoré con el corazón.

A todas esas personas que han pasado por el laboratorio durante estos 8 años, desde los primeros: **Memo, Fabi, Becky, Mateo**, los intermedios: **China, Jorge, Caro V.**, y hasta los últimos: **Diana (mi potato), Kon (el nandito), Bora (chang), Mariana** (son tantos que solo pondré algunos ejemplos ya que temo olvidar mencionar a algunos ustedes), han sido una familia para mí, gracias por soportar tantos cambios de humor, por compartir sus historias de vida (y memes), por estar en los buenos y malos momentos de mi vida (aún estando lejos), por darme la confianza de enseñarles lo poco que se, por su amistad y por hacer de este ciclo de mí vida una gran aventura, sin duda el laboratorio no sería lo mismo sin ustedes, saben que los quiero y siempre podrán contar conmigo.

¡Muchas gracias a todos lo que han estado conmigo durante este viaje y que directa o indirectamente han estado para apoyarme, sin duda puedo decir que soy una persona afortunada por tenerlos a mí lado!

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Planteamiento del problema	6
Justificación	8
Objetivos	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Antecedentes	10
Microorganismos Endófitos	10
a) Actividad antagónica	12
b) Promoción de crecimiento y asimilación de nutrientes	13
Endófitos de banano	16
Importancia del banano	19
Retos y amenazas para la producción de banana	21
La Sigatoka negra	21
Mal de Panamá	22
Control de enfermedades	23
Uso eficiente de nitrógeno	24
Uso eficiente de nitrógeno (NUE) y transportadores de nitrógeno en raíz	27
Diseño de simbiosis y transferencia de nutrientes bajo condiciones de empobrecimiento de suelos	29
La transferencia de nitrógeno de microorganismos endófitos a las plantas	30
Nanotecnología: una alternativa para el uso de nanopartículas en la agricultura	32
Espectrometría de masas MALDI-TOF	34
Identificación de microorganismos por a técnica MALDI-TOF	35
Identificación de proteínas	36
MALDI-IMAGING	36
Materiales, Reactivos y Equipos	38
Material Biológico	38
Material Vegetal	38
Cepas endófitas	38
Utilización de <i>E. coli</i> no-endófito como control en las pruebas de promoción de crecimiento en la planta y colonización	39
Materiales	41
Reactivos	41
Equipos	43
Equipos localizados en Guadalajara, México	43
Equipos localizados en Sao Paulo, Brasil	43
Metodología	44
Cultivo microbiano y de conservación	44
Producción de células microbianas como fuente de inóculo para las plantas	44

Cultivo de plantas	45
Condiciones de incubación de plantas	45
Caracterización morfológica de las bacterias endófitas por microscopia electrónica de barrido	45
Promoción de crecimiento de las plantas por inoculación de bacterias vivas e inactivadas por calor	47
Evaluación de la incorporación de ¹⁵ N en la estructura celular por análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF en proteínas ribosomales bacterianas	49
Determinación de transferencia de nitrógeno mediante el análisis de feofitina marcada	51
Influencia de las nanopartículas en la colonización bacteriana.	54
a) evaluación de la colonización de la cepa endófito: <i>E. cloacae</i>	54
Inducción de la colonización usando nanopartículas (NPS) de Au y Ag	55
a) Adaptación	55
Recuperación del endófito de las raíces colonizadas y cuenta de bacterias epífitas y de suelo.	56
Análisis de metabolitos por MALDI-IMAGING producidos durante la interacción planta- <i>E. cloacae</i> .	57
Resultados	59
Análisis de microscopia electrónica de barrido de bacterias endófitas	59
Acumulación de biomasa en plantas micropropagadas de banano	61
Incorporación de nitrógeno en proteínas bacterianas	63
Determinación de feofitina marcada en hojas de banano	65
Colonización de <i>E. cloacae</i>	67
Nanopartículas de Au y Ag	69
Colonización de <i>E. cloacae</i>	72
Acercamiento proteómico y metabolómico post-inoculación con <i>E. cloacae</i> usando MALDI-IMAGING	76
Discusión	91
Conclusiones y perspectivas	101
Bibliografía	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias y hongos endófitos encontrados principalmente en las raíces de plantas de banano Enano gigante cv. Cavendish.	17
Tabla 2. Ranking mundial de Países que exportan banano a nivel mundial.	20
Tabla 3. Propiedades de promoción del crecimiento de plantas y de inhibición de hongos fitopatógenos asociados al cultivo de banano.	39
Tabla 4. Descripción de los diferentes grupos formados y el tratamiento que fue aplicado a cada uno de ellos.	47
Tabla 5. Descripción de los diferentes tratamientos con ¹⁵ N utilizados en los lotes de plantas para evaluar la transferencia de nitrógeno.	52
Tabla 6. Numero de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) después de 24 horas post-inoculación en plantas tratadas y no tratadas con NPs.	72
Tabla 7. Numero de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) después de 48 horas post-inoculación en plantas tratadas y no tratadas con NPs.	74
Tabla 8. Identificación de bacterias endófitas recuperadas de los tejidos internos de la planta post-tratamiento con NPs e inoculación con <i>E. cloacae</i> .	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la localización de los endófitos y los diferentes tipos de interacciones que pueden llegar a tener con la planta hospedera.	11
Figura 2. Producción en millones de toneladas de banano de acuerdo con las diferentes regiones productoras del mundo. Se observa que Latinoamérica provee la mayor cantidad de banano para el consumo mundial. (FAO 2016).	20
Figura 3. Estadios de Fouré. Muestra la evolución de la sigatoka negra en las hojas de banano, donde van desde pequeñas pizcas en las hojas de banano (etapa 2) hasta una completa necrosis de la planta (etapa 6).	22
Figura 4. Síntomas de planta de banano afectada por el mal de Panamá ocasionada por el hongo fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum cubense</i> . Se observa un amarillamiento de hojas y muerte total de la planta en corto tiempo. Actualmente esta enfermedad amenaza la viabilidad del cultivo en varias regiones productoras del mundo. No hay casos en México.	23
Figura 5. Efecto del nitrógeno sobre el comportamiento fisiológico de las plantas en función de los factores que influyen en el uso eficiente del nitrógeno (NUE). (tomado de Lammerts van Bueren <i>et al</i> , 2017).	26
Figura 6. Aplicaciones potenciales de la nanotecnología en la agricultura. Hay cuatro factores importantes para usar nanotecnología: A) Aumentar la productividad usando las partículas como vehículos de pesticidas y fertilizantes, mejorador de la calidad del suelo, estimulación del crecimiento de la planta y proveer un monitoreo inteligente utilizando nanosensores (Fraceto <i>et al</i> , 2016).	34
Figura 7. Secuencia de eventos para el procesamiento de una muestra en un espectrómetro de masas MALDI-TOF. (Schiller <i>et al</i> , 2004).	35
Figura 8. Obtención de señales de masas usando la técnica MALDI-IMAGING- La muestra debe ser previamente cortada a un grosor de 5-10 micrómetros y bañada con una matriz homogénea.	37
Figura 9. Microscopía de las nanopartículas de Oro y Plata utilizadas en este trabajo de investigación.	40
Figura 10. Obtención de un espectro de masas para la determinación del marcaje con ¹⁵ N de las proteínas bacterianas.	51
Figura 11. Procedimiento para la obtención y preparación de la muestra de las raíces de plantas de banano para su procesamiento en MALDI-IMAGING.	58

- Figura 12.** Imágenes de microscopia SEM de las bacterias *E. cloacae* (panel a, b y c) y *K. variicola* (panel d, e y f) endófitos de banano, donde se aprecia que *E. cloacae* muestra la presencia de vesículas de membrana externa como se observa en el círculo rojo del panel b y la flecha en rojo del panel c. 60
- Figura 13.** Acumulación de biomasa por efecto de aplicación de bacterias endófitas vivas. La aplicación de *E. cloacae* aumenta la biomasa de las plantas en comparación con los otros tratamientos biológicos. Se observa un decremento de la biomasa La aplicación de nutrientes minerales y agua. 62
- Figura 14.** Efecto en la acumulación de biomasa vegetal por tratamientos con bacterias muertas. Se presenta que los tratamientos con *K. variicola* y *E. coli*, aumentaron la biomasa. El análisis estadístico de ambos tratamientos indica que no hay una diferencia significativa (n=8 plantas). 63
- Figura 15.** Espectros de masas MALDI-TOF obtenidos de proteínas bacterianas enriquecidas con fuente de nitrógeno ^{14}N y ^{15}N . Donde se observa la incorporación de nitrógeno 15 en proteínas bacterianas de *E. cloacae* y *E. coli* (panel a y b respectivamente), mientras que para los espectros correspondientes de *K. variicola* (panel c) no es visible dicha incorporación. 64
- Figura 16.** Valores \pm error estándar de la comparación de bacterias tratadas con ^{14}N y marcadas con ^{15}N . a) Tratamiento con *E. cloacae*, b) tratamiento con *K. variicola*, c) tratamiento con *E. coli*, d) promedio de los tratamientos con ^{14}N . 66
- Figura 17.** Microfotografías de campo claro de raíces de banano con tinción de DAB y azul de anilina inoculadas con *E. cloacae*. a) Objetivo 40X a las 24 horas PI, b) Objetivo 100X a las 48 horas PI, c) Objetivo 20X a las 72 horas PI y d) objetivo 20X a las 144 horas PI. No se logra observar formación de peróxido en raíces (central y pelos radiculares) ni la presencia de células bacterianas dentro del tejido. 68
- Figura 18.** Microfotografías de raíces de banano post inoculadas con nanopartículas de Au y Ag. a) Au 0.5ppm objetivo 20X, b) Au 1ppm objetivo 100X, c) Ag 0.5ppm objetivo 20X y d) Ag 1ppm objetivo 20X. 69
- Figura 19.** Análisis microscópico de la colonización bacteriana de las raíces de banano bajo los siguientes tratamientos: a) *E. cloacae*, b) NPs Au 0.5ppm + *E. cloacae*, c) NPs Au 1ppm + *E. cloacae*, d) NPs Ag 0.5ppm + *E. cloacae* y e) NPs Ag 1ppm + *E. cloacae*. El tratamiento sin NPs (a) muestra producción de peróxido. Las plantas tratadas previamente con NPs inducen 70

la colonización de células bacterianas desde las 24 horas de inoculación, así como la presencia de H₂O₂.

Figura 20. Identificación de metabolitos por espectrometría MALDI-IMAGING de raíces con 24 horas de inoculación de nanopartículas de oro y plata. Se observan las siguientes masas (m/z) correspondientes: a) 151.885 m/z (dihidrokaempferol), b) 268.875 m/z (4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona), c) 305.807 m/z (dihidroflavonol), d) 332.068 m/z (giberelina), e) 476.871 m/z (flavonoide), f) 493.832 m/z (metoxikaempferol), g) 667.814 m/z (neovabaisoflavona) y h) 719.79 m/z (kaempferol). 78

Figura 21. Espectro de masas MALDI-IMAGING de raíces de 48 horas post-inoculación de nanopartículas de oro y plata. a) 151.885 m/z (dihidrokaempferol), b) 176.87 m/z (ácido indol acético), c) 332.068 m/z (giberelina) y 476.871 m/z (flavonoide). 80

Figura 22. Análisis de MALDI-IMAGING de raíces de 24 horas post-inoculación con *E. cloacae* se identifican los siguientes metabolitos. a) 189.976 m/z (ácido indol acético), b) 242.18 m/z (N-nonanoil-L-homoserina lactona), c) 305.336 m/z (dihidroflavonol), d) 332.351 m/z (giberelina), e) 360.461 m/z (N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona), f) 379.262 m/z (flavona), g) 493.832 m/z (metoxikaempferol) y h) 667.479 m/z (neobavaisoflavona). 82

Figura 23. Identificación de metabolitos en raíces con 48 horas post inoculación de *E. cloacae*. a) 151.885 m/z (dihidrokaempferol), b) 174.864 m/z (ácido indol acético), c) 176.668 m/z (ácido indol acético), d) 268.785 m/z (4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona), e) 305.807 m/z (dihidroflavonol), f) 318.937 m/z (5,7,2',5-tetrahidroxi-6-metoxiflavona), g) 332.068 m/z (giberelina), h) 476.689 m/z (flavonoide), i) 493.649 m/z (metoxikaempferol), j) 588.118 m/z (kaempferol) y k) 719.973 m/z (kaempferol). 85

Figura 24. Identificación de metabolitos expresados durante el tratamiento de raíces 24 horas post-inoculación de las nanopartículas de oro y plata y de *E. cloacae*. a) 163.872 m/z (ácido indol acético), b) 174.921 m/z (ácido indol acético), c) 176.86 m/z (ácido indol acético), d) 189.96 m/z (ácido indol acético), e) 202.091 m/z (O-succinil-L-homoserina), f) 268.795 m/z (4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona), g) 284.192 m/z (giberelin), h) 305.169 m/z (dihidroflavonol), i) 332.204 m/z (giberelina), j) 360.257 m/z (N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona), k) 667.058 m/z (neobavaisoflavona) y l) 773.668 m/z (kaempferol). 88

Figura 25. Espectro de masas MALDI-IMAGING de muestras de raíces 48 horas post inoculación de las nanopartículas de oro y plata y de *E. cloacae*. a) 163.971 m/z (ácido indol acético), b) 174.916 m/z (ácido indol acético) y c) 332.353 m/z (giberelina). 90

Figura 26. Arquitectura y composición de las vesículas de membrana de bacterias gram negativas. Estas vesículas están encerradas en la membrana exterior que esta embebida con lipopolisacáridos y otras proteínas de membrana externa (Bitto *et al*, 2017). 92

Figura 27. Función de las vesículas de membrana externa en la fisiología de la bacteria. a) las vesículas pueden servir como mecanismo para remover compuestos tóxicos, b) las condiciones de estrés pueden favorecer la producción de vesículas, c) las vesículas pueden servir como fuente de carbono y nitrógeno y d) pueden tener sistemas de asimilación Zn y Fe que son capaces de asimilarlos del ambiente (Schwechheimer *et al*, 2015). 93

Figura 28. Diagrama de donde se muestra la mayor presencia de la masa 242.194 m/z correspondiente a N-nonanoil-L-homoserina lactona en el tratamiento con *E. cloacae* únicamente después de 24 horas post inoculación. 99

Figura 29. Diagrama de donde se muestra la mayor presencia de la masa 360.257 m/z correspondiente a N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona en el tratamiento con *E. cloacae* únicamente después de 24 horas post inoculación. 100

RESUMEN

Hoy en día el tema de seguridad alimentaria es de suma importancia para todos los países del mundo, debido a las diversas plagas que afectan a todos los cultivos de importancia económica. Existen reportes de microorganismos nativos (endófitos) de plantas que poseen características que pueden ayudar a la planta no solo a protegerse del ataque de patógenos, sino también a tomar elementos indispensables que se encuentran poco disponibles para la planta. En este trabajo de investigación utilizamos 2 cepas endófitas de banano identificadas como *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella variicola*, con el objetivo de medir la capacidad de sostener el crecimiento de plantas de banano en un sustrato bajo en nutrientes (arena de playa), y la habilidad de las mismas para transferir nitrógeno a la planta verificado mediante un marcaje con ^{15}N . Las bacterias sostienen el crecimiento de la planta en un suelo pobre de nutrientes, logrando aumentar hasta en 2g la biomasa de la planta. Además, estas bacterias probaron que logran transferir nitrógeno a la planta, marcando los 4 nitrógenos de la molécula de la feofitina (hidrolizado de clorofila) como es el caso de *K. variicola*. Por otro lado, se hizo uso de nanopartículas de oro y plata como aceleradores de la colonización, ya que *E. cloacae* no logra penetrar las raíces de la planta hasta 2 meses post inoculación. El uso de nanopartículas no solo logra acelerar la colonización de *E. cloacae* sino que, además, activa bacterias no cultivables dentro de la planta e induce un aumento de peróxido de hidrógeno en las raíces. Además, se realizó un acercamiento proteómico sobre las raíces de la planta para observar las moléculas de interacción de planta-bacteria, encontrando moléculas de señalización, así como la producción de flavonoides en raíces.

ABSTRACT

Today food security is important for all countries of the world, due to the big amount of diseases that affect all crops economically important. There are reports of native microorganisms (endophytes) of plants that have the ability to provide help to the plant not only to protect itself from the attack of pathogens, but also to take indispensable elements that are unavailable for the plant. In this research work we used 2 endophytic banana strains identified as *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella variicola*, with the objective of measuring the ability to sustain the growth of banana plants in a low nutrient substrate (beach sand), and the ability to transfer nitrogen to the verified plant by marking bacterial proteins with ^{15}N . These bacteria sustain the growth of the plant in a soil poor in nutrients, managing to increase the biomass of the plant by up to 2g. In addition, these bacteria proved that they manage to transfer nitrogen to the plant, marking the 4 nitrogens of the pheophytin molecule (chlorophyll hydrolyzate) as is the case of *K. variicola*. On the other hand, gold and silver nanoparticles were used as accelerators of the colonization, since *E. cloacae* cannot penetrate the roots of the plant until 2 months post inoculation. The use of nanoparticles not only accelerates the colonization of *E. cloacae*, but also activates non-culturable bacteria within the plant and induces an increase in hydrogen peroxide in the roots. In addition, a proteomic approach was carried out on the roots of the plant to observe the interaction molecules of plant-bacteria, finding signaling molecules, as well as the production of flavonoids in roots.

INTRODUCCION

La seguridad alimentaria es un tema de suma importancia para todos los países del mundo, preguntas sobre cómo se puede mantener una agricultura sustentable es una preocupación mayor, ya que los cultivos se ven amenazados por muchas plagas que destruyen en su totalidad cultivos de importancia alimentaria y económica. El banano, hoy en día se encuentra amenazado por plagas de hongos que causan enfermedades, entre las que destacan la Sigatoka negra (ocasionada por el hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*) y el mal de panamá (ocasionado por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*) (Ploetz *et al*, 2015; Machinova *et al*, 2014). Dichas enfermedades son controladas mediante el uso de agente químicos, pero al no tener un sistema de rotación de fungicidas, éstos han ocasionado que las cepas de dichos hongos se vuelvan resistentes, haciendo de los fungicidas inservibles, además de que en el manejo del cultivo representan una tercera parte del costo de producción. Estos problemas llevan a la búsqueda de alternativas sustentables y eco-amigables para la protección de patógenos en los cultivos. Una novedosa estrategia para la resolución del control de plagas es el potencial de usar microorganismos como agentes de control biológico. Para la Sigatoka negra, el uso de bacterias especialmente son prometedoras para crear bio-pesticidas, pero es una opción que aún no ha sido muy explorada. Existen pocos reportes del uso efectivo de estos agentes como parte de un esquema de biocontrol. (Souza *et al*, 2014).

Desde una perspectiva biotecnológica, los microorganismos endófitos de banano tienen un alto potencial para ser utilizados como microorganismos benéficos (como promotores de crecimiento, protección contra patógenos, etc.). De tal forma

que existe la posibilidad que la reintroducción de estos microorganismos en las plantas, mejoren los rendimientos del cultivo, en la tolerancia a patógenos y a factores inducidos por el cambio climático. Esto se debe a la producción de fitohormonas que pueden promover el crecimiento de la planta y además facilitan la asimilación de nutrientes en la planta (Fernandes-Andrade *et al*, 2014). Las plantas de banano son conocidas por tener una alta demanda de nitrógeno, potasio, fósforo, calcio y magnesio. El nitrógeno en las plantas es asimilado en sus formas inorgánicas (nitrato o amonio). Sin embargo, también el nitrógeno se encuentra en el suelo como formas complejas de nitrógeno orgánico distribuido de manera heterogénea, derivado de la putrefacción de materia orgánica o cadáveres de insectos, animales, hongos y otros microorganismos (Schmidt *et al*, 2014). Por lo que la diversidad y abundancia de las comunidades microbianas que habitan los suelos, tienen la capacidad de convertir dichas formas inaccesibles en moléculas menos complejas como oligonucleótidos, aminoácidos y otros materiales que son más fáciles de asimilar. Por otra parte, en el laboratorio se ha propuesto que los microorganismos pueden servir de nutrientes cuando la planta se encuentra en suelos pobres de nutrientes (Puangfoo-Lonhienne *et al*, 2010).

Los nanomateriales se han convertido en una herramienta para mejorar el rendimiento de los cultivos. Las nanopartículas y los nanoencapsulados, pueden ser vehículos de fertilizantes y/o fungicidas que son capaces de llegar directamente a la planta blanco, sin tener como efecto colateral el daño de plantas vecinas. Existen reportes que algunas nanopartículas promueven el crecimiento de plantas de acuerdo al material de que estén hechas, el tamaño y la concentración a la cual sean aplicadas a la planta (Fraceto *et al*, 2016).

Durante los últimos años se han estudiado el comportamiento en términos de resistencia del hongo de la Sigatoka negra del banano (Macedo-Raygoza G.M., 2010), el uso de microorganismos endófitos como una alternativa para el control de la Sigatoka negra usando enzimas hidrolíticas inducidas por fragmentos del hongo como sustrato (Macedo-Raygoza G.M., 2013). En este proyecto las bacterias endófitas fueron evaluadas en su capacidad de soportar el crecimiento de plantas micropropagadas de banano cavendish, clon Francés bajo condiciones de nutrición limitada, usando como soporte arena de playa y las bacterias como la única fuente de nutriente. Para determinar esto se hizo un enriquecimiento del material celular bacteriano con ^{15}N , de tal forma que con este etiquetado se midió la incorporación del nitrógeno isotópico en la feofitina derivada de la clorofila. Así también se midió el efecto sobre el crecimiento de las plántulas. Por último, con el objetivo de hacer eficiente la colonización bacteriana en las raíces se utilizaron nanopartículas de oro y plata y además usando acercamientos de proteómica y metabolómica con la tecnología MALDI-IMAGING, se midieron la acumulación de péptidos y otros metabolitos inducidos por las bacterias y por las nanopartículas, que nos acercaron al entendimiento del mecanismo de colonización, estrictamente ligado a la acumulación de especies de oxígeno reactivas como un evento previo a la colonización.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los incendios forestales y el uso de fertilizantes químicos han hecho que la reserva de nitrógeno en suelo vaya en decremento. La pérdida gradual de nitrógeno en suelos es alarmante ya que éste es uno de los elementos principales para que las plantas puedan desarrollarse. Por otro lado, el costo energético para la producción de fertilizantes nitrogenados y su impacto medioambiental es un punto importante por considerar, debido a que el 2% del total de hidrocarburos extraídos se consumen para la producción de dichos fertilizantes mediante el proceso Haber-Bosch.

También el alto uso de fertilizantes y químicos en la industria agrícola, influyen en la contaminación del suelo, subsuelo y atmósfera, sin contar los mantos freáticos, las consecuencias medioambientales relacionadas con el cambio climático y la salud en las poblaciones. Por lo que es sumamente importante usar alternativas de producción de alimentos amigables tanto con el medio ambiente como con las personas que manejan los agentes químicos. Es por esto que, el uso de microorganismos se ha incrementado estos últimos años en función de la amplia variedad de propiedades que les confieren a las plantas al vivir en simbiosis.

Los microorganismos benéficos para las plantas son usados en agricultura como bio-fertilizantes o pesticidas. Entre estos las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno, micorrizas y otros microorganismos del suelo son usados frecuentemente en formulaciones bio-inoculantes. Sin embargo, hay un atractivo interés por parte de nuestro grupo de trabajo por el uso de bacterias y hongos endófitos para mantener la producción sostenible de las plantas con importancia agronómica. La filosofía del laboratorio es hacer “trajes a la medida”, es decir usar

microorganismos que fueron obtenidos de la misma planta. Estos de primera instancia tendrán la capacidad de volver a reintroducirse y colonizar la planta, además de fijar nitrógeno orgánico dentro de los tejidos, modificar la arquitectura de la raíz haciendo más eficiente la asimilación de nutrientes y funcionar como su nutriente en suelos pobres.

El presente proyecto de investigación tiene como fin el poder determinar la capacidad de colonización de bacterias endófitas del banano, soportar el crecimiento en ambientes pobres de materia orgánica y nitrógeno, incluso mejorar la capacidad de transferirle nitrógeno a las plantas, como una estrategia de sobrevivencia de la planta y su simbionte. También, se exploró mediante el uso de espectrometría de masas MALDI-TOF, la identificación de metabolitos secretadas durante la interacción planta-bacteria, en función de buscar entender el mecanismo y moléculas asociadas a la colonización de la planta mediante el uso de nanopartículas de Au y Ag.

JUSTIFICACIÓN

Jalisco es una de las regiones del país perteneciente a la región pacífico-centro de productores de bananos y plátanos. Las plantaciones de banano, no solo de Jalisco sino de todo el país se ven afectadas por enfermedades como la Sigatoka negra. Estas enfermedades ocasionan que los productores gasten millones de pesos anualmente en agentes químicos y fertilizantes, pero estos fungicidas son ineficientes con el manejo de la enfermedad. Además, contaminan los suelos, afectando la sustentabilidad de los mismos y disminuyendo la fuente natural de nitrógeno. Es por esto que el uso de microorganismos benéficos (endófitos) es una alternativa ecológica para el mantenimiento de los suelos y protección de las plantas. En el laboratorio de bioquímica y biología molecular de la Universidad Autónoma de Guadalajara, en los últimos 10 años de estudio del cultivo de banano, se ha logrado desarrollar una bio-formulación efectiva contra la Sigatoka negra en plantaciones comerciales, que muestra efectos de fertilización al desarrollarse plantas robustas en el pseudotallo y el tamaño de hojas. Esta bio-formulación está compuesta por bacterias endófitas nativas de las plantas de banano. Por lo tanto, en el presente trabajo se profundizó en investigar el efecto de las bacterias en el soporte del crecimiento de las plantas y la colonización inducida por el uso de nanopartículas. Los resultados obtenidos de esta investigación brindarán un panorama de la capacidad de estos microorganismos endófitos para transferir nitrógeno orgánico a las plantas en suelos deficientes de nutrientes. Por otro lado, el acercamiento metabolómico de la colonización abre rutas futuras de investigación sobre los mecanismos involucrados en la colonización de los microbios endófitos en las plantas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la transferencia de nitrógeno orgánico, la colonización y el soporte del crecimiento de plantas de banano *Musa acuminata* AAA Cavendish mediante el diseño de simbiosis bacteriana para el desarrollo de bio-fertilizantes microbianos en cultivos de importancia alimentaria.

Objetivos Específicos

- a) Evaluar el efecto sobre el desarrollo de plántulas de banano inoculadas con cepas endófitas de *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella variicola* comparadas con una cepa no endófitas de *Escherichia coli* bajo condiciones de limitación de nutrientes en arena de playa.
- b) Determinar el marcaje isotópico con ^{15}N en proteínas ribosomales de las bacterias enriquecidas con $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, $^{15}\text{NO}_3\text{Na}$ usando espectrometría de masas MALDI-TOF.
- c) Evaluar la transferencia de ^{15}N orgánico de las bacterias a la estructura de la feofitina de las plantas, usando espectrometría de masas HPLC-Q-TOF.
- d) Evaluar el proceso de colonización de raíces en ausencia y presencia de nanopartículas de Au y Ag, usando técnicas de microscopía óptica, tinción DAB y recuperación de bacterias de los tejidos internos de raíces, pseudotallo y hojas.
- e) Identificar mediante tecnología MALDI-IMAGING-MS los metabolitos secundarios y pequeños péptidos inducidos por el proceso de colonización.

ANTECEDENTES

Microorganismos endófitos

Las asociaciones simbióticas con los microorganismos de la rizósfera y filósfera es una propiedad de tipo adaptativo en las plantas. Al igual que las personas, las plantas se encuentran colonizadas por diferentes comunidades de microorganismos con roles benéficos potenciales para su hospedante y en el ecosistema que los rodea (suelo, rizósferas, etc), a esos microorganismos se les llaman endófitos. Los endófitos son microorganismos (bacterias y hongos) que existen o desarrollan parte de su ciclo de vida dentro de una planta. Visualmente no se observan síntomas en las plantas por su colonización. Los endófitos invaden los tejidos internos de las plantas, penetran las células y se mantienen en los espacios intercelulares, y no producen estructuras externas que afecten directamente el desarrollo planta. En general, los microorganismos endófitos juegan un papel importante en el proceso de adaptación ambiental de las plantas (Souza *et al*, 2014). Este tipo de microorganismos tienen la capacidad de sobrepasar la resistencia sistémica de plantas y se diseminan activamente en los tejidos comportándose como simbioses competitivos. Los endófitos pueden ser adquiridos por las plantas si la densidad poblacional de éstos baja, en el orden de 10^2 UFC por planta y en los tejidos se mantienen entre 10^2 a 10^7 CFU por gramo de tejido húmedo, dependiendo del órgano, tipo de tejido y edad de la planta. Los microorganismos endófitos producen un amplio rango de compuestos útiles para el crecimiento de la planta, así como metabolitos que le otorgan protección en contra del estrés biótico y abiótico (Dita *et al*, 2014) como se muestra en la figura 1.

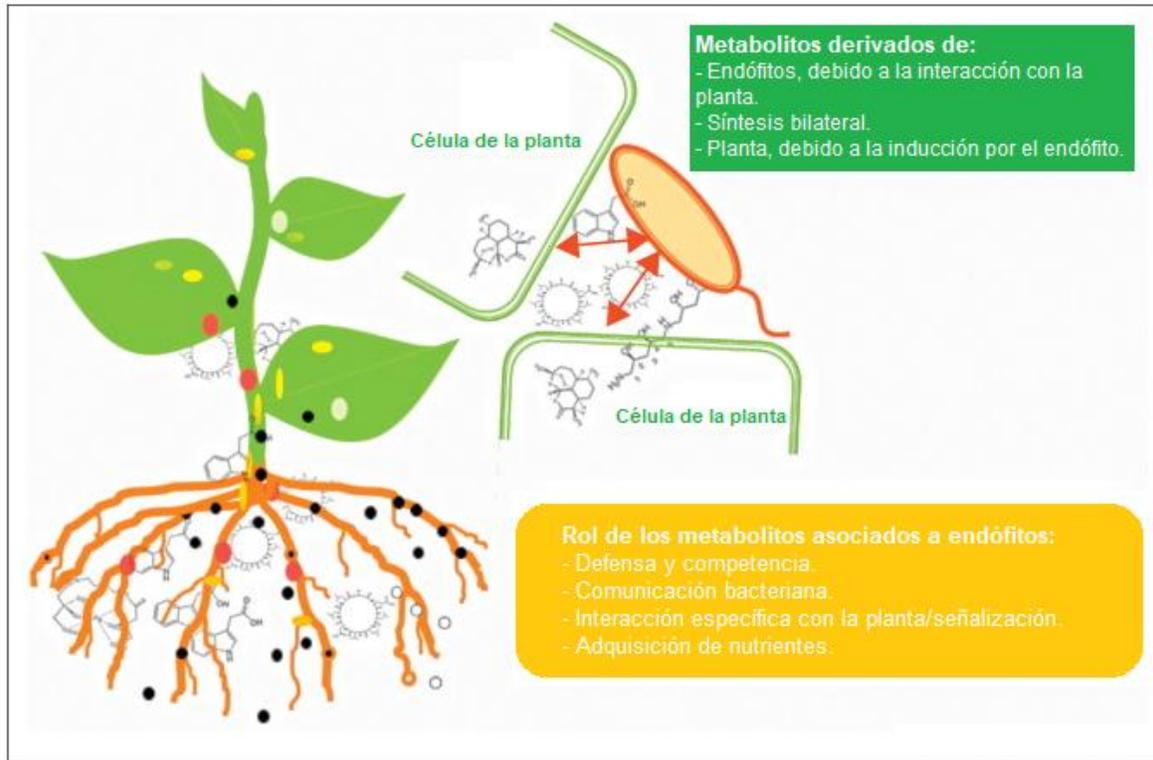


Figura 1. Esquema de la localización de los endófitos y los diferentes tipos de interacciones que pueden llegar a tener con la planta hospedera.

Cada día existen nuevos reportes sobre las comunidades endófitas de las plantas, hoy se sabe que la composición de la microbiota de las plantas varía considerablemente dependiendo del hábitat, condición ambiental, entre otros.

Las asociaciones naturales entre microorganismos y plantas están siendo exploradas por su potencial uso en un gran número de aplicaciones biotecnológicas, entre las que se encuentran su papel como agentes potenciales para biocontrol, esto debido a efectos inhibitorios en contra de patógenos. La habilidad de controlar patógenos de plantas ha sido descubierta en especies de *Bacillus*, *Enterobacter* y *Burkholderia*. Los endófitos sintetizan una serie de

moléculas activas que incluyen sideróforos, biosurfactantes, ácido cianhídrico e hidrolasas (glucanasas, quitinasas, lipasas y proteasas), que dan una ventaja sobre los fitopatógenos en la competencia por un nicho. Así también contribuyen con la protección de la planta al inhibir indirectamente al patógeno induciendo la defensa de la planta. Por ejemplo, algunos determinantes conocidos como patrones moleculares asociados a microbios o MAMPS, como la flagelina, lipopolisacárido (LPS), compuestos tipo fitohormonas y VOC juegan un papel importante en la inducción indirecta de la protección de la planta.

A) Actividad antagónica

Algunas bacterias endófitas, especialmente aquellas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* tienen la capacidad de producir sustancias biosurfactantes conocidas como lipopéptidos cíclicos (Beltrán-Gracia *et al* 2017, Jha *et al*, 2016, Ma *et al*, 2016, You *et al*, 2015). Entre estas, las surfactinas, fengicinas, e iturinas producidas por *Bacillus*, han demostrado tener actividades antivirales, anti-bacterianas, anti-fúngicas y hemolíticas, las cuales se asocia a la habilidad de unirse a la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática y modificar su permeabilidad. Las Surfactinas de *Bacillus* por ejemplo, muestran actividad antagónica con hongos como *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryosphaeria ribis*, *Phomopsis gossypii*, *Helminthosporium maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Drechlera oryzae*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *F. roseum*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotium sp.*, y *Phytophthora sp.* Otro ejemplo es la Iturina y la Fengicina producidas por *B. subtilis* que muestran un antagonismo directo sobre hongos fitopatógenos que afectan importantemente los

cultivos, pero también inducen la expresión de genes de la vía de los fenilpropanoides disparando la resistencia inducida sistémicamente (ISR) (Pieterse, et al, 2014). La surfactina causa una alcalinización dependiente de calcio y la acumulación de especies de oxígeno reactivas (EOR's). Estos datos incluyen a los EORs y su inducción por ácido salicílico puede ser mediada por estos lipopéptidos cíclicos. Estas moléculas se asocian a la motilidad bacteriana durante la colonización de las raíces y al estado de Quorum sensing, que son importantes en la formación de biopelículas (Burkhanova et al., 2017).

La ISR activada es mantenida por la planta por periodos largos y eficientemente protege contra los patógenos. La ISR incluye la formación de EORs mencionados anteriormente, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que durante la infección activa la expresión de factores de transcripción sensibles a cambios REDOX y a genes relacionados con la patogénesis, regulando la interacción entre ácido salicílico y ácido jasmónico, por las vías de señalización dependientes de etileno (Pieterse, et al, 2014; Burkhanova et al., 2017).

B) Promoción del Crecimiento y asimilación de nutrientes

Los endófitos como se sabe tienen propiedades de inducir el crecimiento de las plantas, entre las que destacan la fijación de nitrógeno atmosférico, este fenómeno ha sido estudiado ampliamente en las rizobacterias asociadas a plantas leguminosas, de tal forma que se conoce la compleja señalización y eventos moleculares que ocurren dentro del nódulo (Ahemad M. y Kibret M., 2014). Sin embargo, en las bacterias endófitas a pesar de que se sabe que éstas pueden fijar el nitrógeno, no existen estudios sobre la actividad de nitrogenasas endófitas.

Metabolitos como las auxinas, citocininas, ácido abscísico y la ACC deaminasa, también producidas por los endófitos, se consideran en el contexto de parámetros promotores del crecimiento de las plantas.

Otra propiedad extensamente estudiada, es la producción de auxinas. El ácido indol acético (AIA) es un factor que estimula el desarrollo de las raíces, especialmente el crecimiento de las raíces laterales y en los tejidos meristemáticos (Sevik H. y Guney K., 2013). Después de la germinación, las plántulas jóvenes contienen sólo raíz primaria, formadas directamente de la radícula presente en el embrión. Los primordios de raíces laterales originados de las células periclas localizadas enfrente del xilema de las raíces primarias. Las auxinas por lo tanto influyen en la formación de las raíces secundarias. Recientemente la señalización asociada a las auxinas, más allá de la arquitectura de la raíz en respuesta a estímulos ambientales, se ha estudiado con cierta profundidad, especialmente la resistencia al frío y sequía (Shi H. *et al*, 2014) a través de la ARE, conocidos como elementos de respuestas a auxinas. La síntesis depende de la secreción de triptófano por transportadores específicos de la raíz al exterior, mismo que es aprovechado por los microorganismos para transformarlo en AIA.

Un factor atractivo es la habilidad de producir ácido abscísico (ABA) especialmente bajo condiciones de estrés. La producción de ABA permite a las plantas a crecer bajo estrés por sequía. El ABA también regula la actividad estomática, lo cual puede ser considerada en el establecimiento de una barrera primaria contra patógenos de hojas. Además, el ABA también contribuye a la acumulación de callosa en células de la pared celular adyacente al sitio de infección. Mientras que las citocininas inducen la producción de moléculas de

señalización como el ácido jasmónico y ácido salicílico en plantas. Por lo tanto, se activa la defensa contra patógenos.

En algunos casos es producida la síntesis de etileno por la vía de las metioninas por ciertas bacterias; pero aquellas bacterias que producen ACCdeaminasa (ACCd) la cual cataliza el rompimiento del ACC (1-aminociclopropano1-acido carboxílico), precursor del etileno son consideradas de fuerte importancia. Debido a que la producción de etileno interfiere con la activación de la ISR en respuesta a las infecciones por patógenos biotróficos y hemibiotróficos, las bacterias productoras de ACCd reducen los síntomas de infecciones.

Además, los microorganismos endófitos pueden acelerar la asimilación de minerales como el fósforo por medio de la secreción de enzimas o simplemente la producción de ácidos orgánicos (Schoebitz M. *et al*, 2013). Sin embargo, el factor más influyente en la asimilación de este mineral y otros como el zinc, y el nitrógeno es la activación de transportadores selectivos. Este proceso de acumulación de transportadores selectivos influye en la modificación de las raíces laterales y de cierta manera ésta ligada a mecanismos regulatorios con las auxinas como parte de una respuesta adaptativa (Bouain *et al*, 2014).

Esta información sugiere que los microorganismos endófitos son una alternativa sustentable al uso de fertilizantes y pesticidas químicos, debido a su bajo costo y a su contribución como un modelo para una agricultura sustentable.

Endófitos de Banano

Existen varios reportes donde se han aislado bacterias y hongos endófitos de banano (*Musa acuminata*) con capacidades de controlar a los hongos causantes del mal de Panamá y de la Sigatoka negra. En la tabla 1 se presentan los géneros más destacados entre estos: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Klebsiella*, *Erwinia*, entre otros (Souza *et al*, 2014, Thangavelu *et al*, 2015, Zakaria *et al*, 2016, Sharma *et al*, 2017, Sekhar *et al*, 2015, Dita *et al*, 2014). Mientras que entre los hongos endófitos destacan los géneros: *Fusarium*, *Curvularia*, *Trichoderma*, *Calonectria*, *Rhizoctonia*, *Bionectria*, *Stromatoneurospora*, entre otros (Zakaria *et al*, 2016).

La mayoría de estos reportes de endófitos de banano se enfocan en aquellos encontrados en sus raíces, debido a la posible producción de moléculas benéficas para la planta.

Tabla1. Bacterias y hongos endófitos encontrados principalmente en las raíces de plantas de banano Enano gigante cv. Cavendish.

Tipo de endófito	Género y especie	Tejido de localización
Bacteria	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus vallismortis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Virgibacillus halophilus</i> , <i>Terribacillus goriensis</i> (1)	Raíz
	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Achromobacter</i> spp., <i>Rhizobium</i> spp., <i>Bacillus flexus</i> (2)	Raíz
	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Erwinia cyripedii</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Cellulomonas uda</i> , <i>Cellulomonas flavigela</i> , <i>Corynebacterium paurometabolum</i> , <i>Bacillus megaterium</i> (3)	Raíz

Enterobacter cloacae, Raíz, Hoja

Bacillus subtilis,

Lysinibacillus fusiformis,

Enterococcus faecalis,

Bacillus cereus (5)

Klebsiella variicola, Raíz

Klebsiella oxytoca,

Bacillus subtilis,

Enterobacter cloacae (6)

Hongo

Fusarium proliferatum, Raíz

Fusarium sp., *Fusarium*

solani, *Fusarium*

oxysporum, *Curvularia*

lunata, *Trichoderma*

atroviride, *Calonectria*

gracilis, *Rhizoctonia*

solani, *Bionectria*

ochroluca,

Stromatoneurospora

Phoenix (Xylariceae) (4)

- 1) Souza *et al*, 2014, 2) Thangavelu *et al*, 2015, 3) Sharma *et al*, 2017, 4) Zakaria *et al*, 2016, 5) Ortíz-Mendoza, 2014, 6) Thomas *et al*, 2009.

Importancia del banano

El banano se encuentra entre los principales productos agrí más valiosos del mundo, siendo el cuarto cultivo a nivel mundial después del arroz, trigo y maíz en términos del valor bruto de la producción anual, y es el 12vo cultivo más importante en términos de valor y cantidad. Se estima que alrededor de 5 millones de hectáreas de banano son cultivadas anualmente en todo el mundo, teniendo a sus mayores productores en África, Asia, India, el caribe y América latina (FAO, 2016). Además, se reporta que la producción de bananos genera un valor de exportación de aproximadamente \$5 billones de dólares por año (Machinova *et al*, 2014). Los 4 países que lideran la exportación de bananos en el mundo son India, China, Brasil y Filipinas, representando el 64% de la exportación mundial (Sheth, 2017), mientras que México ocupa el lugar 14 con un 1.7% de la producción mundial (The World Factbook, Field Listing: Exports – Commodities. 2017) como se observa en la tabla 2.

Para 2016, se hizo una estimación donde se preveía que México podría aumentar su capacidad de exportación en un 184.3%. Por otro lado, la FAO (Food and Agriculture Organization) estima que la producción puede aumentar unas 18.1 millones de toneladas a nivel mundial, siendo los países de América latina como se observa en la figura 2. Pero, esto puede verse amenazado debido a los diferentes retos de producción que se enfrenta este cultivo.

Tabla 2. Ranking mundial de Países que exportan banano a nivel mundial.

País	Exportación
1.- Ecuador	\$2.7 billones (23.3%)
2.- Guatemala	\$ 1.2 billones (10.5%)
3.- Costa Rica	\$ 996.8 millones (8.5%)
4.- Bélgica	\$ 940.9 millones (8%)
5.- Colombia	\$ 914.9 millones (7.8%)
6.- Filipinas	\$ 618.8 millones (5.3%)
14.- México	\$ 197.1 millones (1.7%)

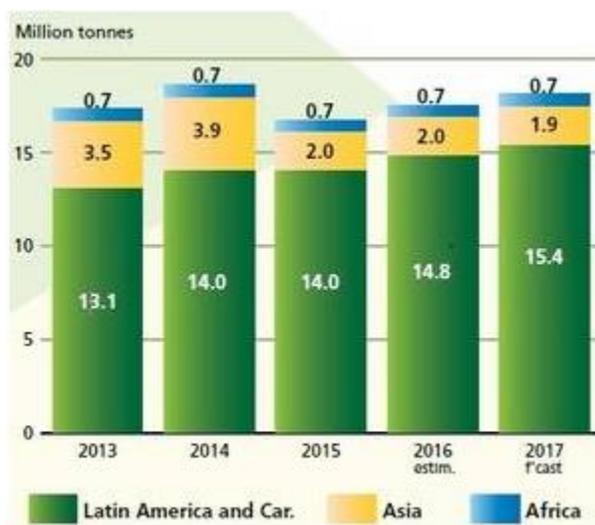


Figura 2. Producción en millones de toneladas de banano de acuerdo con las diferentes regiones productoras del mundo. Se observa que Latinoamérica provee la mayor cantidad de banano para el consumo mundial. (FAO 2016).

Retos y Amenazas para la producción de Banana.

La Sigatoka negra

Las enfermedades causadas por microorganismos son los factores más dinámicos y destructivos que afectan al cultivo. En total, la producción global de banano es reducida por las enfermedades que atacan a las plantas más que por otras condiciones bióticas (Ploetz *et al*, 2015). La Sigatoka negra, es de las enfermedades más importante en la producción de importación. El daño que causa esta enfermedad es bastante severo y se propaga rápidamente teniendo interacción con nuevos ambientes, zonas de cultivo nuevas, etc. A pesar de que esta enfermedad no mata la planta de manera inmediata, tiene serios impactos en la calidad de la fruta. La Sigatoka negra es causada por el hongo fitopatógeno *Pseudocercospora fijiensis*. En general la Sigatoka negra ocasiona una inhibición de la capacidad fotosintética de la planta lo que lleva a una maduración prematura del fruto y acorta la vida de la fruta post cosecha (Ploetz *et al*, 2015). La patogenia es estrictamente foliar, por lo que los síntomas de la enfermedad se presentan en las hojas de las plantas, además de presentar diferentes estadios de acuerdo con la evolución de la enfermedad como se observa en la figura 3.

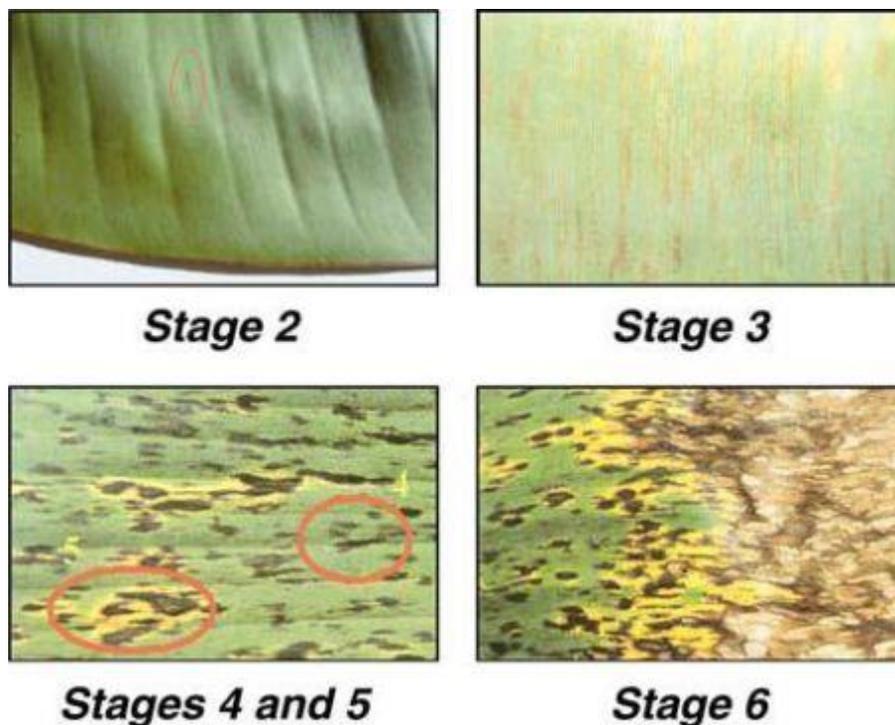


Figura 3. Estadios de Fouré. Muestra la evolución de la sigatoka negra en las hojas de banano, donde van desde pequeñas pizcas en las hojas de banano (etapa 2) hasta una completa necrosis de la planta (etapa 6).

Mal de panamá

El mal de panamá causado por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum cubense* (foc) raza 4, a pesar de ser reportado primero en Australia, se han reportado brotes de esta enfermedad en todos los países productores de banano alrededor del mundo. El mal de Panamá es una enfermedad letal que infecta las raíces y el xilema de las plantas. Al afectar el xilema las plantas se vuelven no funcionales, logrando que la planta se marchite y muera (figura 4).



Figura 4. Síntomas de planta de banano afectada por el mal de Panamá ocasionada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum cubense*. Se observa un amarillamiento de hojas y muerte total de la planta en corto tiempo. Actualmente esta enfermedad amenaza la viabilidad del cultivo en varias regiones productoras del mundo. No hay casos en México.

Ambas enfermedades son poco manejables, actualmente el control de dichas enfermedades es mediante el uso de agentes químicos (fungicidas), pero éstos han demostrado ser ineficientes para controlar dichas plagas (Aguilar-Barragán *et al*, 2014).

Control de enfermedades

Para maximizar las oportunidades de exportar el fruto y disminuir los efectos ocasionados por Sigatoka negra, actualmente se usan una serie de varios fungicidas que son aplicadas con ayuda de avionetas. Dichos fungicidas pueden ser protectores (no penetran la planta, sólo se depositan en la superficie de la

hoja) o sistémicos (entran dentro de la planta y tienen un blanco específico en la estructura celular del fitopatógeno). Esta es una práctica bastante costosa, considerando que el 25% del precio de la fruta es atribuido a esta actividad (ploetz *et al*, 2015), mientras que 1/3 del costo de la producción se destina a la aplicación de fungicidas para controlar esta enfermedad (Machinova *et al*, 2014).

El mal de Panamá, no tiene una estrategia de tratamiento químico que ejerza un control contra del hongo. Se ha reportado que la enfermedad es controlada por un corto periodo de tiempo mediante el uso de agente biológicos, aunque dichos resultados son cuestionables debido a la aplicación de fungicidas y fertilizantes químicos en conjunto con los agentes biológicos (Ploetz *et al*, 2015).

En México no existe un plan de rotación de fungicidas para tratar estas enfermedades, así que el uso de estos fungicidas es indiscriminado, aplicando durante mucho tiempo el agente químico que aparenta controlar la plaga, hasta que se pierde el efecto. Eso ha producido que las cepas que infectan los cultivos de banano desarrollen resistencia a los fungicidas, provocando que dicho control no sea eficaz y se comiencen a buscar alternativas que sean más funcionales para los productores (Aguilar-Barragán *et al*, 2014).

Uso eficiente de nitrógeno

El nitrógeno es un factor limitante para el desarrollo de las plantas que limitan la producción de los cultivos comerciales (Perchlik *et al*, 2017). El agricultor para llegar a los niveles de rendimiento adecuados debe utilizar grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados en su producción. En países industrializados, se han incrementado dramáticamente el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos ha

incrementado dramáticamente para poder satisfacer la demanda agrícola de una población en crecimiento (Perchlik *et al*, 2017, Chao *et al*, 2015). Sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes provoca una contaminación ambiental severa, influye en el cambio climático y en consecuencia la pérdida de la biodiversidad macroscópica y microscópica. Lo que la producción sustentable de un cultivo requiere de un manejo cuidadoso de las cantidades de nitrógeno aplicado debido a que es un elemento móvil (Lammerts van Bueren *et al*, 2017). El uso excesivo de nitrógeno aumenta el riesgo de contaminación por inmovilización, por lixiviación superficial en el suelo, desnitrificación o volatilización (Lammerts van Bueren *et al*, 2017). Por esto, el uso eficiente de nitrógeno (NUE) juega un papel fundamental en la producción de cultivos comerciales (Todeschini *et al*, 2016). La definición de NUE es compleja, pero se puede definir como el rendimiento por grano, forraje o fruta por unidad de nitrógeno disponible en el suelo de acuerdo con las diferentes especies de plantas (Li *et al*, 2017). Cuando se considera el mejoramiento del manejo de nitrógeno, varias fuentes de obtención del nitrógeno por plantas se toman en cuenta: deposición atmosférica de compuestos nitrogenados, el nitrógeno disponible en suelo, nitrógeno atmosférico fijado por bacterias o algas fijadoras de nitrógeno, nitrógeno mineralizado de la materia orgánica en suelo, nutrientes nitrogenados a través de simbiosis en raíces con microorganismo benéficos de suelo, minerales nitrogenados, entradas de nitrógeno (como estiércol de animales, composta, etc), aplicación de nutrientes foliares, nutrientes aplicados en los sistemas de irrigación, etc. (Lammerts van Bueren *et al*, 2017). Los principales componentes del NUE son la eficiencia de consumo de nitrógeno (NUpE) que se resume en la habilidad de la planta de absorber el nitrógeno

disponible en el suelo, la eficiencia de utilización de nitrógeno (NUE) que es la relación entre el rendimiento del cultivo y el total de nitrógeno absorbido por la planta y la eficiencia de re movilización de nitrógeno (NRE) que se traduce como la habilidad de la planta de translocación del nitrógeno en la misma. A estos se atribuye la variabilidad de la respuesta al NUE en los cultivos, ya que, si la planta posee una alta eficiencia para re movilizar el nitrógeno, esto tiende a acelerar el proceso de senescencia. Además, se ha relacionado con el NUE la acumulación de biomasa de la planta, así como el contenido de clorofila en las hojas de éstas (Todeschini *et al*, 2015). La importancia del NUE se ha estimado en que se puede ahorrar hasta cerca de \$1.1 billones de dólares si se logra aumentar en al menos 1% (Li *et al*, 2017, Perchlik *et al*, 2017, Han *et al*, 2015, Hawkesford M.J., 2017).

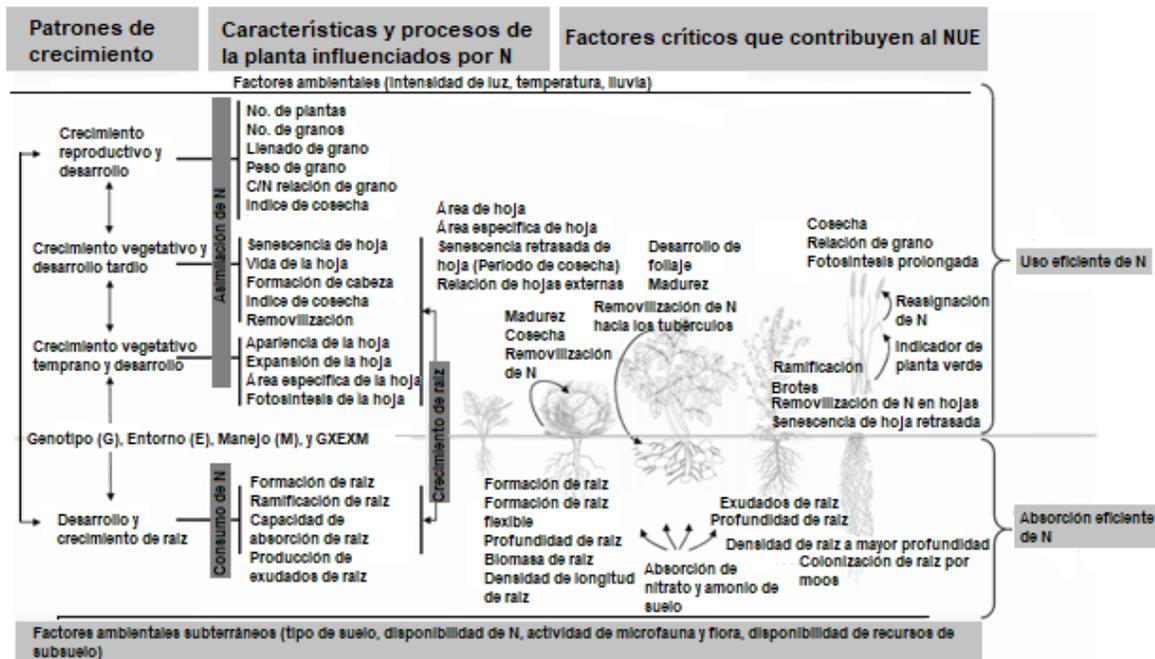


Figura 5. Efecto del nitrógeno sobre el comportamiento fisiológico de las plantas en función de los factores que influyen en el uso eficiente del nitrógeno (NUE). (tomado de Lammerts van Bueren *et al*, 2017).

Uso Eficiente de Nitrógeno (NUE) y transportadores de Nitrógeno en la raíz.

Las plantas son organismos inmóviles que han desarrollado varios sistemas de toma de nitrógeno para sostener su supervivencia en el cambio ambiental. El nitrato y amonio son dos de las formas de nitrógeno más importantes que existen en los suelos, de las cuales el nitrato es la forma más abundante en ambientes aeróbicos, mientras que el amonio tiende a ser la forma principal en suelos ácidos o con una gran cantidad de agua (Glass *et al*, 2001). Los aminoácidos también cuentan como una pequeña porción del nitrógeno orgánico que puede ser utilizado por las plantas. Para que el nitrógeno ingrese a las plantas, se debe movilizar a través de transportadores de nitrógeno presentes en las raíces y son elementos claves para determinar la NUE.

Se han reportado 4 familias de transportadores de nitratos en *Arabidopsis* que corresponden a NPF (NRT1/PTR), NRT2, la familia del canal de cloruro (CLC) y los homólogos asociados al canal de anión lento (SLAC/SLAH). *Arabidopsis* cuenta con 53 NPF, 7 NTR2, 7 CLC y 5 SLAC/SLAH, transportadores que han sido caracterizados. Mientras que se han reportado los siguientes transportadores de amonio en *Arabidopsis* AtAMT1;1-AtAMT1;5 (Li *et al*, 2017, Han *et al*, 2015). Los transportadores pueden clasificarse en transportadores de alta afinidad, transportadores de baja afinidad y transportadores de amonio (Glass *et al*, 2001). Un efecto fisiológico en la planta que puede afectar el NUpE incluye la arquitectura de la raíz y cualquier otra característica que impacte la habilidad de las raíces para extraer nitrógeno del suelo. Un ejemplo simple para mejorar el NUpE sería incrementar la toma de nitrógeno con la expresión de transportadores de nitrógeno más eficientes o incrementar la expresión de todos los transportadores; sin

embargo, es poco probable que la sobreexpresión de dichos transportadores sólo incremente la toma de nitrógeno. Un segundo ejemplo es identificar los genes que tiene un papel en la remodelación de la raíz, sin embargo, hay muy pocos estudios que demuestren que la manipulación de dichos genes afecta la toma de nitrógeno por parte de la planta. Es claro que el factor ambiental que afecta el NUE es la disponibilidad de agua. Sin suficiente agua, las plantas no pueden extraer nutrientes del suelo y el rendimiento se ve limitado exclusivamente a la humedad disponible en el suelo y no a la disponibilidad del nitrógeno como se es deseado (Han *et al*, 2015).

Ahora bien, otro factor importante es el uso eficiente de nitrógeno en microorganismos, que se describe como la partición del N orgánico absorbido entre el crecimiento y la liberación de N inorgánico al medio ambiente (es decir, la mineralización de N). Se ha encontrado que los microorganismos retienen una alta concentración de nitrógeno orgánico inmovilizado, cuando están carentes de nitrógeno, resultando en una baja mineralización del nitrógeno. Sin embargo, cuando el control catabólico de los microorganismos cambia de una limitación de nitrógeno a una limitación de carbono, liberando una fracción considerable del nitrógeno orgánico como amonio (Mooshammer *et al*, 2014). Se ha concluido que la regulación del NUE es una estrategia esencial de las comunidades microbianas para enfrentarse a la carencia de suelos pobres de nutrientes afectando el ciclo del nitrógeno (Mooshammer *et al*, 2014).

Diseño de simbiosis y transferencia de nutrientes bajo condiciones de empobrecimiento de suelos.

Las plantas han colonizado la tierra desde hace 450-490 millones de años. Lo que requirió varias adaptaciones en su manera de tomar los nutrientes, que incluyen la toma y el movimiento de agua y de otros solutos dentro de la planta (Batista *et al*, 2015). La evolución de las raíces de las plantas ha servido para una amplia variedad de procesos, incluyendo la toma de nutrientes y agua, el anclaje al suelo, soporte mecánico y almacenaje. La planta es completamente dependiente de sus sistemas de raíces para su supervivencia en la naturaleza y para mantener el rendimiento y la calidad nutricional en la agricultura (Batista *et al*, 2015, Koutika *et al*, 2017). La seguridad alimentaria se encuentra entre los retos más grandes de la humanidad en el siglo 21. La baja fertilidad del suelo incluyendo la baja disponibilidad de los nutrientes y problemas como la acidez de los suelos y la toxicidad asociada a metales como el aluminio (Al) limitan la productividad agrícola al restringir a los cultivos de alcanzar todo su rendimiento. La baja fertilidad de los suelos en Países desarrollados es una de las principales preocupaciones en cuanto al desarrollo de seguridad alimentaria y al propio desarrollo económico. Adicionalmente, la disponibilidad del agua a menudo limita el desarrollo de los cultivos en la mayoría de los sistemas de agricultura (Batista *et al*, 2015, Koutika *et al*, 2017).

Los síntomas generales que presentan las plantas cuando se encuentran en un suelo pobre de nutrientes (con una baja fertilidad) o con toxicidad mineral incluyen la poca aparición de las plantas, bajo crecimiento, plántulas y plantas adultas dañadas, clorosis en hojas, una reducción en el crecimiento en general y en la

producción de materia seca y una alteración en las semillas (Batista *et al*, 2015; Koutika *et al*, 2017).

Como se explicó en el apartado de uso eficiente de nitrógeno, los microorganismos también tienen la habilidad de controlar la toma de nutrientes. El hecho de que las raíces de las plantas hagan asociaciones (micorrizas o nódulos con rizobacterias) o permitan la colonización, abre la puerta a que se piense en los microorganismos como una alternativa para mejorar el rendimiento de los cultivos cuando éstos se encuentran en suelos infértiles. Los microorganismos pueden cambiar su metabolismo cuando se encuentran en limitaciones de nitrógeno o carbono, esto conlleva a la regulación del NUE como una estrategia de los microorganismos para hacer frente al desequilibrio de nutrientes. Por lo tanto, el conocimiento de cómo los microorganismos regulan el uso del nitrógeno puede brindar una idea general de cómo se regulan las funciones del ecosistema y de esa manera cómo aumentan el rendimiento de los cultivos (Mooshammer *et al*, 2014). Ahora bien, controlar el NUE no es la única estrategia que tienen los microorganismos para lograr su supervivencia y la de su planta hospedera en condiciones de limitación de nitrógeno.

La transferencia de nitrógeno de microorganismos endófitos a las plantas.

A pesar de su abundancia atmosférica, el N₂ gaseoso no es una fuente disponible de nitrógeno para las plantas. Los microorganismos libres y los microorganismos de suelos son capaces de fijar nitrógeno y producen compuestos nitrogenados que son utilizados directamente por las plantas. Como se ha visto anteriormente, la simbiosis que crea la planta con los microorganismos endófitos es para beneficio

de ambos, y dicha simbiosis se basa en la producción de metabolitos que son aprovechados por la planta, de igual manera dichos microorganismos son capaces de transferir nitrógeno, que es un elemento esencial para el crecimiento de la planta. Está reportado en literatura dicho fenómeno, donde los microorganismos son marcados con ^{15}N y posteriormente dicho marcaje es buscado en la planta (Beltrán-García *et al*, 2014). El nitrógeno tiene 2 isótopos estables ^{15}N y ^{14}N . La mayoría de los procesos físicos, químicos y bioquímicos se inclinan a la incorporación del isótopo más ligero en su producto, dejando el sustrato enriquecido con el isótopo más pesado. Una de las técnicas más usadas para medir la dinámica del nitrógeno, es medir la proporción de los isótopos ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) en plantas, ya que se ha probado que es una técnica bastante útil para medir el total de nitrógeno que entra, sale o se fracciona en los diferentes procesos (Hobbie *et al* 2012). Para verificar dicho marcaje hay diferentes técnicas que serán vistas en este apartado.

Para demostrar la funcionalidad de los endófitos como agentes de transferencia de nitrógeno hacia las plantas, Behie *et al*, en 2014 marcaron la larva de *Galleria mellonella* con sulfato de amonio ^{15}N , posteriormente dicha larva fue infectada con conidias de hongos (*Metarhizium sp.*, *B. bassiana*, *L. lecanii* o *A. flavus*) que son géneros patógenos para insectos, estas larvas se colocaron en brotes de soya, frijol, pasto y trigo. La búsqueda del marcaje con ^{15}N fue realizado a los 14 y 28 días posteriores al depósito de la larva en los brotes de las plantas, se tomaron solamente las hojas, se secaron a 60°C y se molieron hasta obtener un polvo fino. El material se encapsuló y se analizó el contenido de ^{15}N con ayuda de un espectrofotómetro de emisión NOI-5. Después de 28 días se observó que, si había

una transferencia de nitrógeno presentando un aumento del 60%, 30%, 62% y 82% respectivamente para cada planta a los 28 días. Mientras que Montesinos-Navarro *et al*, en 2016 y 2017 midieron la transferencia de nitrógeno en plantas secando la planta a 50°C durante tres días y posteriormente se maceró hasta obtener un polvo fino, después encapsularon 3mg del material para poder medir el isótopo con ayuda de un espectrómetro de masas con flujo continuo de isótopos. Por otro lado, Beltrán-García *et al* en 2014, hicieron el seguimiento de la transferencia de nitrógeno en agave por parte del endófito *Bacillus tequilensis*, ellos analizaron la feofitina, que es la clorofila sin magnesio, se encontró que los cuatro átomos de nitrógeno estas marcados en las hojas de agave.

Nanotecnología: una alternativa para el uso de nanopartículas en la agricultura

La nanotecnología es reconocida como una tecnología clave que puede contribuir a una competitividad sustentable y a un desarrollo en varios campos de aplicación industrial. Las propiedades de las nanopartículas proveen de funciones útiles que han sido rápidamente explotadas en campos como la medicina, la biotecnología, electrónica, ciencia de los materiales y sectores energéticos entre otros. Todos estos desarrollos también han llegado al sector agrícola, donde se requiere de una innovación continúa debido al reto que está presentando la seguridad alimentaria y el cambio climático (Parisi *et al*, 2014). El uso de nanotecnología para el sector agrícola ha sido específicamente para mejorar procesos de fertilización, incremento de rendimiento a través de la optimización de nutrientes y minimizando los productos químicos (Dhewa T., 2015). El uso más común de las nanopartículas

en la agricultura han sido los encapsulados o nanopartículas que acarrean fungicidas o fertilizantes, que tienen blancos específicos reduciendo así el daño a plantas que no son el blanco de las nanopartículas (Sabir *et al*, 2014), en forma de resumen se presenta en la figura 6 la utilidad de las nanopartículas en la agricultura. El tipo de nanopartículas o nanomateriales más utilizados para las plantas son bastante amplios, pero se pueden clasificar en dos grupos principales: nanomateriales basados en carbón y nanomateriales basados en metales. Los nanomateriales más utilizados con metales son los siguientes: TiO_2 , CeO_2 , Fe_3O_4 , ZnO y AgNO_3 (Matiello *et al*, 2017). Las nanopartículas de diferentes metales pueden jugar un papel importante en la promoción de crecimiento y el rendimiento de la planta, sin embargo, aún se investiga el efecto tóxico que estas nanopartículas puedan tener (Bhattacharyya *et al* 2014). Las nanopartículas tienen el potencial de viajar a través del organismo a diferencia de otros tipos de materiales de tamaño mayor (Bhattacharyya *et al* 2014). Hay reportes de nanopartículas que al ser aplicadas a las plantas tienen un efecto benéfico, por ejemplo; la aplicación de SiO_2 en maíz y tomate, nanotubos de carbón en tomate, mostaza, frijol negro y arroz. TiO_2 en espinaca y trigo (Ditta *et al*, 2015). Las nanopartículas de Si, Pd, Au y Cu en lechuga, estas han demostrado un aumento en la germinación de estas plantas (Ditta *et al*, 2015). Sin embargo, el impacto real de las nanopartículas en plantas dependerá mucho de su composición, concentración, tamaño, carga de superficie y las propiedades químicas y físicas, además de la susceptibilidad de la planta (Fraceto *et al*, 2016).

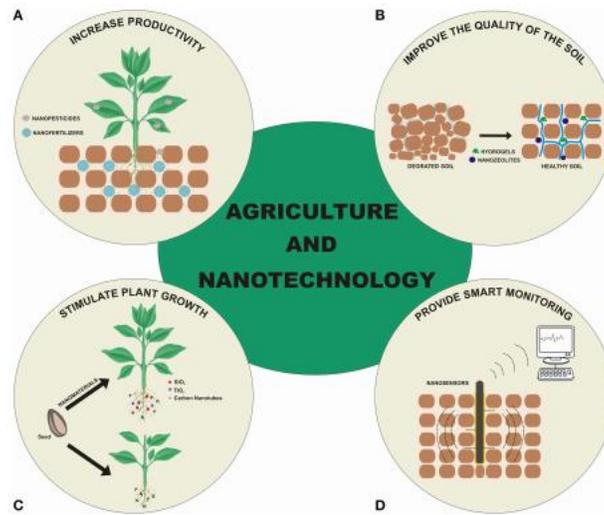


Figura 6. Aplicaciones potenciales de la nanotecnología en la agricultura. Hay cuatro factores importantes para usar nanotecnología: A) Aumentar la productividad usando las partículas como vehículos de pesticidas y fertilizantes, mejorador de la calidad del suelo, estimulación del crecimiento de la planta y proveer un monitoreo inteligente utilizando nanosensores (Fraceto *et al*, 2016).

Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica bastante sencilla para el análisis de proteínas y péptidos. La tecnología MALDI-TOF es considerada como un método de ionización suave; ésta fue introducida al final de los años 80s revolucionando la espectrometría de masas (Schiller *et al*, 2004). La técnica posee un láser como fuente de ionización, donde las muestras son recubiertas con una matriz (de ahí sus siglas en inglés Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). El primer análisis que se realizó con esta técnica se utilizó polvos de cobalto como matriz, hoy en día se utilizan exclusivamente ácidos orgánicos de los cuales los más utilizados son el ácido sinápico, ácido α -ciano-4-hidroxicinámico y el ácido

2,5-dihidroxibenzoico. Y posee como analizador de masas un tubo de tiempo de vuelo (Time Of Flight) donde los compuestos ionizados son separados de acuerdo a su masa y su carga. El funcionamiento del equipo se esquematiza en la figura 7.

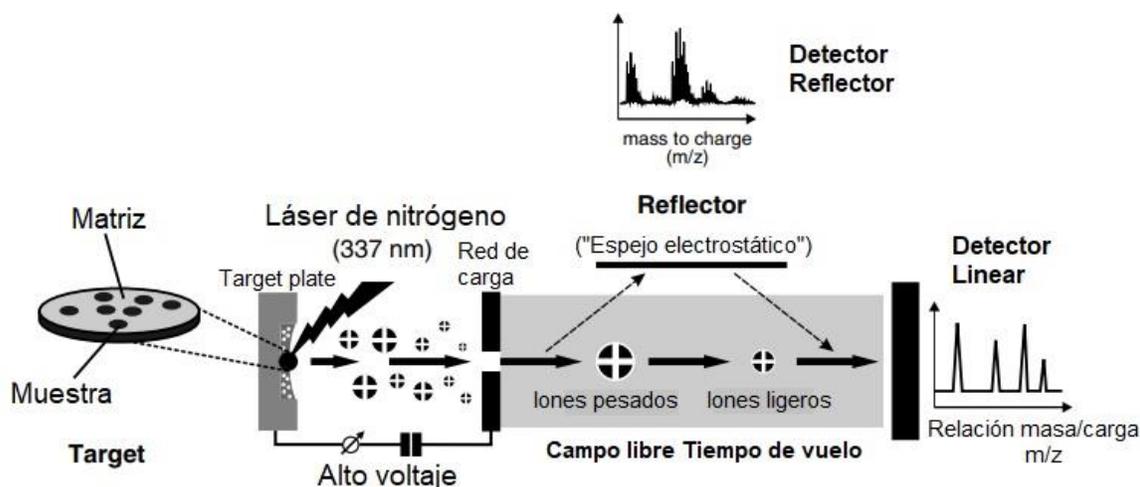


Figura 7. Secuencia de eventos para el procesamiento de una muestra en un espectrómetro de masas MALDI-TOF. (Schiller *et al*, 2004).

Identificación de microorganismos por la técnica MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS es una herramienta fácil de usar, rápida y precisa que ha revolucionado la identificación de microorganismos en laboratorios de microbiología. Esta tecnología permite hacer una identificación a nivel de especie mediante un análisis de proteínas totales. La espectrometría de masas MALDI-TOF MS se basa en la generación de un espectro de masas de todas las proteínas del microorganismo (perfil proteico) y su comparación con espectros de masas que se encuentran almacenados en una base de datos (Saugete *et al*, 2017). Existen factores que pueden afectar la identificación de un

microorganismo por MALDI-TOF, entre ellos se encuentra la intensidad de la señal, la pérdida de la señal y el cambio de señal. Sin embargo, la identificación también se puede ver afectada por la condición de crecimiento del cultivo, la misma preparación de la muestra e incluso el medio de cultivo utilizado.

Identificación de proteínas

La espectrometría de masas estuvo mucho tiempo restringida a moléculas pequeñas y termoestables debido a la escasa efectividad de las técnicas disponibles. El desarrollo de la técnica de MALDI-TOF en los años 80s cambió esta situación, y logrando poder ver proteínas de masas moleculares altas. La espectrometría de masas es usada para medir pesos moleculares siempre de polipéptidos o incluso determinar estructuras adicionales que incluyen la secuenciación de aminoácidos o el sitio de unión de modificaciones postraduccionales en proteínas. La espectrometría de masas MALDI-TOF MS es bastante confiable para la determinación de péptidos y proteínas y usualmente suele ser completado con un análisis de ESI MS. Comparando ambas técnicas (MALDI y ESI), MALDI MS es una técnica más sensible y más tolerante a la presencia de contaminantes como sales o pequeñas concentraciones de sales (Domon *et al*, 2017).

MALDI-IMAGING

La técnica de MALDI-IMAGING es una técnica que se encuentra en desarrollo. Esta técnica sirve para medir la distribución tiempo/espacio de distintas biomoléculas sobre tejidos. Esta técnica ha sido usada en diversas áreas que

incluye el estudio de metabolitos primarios, productos naturales, mecanismo de defensa en plantas, respuesta a estrés abiótico y biótico en plantas, lípidos en plantas y metabolómica (Boughton *et al*, 2016). En la figura 8 se observa el esquema del funcionamiento de la técnica de MALDI-IMAGING.

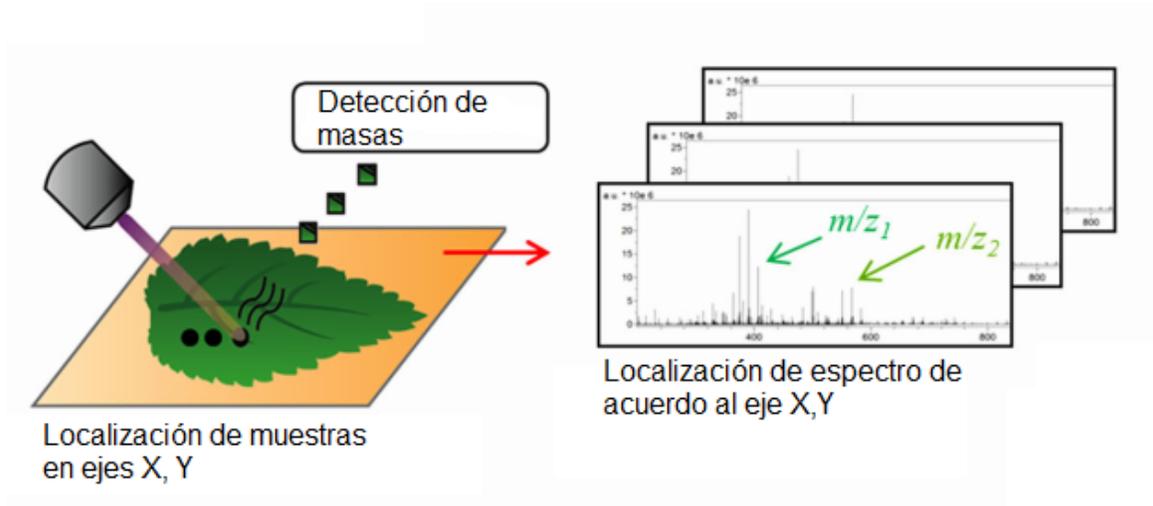


Figura 8. Obtención de señales de masas usando la técnica MALDI-IMAGING- La muestra debe ser previamente cortada a un grosor de 5-10 micrómetros y bañada con una matriz homogénea.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Material biológico

Material vegetal

Las plantas utilizadas para este proyecto fueron bananos micropropagados (Banano, clon francés) en agar obtenidas de la empresa Nature Source Improved Plants ubicada en Cantón el Carmen, Mpio. De Frontera Hidalgo, Chiapas, México.

Cepas endófitas

En este proyecto fueron utilizadas dos cepas endófitas de banano registradas como C2 y RU1E. La primera fue aislada de hoja de banano mientras que la segunda fue aislada de raíz de banano, ambas cepas fueron colectadas en Cihuatlán, Jalisco, México. Dichas cepas fueron escogidas ya que ambas fijan nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen auxinas y además presentan actividad antifúngica en contra de cepas de *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium oxysporum*, hongos fitopatógenos de banano como se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades de promoción del crecimiento de plantas y de inhibición de hongos fitopatógenos asociados al cultivo de banano.

Inhibición de hongos patógenos				Promoción de Crecimiento		
CEPA	<i>Fusarium</i>	Cepa 102*	Cepa MF-1*	Auxinas	N ₂	Fosfato
Endófito	<i>oxysporum</i>					
<i>E.</i>	18.33%	90%	75%	+	+	148.59
<i>cloacae</i>						± 5.38
<i>K.</i>	16%	100%	100%	+	+	131.11
<i>variicola</i>						± 7.84

*Cepas 102 y MF-1 corresponden a cepas del hongo fitopatógeno *Pseudocercospora fijiensis*.

El análisis de identificación bacteriana fue llevado a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y por análisis de secuenciación del producto de amplificación del ARNr16S ambos estudios revelan que la cepa C2 corresponde a *Enterobacter cloacae* y la cepa RU1E es una *Klebsiella variicola*.

Utilización de *Escherichia coli* no-endófito como control en las pruebas de promoción de crecimiento de planta y colonización

Como cepa control se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922. Esta cepa fue analizada para la producción de auxinas, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno; a las tres pruebas dio positiva a pesar de no ser una bacteria endófito de banano. Su identidad fue corroborada con espectrometría de masas MALDI-

TOF. La cepa fue inoculada en tubos eppendorf con agar soya tripticaseína para su mantenimiento.

Nanopartículas de oro y plata

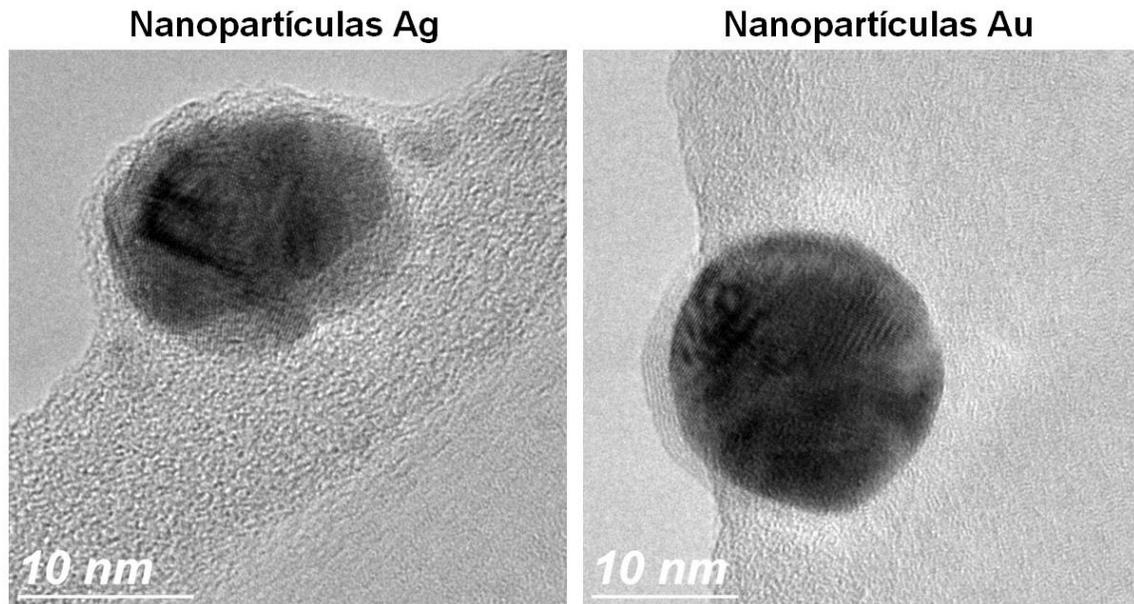


Figura 9. Microscopía de las nanopartículas de Oro y Plata utilizadas en este trabajo de investigación.

MATERIALES

Cajas Petri

Matraz Erlenmeyer 1lt

Matraz Erlenmeyer 250ml

Tubos falcon 50ml

Tubos eppendorf 2ml

Puntas de 5ml

Puntas de 1ml

Puntas de 200 μ l

Puntas de 10 μ l

Probeta

Espátula

Charola para pesar

Frascos de boca ancha

Viales

Cubre objetos

Porta objetos

Pipeta pasteur

Vaso de precipitado

Pinzas

Mortero

Mechero

REACTIVOS

Agar soya tripticaseína (Bioxon, NJ, USA)

Caldo soya tripticaseína (Bioxon, NJ, USA)

Agar para método estándar (Bioxon, NJ, USA)

Glutaraldehído (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)

Fosfato de sodio dibásico (JT Baker, USA)

Fosfato monobásico de potasio (JT Baker, USA)

Cloruro de sodio (Merck, Darmstat, Germany)

Cloruro de amonio (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)

Glucosa (Hycel, México)

Sulfato de magnesio heptahidratado (JT Baker, USA)

Nitrato de amonio (Productos químicos de Monterrey, México)	Agua milliQ (Merck, Darmstat, Germany)
Arena de playa	Etanol grado HPLC (Golden bell, Anaheim, CA, USA)
Cloruro de calcio (JT Baker, USA)	Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker, USA)
Cloruro férrico (MACRON, PA, USA)	Ácido trifluoroacético (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)
Cloruro de potasio (JT Baker, USA)	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)
Ácido bórico (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)	Acetona (Hycel, México)
Sulfato de manganeso mono hidratado (JT Baker, USA)	Éter (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)
Sulfato de cobre (Mallinckrodt, Dublín, Irlanda)	Metanol grado HPLC (Golden bell, Anaheim, CA, USA)
Molibdato de amonio tetra hidratado (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)	Sulfato de amonio (JT Baker, USA)
Cloruro de amonio ¹⁵ N (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)	Kit DNeasy plant mini kit (QUIAGEN, Hilden, Alemania)
Nitrato de sodio ¹⁵ N (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)	Ácido fórmico (JT Baker, USA)
Hidróxido de sodio (Hycel, México)	Diamino bencidina (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)
Ácido clorhídrico (JT Baker, USA)	Azul de anilina (Sima-Aldrich, Darmstat, Germany)
Buffer pH 7 (JT Baker, USA)	Nanopartículas de oro
Buffer pH 10 (JT Baker, USA)	
Nitrógeno líquido (Praxair, México)	

Nanopartículas de plata

Agarosa (IBI, Dubuque, Iowa, USA)

Hipoclorito de sodio

OCT (Leica, Wetzlar, Alemania)

EQUIPOS

Equipos localizados en Guadalajara, México

Campana de flujo laminar (ESCO,

Celdas de cuarzo 1ml

Horshman, USA)

Autoclave (Felisa, Zapopan, Jalisco,

Incubadora (VWR, PA, USA)

México)

Centrifuga refrigerada (NEUIRE)

Cámara bioclimática (Climacell,

Microscopio electrónico de barrido

Boston, Massachusetts, USA)

(FEI Quanta 250, Waltham,

Minicentrifuga (Eppendorf,

Massachusetts, USA)

Hamburgo, Alemania)

Agitador en orbital (INFORS HT,

Vortex (Scientific Industries, Bohemia,

Basel, Suiza)

NY, USA)

Espectrofotómetro UV-VIS (Lambda

Espectrómetro de masas MALDI-TOF

25 PerkinElmer, Waltham,

(Bruker, Bremen, Alemania)

Massachusetts, USA)

Equipos localizados en Sao Paulo, Brasil

Termomixer (Eppendorf, Hamburgo,

Columna Luna 5µm PFP2 150 x 2

Alemania)

mm, 100A de tamaño de partícula

MicroTOFQ-II (Bruker, Bremen,

(Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Alemania)

HPLC 1200 series (Agilent, Santa,

HPLC (Shimadzu, Kioto, Japón)

Clara, CA, USA)

Columna C18 250mm x 4.6mm y 5µm de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	Microscopio (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania)
QTRAP 4000 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)	Crióstato (Leica, Wetzlar, Alemania) Image-Prep (Bruker, Bremen, Alemania)

METODOLOGIA

Cultivo microbiano y conservación

TSA (Agar soya tripticaseína): Peptona de caseína 15g/L, peptona de soya 5g/L, cloruro de sodio 5g/L y agar bacteriológico 15g/L.

Medio M9: Na₂HPO₄ 6g/L, KH₂PO₄ 3g/L, NaCl 5g/L, NH₄Cl 3g/L, glucosa 30g/L, MgSO₄*7H₂O 0.5g/L.

Producción de células microbianas como fuente de inóculo para las plantas

Las bacterias utilizadas para los grupos 3, 5, 7, 9, 11 y 13 fueron inoculadas en medio de cultivo mínimo definido M9.

La fuente de nitrógeno vario de acuerdo con la cepa utilizada, por ejemplo, se utilizó NH₄Cl (para *E. coli* y *E. cloacae*) y NH₄NO₃ (para *K. variicola*), esto debido a que para *Klebsiella variicola* el NH₄Cl no es considerada como una fuente asimilable de nitrógeno ya que en los ensayos previos no se aumentó el número de células (biomasa) después de 18 horas de incubación. Las células de *K. variicola* se incubaron durante 18 horas a 37°C en agitación, para después centrifugarlas a 6000 rpm a 4°C por 15 min donde se descartó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con una solución de glucosa al 0.05% estéril agitando con

ayuda de un vórtex por 30 segundos. Después se centrifugó a 6000 rpm a 4°C por 15 min descartando el sobrenadante en cada lavado.

Las bacterias fueron ajustadas a una $OD_{600nm}=1$ utilizando un espectrofotómetro UV-Vis y que fueron equivalentes en UFC/ml para *E. coli* 2.47×10^5 , *E. cloacae* 1.84×10^5 y *K. variicola* 1×10^5 . Estos números de UFC se calcularon al desarrollar el método de dilución seriada y cultivo en placas de agar cuenta estándar.

Cultivos de plantas

Un total de 8 plantas micropropagadas de banano con un peso promedio de 1.5g a 2g y con un promedio de hojas entre 3 y 5 hojas. Se creó un microcosmos de que contenía 4 plantas por frasco, soportadas por 100g de arena de playa tratada con agua corriente para eliminar materia orgánica y otras contaminaciones, además de esterilizarse por 3 horas a 121°C y 15 lb de presión. Las plantas mantuvieron una humedad aproximada del 60% en el sustrato. Las plantas fueron dejadas por un periodo de 7 días para su adaptación.

Condiciones de incubación de las plantas

Para determinar el efecto inducido por las bacterias sobre el crecimiento de las plantas, éstas fueron mantenidas por 60 días en una cámara bioclimática a 30°C, 50% de humedad, 1000 luxes con 14 horas luz y 10 en oscuridad.

Caracterización morfológica de las bacterias endófitas por microscopia electrónica de barrido.

Las cepas de *Enterobacter cloacae* (C2), *Klebsiella variicola* (RU1E) y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron cultivadas en 50 ml de caldo casoy en un matraz de 250ml, durante 18 horas a 37°C, sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la biomasa fue lavada mediante la adición de agua destilada y

posteriormente una centrifugación por 15 minutos a 6000rpm y 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet formado fue lavado tres veces con agua destilada estéril. A cada pellet se le adicionó 25ml de agua estéril para hacer una suspensión celular. Un mL de la suspensión fue colocado en un tubo Eppendorf de 2ml y se centrifugó a 12000 rpm por 2 min. Nuevamente el sobrenadante fue descartado y se adicionó una solución al 2.5% de glutaraldehído para fijar la muestra. Las muestras fueron enviadas a la Universidade de Federal de Sao Paulo (UNIFESP) ubicado en el edificio de ciencias biomédicas, campus Sao Paulo, en Sao Paulo, Brasil para su procesamiento y su análisis en el microscopio electrónico de barrido por emisión de campo FEI Quanta 250. El pellet de la bacteria fue despegado con cuidado y las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% por 1 hora seguido de 4 lavados con buffer de cacodilato 0.1M pH 7.2 por 1 hora cada uno. Las muestras fueron colocadas cuidadosamente en 1% de tetra óxido de osmio en 0.1M de buffer de cacodilato por 1 hora, posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer de cacodilato como se mencionó anteriormente y se trataron con ácido tánico al 1% por 30 minutos, realizando dos lavados con agua desionizada. Después se realizó una segunda impregnación con tetra óxido de osmio 1% por 30 minutos y se lavó 3 veces con agua desionizada, las muestras fueron deshidratadas en una serie de concentraciones crecientes de etanol (10% cada paso) por 10 min cada uno. Después del secado, a las muestras se les colocó un recubrimiento delgado (10nm) de oro y se guardaron deshidratadas hasta ser analizadas en el microscopio electrónico de barrido FEI Quanta FEG 250 usando 5KV.

Promoción de crecimiento de las plantas por inoculación de bacterias vivas e inactivadas por el calor.

Un total de 8 plantas micropropagadas de banano fueron agrupadas de acuerdo a cada tratamiento como se describe en el cuadro 4. Las aplicaciones de las suspensiones bacterianas fueron realizadas cada 7 días hasta cumplir 60 días. Las plantas al momento del análisis fueron removidas cuidando de no dañar las raíces. Las plantas fueron registradas midiendo peso, tamaño y número de hojas. Para efectos de seguimiento cada 15 días se registró el desarrollo.

Tabla 4. Descripción de los diferentes grupos formados y el tratamiento que fue aplicado a cada uno de ellos.

Grupo	Tratamiento	Descripción/condiciones del tratamiento
1	Agua destilada	Las plantas fueron sembradas/colocadas en un microcosmos sin nutrientes irrigados con 5 ml de agua estéril por cada planta 1 vez cada semana (7 días) durante 60 días.
2	Medio Mineral (MMN)	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una solución mineral estéril que contiene (NH ₄ Cl 0.5g/L, CaCl ₂ 0.05g/L, NaCl 0.025g/L, KH ₂ PO ₄ 0.05g/L, MgSO ₄ *7H ₂ O 0.15g/L, FeCl ₃ *6H ₂ O 1mg/L, glucosa monohidratada 5g/L y 10ml de elementos traza [KCl 3.728g/L, H ₃ BO ₃ 1.546g/L,

		MnSO ₄ *H ₂ O 0.05g/L, CuSO ₄ 0.0125g/L y (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O 0.05g/L).
3	<i>Escherichia coli</i> viva 14N.	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>E. coli</i> , utilizando como fuente de nitrógeno NH₄Cl .
4	<i>Escherichia coli</i> muerta 14N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>E. coli</i> , utilizando como fuente de nitrógeno NH₄Cl inactivando las células por calor (120°C y 15lb de presión por 20 min).
5	<i>Enterobacter cloacae</i> viva 14N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>E. cloacae</i> utilizando como fuente de nitrógeno NH₄Cl .
6	<i>Enterobacter cloacae</i> muerta 14N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>E. cloacae</i> , utilizando como fuente de nitrógeno NH₄Cl inactivando las células por calor (120°C y 15lb de presión por 20 min).
7	<i>Klebsiella</i>	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7

14N	<i>variicola</i> viva	días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>K. variicola</i> , utilizando como fuente de nitrógeno NH₄NO₃ .
8	<i>Klebsiella variicola</i> muerta 14N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>K. variicola</i> , utilizando como fuente de nitrógeno NH₄NO₃ inactivando las células por calor (120°C y 15lb de presión por 20 min).

Evaluación de la incorporación de ¹⁵N en la estructura celular por análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF en proteínas ribosomales bacterianas

El análisis de marcaje isotópico en proteínas bacterianas se realizó para verificar que las bacterias estén incorporando el nitrógeno en sus proteínas y poder asegurarnos de que el ensayo de transferencia de nitrógeno sea realizado correctamente.

Las cepas de *E. coli*, *E. cloacae* y *K. variicola* fueron inoculadas en agar soya tripticaseína y fueron incubadas por 24 horas a 37°C, posteriormente dichas bacterias fueron inoculadas en medio M9 a una DO_{600nm} = 0.2 utilizando fuentes de nitrógeno como NH₄Cl (Sigma Aldrich), NH₄NO₃, ¹⁵NH₄Cl y ¹⁵NH₄NO₃, posteriormente se incubaron a 37°C durante 18 horas en agitación en un agitador en orbital a 150rpm. Para eliminar residuos metabólicos y medio de cultivo, las bacterias fueron centrifugadas a 12000 rpm por 2 min descartando el

sobrenadante. Al pellet celular formado se le agregaron 300µl de agua MilliQ y se mezclaron por vórtex por algunos segundos. Después se agregaron 900µl de etanol grado HPLC y se mezcló en vórtex. Los tubos fueron centrifugados a 12000 RPM por 2 min, este paso se repitió al menos 2 veces, con descarte del sobrenadante cada vez.

El botón celular formado se dejó secar a temperatura ambiente por cerca de 15 min. Posteriormente se le agregaron de 1 a 80µl de ácido fórmico al 70%, dependiendo del tamaño de pellet formado, se mezcló utilizando un vórtex y se agregó la misma cantidad, pero ahora de acetonitrilo. Se volvió a mezclar con vórtex y posteriormente se centrifugó a 12000 RPM por 2 min. Tomamos 1µl de sobrenadante y se colocó en un MALDI TARGET PLATE hasta secarse a temperatura ambiente, después se agregó 1µl de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) sobre la muestra y se dejó secar a temperatura ambiente. Se realizó el análisis de masas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex (Bruker), con un método LP 5-20 kDa, con un poder de láser de 30%, disparando 1000 veces hasta acumular 10,000 disparos, con un voltaje de ionización de 19Kv (Figura 10).

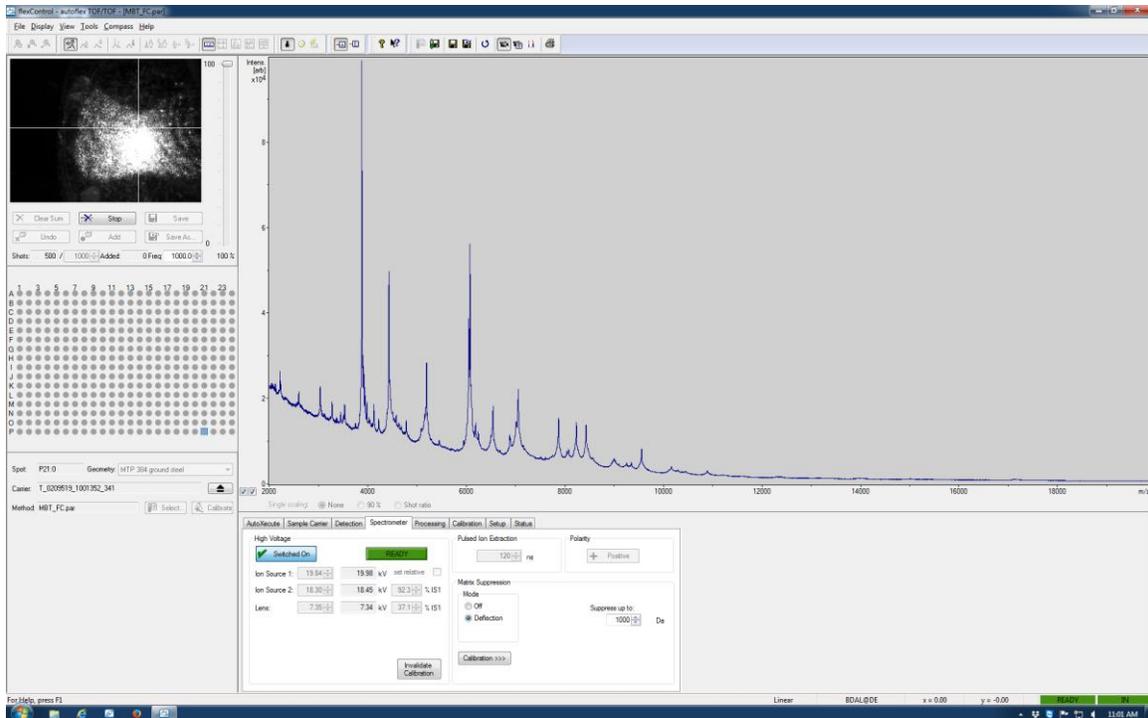


Figura 10. Obtención de un espectro de masas para la determinación del marcaje con ^{15}N de las proteínas bacterianas.

Determinación de transferencia de nitrógeno mediante el análisis de feofitina marcada

Para determinar la transferencia de nitrógeno de bacteria a planta se realizó la extracción de la feofitina para analizar el marcaje del isótopo ^{15}N en alguno de sus 4 átomos de nitrógeno. La feofitina se deriva de la clorofila porque no es posible hacer el análisis directo debido a la inestabilidad de la molécula.

Se dispusieron lotes con 8 plantas de banano micropropagado, éstas fueron colocadas en arena de playa estéril y, se dejaron aclimatar por una semana. Los microcosmos se regaron con 5ml de agua estéril cada 2 días. Posteriormente cada lote fue separado en 14 tratamientos como se describe en las tablas 4 y 5. Las

plantas fueron inoculadas con bacterias 1 vez cada 7 días durante un periodo de 60 días. Una vez transcurrido el tiempo de prueba, las plantas fueron separadas en raíz, tallo y hoja y fueron maceradas con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. El polvo de planta fue colocado en un tubo eppendorf y se liofilizó a -50°C con un vacío de 1mBar.

Tabla 5. Descripción de los diferentes tratamientos con ^{15}N utilizados en los lotes de plantas para evaluar la transferencia de nitrógeno.

Grupo	Tratamiento	Descripción/condiciones del tratamiento
1	<i>Escherichia coli</i> viva ^{15}N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ de <i>E. coli</i> , utilizando como fuente de nitrógeno $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.
2	<i>Escherichia coli</i> muerta ^{15}N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ de <i>E. coli</i> , utilizando como fuente de nitrógeno $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ inactivando las células por calor (120°C y 15lb de presión por 20 min).
3	<i>Enterobacter cloacae</i> viva ^{15}N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ de <i>E. cloacae</i> , utilizando como fuente de nitrógeno $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.

4	<i>Enterobacter cloacae</i> muerta ¹⁵ N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>E. cloacae</i> , utilizando como fuente de nitrógeno ¹⁵ NH ₄ Cl inactivando las células por calor (120°C y 15lb de presión por 20 min).
5	<i>Klebsiella variicola</i> viva ¹⁵ N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>K. variicola</i> , utilizando como fuente de nitrógeno ¹⁵ NH ₄ NO ₃ .
6	<i>Klebsiella variicola</i> muerta ¹⁵ N	Las plantas fueron irrigadas cada semana (7 días) durante 60 días con 5ml de una suspensión bacteriana DO600nm = 1 de <i>K. variicola</i> , utilizando como fuente de nitrógeno ¹⁵ NH ₄ NO ₃ inactivando las células por calor (120°C y 15lb de presión por 20 min).

Se tomó entre 30 y 50mg de macerados liofilizados de hojas de banano previamente inoculadas con bacterias tratadas con ¹⁴N y ¹⁵N. Después se les agregó 0.75ml de una solución de acetona:agua (85:15) y se agitaron con vórtex por 5 min. Después se añaden 0.75ml de éter y se agitó con vórtex por 5min. Los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm por 5min para coleccionar el sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf de 2ml dejando que el éter se evaporara, mientras

se hicieron 2 extracciones más a los tejidos liofilizados de plantas con éter colectando cada vez el sobrenadante. Se dejó evaporar el éter hasta alcanzar aproximadamente 0.5ml. A continuación, se adicionaron 0.5ml de HCl 6M, se agitó por 30 segundos y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. En este proceso la muestra se separa en dos fases. Se agrega a la fase etílica 0.5ml de agua, se mezcló por 30 segundos y se centrifugó nuevamente. Este paso se realizó dos veces más para eliminar la mayor cantidad de ácido en el extracto. Las muestras fueron secadas y se prepararon para su análisis de HPLC-MS/MS agregando metanol hasta obtener una concentración final de 1 mg/ml. Las muestras fueron analizadas usando un espectrómetro de masas MicroTOFQ-II (Bruker) acoplado a un sistema HPLC (Shimadzu), utilizando una columna Phenomenex Luna 5µm (PFP2 150 x 2 mm, 100Å de tamaño de partícula), con un flujo de 200µl/min usando como fase móvil acetonitrilo: H₂O (0.1% ácido fórmico) con el siguiente gradiente: 0 – 5 min 60% acetonitrilo; 5 – 30 min 60 a 100% de acetonitrilo. La columna se mantuvo a 40°C durante la corrida, leyendo el efluente a 400 y 600 nm. El espectrómetro de masas se mantuvo en electrospray en modo positivo, con nebulización y gas de secado a 4 Bar y 8 L/min respectivamente. El voltaje capilar fue puesto a 4500V con una temperatura de secado de 200°C. La celda de colisión y la energía del cuadrupolo de 20 eV y 10 eV respectivamente.

Influencia de las nanopartículas en la colonización bacteriana.

a) evaluación de la colonización de la cepa endófito: *E. cloacae*

Las plantas micropropagadas de banano fueron inoculadas con una suspensión bacteriana $DO_{600nm} = 1$ de *E. cloacae*. La bacteria fue incubada durante 24, 48, 72

y 144 horas post inoculación las plantas fueron puestas en 5ml de una solución de DAB (diamino bencidina, 0.7mg/ml) por máximo de 24 horas. Posteriormente la planta fue enjuagada con agua corriente y se tomaron muestras de la raíz de las plantas por los diferentes tiempos. Las muestras fueron teñidas con azul de anilina al 1% durante 15 min. Después las raíces se enjuagaron con agua destilada y fueron observadas en un microscopio de campo claro, para evaluar la formación de peróxido y la posible colonización de las raíces por la bacteria.

Inducción de la colonización usando nanopartículas (NPS) de Au y Ag

a) Adaptación

Plantas de banano fueron inoculadas con 5 ml de una solución de nanopartículas de Au y Ag en una concentración de 0.5ppmy 1ppm. Las plantas se incubaron (50% humedad, 1000 luxes, 14 horas luz y 10 oscuridad) durante 5 días para observar cualquier toxicidad ocasionada por las NPS sobre la apariencia de las plantas. Después de 5 días, las plantas fueron inoculadas con una suspensión bacteriana $DO_{600nm} = 1$ de *E. cloacae* equivalente a 1.84×10^5 UFC/ml. Después de 24, 48, 72, 144 horas y 15 días post inoculación las plantas fueron tomadas del microcosmos e incubadas en 5ml de una solución de DAB (diamino bencidina, 0.7mg/ml) por un tiempo máximo de 24 horas. Consecutivamente, la planta fue enjuagada con agua corriente y se tomaron las raíces de las plantas a los diferentes tiempos seleccionados., Las raíces se tiñeron con azul de anilina al 1% durante 15 min. Después de este tiempo, las raíces se enjuagaron con agua destilada y fueron observadas en un microscopio de campo claro, para observar la formación de peróxido en función del desarrollo de una coloración café, que indica

la precipitación de la diaminobencidina oxidada. Así también se determinó la presencia de formas bacterias.

Recuperación del endófito de las raíces colonizadas y cuenta de bacterias epífitas y de suelo.

Las plantas tratadas con nanopartículas de Au y Ag en una concentración de 0.5ppm. Plantas se incubaron por 5 días y posteriormente se inocularon con *E. cloacae* por 24 y 48 horas. Las plantas se seccionaron en la raíz, tallo y hoja, para recuperar los endófitos, las plantas fueron lavadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% por 15 min, más un lavado de etanol al 85% por 10min y tres lavados con agua destilada estéril por 1min cada uno. Cortes de secciones del tejido fueron macerados con 5ml de solución salina isotónica (0.9%) y la suspensión resultante fue inoculada con el método de dilución en placa en agar cuenta estándar, las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. También se determinó la presencia de microorganismos adheridos a las raíces, por lo que se enjuagaron las raíces en un recipiente estéril y se tomó una muestra del lavado para ser inoculado con el método de dilución en placa en agar cuenta estándar. Para cuantificar los microorganismos presentes en la arena, se tomó 100mg de muestra y se diluyó en 900µl de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente en un vórtex por algunos minutos de forma intermitente y se tomó 100 microlitros que fueron inoculados con el método de dilución en placa en agar cuenta estándar. Las colonias que se formaron en las placas posterior a la incubación y que estuvieron perfectamente separadas y con aparente morfología colonial diferente

fueron colectadas para ser identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF y determinar la presencia de *E. cloacae* en las bacterias recuperadas.

Análisis de metabolitos por MALDI-IMAGING producidos durante la interacción planta-*E. cloacae*.

Plantas micropropagadas de banano fueron inoculadas con 5 ml de una solución de NPS de Au y Ag al 5% (v/v). Se tomaron muestras de raíz de dichas plantas a las 24 y 48 horas para analizarlas tal como se realizó en los ensayos pasados. Las raíces fueron lavadas para eliminar la mayor cantidad de arena posible, posteriormente se colocan en bloque hecho de en una solución de agarosa al 1% y se dejan congelar a -40°C. Una vez congeladas la raíces, se hacen cortes de 20µm de con los diferentes tratamientos y una muestra tratada sola con agua como control. Los cortes se colocan en un portaobjetos con un recubrimiento de TiO para ser usados en MALDI-IMAGING y se marcan con 3 puntos para una posterior localización. Los cortes fueron recubiertos con matriz (HCCA) con ayuda del IMAGE-PREP como se muestra en la figura 11. Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker, Bremen, Alemania) utilizando un poder de láser del 50%, un número de disparos de 1000, un voltaje de ionización de 19.14Kv, utilizando un método RP IMAGING 200-1500 Da, ampliando el rango de 0 a 1500Da.

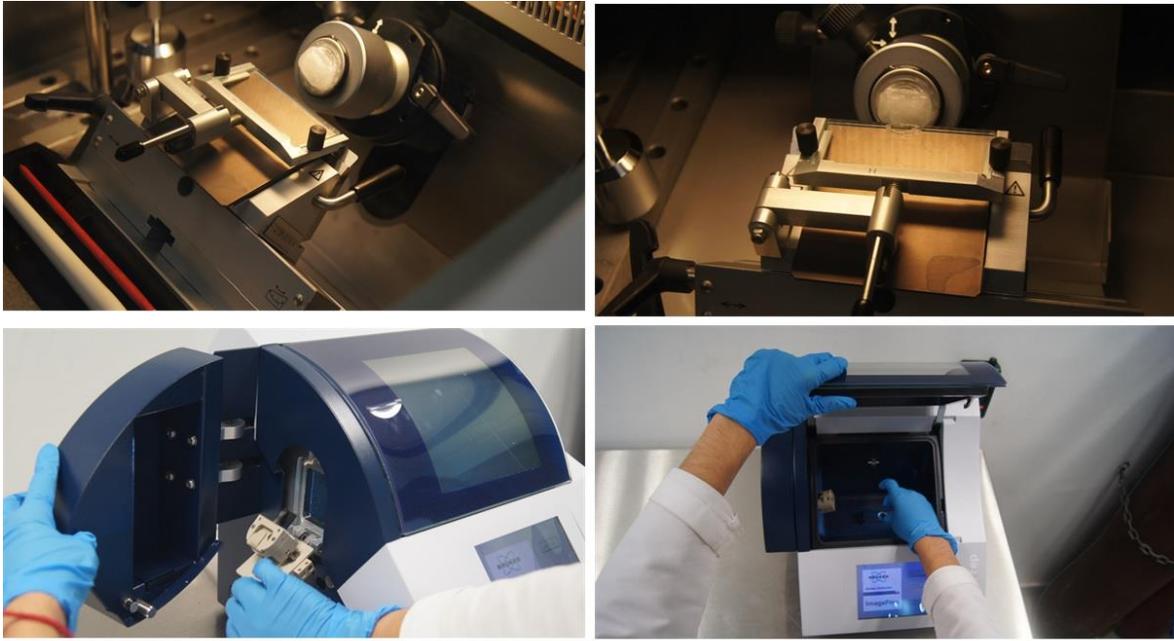


Figura 11. Procedimiento para la obtención y preparación de la muestra de las raíces de plantas de banano para su procesamiento en MALDI-IMAGING.

RESULTADOS

Con la finalidad de caracterizar la morfología celular de las bacterias endófitas y determinar algunas otras características que nos sirvan para entender la interacción con las raíces por medio de su estructura celular, se hizo un análisis de microscopía electrónica de barrido. La figura 12A-12C, muestra que *E. cloacae* tiene una morfología de bacilo corto con células de un tamaño de 0.6-1.0 μm de ancho por 1.2-3.0 μm de largo. Las células forman clusters (12A) y tienen pocos flagelos laterales, una gran cantidad de pilis, algunos de ellos pilis sexuales por su longitud y otros más cortos (12A y 12B). También se observa material mucoide, posiblemente algún tipo de exopolisacárido rodeando la célula individualmente y que mantiene en contacto a otras células. En las figuras 12B y 12C, se observan ampollas sobre la superficie que sugieren ser vesículas de membrana externa, que se encuentran en una gran cantidad en algunas de las células y en formación en otras.

Klebsiella variicola, es un bacilo con un tamaño de 0.3-1.0 μm de ancho y de 0.6-6.0 μm de longitud. También muestra múltiples flagelos laterales y pilis. Se observa un material compacto extracelular y no se observan vesículas aparentemente. Las bacterias fueron analizadas a las 18 horas de incubación, que es el tiempo establecido para la inoculación.

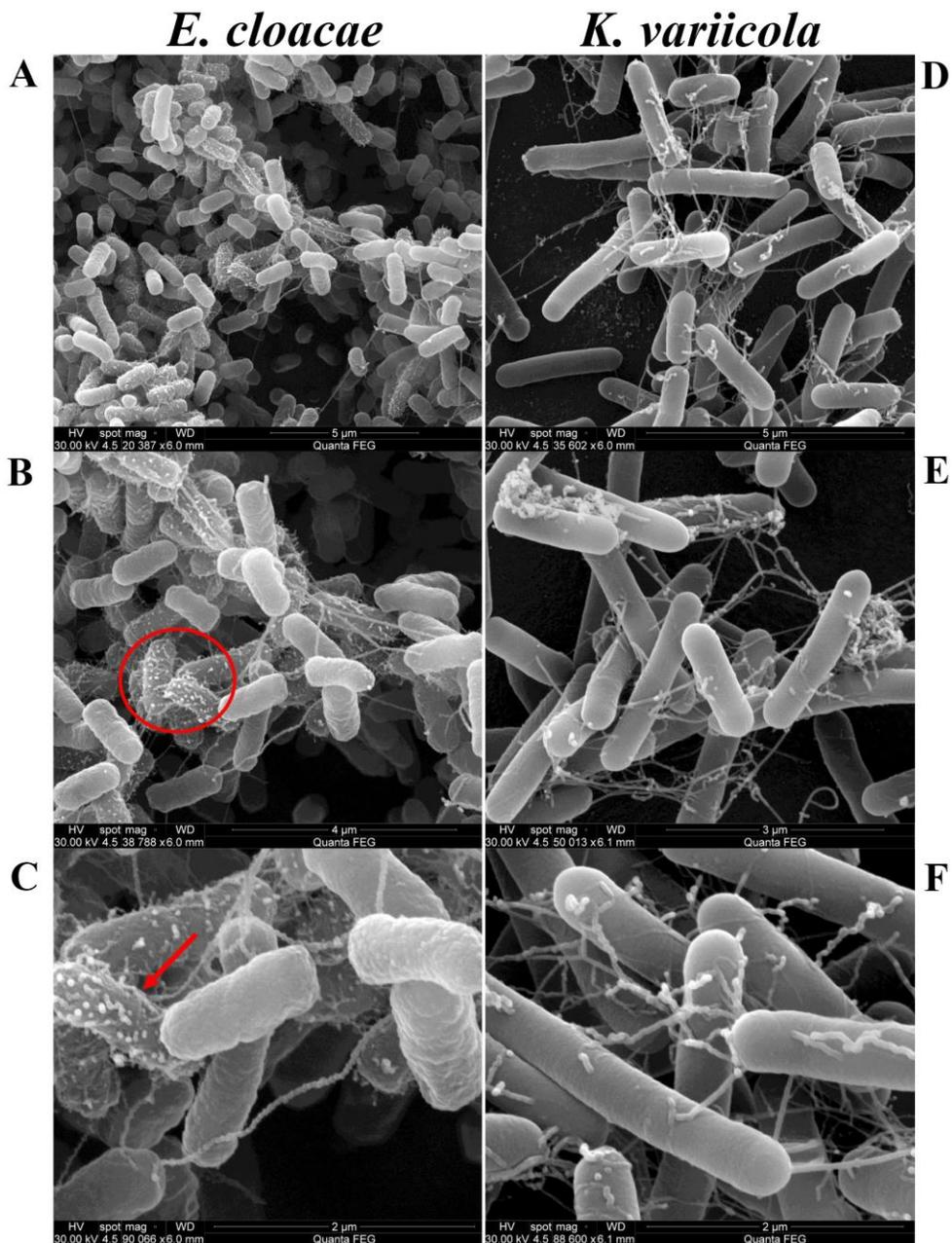


Figura 12. Formación de vesículas de membrana externa (OMV's) en *E. cloacae*. Análisis SEM de las bacterias *E. cloacae* (panel A-C) y *K. variicola* (panel D-F). El panel C muestra una amplificación de las vesículas y material extracelular en *E. cloacae*. *K. variicola* presenta células más grandes con múltiples flagelos laterales.

Acumulación de biomasa en plantas micropropagadas de banano

Después de 2 meses de inoculaciones semanales, se determinó la acumulación de biomasa y la formación de hojas nuevas en las plantas de banano. La figura 13, muestra que tratamiento que presenta mayor aumento de biomasa fue en el que se inoculo *E. cloacae* viva. El aumento fue de hasta $2.0916\text{g} \pm 0.70\text{g}$. El tratamiento con *E. cloacae* muerta aumentó $1.1\text{g} + 0.5\text{g}$ del peso inicial las plantas. Por otro lado, el tratamiento con *K. variicola* viva logra aumentar hasta un $1.583\text{g} \pm 0.8\text{g}$ y el tratamiento con bacterias muertas aumentan en un $1.8166\text{g} \pm 0.7\text{g}$ del peso inicial. De acuerdo al análisis estadístico realizado no se muestra una diferencia significativa entre los tratamientos de bacterias vivas y muertas (figuras 13 y 14). El tratamiento con *E. coli* usando sus células vivas lograron aumentar $1.5833\text{g} \pm 0.9\text{g}$, mientras que el tratamiento con bacterias muertas aumenta en un $1.9583\text{g} \pm 0.4\text{g}$ del peso inicial. Al comparar los tratamientos con *K. variicola* y *E. coli* no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos, además de que al parecer los tratamientos con bacterias muertas logran aumentar un poco más el peso de las plantas, especialmente en *E.coli*. Se utilizaron como tratamientos control la aplicación de agua y una solución mineral nutritiva. Bajo estos tratamientos, las plantas disminuyen su biomasa y en el tratamiento con se observa clorosis y una muerte total de la planta después de 15 días de haber iniciado el ensayo. La biomasa con el tratamiento con solución mineral nutritiva disminuye un $0.55\text{g} \pm 0.63\text{g}$. Esto indica que los tratamientos con bacterias influyen positivamente en desarrollo, soportando el crecimiento y aumentan la biomasa de la planta al encontrarse en un sistema pobre de

nutrientes. Los tratamientos con solución mineral y agua, al estar en condiciones estériles aparentemente deberían utilizar las bacterias endófitas que la planta transporta. Por lo tanto, las bacterias aplicadas en el sustrato funcionan como nutriente para las plantas.

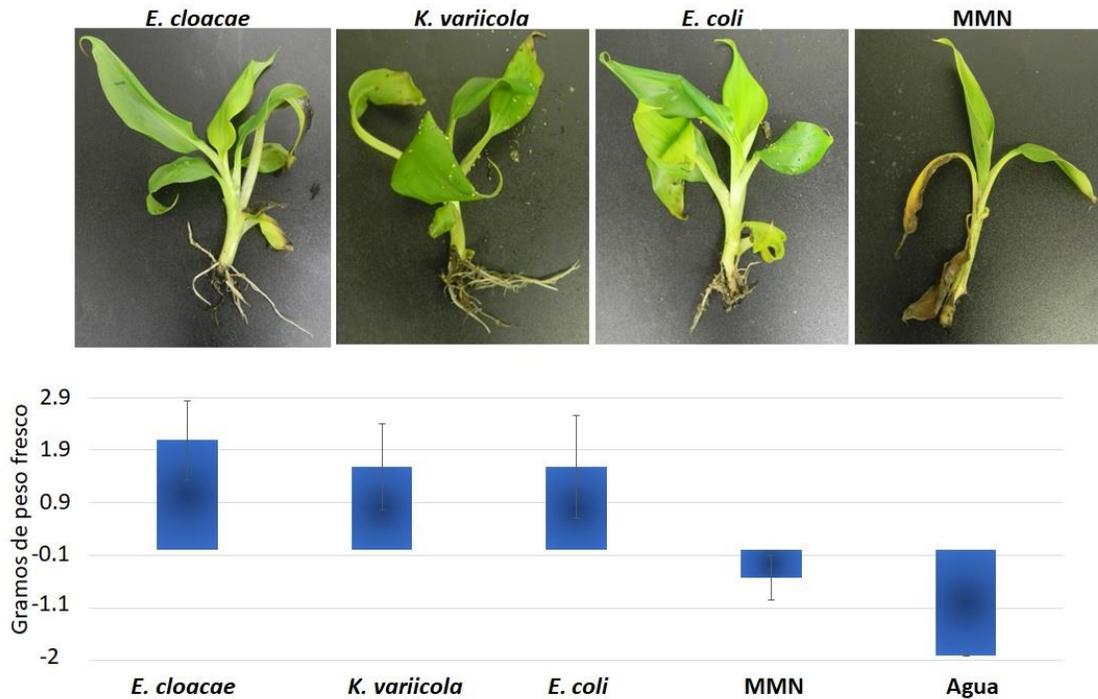


Figura 13. Acumulación de biomasa por efecto de aplicación de bacterias endófitas vivas. La aplicación de *E. cloacae* aumenta la biomasa de las plantas en comparación con los otros tratamientos biológicos. Se observa un decremento de la biomasa La aplicación de nutrientes minerales y agua.

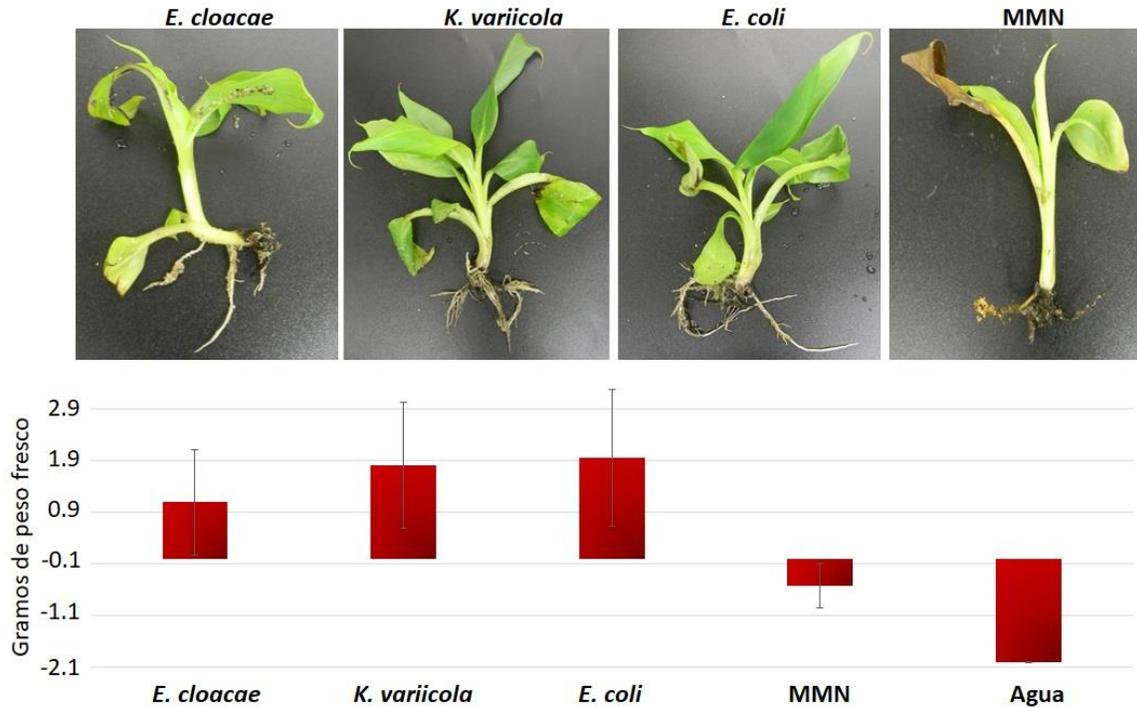


Figura 14. Efecto en la acumulación de biomasa vegetal por tratamientos con bacterias muertas. Se presenta que los tratamientos con *K. variicola* y *E. coli*, aumentaron la biomasa. El análisis estadístico de ambos tratamientos indica que no hay una diferencia significativa (n=8 plantas).

Incorporación de nitrógeno en proteínas bacterianas

Un objetivo importante que evaluar en este proyecto fue la transferencia de nitrógeno como un factor que indica que las bacterias son utilizadas como fuente de nutriente orgánico bajo las condiciones experimentales probadas. Por lo tanto, se debe verificar la incorporación del material nitrogenado en los componentes celulares.

La figura 15 muestra espectros de masas obtenidos de verificación de incorporación de nitrógeno en las proteínas bacterianas. En el panel a) se muestran los espectros de *E. cloacae*, en rojo se presenta el tratamiento con ^{14}N y en azul el tratamiento con ^{15}N . El perfil proteico es similar en ambos espectros con la diferencia que en el espectro obtenido del tratamiento con ^{15}N se encuentra ligeramente desplazado hacia la izquierda, lo cual indica la incorporación de ^{15}N en las proteínas bacterianas. En el panel b) se observan los espectros de *E. coli* que también presentan un desplazamiento indicativo de la incorporación de ^{15}N en las proteínas bacterianas. Por otro lado, en el panel c) se observan los espectros de *K. variicola*, en estos no pudimos detectar algún desplazamiento por lo que se pueden concluir dos cosas: la bacteria es incapaz de asimilar esa fuente de nitrógeno por lo cual no incorpora el ^{15}N en sus proteínas y se necesitan otros estudios en los que se deba cuantificar el material isotópico en las células de *K. variicola*.

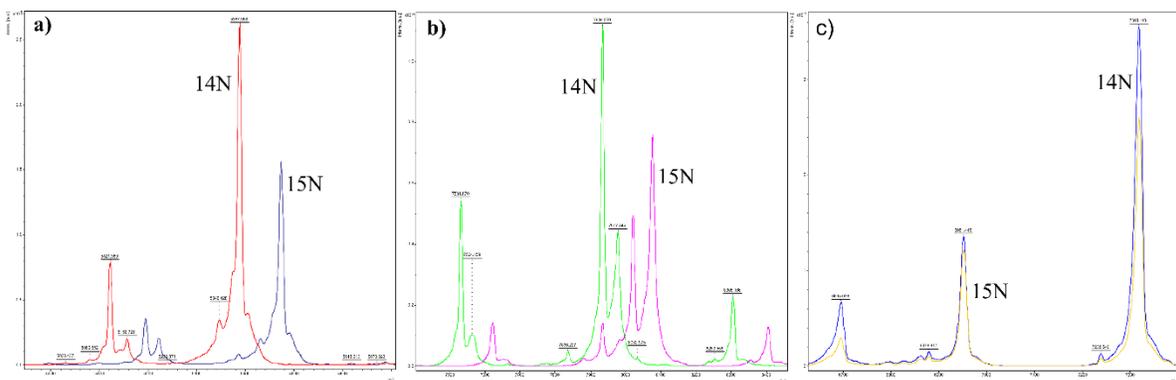


Figura 15. Espectros de masas MALDI-TOF obtenidos de proteínas bacterianas enriquecidas con fuente de nitrógeno ^{14}N y ^{15}N . Donde se observa la incorporación de ^{15}N en proteínas bacterianas de *E. cloacae* y *E. coli* (panel a y b

respectivamente), mientras que para los espectros correspondientes de *K. variicola* (panel c) no se observa dicha incorporación.

Determinación de feofitina marcada en hojas de banano

El análisis de feofitina muestra que el tratamiento con ^{14}N para las tres cepas bacterianas cuentan con los valores teóricos de la fórmula de la feofitina ($\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_5$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 871.573$) mostrando picos a los 871.577 m/z , 871.575 m/z y 871.575 m/z para *E. cloacae*, *E. coli* and *K. variicola* respectivamente. La inoculación de plantas con las tres cepas bacterianas tratadas con ^{15}N , muestran la incorporación de nitrógeno en los isotopómeros de la feofitina. La abundancia relativa de los isotopómeros m/z 872.577, 873.576, 874.575, 875.575, 876.575 incrementan un 0.07, 108.29, 313.78, 609.92 y 357.13% respectivamente ($p < 0.2281$; $p < 0.2818$; $p < 0.2821$; $p < 0.0873$, $p < 0.0326$ y 0.0224 respectivamente para m/z 871.577, 872.580, 873.582, 874.585, 875.588 y 876.593 comparando ^{14}N y ^{15}N) para *E. cloacae*; 872.577, 873.577, 874.577, 875.577, 876.577 incrementan un 6.40, 101.75, 258.05, 426.29 y 535.71% respectivamente ($p < 0.4065$; $p < 0.6736$; $p < 0.2257$; $p < 0.0738$; $p < 0.0072$ y $p < 0.0208$ respectivamente para m/z 871.575, 872.579, 873.582, 874.586, 875.589 y 876.631) para *E. coli*; 872.576, 873.576, 874.575, 875.575, 876.575 incrementan un 2.37, 109.30, 287.66, 541.17 y 640.88% respectivamente ($p < 0.0858$; $p < 0.0643$; $p < 0.1871$; $p < 0.0582$; $p < 0.0400$ y $p < 0.0213$ para 871.576, 872.579, 873.581, 874.585, 875.590 y 876.594) para *K. variicola*, como se muestra en la figura 16. Para los tratamientos con *E. coli* y *K. variicola* el isotopómero con mayor abundancia es el de 876.5 m/z , indicativo de que el marcaje con ^{15}N ocurrió en los cuatro nitrógenos

del anillo tetrapirrol de la feofitina. Sin embargo, para el tratamiento con *E. cloacae* el isotopómero con mayor abundancia fue el correspondiente a 875.575 *m/z*, indicando que la incorporación de ¹⁵N ocurrió solo en 3 de los 4 nitrógenos del anillo tetrapirrol de la feofitina. A pesar de que el análisis de incorporación de nitrógeno en proteínas bacterianas muestra que aparentemente *K. variicola* no incorpora nitrógeno, el análisis de feofitina mostró que esta bacteria si incorpora el nitrógeno y además lo transfiere a la planta logrando marcar los cuatro nitrógenos de la feofitina, esto indica que el método utilizado para medir la incorporación de nitrógeno en bacterias no es el adecuado y se requiere de un método más sensible para realizar dicho análisis.

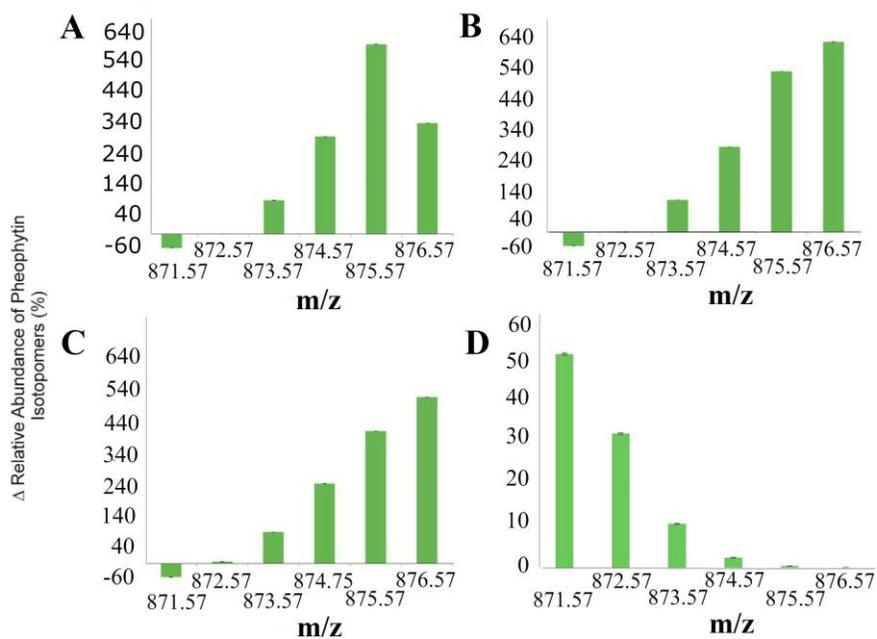


Figura 16. Valores \pm error estándar de la comparación de bacterias tratadas con ¹⁴N y marcadas con ¹⁵N. a) Tratamiento con *E. cloacae*, b) tratamiento con *K. variicola*, c) tratamiento con *E. coli*, d) promedio de los tratamientos con ¹⁴N.

Colonización de *E. cloacae*

Las muestras fueron tomadas a las 24, 48, 72, 144 y 15 días, donde se observó que inclusive después de los 15 días no hay formación de peróxido en raíces (central y pelos radiculares) e inclusive no se logra visualizar células bacterianas dentro de las mismas. Se hizo un ensayo posterior a los 2 meses de inoculación, en la cual se encontraron células bacterianas en los pelos radiculares, así como formación de peróxido como se observa en la figura 17. Esto indica que *E. cloacae* (endófito de banano) no coloniza la raíz en las primeras horas post inoculación como se esperaba, ya que en estudios previos de laboratorio se utilizó una cepa de *E. cloacae* endófito de agave y se realizó el mismo experimento en plantas de agave, donde se logró visualizar formación de peróxido y colonización desde las 24 horas post inoculación. *E. cloacae* endófito de banano es al parecer una bacteria que tarda en colonizar la planta por un periodo mayor de 15 días, por lo que se busca una manera de acelerar el proceso de colonización se requiere tratar de hacer algún daño mecánico en raíces para lograr el objetivo.

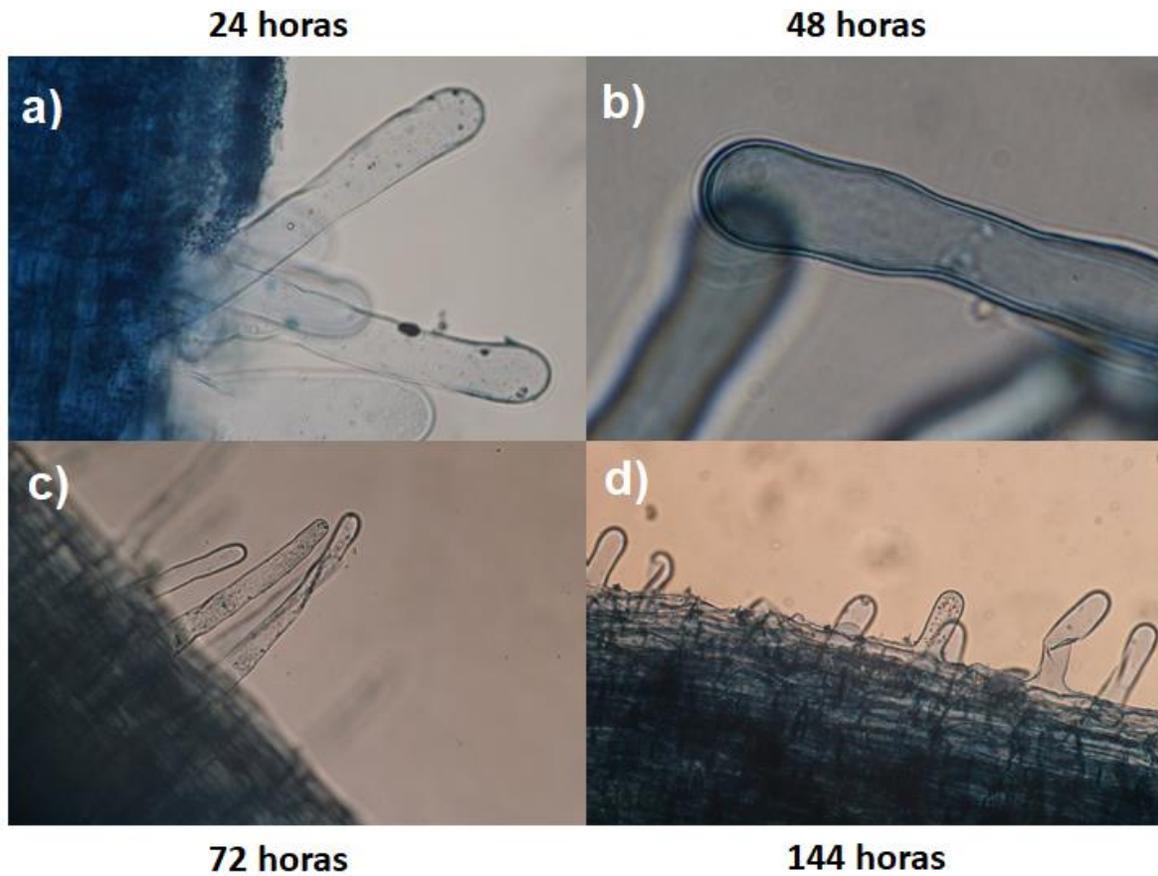


Figura 17. Microfotografías de campo claro de raíces de banano con tinción de DAB y azul de anilina inoculadas con *E. cloacae*. a) Objetivo 40X a las 24 horas PI, b) Objetivo 100X a las 48 horas PI, c) Objetivo 20X a las 72 horas PI y d) objetivo 20X a las 144 horas PI. No se logra observar formación de peróxido en raíces (central y pelos radicales) ni la presencia de células bacterianas dentro del tejido.

Nanopartículas de Au y Ag

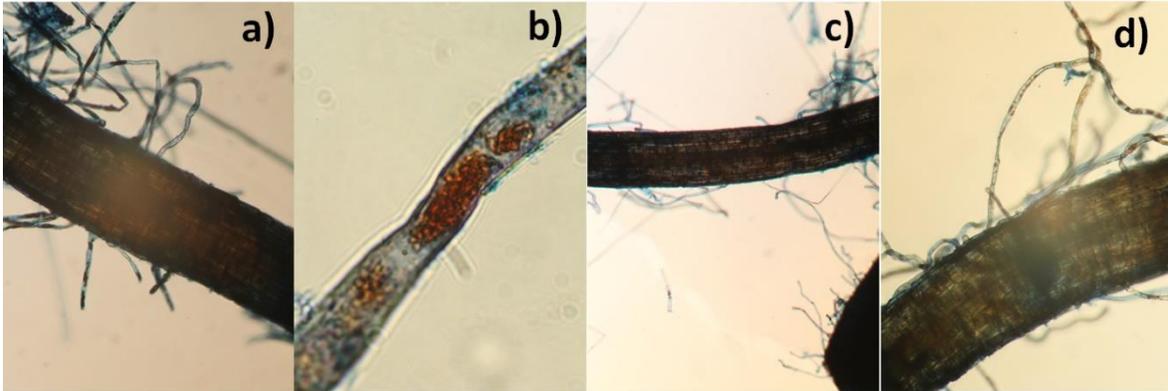


Figura 18. Microfotografías de raíces de banano 5 días post inoculación únicamente con nanopartículas de Au y Ag. a) Au 0.5ppm objetivo 20X, b) Au 1ppm objetivo 100X, c) Ag 0.5ppm objetivo 20X y d) Ag 1ppm objetivo 20X.

En la figura 18 se observan raíces de banano después de 5 días de inocularlas con nanopartículas de Au y Ag. Se observó que, en a, c y en d la formación de peróxido en raíz central, mientras que en b se detecta la formación de peróxido en pelos radiculares, así como también en la raíz tratada en d. Aparentemente las nanopartículas inducen a la formación de peróxido, esto puede ser debido a causa del posible daño mecánico que se esté ocasionando en las raíces.

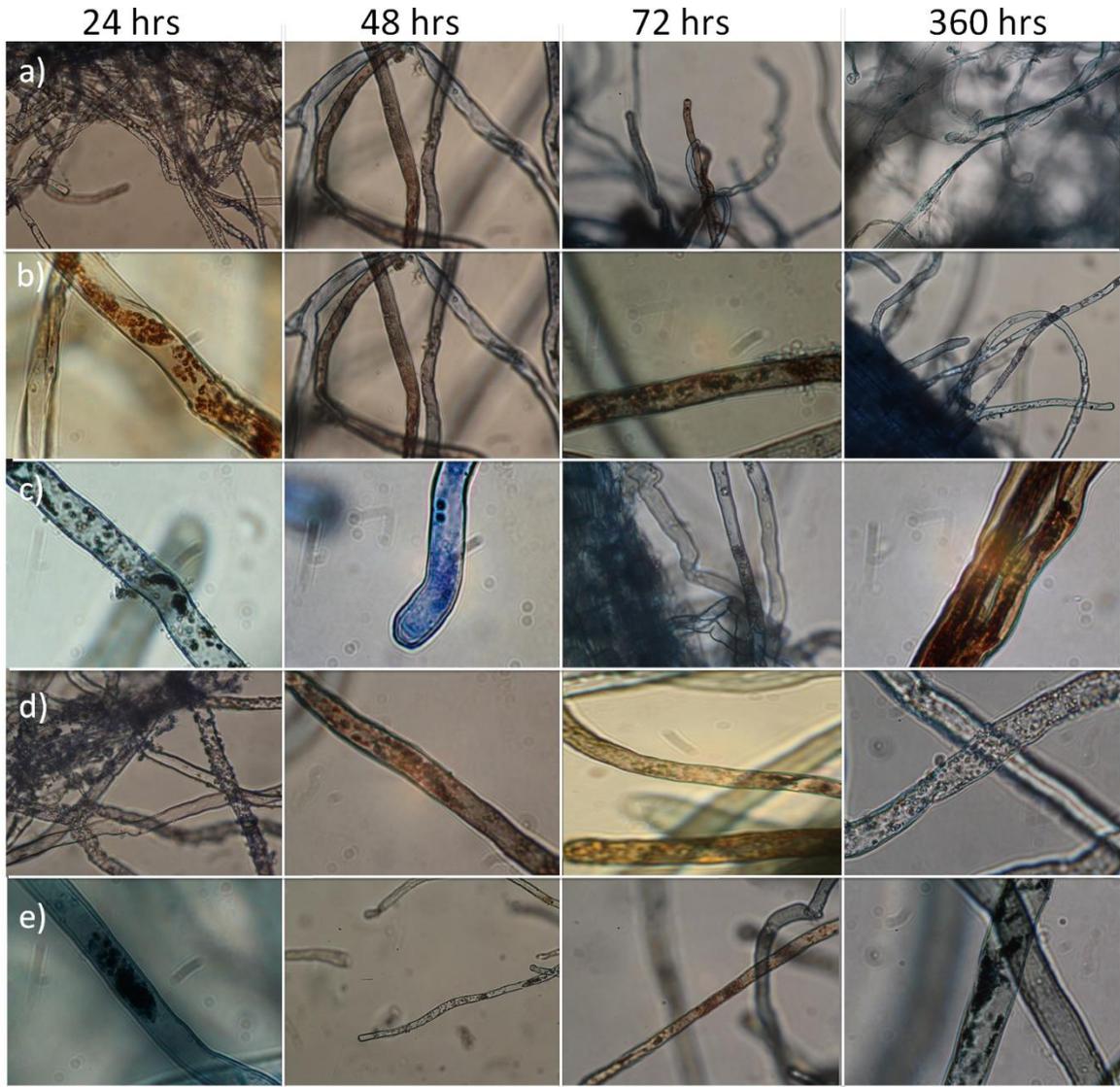


Figura 19. Análisis microscópico de la colonización bacteriana de las raíces de banano bajo los siguientes tratamientos: a) *E. cloacae*, b) NPs Au 0.5ppm + *E. cloacae*, c) NPs Au 1ppm + *E. cloacae*, d) NPs Ag 0.5ppm + *E. cloacae* y e) NPs Ag 1ppm + *E. cloacae*. El tratamiento sin NPs (a) muestra producción de peróxido. Las plantas tratadas previamente con NPs inducen la colonización de células bacterianas desde las 24 horas de inoculación, así como la presencia de H₂O₂.

En la figura 19 se observa en el panel a) que el tratamiento con bacteria muestra que hay poca acumulación de peróxido principalmente en pelos radiculares a las 24, 48 y 72 horas, sin embargo, a las 360 horas no hay presencia de peróxido en raíz. En el panel b) se observa el tratamiento con 0.5ppm de nanopartículas de Au más la suspensión bacteriana, también hay presencia de peróxido en los pelos radiculares a las 24, 48 y 72 horas. En esta condición se encontraron células bacterianas internalizadas en los pelos radiculares, a las 360 horas no se observa presencia de peróxido, pero se aprecia de forma más clara la presencia de células bacterianas internalizadas en la raíz de la planta. En el panel c) el tratamiento con 1ppm de nanopartículas de Au más la suspensión bacteriana, incrementa la internalización de la bacteria desde las 24 horas y la formación de peróxido, que se mantiene hasta las 360 horas post inoculación de la bacteria. Por último, en los paneles d) y e) observamos los tratamientos de nanopartículas de Ag a 0.5ppm y 1ppm respectivamente, en estos observamos la colonización de la bacteria desde las 24 horas, así como una acumulación significativa de peróxido de hidrógeno en los pelos radiculares. Esto apoya que las nanopartículas generan peróxido de hidrógeno en la raíz, aumentando la capacidad de internalización de las bacterias.

Colonización de *E. cloacae*

Después de 24 horas post inoculación de la suspensión bacteriana, se observa un aumento en la cantidad de UFC/g en las raíces tratadas con nanopartículas más *E. cloacae* a comparación del tratamiento donde solo se aplicó la bacteria como se presenta en la tabla 6. En dicho tratamiento no se recuperaron células bacterianas después de incubar las cajas por 24 horas.

Tabla 6. Numero de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) después de 24 horas post-inoculación en plantas tratadas y no tratadas con NPs.

TRATAMIENTO	RAIZ (SUPERFICIE)	SUELO	RAIZ	PSEUDOTALLO	HOJAS
Au 0.5ppm +	1.18×10^7	4.6×10^8	5×10^5	0	20
bacteria					
Au 1ppm +	7.7×10^6	1.22×10^9	4×10^5	0	0
bacteria					
Ag 0.5ppm +	1.02×10^7	1.5×10^8	8×10^5	300	0
bacteria					
Ag 1ppm +	8.3×10^7	1.48×10^8	4×10^5	0	22
bacteria					
Bacteria	1.14×10^9	5.8×10^8	0	0	0

La cantidad de células bacterianas que logran internalizar en los tratamientos con nanopartículas después de 24 horas post-inoculación oscilan entre 4 y 8×10^5 UFC/g, siendo el tratamiento con plata al 0.5ppm el que presenta una mayor cantidad al encontrarse 8×10^5 UFC/g. Al comparar las bacterias que se encuentran en la superficie adheridas y las bacterias de suelo de los diferentes tratamientos dados se encontró una similitud entre el número de bacterias recuperadas de suelo entre los diferentes tratamientos aplicados, mientras que en las bacterias de superficie de raíz se notó que la cantidad de UFC/g en los tratamientos de Au 0.5ppm, Ag 0.5ppm y 1ppm se encuentran en el rango de 10^7

UFC/g. Por otro lado, en el tratamiento con Au 1ppm la cantidad de bacterias epífitas bajan siendo de todos los tratamientos la que presenta menor cantidad de células bacterianas (7.7×10^6 UFC/g) adheridas a la superficie de la raíz. El tratamiento con bacteria sin aplicación previa de nanopartículas es la que presenta mayor número de células bacterias adheridas al tejido de raíz. Otro aspecto interesante de este análisis es que los tratamientos con nanopartículas de Au 0.5ppm y Ag 1ppm, son los únicos que presentan células bacterianas en hoja siendo 20 UFC/g y 22 UFC/g respectivamente. Mientras que el tratamiento con Ag 0.5ppm fue el único tratamiento que presenta células bacterianas en pseudotallo con una cuenta de 300 UFC/ml. Estos resultados nos indican una posible activación de bacterias no cultivables por efecto de las nanopartículas.

Después de 48 horas post-inoculación con *E. cloacae*, se observó un aumento de UFC/g en pseudotallo y hoja de los tratamientos con nanopartículas a comparación de las plantas tratadas únicamente con bacterias como se observa en la tabla 6. El conteo bacteriano para la raíz, suelo y hoja es muy similar entre todos los tratamientos con nanopartículas. Mientras que el conteo bacteriano para bacterias epífitas muestra que hay un mayor número en los tratamientos con Au 1ppm y Ag 0.5ppm siendo de 1×10^{10} y 4.29×10^9 respectivamente. Para el resto de los tratamientos se muestran bastantes parejos. El conteo en el pseudotallo muestra que el tratamiento con mayor número de colonias recuperadas es el de Ag 0.5ppm con 1.35×10^5 UFC/g, mientras que el tratamiento con bacteria es el que tiene menor conteo ya que no se logró recuperar ninguna colonia.

Tabla 7. Numero de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) después de 48 horas post-inoculación en plantas tratadas y no tratadas con NPs.

TRATAMIENTO	RAIZ (SUPERFICIE)	SUELO	RAIZ	PSEUDOTALLO	HOJA
Au 0.5ppm + bacteria	1.74×10^7	1.04×10^8	1.1×10^6	2.4×10^3	7.1×10^4
Au 1ppm + bacteria	1×10^{10}	6.6×10^8	6×10^5	1.42×10^4	3.3×10^4
Ag 0.5ppm + bacteria	4.29×10^9	1.68×10^8	3.3×10^6	1.38×10^5	4.38×10^4
Ag 1ppm + bacteria	4.5×10^7	1.58×10^8	3.3×10^6	5.6×10^4	3.1×10^4
Bacteria	3.0×10^7	6.8×10^8	0	0	0

Comparando los resultados obtenidos de 24 horas con los de 48 horas, se observó que se mantienen las UFC/g de las bacterias epifitas y las bacterias de suelo, mientras que hay un incremento drástico en las colonias encontradas en pseudotallo y hojas. El único tratamiento que mantuvo el conteo bacteriano fue el tratamiento con bacteria, esto indicó que después de 48 horas la bacteria aún no logra colonizar los tejidos teniendo esto concordancia con el análisis microscópico realizado previamente.

Las bacterias recuperadas fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Encontramos cepas de *E. cloacae* en la superficie y en el suelo e internalizadas en la raíz. Por otra parte, las bacterias recuperadas de pseudotallo y

hoja que fueron identificadas son *Roseomonas mucosa*, *Sporosarcina psychrophila*, *Lactobacillus plantarum*, *Sphingomonas adhesiva* y *Lactobacillus parabuchneri* (tabla 8). Esto sugiere que quizás el estrés ocasionado por el tratamiento de nanopartículas y la adición de *E. cloacae* indujo la activación de bacterias no cultivables.

Tabla 8. Identificación de bacterias endófitas recuperadas de los tejidos internos de la planta post-tratamiento con NPs e inoculación con *E. cloacae*.

BACTERIA	SCORE	PROCEDENCIA
<i>Roseomonas mucosa</i>	2.110	Pseudotallo
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.320	Raíz
<i>Roseomonas mucosa</i>	2.050	Hoja
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.390	Rizosférico
<i>Sporosarcina psychrophile</i>	1.420	Pseudotallo
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.300	Rizosférico
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.360	Suelo
<i>Lactobaacillus paraplantarum</i>	1.380	Hoja
<i>Roseomonas mucosa</i>	2.140	Hoja
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	1.560	Hoja
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.340	Raíz
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.310	Suelo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.790	Raíz
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.030	Rizosférico
<i>Enterobacter cloacae</i>	2.380	Suelo

<i>Roseomonas mucosa</i>	2.100	Hoja
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	1.600	Pseudotallo

Acercamiento proteómico y metabolómico post-inoculación con *E. cloacae* usando MALDI-IMAGING

Después de 24 horas postinoculación de NPS se observaron picos con las siguientes masas (m/z) de 151.885, 268.875, 305.807, 332.068, 476.871, 493.832, 667.814 y 719.79 correspondientes a dihidrokaempferol, 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona, dihidroflavonol, giberelina, flavonoide, metoxikaempferol, neovabaisoflavona y kaempferol respectivamente como se observa en la figura 20. La masa correspondiente a dihidrokaempferol presenta un 61% de abundancia, teniendo su mayor presencia en el control (raíz tratada con agua), la molécula 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona presenta un 72% de abundancia principalmente sobre el tejido tratado con nanopartículas de oro (panel b, figura 20), mientras que la abundancia de dihidroflavonol es del 61% que, al igual que dihidrokaempferol, se encuentra sobre el tejido de la raíz control (panel c, figura 20) Para giberelina la abundancia es del 80% teniendo mayor presencia en las raíces tratadas con nanopartículas de oro (panel d, figura 20). La masa correspondiente a un flavonoide presenta una abundancia del 81% teniendo mayor abundancia en el tejido tratado con NPS de plata (panel e, figura 20). La molécula de metoxikaempferol presenta una abundancia del 88% teniendo mayor presencia sobre el tejido tratado con NPS de plata (panel f, figura 20), mientras que la neovabaisoflavona presenta una abundancia del 71% teniendo mayor presencia

en el control y el tratamiento con NPS de plata (panel g, figura 20) y por último la masa correspondiente a kaempferol cuenta con un 71% de abundancia en tejidos siendo el tratamiento con NPS de plata donde se encuentra mayor presencia (panel h, figura 20). Las nanopartículas al parecer inducen a la producción de flavonoides, metabolitos producidos por las plantas como respuesta a estrés generado en la misma, es probable que las nanopartículas estén ocasionando un daño mecánico en las raíces de las plantas ocasionando que además de producir peróxido en raíces se esté induciendo la producción de flavonoides.

En la figura 21, observamos las masas obtenidas del análisis de MALDI-IMAGING realizadas a 48 horas después de inocular las plantas con nanopartículas de oro y plata. Se obtuvieron 20 masas específicas que poseen un porcentaje de abundancia mayor al 50%, 4 de esas 20 masas son las que sobresalen y son las siguientes: 151.885, 176.87, 332.068 y 476.871 m/z que corresponden a dihidrokaempferol, ácido indol acético, giberelina y flavonoide respectivamente. La molécula de dihidrokaempferol presenta una abundancia del 74% teniendo una localización bastante similar en el control y los tejidos tratados con NPS de oro y plata (panel a, figura 21).

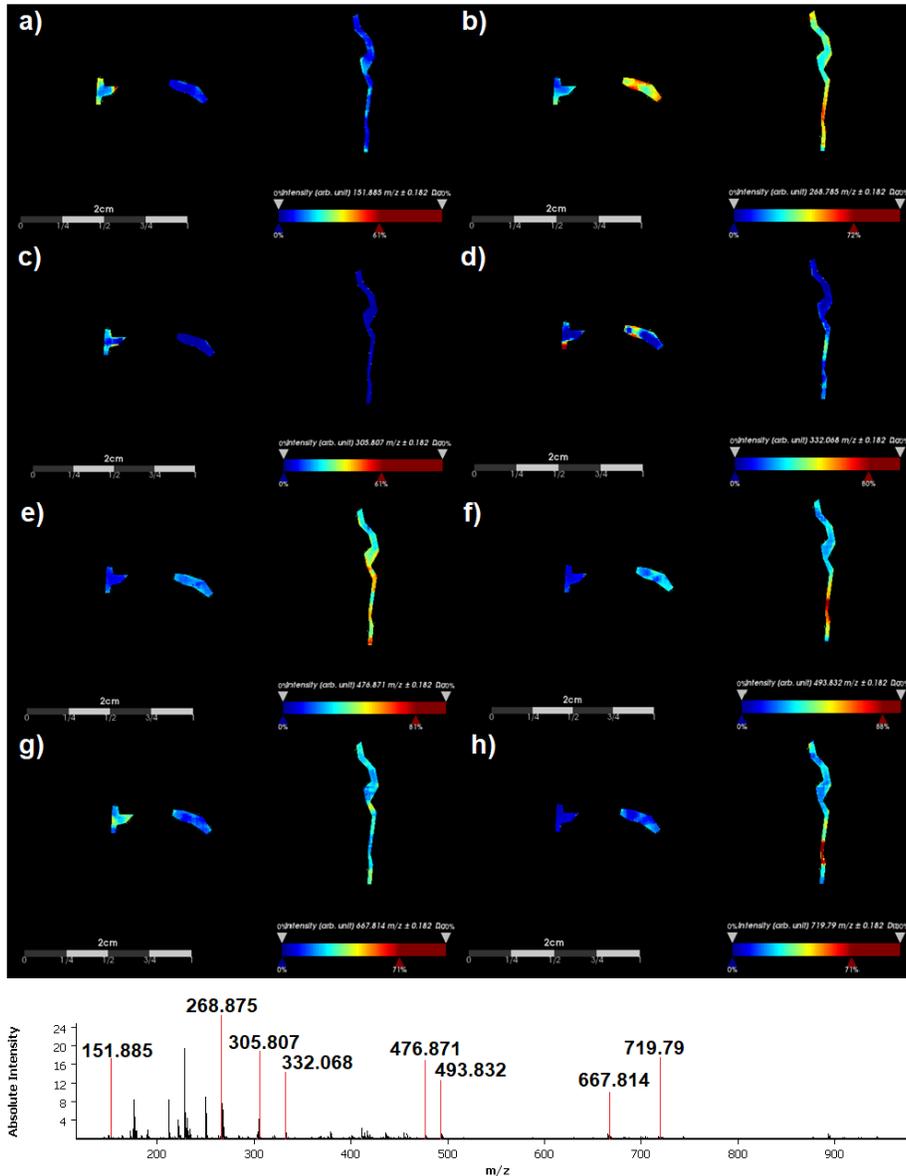


Figura 20. Identificación de metabolitos por espectrometría MALDI-IMAGING de raíces con 24 horas de inoculación de nanopartículas de oro y plata. Se observan las siguientes masas (m/z) correspondientes: a) 151.885 m/z (dihidrokaempferol), b) 268.875 m/z (4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona), c) 305.807 m/z (dihidroflavonol), d) 332.068 m/z (giberelina), e) 476.871 m/z (flavonoide), f) 493.832 m/z (metoxikaempferol), g) 667.814 m/z (neovabaisoflavona) y h) 719.79 m/z (kaempferol).

Mientras que el ácido indol acético muestra una abundancia del 65% siendo su mayor localización en el tejido tratado con NPS de plata (panel b, figura 21). La abundancia de la giberelina es del 57%, siendo el tejido tratado con NPS de oro donde se encuentra mayor localizado (panel c, figura 21). Y por último hay una abundancia del 72% para el flavonoide teniendo su mayor localización en el tejido tratado con NPS de plata (panel d, figura 21). El análisis de MALDI-IMAGING después de 48 horas de inoculadas las nanopartículas muestra una cantidad menor de masas, pero muestra masas similares a las encontradas después de 24 horas. Y al igual que el ensayo anterior cabe resaltar la producción de flavonoides en las raíces de las plantas, así como las fitohormonas producidas en las mismas (giberelinas y ácido indo acético).

El análisis de MALDI-IMAGING de muestras de raíces de banano tratadas únicamente con una suspensión bacteriana de *E. cloacae* arrojó 47 picos de masas con una abundancia arriba del 50%, de las cuales destacan: 189.976, 242.18, 305.336, 332.351, 360.461, 379.262, 493.832 y 667.479 *m/z* que corresponden a ácido indol acético, N-nonanoil-L-homoserina lactona, dihidroflavonol, giberelina, N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona, flavona, metoxikaempferol y neobavaisoflavona, respectivamente. El ácido indol acético se encuentra en 82% de abundancia presentándose mayormente en la raíz tratada con la bacteria (panel a, figura 22).

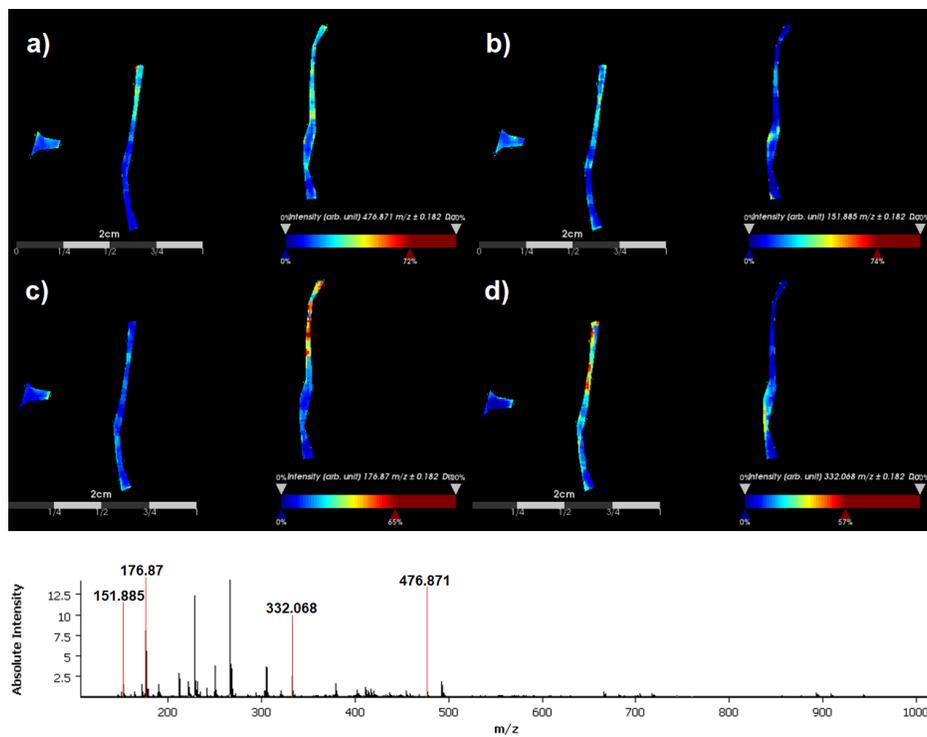


Figura 21. Espectro de masas MALDI-IMAGING de raíces de 48 horas post-inoculación de nanopartículas de oro y plata. a) 151.885 m/z (dihidrokaempferol), b) 176.87 m/z (ácido indol acético), c) 332.068 m/z (giberelina) y 476.871 m/z (flavonoide).

La molécula N-nonanoil-L-homoserina lactona se encuentra en un 56% principalmente en el tejido de la raíz tratada con la suspensión bacteriana (panel b, figura 22), mientras que el dihidroflavonol se encuentra en un 72% encontrándose en mayor cantidad en la raíz tratada (panel c, figura 22). La abundancia para la giberelina es de 74% (panel d, figura 22) y la del N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona es del 63% (panel e, figura 22) ambas con mayor presencia en el tejido tratado con la bacteria. La flavona se encuentra en un 73% en el tejido

tratado (panel f, figura 22) mientras que el metoxikaempferol se encuentra en un 67% siendo el control el principal tejido de localización (panel g, figura 22) y por último la abundancia para la neobavaisoflavona es del 69% siendo el tejido tratado donde se presenta en mayor cantidad (panel h, figura 22). Al igual que los tratamientos con NPS se logró observar la presencia de flavonoides tanto en las raíces tratadas como en las no tratadas con la suspensión bacteriana. Además de encontrar moléculas de señalización (N-nonanoil-L-homoserina lactona y N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona) en las raíces tratadas con la suspensión bacteriana 24 horas posterior a la inoculación. Esto puede ser un indicativo de comunicación planta-bacteria para poder colonizar el tejido interno de la planta.

Después de 48 horas de inoculada la suspensión bacteriana se encontraron 40 masas con una abundancia mayor al 50%, de las cuales destacan las siguientes: 151.885, 174.864, 176.668, 268.785, 305.807, 318.937, 332.068, 476.689, 493.649, 588.118 y 719.973 m/z correspondientes a dihidrokaempferol, ácido indol acético, ácido indol acético, 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona, dihidroflavonol, 5,7,2',5-tetrahidroxi-6-metoxiflavona, giberelina, flavonoide, metoxikaempferol, kaempferol y kaempferol respectivamente. La abundancia para el dihidrokamepferol es del 63% teniendo mayor presencia en el tejido control (panel a, figura 23), mientras que los dos acido indo acético encontrados (174.864 y 176.668 m/z) se encuentran en una abundancia de 74% y 68%, teniendo mayor presencia en el tejido inoculado con bacteria para el caso de la masa de 174.864 m/z y en el tejido control en el caso de la masa de 176.668 m/z (panel b y c, figura 23, respectivamente).

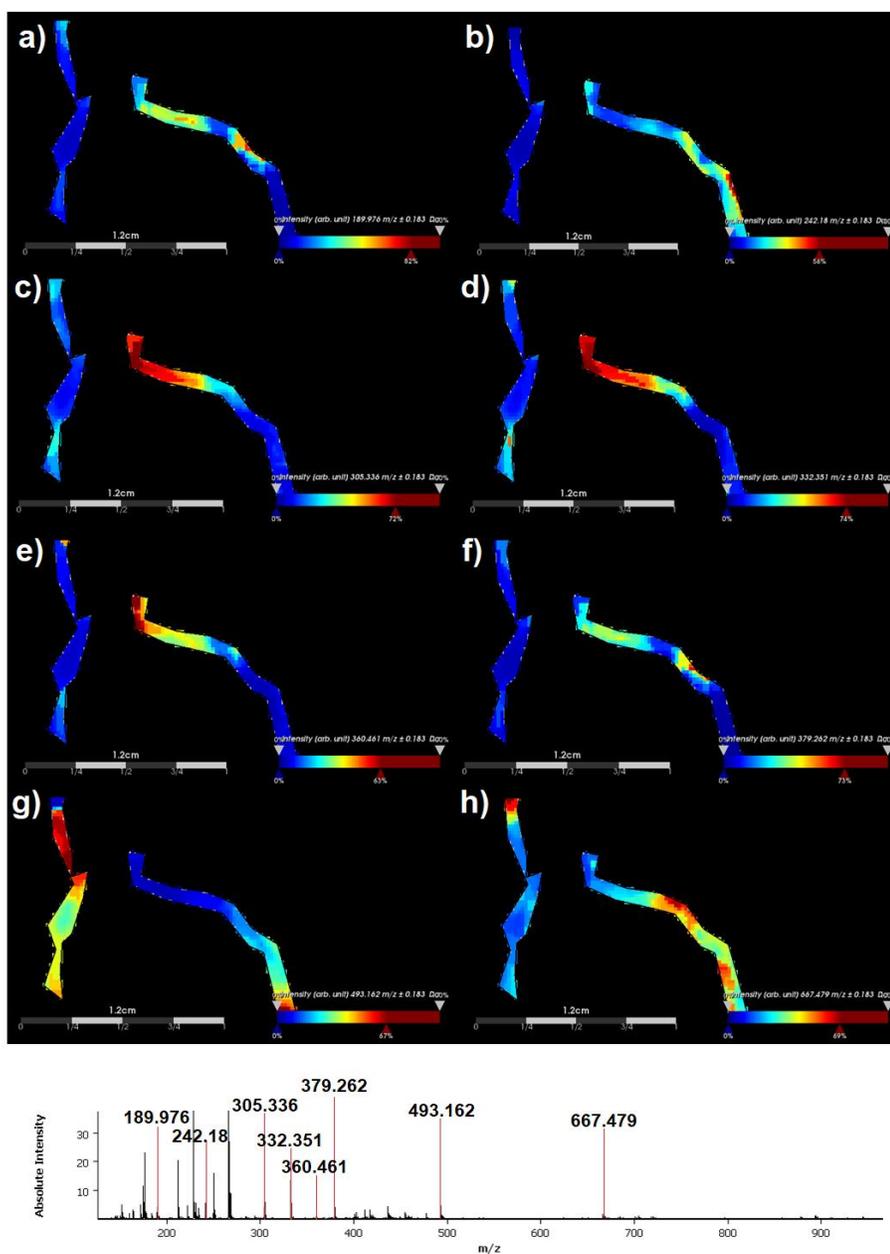


Figura 22. Análisis de MALDI-IMAGING de raíces de 24 horas post-inoculación con *E. cloacae* se identifican los siguientes metabolitos. a) 189.976 m/z (ácido indol acético), b) 242.18 m/z (N-nonanoil-L-homoserina lactona), c) 305.336 m/z (dihidroflavonol), d) 332.351 m/z (giberelina), e) 360.461 m/z (N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona), f) 379.262 m/z (flavona), g) 493.832 m/z (metoxikaempferol) y h) 667.479 m/z (neobavaisoflavona).

Para el caso de 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona la abundancia es de un 75% siendo este el tejido tratado el que presenta mayor abundancia de esta molécula (panel d, figura 23). En el caso del dihidroflavonol tiene un 54% de abundancia presentando una mayor presencia en el tejido control (panel e, figura 23). La molécula 5,7,2',5-tetrahidroxi-6-metoxiflavona presenta una abundancia del 69% presentándose solamente en el tejido control (panel f, figura 23). Por su parte la giberelina presenta una abundancia del 68% presentándose en ambos tejidos (control y tratamiento) pero con una presencia mayor en tejido control (panel g, figura 23). El flavonoide encontrado tiene una abundancia del 92%, presentándose mayormente en el tejido tratado con la bacteria (panel h, figura 23). Por otro lado, el metoxikaempferol presenta una abundancia del 81% encontrándose principalmente en el tejido inoculado (panel i, figura 23). Por último, las masas 588.118 y 719.973 m/z son kaempferol con una abundancia del 61% y 66% respectivamente, ambas moléculas presentan su mayor localización en los tejidos control. En comparación con el análisis realizado a las 24 horas, solo encontramos la presencia de flavonoides en ambos tejidos, esto también concuerda con los análisis realizados con solo nanopartículas. También algo que notamos es la ausencia de las moléculas de señalización que fueron encontradas a las 24 horas, la comunicación planta-bacteria solo se establece a las 24 horas post inoculación.

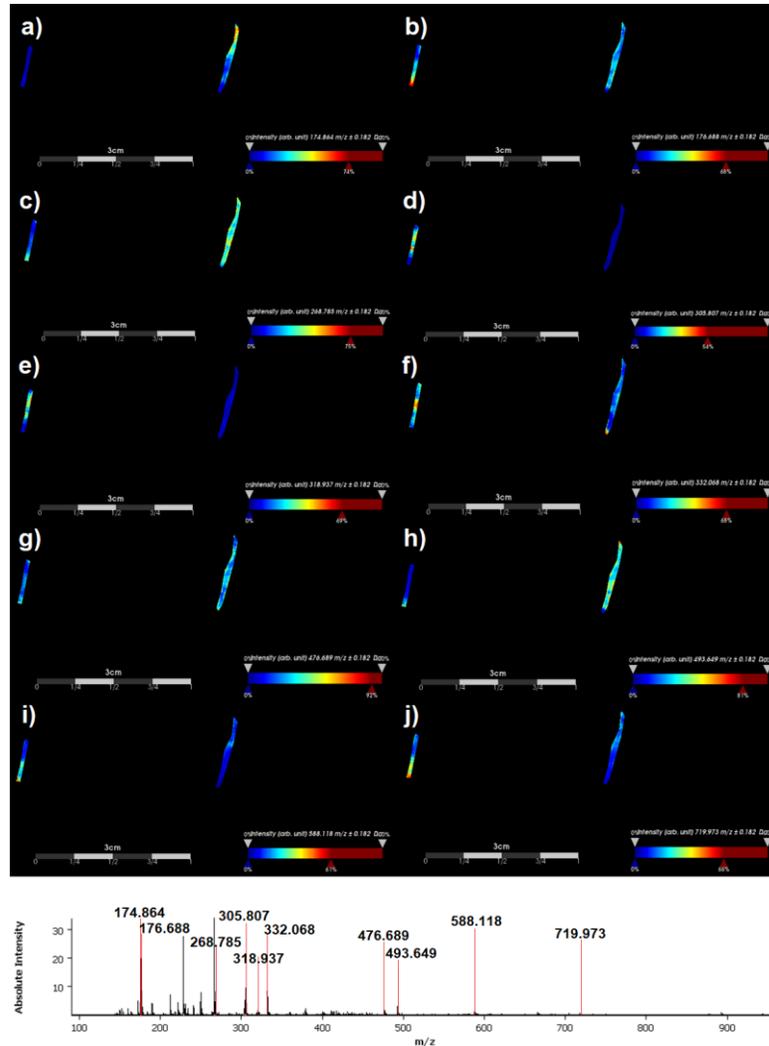


Figura 23. Identificación de metabolitos en raíces con 48 horas post inoculación de *E. cloacae*. a) 151.885 m/z (dihidrokaempferol), b) 174.864 m/z (ácido indol acético), c) 176.668 m/z (ácido indol acético), d) 268.785 m/z (4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona), e) 305.807 m/z (dihidroflavonol), f) 318.937 m/z (5,7,2',5-tetrahidroxi-6-metoxiflavona), g) 332.068 m/z (giberelina), h) 476.689 m/z (flavonoide), i) 493.649 m/z (metoxikaempferol), j) 588.118 m/z (kaempferol) y k) 719.973 m/z (kaempferol).

Después de 5 días de inoculadas con nanopartículas, las plantas se inoculan con una suspensión bacteriana de *E. cloacae* a $DO_{600nm} = 1$. El análisis de MALDI-IMAGING de las 24 horas posteriores a la inoculación de la bacteria presenta un total de 68 masas con una abundancia mayor al 50% de las cuales destacan las siguientes masas: 163.872, 174.921, 176.86, 189.96, 202.091, 268.795, 284.192, 305.169, 332.204, 360.257, 667.058 y 773.668 m/z correspondientes a ácido indol acético, ácido indol acético, ácido indol acético, ácido indol acético, O-succinil-L-homoserina, 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona, giberelina, dihidroflavonol, giberelina, N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona, neobavavisoflavona y kaempferol respectivamente. Las 4 primeras masas antes mencionadas se reportan que son ácido indol acético con una abundancia del 75%, 83%, 78% y 68% respectivamente teniendo mayor localización en ambos tejidos tratados con NPS de oro y plata más la bacteria en el caso de la masa de 163.872 m/z (panel a, figura 24), para la masa de 174.921 m/z (panel b, figura 24) la mayor localización es en el tejido tratado con nanopartículas de oro más la bacteria al igual que la masa de 176.86 m/z (panel c, figura 24), mientras que la masa de 189.96 m/z presenta su mayor localización en el tejido tratado con NPS de plata (panel d, figura 24). La molécula O-succinil-L-homoserina presenta una abundancia del 56% teniendo mayor presencia sobre la raíz tratada previamente con NPS de plata (panel e, figura 24). Por otro lado, la 4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona tiene una abundancia del 76% teniendo una mayor presencia en el tejido tratado con NPS de oro (panel f, figura 24). Para la masa de 284.192 que se reporta es una giberelina presenta una abundancia del 61% teniendo mayor localización sobre el tejido de la raíz control (panel g, figura 24). El hidroxiflavonol muestra una

abundancia del 71% localizándose principalmente sobre el tejido de la raíz tratada con NPS de plata (panel h, figura 24), al igual que la otra giberelina presente que presenta una abundancia del 85% (panel i, figura 24). La abundancia para la molécula N-cis-hexadec- 9z-enoyl-L-homoserina lactona es del 63% presentando una mayor localización en el tejido tratado con NPS de plata (panel j, figura 24). El flavonoide neobavaisofavona presenta una abundancia del 50% teniendo una mayor presencia en el tejido tratado con NPS de plata (panel k, figura 24) y por último el kaempferol presenta una abundancia del 57% teniendo una mayor localización en el tejido tratado con NPS de oro (panel l, figura 24). Comparando con los otros tratamientos a las 24 horas (NPS y bacteria) encontramos que al combinar los tratamientos hay masas similares como lo son la producción de flavonoides y sobre todo la producción de moléculas de señalización.

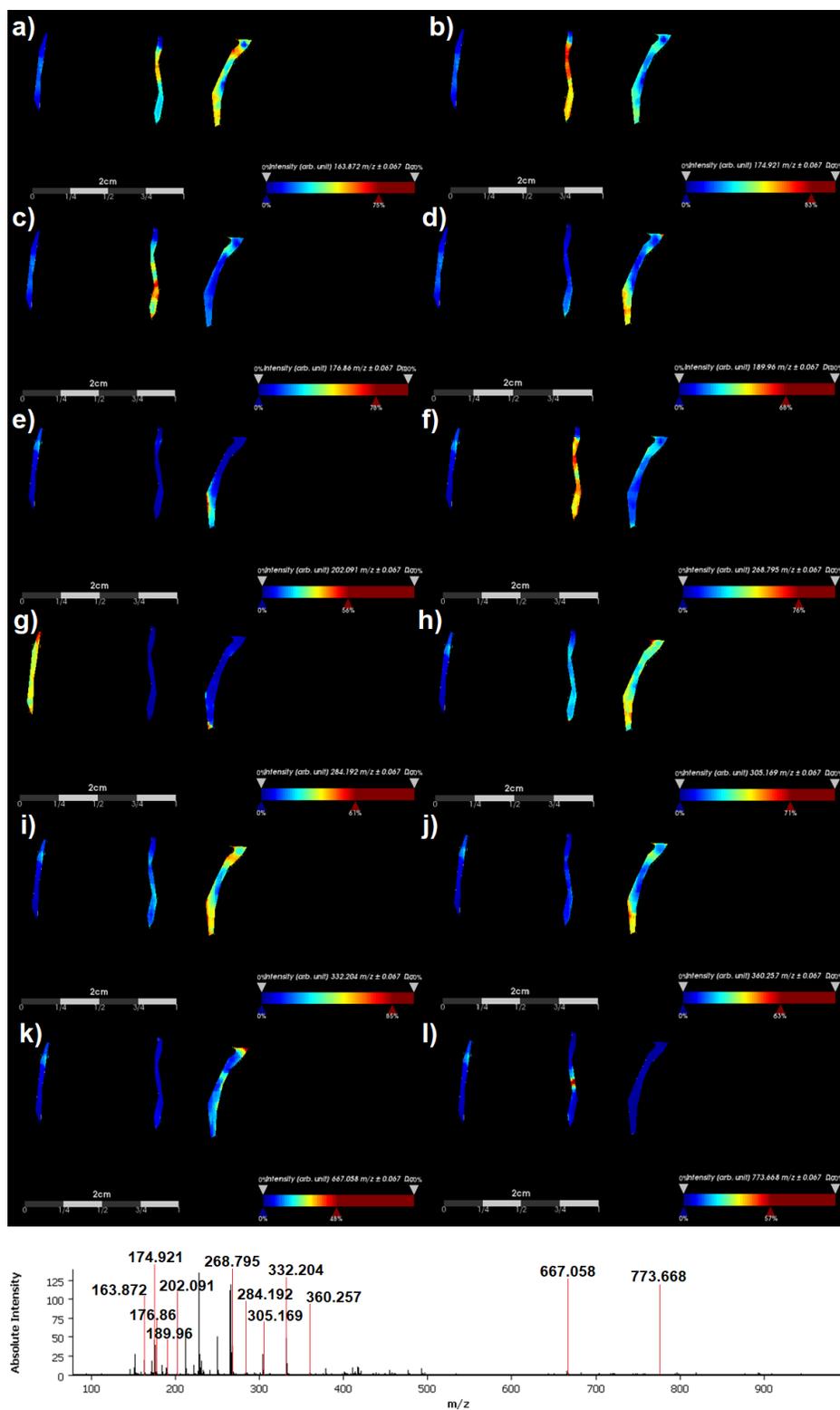


Figura 24. Identificación de metabolitos expresados durante el tratamiento de raíces 24 horas post-inoculación de las nanopartículas de oro y plata y de *E.*

cloacae. a) 163.872 *m/z* (ácido indol acético), b) 174.921 *m/z* (ácido indol acético), c) 176.86 *m/z* (ácido indol acético), d) 189.96 *m/z* (ácido indol acético), e) 202.091 *m/z* (O-succinil-L-homoserina), f) 268.795 *m/z* (4,5-dihidroxi-7-metoxiflavona), g) 284.192 *m/z* (giberelin), h) 305.169 *m/z* (dihidroflavonol), i) 332.204 *m/z* (giberelina), j) 360.257 *m/z* (N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona), k) 667.058 *m/z* (neobavavisoflavona) y l) 773.668 *m/z* (kaempferol).

El análisis de MALDI-IMAGING después de 5 días de inoculadas las nanopartículas y 48 post inoculación de la suspensión bacteriana de *E. cloacae* arrojo un total de 20 masas con una abundancia mayor del 50%, destacando 3 principales masas que son: 163.971, 174.916 y 332.353 *m/z* que corresponden a ácido indol acético (163.971 *m/z* y 174.916 *m/z*) y giberelina respectivamente. La masa de 163.971 *m/z* correspondiente a ácido indol acético presenta una abundancia del 54% con una mayor localización sobre el tejido control (panel a, figura 25), mientras que el otro ácido indol acético encontrado (174.916 *m/z*) presenta una abundancia del 53% teniendo mayor localización en el tejido control y en el tratado con nanopartículas de oro (panel b, figura 25). Mientras que la masa correspondiente a giberelina (332.353 *m/z*) presenta una abundancia del 74% teniendo su mayor presencia en el tejido control (panel c, figura 25). En comparación con el análisis realizado a las 24 horas baja considerablemente las masas encontradas, pero podemos observar que encontramos moléculas similares como es la producción de flavonoides y giberelinas.

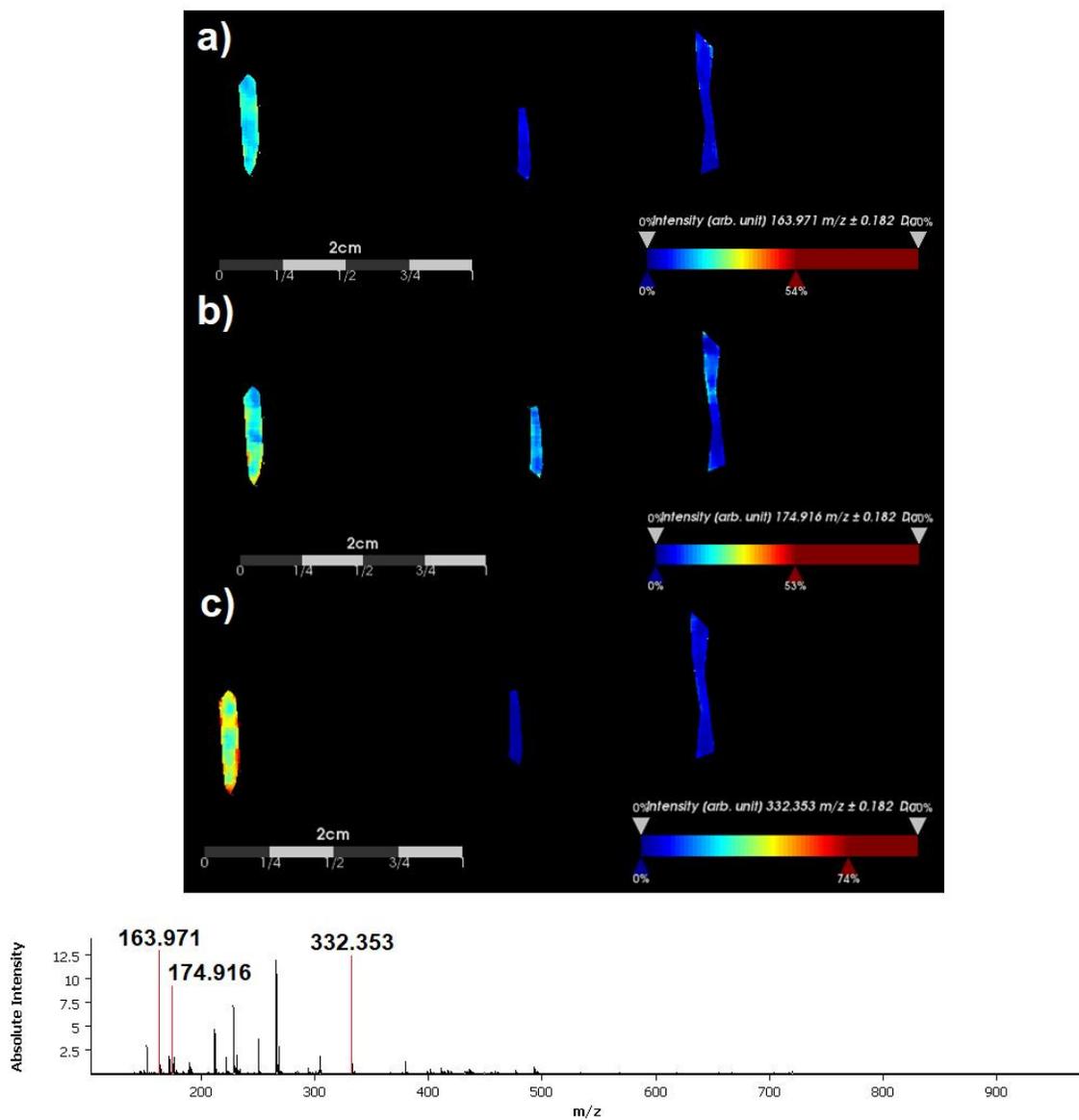


Figura 25. Espectro de masas MALDI-IMAGING de muestras de raíces 48 horas post inoculación de las nanopartículas de oro y plata y de *E. cloacae*. a) 163.971 m/z (ácido indol acético), b) 174.916 m/z (ácido indol acético) y c) 332.353 m/z (giberelina).

DISCUSION

El cultivo de banana es uno de los más importantes nivel mundial, genera divisas y mantiene la seguridad alimentaria. Este cultivo se ve amenazado por enfermedades y condiciones medio ambientales, así como un estrés ligado a la fertilización, sistema de drenaje y el cambio climático que influye en el rendimiento de la fruta.

La asociación entre la planta y sus simbioses microbianos tiene influencias en el acondicionamiento de la planta, la resistencia al estrés y la resiliencia a estados que afectan su crecimiento. En este estudio nos enfocamos en determinar cómo bacterias endófitas nativas del banano soportan el crecimiento de su planta hospedante bajo condiciones de limitación de nutrientes, sin materia orgánica disponible. Usamos dos bacterias aisladas de plantaciones comerciales que fueron identificadas como *E. cloacae* y *K. variicola*. Ambas bacterias son fáciles de cultivar y fueron identificadas usando análisis proteómico y molecular.

Como parte del protocolo de identificación y entender como estas bacterias pueden interaccionar con las raíces en estados previos a la colonización, se hizo un análisis de microscopia a nivel de superficie celular usando microscopia electrónica de barrido. Encontramos que ambas bacterias forman asociaciones tipo “cluster”, y muestran la presencia de flagelos laterales y pilis después de 18 horas de incubación. Algo que resulto sobresaliente fue que las células de *E. cloacae*, están rodeados por un material extracelular que sugiere la presencia de moco y la formación de vesículas de membrana externas, conocidas como OMV’s por sus siglas en ingles. Se ha propuesto que las OMV’s, participan en la comunicación que se establece en el reconocimiento de endófito en la raíz, la

unión de la raíz, la formación de biofilms y la expresión de genes involucrados en las uniones de las raíces, en la activación de sistemas de defensas y en la remodelación de la pared celular de las raíces. Para mamíferos y patógenos de plantas, las OMVs modulan el sistema inmune y son importantes en la tolerancia a estrés, virulencia y colonización (Ionescu *et al.*, 2014, Bahar *et al.*, 2016, Jan 2017, Katsir and Bahar, 2017, Tan *et al.*, 2018).

Las vesículas son carreadoras naturales de moléculas pequeñas (enzimas, proteínas y ácidos nucleicos, en específico las vesículas bacterianas acarrean lipopolisacáridos, peptidoglicano, membrana y proteínas periplásmicas y citoplásmicas. Estudios recientes sugieren que las vesículas de bacterias gram negativas pueden ser producidas por una lisis celular espontánea, generando vesículas cerradas que toman los componentes de la periferia celular (Bitto *et al.*, 2017) como se observa en la figura 26.

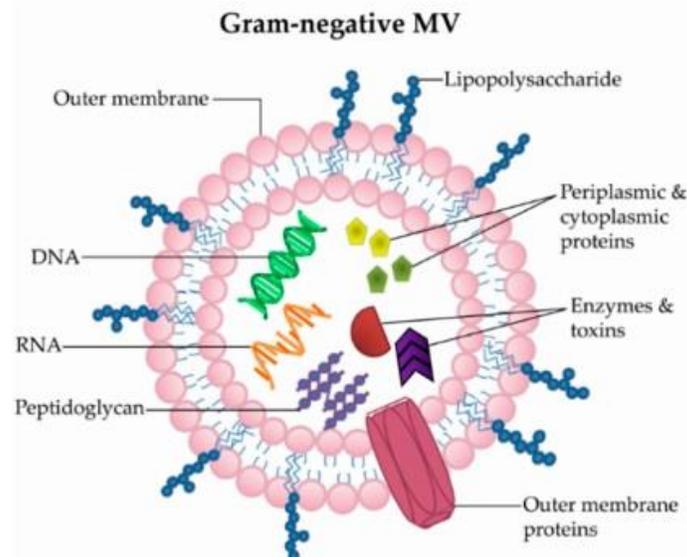


Figura 26. Arquitectura y composición de las vesículas de membrana de bacterias gram negativas. Estas vesículas están encerradas en la membrana exterior que

esta embebida con lipopolisacáridos y otras proteínas de membrana externa (Bitto *et al*, 2017).

Un interés principal de este trabajo fue conocer si la inoculación de bacterias endófitas puede soportar el crecimiento de las plantas aun en ausencia de nutrientes y materia orgánica en el suelo. El incremento de la biomasa de manera significativa estadísticamente fue *E. cloacae* con un incremento de hasta 1g sobre el peso original de la planta y además está por encima de la biomasa generada por parte de las otras dos bacterias *E. coli* y *K. variicola*. No se observó una diferencia significativa entre el tratamiento con *E. coli* y *K. variicola* vivas. Por otro lado, los tratamientos con las bacterias muertas *Klebsiella variicola* y *E. coli* muestran un mayor incremento de biomasa con un 0.5g sobre el peso original, pero esta es menor que el efecto de la bacteria *E. cloacae*. En reportes previos, el uso de bacterias muertas no ha mostrado una diferencia entre los parámetros de crecimiento tomados cuando son comparadas con el control (Sajjad *et al*, 2001). En este trabajo usamos una cepa de *E. coli* ATCC como una cepa control no endófitas; sin embargo, tiene efectos sobre el crecimiento positivamente, aunque no hay diferencia significativa con los otros tratamientos biológicos, el aumento de biomasa es ligeramente más alto en la cepa muerta, y pensamos que esto ocurre debido a que la bacteria puede causar un efecto citotóxico.

Con respecto al efecto de transferencia de nitrógeno y en relación con el crecimiento, se cuantificó la incorporación de ^{15}N en los tejidos. Para la búsqueda de material isotópico es la técnica más utilizada para la determinación de este isótopo ha sido la espectrometría de masas, pero también puede utilizarse es la

Resonancia Magnética Nuclear (NMR) (Hauck *et al*, 1976). En cuanto a la espectrometría de masas, la técnica más común es ver el marcaje usando un ICP-MS, en esta investigación intentamos proponer el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF como una técnica fácil y rápida para determinar la incorporación de nitrógeno marcado en las proteínas bacterianas. Los espectros de *E. cloacae* y *E. coli* muestran una diferencia marcada en el peso de sus proteínas cuando se comparan los tratamientos con ^{14}N y ^{15}N , por lo cual asumimos que esa diferencia corresponde a que la cantidad de ^{15}N aumento y las proteínas se vuelven más pesadas, logrando ver este desplazamiento en los espectros. Para *K. variicola* es un poco complejo y tuvimos problemas desde el inicio al tratar de cultivarla en el medio M9 usando como fuente de nitrógeno NH_4Cl , después de 18 horas de incubación en dicho medio la bacteria no presentaba un desarrollo adecuado en su biomasa. Es por eso que se pensó en cambiar la fuente de nitrógeno, ya que es posible que el NH_4Cl sea una fuente no asimilable para esta cepa. El medio se reformuló, y se comenzó a utilizar como fuente de nitrógeno NaNO_3 , la biomasa aumentó, pero aun así el desarrollo siguió sin ser el deseado. Cuando se realizó el análisis por MALDI-TOF de las proteínas bacterianas nos percatamos que ambos espectros (^{14}N y ^{15}N) eran idénticos y que, a comparación de *E. coli* y *E. cloacae*, no presentaba una diferencia de peso entre sus proteínas. Al analizar con detenimiento dicho suceso pensamos que la bacteria era incapaz de incorporar dichas fuentes de nitrógeno, y que posiblemente utilizando otra fuente de nitrógeno la bacteria pueda asimilarlo y de esa manera marcar sus proteínas con el isótopo, pero cuando se realizó el análisis de feofitina en hojas de banano buscando el marcaje con ^{15}N indicativo de la

transferencia de nitrógeno de bacteria a planta nos dimos cuenta que la bacteria si estaba incorporando el nitrógeno a sus proteínas y además, si está realizando la transferencia de nitrógeno de sus proteínas a la clorofila de la planta, resultando en un marcaje de los 4 nitrógenos del anillo del tetrapirrol de la feofitina. Esto nos indica que la espectrometría de masas MALDI-TOF no es un método tan sensible para poder determinar la incorporación de nitrógeno en proteínas bacterianas, quizás un método adecuado para poder determinar esto es un análisis de ICP-MS. El análisis de transferencia de nitrógeno de las plantas tratadas con *E. cloacae* viva indica que la igual que *K. variicola*, esta marca los 4 nitrógenos presentes en el anillo, pero al hacer el análisis del tratamiento de *E. cloacae* muerta se ve que solamente marca tres de los cuatro nitrógenos presentes en el anillo de tetrapirrol, siendo el isótopo más abundante la masa correspondiente a 875.58 m/z en este tratamiento. Esto concuerda con los resultados obtenidos de la producción de biomasa de las plantas con los tratamientos con bacteria, ya que el tratamiento con esta bacteria muerta no aumenta la biomasa de la planta tan considerablemente como lo hizo el tratamiento con bacteria viva. En el caso de la *E. coli* ATCC, como ya se había mencionado antes, se sugirió que sería una bacteria control al no ser endófito, pero además de aumentar biomasa en las plantas tratadas, esta bacteria tiene la capacidad de transferir nitrógeno (en ambos tratamientos) logrando marcar los cuatro nitrógenos de la feofitina, ya que el isótopo con mayor abundancia es el de 876.58 m/z. Esto podría ser indicativo de que el movimiento de nitrógeno de la bacteria a la planta puede estar siendo provocado por el estrés generado en la planta debido a que esta se encuentra en condiciones de poca disponibilidad de nutrientes y altas salinidades en el suelo

(Beltrán-García *et al*, 2014). Estudios con compuestos que contienen elementos isotópicos como C, N y P (siendo los isotopos de nitrógeno los más utilizados, específicamente el ^{15}N) han demostrado que dichos elementos se pueden transferir de un donador (planta, hongo y bacteria) a plantas receptoras para que de esta manera exista una red de nutrientes entre ambos. Un ejemplo claro es el hongo *Glomus mosseae*, que ha demostrado la habilidad de poder transferir ^{15}N de suelo a las micorrizas de plantas de apio, probando que hay una transferencia de nutrientes de plantas con micorrizas y hongos formadores de micorrizas (Mehnaz S., 2011). También, en otros estudios, *Bacillus tequilensis* una bacteria endófito de agave mostró que es capaz de transferir nitrógeno a plántulas de agave después de 2 meses de inoculación de la planta con bacteria previamente marcada con ^{15}N (Beltran-Garcia *et al*, 2014). De igual manera Mehnaz en 2011 marco plantas de soya con ^{15}N y las inoculo con el hongo *Glomus versiforme*, las plantas fueron colocadas al lado de plantas de maíz, esto muestra una transferencia de nitrógeno de plantas de soya al hongo, y de este a las plantas de maíz, probando que todos los microorganismos mantienen una estrecha comunicación y, de igual manera, mantienen una red en común para el intercambio de nutrientes.

Al hacer el análisis de la colonización en raíces de *E. cloacae* con ayuda de la tinción de DAB, se descubrió que esta no logra entrar en raíz hasta los 2 meses post inoculación como se muestra en la figura 17. Consideramos que esto puede ser debido a que la bacteria requiere de mayor tiempo de contacto con la planta para poder colonizarla.

Cuando las plantas fueron tratadas con nanopartículas exclusivamente se logró observar la producción de peróxido desde las 24 horas post inoculación de las nanopartículas de oro y plata, diferenciándose entre ellas y los dos tipos de condiciones (0.5 y 1 ppm) por la zona donde se producía el peróxido sobre raíz. Al momento de inocular bacteria más nanopartícula, se detectó lo que parecen ser restos celulares dentro de la raíz, además de la producción de peróxido en la misma desde las 24 horas postinoculación. Cuando se realizó el acercamiento proteómico por medio de la técnica de MALDI-IMAGING, los tratamientos con solo nanopartículas arrojaron la presencia de metabolitos como flavonoides y giberelinas, molécula reguladora del crecimiento en plantas. Pero en los tratamientos con *E. cloacae* arrojaron varios picos interesantes. A las 24 horas post inoculación de bacteria se encontró, además de fitohormonas (auxinas y giberelinas) moléculas de señalización. Como la masa a los 242.194 m/z correspondiente a N-nonanoil-L-homoserina lactona. Haciendo un análisis estadístico y comparando todos los tratamientos efectuados para la búsqueda de metabolitos secundarios, se encontró que esta molécula está presente en mayor abundancia en el tratamiento con bacteria a las 24 horas post inoculación, como se muestra en la figura 27.

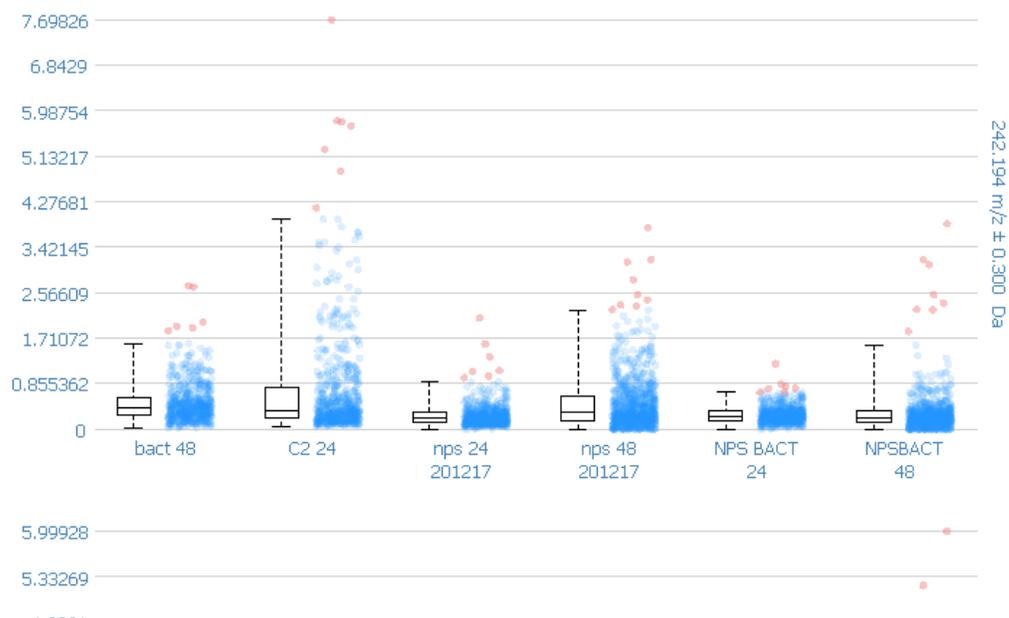


Figura 27. Acumulación de N-nonanoil-L-homoserina lactona. La mayor presencia de esta molécula se presenta en el tratamiento con *E. cloacae* únicamente después de 24 horas post inoculación.

Otra masa que se encontró correspondiente a una molécula de señalización fue la masa de 360.257 m/z que corresponde a N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona. Al realizar el análisis estadístico y compararlo con todos los tratamientos se descubrió que la mayor presencia de esta masa de interés es en el tratamiento con nanopartículas de plata más la suspensión bacteriana a las 24 horas post inoculación como se muestra en la figura 28. Esto concuerda con los resultados obtenidos de los tratamientos, ya que al parecer *E. cloacae* es la que está generando una respuesta de comunicación con la planta, tanto por si sola como en presencia de nanopartículas.

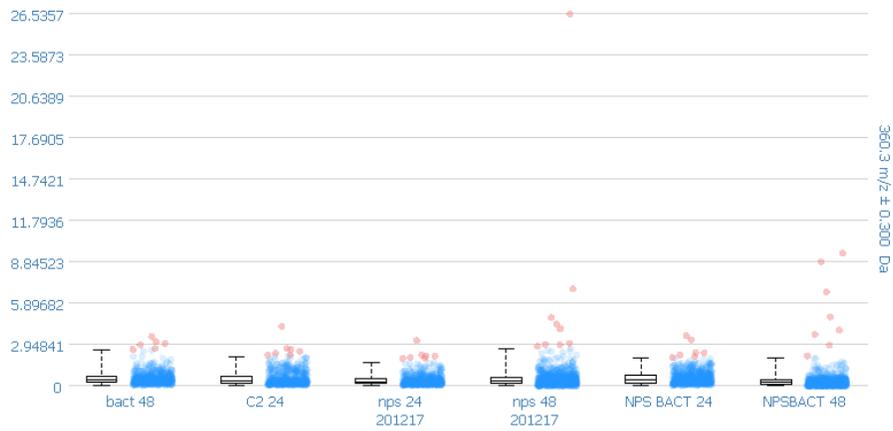


Figura 28. Valores de Acumulación de N-cis-hexadec-9z-enoyl-L-homoserina lactona (360.257 m/z). Se observa la mayor presencia en el tratamiento con *E. cloacae* únicamente después de 24 horas post inoculación.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El uso de bacterias endófitas como biofertilizantes es bastante prometedor, porque estas bacterias producen moléculas (tanto fitohormonas que ayudan al crecimiento de la planta, así como moléculas de comunicación planta-bacteria) benéficas para la planta.

De igual manera se demostró que las bacterias ayudan a la planta cuando esta se encuentra en condiciones pobres de nutrientes, ya sea proveyendo nutrientes a la planta o sirviendo como fuente de nutrientes para la planta. Se cree que cuando las plantas se encuentran en este tipo de condiciones, utilizan los microorganismos que los colonizan como fuente de nutrientes para poder sobrevivir ante condiciones adversas.

El uso de nanopartículas como aceleradores de crecimiento probó ser efectivo, ya que se pudo ver la internalización de la bacteria (*E. cloacae*) a las 24 horas post inoculación, cosa que no veíamos cuando colocábamos la bacteria sola sin nanopartículas. Esto puede ser interesante ya que se puede hacer uso de nanopartículas en la agricultura como un acelerador de colonización de plantas y de inducción de moléculas como fitohormonas. Es recomendable realizar un estudio para establecer las concentraciones de nanopartículas más adecuada para la planta.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adivitiya, Babbal y Khasa Y.P.; 2017; Microbes as biocontrol agents. Probiotics and plant health. Doi:10.1007/978-981-10-3473-2_24.
- 2.- Aguilar-Barragán A., Gracia-Torres A.E., Odriozola-Casas O.E., Macedo-Raygoza G.M., Ogura T., Manzo-Sánchez G., James A.C., Islas-Flores I. y Beltrán-García M.J.; 2014; Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. Brazilian Journal of Microbiology 45(1):359-364.
- 3.- Ahemad, M. y Kibret, M.; 2013; Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University 26:1-20.
- 4.- Bahar O., Mordukhovich G., Luu D.D., Schwessinger B., Daudi A., Jehle A.K., Felix G. y Ronald P.C.; 2016; Bacterial outer membrane vesicles induce plant immune responses. APS Journals, 29(5):374-384.
- 5.- Batista A.H., Vargas-Motta A.C., Reissmann C.B., Schneider T., Martins I.L. y Hashimoto M.; 2015; Liming and fertilization in *Pinus taeda* plantations with severe nutrient deficiency in savanna soils. Acta Scientiarum. Agronomy 37(1):117-125.
- 6.- Behie S.W. y Bidochka M.J.; 2014; Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. Applied and environmental microbiology 80(5):1553-1560.
- 7.- Beltrán-García M.J., White J.F., Prado F.M., Prieto K.R., Yamaguchi L.F., Torres M.S., Kato M.J., Medeiros M.H.G. y Di Mascio P.; 2014; Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria. Scientific reports. 4:6938.

- 8.- Beltrán-Gracia E., Macedo-Raygoza G.M., Villafaña-Rojas J., Martínez-Rodríguez A., Chávez-Castrillón Y.Y., Espinosa-Escalante F.M., Di Mascio P., Ogura T. y Beltrán-García M.J.; 2017; Production of lipopeptides by fermentation processes: endophytic bacteria, fermentation strategies and easy methods for bacterial selection. Intech Open. <http://dx.doi.org/10.5772/64236>.
- 9.- Beneduzi A., Ambrosini A. y Passaglia L.M.P.; 2012; Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology 35(4):1044-1051.
- 10.- Bhattacharyya A., Chandrasekar R., Chandra A.K., Epedi T.T. y Prakasham R.S.; 2014: Application of nanoparticles in sustainable agriculture: its current status. 2:429-448.
- 11.- Bitto N.J. y Kaparakis-Liaskos M.; 2017; The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles. International journal of molecular sciences 18:1287.
- 12.-Bouain N., Shahzad Z., Rouached A., Khan G.A., Berthomieu P., Abdely C., Poirier Y. y Rouached H.; 2014; Phosphate and zinc transport and signaling in plant: toward a better understanding of their homeostasis interaction. Journal of experimental botany, 65(20):5765-5741.
- 13.- Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F. y Sessitsch A.; 2014; Metabolic potential of endophytic bacteria. Current Opinion in Biotechnology. 27. 30–37.
- 14.- Burkhanova G.F., Vasselova S.V., Sorokan' A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V. y Maksimov I.V.; 2017; Strains of *Bacillus* ssp. Regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk. Appl Biochem Microbiol, 53(3):346-352.
- 15.- Chao D.Y. y Lin H.X.; 2015; Transport solution in rice variations. Nature plants 1:1-2.

- 16.- Dhewa Tejpal; 2015; Nanotechnology applications in agriculture: an update. *Octa journal of environment research* 3(2):204-211.
- 17.- Dita M., Schilly A., Vargas J., Chaves N., Guzmán M., Sandoval J. y Staver C.; 2014; Endophyte microbiome of banana roots reveals high diversity and potential for agricultural uses. *Tropentag*.
- 18.- Ditta A., Arshad M. y Ibrahim M.; 2015; Nanoparticles in sustainable agricultural crop production: applications and perspectives. Springer International. Doi:10.1007/978-3-319-14502-0_4.
- 19.- Fraceto L.F., Grillo R., De Medeiros G.A., Scognamiglio V., Rea G. y Bartolucci C.; 2016; Nanotechnology in agricultura. Wich innovation potential does it have?. *Frontiers in environmental science* 4:20.
- 20.- Glass A.D.M., Brito D.T., Kaiser B.N., Kronzucker H.J., Kumar A., Okamoto M., Rawat S.R., Siddiqi M.Y., Silim S.M., Vidmar J.J. y Zhuo D.; 2001; Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164:199-207.
- 21.- Han M., Okamoto M., Beatty P.H., Rothstein S.J. y Good A.G.; 2015; The genetics of nitrogen use efficiency in crop plants. *Reviews in advance* 13:27.
- 22.- Hauck, R. D., & Bremner, J. M.; 1976; Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. *Advances in agronomy*, 28, 219-266.
- 23.- Hawkesford Malcom J.; 2017; Genetic variation in traits for nitrogen use efficiency in wheat. *Journal of experimental botany*. Doi:10.1093/jxb/erx079.
- 24.- Hobbie E.A. y Höberg P.; 2012; Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics. *New Phytologist* 196:367-382.

- 25.- Ionescu M., Zaini P.A., Baccari C., Tran S., Da Silva A.M. y Lindow S.E.; 2014; *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surface. PNAS, <https://doi.org/10.1073/pnas.1414944111>.
- 26.- Jan A.T.; 2017; Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. Front. Microbiol., <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>.
- 27.- Jha S.S., Joshi S.J. y Geetha S.J.; 2016; Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. Brazilian Journal of Microbiology 47:955-964.
- 28.- Katsir L. y Bahar O.; 2017; Bacterial outer membrane vesicles at the plant-pathogen interface. Plos pathogens, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006306>.
- 29.- Koutika L.S., Tchichelle S.V., Mareschal L. y Epron D.; 2017; Nitrogen dynamics in a nutrient-poor soil under mixed-species plantations of eucalypts and acacias. Soil Biology and Biochemistry 108:84-90.
- 30.- Lammerts van Bueren E. y Struik P.; 2017; Diverse concepts of breeding for nitrogen use efficiency. A review. Agron. Sustain. Dev. 37:50.
- 31.- Li H., Hu B. y Chu C.; 2017; Nitrogen use efficiency in crops: lessons from *Arabidopsis* and rice. Journal of experimental botany. Doi: 10.1093/jxb/erx101.
- 32.- Ma Z., Geudens N., Kieu N.P., Sinnaeve D., Ongena M., Martins J.C. y Höfte M.; 2016; Biosynthesis, chemical structure and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas*. Frontiers in Microbiology 7:382.
- 33.- Macedo-Raygoza G.M.; 2013; Análisis de enzimas hidrolíticas de la pared y la membrana celular secretadas por bacterias endófitas como un factor antifúngico contra *Mycosphaerella fijiensis*. (Tesis de maestría).

- 34.- Macedo-Raygoza G.M.; 2010; Análisis fisiológico y molecular de la sensibilidad a fungicidas en cepas del hongo *Mycosphaerella fijiensis* obtenidas de las regiones productoras de plátano de Jalisco, Tabasco y Colima: Desarrollo de un mapa geográfico de resistencia. (Tesis de licenciatura).
- 35.- Machovina B. y Feeley K.; 2014; Climate change driven shifts in the extent and location of areas suitable for export area productions. *Ecological economics* 95:83-95.
- 36.- Mattiello A. y Marchiol L.; 2017; Application of nanotechnology in Agriculture: Assessment of TiO₂ nanoparticles effects on barley. *Intech Open Science*. [Http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68710](http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68710).
- 37.- Mehnaz, S.; 2011; Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer Berlin Heidelberg. (pp. 165-187).
- 38.- Montesinos-Navarro A., Verdú M., Querejeta J.I., Sortibrán L. y Valiente-Banuet A.; 2016; Soil fungi promote nitrogen transfer among plants involved in long-lasting facilitative interactions. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics*. <http://dx.doi.or/10.1016/j.ppees.2016.01.004>.
- 39.- Mooshammer M., Wanek W., Hämmerle I., Fuchslueger L., Hofhansl F., Knoltsch A., Schneckner J., Takriti M., Watzka M., Wild B., Keiblinger K.M., Zechmeister-Boltenstern S. y Richter A.; 2014; Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon:nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nature communications* 5:3694.
- 40.- Parisi C., Vigani M. y Rodríguez-Cerezo E.; 2014; Agricultural Nanotechnologies: what are the current possibilities?. *Science direct* 10:124-127.

- 41.- Perchlik M. y Tegeder M.; 2017; Improving plant nitrogen use efficiency through alteration of amino acids transport processes. *Plant physiology* 175:235-247.
- 42.- Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C.M. y Bakker P.A.H.M.; 2014; Induce systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopatol*, 52:347-75.
- 43.- Ploetz R.C. y Evans E.A.; 2015; The future of global banana production. *Horticultural reviews*. 43:311-351.
- 44.- Sabir S., Arshad M. y Chaudhari S.K.; 2014; Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. Hindawi Publishing Corporation. [Http://dx.doi.org/10.1155/2014/925494](http://dx.doi.org/10.1155/2014/925494).
- 45.- Sajjad Mirza, M., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., & Malik, K. A.; 2001; Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, 237(1), 47-54.
- 46.- Schmidt S., Näsholm T. y Rentsch D.; 2014; Organic nitrogen. *New phytologist*, 203:29-31.
- 47.- Schwechheimer C. y Kuehn M.J.; 2015; Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*. 13(10):605-619.
- 48.- Sekhar A.C. y Thomas P.; 2015; Isolation and identification of shoot-tip associated endophytic bacteria from banana cv. Grand naine and testing from antagonistic activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *American journal of planta science* 6:943-954.

- 49.- Sevik, H. y Guney, K.; 2013; Effects of IAA, IBA, NAA, and GA3 on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. Stem cuttings. The scientific world journal, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/909507>.
- 50.- Sharma V., Bhardwaj B., Shivani, Pundir R.K. y Tiwari S.; 2017; Identification and molecular characterization of endophytic bacteria isolates from *Musa* rhizomes. IOSR-JECE 12(6):2278-2834.
- 51.- Shi, H., Chen L., Ye T., Liu X., Ding K., Chan Z.; 2014; Modulation of auxins content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. Plant Physiology and biochemistry 82:209-217.
- 52.- Schoebitz M., Ceballos C. y Ciampi L.; 2013; Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. J. Soil Sci. Plant Nutr. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000001>.
- 53.- Silva H.S.A., Tozzi J.P.L., Terrasan C.R.F. y Bettioli W.; 2012; Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. Biological control 63:62-67.
- 54.- Söderström Kajsa; 2012; Nutrient effects on microorganism communities in nutrient poor soils. Swedish University of Agricultural Sciences. Faculty of Natural Resources and Agricultural Science.
- 55.- Souza A., Cruz J.C., Sousa N.R., Procópio A.R.L., Silva G.F., 2014; Endophytic bacteria from banana cultivars and their antifungal activity. Genet. Mol. Res. 13(4): 8661-8670.
- 56.- Tan K., Li R., Huang X. y Liu Q.; 2018; Outer membrane vesicles: current status and future direction of these novel vaccine adjuvants. Front. Microbil., doi: 10.3389/fmicb.2018.00783.

- 57.- Thangavelu R. y Gopi M.; 2015; Field suppression of *Fusarium* wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions. *Phytopathologia mediterranea* 54(2):241-252.
- 58.- Thomas P. y Soly T.A.; 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.
- 59.- Todeschini M., Milioli A.S., Trevizan D.M., Bornhofen E., Finatto T., Storck L. y Benin G.; 2016; Nitrogen use efficiency in modern wheat cultivars. *Soil and plant nutrition* 75(3):351-361.
- 60.- Yoo H.S. y Ting A.S.Y, 2017; *In vitro* endophyte-host plant interaction study to hypothetically describe endophyte survival and antifungal activities *in planta*. *Acta Bio Szeged* 61(1):1-11.
- 61.- You J., Yang S.Z. y Mu B.Z.; 2015; Structural characterization of lipopeptides from *Enterobacter* sp. strain N18 reveals production of surfactin homologues. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117:890-898.
- 62.- Zakaria L., Izham M., Jamil M. y Anuar I.S.M.; 2016; Molecular characterization of endophytic fungi form roots of wild banana (*Musa acuminata*). *Tropical life science research* 27(1):153-162.

ANEXOS

Asistencia a los siguientes congresos:

2015-09 Quinto Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Cartel: Evaluación del proceso de colonización y determinación de los efectos benéficos de las bacterias endófitas de banano.

2017-09 Sexto Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Cartel: *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella variicola* endófitos antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis* y bacterias promotoras de crecimiento de plántulas de banano.

Cartel: Efecto de nanopartículas de Au y Ag en raíces de banano y su papel en la colonización de *Enterobacter cloacae* endófito de banano.

2015-06 XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cartel: Evaluación del proceso de colonización y determinación de los efectos benéficos de las bacterias endófitas de banano.

2014-11 XXX Congreso Nacional de Bioquímica: Evaluación del proceso de colonización y determinación de los efectos benéficos de las bacterias endófitas de banano.

2017-11 7 Symposium mexican proteomics society Mass Spectrometry Based Omics. Cartel: Low mass molecules and peptides as a response of banana plants and endophytic bacteria interactions to Ag and Au nanoparticles with MALDI-IMAGING perspective.

Y se hicieron las siguientes publicaciones:

Research Paper

Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México

Alejandra Aguilar-Barragan¹, Ana Elisa García-Torres¹, Olga Odriozola-Casas²,
Gloria Macedo-Raygoza², Tetsuya Ogura¹, Gilberto Manzo-Sánchez³,
Andrew C. James⁴, Ignacio Islas-Flores⁵, Miguel J. Beltrán-García¹

¹Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco México.

²Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali B.C., México.

³Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Colima, Campus Tecomán,
Tecomán, Colima, México.

⁴Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida Yucatán, México.

⁵Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán,
Mérida, Yucatán, México.

Submitted: March 9, 2013; Approved: September 9, 2013.

Abstract

The chemical management of the black leaf streak disease in banana caused by *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) requires numerous applications of fungicides per year. However this has led to fungicide resistance in the field. The present study evaluated the activities of six fungicides against the mycelial growth by determination of EC₅₀ values of strains collected from fields with different fungicide management programs: Rustic management (RM) without applications and Intensive management (IM) more than 25 fungicide application/year. Results showed a decreased sensitivity to all fungicides in isolates collected from IM. Means of EC₅₀ values in mg L⁻¹ for RM and IM were: 13.25 ± 18.24 and 51.58 ± 46.14 for azoxystrobin, 81.40 ± 56.50 and 1.8575 ± 2.11 for carbendazim, 1.225 ± 0.945 and 10.01 ± 8.55 for propiconazole, 220 ± 67.66 vs. 368 ± 62.76 for vinclozolin, 9.862 ± 3.24 and 54.5 ± 21.08 for fludioxonil, 49.2125 ± 34.11 and 112.25 ± 51.20 for mancozeb. A molecular analysis for β-tubulin revealed a mutation at codon 198 in these strains having an EC₅₀ greater than 10 mg L⁻¹ for carbendazim. Our data indicate a consistency between fungicide resistance and intensive chemical management in banana fields, however indicative values for resistance were also found in strains collected from rustic fields, suggesting that proximity among fields may be causing a fungus interchange, where rustic fields are breeding grounds for development of resistant strains. Urgent actions are required in order to avoid fungicide resistance in Mexican populations of *M. fijiensis* due to fungicide management practices.

Key words: banana, fungicides, *Mycosphaerella fijiensis*, sensitivity, Sigatoka.

Introduction

Banana and plantain are constantly exposed to adverse conditions that are affecting their production. Currently two fungal diseases have threatened the production of bananas in the world, the black Sigatoka, also known as black leaf streak disease (BLSD) caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorph *Pseudocercospora*

fijiensis Morelet) and the Panama disease caused by *Fusarium oxysporum* cubense race 4 (FOC)(Grimm, 2008). Detrimental crop losses have led to a debate about the future of banana production. In Mexico the banana industry is widely affected by BLSD. Since its emergence in the southern state of Chiapas, Mexico in 1980's, the disease has spread rapidly in almost all banana-producing areas in the

Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection

Esteban Beltran-Gracia, Gloria Macedo-Raygoza,
Juan Villafaña-Rojas, America Martinez-Rodriguez,
Yur Yenova Chavez-Castrillon,
Froylan M. Espinosa-Escalante, Paolo Di Mascio,
Tetsuya Ogura and Miguel J. Beltran-Garcia

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/64236>

Abstract

Lipopeptides constitute an important class of microbial secondary metabolites. Some lipopeptides have potent therapeutic activities such as antibacterial, antiviral, antifungal, antitumor and immunomodulator. Surfactin, iturin, fengycin, lichenysin and bacillomycin D from *Bacillus* species, daptomycin from *Streptomyces roseosporus* and rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are among the most studied lipopeptides. These molecules are good candidates to replace those antibiotics and antifungals with no effect on pathogenic microorganisms. Microbial lipopeptides are produced via fermentation processes by bacteria, yeast and actinomycetes either on water miscible and immiscible substrates. However, the major bottlenecks in lipopeptide production are yield increase and cost reduction. Improving the bioindustrial production processes relies on many issues such as selecting hyperproducing strains and the appropriate extraction techniques; purification and identification by Polymerase Chain Reaction (PCR), High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS); the use of cheap raw materials and the optimization of medium-culture conditions. The purpose of this chapter is to orient the reader on the key elements in this field, including the selection of analytical strategies to get a good microbial strain as well as to show some examples of liquid and solid-state low-cost fermentation processes. Last, we introduce endophytic bacteria as lipopeptide-producer candidates.

ENDOPHYTIC BACTERIA AND RARE EARTH ELEMENTS; PROMISING CANDIDATES FOR NUTRIENT USE EFFICIENCY IN PLANTS

Katia R. Prieto*, **Francisco Echaide-Aquino****, **Aurora Huerta-Robles[†]**, **Hellen P. Valério***, **Gloria Macedo-Raygoza[†]**, **Fernanda M. Prado***, **Marisa H.G. Medeiros***, **Hermi F. Brito***, **Ivan G.N. da Silva***, **Maria C.F. Cunha Felinto[†]**, **James F. White, Jr.[§]**, **Paolo Di Mascio***, **Miguel J. Beltran-García****

**Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

***Autonomous University of Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Mexico*

[†]Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico

[§]Nuclear and Energy Research Institute (IPEN-CQMA), São Paulo, Brazil

[§]Rutgers University, New Brunswick, NJ, United States

INTRODUCTION

The world population is expected to increase from 7.1 billion (currently) to 9 billion by 2050. Expanding agriculture to feed the growing population will increase pressure on the world's natural resources (land, water, and air). Future food production needs will be approximately double the current demands. About 5.024 billion ha of the world's land is used for food production (including pastureland and cropland). On the other hand, chemical fertilizers that contain nitrogen, phosphorous, and potassium (NPK) are one of the expensive inputs used by farmers to achieve desired crop yields. However in most intensive agricultural production systems, over 50% of the N applied to the field is not used by the plants and is lost by leaching into the soil. That incomplete capture and poor conversion of N fertilizer also causes global warming through emissions of nitrous oxide and also the emission of toxic ammonia into the atmosphere that can contribute to acidification. N fertilizer also contributes to soil degradation, diminishes water quality and eventually leads to public health problems.¹ It has been estimated that the overall efficiency of these applied fertilizers is approximately 50% for nitrogen, 5% for P, and close to 40% for K.

Over the past 50 years N-fertilizer application has increased 20-fold and its application is projected to increase to 180 million tons by 2030. Moreover, N-fertilizer prices have climbed more than 2.5-fold over the past decade.² So the use and efficiency of nutrients for different environments and conditions will need to be calculated. For crops nutrient use efficiency (NUE) may be defined as a ratio of output (total plant N, grain N, biomass yield, and grain yield) and input (total N, soil N, or