



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Efecto de la co-inoculación de *A. agilis* UMCV2 y diversos
fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa***

TESIS

Como requisito para obtener el título profesional de
QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA:

KAREN ALOHA ZAVALA CASTILLO

Asesor de tesis: D.C. Eduardo Valencia Cantero

Co-asesora: M.C. Idolina Flores Cortez

Morelia, Michoacán. Agosto de 2015.



Este trabajo se realizó en el instituto de investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en el Laboratorio de Ecología Microbiana, bajo la dirección del D.C. Eduardo Valencia Cantero. Agradezco el financiamiento de este trabajo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto No. SEP-CONACYT CB-2009-01-128341 “Relación entre la comunidad bacteriana rizosférica y la absorción de hierro por plantas con estrategia de absorción de Fe I y II y moderadamente ácido. Continuación”.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecerle a mi asesor de tesis el **D.C. Eduardo Valencia Cantero** por haberme dado la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo desde el servicio social y por compartir conmigo sus conocimientos, su experiencia y su tiempo, sin los cuales no podría haber llevado a cabo este proyecto. Así como también le quiero agradecer la paciencia y la motivación que me brindó para seguir adelante tanto en mi vida profesional como personal.

A la M.C. Idolina Flores Cortez por haberme ayudado en la realización de este proyecto, por compartir sus conocimientos conmigo y su tiempo.

A mis compañeros de laboratorio Diana, Edgar, Liz, Ramiro, Daniel, Miguel, Rocío, Cristina y Julie por darme ánimo en los momentos difíciles, por compartir sus conocimientos conmigo y ayudarme cuando más lo necesitaba.

A mis revisores de tesis M.C. José Arnoldo López Álvarez, M.C. Lorena Martínez Alcantar, M.C. Luz Elena Arévalo León, M.C. Diana Cecilia Maya Cortés y D.C. Josué Altamirano Hernández, gracias por el tiempo que dedicaron a revisar este proyecto de tesis.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico especialmente a mis padres Julio **César Zavala Partida** y **Aloa Castillo Santibáñez** por su apoyo y amor incondicional, por darme la fortaleza y la motivación necesaria para poder superar todos los momentos difíciles de mi vida y por inspirarme a perseverar y poner dedicación en todos y cada uno de los aspectos de mi vida, gracias.

También a mis hermanos **Janette y Julio César**, que han sido mis mejores amigos y cómplices, mi mayor motivación para seguir adelante y que me han hecho reír aun en los momentos de tristeza.

Así mismo, le dedico este trabajo a **Emilio Guzmán Chávez**, por apoyarme en todos y cada uno de los aspecto de mi vida, por brindarme amor, paciencia, tiempo y comprensión en todos estos años que hemos pasado juntos y por brindarme los momentos más felices de mi vida al compartir su vida conmigo.

Karen Aloha Zavala Castillo

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs)	5
2.1.1. Mecanismos directos de acción de las PGPRs	6
2.1.2. Mecanismos indirectos de acción de las PGPRs	7
2.2. Uso de bioinoculantes para biocontrol en cultivos agrícola	10
2.3. <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 como PGPR y agente de biocontrol	11
2.4. <i>Botrytis cinerea</i>	14
2.4.1. Ciclo de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	15
2.5. <i>Phytophthora cinnamomi</i>	16
2.5.1. Ciclo de infección de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	17
2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.7. <i>Medicago sativa</i>	20
2.8. Importancia económica en México de <i>Medicago sativa</i>	23
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo general	27
5.2. Objetivos particulares	27

6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Material biológico.....	28
6.1.1. <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2.....	28
6.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1).....	28
6.1.3. <i>Botrytis cinerea</i>	29
6.1.4. <i>Phytophthora cinnamomi</i>	29
6.1.5. Plantas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) 59 N49.....	30
6.2. METODOLOGÍA	31
6.2.1. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos <i>In vitro</i>	31
6.2.2. Efecto de los VOCs producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos.....	32
6.3. Experimentos realizados <i>in vivo</i> en plantas de <i>Medicago sativa</i>	34
6.3.1. Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 y diversos fitopatógenos en plantas de <i>Medicago sativa</i>	35
6.3.2. Efecto de la co-inoculación de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 con diversos fitopatógenos en plantas de <i>Medicago sativa</i>	36
6.3.3. Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 previamente inoculado en plantas de <i>Medicago sativa</i> con diversos fitopatógenos.....	37
6.4. Variables a evaluar.....	37
6.5. Análisis estadístico.....	37
7. RESULTADOS	38
7.1. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos <i>in vitro</i>	38

7.2. Efecto de los VOCs producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos.....	41
7.3. Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 y diversos fitopatógenos en plantas de <i>Medicago sativa</i>	45
7.3.1. Clorofila.....	47
7.3.2. Altura.....	47
7.3.3. Número de hojas trifoliadas.....	48
7.3.4. Biomasa aérea.....	49
7.3.5. Biomasa de la raíz.....	49
7.4. Efecto de la co-inoculación de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 con diversos fitopatógenos en plantas de <i>Medicago sativa</i>	50
7.4.1. Clorofila.....	52
7.4.2. Altura.....	52
7.4.3. Número de hojas trifoliadas.....	53
7.4.4. Biomasa aérea.....	54
7.4.5. Biomasa de la raíz.....	54
7.5. Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 previamente inoculado en plantas de <i>Medicago sativa</i> frente a diversos fitopatógenos.....	55
7.5.1. Clorofila.....	57
7.5.2. Altura.....	57
7.5.3. Número de hojas trifoliadas.....	58
7.5.4. Biomasa aérea.....	59
7.5.5. Biomasa de la raíz.....	59

8. DISCUSIÓN.....	60
9. RESUMEN DE RESULTADOS.....	65
10. CONCLUSIÓN.....	65
12. LITERATURA CITADA.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento de semillas de <i>Medicago sativa</i>	12
Figura 2. <i>A. agilis</i> UMCV2 promueve el crecimiento y desarrollo de plántulas de <i>M. sativa</i>	13
Figura 3. Efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i>	14
Figura 4. Morfología de la planta de <i>Medicago sativa</i>	22
Figura 5. <i>A. agilis</i> , crecida en medio AN.....	28
Figura 6. <i>P. aeruginosa</i> , crecida en medio AN	28
Figura 7. <i>B. cinerea</i> crecido en medio PDA	29
Figura 8. <i>P. cinnamomi</i> , crecido en medio PDA	30
Figura 9. Sistema utilizado para observar el efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> y <i>P. cinnamomi</i>	31
Figura 10. Sistema utilizado para observar el efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento bacterial de <i>P. aeruginosa</i> PaO1	32
Figura 11. Sistema utilizado para observar el efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento del micelio de <i>B. cinerea</i> y <i>P. cinnamomi</i>	33
Figura 12. Sistema utilizado para observar el efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento bacterial de <i>P. aeruginosa</i> PaO1.....	34

Figura 13. Sistema usado para la realización de los diferentes experimentos en plantas de <i>Medicago sativa in vivo</i> , empleando <i>A. agilis</i> UMCV2 y diversos fitopatógenos	35
Figura 14. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i>	38
Figura 15. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i>	39
Figura 16. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento bacterial de <i>P. aeruginosa</i> PaO1.....	40
Figura 17. Efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i>	42
Figura 18. Efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i>	43
Figura 19. Efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento micelial de <i>P. aeruginosa</i>	44
Figura 20. Efectos de la inoculación de <i>A. agilis</i> UMCV2 y diversos fitopatógenos en plantas de <i>Medicago sativa</i> , después de estar en contacto por 30 días	46
Figura 21. Efectos de la co-inoculación de <i>A. agilis</i> UMCV2 con diversos fitopatógenos en plantas de <i>Medicago sativa</i> , después de estar en contacto por 30 días	51
Figura 22. Efectos de la inoculación previa de <i>A. agilis</i> UMCV2 en plantas de <i>Medicago sativa</i> frente a diversos fitopatógenos, después de estar en contacto por 30 días.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>B. cinerea</i>	15
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>P. cinnamomi</i>	17
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>P. aeruginosa</i>	19
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>M. sativa</i>	21

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Superficie y valor de producción de alfalfa en México.....	23
Gráfica 2. Distribución de la producción de alfalfa en México (2012).....	24
Gráfica 3. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i>	39
Gráfica 4. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento del micelio de <i>P. cinnamomi</i>	40
Gráfica 5. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en el crecimiento bacterial de <i>P. aeruginosa</i> PaO1	41
Gráfica 6. Efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> sobre el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i>	43
Gráfica 7. Efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> sobre el crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i>	44
Gráfica 8. Efecto de los VOCs de <i>A. agilis</i> sobre el crecimiento micelial de <i>P. aeruginosa</i>	45
Gráfica 9. Cantidad de clorofila (mg/g) de plantas de <i>M. sativa</i> , que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y <i>A. agilis</i> UMCV2, después de 30 días	47
Gráfica 10. Altura (cm) de las plantas de <i>M. sativa</i> , que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y <i>A. agilis</i> UMCV2, después de 30 días.....	48

Gráfica 11. Número de hojas trifoliadas en plantas de <i>M. sativa</i> , que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y <i>A. agilis</i> UMCV2, después de 30 días	48
Gráfica 12. Biomasa aérea de plantas de <i>M. sativa</i> , que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y <i>A. agilis</i> UMCV2, después de 30 días.....	49
Gráfica 13. Biomasa de la raíz de plantas de <i>M. sativa</i> , que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y <i>A. agilis</i> UMCV2, después de 30 días.....	49
Gráfica 14. Cantidad de clorofila (mg/g) en plantas de <i>M. sativa</i> , que fueron co-inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2 y los diversos fitopatógenos, después de 30 días.....	52
Gráfica 15. Altura (cm) de las plantas de <i>M. sativa</i> , que fueron co-inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados, después de 30 días.....	53
Gráfica 16. No. de hojas trifoliadas de las plantas de <i>M. sativa</i> , que fueron co-inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados, después de 30 días.....	53
Gráfica 17. Biomasa aérea (gr) en plantas de <i>M. sativa</i> , que fueron co-inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2 y los diversos fitopatógenos, después de 30 días.....	54
Gráfica 18. Biomasa de la raíz de las plantas de <i>M. sativa</i> , que fueron co-inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados, después de 30 días.....	54

Gráfica 19. Cantidad de clorofila (mg/g) en plantas de <i>M. sativa</i> , previamente inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días.....	57
Gráfica 20. Altura (cm) de las plantas de <i>M. sativa</i> , previamente inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días.....	58
Gráfica 21. Número de hojas trifoliadas de plantas de <i>M. sativa</i> , previamente inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días.....	58
Gráfica 22. Biomasa aérea (g) en plantas de <i>M. sativa</i> , previamente inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días.....	59
Gráfica 23. Biomasa de la raíz (g) en plantas de <i>M. sativa</i> , previamente inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días.....	59

RESUMEN

Una alternativa empleada para combatir enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, que limitan fuertemente la producción agrícola, es el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPRs) que antagonicen a dichos agentes infecciosos. Este trabajo de tesis se realizó con el objetivo de conocer si es posible conferir resistencia a las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), tras su inoculación con *A. agilis* UMCV2 en condiciones *in vivo*, frente a diversos fitopatógenos. Por lo anterior, se establecieron diferentes tratamientos para co-inocular las plantas de *Medicago sativa* con *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamomi* y *Pseudomonas aeruginosa*, para conocer si es posible dicho efecto. Dichas plantas se dejaron en condiciones de invernadero por 30 días y, posteriormente se midió la cantidad de clorofila, la altura, el número de hojas trifoliadas, la biomasa aérea y de raíz, con la finalidad de monitorear los efectos producidos por las diferentes co-inoculaciones.

Las condiciones ambientales *in vivo*, no fueron las adecuadas para que los fitopatógenos infectaran las plantas de alfalfa y adicionalmente, de forma inesperada *Botrytis cinerea* favoreció el aumento de la cantidad de clorofila.

Sin embargo, la clorofila, la altura y el número de hojas trifoliadas, fueron los parámetros que mayormente se vieron favorecidos en las plantas de alfalfa, las cuales fueron previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y después con los fitopatógenos, que al ser inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos al mismo tiempo.

Adicionalmente, también se estableció un sistema *in vitro*, donde se demostró que *A. agilis* UMCV2 es una bacteria que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos, debido a compuestos orgánicos volátiles de dicha bacteria.

Palabras clave: PGPRs, *Arthrobacter agilis*, conferir resistencia, co-inoculaciones, compuestos orgánicos volátiles.

ABSTRACT

An alternative used to combat diseases caused by pathogenic fungi as *Botrytis cinerea* and the oomycete *Phytophthora cinnamomi*, which strongly limit agricultural production is the use of plant growth promoting microorganisms (PGPRs) that antagonize these infectious agents. This thesis was carried out in order to know if it is possible to confer on alfalfa plants (*Medicago sativa*) resistance after inoculation with *A. agilis* UMCV2 *in vivo*, against various pathogens. Therefore, different treatments were established co-inoculated plants *Medicago sativa* with *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamomi* and *Pseudomonas aeruginosa*, to know if this effect is possible. These plants were left in a greenhouse for 30 days and subsequently the amount of chlorophyll was measured height, the number of trifoliolate leaves, and root biomass, in order to monitor the effects of the different co-inoculations. *In vivo* environmental conditions, it was not appropriate to infect phytopathogenic alfalfa plants and additionally, *Botrytis cinerea* unexpectedly led to increases in the amount of chlorophyll. However, chlorophyll, height and number of trifoliolate leaves were the parameters that were favored mostly in alfalfa plants, which were previously inoculated with *A. agilis* UMCV2 and then with the pathogens, which when inoculated *A. agilis* UMCV2 with phytopathogenic and simultaneously. Additionally, an *in vitro* system, where it was shown that *A. agilis* UMCV2 is a bacterium having the ability to inhibit the growth of pathogens due to volatile organic compounds from the bacteria was also established.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que limitan fuertemente la producción agrícola son las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. Por lo cual, una alternativa para combatir las enfermedades causadas por estos fitopatógenos es emplear microorganismos promotores del crecimiento vegetal que antagonicen a los agentes infecciosos. Existen una gran variedad de bacterias capaces de antagonizar hongos por diversos mecanismos, como son la producción de sideróforos (Santoyo *et al.*, 2010) la producción de antibióticos (Valencia-Cantero *et al.*, 2005) y la competencia por espacios de colonización en las raíces (Handelsman y Stabb, 1996). Recientemente se ha demostrado que algunas bacterias producen compuestos orgánicos volátiles (VOCs) con un fuerte efecto antifúngico (Xu *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2007). Particularmente, la bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2, la cual fue aislada de la rizósfera de plantas de maíz, se caracteriza por su efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas de frijol y de alfalfa, (Valencia-Cantero *et al.*, 2007). Así como también se demostró que dicha bacteria, es capaz de producir compuestos volátiles que pueden inhibir el crecimiento de *B. cinerea* *in vitro* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue conocer si es posible conferir resistencia a las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), tras su inoculación con *A. agilis* UMCV2 en condiciones *in vivo*, frente a diversos fitopatógenos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs)

En años recientes se ha retomado interés en el uso de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs por su siglas en inglés (**P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacterias), las cuales, habitan en la rizósfera de las plantas, pueden penetrar al interior de las raíces como poblaciones endófitas (Gray y Smith, 2005) y pueden tener un efecto positivo sobre los cultivos (Kloepper y Schroth, 1978). Un amplio número de géneros bacterianos están considerados dentro de esta clasificación: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter*, entre otros (Kennedy *et al.*, 2004).

Las rizobacterias pueden promover el crecimiento por al menos dos grupos de mecanismos que no son mutuamente excluyentes: los mecanismos directos y los mecanismos indirectos.

Los mecanismos directos se denominan así porque influyen directamente sobre el metabolismo de las plantas, promoviendo el aumento de la toma de agua y nutrientes, el desarrollo del sistema radical y otros órganos, así como también la estimulación del funcionamiento de otros microorganismos benéficos presentes en la rizósfera. Mientras que los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento consisten fundamentalmente en la supresión de organismos fitopatógenos por la producción de metabolitos inhibitorios o por la inducción de resistencia natural en la planta, por lo que se considera que ejercen un papel de biocontrol de patógenos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006).

Las PGPRs reportadas hasta el momento han sido aisladas de las raíces de una amplia gama de especies, tales como la cebada, el arroz, la col, el maíz y el frijol entre muchas otras (García-Juárez *et al.*, 2010).

2.1.1 Mecanismos directos de acción de las PGPRs

Los mecanismos directos empleados por bacterias, son muy diversos y en algunos casos poco estudiados (Ahmad *et al.*, 2006). Sin embargo, se pueden diferenciar claramente dos procesos directos esenciales. El primero consiste en la producción de sustancias orgánicas, producto del metabolismo secundario de las bacterias e inclusive enzimas, que son capaces de promover respuestas fisiológicas específicas en las células vegetales (Ahmad *et al.*, 2006) a esto se le denomina fitoestimulación (Ortiz-Castro *et al.*, 2013). Dentro de estas sustancias se cuentan las fitohormonas como auxinas, giberelinas y citocininas y de vitaminas (García de Salamone *et al.*, 2005), pero también se considera como mecanismo directo la regulación bacteriana de los niveles de etileno de la planta que al disminuir permiten un mayor desarrollo de la raíz (Muhammad *et al.*, 2007).

El segundo mecanismo se puede encontrar en la intervención directa de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos, en los cuales pueden hacer disponibles compuestos orgánicos e inorgánicos que son aprovechados por las plantas (Ahn *et al.*, 2007). Ejemplo de esto son la fijación simbiótica de nitrógeno y reducción bacteriana del hierro (Valencia-Cantero *et al.*, 2007; Onofre-Ortega 2013).

2.1.2 Mecanismos indirectos de acción de las PGPRs

En cuanto a los mecanismos indirectos, las rizobacterias promueven el crecimiento vegetal antagonizando patógenos mediante la producción de sideróforos, antibióticos, ácido cianhídrico, enzimas degradantes de pared celular, por la producción de lipopéptidos y péptidos no ribosomales, compuestos que reducen el crecimiento o actividad de patógenos o causan su muerte según se ha probado bajo condiciones de invernadero y de campo (Kloepper *et al.*, 1980).

La producción de sideróforos constituye un mecanismo dual de promoción de crecimiento vegetal, ya que además de aumentar la disponibilidad de hierro a las plantas, coadyuva en el control biológico de agentes fitopatógenos. Al secuestrar el hierro del suelo y hacerlo aprovechable para sí mismos y para las células vegetales que son capaces de asimilar el complejo bacteriano sideróforo-hierro, los microorganismos estimuladores de crecimiento limitan de este modo la cantidad disponible de este elemento en el suelo para otros microorganismos (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

Por su parte, la síntesis de antibióticos es el mecanismo más comúnmente asociado con la capacidad de una PGPR para inhibir fitopatógenos (Chet y Inbar, 1994; Whipps, 1997). La habilidad de algunas bacterias de suprimir hongos patógenos depende de su habilidad de producir antibióticos como pioluteorina, pirronitrina, ácido fenacin-1-carboxílico y 2,4-diacetilfloroglucinol (Picard *et al.* 2000). Otros compuestos son el cianuro de hidrógeno (HCN) y/o enzimas líticas,

que incluyen quitinasa, β -1,3 glucanasa, proteasas y lipasas (Friedlender *et al.*, 1993).

El género *Bacillus* se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza (Chatterjee *et al.*, 2007). La mayoría de los *Bacillus spp.* producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

Numerosos estudios sugieren la utilización de *B. subtilis* para controlar biológicamente diversos hongos fitopatógenos, tales como *Cercospora kikuchii* (Soldano *et al.*, 2010), *Rhizoctonia solani* (Montealegre *et al.*, 2003), *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum* (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha demostrado que algunas bacterias producen compuestos orgánicos volátiles (VOCs) con un fuerte efecto antifúngico (Xu *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2007).

Los VOCs producidos por las especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, entre otros, han demostrado su capacidad para inhibir o antagonizar el crecimiento de patógenos de las plantas (Carreras, 2011) pero la identificación de estos compuestos y el estudio de su actividad antifúngica cuando se suministra como compuestos puros no siempre es posible (Kai *et al.*, 2007).

La competencia por espacios en la rizósfera es otro mecanismo de antagonizar organismos patógenos (Haas y Keel 2003). Los sitios predilectos para el crecimiento bacteriano son las uniones de entre las células epidérmicas y los puntos del origen de las raíces laterales. Una vez que los microorganismos del suelo colonizan las raíces de las plantas ocupan espacios y consumen nutrientes que de otra manera podrían ser aprovechados por agentes fitopatógenos (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

Un mecanismo indirecto adicional resulta de la interacción directa entre las PGPRs y la planta hospedera. En este caso, se estimulan reacciones de defensa del hospedero frente a la enfermedad, mediante un proceso denominado resistencia sistémica inducida (ISR), contra múltiples bacterias patógenas, hongos y virus en una planta huésped, esta respuesta ha sido observada en el tomate, el pimiento y el pepino entre otros cultivos. La ISR es desencadenado por la colonización de la rizósfera por PGPRs, que conducen a la acumulación de ácido jasmónico endógeno (Pieterse *et al.* 2012). Hasta la fecha, la investigación se ha llevado a cabo para determinar si las cepas de PGPRs pueden provocar ISR en un rango mayor de plantas hospederas (Camelo *et al.*, 2011).

Las PGPRs también pueden ser inductores de los procesos de resistencia sistémica adquirida (o SAR, por sus siglas en inglés) de las plantas a diferentes agentes fitopatógenos como *Blumeria graminis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Pseudomonas syringae* y *Fusarium culmorum* (Ramos-Solano *et al.*, 2008). En las plantas, la SAR es una respuesta de resistencia globalizada de la planta que ocurre después de que una planta es expuesta al contacto con un patógeno o un U.M.S.N.H.

producto derivado de éste. En un sentido amplio, la resistencia sistémica adquirida de las plantas es equivalente a las respuestas del sistema inmune de los animales al ataque de patógenos. Después de una exposición temprana y localizada a ciertos organismos infecciosos, la SAR activa los mecanismos de resistencia a nivel de planta completa contra una amplia variedad de patógenos. Se ha demostrado que la colonización endofítica de plántulas de cacao por *Trichoderma* activa las cascadas de señalización de defensa vegetales. La SAR se asocia con la inducción de una gran variedad de genes (genes PR's o relacionados con la patogénesis) y requiere la acumulación de ácido salicílico endógeno (Bailey *et al.*, 2006).

2.2 Uso de bioinoculantes para biocontrol en cultivos agrícolas

Los biofertilizantes, también conocidos como bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes del suelo, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) y que son agregados a los cultivos agrícolas para estimular su crecimiento y productividad (Aguado-Santacruz G., 2012). Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes, son todos aquellos que presentan la capacidad de promover el crecimiento vegetal (PGPRs) y/o la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Lucy *et al.*, 2004).

Los biofertilizantes pueden incluir microorganismos que tienen tanto la capacidad de incrementar la captación o disponibilidad de nutrientes como la de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Manjula y Podile, 2001; Guo *et al.*,

2004). Por ejemplo, existen algunas bacterias versátiles que presentan diversos mecanismos como es el caso de *Bacillus subtilis* que produce auxinas que promueven el crecimiento de tomate e inducen resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*, el cual provoca marchitez y pudrición de las raíces (Gupta *et al.*, 2000). Finalmente, otra ventaja del empleo de microorganismos como un medio para controlar enfermedades en las plantas es que (a diferencia de lo que sucede con los pesticidas químicos) es menos probable que los patógenos desarrollen resistencia ante los microorganismos debido a que muchos de ellos poseen múltiples mecanismos de biocontrol.

Una característica fundamental en los organismos empleados como bioinoculantes es que deben ser rizósfera-competentes para poder ejercer su efecto benéfico sobre las plantas. Deben ser capaces de competir con otros microorganismos presentes en la rizósfera por los nutrientes secretados por la raíz y por los espacios físicos disponibles en la raíz, de lo contrario serían paulatinamente desplazados y eliminados por otros microorganismos independientemente de que estos fueran benéficos, perjudiciales o comensales (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

2.3 *Arthrobacter agilis* UMCV2 como PGPR y agente de biocontrol

Arthrobacter agilis UMCV2 es una bacteria previamente aislada de la rizósfera de maíz. Las propiedades de promoción del crecimiento vegetal de esta cepa, incluyen su capacidad para solubilizar hierro bajo condiciones alcalinas, así como la producción de señales similares a las hormonas y la producción de VOCs, que han sido caracterizados en el frijol, alfalfa, y en plantas de *Medicago truncatula*

(Valencia-Cantero *et al.*, 2007; Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013). Por otra parte, estos recientes informes han demostrado que la modulación del crecimiento de la raíz y la capacidad de reducción de hierro de las plantas inoculadas con *A. agilis* UMCV2 está relacionada con emisiones de DMHDA o dimetilhexadecilamina (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013) (Figura 1).

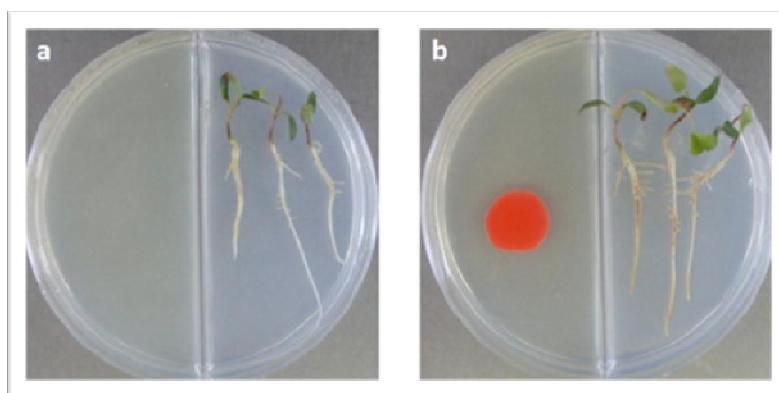


Figura 1. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento de plántulas de *Medicago sativa*, germinadas en cajas Petri divididas con medio Hoagland. A las 24 horas de su germinación, se colocó en el lado opuesto a) 50 μ L de agua desionizada estéril y b) 50 μ L de la suspensión bacteriana (1×10^9 CFU/mL-1).

Velázquez-Becerra (2011), realizó un trabajo donde determinó los efectos directos de *A. agilis* en el crecimiento de leguminosas, colocaron semillas de *M. sativa* en cajas Petri con medio Hoagland solidificado y un tratamiento de control o inoculación de *A. agilis* UMCV2 a 2.5 cm de la semilla, 10 días después de la inoculación determinaron que la bacteria aumentó en un 40% el peso fresco de la planta y la longitud del tallo en comparación con los controles (Figura 2).

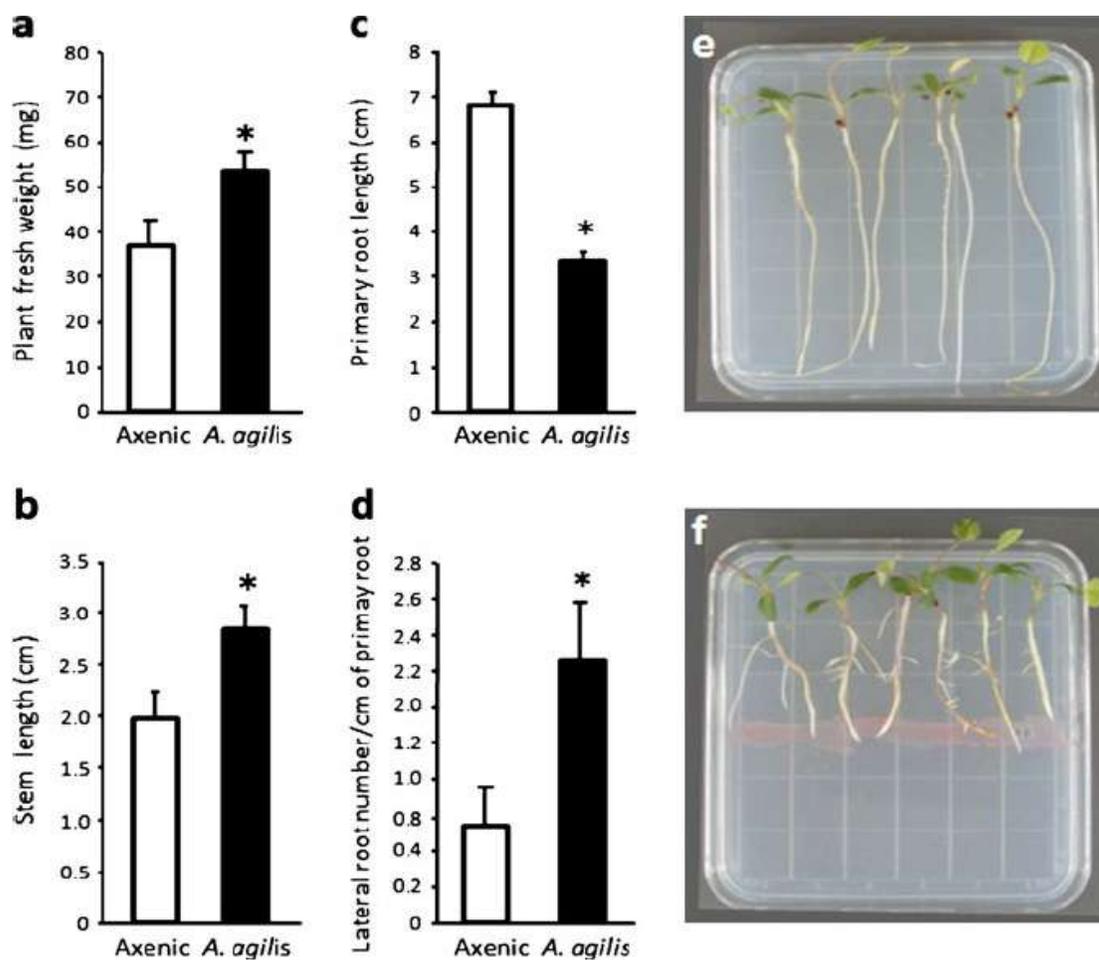


Figura 2. *A. agilis* UMCV2 promueve el crecimiento y desarrollo de plántulas de *M. sativa*, las cuales fueron germinadas en placas de medio Hoagland. *A. agilis* UMCV2 fue inoculada (f) o no (e) a 2.5 cm de distancia de las plántulas. Después de 10 días de germinación se determinó a) peso fresco de las plantas, b) longitud del tallo, c) longitud de la raíz primaria y d) número de raíces laterales, después de 10 días de germinación. Las barras de error representan el error estándar (n=24), los asteriscos indican diferencia estadística significativa, Student's test ($p < 0.05$).

Mostrando claramente, un efecto positivo sobre su desarrollo y demostrando que *A. agilis* UMCV2 es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal. Además, también se ha demostrado que la bacteria tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *B. cinerea* a través de emisiones de compuestos orgánicos volátiles entre un 15% y 35%, al ser co-inoculado en placas de Petri divididas donde se inoculó *A. agilis* antes de *B. cinerea* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013).

Demostrándose que *A. agilis* puede actuar tanto como bacteria promotora del crecimiento vegetal como agente de biocontrol de diversos fitopatógenos (Figura 3).

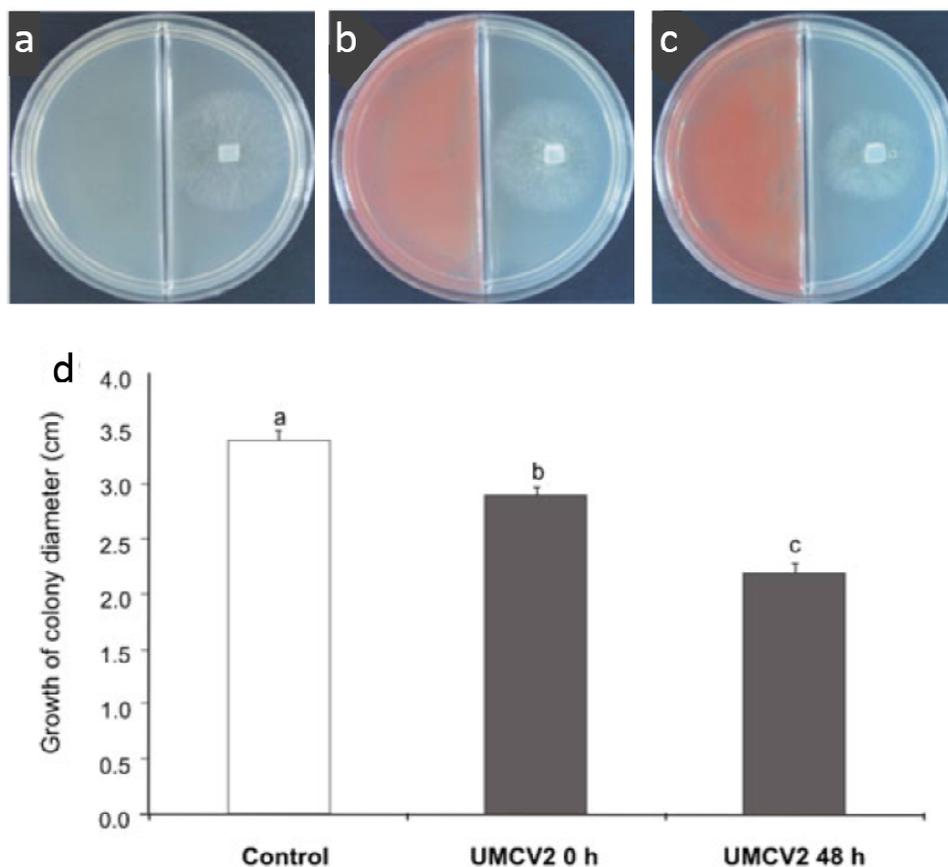


Figura 3. Efecto de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2 0 h, c) *A. agilis* UMCV2 48 h y d) inhibición del crecimiento micelial, después de 5 días. Las barras de error representan el error estándar (n = 4). Las letras son utilizadas para denotar diferencia estadística según la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$).

2.4 *Botrytis cinerea*

B. cinerea (tabla 1) es uno de los hongos fitopatógenos más importantes y ampliamente distribuidos en la naturaleza, debido a su ciclo infectivo y a su naturaleza saprófita que le permite vivir sobre material vegetal muerto o previamente infectado por otros patógenos (Staats *et al.*, 2007). Después de la

infección y muerte de los tejidos vegetales, *B. cinerea* puede sobrevivir y esporular produciendo estructuras de resistencia como los esclerocios, conidios y clamidosporas. Estas estructuras se forman en superficies y restos vegetales e incluso en el suelo (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). El género *Botrytis* afecta al menos a 235 especies de plantas, incluyendo un rango de cultivos agrónomicamente importantes como uvas, manzanas, peras, fresa, tomates y plantas ornamentales (Reis *et al.*, 2005).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>B. cinerea</i>				
Dominio	Eukarya		Familia	Sclerotiniceae
Reino	Fungi		Género	<i>Botrytis</i>
Phylum	Ascomycota		Especie	<i>cinerea</i>
Clase	Pezizomycotina			
Subclase	Leotiomycetidae			
Orden	Helotiales			
http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/botrytis-cinerea				

2.4.1 Ciclo de infección de *Botrytis cinerea*

Cuando las esporas están maduras se liberan y son transportadas por el viento o por la lluvia (Holz *et al.*, 2003). Una vez que las esporas han alcanzado la superficie del huésped (adhesión y germinación), se inicia el ciclo de infección. Su penetración en el tejido vegetal, puede ser a través de heridas o de aberturas naturales, dando lugar a el establecimiento del patógeno en la zona de

penetración, determinando la muerte de las células adyacentes y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta; en muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en la áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias; transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquéllas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Benito *et al.*, 2000).

2.5 *Phytophthora cinnamomi*

El oomycete *P. cinnamomi* (tabla 2) es un fitopatógeno que habita en el suelo, capaz de inducir enfermedades destructivas a diversas especies de plantas herbáceas, frutales, hortalizas y ornamentales, entre otras especies. Se le atribuye un rango de hospederos de más de 950 plantas (Hardham, 2005). La enfermedad considerada de gran importancia en México, causada por este patógeno, es la pudrición de raíces de aguacate, conocida como “la tristeza del aguacatero” (Téliz *et al.*, 1992.) *P. cinnamomi* ocasiona la destrucción de las puntas de las raíces, las cuales se necrosan y se desprenden fácilmente. Ocasionalmente el hongo coloniza raíces gruesas, necesitando una herida para causar infección. Raras veces causa chancros o cáncer en la base del tronco. Los síntomas en el follaje

U.M.S.N.H.

son originados por la reducción de la absorción de nutrientes y agua que no pueden ser transportados de forma ascendente. La falta de agua también reduce la capacidad de las hojas para producir clorofila, que les da el color verde y esto ocasiona clorosis o amarillamiento de las hojas (Téliz, 2000). Las condiciones que facilitan la reproducción y diseminación del patógeno son las altas temperaturas con abundancia de agua y mal drenaje, suelos arcillosos o arenosos con un subsuelo rocoso o con capa de arcilla que interfieran con el drenaje del agua.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora cinnamomi</i>				
Dominio	Eukarya		Familia	Pythiaceae
Reino	Chromista		Género	<i>Phytophthora</i>
Phylum	Oomycota		Especie	<i>Cinnamomi</i>
Clase	Oomycetes			
Orden	Pythiales			
http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/phytophthora-cinnamomi				

2.5.1 Ciclo de infección de *Phytophthora cinnamomi*

Phytophthora cinnamomi produce clamidosporas en las raíces infectadas, las cuales pasan al suelo donde pueden sobrevivir por varios años. Las clamidosporas germinan, producen esporangios que liberan zoosporas y éstas alcanzan las raíces ya que son atraídas por los exudados radicales. Sobre estas raíces las zoosporas se enquistan, germinan y penetran la raíz, colonizando el tejido vegetal y causando necrosis o pudrición de la raíz. Uno de los mecanismos indirectos de dispersión son los movimientos de tierra que se realizan para la U.M.S.N.H.

formación de los viveros, principalmente los substratos, generalmente esta tierra no se analiza para detectar la presencia de patógenos.

Las mayores infecciones de las raíces tienen lugar en épocas cálidas del año, ya que este hongo forma sus esporangios cuando existen temperaturas de 25°C y 30.5°C y requiere además un pH de 6.5 para su buen desarrollo. En suelos donde la cantidad y frecuencia de riego es alta, si existe el hongo en el suelo, la dispersión e infestación es más rápida, y este efecto está relacionado con las zoosporas que están rodeadas de flagelos que le permiten nadar y llegar a zonas libres de la enfermedad (Hardham, 2005).

2.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria Gram-negativa que comúnmente se conoce como patógeno oportunista de infecciones nosocomiales en humanos. Sin embargo, también se considera como un patógeno de plantas. Aunque existen pocos reportes de las enfermedades que causa en las plantas, se ha encontrado que *P. aeruginosa* (tabla 3) cepa PaO1, es un patógeno de plantas como *Arabidopsis thaliana*. Para comprobar su patogenicidad en raíces de *Arabidopsis thaliana* in vitro, se usó un medio líquido para infiltrar a PaO1 en las raíces, mostrando síntomas característicos zonas negras necróticas principalmente en las puntas de las raíces. La infección fue aumentando progresivamente por las raíces hasta afectar el desarrollo total de las hojas ubicadas cerca de la base de la planta después de 2 o 3 días de la inoculación y su propagación sistémica hacia la parte superior de la planta continua aproximadamente después de 4 días de la inoculación. Después

de 7 días, el grado de los síntomas de la enfermedad se mantuvo sin cambios en las raíces en la planta que fueron cortadas en comparación a las raíces sin cortar, a pesar de que los patógenos bacterianos de las plantas requieren de una herida o abertura natural para penetrar el tejido. Una característica interesante de la patogénesis de *P. aeruginosa* en *Arabidopsis thaliana* es la perforación de las paredes celulares del mesófilo generando agujeros permanentes para obtener acceso a los nutrientes, lo que sugiere que las paredes han sido sometidas a un grado significativo de digestión enzimática por enzimas hidrolíticas antes de la formación de los agujeros (Plotnikova *et al.*, 2000; Rahme *et al.*, 1995).

Sin embargo, existe poca evidencia acerca de que esta bacteria puede sobrevivir por largos periodos en el suelo como bacterias libres (Starr, 1983).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>P. aeruginosa</i>				
Dominio	Bacteria		Familia	Pseudomonadaceae
Phylum	Proteobacteria		Género	<i>Pseudomonas</i>
Clase	Gamma proteobacteria		Especie	<i>Aeruginosa</i>
Orden	Pseudomonadales			
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100001				

2.7 *Medicago sativa*

La alfalfa, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*, es una planta utilizada principalmente como forraje, y que pertenece a la familia de las leguminosas. Las plántulas de alfalfa emergen con dos cotiledones alrededor de los cuatro días, produce una hoja unifoliada, seguido por hojas alternas trifoliadas pinadas. La planta varía en altura de 40 a 90 cm, y presenta de 5 a 20 o más tallos erectos que continuamente emergen de yemas basales y axilares de la corona conforme maduran los tallos o son cosechados; aunque también pueden emerger algunos tallos cortos durante todo el desarrollo de la planta, e inclusive durante la floración y llenado de vainas. El foliolo es oblongo de forma dentada con la nervadura central proyectada en forma lanceolada en el ápice. Cerca del 48% del peso de la planta es de hojas. El sistema radical consiste de una raíz pivotante, que en condiciones favorables puede penetrar hasta 9 metros de profundidad. La raíz principal permanece durante toda la vida de la planta, y también presenta raíces laterales las cuales son mayores en suelos compactos y menos predominantes en suelos porosos. Las flores de la alfalfa forrajera nacen en racimos oblongos multifloros (~10 flores por racimo) sobre pedúnculo no aristado, de color púrpura, amarillas o blancas, y de tipos variados. La alfalfa tiene una corola papilionacea que consiste de cinco pétalos: un estandarte largo, dos pétalos alados laterales, y dos pétalos fusionados o quillas. El pistilo consiste de un carpelo simple que desarrolla un ovario superior, un estilo frágil hueco en forma de lanza, y un estigma bien definido. El ovario contiene entre 10 a 12 óvulos. El fruto es una vaina doblada en espiral, que usualmente contiene de una a ocho semillas

pequeñas de forma riñonada, de color verde olivo. Las semillas son de 1.5 por 2.5 mm, ovales, escotadas en el ombligo, y pesan en promedio 0.8 mg. A pesar de que florece durante todo el año, la mayor floración se presenta entre marzo a julio (Del Pozo, 1983; Alarcón-Zúñiga y Cervantes-Martínez, 2012).

Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>M. sativa</i>				
Dominio	Eukarya		Familia	Fabaceae
Reino	Plantae		Tribu	Trifolieae
División	Magnoliophyta		Género	Medicago
Clase	Magnoliopsida		Especie	Sativa
Orden	Fabales			
Alarcón-Zúñiga B. y Cervantes-Martínez T., 2012				

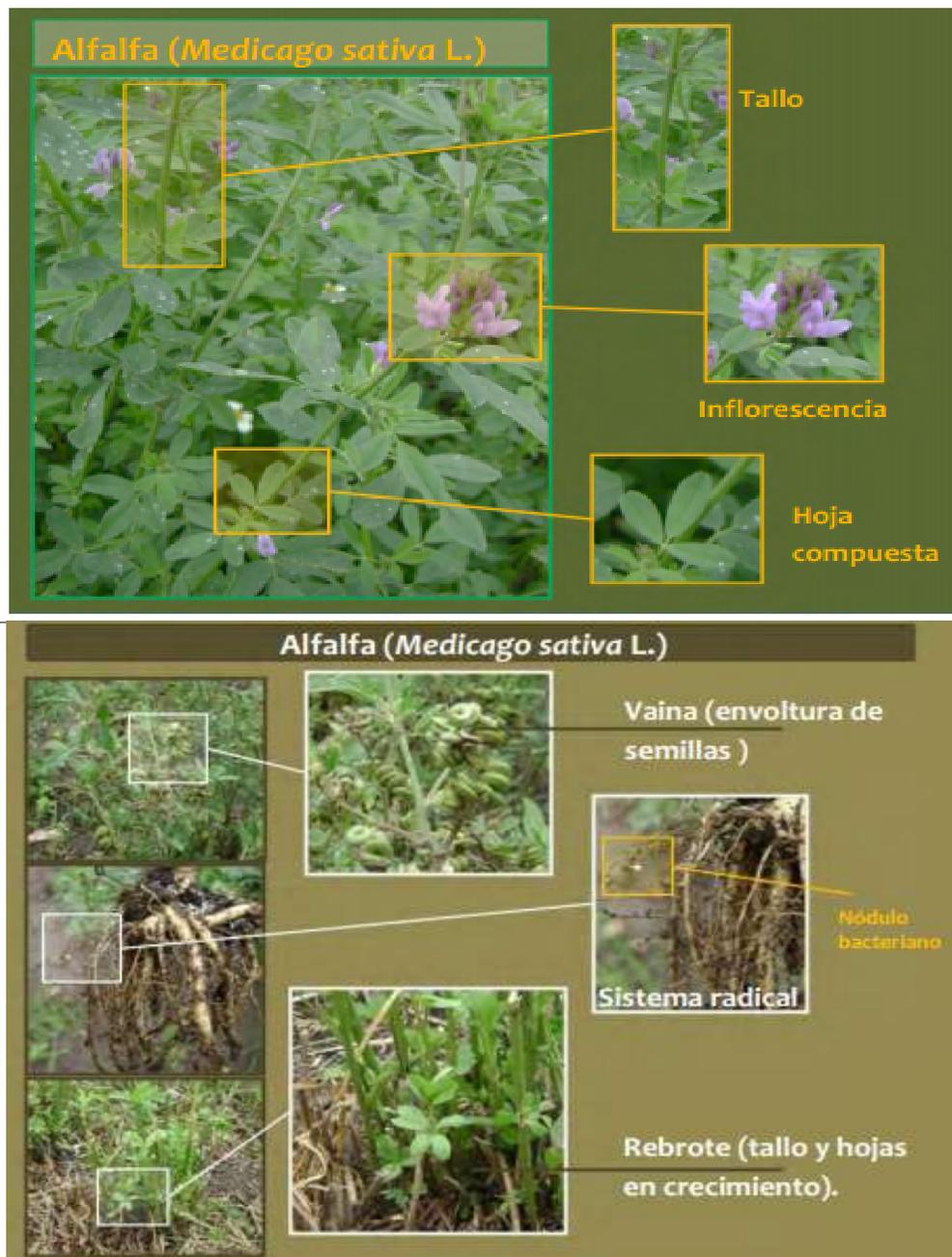
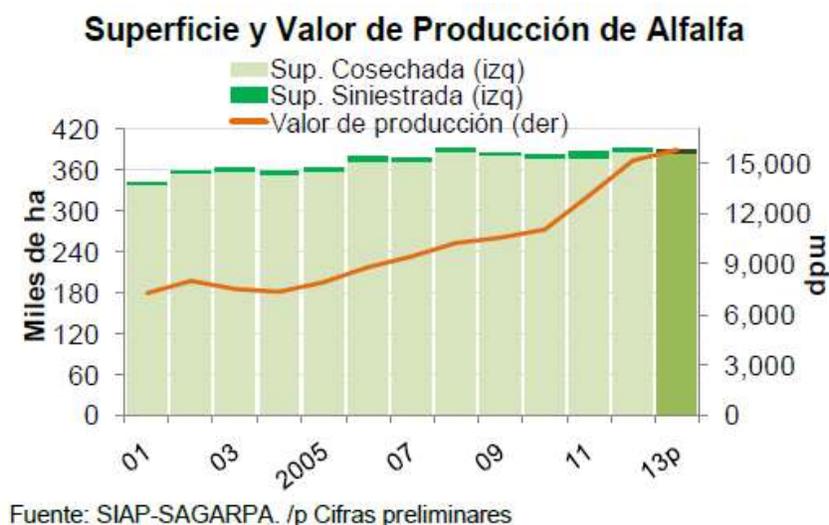


Figura 4. Morfología de la planta de *Medicago sativa* (Alarcón-Zúñiga B. y Cervantes-Martínez T., 2012).

2.8 Importancia económica en México de *Medicago sativa*

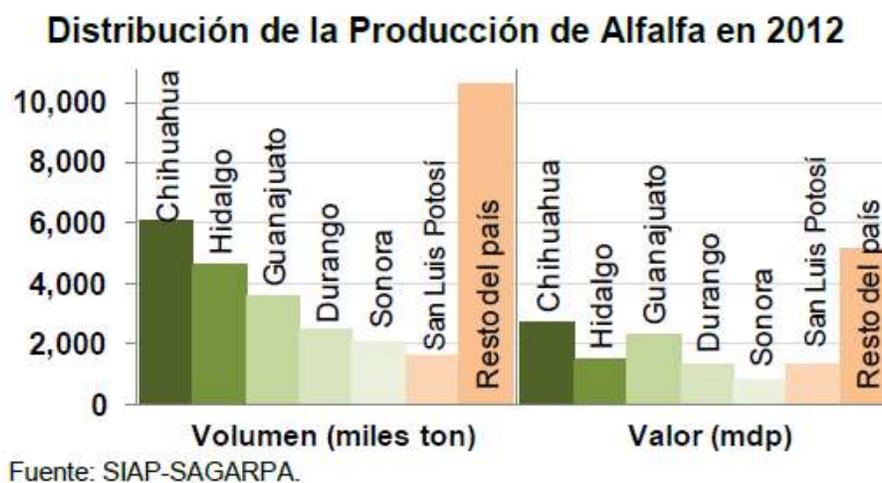
La alfalfa es una hierba perenne que ocupa el 6° lugar en la generación de valor agrícola a nivel nacional, alcanzando los 15,132 mdp en 2012. La siembra se asocia al desarrollo de la ganadería, debido a su importante uso como forraje (Salinas C.S., 2005). La superficie destinada a la alfalfa ocupa el 1.8% del total de la superficie agrícola en el país, esto es 390 mil hectáreas. La producción se ha incrementado a una tasa de 1.7% anual en los últimos diez años, alcanzando actualmente 31 millones de toneladas



Gráfica 1. Superficie y valor de producción de alfalfa en México.

Prácticamente la totalidad de la alfalfa es producida bajo riego, sin embargo, dos de los problemas que enfrenta este cultivo son los bajos rendimientos, alrededor de 80 ton/ha, y el alto consumo de agua.

Las zonas de producción se ubican cerca de las cuencas lecheras o donde existen hatos o rebaños consumidores del forraje, por lo que en el centro y norte de México es un cultivo muy popular. Cuatro estados concentran la mitad del volumen de producción de alfalfa en el país: Chihuahua, que participa con el 19.7%, Hidalgo (14.9%), Guanajuato (11.6%) y Durango (7.9%).



Gráfica 2. Distribución de la producción de alfalfa en México (2012).

La alfalfa se comercializa en pacas (henificada) y en fresco, principalmente, aunque el ensilado, técnica para conservar el forraje con un alto contenido de humedad mediante la compactación, está siendo cada vez más utilizado en los grandes establos tecnificados.

El precio medio rural de la alfalfa muestra una tendencia creciente en los últimos diez años, con un incremento de 4.8% anual, llegando en 2012 a los \$488 por tonelada. El dinamismo mostrado por el precio de este cultivo tiene una gran

correlación con el precio de la producción bovina, principalmente lechera. La alfalfa presenta problemas para su comercialización, lo cual se refleja en variaciones de precios al productor, como consecuencia, muy frecuentemente los intermediarios obtienen un alto margen de ganancia, en perjuicio de los productores y usuarios finales. Se considera que la baja producción del cultivo es ocasionada por la insuficiente disponibilidad y uso de variedades adecuadas, la incorrecta aplicación de fertilizantes, el incremento de la superficie sembrada y las técnicas “modernas” de producción que no cuentan con programas de prevención y control de malezas, plagas y enfermedades (principalmente enfermedades radiculares, destacándose las pudriciones de raíces por *Fusarium* y *Phytophthora*) (Financiera Rural, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 ha sido objeto de estudio por su capacidad de incrementar la absorción de Fe en plantas, mejorar el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. Sin embargo, en años recientes se ha demostrado que *A. agilis* UMCV2 puede ser empleada como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (*in vitro*) y también, se ha demostrado que puede actuar como un agente de biocontrol frente a diversos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* (*in vitro*). Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca en conocer si *A. agilis* UMCV2 puede actuar como un agente de biocontrol frente a diversos fitopatógenos en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), por ser uno de los cultivos forrajeros más importantes en el país. Además, se incrementaría la posibilidad de ser utilizada como uno de los componentes principales de los biofertilizantes que están teniendo un gran auge en nuestro país, como una medida de aumentar la productividad agrícola y eliminar riesgos a la salud (disminuyendo el uso de fertilizantes químicos).

4. HIPÓTESIS

Las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) presentan resistencia frente a diversos fitopatógenos por efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la co-inoculación de *A. agilis* UMCV2 y diversos fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa*.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos *in vitro*.
2. Demostrar la infección de las plantas de *M. sativa* por los fitopatógenos seleccionados *in vivo*.
3. Determinar el efecto de la co-inoculación de *A. agilis* UMCV2 con los fitopatógenos seleccionados en plantas de *Medicago sativa in vivo*.
4. Demostrar la resistencia de las plantas de *M. sativa* frente a los fitopatógenos seleccionadas por efecto de la previa inoculación de *A. agilis* UMCV2 *in vivo*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 *Arthrobacter agilis* UMCV2 aislada de la rizósfera de maíz (*Zea mays*) (Valencia-Cantero *et al.*, 2007) fue resembrada por estriado simple en placas de agar nutritivo (AN) e incubada a 25 °C en cámara de crecimiento por 3 días.



Figura 5. *A. agilis*, crecida en medio AN.

6.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)

P. aeruginosa fue resembrada por estriado en placas de agar nutritivo (AN) e incubada a 30 °C por 1 día.



Figura 6. *P. aeruginosa*, crecida en medio AN.

6.1.3 *Botrytis cinerea*

B. cinerea fue crecido en medio agar papa dextrosa (PDA). Para su diseminación, se empleó un fragmento de micelio en forma de cuadrado de 0.5 x 0.5 cm de un cultivo previamente proporcionado por el laboratorio de Ecología Microbiana, el cual se colocó en una placa nueva de PDA y se incubó a 25 °C en la obscuridad. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas adicionando agua estéril a cajas con *B. cinerea* en esporulación, removiendo parte del micelio usando una asa y retirando la solución de esporas con una micropipeta.

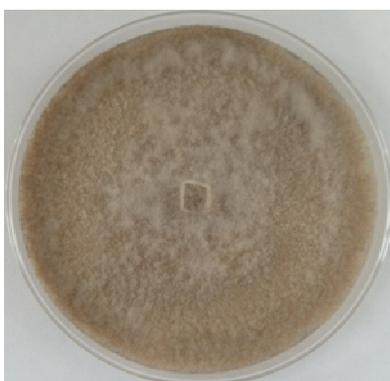


Figura 7. *B. cinerea* crecido en medio PDA.

6.1.4 *Phytophthora cinnamomi*

P. cinnamomi fue crecido en medio agar papa dextrosa (PDA), de una cepa proporcionada por el laboratorio de Ecología Microbiana. Para su propagación, se tomó un fragmento de micelio en forma de cuadrado de 0.5 x 0.5 cm, el cual se colocó en una placa nueva de PDA y se incubó a 25 °C en la obscuridad. Posteriormente, se recogió parte del micelio con 3 ml de agua estéril, se colocó en

tubos eppendorf y con ayuda de un vortex se fragmentó dicho micelio para ser utilizado como inóculo.

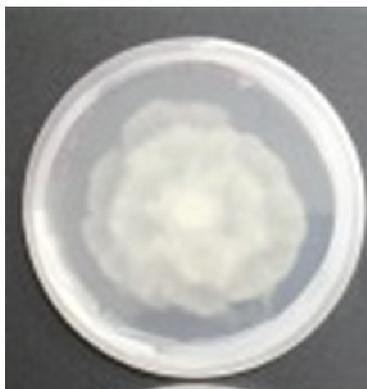


Figura 8. *P. cinnamomi*, crecido en medio PDA.

6.1.5 Plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) 59 N49

Las semillas de *Medicago sativa* se esterilizaron previamente colocándolas en varios tubos eppendorf, adicionando de 0.5-1 ml de etanol al 96%, posteriormente se agitaron por inversión y se dejaron reposar por 5 minutos. Se decantó el etanol y se agregó de 0.5-1 ml de hipoclorito de sodio al 20%, dejándolas reposar de 8-10 minutos. Se decantó el hipoclorito de sodio y se lavó cinco veces con 1ml de agua estéril. Se resuspendió en 300-500 μ l de H₂O desionizada estéril, se cubrieron los tubos eppendorf con papel aluminio y se dejaron vernalizar por 4 días a 4 °C, posteriormente se colocaron de 15 a 20 semillas de *M. sativa* en forma lineal en cajas Petri con medio MS (Murashige y Skoog), y se dejaron en la cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 22 °C durante siete días para su germinación. Posteriormente, las plántulas fueron

sometidas a diferentes tratamientos bajo condiciones *in vivo*, los cuales se explicaran más adelante.

6.2 Metodología

6.2.1 Efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos *in vitro*.

Para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de fitopatógenos como *B. cinerea* se utilizó un medio preparado con 50% de PDA y 50% de AN, se usaron cajas Petri completas divididas en cuadrantes, donde *A. agilis* UMCV2 se estrió sobre las líneas que formaron los cuadrantes y se inoculó en el centro de cada cuadrante a *B. cinerea* (un fragmento cuadrado de micelio de 0.5 x 0.5 cm de un cultivo previo en PDA) (Fig. 9), inoculando *A. agilis* UMCV2 al tiempo 0 y con 48 h de anticipación. Para determinar el efecto de *A. agilis* se midió el halo de crecimiento de *B. cinerea*. Se realizaron 2 tratamientos con sus respectivos controles (5 réplicas por tratamiento).

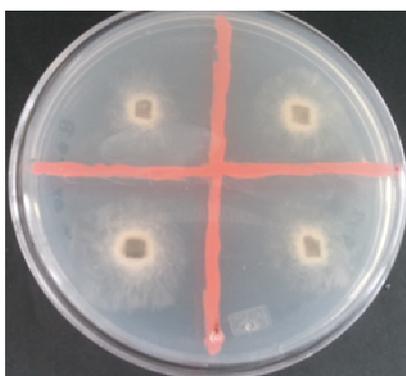


Figura 9. Sistema utilizado para observar el efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento micelial de *B. cinerea* y *P. cinnamomi*.

Para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*, se utilizó el mismo sistema explicado anteriormente.

Para evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento bacterial de *P. aeruginosa* PaO1, se usaron placas de agar nutritivo, donde *A. agilis* UMCV2 se estrió sobre las líneas que formaron los cuadrantes al tiempo 0 y con 48 horas de anticipación y en el centro de cada cuadrante se colocaron 50 μ L de *P. aeruginosa* (D.O. 0.1, A₅₉₅) (Fig. 10). Para determinar el efecto de *A. agilis* se midió el halo de crecimiento de *P. aeruginosa* (PaO1).

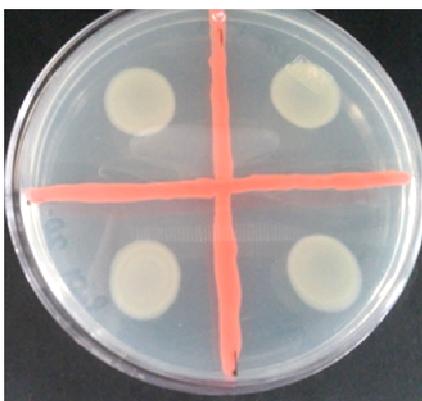


Figura 10. Sistema utilizado para observar el efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento bacterial de *P. aeruginosa* PaO1.

6.2.2 Efecto de los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos.

Para evaluar el efecto de los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *P. cinnamomi*, se utilizó el siguiente sistema: para evitar el contacto físico entre *A. agilis* UMCV2 y *B. cinerea*, se emplearon cajas Petri divididas, en las cuales en una mitad de la caja se colocó medio PDA, donde se inoculó *B. cinerea* (un fragmento cuadrado de 0.25 x 0.25 cm de un cultivo

previo en PDA) y en la otra mitad de la caja se colocó medio AN, donde se inocularon 200 μ L de *A. agilis* UMCV2 (D.O. 0.1, A_{595}) (Fig. 11). Se utilizó el mismo sistema para *A. agilis* UMCV2 con *P. cinnamomi*. Se llevaron a cabo 2 tratamientos y sus respectivos controles (5 réplicas por tratamiento). a) Inoculando los 2 microorganismos al mismo tiempo y b) Inoculando *A. agilis* UMCV2 con 48 h de anticipación. Para determinar el efecto de los VOCs de *A. agilis* se midió el halo de crecimiento micelial de *B. cinerea* y de *P. cinnamomi*.



Figura 11. Sistema utilizado para observar el efecto de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento del micelio de *B. cinerea* y *P. cinnamomi*.

Para evaluar el efecto de los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* PaO1, se utilizó el mismo sistema: usando cajas Petri divididas con medio AN. Una mitad de la caja se inoculó con 200 μ L de *A. agilis* UMCV2 (D.O. 0.1, A_{595}) y la otra se inoculó con 100 μ L de *P. aeruginosa* (D.O. 0.1, A_{595}) (Fig.12).

Inoculando los 2 microorganismos al mismo tiempo e inoculando *A. agilis* UMCV2 con 48 h de anticipación.

Para determinar el efecto de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento de *P. aeruginosa* PaO1, se recuperó a PaO1 en 2 ml de agua estéril y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a 595 nm.

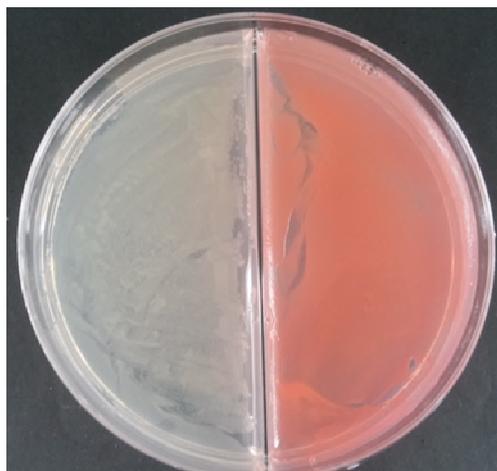


Figura 12. Sistema utilizado para observar el efecto de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* PaO1.

6.3 Experimentos realizados *in vivo* en plantas de *Medicago sativa*

Se llevaron a cabo 3 experimentos diferentes en plantas de *Medicago sativa* *in vivo*, usando *A. agilis* UMCV2 y fitopatógenos como *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *P. aeruginosa* PaO1.

Una vez esterilizadas las semillas, empleando el método anteriormente descrito, las plántulas con una radícula de aproximadamente 2 cm de longitud, fueron colocadas en frascos de la siguiente manera: se usaron 20 frascos de conserva (aproximadamente de 1 litro de capacidad) con 10 plántulas cada uno, con aproximadamente 200 gramos de sustrato de cultivo (peatmoss musgo de turba de sphagnum canadiense, perlita, piedra caliza, agente humectante) previamente estéril y con 125 ml de agua estéril cada uno (Fig. 13). Se montaron 5 tratamientos

diferentes con 4 réplicas cada uno, para determinar el efecto de la co-inoculación de *Arthrobacter agilis* UMCV2 con *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), *Arthrobacter agilis* UMCV2 con *Botrytis cinerea* y *Arthrobacter agilis* UMCV2 con *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Medicago sativa*, junto con sus respectivos controles.



Figura 13. Sistema usado para la realización de los diferentes experimentos en plantas de *Medicago sativa* *in vivo*, empleando *A. agilis* UMCV2 y diversos fitopatógenos.

6.3.1 Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversos fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa*.

Se montaron 5 tratamientos diferentes con 4 réplicas cada uno, para determinar el efecto individual de cada microorganismo (*Arthrobacter agilis* UMCV2, *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*) en plantas de *Medicago sativa*, utilizando el sistema anteriormente descrito. Como control, se inocularon 40 plántulas con 100 μ l de agua estéril. Posteriormente, se inocularon 40 plántulas con 100 μ L (D.O. 0.1, A_{595}) de *A. agilis* UMCV2 y otras 40 plántulas con 100 μ L (D.O. 0.1, A_{595}) de *P. aeruginosa* (PaO1). Se procedió igual con *B. cinerea*, al inocularse 40 plántulas con 50 μ L (100,000 esporas/ml) y

finalmente, otras 40 plántulas fueron inoculadas con 50 μ L un inóculo de *P. cinnamomi* previamente descrito en el apartado 6.1.4. Las inoculaciones se llevaron a cabo directamente en la raíz de las plántulas de alfalfa, a los 15 días se re-inocularon con las mismas concentraciones y finalmente, después de 30 días se midieron los parámetros a evaluar.

6.3.2 Efecto de la co-inoculación de *Arthrobacter agilis* UMCV2 con diversos fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa*.

Para llevar a cabo este experimento, se montó el sistema de frascos previamente descrito en el apartado 6.3.1, con la diferencia de que se realizaron co-inoculaciones, es decir, que se colocaron, al mismo tiempo y en cada una de las plantas de alfalfa, la bacteria *A. agilis* UMCV2 y los diferentes fitopatógenos.

El tratamiento usado como control, consistió en la inoculación de 40 plántulas con 100 μ l de agua estéril y para el segundo tratamiento, se inocularon otras 40 plántulas con 100 μ l (D.O. 0.1, A_{595}) de *A. agilis* UMCV2 sin la presencia de ningún patógeno. Mientras que para el tercer tratamiento, se co-inocularon 40 plántulas con 100 μ L (D.O. 0.1, A_{595}) de *A. agilis* UMCV2 junto con 50 μ L (100,000 esporas/ml) de *B. cinerea*, mientras que para el cuarto tratamiento se co-inocularon 40 plántulas con 100 μ L (D.O. 0.1, A_{595}) de *A. agilis* UMCV2 junto con 50 μ L (tomados de un inóculo previamente preparado) de *P. cinnamomi* y para el último tratamiento se co-inocularon otras 40 plántulas con 100 μ L (D.O. 0.1, A_{595}) de *A. agilis* UMCV2 junto con 100 μ L (D.O. 0.1, A_{595}) de *P. aeruginosa*. Todas y cada una de las plántulas fueron inoculadas o co-inoculadas directamente en la

raíz. A las 15 días se re-inocularon con las mismas concentraciones y después de 30 días se midieron los parámetros a evaluar.

6.3.3 Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 previamente inoculado en plantas de *Medicago sativa* con diversos fitopatógenos.

Para determinar dicho efecto, se empleó el mismo sistema de frascos anteriormente explicado en el apartado 6.3, donde se inocularon todas las plantas de *M. sativa* con 100 µl (D.O. 0.1, A₅₉₅) de *A. agilis* UMCV2. Después de 15 días, se inocularon 40 plántulas con 100 µL (D.O. 0.1, A₅₉₅) de *A. agilis* UMCV2 como control y posteriormente, se inocularon 40 plántulas con 100 µL (D.O. 0.1, A₅₉₅) de *P. aeruginosa*, otras 40 plántulas se inocularon con 50 µL (100,000 esporas/ml) de *B. cinerea* y finalmente, otras 40 plántulas fueron inoculadas con 50 µL (tomado del inóculo preparado previamente) de *P. cinnamomi*. Todas las inoculaciones se realizaron directamente en la raíz de las plántulas y después de 30 días se midieron los parámetros a evaluar.

6.4 Variables a evaluar

Después de 30 días, cada planta fue sometida a la medición de parámetros como: la altura de la parte aérea, número de hojas trifoliadas, biomasa de la parte aérea, biomasa de la raíz y clorofila.

6.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron de forma independiente dos veces y tuvieron 5 réplicas por tratamiento cada vez. Los resultados se analizaron mediante una prueba de ANOVA y una separación de medias por prueba de Duncan para comparaciones múltiples ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos *in vitro*.

En el panel b y c de la figura 14, se puede apreciar una disminución notable en el crecimiento del micelio de *B. cinerea*, debido a la inoculación de *A. agilis* UMCV2 con respecto al control (panel a), siendo mayor la inhibición al inocular *A. agilis* UMCV2 con 48 horas de anticipación (panel c). El experimento duró 3 días.

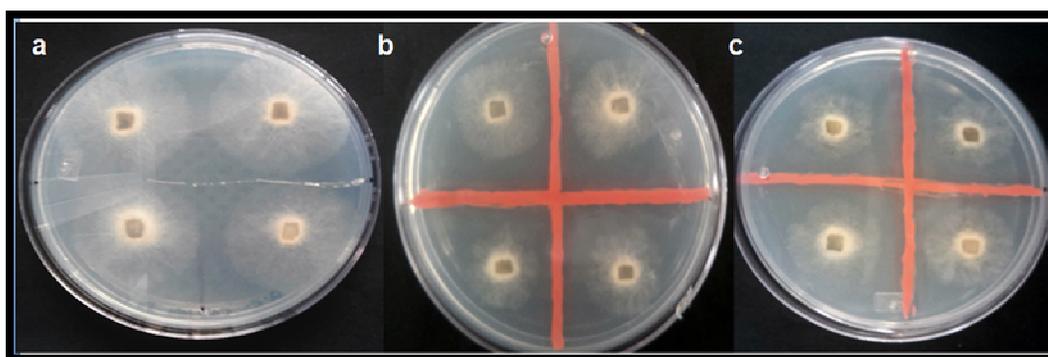
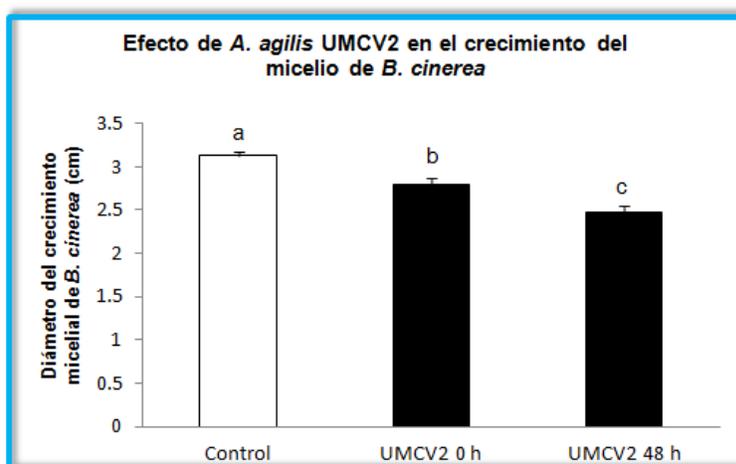


Figura 14. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento micelial de *B. cinerea*. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2 al tiempo 0 y c) *A. agilis* UMCV2 inoculado 48 horas antes.

El crecimiento del micelio de *B. cinerea*, después de 3 días, se redujo en un 10% con respecto al control, al ser inoculados al mismo tiempo con *A. agilis* UMCV2. Mientras que, al inocular *A. agilis* UMCV2 48 horas antes de estar en contacto con *B. cinerea*, el crecimiento micelial se redujo en un 21%, debido a que la bacteria tuvo más tiempo de producir los compuestos difusibles que podrían ser los responsables de la inhibición del crecimiento del patógeno, después de 3 días (Gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Las barras de error representan el error estándar ($n = 5$). Las letras denotan diferencia estadística significativa, Duncan ($p \leq 0.05$).

En la siguiente figura, se muestra una disminución en el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*, causada por la inoculación de *A. agilis* UMCV2 al mismo tiempo, con respecto al control (panel a), siendo mayor la inhibición del micelio, al inocular *A. agilis* UMCV2 con 48 horas de anticipación (panel c).

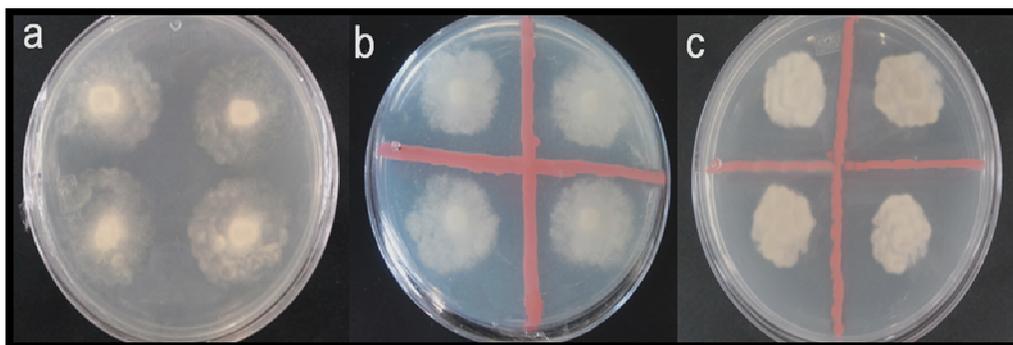
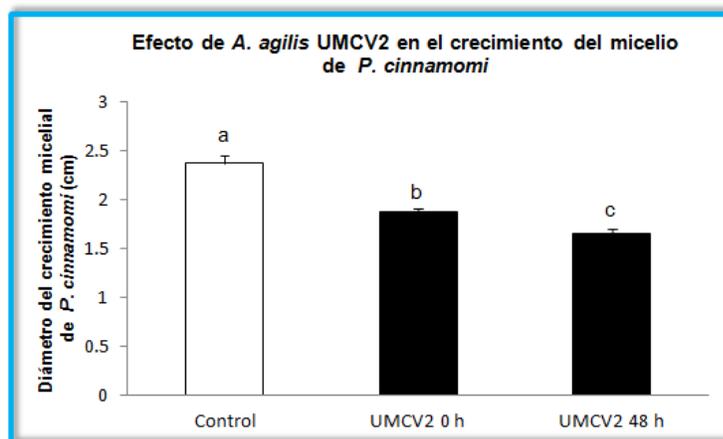


Figura 15. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2 al tiempo 0 y c) *A. agilis* UMCV2 inoculado 48 horas antes.

El crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* se redujo en un 21% al ser inoculado al mismo tiempo con *A. agilis* UMCV2. Por otro lado, al inocularse *A. agilis* UMCV2

48 horas antes, el micelio de *P. cinnamomi* presentó una disminución del 30% con respecto al control, después de 3 días (Gráfica 4).



Gráfica 4. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento del micelio de *P. cinnamomi*. Las barras de error representan el error estándar ($n = 5$). Las letras denotan diferencia estadística significativa, Duncan ($p \leq 0.05$).

En la figura 16, se puede observar una reducción en el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* PaO1, generada por la inoculación de *A. agilis* UMCV2 al mismo tiempo (panel b), con respecto al control (panel a). Sin embargo, se muestra una mayor inhibición del micelio al inocular *A. agilis* UMCV2 con 48 horas de anticipación (panel c).

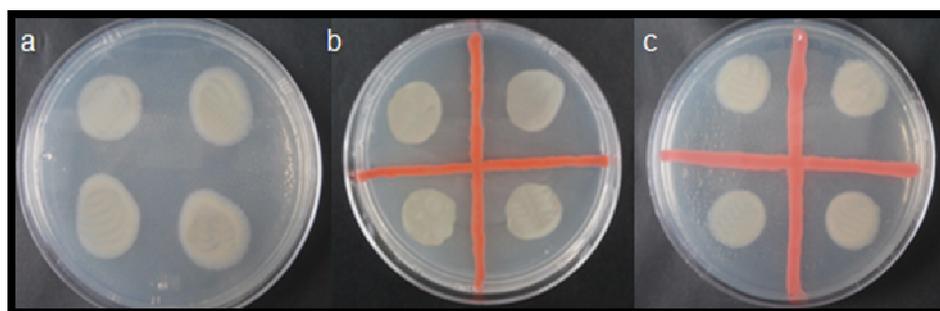
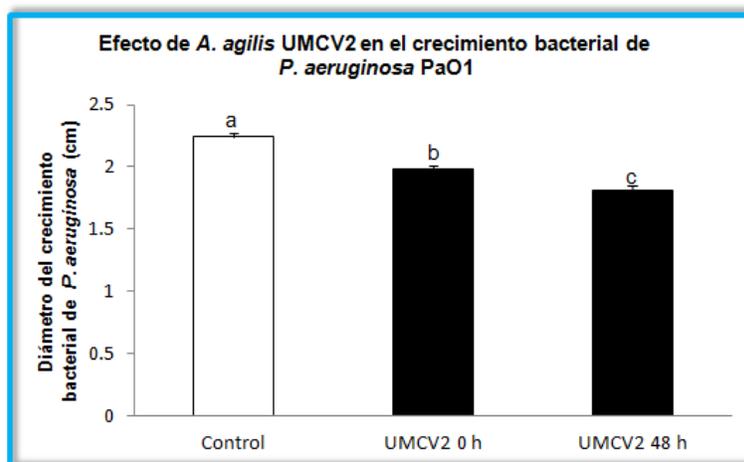


Figura 16. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* PaO1. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2 al tiempo 0 y c) *A. agilis* UMCV2 inoculado 48 horas antes.

El crecimiento bacterial de *P. aeruginosa* (PaO1) se redujo en un 11.6%, al estar en contacto simultáneo con *A. agilis* UMCV2. Sin embargo, se observó una disminución del 18.9% del crecimiento de la bacteria al inocular *A. agilis* UMCV2 48 horas antes, lo cual permitió una mayor concentración de los compuestos difusibles responsables de su inhibición, después de 3 días (Gráfica 5).



Gráfica 5. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento bacterial de *P. aeruginosa* PaO1. Las barras de error representan el error estándar (n = 5). Las letras denotan diferencia estadística significativa, Duncan ($p \leq 0.05$).

7.2 Efecto de los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de diversos fitopatógenos vía VOCs.

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *A. agilis* UMCV2 lograron reducir el crecimiento de los fitopatógenos como *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *Pseudomas aeruginosa*, mostrándose una mayor inhibición del crecimiento de los patógenos cuando se inoculó *A. agilis* UMCV2 con 48 horas de anticipación, demostrando de esta manera el efecto fungistático de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 reportado por Velázquez-Becerra y colaboradores (2013).

En la figura 17, después de 5 días se observa una disminución en el crecimiento micelial de *B. cinerea*. Después de haberse inoculado al mismo tiempo *A. agilis* UMCV2 con el hongo (panel b), mientras que en el panel c, se inoculó a la bacteria 48 horas antes.

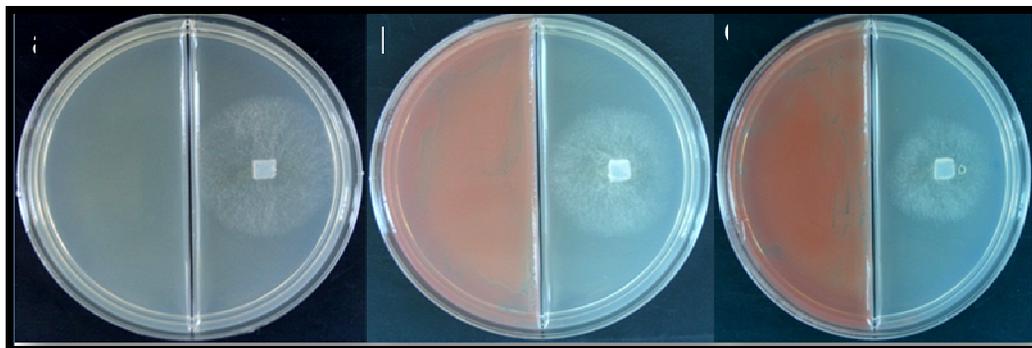
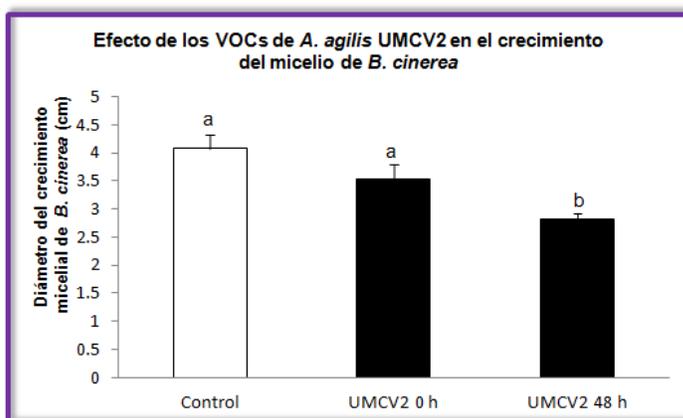


Figura 17. Efecto de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2 0 h y c) *A. agilis* UMCV2 48 h. Después de 5 días.

Cuando los dos microorganismos se inocularon al mismo tiempo, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Sin embargo, donde la bacteria se inoculó con 48 h de anticipación, la inhibición fue de un 31%, lo cual pudo deberse a que *A. agilis* UMCV2 tuvo más tiempo de producir una mayor concentración de los VOCs posiblemente responsables de la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* (Gráfica 6).



Gráfica 6. Efecto de los VOCs de *A. agilis* sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. Las barras de error representan el error estándar ($n = 5$). Las letras son utilizadas para denotar diferencia estadística según la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$).

En la siguiente figura, se muestra la reducción del crecimiento micelial de *P. cinnamomi* después de haberse inoculado *A. agilis* UMCV2 al mismo tiempo que el hongo (panel b) y al inocularse la bacteria 48 horas antes (panel c), con respecto al control (panel a).

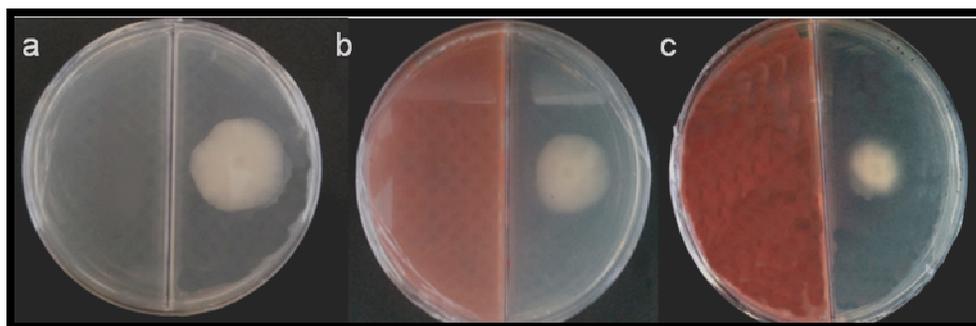
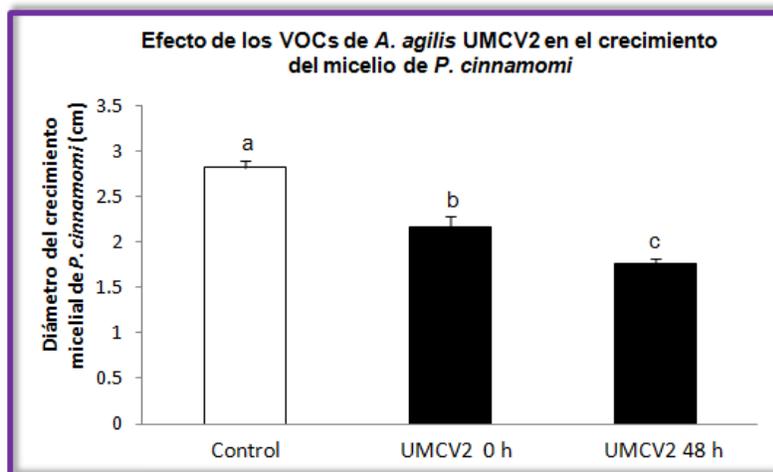


Figura 18. Efecto de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2 0 h y c) *A. agilis* UMCV2 48 h. Después de 5 días.

Cuando los dos microorganismos se inocularon al mismo tiempo, hubo una reducción del crecimiento micelial de *P. cinnamomi* de un 23%. Mientras que donde la bacteria se inoculó 48 horas antes, la inhibición fue de 38%, lo cual se

podría deber a una mayor concentración de los VOCs de *A. agilis* UMCV2, después de 4-5 días (Gráfica 7).



Gráfica 7. Efecto de los VOCs de *A. agilis* sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*. Las barras de error representan el error estándar ($n = 5$). Las letras son utilizadas para denotar diferencia estadística según la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$).

En la siguiente figura, se muestra la reducción del crecimiento bacterial de *P. aeruginosa* al inocular las bacterias al mismo tiempo (panel b) y al inocular *A. agilis* UMCV2 48 horas antes (panel c), con respecto al control (panel a), después de 2 días.

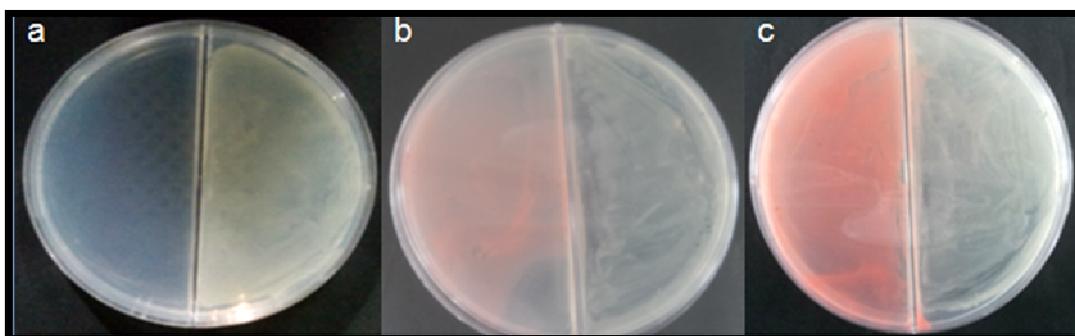
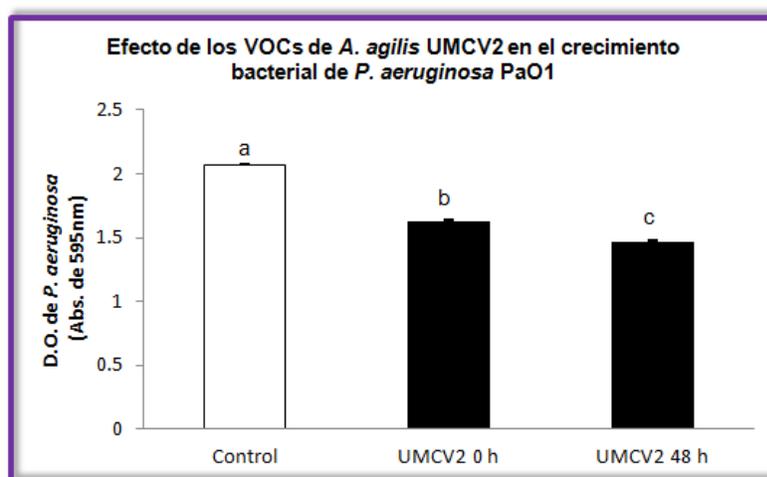


Figura 19. Efecto de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento micelial de *P. aeruginosa*. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2 0 h y c) *A. agilis* UMCV2 48 h. Después de 2 días.

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento bacterial de *P. aeruginosa* se midió la densidad óptica (D.O.) después de estar en contacto con *A. agilis* UMCV2. Cuando las dos bacterias se inocularon al mismo tiempo, se obtuvo una reducción del crecimiento bacterial de *P. aeruginosa* de un 21%, mientras que donde *A. agilis* UMCV2 se inoculó 48 horas antes, la inhibición fue de 29%, lo cual se pudo deber a una mayor concentración de los VOCs de *A. agilis* UMCV2, después de 2 días (Gráfica 8).



Gráfica 8. Efecto de los VOCs de *A. agilis* sobre el crecimiento micelial de *P. aeruginosa*. Las barras de error representan el error estándar ($n = 5$). Las letras son utilizadas para denotar diferencia estadística según la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$).

7.3 Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversos fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa*.

Se llevó a cabo la inoculación de *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados en plantas de *M. sativa*, bajo condiciones de invernadero (Fig. 20). A los 15 días se realizó una re-inoculación debido a que las plantas de alfalfa no presentaron síntomas de infección. Sin embargo, después de 30 días, las plantas de alfalfa continuaron con una ausencia de infección (hojas o raíces necróticas).

Por lo que se midieron parámetros como clorofila, altura, número de hojas trifoliadas, biomasa aérea y biomasa de las raíces, para determinar algún efecto en las plantas. A continuación se muestran las gráficas con los resultados obtenidos.

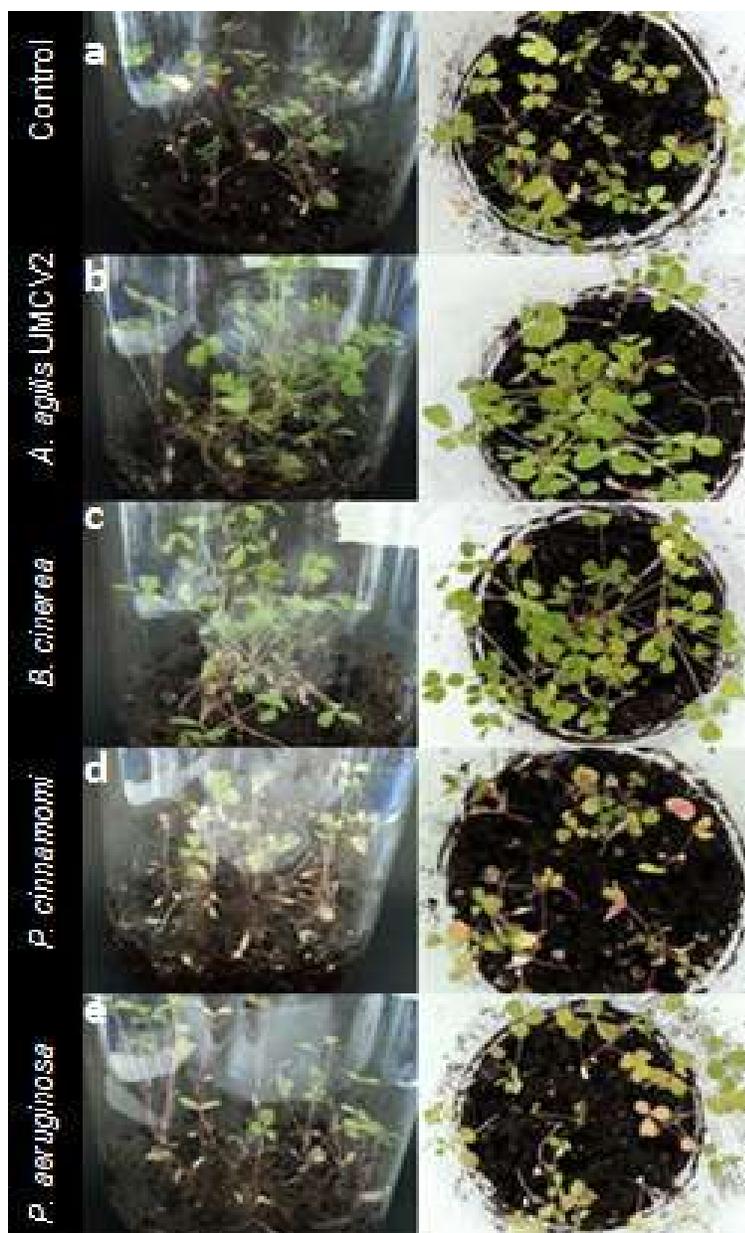
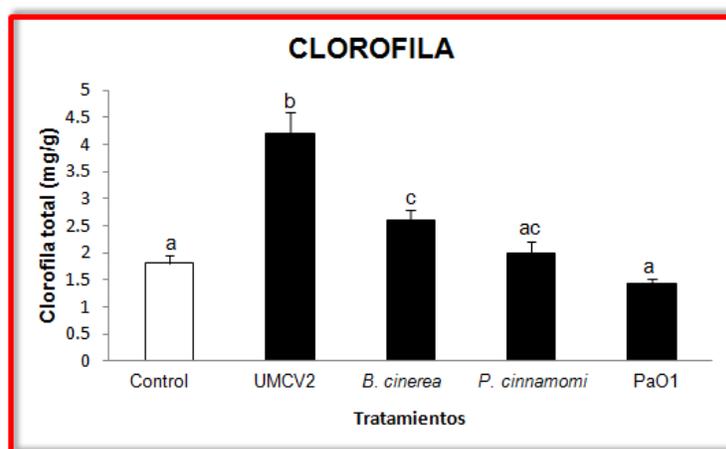


Figura 20. Efectos de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 y diversos fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa*, después de estar en contacto por 30 días. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2, c) *B. cinerea*, d) *P. cinnamomi* y e) *P. aeruginosa* PaO1.

7.3.1 Clorofila

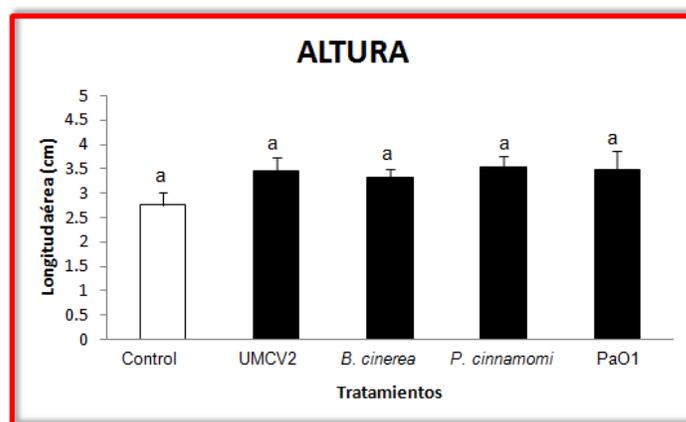
La concentración de clorofila en las plantas de *M. sativa* aumentó en un 130% al ser inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y con *B. cinerea* aumentó en un 40%, comparado con el control. Con respecto a los demás tratamientos, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas comprado con el control (Gráfica 9).



Gráfica 9. Cantidad de clorofila (mg/g) de plantas de *M. sativa*, que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y *A. agilis* UMCV2, después de 30 días. Las barras representan el error estándar, Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.3.2 Altura

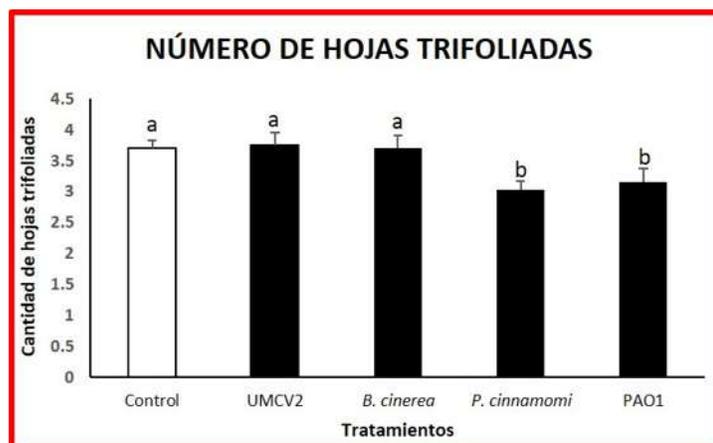
En la gráfica 10, se observa que con respecto a las plantas de *M. sativa* que fueron inoculadas con los diferentes tratamientos, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control.



Gráfica 10. Altura (cm) de las plantas de *M. sativa*, que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y *A. agilis* UMCV2, después de 30 días. Las barras representan el error estándar, Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$

7.3.3 Número de hojas trifoliadas

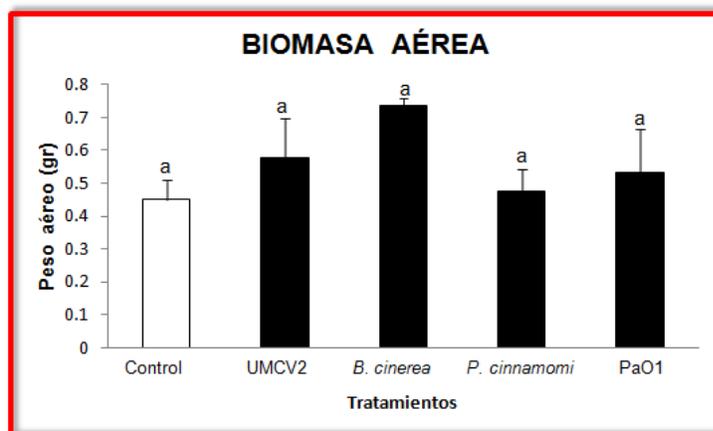
En la gráfica 11, se puede apreciar que las plantas de *M. sativa* inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y *B. cinerea* no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Sin embargo, aquellas plantas inoculadas con *P. cinnamomi* y *P. aeruginosa* PaO1, mostraron una disminución del 18% en el número de hojas trifoliadas con respecto al control.



Gráfica 11. Número de hojas trifoliadas en plantas de *M. sativa*, que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y *A. agilis* UMCV2, después de 30 días. Las barras representan el error estándar, Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.3.4 Biomasa aérea

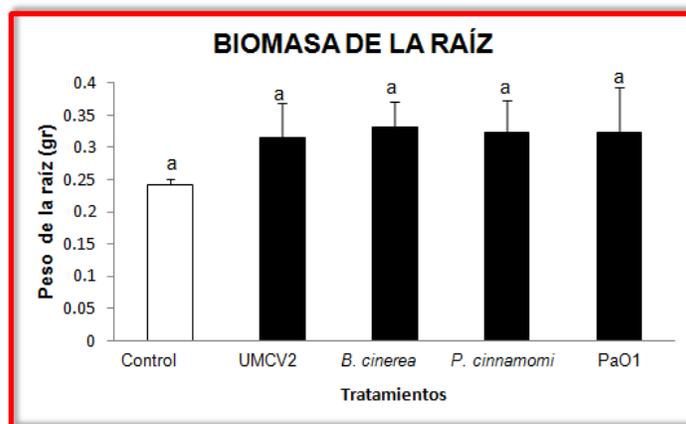
En la gráfica 12, se muestra que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al control.



Gráfica 12. Biomasa aérea de plantas de *M. sativa*, que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y *A. agilis* UMCV2, después de 30 días. Las barras representan el error estándar, Duncan $p \leq 0.05$, $n=4$.

7.3.5 Biomasa de la raíz

En la siguiente gráfica, se muestra que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los diferentes tratamientos con respecto al control.



Gráfica 13. Biomasa de la raíz de plantas de *M. sativa*, que estuvieron en contacto con los fitopatógenos seleccionados y *A. agilis* UMCV2, después de 30 días. Las barras representan el error estándar, Duncan $p \leq 0.05$, $n=4$.

7.4 Efecto de la co-inoculación de *Arthrobacter agilis* UMCV2 con diversos fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa*.

Se realizó la co-inoculación de *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados en plantas de *M. sativa*, bajo condiciones de invernadero para determinar si *A. agilis* UMCV2 generó algún efecto sobre las plantas ya sea como PGPR o agente de biocontrol, al evitar o retrasar la infección que podrían ocasionar los fitopatógenos. Los parámetros a evaluar fueron los siguientes: clorofila, biomasa aérea, biomasa de las raíces, altura y número de hojas trifoliadas. A continuación se muestran las gráficas con los resultados obtenidos.

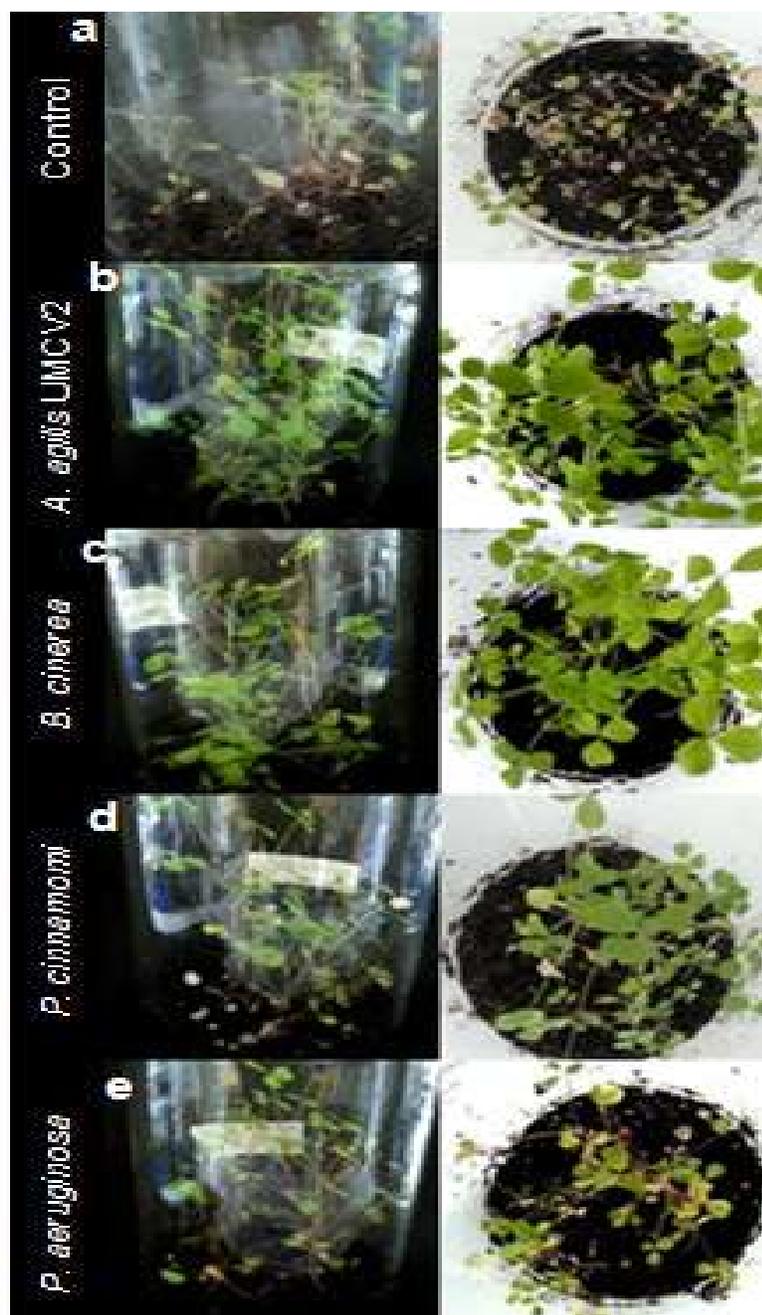
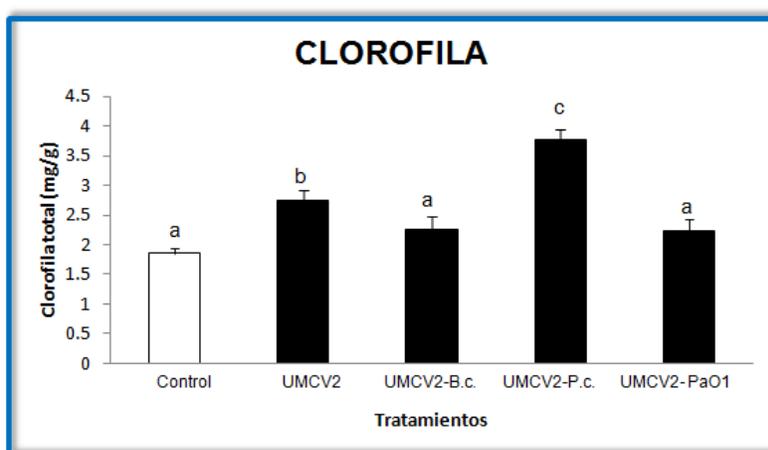


Figura 21. Efectos de la co-inoculación de *A. agilis* UMCV2 con diversos fitopatógenos en plantas de *Medicago sativa*, después de estar en contacto por 30 días. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2, c) *A. agilis* UMCV2-*B. cinerea*, d) *A. agilis* UMCV2-*P. cinnamomi* y e) *A. agilis* UMCV2-*P. aeruginosa* PaO1.

7.4.1 Clorofila

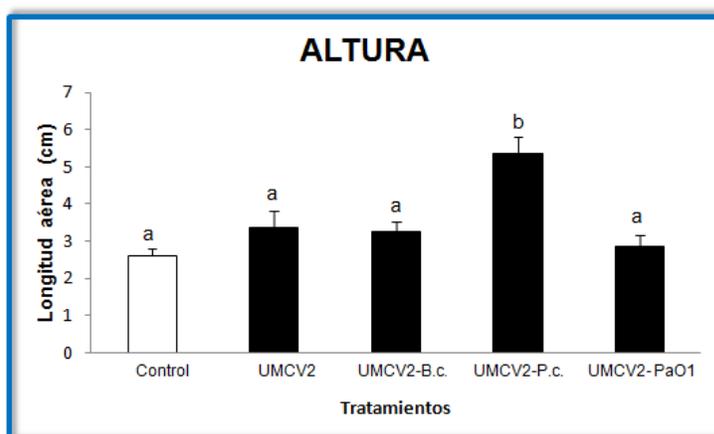
La concentración de clorofila en las plantas de *M. sativa* aumentó en un 49% al ser inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y las plantas que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y *P. cinnamomi*, aumentó en un 104%. Sin embargo, con respecto a los demás tratamientos no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa comparando con el control (Gráfica 14).



Gráfica 14. Cantidad de clorofila (mg/g) en plantas de *M. sativa*, que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los diversos fitopatógenos, después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.4.2 Altura

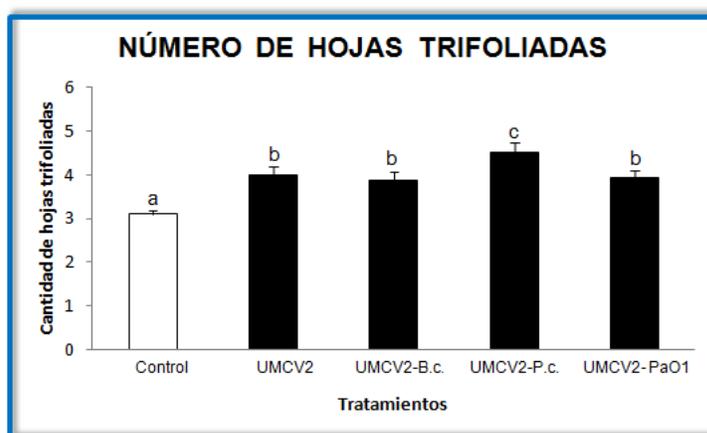
En la gráfica 15, se muestra que las plantas que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y *P. cinnamomi* aumentaron su altura en un 105% con respecto al control. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos comparados también con el control.



Gráfica 15. Altura (cm) de las plantas de *M. sativa*, que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados, después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.4.5 Número de hojas trifoliadas

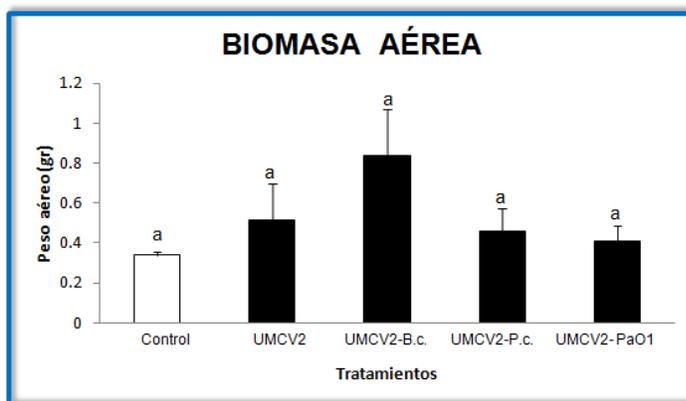
En la gráfica 16, se muestra que las plantas que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y *P. cinnamomi* aumentaron un 45% el número de hojas trifoliadas, con respecto al control. Mientras que los demás tratamientos produjeron un incremento de entre el 25% al 29%, comparado con el control.



Gráfica 16. No. de hojas trifoliadas de las plantas de *M. sativa*, que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados, después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.4.2 Biomasa aérea

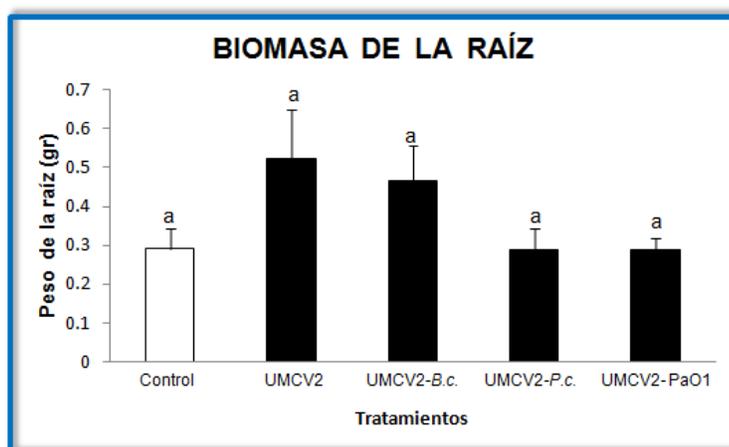
En la gráfica 17, se muestra que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al control.



Gráfica 17. Biomasa aérea (gr) en plantas de *M. sativa*, que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los diversos fitopatógenos, después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=4$.

7.4.3 Biomasa de la raíz

En la gráfica 18, se muestra que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al control.



Gráfica 18. Biomasa de la raíz de las plantas de *M. sativa*, que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos seleccionados, después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=4$.

7.5 Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 previamente inoculado en plantas de *Medicago sativa* frente a diversos fitopatógenos.

A diferencia del experimento anterior, se realizó la inoculación de *A. agilis* UMCV2 previamente en plantas de *M. sativa* y posteriormente se inocularon los fitopatógenos seleccionados, bajo condiciones de invernadero, para determinar si *A. agilis* UMCV2 tiene la capacidad de actuar como agente de biocontrol, al evitar o retrasar la infección que podrían ocasionar los fitopatógenos, evaluando los mismos parámetros mencionados anteriormente.

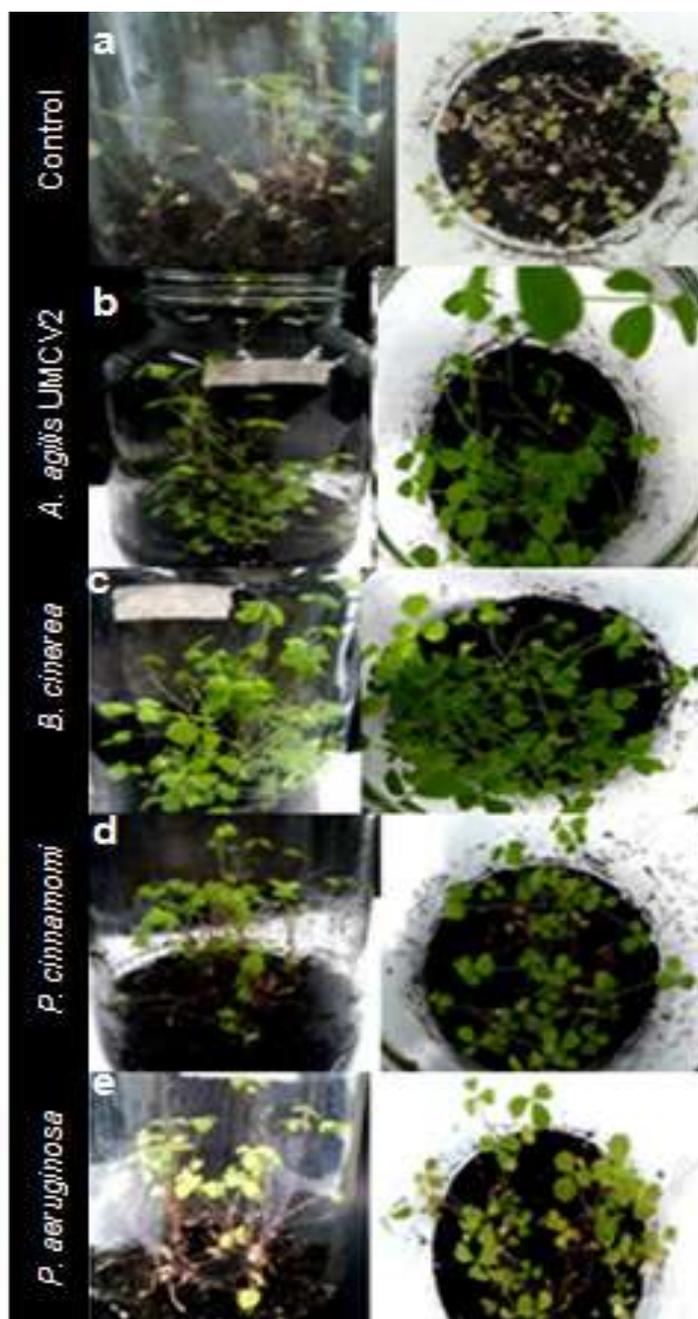
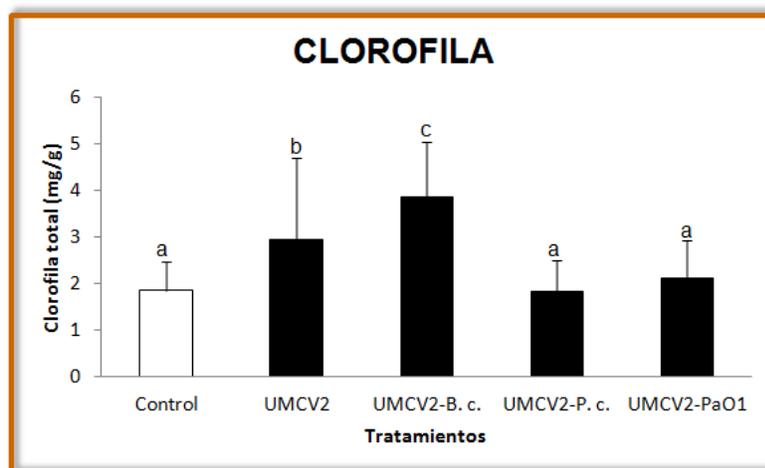


Figura 22. Efectos de la inoculación previa de *A. agilis* UMCV2 en plantas de *Medicago sativa* frente a diversos fitopatógenos, después de estar en contacto por 30 días. a) Control, b) *A. agilis* UMCV2, c) *A. agilis* UMCV2-*B. cinerea*, d) *A. agilis* UMCV2-*P. cinnamomi* y e) *A. agilis* UMCV2-*P. aeruginosa* PaO1.

7.5.1 Clorofila

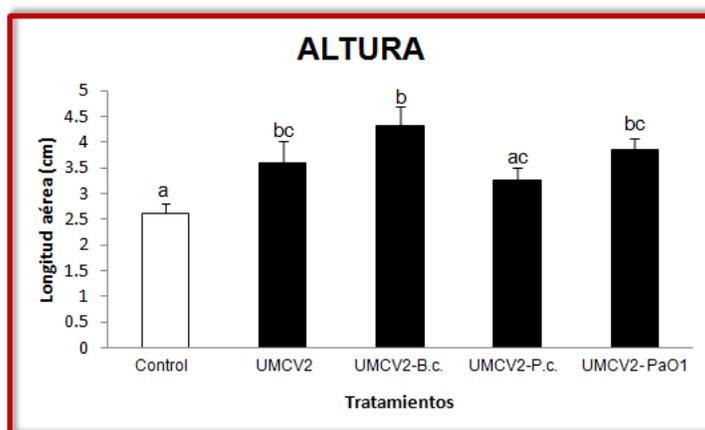
La concentración de clorofila aumentó en un 55%, en aquellas plantas que fueron inoculadas solamente con *A. agilis* UMCV2 y tuvo un aumento del 108%, en las plantas que fueron previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y después estuvieron en contacto con *B. cinerea*, en comparación con el control. Sin embargo, con respecto a los demás tratamientos, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Gráfica 19).



Gráfica 19. Cantidad de clorofila (mg/g) en plantas de *M. sativa*, previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.5.2 Altura

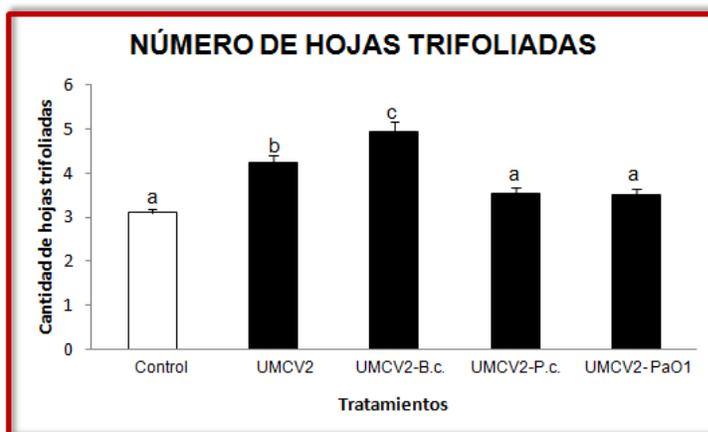
En la gráfica 20, se muestra que la altura de las plantas que fueron previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y que después, estuvieron en contacto con *B. cinerea* aumentó en un 65% y los demás tratamientos generaron un incremento de entre un 20% a un 47%, comparado con el control.



Gráfica 20. Altura (cm) de las plantas de *M. sativa*, previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.5.3 Número de hojas trifoliadas

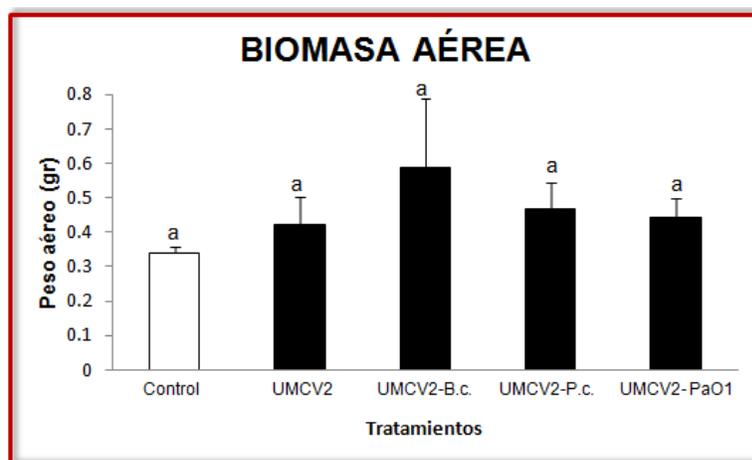
En la gráfica 23, se muestra que las plantas inoculadas solamente con *A. agilis* UMCV2 aumentaron la cantidad de hojas trifoliadas en un 33% y las plantas previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y que después, estuvieron en contacto *B. cinerea*, aumentaron su cantidad de hojas trifoliadas en un 66%. Con respecto a los demás tratamientos, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control.



Gráfica 23. Número de hojas trifoliadas de plantas de *M. sativa*, previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=40$.

7.5.4 Biomasa aérea

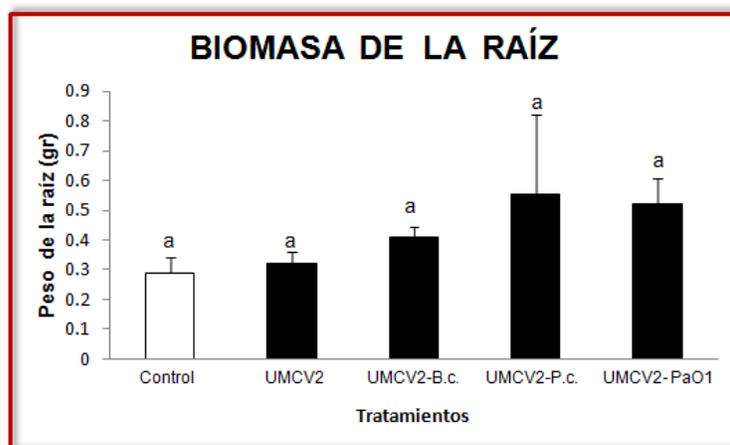
En la gráfica 24, se muestra que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al control.



Gráfica 24. Biomasa aérea (g) en plantas de *M. sativa*, previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=4$.

7.5.5 Biomasa de la raíz

En la gráfica 25, se muestra que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al control.



Gráfica 25. Biomasa de la raíz (g) en plantas de *M. sativa*, previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2, frente a diversos fitopatógenos. Después de 30 días. Las barras representan el error estándar. Duncan $p \leq 0.05$, $n=4$.

8. DISCUSIÓN

Velásquez-Becerra y colaboradores en el 2013 demostraron que la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 produce compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que inhiben el crecimiento de *B. cinerea* *in vitro*.

Debido a lo anterior en el presente trabajo se evaluó el efecto de los compuestos difusibles y VOCs de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de fitopatógenos como *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *P. aeruginosa* (PaO1) *in vitro*, obteniendo que efectivamente los VOCs emitidos por *A. agilis* son capaces de inhibir el crecimiento de los diferentes patógenos si bien esta inhibición fue discreta (entre 10 y 38% de inhibición). Un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de dichos patógenos se registró al inocular la bacteria con 48 horas de anticipación y al ponerse en contacto con los VOCs de *A. agilis* UMCV2, resultados similares fueron obtenidos por Velásquez-Becerra y col. en el 2013 que reportan inhibición de *A. agilis* UMCV2 sobre los fitopatógenos *B. cinerea* y *P. cinnamomi*.

Hasta donde sabemos, no existen reportes de la inhibición de *P. aeruginosa* por los VOCs emitidos por *A. agilis* o cualquier otra bacteria. Sin embargo López *et al.* (2005), probaron VOCs generados a partir de los aceites esenciales de seis plantas aromáticas contra ocho bacterias y tres hongos de interés médico y agronómico encontrando que todos los microorganismos probados fueron inhibidos en algún grado por los VOCs a excepción de *P. aeruginosa*. En un estudio semejante Mitchell y col. en el 2010, probaron los volátiles del hongo endofítico *Muscodor crispans* contra más de 50 microorganismos patógenos de

plantas y animales, encontrando que todos eran sensibles a dichos volátiles con la excepción de 4 bacterias, entre ellas *P. aeruginosa*.

Los anteriores reportes muestran que *P. aeruginosa* es un organismo versátil con capacidad de tolerar diversos VOCs antimicrobianos e incrementan el interés por la inhibición sobre *P. aeruginosa* PA01 que se observó en el presente trabajo, quedando como perspectiva el estudio del mecanismo por medio del cual se da esta inhibición.

Adicionalmente, no existen reportes sobre si *A. agilis* UMCV2 tiene la capacidad de ser usada como un agente de biocontrol al inhibir el crecimiento de fitopatógenos *in vivo*, empleando plantas de importancia económica como lo es la alfalfa, por lo tanto uno de los objetivos de este trabajo fue demostrar que *A. agilis* UMCV2, además de promover el crecimiento de las plantas de alfalfa, tal y como lo observaron Velázquez-Becerra y col. en el 2011, también puede ser considerada dicha bacteria como un agente de biocontrol, con la finalidad de utilizarse posteriormente como un bioinoculante en la fabricación de biofertilizantes.

En general, las plantas de alfalfa no mostraron síntomas de infección por parte de los fitopatógenos, probablemente porque las condiciones ambientales podrían no haber sido las adecuadas para favorecer el crecimiento de los mismos (Figura 20). Uno de los parámetros sin embargo (número de hojas trifoliadas), mostró que las plantas infectadas con *P. cinnamomi* y *P. aeruginosa* PaO1 tuvieron un menor desarrollo respecto al tratamiento control y las plantas inoculadas con *A. agilis*

UMCV2 o con *B. cinerea*, dando indicios de la forma en que la presencia de los fitopatógenos afectó a las plantas de alfalfa (Gráfica 11). En este sentido no se puede concluir que *B. cinerea* produjo efectivamente una infección en las plantas de alfalfa y si se mostró que al tiempo en que se concluyó el experimento, los otros dos patógenos (*P. cinnamomi* y *P. aeruginosa*) produjeron una infección sin efectos muy severos ya que solo afectó negativamente el número de hojas trifoliadas pero no en parámetros como biomasa y altura de las plantas, o la concentración de clorofila (gráficas 9 a la 13).

Por otro lado el efecto de *B. cinerea* no fue el esperado. *B. cinerea* es un hongo fitopatógeno necrotrófico (Choquer *et al.*, 2007), pero también es capaz de crecer como saprófito (Schumacher, J. y Tudzynski, 2012), por lo que es posible que el hongo haya sobrevivido en torno a la planta sin entrar a una fase patogénica, adicionalmente se conoce que *B. cinerea* es capaz de producir ácido indol-acético entre otros fitorreguladores (Tuomi *et al.*, 1993) lo que abre la posibilidad de que la inoculación de *B. cinerea* no sólo no haya progresado como una infección sino que por el contrario, haya servido como una fuente de fitorreguladores promoviendo el crecimiento de las plantas de alfalfa, lo que explicaría el aumento en la biomasa aérea que observamos en las plantas inoculadas con *B. cinerea* (Gráfica12), por tanto otra perspectiva del presente trabajo es el análisis de las biomoléculas excretadas por *B. cinérea* en búsqueda de auxinas u otros fitorreguladores.

Una observación del presente trabajo es el efecto protector contra fitopatógenos que la inoculación de *A. agilis* UMCV2 tiene las plantas de alfalfa.

Cuando las plantas de alfalfa fueron inoculadas con *A. agilis* UMCV2, la inoculación de los fitopatógenos en ningún caso produjo un efecto negativo sobre las plantas, ni siquiera en el parámetro de número de hojas trifoliadas que si disminuyó en plantas infectadas que no fueron inoculadas con *A. agilis* UMCV2 según se mostró anteriormente. Por otro lado, las plantas de alfalfa se vieron mayormente favorecidas en cuanto a parámetros como clorofila, altura y número hojas trifoliadas, al ser previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y después con los patógenos, que al ser co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos al mismo tiempo, lo anterior podría ser explicado debido a que *A. agilis* UMCV2 ha sido reportada como una bacteria endófito de leguminosas por Avilés-García *et al.*, 2010. Al inocular, primero las plantas con *A. agilis* UMCV2 le permitió a la bacteria penetrar los tejidos de las plantas y disponer de más tiempo para generar una mayor concentración de los compuestos responsables de la inhibición de los fitopatógenos probablemente desencadenando una respuesta de defensa.

Velázquez-Becerra y col. en el 2011 demostraron que *A. agilis* UMCV2 puede ser percibida a través de los VOCs emitidos por la propia bacteria, lo cual, modifica la respuesta defensiva en *M. truncatula* ya que tiene la capacidad de reconocer a la bacteria como PGPR y suspender la producción de compuestos capaces de inhibir a dicha bacteria (Mathesius *et al.*, 2003; de la Peña *et al.*, 2008) y simultáneamente la emisión de volátiles bacterianos también tienen un papel en la inducción en las plantas de un fenómeno llamado resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) (Thimmaraju *et al.*, 2010). Esta aparece cuando el

mecanismo de defensa de las plantas es estimulado y preparado para resistir la infección de patógenos. Ryu y colaboradores en el 2003, encontraron que los VOCs emitidos por *Bacillus subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a estimularon una ISR en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, lo que confirió protección a la planta contra la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora*.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- *A. agilis* UMCV2 es una bacteria que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos *in vitro* incluyendo a *P. aeruginosa* PA01 al inocularse 48 horas antes, lo cual podría deberse a la generación de una mayor cantidad de los compuestos orgánicos volátiles responsables de dicho efecto.
- Las condiciones ambientales *in vivo*, no fueron las adecuadas para que los fitopatógenos infectaran las plantas de alfalfa y adicionalmente, de forma inesperada *Botrytis cinerea* favoreció el aumento de la cantidad de clorofila.
- La clorofila, la altura y el número de hojas trifoliadas, fueron los parámetros que mayormente se vieron favorecidos en las plantas de alfalfa, las cuales fueron previamente inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y después con los fitopatógenos, que al ser inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y los fitopatógenos al mismo tiempo.

10. CONCLUSIÓN

La inoculación de *A. agilis* UMCV2 ejerce un efecto protector en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) frente a diversos fitopatógenos.

11. LITERATURA CITADA

Aguado-Santacruz, G. (2012) Uso de microorganismos como biofertilizantes. In: Aguado-Santacruz, G.A. (ed). Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la Agricultura. INIFAP/SAGARPA. México, pp. 52-55.

Ahmad, F., Ahmad, I. y Khan, M.S. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 36:1-3.

Ahn, I.P., Lee, S.W. y Suh, S.C. (2007). Rhizobacteria-Induced Priming in *Arabidopsis* Is Dependent on Ethylene, Jasmonic Acid, and NPR1. *Mol Plant Microbe Interact* 20(7):759-765.

Alarcón-Zúñiga, B. y Cervantes-Martínez, T. (2012). Manual para la producción de semilla de alfalfa en el valle del Mezquital, Hidalgo. Ed.1, pp. 19-22. <http://www.chapingo.mx/maizedb/Alfalfa>. (Accesada en septiembre del 2014)

Aviles-García, M.E., Santoyo-Pizano, G., Flores-Cortes, I. y E. Valencia-Cantero (2010). *Arthrobacter agilis* UMCV2 como endófito de leguminosas. Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Microbiología. Morelia, Michoacán 29 de Junio al 2 de Julio 2010. Pág 50.

Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuel, G.J., Choi, I. y Holmes, K.A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedling by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224:1449-1464.

Benito, E., Arranz, M. y Eslava, P. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev. Iberoam Micol.* 17:S43-S46.

- Camelo M., Vera S. P. y Bonilla R.R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2011) 12(2), 159-166.
- Carreras B. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de Fitopatógenos. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2011. 12(2), 129 -133.
- Chatterjee, S.N., Bhattacharya,T., Dangar, T.K. y Chandra, G. (2007). Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *Afr. J. Biotechnol.* 6(13):1587-1591.
- Chet, I. e Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47:37-43.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A. y Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Letters*, 27: 1-10.
- de la Peña, C., Lei, Z., Watson, B.S., Sumner, L.W. y Vivanco, J.M. (2008). Root-microbe communication through protein secretion. *Journal of Biological Chemistry.* 283:25247–25255.
- Del Pozo, I. M. (1983). La alfalfa y su aprovechamiento. Ed. Mundi-Prensa. Madrid España.
- Financiera Nacional de Desarrollo (SIAP/ SAGARPA) 2014. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica, Análisis Sectorial y Tecnologías de la Información. Panorama de la alfalfa.

<http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Alfalfa%20%28abr%202014%29.pdf>. (Accesada en octubre del 2014).

Friedlender, M., Inbar, J. y Chet, I. (1993). Biological control of soilborne plant

García de Salamone, I.E., Hynes, R.K. y Nelson, L.M. (2005). Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *In*: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui, Z.A. (ed). Springer, Dordrecht, The Netherlands.

García-Juárez, P., Altamirano-Hernández, J., López-Bucio, J., Valencia-Cantero, E. y Macías-Rodríguez, L. (2010). Efecto del perfil de compuestos volátiles de distintas rizobacterias en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Experimental* 12:20-27.

Gray, E.J. y Smith, D.L. (2005) Intracellular and extracellular PGPR. *Soil Biol. Biochem.* 37:395-403.

Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.I., Gong, I.Y., Zhang, I.X. and Sun, P.H. (2004). Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 29:66-72.

Gupta, V.P., Bochow, H., Dolej, S. y Fischer, I. (2000) Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.* 107 (2):145-154.

Haas, D. y Keel, C. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41:117-153.

Handelsman, J. y Stabb E.V. (1996). Biocontrol of soilborn plant pathogens. *The Plant Cell* 8:1855-1869.

Hardham, A. (2005) Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* (2005) 6 (6), 589-604. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2005.00308.X

Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Velázquez-del Valle, M.G. y Hernández-Lauzardo, A.N. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Rev. Mexicana de Fitopatología*.24 :42-48.

Holz, G., Gütschow, M., Coertze, S. y Calitz, F. (2003). Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Disease*. 87:351-355.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G. and Piechulla, B. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*.187:351-360.

Kennedy, I.R., Choudhury, A.T. y Kecskes, M.L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1229-1244.

Kloepper, J. W., Schroth, M. N. y Miller, T. D. (1980). Effects of Rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*. 70:1078-1082.

Kloepper, J.W. y Schroth, M.N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic*

Bacteria. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France.

Leelasuphakul, W., Hemmanee, P. y Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharv Biol Technol* 48(1):113-121.

Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., y Nerin, C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem* 53: 6939-6946.

Lucy, M., Reed, E. y Glick, R.B. (2004) Applications of free living plant growthpromoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.

Manjula, K. y Podile, A.R. (2001). Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Can. J. Microbiol.* 47:618-625.

Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anollés, G., Rolfe, B.G. y Bauer, W.D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100: 1444-1449.

Mitchell, A. M., Strobel, G. A., Moore, E., Robison, R., y Sears, J. (2010). Volatile antimicrobials from *Muscodora crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology,* 156: 270-277.

Montealegre, J.R., Reyes, R., Pérez, L.M., Herrera, R., Silva, P. y Besoain, X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Elect J Biotechnol* 6:116-127.

Muhammad, S.M., Arshad, S.H. y Ahmad, S.B. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:635-640.

Onofre-Ortega P. (2013) Efecto de la co-inoculación de *Sinorhizobium meliloti* 2011 con *Arthrobacter agilis* UMCV2 en *Medicago sativa*. Facultad de Químico-Farmacobiología UMSNH. Tesis de Licenciatura.

Orozco-Mosqueda, M.C., Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., Santoyo, G., Flores-Cortez, I., Alfaro-Cuevas, R. y Valencia-Cantero, E. (2013). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (Strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant & Soil.* 362:51-66. (Doi:10.1007/s11104-012-1263-y). ISSN: 0032-079X.

Ortiz-Castro, R., Valencia-Cantero, E. y López-Bucio, J. (2013) The beneficial role of rhizosphere microorganisms in plant health and productivity: improving root development and nutrient acquisition. *Acta Horticulturae* 1009: 241-250. ISSN: 0567-7572.

O'Sullivan, D.J. y O'Gara, F. (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev.* 56:662-672.
pathogens by a β -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25:1211-1221.

Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. y Guckert, A. (2000) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:948-955.

Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. y Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology* 28: 489-521.

Plotnikova, J.M., Rahme, L.G. y Ausubel, F.M. (2000). Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124:1766-1774.

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. y Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268:1899-1902.

Ramos-Solano, R., Barriuso-Maicas, J., Pereyra de la Iglesia, M.T., Domenech, Reis, H., Pfiffi, S. y Hahn, M. (2005). Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 6:257-262.
Rev Gen 6:206-220.

Rosslénbroich, H. y Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea*-History of chemical control and novel fungicides for its management. Bayer AG, Crop Protection Business Group, Agricultural Centre Monheim, D-51368 Leverkusen, Germany.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W. y Kloepper, J.W. (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4927-4932.

Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Pena-Cabriales, J.J. y R. Farías-Rodríguez (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana* 28: 53-60.

Schumacher, J. y Tudzynski, P. (2012). Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. En: *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi* (pp. 225-241). Springer Berlin Heidelberg.

Soldano, A., Garate, V., Vaccari, M.C., Latorre-Rapela, G., Lurá, M.C., González, A.M. (2010). Inhibición del crecimiento de *Cercospora kikuchii* por especies de *Bacillus* y efecto sobre la acumulación de cercosporina. *FABICIB* 14:97 -106.

Staats, M., Van Barlen, P., Schouten, A., Van Kan, J. y Bakker, F. (2007). Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genet. Biol.* 44: 52-60.

Téliz, D., Mora, A., Velázquez, C., García, R., Mora, G., Rodríguez, P., Etchevers, J. y Salazar S. (1992). Integrated management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, México. *Proc. Of Second World Avocado Congress*. Riverside, California. pp: 79-84.

Téliz, D.O. (2000). *El aguacate y su manejo integrado*. Ediciones MundiPrensa, México, S.A. de C.V.

Thimmaraju, R., Biedrzycki, L.M., Kunjeti, S.G., Donofrio, N.M., Czymmek, K.J., Paré, P.W. y Bais, H.P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*, *Communicative and Integrative Biology* 3: 130-138.

Tuomi, T., Ilvesoksa, J., Laakso, S., y Rosenqvist, H. (1993). Interaction of abscisic acid and indole-3-acetic acid-producing fungi with *Salix* leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 12: 149-156.

Valencia-Cantero, E., Hernandez-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J.E., Alfaro-Cuevas, R. y López-Bucio J. (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant & Soil* 291: 263-273. (Doi: 10.1007/s11104-007-9191-y).

Valencia-Cantero, E., Villegas-Moreno, J., Sánchez-Yáñez, J.M., Peña-Cabriales, J.J. y R. Farías-Rodríguez (2005). Inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporium* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana* 23:65-72.

Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I. y Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant & Soil*. 339: 329-340. (Doi: 10.1007/s11104-010-0583-z). ISSN: 0032-079X.

Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández Soberano., C. y Valencia-Cantero, E. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Protoplasma*. 250:1251–1262. (Doi: 10.1007/s00709-013-0506-y). ISSN: 0033-183X.

Whipps, J.M. (1997). Developments in biological control of soil-borne plant pathogens. *Adv. Bot. Res.* 26:1-134.

Xu, C., Mo, M., Zhang, L. y Zhang, K. (2004). Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1997-2004.

Zou, C.S., Mo, M.H., Gu, Y.Q., Zhou, J.P. y Zhang, K.Q. (2007). Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology and Biochemistry* 39:2371-2379.