



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUÁREZ"

PROGRAMA DE MAESTRÍA INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA DE FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

TESIS

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE PLANTAS DE ZARZAMORA (*Rubus* SUBGÉNERO *Eubatus*)
INOCULADAS CON BACTERIAS ENDÓFITAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS

Que como requisito para obtener el grado de:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

BLANCA ROJAS SÁNCHEZ
rojassancblanca@gmail.com
1159358B

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MA. DEL CARMEN ROCHA GRANADOS
crochag@yahoo.com.mx

CO-DIRECTOR

DR. GUSTAVO SANTOYO PIZANO
gustavo_santoyo@yahoo.com.mx

URUAPAN, MICHOACAN., MARZO DEL 2020





Programa Institucional
**Ciencias
Biológicas**

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DR. LUIS FELIPE MENDOZA CUENCA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Análisis morfológico de plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) inoculadas con bacterias endófitas y hongos fitopatógenos" presentado por la ING. AGRÓNOMA BLANCA ROJAS SÁNCHEZ con Número de Matrícula 1159358B, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 19 de febrero de 2020

COMITÉ SINODAL

Dra. Ma. Del Carmen Rocha Granados
Directora de Tesis

Dr. Gustavo Santoyo Pizano
Co director

Dra. Patricia Delgado Valerio

Dr. José López Medina

Dra. Ana Tetzqui Chávez Bárcenas

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto, y por motivar la formación de nuevos profesionistas competitivos.

Instituciones:

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A la facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”

Personas:

A mi directora de tesis, la Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados, quien se ha tomado el arduo trabajo de transmitirme su diverso conocimiento y me ha guiado en este proceso.

A la mesa de sinodales el Dr. Gustavo Santoyo Pizano, Patricia Delgado Valerio, Ana Tztzqui Chávez Bárcenas y el Dr. José López Medina, por su apoyo, tiempo y valiosa aportación para el enriquecimiento del proyecto.

A mis amigos Citlalli, Monse, Leo, Juan por que gracias a su amistad y apoyo me han hecho más fácil realizar este proyecto.

A todas aquellas personas que directa e indirectamente contribuyeron a que lograra llegar a esta meta, que es un paso más en el camino de la vida.

DEDICATORIA

A mi hija Bianca, por ser mi fuerza y motivación más grande para concluir este proyecto.

A mis padres Gregorio y Maricela, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, por darme la base para que pueda forjar mi propio camino.

A mis hermanas Luz, Adriana y Marisol, por todo el apoyo brindado durante este camino, pero sobre todo por el gran ejemplo de vida que cada una me ha dado.

A mi hermano Gregorio y a su familia, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A mis amigas Karina y Sofía por motivarme, apoyarme incondicionalmente, y acompañarme en este camino.

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen	1
Abstract	3
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Importancia del cultivo de la zarzamora	7
2.2 Generalidades de la zarzamora	8
2.3 Clasificación taxonómica	9
2.4 Morfología de la zarzamora	9
2.5 Variedades de zarzamora	10
2.6 Principales enfermedades de la zarzamora	12
2.7 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	14
2.8 Bacterias endófitas	16
2.9 <i>Bacillus</i>	17
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
	20
CAPITULO I. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA <i>in vitro</i> DE CEPAS ENDÓFITAS <i>Bacillus spp.</i> , SOBRE <i>F. oxysporum</i> Y <i>Lasiodiplodia sp.</i> , MEDIANTE LA EMISIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES Y DIFUSIBLES.	
Resumen	20

Abstract	21
Introducción	22
Materiales y métodos	24
Resultados	27
Discusión	32
Conclusiones	35
Literatura citada	36
CAPITULO II. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE PLÁNTULAS DE ZARZAMORA CULTIVADOS <i>in vitro</i> POR LA EMISIÓN DE COMPUESTOS DIFUSIBLES Y COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EMITIDOS POR CEPAS ENDÓFITAS DEL GÉNERO <i>Bacillus</i> spp.	39
Resumen	39
Abstract	41
Introducción	42
Materiales y métodos	44
Resultados	46
Discusión	61
Conclusiones	63
Literatura citada	64
CAPITULO III. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE PLANTAS DE ZARZAMORA INOCULADAS CON CEPAS ENDÓFITAS DEL GÉNERO <i>Bacillus</i> sp., Y LOS FITOPATÓGENOS <i>F. oxysporum</i> Y <i>Lasiodiplodia</i> sp., CRECIDAS BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.	66

Resumen	66
Abstract	68
Introducción	70
Materiales y métodos	72
Resultados	75
Discusión	87
Conclusiones	90
Literatura citada	91
V. DISCUSIÓN GENERAL	93
VI. CONCLUSIONES GENERALES	96
VII. LITERATURA GENERAL	97
VIII. APÉNDICE	107

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
1 Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas endófitas E25, COPE51, CR71 y UM96 <i>Bacillus</i> spp.	27
2 Efecto de la emisión de compuestos difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .	28
3 Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .	29
4 Efecto de la emisión de compuestos difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp.	30
5 Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp.	31
6 Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., var. Tupy. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.	47
7 Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., var. Tupy. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.	49

8	Efecto de la emisión de compuestos difusibles (a) y compuestos orgánicos volátiles (b) por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., var. Tupy.	50
9	Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., var. Kiowa. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.	52
10	Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., var. Kiowa. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.	54
11	Efecto de la emisión de compuestos difusibles (a) y compuestos orgánicos volátiles (b) por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., var. Kiowa.	55
12	Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., selección UM13. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.	57
13	Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., selección UM13. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.	59

14	Efecto de la emisión de compuestos difusibles (a) y compuestos orgánicos volátiles (b) por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., sobre plántulas <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> sp., selección UM13.	60
15	Figura 15. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., y el hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> sobre plantas de <i>Rubus</i> sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f) Área foliar.	76
16	Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., y el hongo fitopatógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp., sobre plantas de <i>Rubus</i> sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f) Área foliar.	78
17	Figura 17. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., y el hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> , sobre plantas de <i>Rubus</i> sp., var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Área foliar y f) Número de brotes.	80
18	Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de <i>Bacillus</i> spp., y el hongo fitopatógeno <i>Lasiodiplodia</i> sp., sobre plantas de <i>Rubus</i> sp., var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Área foliar y f) Número de brotes.	82

- 19** Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*., sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f)) Área foliar. 84
- 20** Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *Lasioidiplodia* sp., sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f)) Área foliar. 86

RESUMEN

En los últimos años con la finalidad de disminuir el uso excesivo de agroquímicos se ha estudiado el uso de diferentes microorganismos que promuevan la sanidad y crecimiento vegetal a diversas especies de plantas. Uno de los géneros más estudiados es *Bacillus* sp., gracias a la simbiosis mutualista que presenta con diversas familias de plantas, ya que produce compuestos aromáticos, hormonas vegetales, polisacáridos y enzimas relacionadas con el metabolismo del fenilpropanoide, representa un alto potencial para la promoción del crecimiento vegetal. En los últimos años el cultivo de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) se ha visto dañado por hongos fitopatógenos, lo que ha repercutido en la pérdida total de áreas de producción. En este estudio se ha planteado analizar los efectos antifúngicos de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias endófitas del género *Bacillus* (E25, COPE52, UM46 y CR71), sobre *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., y su efecto sobre la promoción del crecimiento vegetal de plántulas de zarzamora variedad Kiowa, Tupy y selección 13, cultivadas *in vitro* y en plantas en condiciones de invernadero. En los experimentos de inhibición *in vitro* mediante la emisión de compuestos difusibles destacó la cepa E25 inhibiendo en un 22.79% y 44.58% a *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles únicamente la cepa E25 inhibió con 10.4% a *F. oxysporum* y E25, COPE52 y CR71 con un 13.7% a *Lasiodiplodia* sp. En la inoculación a plántulas *in vitro*, la variedad Tupy presenta mayor porcentaje de promoción vegetal al ser inoculada con la cepa E25, mientras que la variedad Kiowa incrementa su promoción vegetal al ser inoculada con las cepas E25 y COPE52 en mayores porcentajes. La selección UM13 sólo incrementa su promoción al inocularse con la cepa CR71. En la inoculación con las cepas y los hongos fitopatógenos en plantas de *Rubus* sp., en condiciones de invernadero la variedad Tupy se ve beneficiada al ser inoculada con la cepa UM96, y

aún con la inoculación del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* incrementa el contenido de clorofila, área foliar, peso seco aéreo y la longitud de raíz; en contraste, la cepa CR71 presenta efectos inhibitorios sobre las plantas inoculadas con el mismo hongo fitopatógeno. En la variedad Tupy no se presentaron efectos promotorios de crecimiento vegetal al ser inoculada con la cepa COPE52, es la cepa CR71 la que presenta efectos inhibitorios sobre el peso seco de raíz. La variedad Kiowa se vio favorecida por la cepa CR71 al ejercer un efecto de promoción incluso ante la presencia del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* sobre el peso seco de raíz y aéreo. La cepa E25 ejerce efectos inhibitorios sobre el peso seco de raíz de la selección UM13, sin embargo, promueve la aparición de nuevos brotes e incrementa el contenido de clorofila. El uso de las cepas de *Bacillus* spp., resulta ser eficiente como biocontrol, promoción y prevención en plantas de *Rubus* sp., sobre la presencia de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., únicamente es importante determinar el tipo de cepa que se utilizará para cada variedad o la selección y el tipo de promoción deseado.

Palabras clave: Bacterias endófitas, Promoción del crecimiento vegetal, Biocontrol, *Bacillus*, *Rubus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia* sp, *in vitro*.

ABSTRACT

In recent years in order to reduce the excessive use of agrochemicals, the use of different microorganisms that promote plant health and growth has been studied in various plant species. One of the most studied genera is *Bacillus* sp., thanks to the mutualistic symbiosis that it presents with various plant families, since it produces aromatic compounds, plant hormones, polysaccharides and enzymes related to phenylpropanoid metabolism, it represents a high potential for promotion of plant growth. In recent years the cultivation of blackberry (*Rubus* subgenus *Eubatus*) has been damaged by phytopathogenic fungi, which has had an impact on the total loss of production areas. In this study it has been proposed to analyze the antifungal effects of diffusible compounds and volatile organic compounds produced by endophytic bacteria of the genus *Bacillus* (E25, COPE52, UM46 and CR71), on *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp., And their effect on the promotion of vegetable growth of blackberry seedlings variety Kiowa, Tupy and selection 13, grown *in vitro* and in greenhouse plants. In the experiments of inhibition *in vitro* by means of the emission of diffusible compounds, the strain E25 stood out, inhibiting *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp. 22.79% and 44.58%, by means of the emission of volatile organic compounds only strain E25 inhibited with 10.4% a *F. oxysporum* and E25, COPE52 and CR71 with 13.7% to *Lasiodiplodia* sp. In inoculation to seedlings *in vitro*, the Tupy variety presents a higher percentage of plant promotion when inoculated with strain E25, while the Kiowa variety increases its plant promotion when inoculated with strains E25 and COPE52 in higher percentages. The UM13 selection only increases its promotion by inoculating with strain CR71. In the inoculation with the strains and phytopathogenic fungi in *Rubus* sp., plants, under greenhouse conditions the Tupy variety is benefited by being inoculated with the strain UM96, and even with the inoculation of the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* increases the content of chlorophyll, leaf area, aerial dry weight and root length; in contrast, strain CR71 has inhibitory effects on plants inoculated with the same phytopathogenic fungus. In the Tupy variety, there were no plant growth promoting effects when inoculated with strain COPE52, it is strain CR71 that has inhibitory effects on dry root weight. The Kiowa variety was favored by strain

CR71 by exerting a promotional effect even in the presence of the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* on the root and aerial dry weight. Strain E25 exerts inhibitory effects on the dry root weight of the UM13 selection, however, it promotes the appearance of new outbreaks and increases the chlorophyll content. The use of *Bacillus* spp. Strains, turns out to be efficient as biocontrol, promotion and prevention in plants of *Rubus* sp., on the presence of phytopathogenic fungi *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp., it is only important to determine the type of strain that It will be used for each variety or selection and the type of promotion desired.

Keywords: Endophytic bacteria, Plant growth promotion, Biocontrol, *Bacillus*, *Rubus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia* sp, *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Rubus* es uno de los más diversos dentro de la familia *Rosaceae*, cuenta con 12 subgéneros, dos de ellos de gran importancia comercial, *Idaeobatus* y *Eubatus*. Este último comprende a las zarzamoras y se caracteriza por formar un fruto agregado llamado polidrupa (Jennings, 1990; Hedrick, 1925). La zarzamora es cultivada en la mayor parte del mundo y la estimación en cuanto a su producción a nivel mundial es aproximadamente de 700,000 toneladas anuales (FAO, 2015).

En México la producción de zarzamora está concentrada principalmente en la parte central del país, en el estado de Michoacán (Clark, 2011). El sistema de producción en un pasado dependió del cultivar espinoso “Brazos” (Desarrollado por la Universidad de Texas A & M). La producción con “Brazos” fue la base del desarrollo de la industria de la zarzamora mexicana en la década de 1990, después el cultivar brasileño “Tupy” (Desarrollado por EMBRAPA, Pelotas, Brasil) fue traído a México, aunque los esfuerzos iniciales para hacer producir a “Tupy” con las mismas prácticas utilizadas en “Brazos” no eran exitosas, poco a poco mediante diversas técnicas en el manejo del cultivo se logró obtener una producción confiable con el cultivar “Tupy” (Clark, 2011). En los últimos quince años, la producción de esta frutilla ha tenido un importante crecimiento, al pasar de una superficie de cerca de 1,200 hectáreas en el año 2000 a diez veces mayor en el año 2018 (SIAP, 2018; SIAP-SAGARPA 2015).

Las características de los suelos y agua de las áreas de producción, son de suma importancia para el cultivo de la zarzamora, ya que la rizosfera contiene una gran población de microorganismos que interactúan de manera benéfica, neutral o patogénica con las plantas (Onofre *et al.*, 2009). Debido a la interacción de las raíces de las plantas con el suelo, éstas liberan una gran cantidad de compuestos solubles en agua, tales como aminoácidos, azúcares, enzimas, mucílago y compuestos fenólicos, entre otros, los cuales utilizan los microorganismos como alimento (Saharashbudhe, 2011). Las rizobacterias pueden llegar a colonizar tanto la parte

externa como interna (Endófitas) de las plantas. El término endófito significa dentro de la planta, y las bacterias endófitas se definen como aquellas que pueden colonizar y sobrevivir dentro de los tejidos vegetales sin causar un daño aparente (Rojas *et al.*, 2016; Meena *et al.*, 2017). Se ha propuesto que las bacterias endófitas pueden tener una comunicación más íntima y estrecha con la planta, es decir, sus metabolitos aún a concentraciones mínimas, pueden ejercer un efecto en la planta (Ali *et al.*, 2012).

Las bacterias rizosféricas pueden colonizar los tejidos internos de las plantas a través de mecanismos pasivos o activos (Rojas *et al.*, 2016). Colonizar esos espacios les permite desplazarse entre los espacios intercelulares de células epidérmicas y de la corteza, es decir, pueden llegar desde la raíz hasta el tallo, hojas, flores y heredarse a través de las semillas a las siguientes generaciones (Couillerot *et al.*, 2009). En este ambiente endófito existe, hasta donde se sabe, una menor competencia por nutrientes, es un ambiente de temperatura estable y protegido de condiciones de algunos tipos de estrés abiótico (como el salino, por ejemplo) (Rojas *et al.*, 2016). Aunque se conoce poco sobre los determinantes genéticos involucrados en la colonización de la endosfera, se ha propuesto que las actividades celulolíticas, las glucanasas, producción de biofilm, entre otras, son importantes (Glick, 2012).

En los últimos años el cultivo de zarzamora se ha visto seriamente dañado por una serie de organismos patógenos, entre los que destacan los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasioidiplodia* sp., el último de ellos ha sido recientemente identificado. Los patógenos causan necrosis en hojas, cáncer y muerte regresiva en ramas y tallos, lo cual repercute considerablemente en la pérdida de áreas de producción (Contreras *et al.*, 2019). Con base en la problemática anterior y dadas las características que presentan las bacterias endófitas, y su efecto en las plantas, se propone analizar el efecto inhibitorio de bacterias endófitas sobre el crecimiento de los fitopatógenos *F. oxysporum* y

Lasiodiplodia sp., además de evaluar la promoción sobre el crecimiento de plantas de zarzamora.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del cultivo de la zarzamora

México es el principal productor de zarzamora a nivel mundial con un total de 270 399 t cosechadas en 2018. En Michoacán se encuentran cultivadas aproximadamente 12 500 hectáreas de este cultivo, las cuales aportan más del 95% de la producción nacional con un total de 260 143 t cosechadas, con ello posicionan al estado, y por ende al país, como los principales productores del cultivo de zarzamora a nivel mundial (SIAP, 2018).

La zarzamora (*Rubus* sp.), es un producto de primera importancia para la exportación debido a su alta rentabilidad, su rápida recuperación de la inversión, su versatilidad de uso y alta demanda existente en Norteamérica. En México ha adquirido gran importancia comercial por la ventaja en la época de cosecha. Es importante destacar que en cada hectárea cultivada se generan al menos tres empleos directos, arrojando aproximadamente un total de 37 500 empleos, sin contar los 100 000 jornales contratados en la temporada de corte y empaque del fruto (Esquivel *et al.*, 2016).

A nivel nacional dentro de los estados productores además de Michoacán se encuentra Baja California que aporta 722 t, Colima con 600 t, Guanajuato con 99 t, entre otros. Dentro del estado de Michoacán es el municipio de los Reyes el que aporta la mayor producción con 125 000 toneladas en una superficie cultivada de 5 mil 164 hectáreas, seguido del municipio de Peribán con una producción de 49 mil 859 toneladas, en una superficie cultivada de 2 mil 167 hectáreas; Tacámbaro

aporta 10 mil 650 toneladas, que se obtienen en una superficie de más de mil hectáreas, entre otros (SEDRUA, 2018).

En la actualidad la tendencia a disminuir el consumo de carnes rojas y grasas saturadas, e incrementar el consumo de productos “naturales”, ha sido el factor importante para el rápido crecimiento de la producción y comercialización a nivel mundial de las frutas llamadas “berries” (zarzamora, arándano y frambuesa) (Meza *et al.*, 2013), su principal comercialización es hacia los países como Europa Occidental, E.U.A y Canadá, y en los últimos años también se han abierto nuevas posibilidades a nuevos mercados como es el caso de Arabia Saudita y Japón (De la Tejera *et al.*, 2004).

Su consumo, ya sean frescas o procesadas, presenta una excelente fuente de sustancias nutraceuticas con alto potencial antioxidante (Lee *et al.*, 2012). En los últimos años diversas investigaciones han reportado las propiedades benéficas que aporta a la salud humana, dentro de las cuales se encuentra la inhibición a afectaciones hepáticas (Liu *et al.*, 2010), alta actividad antiinflamatoria, antimicrobiana (Heinonen, 2007), neuroprotectora (Chen *et al.*, 2013), antiangiogénica (Medda *et al.*, 2015) y anticancerígena (Konić *et al.*, 2011).

Su principal consumo es en fresco como postre y en la agroindustria se utiliza para elaborar jugos, pulpas concentradas, extractos, saborizantes en yogur y helados, polvos deshidratados, jaleas y ates. A menudo se emplea para la confección de licores o confituras, así como para repostería. Para usos medicinales se aprovechan las hojas, los botones florales, los frutos y, en menor medida, la raíz (Sánchez, 2009).

2.2 Generalidades de la zarzamora

La zarzamora es una especie frutícola originaria de Europa, Asia y América, de crecimiento arbustivo, produce un fruto de color negro brillante con sabor dulce

y aromático. Perteneció al grupo de las frutillas o berries y al sector de “frutas finas” (denominación que se vincula al aspecto comercial y no al botánico) que incluye a un conjunto de especies que se caracterizan por su reducido tamaño en comparación con otras frutas como las cítricas (Sánchez, 2009).

El inicio del cultivo de zarzamora en México comenzó a mediados de los ochenta, al establecerse los primeros huertos comerciales con los cultivares Logan en el estado de Morelos y Brazos en Michoacán (Arteaga, 2000).

2.3 Clasificación taxonómica

Clasificación según Del Toro y Carles, (2008).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Subfamilia: Rosoideae

Tribu: Rubeae

Género: *Rubus*

Nombre científico: *Rubus* sp.

2.4 Morfología de la zarzamora

La planta de zarzamora es un arbusto sarmentoso de ramas arqueadas y espinosas; su sistema radicular sirve de sostén, como órgano de absorción y almacén de alimentos, además de ser de suma importancia para la multiplicación vegetativa de la planta (Clark *et al.*, 1992). El sistema radicular es fasciculado superficial, presenta desarrollos primarios y secundarios, está formado por raíces y

brotos que tienen la capacidad de emitir retoños o hijuelos (Sánchez, 2009; Corzo, 1995). Sus hojas son compuestas de 3 o 5 folíolos elípticos y de borde aserrado, dispuestos de forma palmeada. Sus flores crecen en racimos compuestos, con 5 sépalos y 5 pétalos blancos o rosados sobre un receptáculo ensanchado, con numerosos estambres. Su fruto está formado por muchas drupas, es decir es una polidrupa su la coloración es rojiza al inicio y se torna a negra brillante cuando madura (Sánchez, 2009; Hedrick, 1925).

2.5 Variedades de zarzamora

El género *Rubus* agrupa a especies de plantas pertenecientes a la familia de las rosáceas, subfamilia Rosoideae. Comprende 2208 especies descritas y de estas, solo 331 aceptadas (Davidse *et al.*, 2014). En los años 90 existían diferentes cultivares de esta especie como lo son Shwnee, Rosborough, Brazos, Cheyenne, Darrow, Cherokee, Comanche, Navaho y Choctaw; algunos de éstos se adaptaron para su cultivo en México, particularmente en las zonas de los estados de Michoacán, México y Puebla (Clark, 1992; Moore, 1997).

Las variedades existentes utilizadas en el país son de origen estadounidense y los primeros intentos por estudiar su adaptabilidad en México se hicieron hace aproximadamente 25 años (Pacheco, 1975). En Michoacán cerca del 90% de la superficie cultivada de zarzamora corresponde a la variedad Tupy, debido a su fácil adaptación respecto a las condiciones climáticas de la región (Muratalla *et al.*, 1999). Entre las variedades con mejores características se encuentran:

Brazos. Originaria de Texas y liberada en 1959, su hábito de crecimiento es semierecto y con alto vigor que permite establecer menos plantas por hectárea (Cano *et al.*, 1989). La caña requiere de un periodo mínimo de crecimiento de 6 meses para iniciar la diferenciación de yemas florales, las primeras cosechas ocurren a finales de noviembre, con el grueso de la producción de marzo a junio.

Sus frutos son grandes (8-9g), ácidos y firmeza mediana y muy sensible a la remisión de color (cambio de negro a rojo) una vez cortados. (López, 2006).

Cherokee. Liberada en 1974 en Arkansas, su hábito de crecimiento es erecto y medianamente productivas, sus frutos son firmes de baja acidez (Moore *et al.*, 1974), tamaño mediano (6-7g) y buena vida de anaquel (López, 2006).

Cheyenne. Liberada en 1974 en Arkansas, su hábito de crecimiento es erecto, su periodo de flor a fruto es de aproximadamente 50 días, sus frutos son firmes y de baja acidez (Moore *et al.*, 1977).

Choctaw. Liberada en Arkansas en 1990, su hábito de crecimiento es erecto y vigoroso, precoz y su fruto es mediano (5 a 6g por fruto), dulce y firme (Moore *et al.*, 1977).

Comanche. Liberada en 1974 en Arkansas, su floración es temprana (noviembre), y su brotación se puede uniformizar lo que reduce el periodo de cosecha (Moore *et al.*, 1974).

Kiowa. Esta variedad sobresale por su tamaño (10g). Sus frutos tienen características similares a las de “Brazos” y similar periodo de cosecha (López, 2006).

Logan. Es una variedad precoz, su fruto grande y de color marrón, tiene excelente brotación y la cosecha es de enero a febrero, libre de heladas y muy productiva (Mutarralla *et al.*, 1999).

Tupy. Son plantas de habito erecto, los frutos son de gran tamaño firmes y alargados, con buen balance en el contenido de azucares y ácidos, sus semillas son pequeñas y su vida de anaquel es buena (López, 2006).

2.6 Principales enfermedades de la zarzamora

El mildiu vellosa. Cuyo agente causal es *Peronospora sparsa* Berk., es una de las enfermedades más destructivas de la zarzamora, alcanzando pérdidas de hasta el 100% si no se realiza un control adecuado y oportuno, especialmente en las zonas frescas y húmedas, se caracteriza por formar manchas angulares color púrpura o carmín distribuidas a lo largo de las nervaduras de las hojas que cubren una gran parte de la superficie. Los pedicelos de los frutos y del racimo floral manifiestan coloración púrpura en uno de sus lados. En Primocañas causa retraso en el crecimiento, el fruto en desarrollo pierden su brillo, adquiere una coloración rojiza y se seca (Rebollar, 2014).

El moho gris. Ocasionado por *Botrytis cinerea*., ataca a cientos de plantas cultivadas, incluyendo frutales y hortalizas, además de malezas, en el caso de las frutillas puede causar pérdidas hasta del 100% en poscosecha si no se realiza un buen manejo en campo. Las flores infectadas muestran un color café y posteriormente se secan, en condiciones de alta humedad es posible observar síntomas y esporulación del hongo en campo. Esta enfermedad requiere de un enfoque preventivo para su manejo, ya que la falta de síntomas en campo no indica falta de infección de los frutos (Rebollar, 2014).

Pudrición de la raíz. Ocasionada por *Phytophthora* spp., se desarrolla en ambientes húmedos y cuando se mantiene una temperatura entre los 15 y 23°C, inverna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que va infectando; en primavera las oosporas y clamidosporas germinan en forma de zoosporas, mientras que el micelio prosigue su desarrollo, produce zoosporangios que liberan zoosporas o ambas cosas; estas últimas nadan en el agua del suelo e infectan las raíces de las plantas susceptibles al entrar en contacto con ellas (Agrios, 1999). Los principales síntomas son necrosis en el borde de las hojas, marchitez y muerte del ápice foliar, junto con brotes laterales cloróticos y marchitos, provocan menor producción de brotes y síntomas de deficiencias

nutricionales por la falta de aérea radicular para absorber raíces (De la Tejera *et al.*, 2004).

Agalla de la corona. Ocasionado por *Agrobacterium tumefaciens.*, se caracteriza por la formación de tumores o agallas de tamaño y forma variables entre raíces y tallos, provocando en la planta un crecimiento deficiente y menor productividad (Moore y Skirvin, 1990; De la Tejera *et al.*, 2004).

Roya. Su agente causal es *Kuehneola uredinis*, se desarrolla en ambientes con altas temperaturas, las hojas maduras y basales son las primeras en mostrar pequeñas pústulas amarillas en el envés avanzando hasta cubrir toda la hoja, si es severo causa defoliación, el mayor daño económico se produce cuando las pústulas aparecen en los frutos, al ser estos inmaduros se observan drupeolos maduros mientras que el resto permanecen verdes y en los frutos maduros se observan pústulas amarillas a anaranjadas sobre los drupeolos acompañado de deshidratación (De la Tejera *et al.*, 2004).

Fusariosis. El agente causal es *Fusarium oxysporum*, esta enfermedad se reportó recientemente como un problema fitopatológico que ataca al cultivo de la zarzamora (*Rubus* spp.), ocasionando síntomas de marchitez y muerte de plantas. En 2011 se identificó en el cultivar “Tupy” en los Reyes, Michoacán, en donde se encuentra la mayor producción de este cultivo en México, en el mismo año se reportó en California, E.U., con una incidencia hasta del 40 % (Gordon *et al.*, 2016). La marchitez vascular aparece en cualquier etapa del cultivo, invadiendo el tejido vascular de las plantas hospedantes (Elmer, 2006; Koike *et al.*, 2015).

Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con morfología muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias (Booth, 1970). Algunas

especies de *Fusarium* pueden presentar, en medios de cultivo sintético, colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardo-rojizo, rojo carmín, rosa, púrpura, e incluso azuladas (Nelson *et al.*, 1983).

***Lasiodiplodia* sp.** En el año 2017 se presentó una serie de síntomas no descritos por patógenos causales comúnmente identificados en el cultivo de zarzamora entre los que se encuentran necrosis de hojas, ramas y tallos (con una progresión basipétala), seguido por defoliación y muerte de la planta, en 2019 fue caracterizado morfológica y molecularmente (Contreras *et al.*, 2019). Comúnmente esta enfermedad provoca muerte descendente, cáncer, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas maderables y cultivos como uva, mango y aguacate (Pitt *et al.*, 2009), es un patógeno con escasos estudios de patogenicidad, es considerado cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

La morfología de su ascocarpo es de color café oscuro a negro, agregado, con pared gruesa de color café oscuro y hialino en capas internas, de 250- 400 µm de diámetro (Phillips *et al.*, 2013), Las colonias en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los 7 días y con el tiempo adquieren un color negro. Las temperaturas de crecimiento son 15 °C mínima, 28 °C como óptima y 40 °C como máxima (Slippers *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008).

2.7 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La mayoría de las bacterias asociadas a las plantas derivan del medio ambiente del suelo, migrando a la rizosfera y posteriormente al rizoplano, e incluso algunas pueden penetrar las raíces de las plantas y desplazarse a partes aéreas, presentando una densidad bacteriana decreciente en comparación con la de la rizosfera o las poblaciones colonizadoras de las raíces (Compant *et al.*, 2010).

Las rizobacterias pueden presentar un efecto benéfico, neutro o negativo para la planta, por ello resulta importante señalar que el grupo de BPCV (bacterias promotoras del crecimiento vegetal) sólo lo conforman aquellas útiles para el crecimiento de la planta (Dos Santos, 2005).

En 1978, Kloeppler y Schroth introdujeron el término de rizobacterias en sus experimentos con rábanos, definiéndolo como la comunidad bacteriana que coloniza competitivamente las raíces de la planta, que estimulan su crecimiento y a su vez reducen la incidencia de las enfermedades. Más tarde en el año de 1981 designaron a este grupo bacteriano como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (citado en Jha *et al.*, 2012).

Las bacterias asociadas a las plantas típicamente intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos de estimulación (Preston *et al.*, 1998), generalmente establecen tres pasos que son: la atracción de la bacteria hacia la rizosfera de su hospedero (Albareda *et al.*, 2006), adhesión y colonización a la superficie de la raíz (Oliveira *et al.*, 2009); y por ultimo deben presentar funcionalidad de la simbiosis asociativa (Jha *et al.*, 2012).

Las PGPR son capaces de estimular el crecimiento vegetal de manera directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos complejos que al interactuar entre sí establecen relaciones benéficas, en especial con las raíces de las plantas objetivo (Camelo *et al.*, 2011). Dentro de los mecanismos directos se incluye la producción de fitohormonas (auxinas, citocininas, etileno, ácido abscísico y giberelinas), biosolubilización de fosfatos, reducción de hierro y adquisición de nutrientes esenciales (Ghosalami *et al.*, 2009; Molina *et al.*, 2015; Olanrewaju *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2017). Los mecanismos indirectos incluyen los mecanismos de biocontrol (antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, producción de metabolitos), emisión de compuestos orgánicos volátiles, resistencia sistémica inducida, entre

otros (Cattelan *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2015; Matilla y Krell, 2018; Jain *et al.*, 2017; Broekgaarden *et al.*, 2015).

Se ha reportado que muchos tipos de bacterias pueden regular el crecimiento de las plantas desde la distancia, sin llegar a tener algún tipo de contacto con ellas, por tal motivo se sugiere la posibilidad de que estas bacterias emitan compuestos volátiles que promuevan o inhiban el crecimiento de las plantas (Ryu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2015). Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), son compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas, producidos por PGPR, que actúan como moléculas precursoras o señalizadoras de vías que conducen a la producción de hormonas de crecimiento de plantas y a su vez promover el crecimiento vegetal, inhibir el crecimiento de patógenos e inducir respuesta sistémica (Tahir *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2015; Vidhyasri *et al.*, 2019).

2.8 Bacterias endófitas

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Hua *et al.*, 2006). Lo cual indica que es posible que algunos de estos microorganismos endófitos hayan adquirido un sistema para transferir información genética a las plantas hospederas o viceversa, garantizando su adaptación a diferentes ambientes y a la planta hospedera (Tsavkelova *et al.*, 2007).

Las bacterias endófitas son reconocidas como aquellos organismos que residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Bacon *et al.*, 2000). La penetración en la planta puede ocurrir por estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, siendo que

estas bacterias pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (Macculley, 2002).

La densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable, depende de la especie de bacteria y el genotipo de la planta hospedera, del estado de desarrollo de la planta, densidad del inóculo y las condiciones ambientales (Pillay *et al.*, 1997). Estudios moleculares recientes sobre diversidad de bacterias endófitas han revelado una alta riqueza de filotipos, que promueven el crecimiento de las plantas, suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno (Rosenblueth *et al.*, 2006).

Varios géneros bacterianos han sido reportados como endófitos y promotores del crecimiento vegetal, entre los más importantes y comúnmente mencionados se encuentran *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* y *Microbacterium*, por mencionar algunos (Hallmann *et al.*, 1997; Márquez *et al.*, 2010)

2.9 *Bacillus*

Las especies del género *Bacillus* se caracterizan por ser bacilos aerobios formadores de esporas y con estilos de vida versátiles al encontrarse en diversos ambientes (Bhunia, 2018). Aun cuando dentro de este género se encuentran especies patógenas la mayoría incluye especies responsables del control biológico de enfermedades y plagas que atacan a los cultivos. Actualmente los estudios que se llevan a cabo con estas bacterias se han centrado en la capacidad de algunos de sus representantes de actuar como bacterias bioprotectoras y promotoras del crecimiento vegetal (Orberá *et al.*, 2007).

Numerosas especies de este género se han reportado como productoras de sustancias con actividad fungicida y bactericida, entre las que figuran la subtilisina

y la iturina. Producción de metabolitos secundarios y hormonas como las auxinas, ACCdesaminasa, producción de ácido abscísico y ácido indolacético (Xin *et al.*, 2016; Bhutani *et al.*, 2018; Saikia *et al.*, 2018; Salomon *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

Dentro de este género *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. pumilus*, son capaces de inhibir a los géneros *Pithium* y *Rhizoctonia* (Castellanos, 2002); *Helmintosporium*, *Fusarium* y *Curvularia* (Muhammad, 2003; Lin *et al.*, 2014); *Botrytis* y *Cochliobolus* (Rojas *et al.*, 2018); *Collectotrichum*, *Cercospora* y *Alternaria*, entre otros (Fernández, 1988).

III. HIPÓTESIS

Las bacterias endófitas del género *Bacillus* spp. cepas E25, COPE52, UM96 y CR71, promueven el crecimiento de plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) e incrementan su resistencia contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Lasioidiplodia* sp.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de bacterias endófitas del género *Bacillus* spp. sobre diversos parámetros morfológicos de plantas de zarzamora, variedades Kiowa, Tupy y la selección UM13, así como su resistencia contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la inhibición *in vitro* de *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., mediante la emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles emitidos por cepas endófitas del género *Bacillus* spp.
- Evaluar la promoción del crecimiento vegetal de plántulas de zarzamora cultivadas *in vitro* por la emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles emitidos por cepas endófitas del género *Bacillus* spp.
- Analizar el comportamiento morfológico de las plantas crecidas bajo condiciones de invernadero e inoculadas con cepas endófitas del género *Bacillus* spp., y los fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp.

CAPITULO I. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *in vitro* DE CEPAS ENDÓFITAS *Bacillus spp.*, SOBRE *F. oxysporum* Y *Lasiodiplodia sp.*, MEDIANTE LA EMISIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES Y DIFUSIBLES.

RESUMEN

Las bacterias endófitas asociadas a los cultivos proveen de importantes beneficios a las plantas promoviendo su crecimiento y exhibiendo actividad antifúngica ante diversos fitopatógenos. En los últimos años el cultivo de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) se ha visto seriamente dañado por los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia sp.*, lo que ha repercutido considerablemente en la pérdida de áreas de producción. Dadas las características de las bacterias endófitas, en este estudio se planteó analizar los efectos antifúngicos de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas bacterianas endófitas E25, COPE52, UM96 y CR71 del género *Bacillus spp.*, que fueron previamente aisladas e identificadas, sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia sp.* Durante los experimentos de biocontrol las cepas endófitas de *Bacillus spp.*, presentaron efectos inhibitorios *in vitro* sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia sp.* En la emisión de compuestos difusibles destacó la cepa E25 para ambos casos inhibiendo con un 22.79% y 44.58% respectivamente. La emisión de compuestos orgánicos volátiles de la cepa E25 fue la única que presentó un efecto inhibitorio sobre el fitopatógeno *F. oxysporum* con un 10.4%, respecto al fitopatógeno *Lasiodiplodia sp.*, fueron las cepas E25, COPE52 y CR71 las que presentaron un efecto inhibitorio similar con un 13.7%. En conclusión las cepas endófitas del género *Bacillus* analizadas inhiben el crecimiento de ambos fitopatógenos y a la vez abren una nueva puerta para su uso prometedor como biocontrol.

Palabras clave: Bacterias endófitas, Biocontrol, Antifúngico, *Bacillus*, *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia sp.*

ABSTRACT

The endophytic bacteria associated with crops provide important benefits to plants by promoting their growth and exhibiting antifungal activity against various phytopathogens. In recent years, the cultivation of blackberry (*Rubus* subgenus *Eubatus*) has been seriously damaged by the fungal pathogens *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp., which has had a considerable impact on the loss of production areas. Given the characteristics of endophytic bacteria, in this study it was proposed to analyze the antifungal effects of diffusible compounds and volatile organic compounds produced by endophytic bacterial strains E25, COPE52, UM96 and CR71 of the genus *Bacillus* spp., which were previously isolated and identified, on phytopathogenic fungi *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp. During the biocontrol experiments, the endophytic strains of *Bacillus* spp., presented *in vitro* inhibitory effects on the *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp. In the emission of diffusible compounds, strain E25 inhibiting the growth of *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp. a 22.79% and 44.58%, respectively. The emission of volatile organic compounds of strain E25 was the only one that had an inhibitory effect on the phytopathogen *F. oxysporum* with 10.4%, compared to the phytopathogen *Lasiodiplodia* sp., strains E25, COPE52 and CR71 had a similar inhibitory effect with 13.7%. In conclusion, the endophytic strains of the *Bacillus* genus analyzed inhibit the growth of both phytopathogens and at the same time open a new door for promising use as a biocontrol agent.

Keywords: Endophytic bacteria, Biocontrol, Antifungal, *Bacillus*, *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia* sp.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el cultivo de las frutillas o “berries” se ha potencializado gracias a la alta demanda que presentan en el mercado, por los grandes beneficios que aportan a la salud y al conjunto de propiedades nutraceuticas que poseen, convirtiéndolo en un cultivo altamente comercial (Baby *et al.*, 2017; Kalt *et al.*, 2019). Dentro de este grupo de “berries”, se encuentran los cultivos de fresa (strawberry), arándano (blueberry), frambuesa (raspberry) y zarzamora (blackberry). Esta última ha posicionado a México como principal productor a nivel mundial gracias a su cultivo, y es el estado de Michoacán el que aporta la mayor producción con un 96% (SIAP, 2018).

Sin embargo, en los últimos años el ataque de patógenos ha repercutido notablemente ocasionando incluso la pérdida total de áreas de producción, dentro de estos patógenos se encuentra *Fusarium oxysporum*, recientemente reportado como un problema fitopatológico que ataca al cultivo de la zarzamora (*Rubus* spp.), ocasionando síntomas de marchitez y muerte de plantas. Hernández *et al.* (2015), reportaron el marchitamiento de zarzamora en México por *Fusarium*, en el mismo año, se reportó e identificó como *F. oxysporum* en zarzamora en California, E.U., con una incidencia hasta del 40 % (Gordon *et al.*, 2016).

Derivado del análisis filogenético efectuado mediante técnicas moleculares y estudios de rango de hospedantes a los aislamientos de *F. oxysporum* procedentes de México y California, se plantea el designar a *F. oxysporum* patogénico a zarzamora como *F. oxysporum* f. sp. *mori*, al identificarse mediante pruebas *in vitro* también afecta a algunos cultivares de fresa, mientras que en arándano y frambuesa no desarrollaron síntomas (Pastrana *et al.*, 2017).

Otra de las enfermedades que se ha presentado en los últimos años es el cáncer de ramas y tallos de zarzamora, sin embargo en México pocos estudios se han realizado relacionados a esta enfermedad, dándole más énfasis a

enfermedades tales como el mildiu vellosa que ha sido responsable de pérdidas en un 10% y moho gris en menor proporción (Rebollar, 2014).

En 2019 se identificó este patógeno como *Lasiodiplodia* sp., mediante caracterización morfológica y molecular (Contreras *et al.*, 2019). Esta relacionado con cultivos como mango, uva, aguacate entre otros al causar grandes daños (Phillips *et al.*, 2013).

Por lo general, el control de enfermedades se basa en el uso de agroquímicos, los cuales causan daños al ambiente y al suelo, afectando negativamente la microbiota del suelo. Afortunadamente existen microorganismos antagonistas que presentan mecanismos de acción por competencia, micro parasitismo, inducción de mecanismos de resistencia y antibiosis (Figueredo *et al.*, 2017), refiriéndose esta última a la producción de sustancias tóxicas que inhiben o destruyen la pared celular de los microorganismos patógenos como es el caso de *F. oxysporum*, impidiendo que continúen desarrollándose (Lin *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2017). Algunos ejemplos son *Trichoderma* sp., y *Bacillus* spp., entre otros, los cuales pueden ser inoculados con frecuencia sobre las raíces de las plantas (Nieto *et al.*, 2018).

Por lo tanto, a fin de promover la microflora del suelo, es recomendable la aplicación de productos orgánicos enriquecidos con organismos que contribuyan a incrementar la abundancia y diversidad de microorganismos benéficos y materiales que promuevan la resistencia de las plantas. Dados los mecanismos que emplean las cepas *Bacillus* spp., para inhibir el crecimiento de los patógenos, en el presente estudio se ha propuesto el siguiente objetivo.

Evaluar la inhibición *in vitro* de *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., mediante la emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles emitidos por cepas endófitas *Bacillus* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en la Ciudad de Uruapan, Michoacán, México, cuya localización geográfica es 19° 23′ 38.8″ de LN y 101° 05′ 54.6″ de LO.

Bacterias endófitas. Se utilizaron las cepas endófitas E25, COPE52, CR71 y UM96 del género *Bacillus* spp., proporcionadas por el Dr. Gustavo Santoyo Pizano, Profesor Investigador del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las cepas bacterianas fueron previamente aisladas de plantas de zarzamora variedad Tupy en la región de Ario de Rosales, Michoacán, México.

Hongos fitopatógenos de zarzamora. Se utilizaron los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., los cuales fueron previamente aislados de plantas de zarzamora del Municipio de Peribán,, Michoacán, México.

Cinética de crecimiento bacteriano

Se realizó una cinética de crecimiento bacteriana para determinar el momento apropiado de realizar la inoculación a las plantas de zarzamora, buscando un mínimo de 1×10^{-6} UFC/mL. Para ello se colocó 1 mL de cada cepa bacteriana previamente activada individualmente en un matraz de 100 mL de medio PD (200g de papa + 20g de dextrosa por litro a un pH de 7, se esterilizará a 120 kPa de presión durante 15 min). Se incubaron en un agitador (Llumistell IRO-70) a 120 rpm a 20 °C, se registró la absorbancia del caldo bacteriano de cada aislado a una longitud de onda de 540 nm cada 8 horas, tomando 1 mL del caldo y colocándolo en una celda de luz visible, las lecturas se tomaron en un espectrofotómetro (JENWAY 6305). Posteriormente se generó una curva de crecimiento con los datos obtenidos

de cada uno de los aislados y se determinó la fase exponencial y estacionaria en cada curva.

Cuantificación de unidades formadoras de colonias por mililitro

Con base en las cinéticas de crecimiento obtenidas previamente se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) de cada una de las cepas tomando una muestra a la hora que se presente la fase estacionaria. El número de unidades formadoras de colonias se determinó mediante el método del número más probable (NPM) de acuerdo a Alexander (1982) y con base en las tablas de McCrady (1915). Para ello se realizaron diluciones seriadas con agua estéril en factor 10, desde 10^{-1} a 10^{-6} , se tomarán 100 μ L de la suspensión bacteriana de cada una de las cepas individualmente en el tiempo que se presente la fase estacionaria, se colocaron en un tubo Eppendorf con 900 μ L de agua destilada estéril, se realizarán las diluciones establecidas y de la 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomaran 100 μ L de cada una de ellas individualmente y se incubaran en placas de agar nutritivo por triplicado, a 30° C durante 24 horas, para posteriormente realizar el conteo de las colonias y determinar las UFC.

Pruebas de inhibición *in vitro*

Se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* para evaluar el efecto directo de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles producidos por cepas bacterianas de *Bacillus* spp., sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp. Utilizando la técnica del rayado con la bacteria en forma de cruz y utilizando cajas Petri con una división para cada efecto respectivamente, cada cepa fue probada con cada fitopatógeno, los cuales se colocaron 24 horas después de realizarse el rayado. Las cajas Petri se incubaron en una estufa de crecimiento a 28°C, en oscuridad y se midió el crecimiento micelial de los fitopatógenos cada 24 horas por espacio de 6 días.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, en donde cada repetición correspondió a cada hongo fitopatógeno (*F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp.), inoculado con la bacteria.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza y las variables que presentaron diferencias significativas fueron analizadas con la prueba de Duncan ($P < 0.05$). Todos los análisis se hicieron con la ayuda del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.2.

RESULTADOS

Cinética bacteriana

La Figura 1 muestra la fase exponencial y estacionaria del crecimiento bacteriano de las diferentes cepas endófitas, las cepas CR71 y UM96 requirieron 24 horas de incubación para llegar a la fase estacionaria, la cepa E25 requirió 36 h y COPE52 requiere de 32 horas.

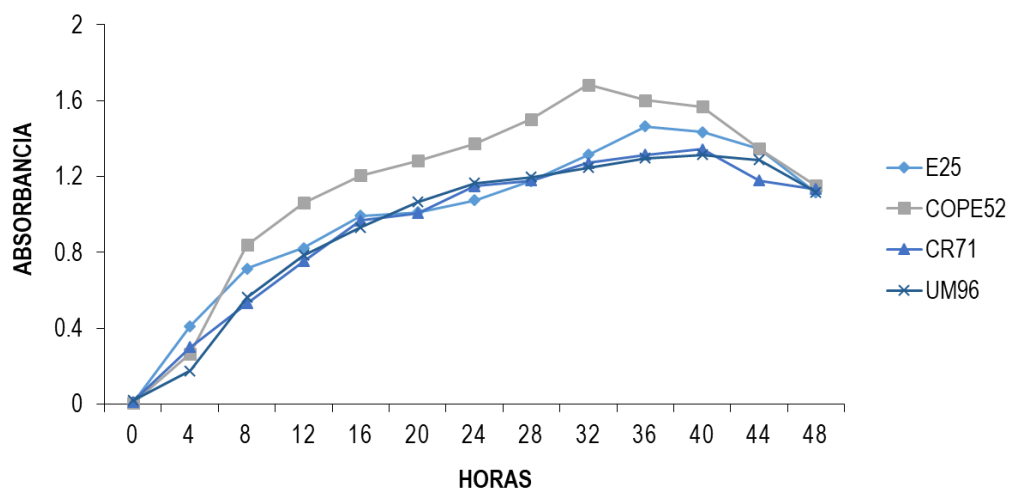


Figura 1. Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas endófitas E25, COPE51, CR71 y UM96 *Bacillus* spp.

Cuantificación de unidades formadoras de colonias por mililitro

En el cuadro 1 se presenta el conteo de las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL⁻¹), de las cepas evaluadas en un periodo de 24 horas de incubación, La cepa COPE52 obtuvo mayor cantidad de unidades con 4.2×10^{-6} , E25, CR71 y UM96 mostraron menor crecimiento bacteriano, sin embargo lograron obtener la cantidad necesaria y eficiente para realizar las inoculaciones.

Cuadro 1. Unidades formadoras de colonias por mililitro de las cepas E25, COPE52, CR71 y UM96 de *Bacillus* spp.

Cepa	Hora de incubación	UFC/ml
E25	24	2.3×10^{-6}
COPE52	24	4.2×10^{-6}
CR71	24	2.7×10^{-6}
UM96	24	2.8×10^{-6}

Las cepas endófitas E25, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., mediante la emisión de compuestos difusibles, presentaron diferencias estadísticas respecto al control, destacando entre ellas la cepa E25 que inhibió en un 22.79% el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (Figura 2). Las cepas CR71 y UM96 inhibieron el crecimiento micelial del fitopatógeno en un 13.5% y 19% respectivamente, la cepa COPE52 no mostró ningún efecto sobre el crecimiento micelial.

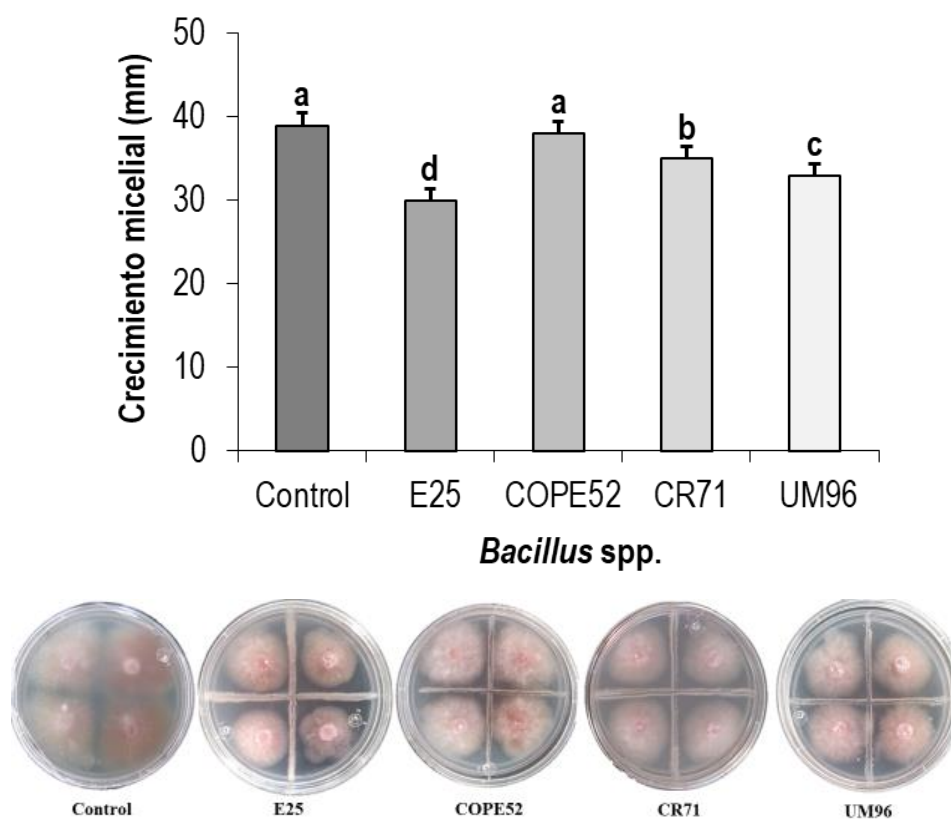


Figura 2. Efecto de la emisión de compuestos difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno *F. oxysporum*.

En la inhibición *in vitro* de *F. oxysporum* mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles, la cepa endófito E25 inhibió en un 10.4% el crecimiento micelial, mientras que las cepas COPE52, CR71 y UM96 no mostraron diferencias estadísticas (Figura 3).

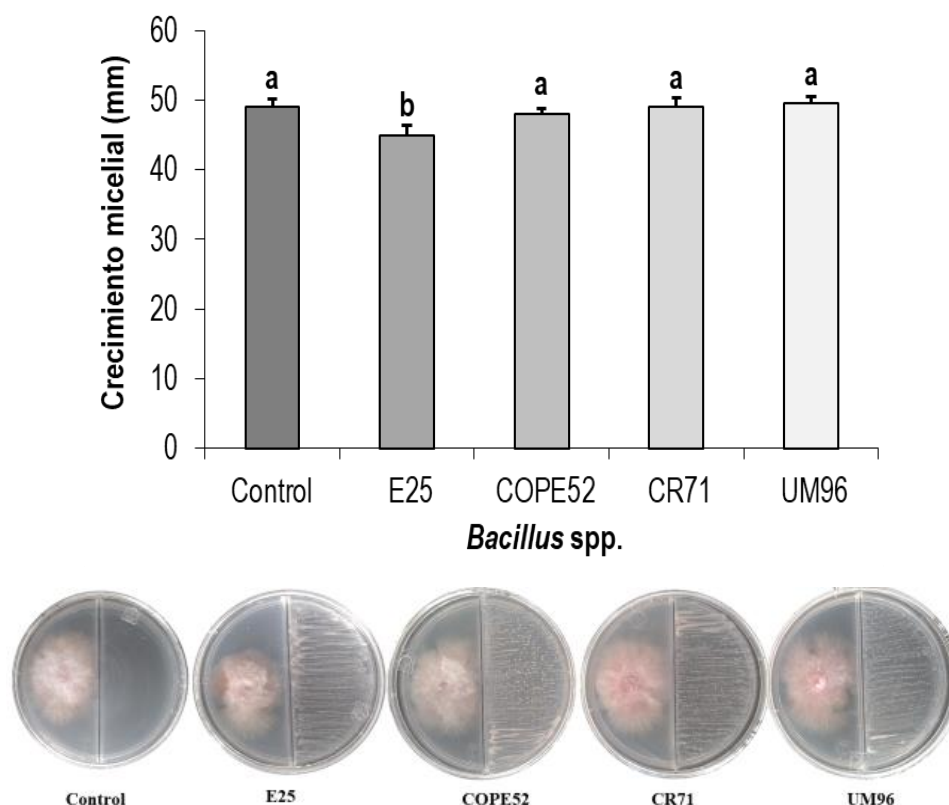


Figura 3. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno *F. oxysporum*.

Las cepas endófitas de *Bacillus* spp., mediante la emisión de compuestos difusibles, presentaron diferencias estadísticas respecto al control, destacando entre ellas la cepa E25 que inhibió en un 44.58% el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia* sp (Figura 4). Las cepas COPE52 y CR71 inhibieron el crecimiento del fitopatógeno en un 8% y 20% respectivamente. La cepa UM96 no presentó efectos inhibitorios mediante la emisión de compuestos difusibles.

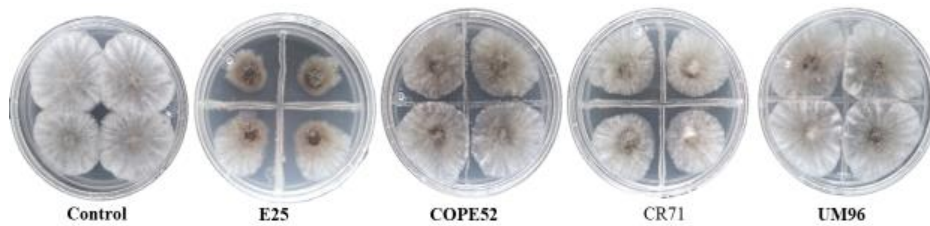
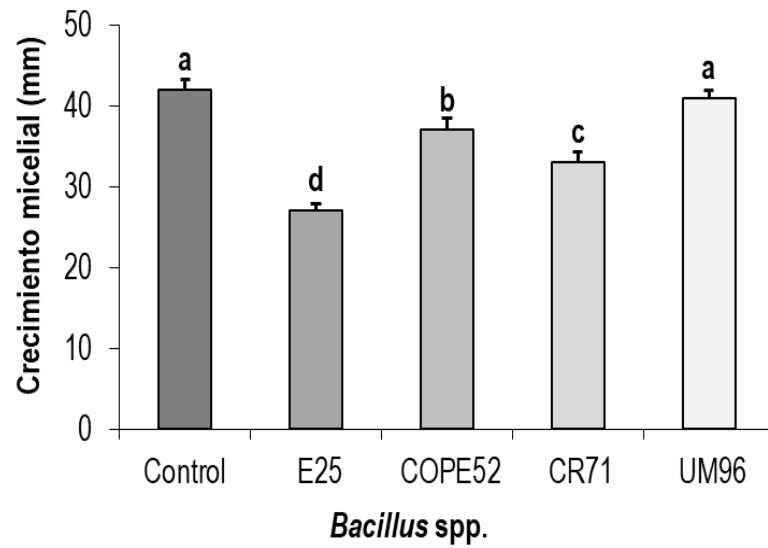


Figura 4. Efecto de la emisión de compuestos difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp.

Mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles, las cepas endófitas E25, COPE52 y CR71 fueron estadísticamente iguales, todas presentaron la mayor inhibición *in vitro* de *Lasiodiplodia* sp. (13.7%), mientras que la cepa UM96 fue estadísticamente igual al control (Figura 5).

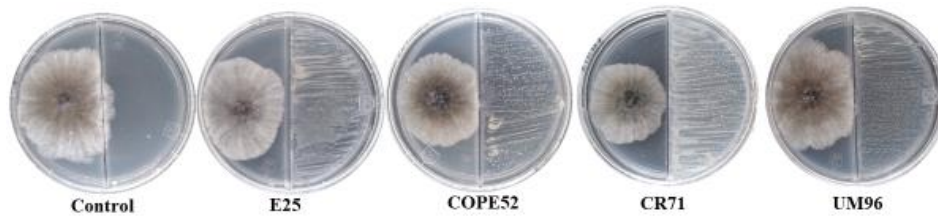
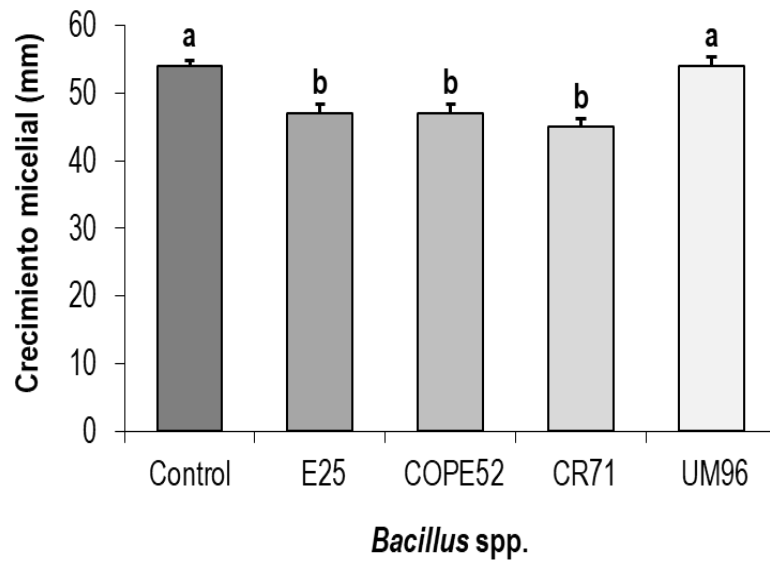


Figura 5. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles difusibles producidos por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., en el crecimiento micelial del fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp.

DISCUSIÓN

Los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., se han identificado como organismos altamente dañinos en las zonas de producción del cultivo de zarzamora, existe evidencia de que ciertos organismos biológicos han llegado a contrarrestar la actividad antifúngica de dichos patógenos. En el presente estudio se utilizaron las cepas E25, CR71, COPE52 y UM96 del género *Bacillus* spp., para evaluar el efecto inhibitorio sobre los patógenos previamente mencionados. Se realizó una cinética de crecimiento bacteriano y la cuantificación de unidades formadoras de colonias para cada una de las cepas endófitas, con el objetivo de determinar la fase exponencial, estacionaria y el número de unidades formadoras de colonias.

Las cepas endófitas del género *Bacillus* spp., requieren diferentes tiempos de exposición para alcanzar la fase estacionaria, sin embargo al realizarse la cuantificación de unidades formadoras de colonias las cuatro cepas presentaron la cantidad necesaria para realizar la inoculación, destacando entre ellas COPE52 al obtener la mayor cantidad de unidades formadores de colonias con el menor tiempo de exposición.

En la emisión de compuestos difusibles sobre el crecimiento micelial de hongo fitopatógeno *F. oxysporum*., fue la cepa E25 la que presentó mayor porcentaje de inhibición, seguido de UM96 y CR71, siendo COPE52 la única cepa que no presentó ningún efecto inhibitorio, en el caso de *Lasiodiplodia* sp., también destacó la cepa E25 con mayor porcentaje de inhibición, pero en este caso fue la cepa UM96 la que no tuvo un efecto inhibitorio sobre este patógeno. Respecto a la emisión de compuestos orgánicos volátiles sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*., únicamente la cepas E25 presentó un efecto inhibitorio sobre dicho patógeno, para el caso de *Lasiodiplodia* sp., las cepas E25, COPE52 y CR71 presentaron efecto inhibitorio positivo sobre este patógeno a comparación de UM96 que no presentó ningún efecto sobre el crecimiento micelial de dicho patógeno. Los

resultados concuerdan con los reportados por Rojas *et al.* (2018), quienes determinaron que la inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno *B. cinérea* mediante la emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas endófitas E25 y CR71. Ambas cepas inhiben el crecimiento micelial del patógeno en un 14% y 24% respectivamente mediante la inhibición por compuestos difusibles y en un 40% y 52% mediante la inhibición por compuestos orgánicos volátiles.

Por otra parte, Contreras *et al.* (2018), determinaron la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos mediante la emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles producidos por la cepa COPE52, esta cepa inhibió un 10% y 45% el crecimiento del hongo respectivamente. Las cepas COPE52 y CR71 inhibieron el crecimiento del fitopatógeno en un 8% y 20% respectivamente, la cepa UM96 no presentó efectos inhibitorios mediante la emisión de compuestos difusibles ni tampoco en la emisión de compuestos orgánicos volátiles, motivo por el cual se descarta como posible agente de biocontrol para este fitopatógeno. El último dato presentado concuerda con este experimento donde en el caso del efecto inhibitorio sobre *Lasiodiplodia* sp., mediante la emisión de compuestos difusibles la cepa UM96 no presentó ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de dicho patógeno.

Se ha demostrado que especies del género *Bacillus* spp., inhiben el crecimiento de diversos patógenos como es el caso de la cepa L3 (*Bacillus amyloliquefasciens*) que mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles y difusibles presentó actividad antagonista en pruebas *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (FON), logrando inhibir su crecimiento en un 68.4%, que causa marchitamiento de la sandía y provoca grandes pérdidas en las áreas de producción (Wu *et al.*, 2019).

Así mismo, Gautam *et al.*, 2019, probaron que la cepa S1 de *Bacillus amyloliquefasciens* inhibió el crecimiento de *Clavibacter michiganensis*.

michiganensis, además de exhibir una solubilización de fosforo significativa (94.16% SEI) y producción de ácido indolacético (27 microgramos·mL) en condiciones *in vitro*. También se comparó contra chancro bacteriano del tomate en condiciones netas, la incidencia mínima de enfermedad bacteriana por cáncer fue de 30% después de 30 días de inoculación.

Recientemente, Zhang *et al.* (2017), mediante un experimento de biocontrol con *Bacillus subtilis* (GLB191) y *B. pumilus* (GLB197) endófitos de hoja de vid, probaron que estas cepas exhiben efectos preventivos con un 69 y 57.5 % respectivamente contra *Plasmopara vitícola* (mildiu de la vid).

CONCLUSIONES

El tiempo de inoculación con las cepas endófitas del género *Bacillus* spp., depende del tiempo de exposición requerido de cada una de ellas para alcanzar la cantidad necesaria para realizar la inoculación.

Las cepas endófitas de *Bacillus* spp., presentan efectos inhibitorios *in vitro* sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., mediante la emisión de compuestos difusibles, destacando entre ellas la cepa E25 para ambos casos.

El efecto inhibitorio *in vitro* de la cepa endófitas E25 de *Bacillus* sp., sobre el fitopatógeno *F. oxysporum* es de un 10.4%, siendo la única cepa que presentó un efecto mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles. Respecto al fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp., las cepas E25, COPE52 y CR71 presentaron un efecto inhibitorio similar con un 13.7%, resultando una alternativa viable para el control de dichos fitopatógenos.

LITERATURA CITADA

- Alexander M.** (1982). Most Probable Number Method for Microbial Populations. In: Methods of Soil Analysis. Part 2 Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. Page, A.L. Editor. *American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc.* Publisher Madison Wisconsin USA, pp. 815-820.
- Baby B., Priya A & Ranjit V.** (2017). Antioxidant and anticancer properties of berries. *Food science and Nutrition*, 2491-2507.
- Contreras P, M., Rocha G, M. C., De los Santos Villalobos, S., Rojas Solis, D y Santoyo Pizano, G.** (2018). Efecto de la coinoculación de *Bacillus* sp. COPE 52 y otras bacterias sobre el crecimiento de *Vaccinium* spp., y el biocontrol de hongos fitopatógenos. V Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable, p:114.
- Contreras P. M., Santoyo P. G., De los Santos V. S., Gutiérrez G. M.A., Orozco M, M. C y Rocha G, M. C.** (2019). First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in Michoacán state, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(3).
- Figueredo M. S., Tonelli M. L., Ibañez F., Morla F., Cerioni G., Tordable M. C & Fabra A.** (2017). Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plant challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. *Microbiological Research*. 197, 65-73.
- Gautam S. A., Chauhan R., Sharma., R. Sehgal & Shirkot, C.K.** (2019). Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Microbial Pathogenesis*, 130, 196-203.
- Gordon, T. C., Kikpatrick, S., Henry P., Kong, M & Broome J.** (2016). First report of a wilt disease of blackberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease*, 100.

- Hernández C, A., Rebollar A., Silva R, H. V., & Urbin C, T. B. (2015).** Identification and pathogenicity of *Fusarium* sp. associated with yellowing and wilting of blackberry (*Rubus* sp.) in Michoacán, México. *Phytopathology* 105 (4) 59.
- Kalt W., Cassidy A., Howard L. R., Krikorian R., Stull A. J., Tremblay F., & Zamora R. R. (2019).** Recent Research on the Health Benefits of Blueberries & Their Anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 065.
- Lin Y., Du D., Si C., Zhao Q., Li Z & Li P. (2014).** Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. *Biological Control*, 71:7-15
- Nieto A., Callela J.G., Rojas M.L & Rodríguez D. (2018).** Evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* de productos de control biológico y biorracionales frente a *Fusarium oxysporum*. V. Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología.
- Pastrana A.M., Kirkpatrick, S.C., Kong M., Broome, J.C & Gordon, T. (2017).** *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, a new forma specialis causing *Fusarium* wilt of blackberry. *Plant Disease*. 101:2066-2072
- Phillips A, J. L., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M.J., Groenewald J. Z & Crous P. W. (2013).** The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167.
- Rebollar A, A. (2014).** Manejo del Mildiu y Moho Gris de la zarzamora. 36p
- Rojas S, D., Zetter S, E., Contreras P, M., Rocha G, M. C., Macías R, L & Santoyo G. (2018).** *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 13: 46–52.
- SIAP. (2018).** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.infosiap.siap.gob.mx>. Último acceso: 3 de mayo del 2019
- Wan, T., Zhao, H., & Wang, W. (2017).** Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1 and plant pathogen *Fusarium oxysporum* on

tomato rhizosphere bacterial community composition. *Biological Control*, 112, 1–9.

Wu Y., Zhou J., Li C & Ma Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiology Open*. 8: 813.

Zhang X., Zhou Y., Li Y., Fu X & Wang Q. (2017). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection*, 96, 173-179.

CAPITULO II. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE PLÁNTULAS DE ZARZAMORA CULTIVADAS *in vitro* POR LA EMISIÓN DE COMPUESTOS DIFUSIBLES Y COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EMITIDOS POR CEPAS ENDÓFITAS DEL GÉNERO *Bacillus* spp.

RESUMEN

El género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado gracias a la simbiosis mutualista que presenta con diversas familias de plantas, produce compuestos aromáticos, hormonas vegetales, polisacáridos y enzimas relacionadas con el metabolismo del fenilpropanoide, lo que representa un alto potencial para la promoción del crecimiento vegetal. Dadas las características de este género, en este estudio se planteó analizar los efectos de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles producidos por cuatro cepas bacterianas endófitas E25, COPE52, UM46 y CR71 del género *Bacillus* spp., sobre la promoción del crecimiento vegetal de plántulas de dos variedades y una selección de *Rubus* sp., cultivadas *in vitro*. Mediante la emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles la cepa COPE52 promovió la longitud de raíz de plántulas de la variedad Tupy con 3.14 y 3.03cm, el peso seco de raíz con 0.0049 y 0.0037g, para cada uno de los tipos de emisión respectivamente, así como la concentración de clorofila en un 32.49% únicamente mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles. La cepa UM96 mediante la emisión de compuestos difusibles inhibió en un 60.43% el peso seco aéreo. El peso seco de raíz y aéreo de las plántulas de la variedad Kiowa mediante la emisión de compuestos difusibles se vio altamente influenciado por la cepa COPE52 y es en el caso de la emisión de compuestos orgánicos volátiles la cepa E25 la que presenta mayor porcentaje de promoción con un 85.29% respecto al peso seco de raíz y 27.77 en cuanto al peso seco aéreo. Mediante la emisión de compuestos difusibles la cepa CR71 logro incrementar el peso seco de raíz en un 200% y es la cepa COPE52 la que destaca en la promoción del peso seco aéreo con un 29.16%. La cepa E25 destaca al promover el mayor porcentaje de aumento con respecto al peso seco aéreo y de raíz con un 28 y 235% respectivamente, es la

cepa CR71 la que promueve el mayor crecimiento de raíz mediante ambos efectos de emisión con un 203% para ambos casos. Las bacterias endófitas del género *Bacillus* spp., promueven el crecimiento vegetal de las plántulas de las variedades de *Rubus* sp., su efecto está en función de la cepa con la cual sea inoculada cada una de ellas y del tipo de emisión que estas ejerzan.

Palabras clave: Bacterias endófitas, *Bacillus*, zarzamora, *in vitro*, promoción del crecimiento vegetal, compuestos orgánicos volátiles, compuestos difusibles

ABSTRACT

The genus *Bacillus* has been widely studied thanks to the mutualistic symbiosis that it presents with various families of plants, produces aromatic compounds, plant hormones, polysaccharides and enzymes related to the metabolism of phenylpropanoid, which represents a high potential for plant growth. Given the characteristics of this genus, this study considered the effects of diffusible compounds and volatile organic compounds produced by four endophytic bacterial strains E25, COPE52, UM46 and CR71 of the genus *Bacillus* spp., on the promotion of plant growth of seedlings of two varieties and a selection of *Rubus* sp., *grown in vitro*. By issuing diffusible compounds and volatile organic compounds, strain COPE52 promoted the root length of seedlings of the Tupy variety with 3.14 and 3.03cm, the dry root weight with 0.0049 and 0.0037g, for each of the emission types respectively, as well as the concentration of chlorophyll in 32.49% only through the emission of volatile organic compounds. The strain UM96 by the emission of diffusible compounds inhibited air dry weight by 60.43%. The root and aerial dry weight of the seedlings of the Kiowa variety through the emission of diffusible compounds was highly influenced by the strain COPE52 and it is in the case of the emission of volatile organic compounds the strain E25 which has a higher percentage of promotion with 85.29% regarding the dry root weight and 27.77 regarding the aerial dry weight. By issuing diffusible compounds strain CR71 managed to increase the dry root weight by 200% and it is strain COPE52 that stands out in the promotion of aerial dry weight with 29.16%. Strain E25 stands out by promoting the highest percentage increase with respect to aerial and root dry weight with 28 and 235% respectively, it is strain CR71 that promotes the greatest root growth through both emission effects with 203% for both cases. The endophytic bacteria of the genus *Bacillus* spp., Promote plant growth of the seedlings of the varieties of *Rubus* sp., their effect is a function of the strain with which each of them is inoculated and the type of emission they exert.

Keywords: Endophytic bacteria, *Bacillus*, blackberry, *in vitro*, plant growth promotion, volatile organic compounds, diffusible compounds.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el cultivo de la zarzamora se ha posicionado como uno de los más importantes a nivel mundial gracias a la alta demanda que este presenta, esto debido a las propiedades que brinda a la salud del ser humano y a su vez se ha incrementado su demanda en las diferentes áreas que lo procesan como lo son la industria farmacéutica y gastronómica (Yand *et al.*, 2015). Este cultivo ha logrado posicionar a Michoacán como primer productor a nivel nacional y a su vez a México como principal productor a nivel mundial (FAO, 2015; SIAP, 2018).

Dadas las exigencias del mercado se han incrementado las áreas de producción de este cultivo, sin embargo los productores se enfrentan a diferentes retos dentro de los que se encuentran escasez de mano de obra, falta de desarrollo de genética local y la presencia de plagas y enfermedades. La base de la problemática sanitaria que dicho cultivo ha presentado en los últimos años radica en la falta de variedades desarrolladas en las regiones donde se establece, al ser importadas estas son susceptibles al ataque de diversos patógenos y su desarrollo se ve afectado por la limitada adaptación a ciertas zonas. Es por ello que se requiere mejorar la sanidad y el desarrollo de las plantas a través de diferentes técnicas, una de ellas es mediante el uso de diferentes organismos biológicos como lo son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Se ha comprobado que mediante la inoculación de plantas de cultivo con ciertas cepas de PGPR en una etapa temprana de desarrollo mejora la producción de biomasa a través de efectos directos sobre raíces y brotes (Saharan *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Elsayed *et al.*, 2017). Estas bacterias son capaces de estimular el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas, especialmente con las raíces de las plantas (Camelo *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2014).

Dentro de este grupo se encuentra las bacterias endófitas, que se definen como aquellas que residen dentro de los tejidos vegetales de las plantas sin

provocar ningún daño (Rojas *et al.*, 2016), entre los géneros identificados comúnmente como endófitos se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Strenophomonas*, entre otras. Con el fin de promover el crecimiento vegetal de plantas de zarzamora mediante el uso de cepas del género *Bacillus* sp, se ha propuesto el siguiente objetivo.

Evaluar la promoción del crecimiento vegetal de plántulas de zarzamora cultivados *in vitro* por la emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles emitidos por cepas endófitas del género *Bacillus* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Plántulas de zarzamora. Se utilizaron plántulas de zarzamora variedad Kiowa, Tupy y la selección UM13 generada por el programa de mejoramiento genético de frutillas de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Todas las plántulas fueron establecidas y propagadas mediante el cultivo *in vitro*.

Bacterias endófitas. Se utilizaron las cepas endófitas E25, COPE52, CR71 y UM96 del género *Bacillus* spp., proporcionadas por el Dr. Gustavo Santoyo Pizano, Profesor Investigador del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las cepas bacterianas fueron previamente aisladas de plantas de zarzamora variedad Tupy en la región de Ario de Rosales, Michoacán, México (Contreras-Pérez et al., 2016).

Evaluación de promoción del crecimiento vegetal de brotes de zarzamora cultivados *in vitro*

Se establecieron 21 plántulas *in vitro* de cada variedad (Tupy y Kiowa) y la selección (UM13), obtenidas de propagación *in vitro*, para cada una de las cepas endófitas (E25, COPE52, CR71 y UM96) individualmente, en el caso de compuestos difusibles se colocaron 100µl de suspensión bacteriana a cada uno de los brotes a una D.O de 0.5 por cepa, en el caso de compuestos orgánicos volátiles se colocaron viales conteniendo la suspensión bacteriana a una D.O de 0.5 en el centro del frasco. Las plántulas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 24° C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, durante 30 días para posteriormente medir altura de brote, crecimiento de raíz, determinar el contenido de clorofila, y el peso seco y fresco.

Diseño experimental

El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar para las dos variedades y la selección (inoculadas con cada una de las cepas y un control). Cada unidad experimental constó de un frasco con tres brotes y siete repeticiones. Las variables evaluadas fueron: concentración de clorofila, altura de plántula, crecimiento de raíz, peso seco y fresco.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza y las variables que presentaron diferencias significativas fueron analizadas mediante la prueba de Duncan ($P < 0.05$). Todos los análisis se realizaron con la ayuda del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.2.

RESULTADOS

Promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de plántulas de *Rubus* sp., var. Tupy, mediante la emisión de compuestos difusibles producidos por cepas de *Bacillus* spp.

La Figura 6, muestra el efecto de compuestos difusibles emitidos por las cepas de *Bacillus* spp., sobre el crecimiento vegetal de las plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. var. Tupy. La longitud de raíz se vio favorecida por los efectos de la cepa COPE52, con una longitud de 3.14 cm, seguido de UM96 y E25 con 1.53 y 1.0 cm respectivamente (Fig. 6a). Ninguna de las cepas presentó efectos de promoción sobre la longitud aérea de las plántulas, hubo un efecto contrario de la cepa UM96 al inhibir en un 56% el crecimiento aéreo (Fig. 6b). Las plántulas tratadas con las cepas COPE52, UM96 y E25 presentaron un mayor peso seco de raíz, destacando la primera de ellas con 0.0167g (Fig. 6c). Respecto al peso seco aéreo ninguna de las plántulas tratadas con las diferentes cepas presentó efectos de promoción, habiendo incluso una inhibición de peso seco promovido por la cepa UM96 que inhibió el peso en un 52.61% (Fig. 6d). En cuanto al número de raíces laterales fueron las cepas E25, COPE52 y UM96 las que promovieron con 1.85, 1,76 y 1.33 raíces laterales respectivamente (Fig. 6f). Las cepas E25, COPE52 y CR71 incrementaron el contenido de clorofila en un 16% (Fig. 6e).

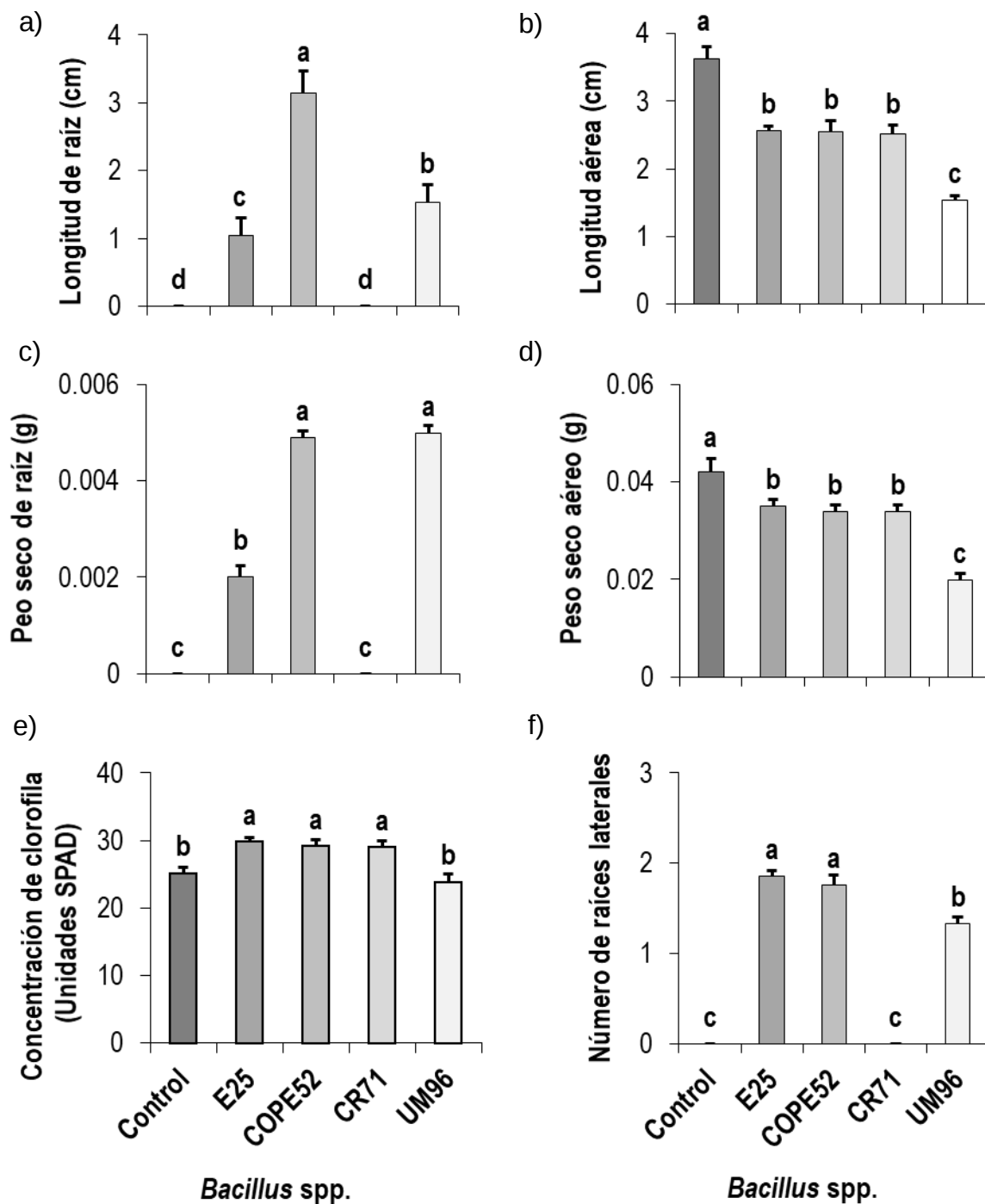


Figura 6. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp., var. Tupy. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.

Promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de plántulas de *Rubus* sp., var. Tupy, mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles producidos por cepas de *Bacillus* spp.

El efecto de promoción del crecimiento de la raíz con las cepas *Bacillus* spp., mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles sobre la raíz de *Rubus* sp., var. Tupy, fue la cepa E25 con un crecimiento de la longitud de 3.03 cm, seguido de las cepas E25 y UM96 con 1.12 y 1.1 respectivamente (Figura 7a). La longitud aérea no se vio favorecida por ninguna de las cepas, por lo contrario UM96 presentó efectos inhibitorios en un 32.94% (Fig. 7b). Las cepas E25, COPE52 y CR71 promovieron el peso seco de raíz, destacando COPE52 con 0.0037g (Fig. 7c). En cuanto al peso seco aéreo ninguna de las cepas presentó efectos de promoción en efecto contrario la cepa COPE 52 presentó efectos inhibitorios con un 51.16% (Fig. 7d). La concentración de clorofila se incrementó con las cepas E25 y COPE52 al presentar diferencias estadísticas respecto al control y fueron las cepas E25, COPE52 y CR71 (Fig. 7e), las que incrementaron el número de raíces laterales (Fig. 7f).

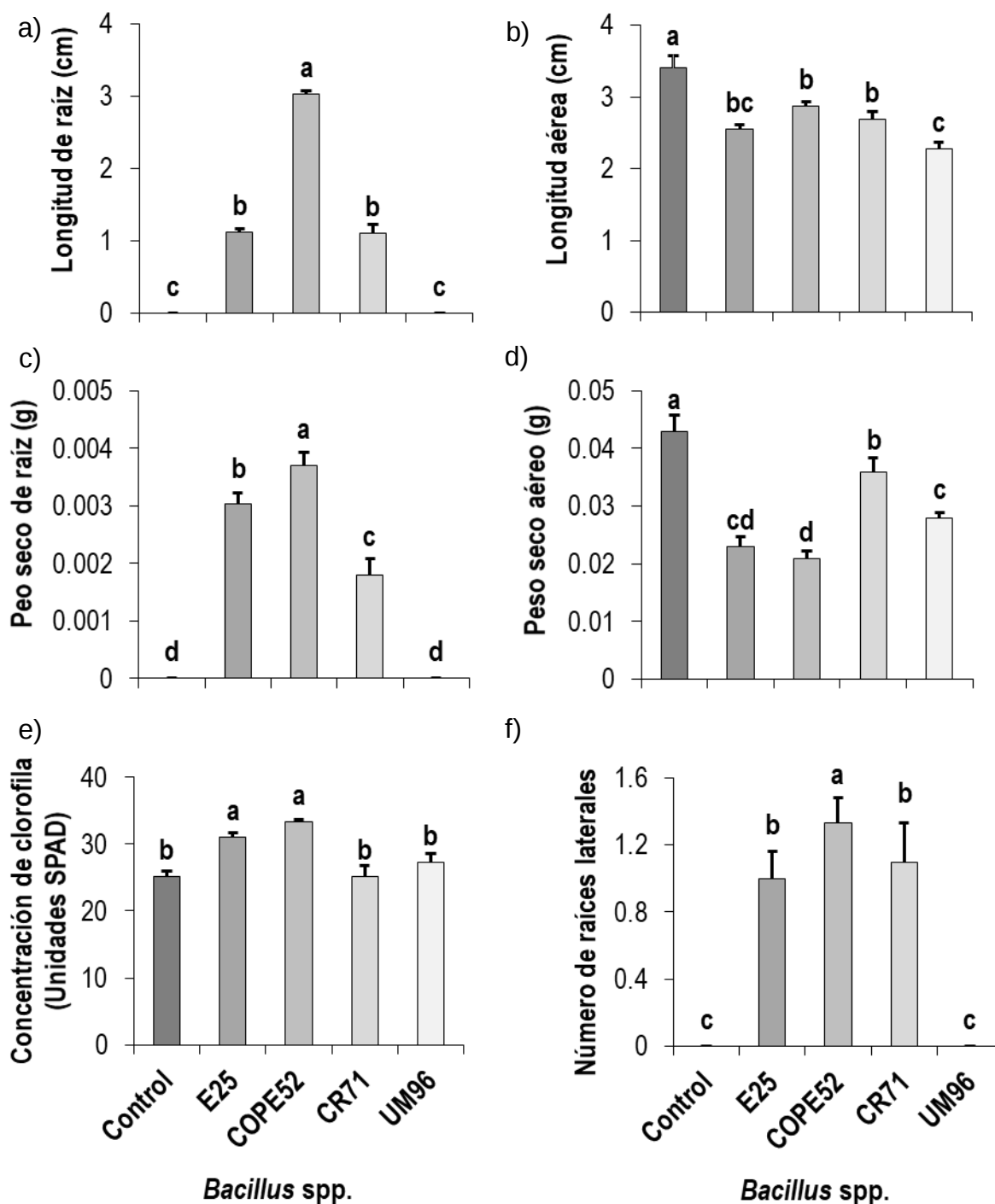
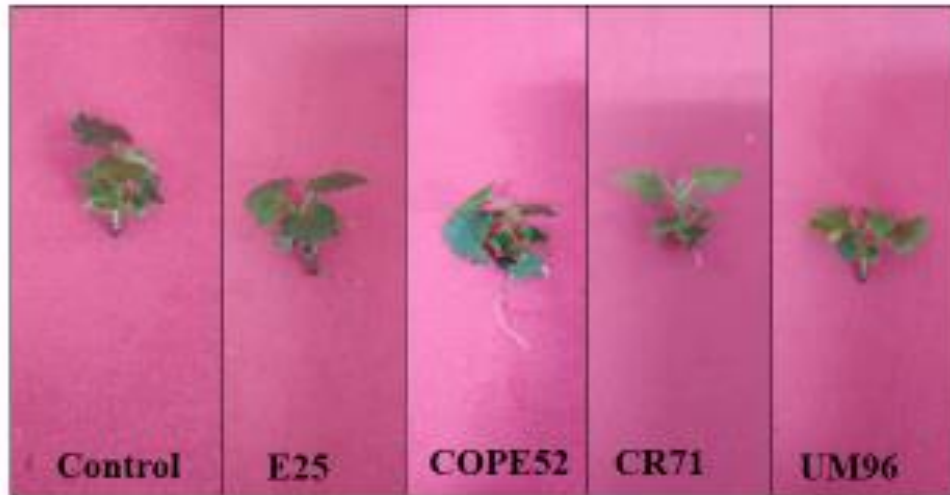


Figura 7. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp., var. Tupy. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.

a)



b)



Figura 8. Efecto de la emisión de compuestos difusibles (a) y compuestos orgánicos volátiles (b) por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71 y UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. var. Tupy.

Promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de plántulas de *Rubus* sp. var. Kiowa mediante la emisión de compuestos difusibles producidos por cepas de *Bacillus* spp.

La Figura 9a muestra el efecto de la emisión de compuestos difusibles sobre la longitud radical, las cuatro cepas fueron estadísticamente diferentes respecto al control, destacando las plántulas inoculadas con las cepas COPE52 y UM96 al presentar mayor crecimiento de raíz, con una longitud de 4.9 y 5.02 cm respectivamente. La longitud aérea fue promovida por las cepas E25, CR71 y UM96 con 2.84, 2.72 y 2.76 cm de longitud respectivamente (Fig. 9b). El peso seco de raíz únicamente se vio favorecido por la cepa COPE52 con un peso de 0.013g (Fig. 9c). En el peso seco aéreo de las plántulas inoculadas con las cuatro cepas presentaron diferencias estadísticas sobre el control, destacando las plántulas inoculadas con la cepa COPE52 con un peso seco de 0.022g (Fig. 9d). El contenido de clorofila se vio influenciado por las cuatro cepas presentando las plántulas concentraciones de entre 40.69 y 43.43 unidades SPAD (Fig. 9e). Las cepas E25 y UM96 promovieron la emergencia de raíces laterales (Fig. 9f).

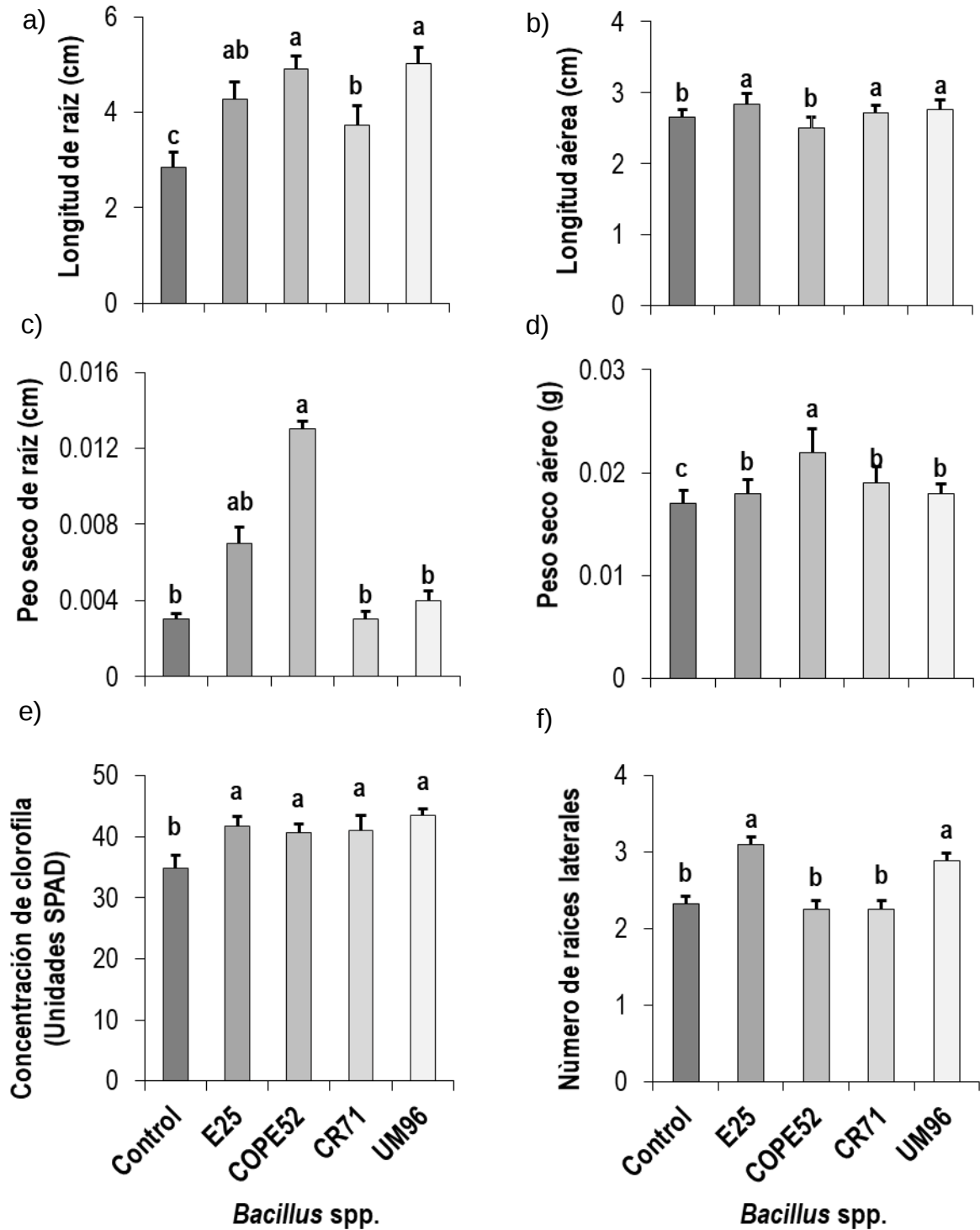


Figura 9. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. var. Kiowa. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.

Promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de plántulas de *Rubus* sp., var. Kiowa, mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles producidos por cepas de *Bacillus* spp.

La figura 10a presenta el efecto de las cepas de *Bacillus* spp., sobre el crecimiento de raíz de las plántulas, únicamente las plantulas inoculadas con las cepas E25 y UM96 presentaron diferencias estadísticas respecto al control con 4.23 y 5.11 cm de longitud respectivamente. El crecimiento aéreo únicamente se vio favorecido por la cepa E25 y en efecto contrario lo presentaron las plántulas inoculadas con las cepas COPE52 (Fig. 10b). Las plántulas inoculadas con las cepas E25 y UM96 fueron las únicas que presentaron diferencias estadísticas con respecto al control con 0.0063 y 0.005g de peso seco de raíz (Fig. 10c). Las plántulas inoculadas con la cepa E25 se destacaron con un peso de 0.023g, seguidas de las plántulas tratadas con la cepa UM96 que fueron significativas diferentes al control con 0.021g de peso seco aéreo (Fig. 10d). Ninguna de las plantas tratadas con las diferentes cepas presentaron diferencias estadísticas respecto al control sobre el contenido de clorofila (Fig. 10e) y son las plántulas tratadas con las cepas E25 y UM96 las únicas que presentaron diferencias estadísticas en el número de raíces laterales (Fig. 10 f).

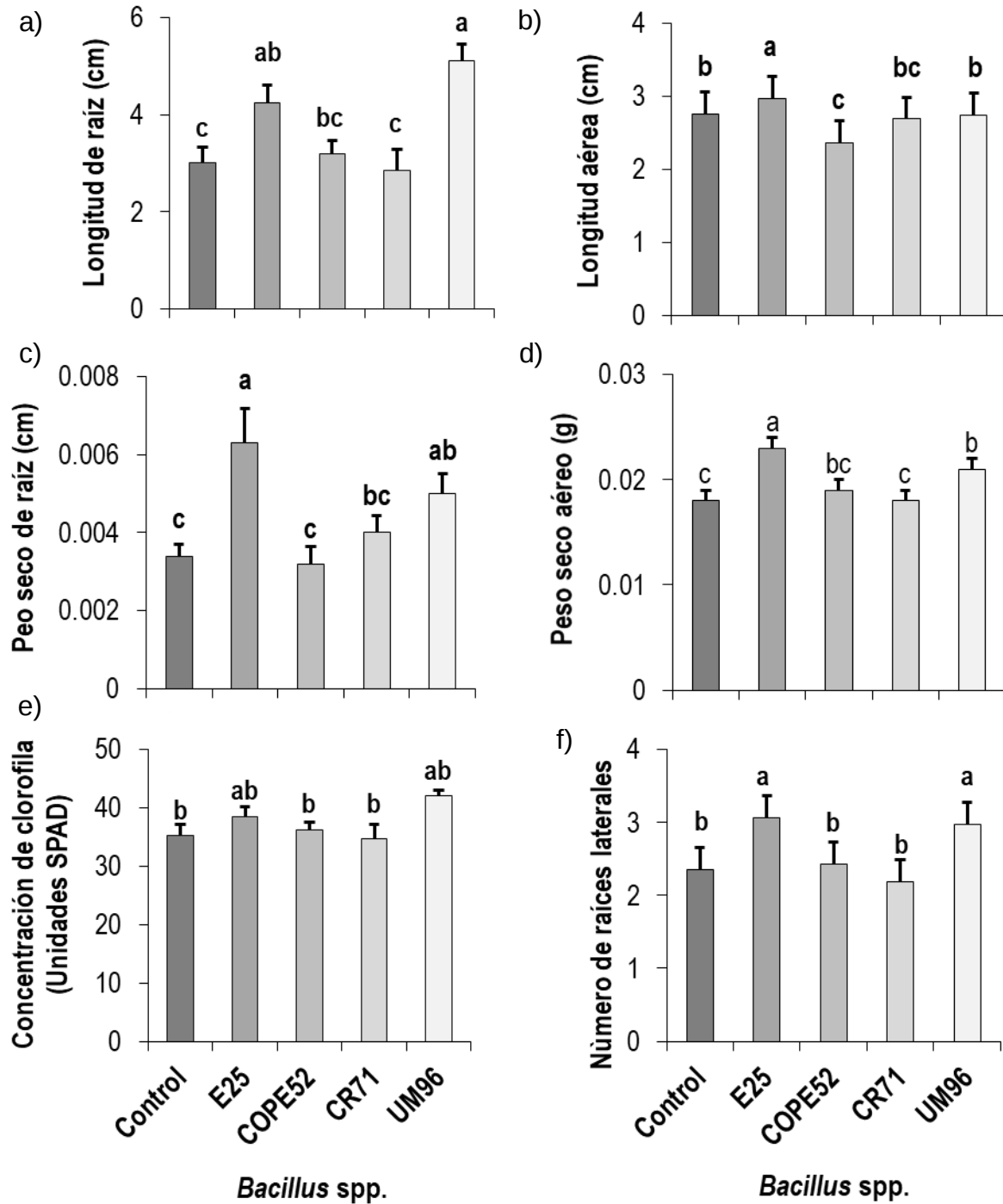


Figura 10. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp., var. Kiowa. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.

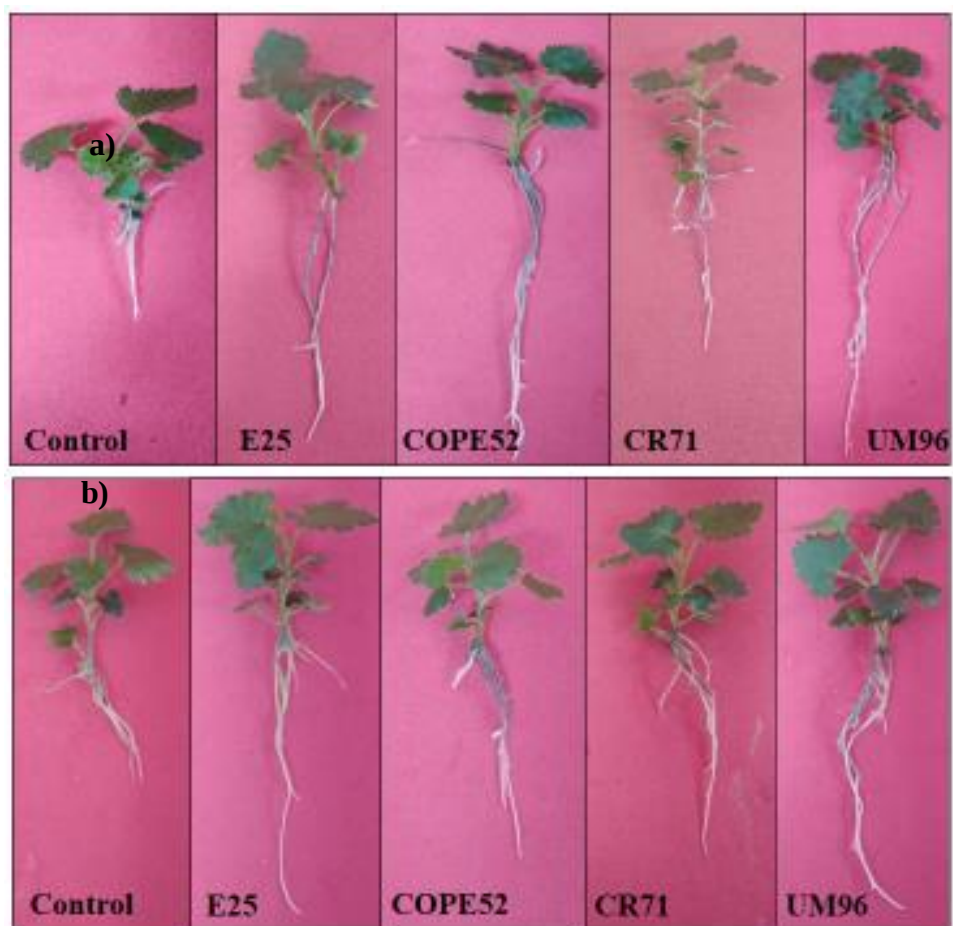


Figura 11. Efecto de la emisión de compuestos difusibles (a) y compuestos orgánicos volátiles (b) por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp., var. Kiowa.

Promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de plántulas de *Rubus* sp., selección UM13, mediante la emisión de compuestos difusibles producidos por cepas de *Bacillus* spp.

Mediante la emisión de compuestos difusibles para la longitud de raíz las plántulas inoculadas con las cuatro cepas *Bacillus* sp., presentaron diferencias estadísticas respecto al control destacando las plántula tratadas con las cepas CR71 y UM96 con una longitud de 6.83 y 6.73 respectivamente (Fig.12a). En la longitud aérea las plántulas inoculadas con las cepas COPE52 y UM96 presentaron diferencias estadísticas respecto al control con 2.36 y 2.48 cm de longitud, la cepa CR71 indujo menor longitud aérea en las plántulas en comparación con el control (Fig.12b). En el peso seco de raíz las plántulas tratadas con las cuatro cepas de *Bacillus* spp., presentaron diferencias estadísticas respecto a las plántulas control sobresaliendo las plántulas inoculadas con la cepa CR71 con un peso de 0.0060g (Fig.12c). El peso seco aéreo solamente se vio favorecido por las cepas E25 y COPE52 presentaron diferencias estadísticas respecto al control (Fig. 12d). La concentración de clorofila se vio favorecida en las plántulas inoculadas con las cepas E25, CR71 y UM96, las que presentaron diferencias estadísticas, destacando entre ellas las plántulas tratadas con la cepa E25 con una concentración de 46.35 unidades SPAD (Fig. 12e). El número de raíces laterales se vio beneficiado por las cuatro cepas del género *Bacillus* spp., destacando las plántulas incouladas con las cepas E25 y CR71 con 2.5 raíces laterales (Fig. 12f).

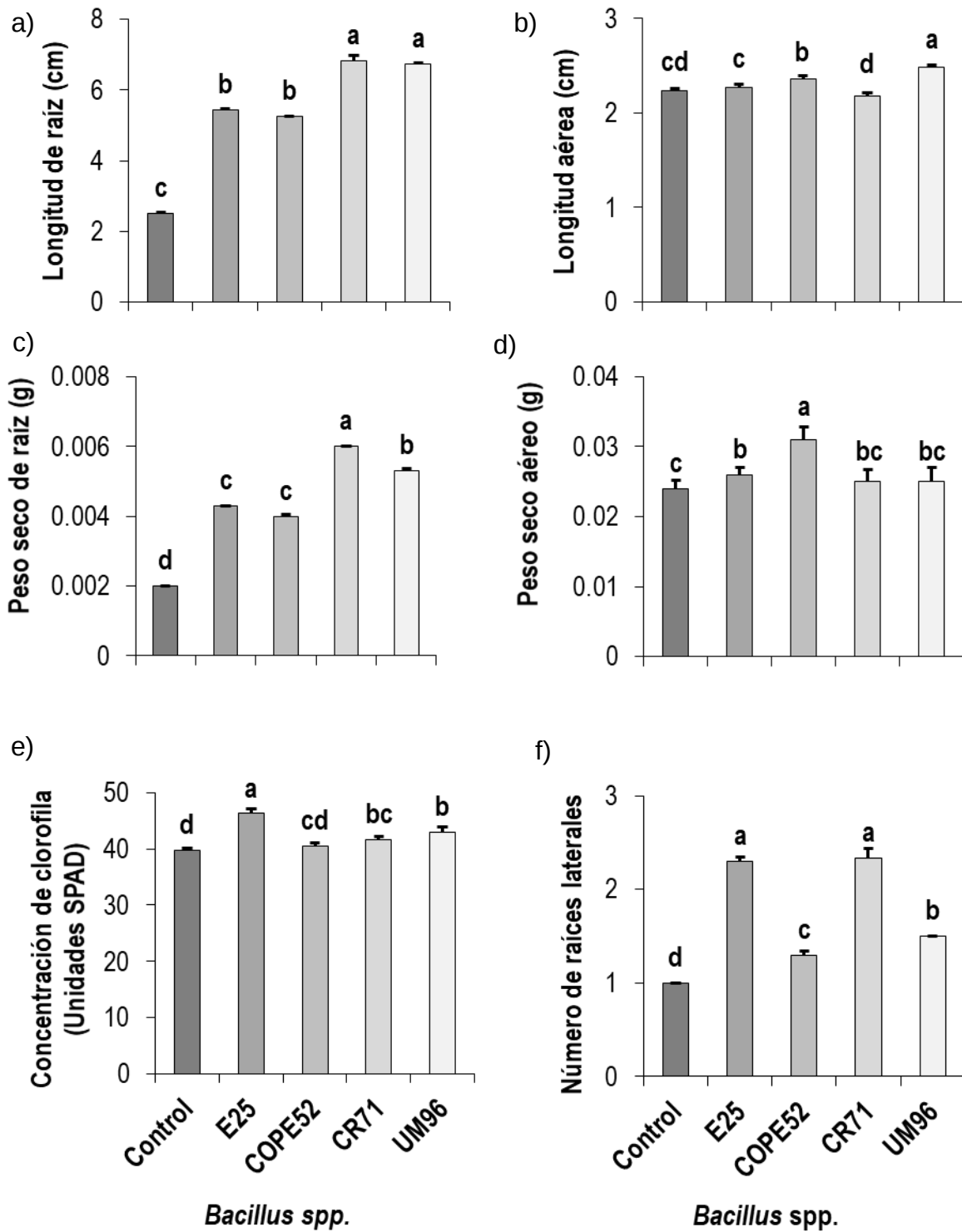


Figura 12. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp., selección UM13. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.

Promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de plántulas de *Rubus* sp., selección UM13, mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles producidos por cepas de *Bacillus* spp.

La emisión de compuestos orgánicos volátiles, emitidos por las cepas E25, COPE 52 y CR71 favorecen una mayor longitud de raíz con 7.90 cm, aunque la plántulas inoculadas con la cepa UM96 presentaron el menor crecimiento de raíz respecto al control (Fig. 13a). Únicamente las plántulas inoculadas con la cepa CR71 presentaron diferencias significativas respecto al control con una longitud de 2.53 y es en este caso la cepa UM96 indujo la menor longitud en comparación con el control (Fig. 13b). Las cuatro cepas de *Bacillus* spp., presentaron diferencias estadísticas respecto al control sobre el peso seco de raíz de las plántulas inoculadas con éstas, fueron las plántulas inoculadas con estas, fueron las plántulas tratadas con las cepas COPE52 y CR71 las que destacaron con un peso de 0.007 y 0.0067g respectivamente (Fig. 13c). Únicamente las plántulas inoculadas con la cepa COPE52 presentaron diferencias significativas respecto al control con un peso seco aéreo de 0.032g (Fig. 13d). Respecto al contenido de clorofila fueron las plántulas inoculadas con las cepas E25 y COPE52, las que presentaron diferencias estadísticas respecto al control con concentraciones de 43.17 y 42.76 unidades SPAD respectivamente (Fig. 13e), es interesante observar como las plántulas inoculadas con la cepa UM96 presentaron menor concentración de clorofila respecto al control (Fig. 13f).

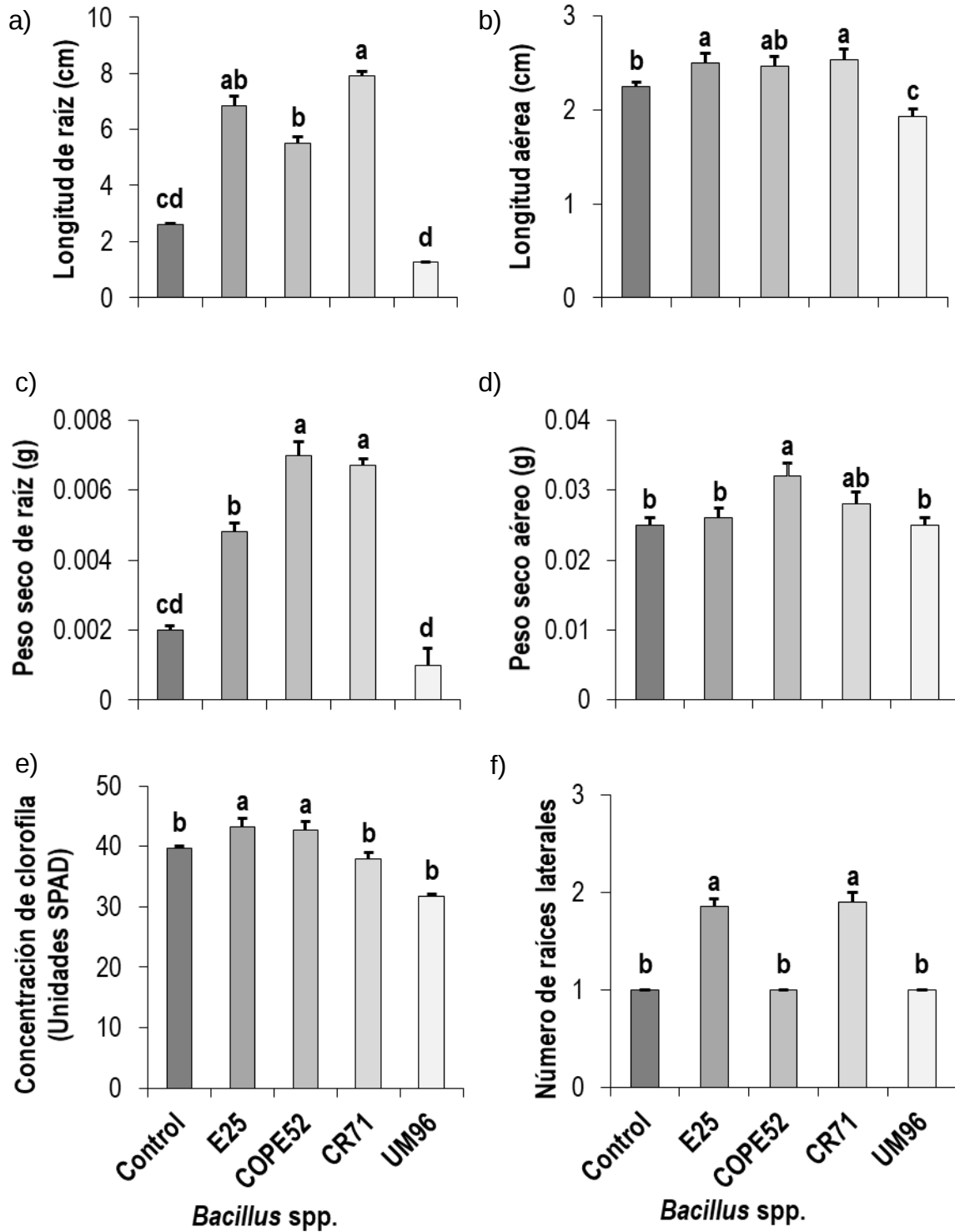


Figura 13. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp., selección UM13. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) concentración de clorofila y f) Número de raíces laterales.

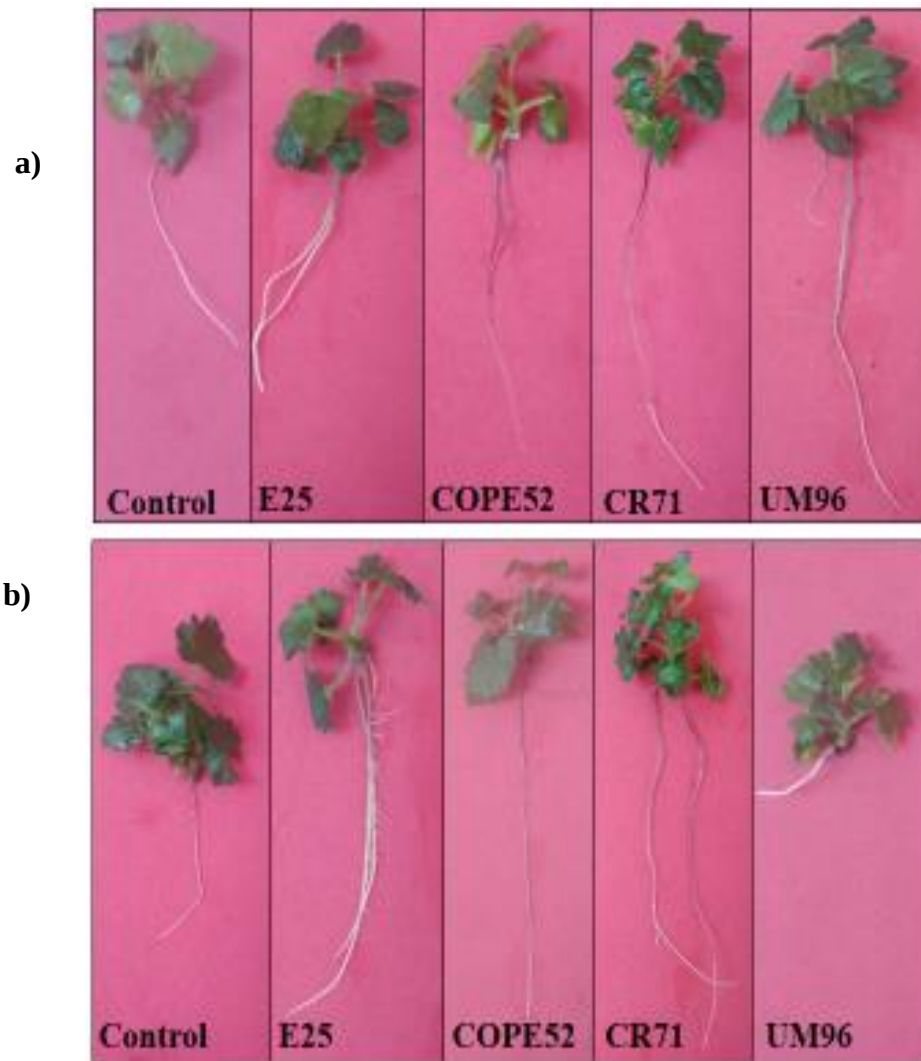


Figura 14. Efecto de la emisión de compuestos difusibles (a) y compuestos orgánicos volátiles (b) por las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp., selección UM13.

DISCUSIÓN

Los endófitos constituyen microorganismos colonizadores de plantas en una relación de simbiosis mutualista, se encuentran en la mayoría de los ecosistemas que reducen los estresores bióticos y abióticos de los cultivos de las plantas al estimular las respuestas inmunes, excluyendo a los patógenos de las plantas por competencia de nicho, cambian las propiedades del suelo y garantizan la supervivencia de la planta bajo estrés por sequía (Vurukonda *et al.*, 2016; Romera *et al.*, 2018). Participan en actividades antioxidantes y metabolismo fenilpropanoide, cuya activación produce defensa vegetal, soporte estructural y moléculas de supervivencia. Las actinobacterias y los endófitos de *Bacillus* producen compuestos aromáticos, lipopéptidos, hormonas vegetales, polisacáridos y varias enzimas relacionadas con el metabolismo del fenilpropanoide, lo que representa un alto potencial para promoción de crecimiento vegetal (Ramos *et al.*, 2019).

En el presente estudio se utilizaron cepas E25, CR71, COPE52 y UM96 del género *Bacillus* sp., para evaluar su efecto en la promoción del crecimiento vegetal sobre una selección y dos variedades de *Rubus* sp. La cepa UM96 presenta efectos inhibitorios sobre el peso seco aéreo de las plantas de la variedad Tupy mediante la emisión de compuestos difusibles. La demás cepas ejercen efectos de promoción de crecimiento vegetal y es la cepa E25 la que destaca con los porcentajes más altos en la promoción de peso seco y longitud de raíz mediante la emisión de ambos compuestos. La variedad Kiowa se ve influenciada por la cepa E25, COPE y UM96 para ambos tipos de emisión, destacando la cepa E25 que logro incrementar en un alto porcentaje el peso seco de raíz mediante la emisión de compuestos volátiles, y es COPE52 la que destaca mediante la emisión de compuestos difusibles al incrementar en mayor porcentaje el peso seco de raíz y aéreo.

Es mediante la emisión de compuestos difusibles que la cepa E25 incrementa el contenido de clorofila, peso seco aéreo y número de raíces laterales de plantas de *Rubus* sp., selección UM13 y es la cepa CR71 la que destaca al incrementar la

longitud de raíz, longitud aérea y peso seco de raíz con los más altos porcentajes de promoción. Estas mismas cepas son las que ejercen los mayores porcentajes de promoción mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles sobre la misma selección UM13.

Elsayed *et al.* (2017), evaluaron el efecto de *Bacillus subtilis* BERA 71 sobre plantas de garbanzos, su inoculación dio como resultado un aumento significativo en la síntesis de pigmentos fotosintéticos, incluidos clorofila “a”, clorofila “b” y carotenoides.

Rojas Solís *et al.* (2016), demostraron que las cepas bacterianas UM16, UM240, UM256 y UM270 aumentaron significativamente la biomasa y el contenido de clorofila, además de presentar un alto grado de antagonismo contra el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

Lin *et al.* (2014), reportan que al utilizar la cepa *Bacillus* sp. CZB7 se aumenta significativamente la altura y el peso seco del brote en un 33% y el 18%, respectivamente, en de las plántulas de pepino. Las cepas *Bacillus* sp. CZB15 y CZ20 aumentó la altura del brote en un 15% y 37% respectivamente. CZB15 también aumentó el peso seco de la raíz en un 29%. El peso seco del brote y el de la raíz aumentaron en un 19% y 53% respectivamente cuando se inocularon con la cepa CZB20. CZB26 aumento la altura del brote en un 46%, peso seco del brote en un 22% y el peso seco de raíz en un 59%.

Se ha demostrado que *Bacillus subtilis*, promueve la producción de citoquininas y eleva los niveles de ABA en los brotes, aumentando la conductancia estomática de plántulas de *Platycladus orientalis* (Liu *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Las cepas endófitas de *Bacillus* spp., presentan efectos de promoción de crecimiento vegetal sobre las plántulas de *Rubus* sp., variedad Tupy, Kiowa y selección UM13, sin embargo, es interesante la inhibición que ejerce la cepa UM96 mediante la emisión de compuestos volátiles y difusibles sobre la variedad Tupy.

El efecto de la promoción está en función de la interacción que establezca cada una de las cepas con la variedad o selección de plántulas y del tipo de compuesto que emitan.

La variedad Tupy presenta mayor porcentajes de promoción vegetal al ser inoculada con la cepa E25, mientras que la variedad Kiowa incrementa su promoción vegetal al ser inoculada con las cepas E25 y COPE52 en mayores porcentajes. La selección UM13 sólo incrementa su promoción al inocularse con la cepa CR71.

LITERATURA CITADA

- Camelo** R. M., Vera M. S. P & Bonilla B. R. R., (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12:159-166.
- Contreras** M., Loeza, P. D., Villegas, J., Farias, R., & Santoyo, G. (2016). A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genet. Mol. Res*, 15(3), 1-10.
- Elsayed** F. A. A., Abdulaziz A., Alqarawi A. H., Ramalingam R., Asma. A., Al-Huqail, Fatma O. N., Jahangir A. M., Raedah I. A & Dilduza E. (2017). Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms, *Journal of Plant Interactions*, 13:1, 33-44.
- FAO**. (2015). Food and Agriculture Organization. Disponible en: <http://www.fao.org> (Último acceso: 7 de junio 2018).
- Lin** Y, Du D, Si C, Zhao Q, Li Z, Li P. (2014). Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. *Biological Control*, 71:7-15
- Liu** F., Xing, S., Ma, H., Du, Z & Ma, B. (2013). Cytokinin producing, plant growth promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9155-9164.
- Liu** S., Hao H., Lu X., Zhao X., Wang Y., Zhang Y., Xie Z & Wang R. (2017). Transcriptome profiling of genes involved in induced systemic salt tolerance conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in *Arabidopsis thaliana*. *Nature. Scientific Reports*. 7: 10795
- Ramos** M. J., Gómez F. R., Orozco F, A. A, Rodríguez P. C., González O, G & Tamez G, P. (2019). Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 10:463

- Rojas** S, D., E., Hernández P & G. Santoyo. (2016). Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Phytalis ixocarpa* Brot. Ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Vol. XXII. 1:45-57.
- Romera** F. J., García M., Lucena C., Martínez M. A., Aparicio M. À., Ramos J., Alcántara E., Angulo M & Pérez V, R. (2018). Inducen systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*. 10:287
- Saharan**, B. S & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Reviw. *Life Sciences and Medicine Research*. 2: 1-15.
- SIAP**. (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.infosiap.siap.gob.mx>. Último acceso: 3 de mayo del 2019
- Vurukonda** S. S. K. P., Vardharajula S., Shrivastava M., SkZ A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24.
- Yand** B & Kortensniemi M. (2015). Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Food Science*, 2:36-42

CAPITULO III. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE PLANTAS DE ZARZAMORA INOCULADAS CON CEPAS ENDÓFITAS DEL GÉNERO *Bacillus* spp., Y LOS FITOPATÓGENOS *F. oxysporum* Y *Lasiodiplodia* sp., CRECIDAS BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.

RESUMEN

En los últimos años el cultivo de la zarzamora se ha visto seriamente afectado por diversos microorganismos entre los cuales se encuentran *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., este último, recientemente identificado, causando grandes pérdidas e incluso acabando en un 100% con las áreas de producción. Entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado, se ha reportado que ejerce diversos mecanismos de promoción vegetal, de defensa ante diversos organismos fitopatógenos, es por ello que en este estudio se planteó el objetivo de analizar el comportamiento morfológico de las plantas inoculadas y crecidas bajo condiciones de invernadero inoculadas con cepas endófitas del género *Bacillus* spp., y los fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp. La variedad Tupy inoculada con las cepas de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* se vio influenciada por el tipo de inoculación establecida destacando entre ellos la cepa UM96 al combinarse con dicho fitopatógeno logro incrementar en un 81.8% el área foliar, así como el peso seco aéreo con un 43.67%, sin embargo también se presentaron efectos inhibitorios por parte de las cepas en el peso seco de raíz con un 39.29 y 38.19%. El peso seco aéreo de la variedad Tupy inoculada con la cepa CR71 en combinación con el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp., incremento en un 59.96%, respecto al peso seco de raíz se presentaron efectos inhibitorios por parte de las cepas E25 y CR71 con un 39.29 y 38.18%. La variedad Kiowa inoculada con la cepa COPE52 incremento en un 55.16% el peso seco aéreo y en el caso del peso seco de raíz fue la cepa CR71 sola y en combinación con el hongo fitopatógeno la que promovió el incremento del peso con un 29.79 y 21%. Las cepas CR71 y UM96 fueron las únicas en promover el peso seco aéreo y de raíz de las plantas de la variedad Kiowa

con respecto al control y a las plantas únicamente inoculadas con el hongo, CR71 incrementó el peso seco aéreo en un 55.16% y 29.70 el peso seco de raíz, la cepa UM96 incremento en un 62.43 y 27% para cada caso. La selección UM13 presentó efectos inhibitorios por parte de la cepa E25 hasta en un 38.70% y respecto al peso seco aéreo ninguna de las cepas tuvo diferencias estadísticas respecto al control incluidas las cepas que fueron inoculadas con las bacterias y los hongos fitopatógenos. El efecto de la promoción vegetal y biocontrol ejercido por las cepas de *Bacillus* spp., sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., dependerá del tipo de cepa utilizada para cada y de las variedad inoculada, las bacterias endófitas del género *Bacillus* spp, ejercen incremento e inhibición del crecimiento vegetal dependiendo de la variedad inoculada, del hongo fitopatógeno y la bacteria endófito. En algunos casos las bacterias del género *Bacillus* spp., presentaron efectos neutros respecto al tratamiento control y a las plantas inoculadas con el hongo fitopatógeno así como efectos de promoción respecto a ambos. Las bacterias endófitas del género *Bacillus* spp., pueden utilizarse dependiendo del efecto que ejerzan sobre cada una de las variedades como organismos promotores de crecimiento o preventivos ante el ataque de diversos organismos fitopatógenos.

Keywords: *Rubus* sp., *Bacillus* spp., *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia* sp., promoción del crecimiento vegetal

ABSTRACT

In recent years the cultivation of blackberry fruits has been seriously affected by various microorganisms among which are *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp., the latter recently identified, causing large losses and even ending 100% with the production areas. The genus *Bacillus* has been widely studied, it has been reported that it exerts various mechanisms of plant promotion, defense against various phytopathogenic organisms, that is why in this study the objective of analyzing the morphological behavior of inoculated and grown plants under conditions was raised of greenhouse inoculated with endophytic strains of the genus *Bacillus* spp., and the phytopathogens *F. oxysporum* and *Lasiodiplodia* sp. The Tupy variety inoculated with the *Bacillus* spp. as the aerial dry weight with 43.67%, however, there were also inhibitory effects by the strains on the dry root weight with 39.29 and 38.19%. The aerial dry weight of the Tupy variety inoculated with the strain CR71 in combination with the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia* sp., Increased by 59.96%, with respect to the dry root weight, inhibitory effects were presented by the strains E25 and CR71 with a 39.29 and 38.18%. The Kiowa variety inoculated with the strain COPE52 increased by 55.16% the aerial dry weight and in the case of the root dry weight it was the strain CR71 alone and in combination with the phytopathogenic fungus which promoted the increase in weight with a 29.79 and 21%. The CR71 and UM96 strains were the only ones to promote the aerial and root dry weight of the Kiowa variety plants with respect to the control and the plants only inoculated with the fungus, CR71 increased the aerial dry weight by 55.16% and 29.70 the dry root weight, strain UM96 increased by 62.43 and 27% for each case. The UM13 selection had inhibitory effects on the part of strain E25 by up to 38.70% and with respect to air dry weight none of the strains had statistical differences with respect to control including strains that were inoculated with bacteria and phytopathogenic fungi. The effect of the plant and biocontrol promotion exerted by the *Bacillus* spp., exert increase and inhibition of plant growth depending on the inoculated variety, the phytopathogenic fungus and the endophytic bacteria. In some cases the bacteria of the genus *Bacillus* spp., presented neutral effects with respect to the control

treatment and to the plants inoculated with the phytopathogenic fungus as well as promotional effects with respect to both. Endophytic bacteria of the genus *Bacillus* spp. can be used depending on the effect they have on each of the varieties as growth or preventive organisms against the attack of various phytopathogenic organisms.

Keywords: *Rubus* sp., *Bacillus* spp., *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia* sp., plant growth promotion.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de zarzamora se ha consolidado en los últimos años como uno de los más importantes a nivel nacional e internacional gracias a las favorables características que posee, su demanda ha incrementado notablemente, expandiéndose su exportación a países hacia países asiáticos y europeos. Sin embargo las zonas de producción donde establece dicho cultivo se han visto afectadas por una serie de patógenos entre los que se encuentra *Fusarium oxysporum*, este se ha reportado como un problema fitopatológico que ataca al cultivo de la zarzamora (*Rubus* spp), ocasionando síntomas de marchitez y muerte en plantas. En 2011 se identificó en el cultivar “Tupy” en los Reyes Michoacán (Gordon *et al.*, 2016), en donde se encuentra la mayor producción de dicho cultivo en México con 5000 hectáreas en producción representando el 41% a nivel nacional (SIAP, 2018). Otro de los patógenos recientemente identificado es *Lasiodiplodia* sp., causante de necrosis de hojas, ramas y tallos (con una progresión basipétala), seguido por defoliación y muerte de la plantas de zarzamora (Contreras *et al.*, 2019). Estudios previos han reportado la inhibición de diversos fitopatógenos mediante el biocontrol con de diversas especies de bacterias endófitas entre los que se encuentran *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebisella*, *Entobacter*, *Arthobacter* y *Bacillus* (Glick, 1999).

Dentro del género *Bacillus* se han reportado numerosas especies como productoras de sustancias con actividad funguicida y bactericida, entre las que figuran la subtilisina y la iturina, algunas de las especies reportadas son *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. pumilus* que han logrado inhibir especies de los géneros *Pithium* y *Rhizoctonia* (Castellanos, 2002); *Helmintosporium*, *Fusarium* y *Curvularia* (Muhammad, 2003); *Botrytis* y *Cochliobolus* (Castellanos, 2002); *Collectotrichum* y *Cercospora*; *Alternaria*, entre otros (Fernández, 1988).

La promoción vegetal y la sanidad de la planta, se da mediante diferentes mecanismos enfocados principalmente a la zona radical de la planta (Camelo *et al.*,

2011), el primero de ellos es mediante la estimulación de mecanismos directos que incluye la producción de fitohormonas (auxinas, citocininas, etileno, ácido abscísico y giberelinas), biosolubilización de fosfatos, reducción de hierro y adquisición de nutrientes esenciales (Gholami *et al.*, 2009), el segundo tipo de mecanismos son los indirectos que incluyen los mecanismos de biocontrol (antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, producción de metabolitos), emisión de compuestos orgánicos volátiles, resistencia sistémica inducida, entre otros (Cattelan *et al.*, 1999). Dada la problemática anterior y las características antifúngicas que el género *Bacillus* presenta, se ha propuesto el siguiente objetivo.

Analizar el comportamiento morfológico de las plantas inoculadas y crecidas bajo condiciones de invernadero inoculadas con cepas endófitas del género *Bacillus* spp., y los fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en la Ciudad de Uruapan, Michoacán, México, cuya localización geográfica es 19° 23′ 38.8″ de LN y 101° 05′ 54.6″ de LO., en el Invernadero de “Mejoramiento Genético de Frutillas”.

Material biológico

Plantas de zarzamora. Se utilizaron plantas de zarzamora variedad Kiowa, Tupy y la selección UM13 generadas por el programa de mejoramiento genético de frutillas de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Todas las plantas fueron propagadas mediante el cultivo *in vitro* y adaptadas en sustrato estéril de peat-moss dentro de charolas de plástico totalmente cerradas. Se mantuvieron a una humedad del 100% en un inicio y se irá reduciendo gradualmente, se realizarán riegos cuantas veces sea necesario para mantener el sustrato a capacidad de campo.

Bacterias endófitas. Se utilizaron las cepas endófitas E25, COPE52, CR71 y UM96 del género *Bacillus* spp., proporcionadas por el Dr. Gustavo Santoyo Pizano, Profesor Investigador del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las cepas bacterianas fueron previamente aisladas de plantas de zarzamora variedad Tupy en la región de Ario de Rosales, Michoacán, México.

Hongos fitopatógenos de zarzamora. Se utilizarán los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., los cuales fueron previamente aislados de plantas de zarzamora del Municipio de Peribán, Michoacán, México.

Establecimiento y pruebas de tolerancia en invernadero de los materiales

Todos los materiales, antes de ser inoculados, fueron trasplantados en macetas de 3 L conteniendo como sustrato una mezcla de peat-moss y perlita (3:1). Las plantas se fertilizaron cada semana con una solución nutritiva que constará de una fuente de N-P-K-Mg-Ca y S, así como de elementos menores como Fe, Cu, Mo y Zn.

Inoculación de las plantas de zarzamora con las cepas bacteria endófitas y los hongos fitopatógenos

De cada una de las cepas bacterianas en placas se tomó una alícuota y se colocó individualmente en un matraz con 100 mL de medio PD (Papa-Dextrosa) incubado en agitación (120 rpm) a 28°C por 24 horas para su activación. Las cepas bacterianas se colocaron en un matraz individualmente con 499 mL de medio PD más 1 mL del medio con bacterias activadas hasta alcanzar una D.O. (560-600 nm) entre 0.8 y 1, dicho tiempo se calculó mediante una cinética de crecimiento bacteriano. Una vez crecidas las bacterias se inocularon 30 mL de la suspensión bacteriana conteniendo 10^6 UFC/mL de cada cepa por planta de zarzamora de 1 mes de edad, mediante el riego de la suspensión. Este procedimiento se repitió dos veces más con un intervalo de aplicación de 15 días.

Transcurridos 10 días después de la última inoculación de las plantas con la bacteria, las plantas se inocularon con los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., en cada una de las variedades y la selección, mediante riego en suspensión de conidios (1×10^{-6}). Los datos fueron tomados cada 8 días desde el inicio de la inoculación con la bacteria. El riego consistió en mantener el sustrato a capacidad de campo.

Diseño experimental

Inoculación y crecimiento de las plantas. Se utilizará un diseño completamente al azar con ocho repeticiones, en donde cada repetición corresponderá a cada variedad y la selección, inoculadas con cada cepa bacteriana endófitas (E25, COPE52, CR71, UM96), inoculadas con las cepas endófitas en combinación con cada uno de los hongos (*F. oxysporum* y *Lasiodiplodia sp*), y un respectivo control.

Las variables evaluadas fueron: concentración de clorofila, área foliar, longitud aérea, longitud de raíz, peso seco y fresco, y número de brotes.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y las variables que presentaron diferencias significativas se analizaron mediante la prueba de Duncan ($P < 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.2.

RESULTADOS

Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *F. oxysporum* sobre plantas de *Rubus* sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero.

La figura 15a muestra el efecto de la inoculación sobre la longitud de raíz, únicamente las plantas inoculadas con las cepas E25, CR71 y UM96 combinada con el hongo no presentaron efectos de promoción, en contraste las plantas inoculadas con la cepa E25 combinada con el hongo fueron las que presentaron el mayor porcentaje de incremento en el crecimiento con un 36.75%. La longitud aérea no se vio influenciada de manera positiva por ninguna de las cepas al contrario la cepa CR71 presento efectos de inhibición en un 24.74% (Fig. 15b). El Peso seco de raíz se inhibió en presencia de las cepas E25 y CR71 con un 39.29 y 38.19% (Fig. 15c), mientras que el peso seco aéreo en presencia de CR71 solo y en combinación con el hongo y UM96 no presentaron efectos de promoción, en sentido contrario fue las cepas UM96 en combinación con el hongo la que promovió en un 43.67% el peso (Fig. 15d). La cepa E25 fue la única que no promovió el incremento en contenido de clorofila y fueron las cepas CR71, UM96 sola y en combinación con el hongo las que destacaron al promover con 40.09, 36.52 y 39.36 el incremento de la concentración de clorofila (Fig. 15e). El área foliar únicamente se vio favorecida por las cepas E25, COPE52 y UM96 en combinación con el hongo al incrementar en un 48.08, 43.47 y 81.9% el área (Fig. 15f)

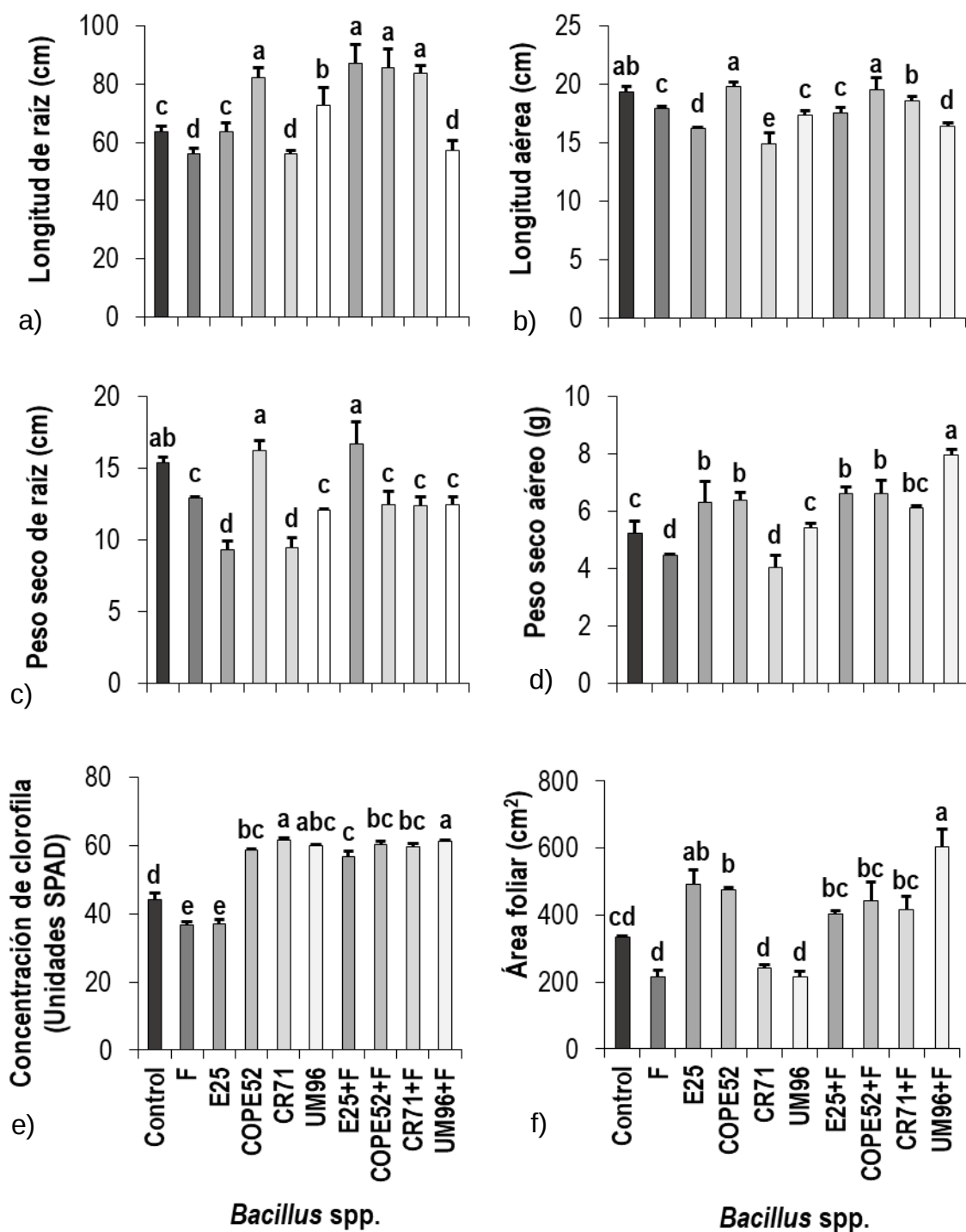


Figura 15. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (F) sobre plantas de *Rubus* sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f) Área foliar.

Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *Lasiodiploida* sp., sobre plantas de *Rubus* sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero.

La Figura 16a muestra el efecto de la inoculación de *Bacillus* spp, sobre la longitud de la raíz, destacando las cepas COPE52, CR71 en combinación con el hongo y UM96 las que promovieron el crecimiento de raíz con un 30.55, 37.07 y 59.12%. La longitud aérea presentò efectos de inhibición en presencia de la cepa CR71 al disminuir su crecimiento en un 23.11% (Fig. 16b), ninguna de las cepas presentò efectos de promoción para este caso y sobre el peso seco de raíz. Las cepa E25 y CR71 disminuyeron el peso seco de raíz en un 39.29 y 38.19% (Fig. 16c). Las cepas CR71, UM96 y COPE52 en combinación con el hongo fueron las únicas que no presentaron efectos de promoción sobre el peso seco aéreo, en contraste la cepa CR71, en combinación con el hongo, la que incrementó en un 59.96% (Fig. 16d). La cepa E25 fue la única que no promovió el incremento de la concentración de clorofila, mientras que el resto de las cepas incrementaron la concentración en un 40.10% (Fig. 16e). Las cepas CR71 y UM96 fueron las únicas que no incrementaron el área foliar, en contraste las cepas E25 y COPE52 en combinación con el hongo, incrementaron en un 67.85 y 83.33% el área foliar (Fig. 16f).

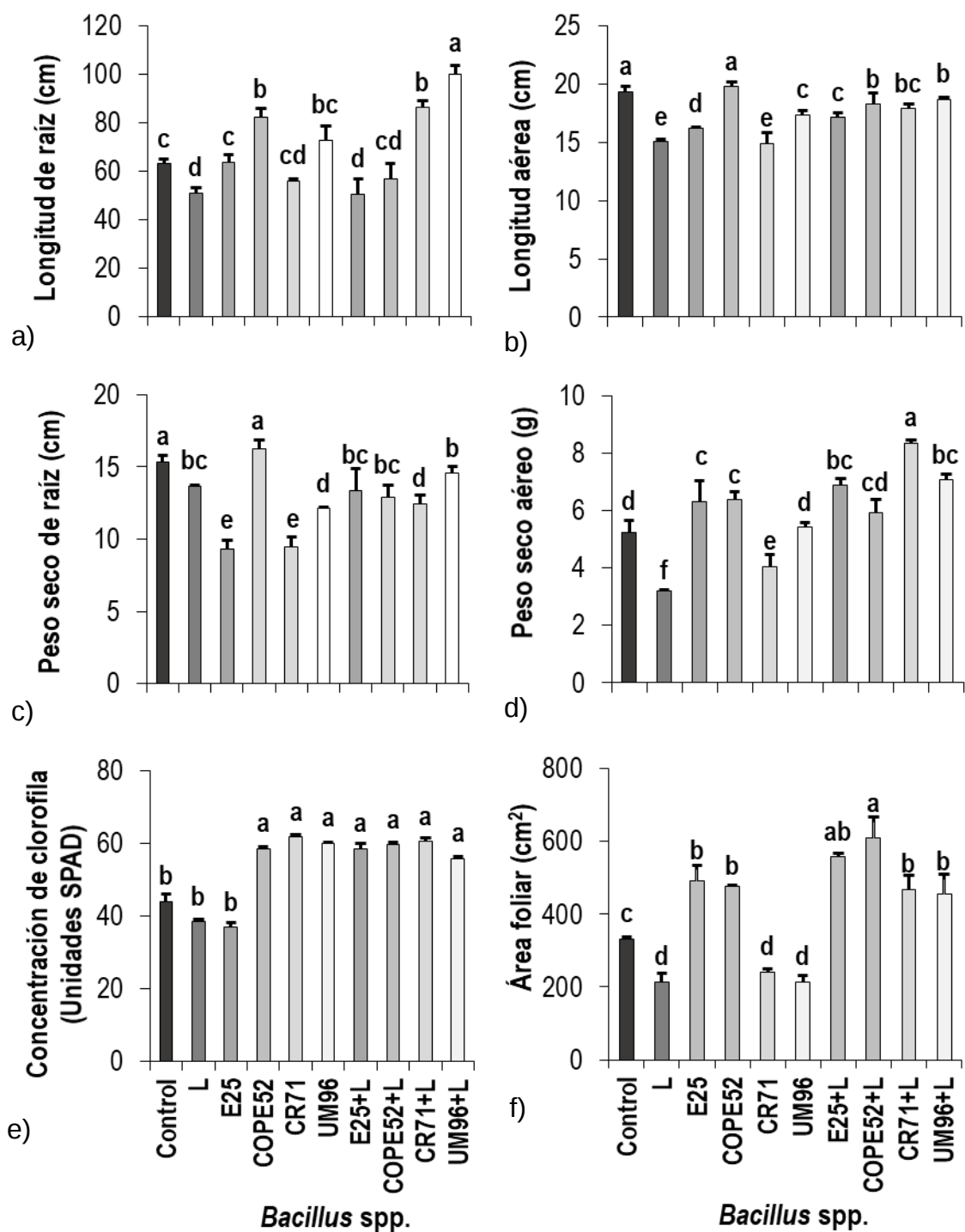


Figura 16. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp (L), sobre plantas de *Rubus* sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f) Área foliar.

Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *F. oxysporum* sobre plantas de *Rubus* sp., var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero.

La Figura 17a muestra los efectos de la inoculación sobre la longitud de raíz, observándose que únicamente las cepas UM96 y CR71 en combinación con el hongo fitopatógeno no presentan efectos de promoción, en contraste la cepa CR71 promovió con un 139.90% el crecimiento de raíz. En referencia la longitud aérea de las plantas se observó que las E25 y UM96 en combinación con el inhibidor en un 40.40% y 35.25%(Fig. 17b). La cepa CR71, sola y en combinación con el hongo, fue la única en promover el peso seco de raíz con un 29.79 y 21% respectivamente (Fig. 17c). El peso seco aéreo se vio beneficiado por las cepas COPE52 y UM96 al incrementar en un 55.16 y 26.07% (Fig. 17d). La cepa UM96, en combinación con el hongo, fue la única que promovió el área foliar con un 30.01% (Fig. 17e). Las cepas UM96, E25 y COPE52, en combinación con el hongo, en un 67.28 y 54% respectivamente (Fig. 17f).

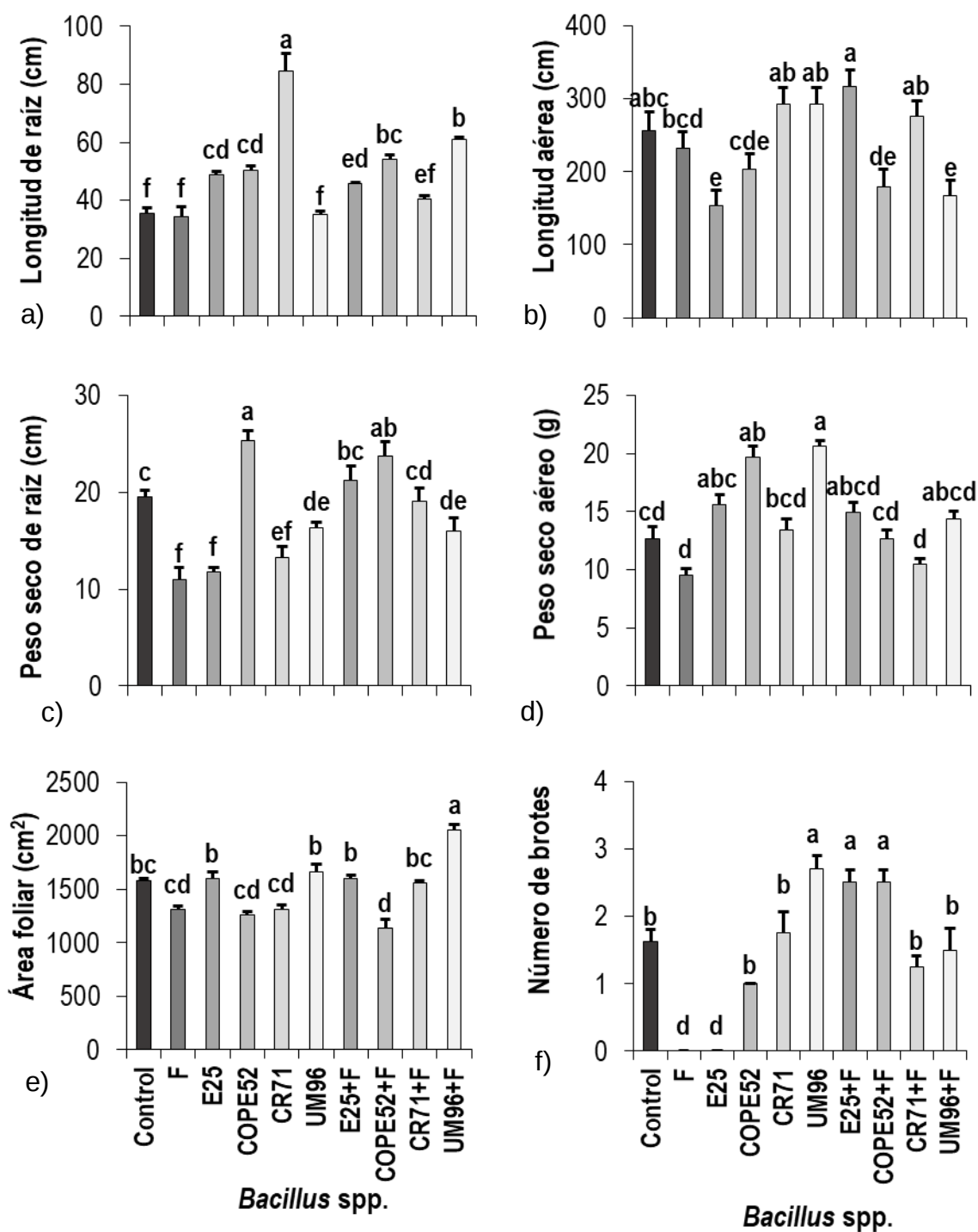


Figura 17. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (L.), sobre plantas de *Rubus* sp., var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Área foliar y f) Número de brotes.

Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *Lasiodiplodia* sp., sobre plantas de *Rubus* sp., var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero.

La Figura 18a muestra el efecto de la inoculación sobre la longitud de raíz, únicamente UM96 no promovió el crecimiento de raíz y fueron las cepas CR71 y COPE52 combinada con el hongo fitopatógeno las que lo promovieron con un 139.90 y 112.32%. La longitud aérea únicamente se vio favorecida por las cepas CR71 y UM96 en combinación con el hongo fitopatógeno incrementando en un 13.60 y 27.08% el crecimiento (Fig. 18b). Las cepas CR71 y UM96 fueron las únicas que promovieron el peso seco de raíz con un 29.79 y 27% respectivamente (Fig. 18c) y el peso seco aéreo con un 55.16 y 62.43% (Fig. 18d). El área foliar únicamente se vio favorecida por la cepas E25 y CR71 ambas en combinación con el fitopatógeno al incrementarla en un 27.30 y 25.45% respectivamente (Fig.18e), mientras que la emergencia de nuevos brotes fue favorecido únicamente la cepa UM96 (1.67 brotes/planta⁻¹) (Fig. 18f).

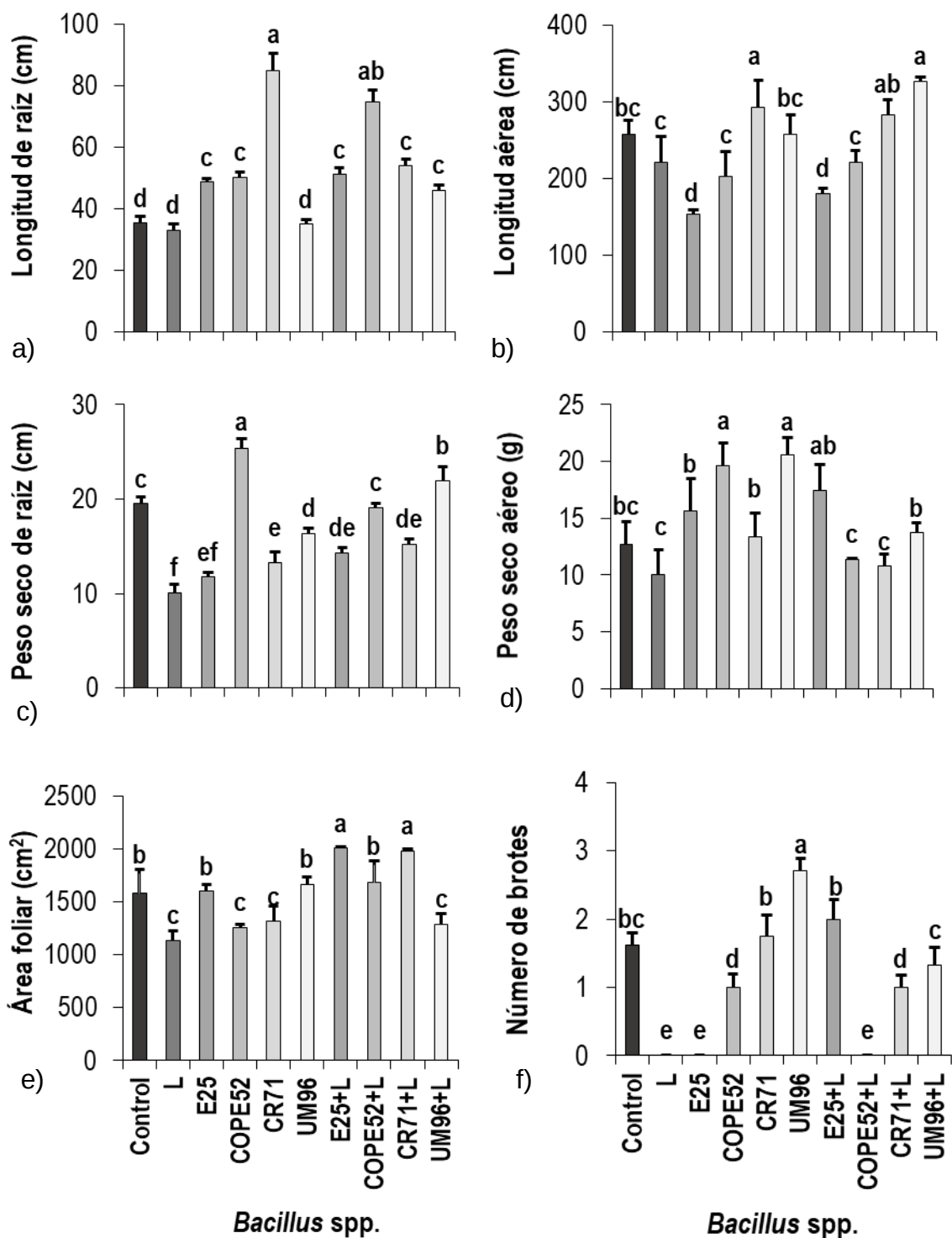


Figura 18. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp (L.), sobre plantas de *Rubus* sp., var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Área foliar y f) Número de brotes.

Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *F. oxysporum* sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero.

La Figura 19a presenta el efecto de la inoculación sobre la longitud de raíz, no hubo efectos de promoción, en contraste las cepas E25 y COPE52 inhibieron en un 37.29% dicha condición. La longitud aérea se viò favorecida por la cepa E25 en combinación con el hongo, en un 10.46% (Fig. 19 b). Las variables peso seco de raíz y aéreo (Fig. 19d) no presentaron efectos de promoción, la cepa E25 inhibió en un 35.29% el peso seco de raíz (Fig. 19c), aunque de manera contraría, esta misma cepa fue la única que aumentó el contenido de clorofila con un 38.35% (Fig. 19e). El área foliar se vio favorecida por las cepas COPE52 y UM96 ambas en combinación con el hongo al incrementar en un 12 y 12.7% respecto al control (Fig. 19f).

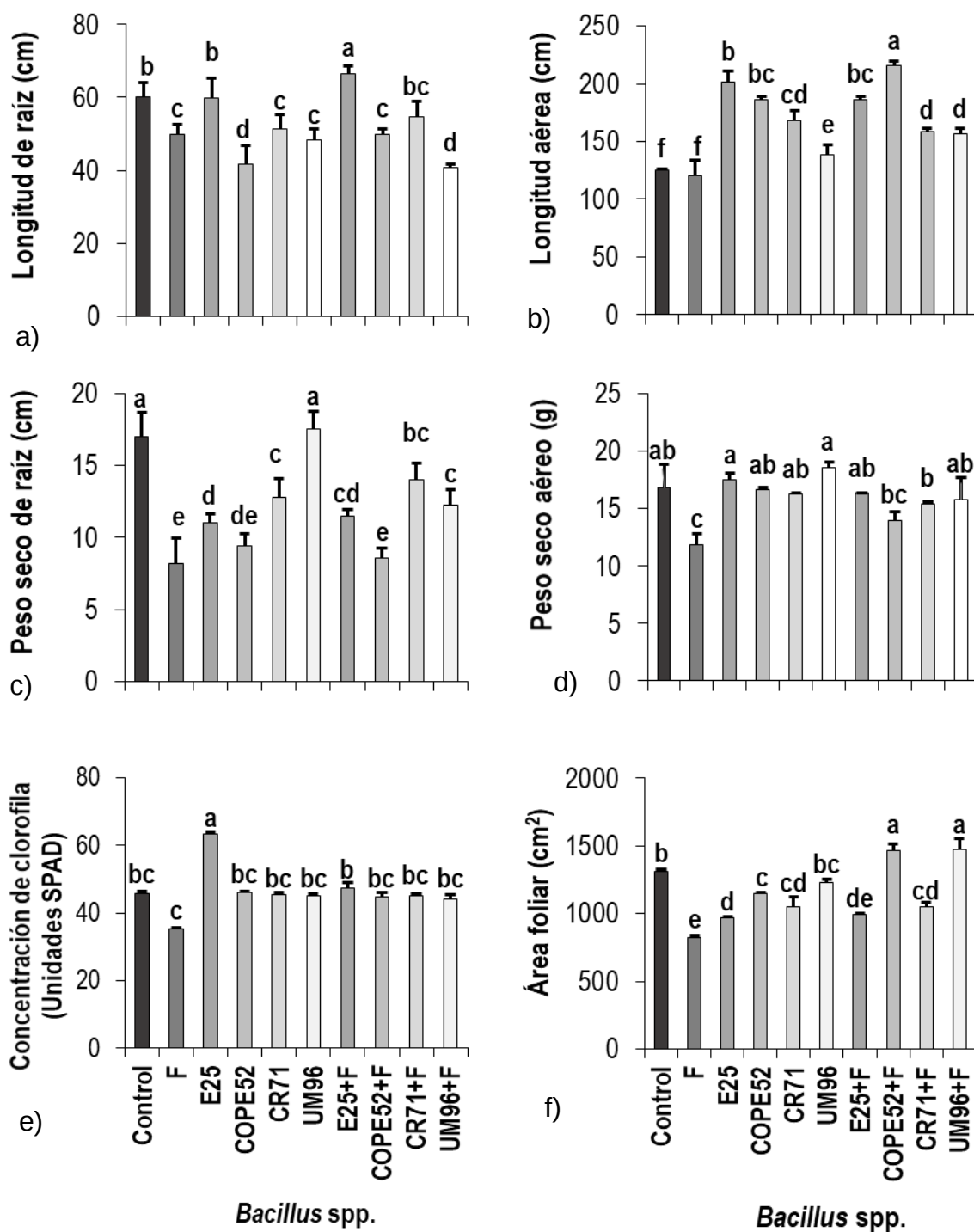


Figura 19. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (F.), sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f) Área foliar.

Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *Lasiodiplodia* sp., sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero.

La inoculación de las cepas bacterianas no afectaron la promoción de raíces en las plantas tratadas con éstas (Fig. 20a). En la longitud aérea únicamente las plantas inoculadas con la cepa UM96, sola o en combinación con el hongo, no presentan diferencias estadísticas respecto al control y son las cepas E25 sola y combinada con el hongo, y CR71 las que destacan al incrementar el crecimiento de las plantas en un 61, 54 y 55.14% (Fig. 20b). El peso seco de raíz no presentó efectos de promoción al contrario las cepas E25 y COPE52 las que presentaron efectos inhibitorios en un 38.70 y 44.70% respectivamente (Fig. 20c). El peso seco aéreo no presentó diferencias estadísticas (Fig. 20d). La cepa E25 fue la única en promover con un 38.35% el contenido de clorofila (Fig. 20e), el área foliar no presentó efectos de promoción en contraste fue la cepa E25 que inhibió en un 25.70% el área (Fig. 20f).

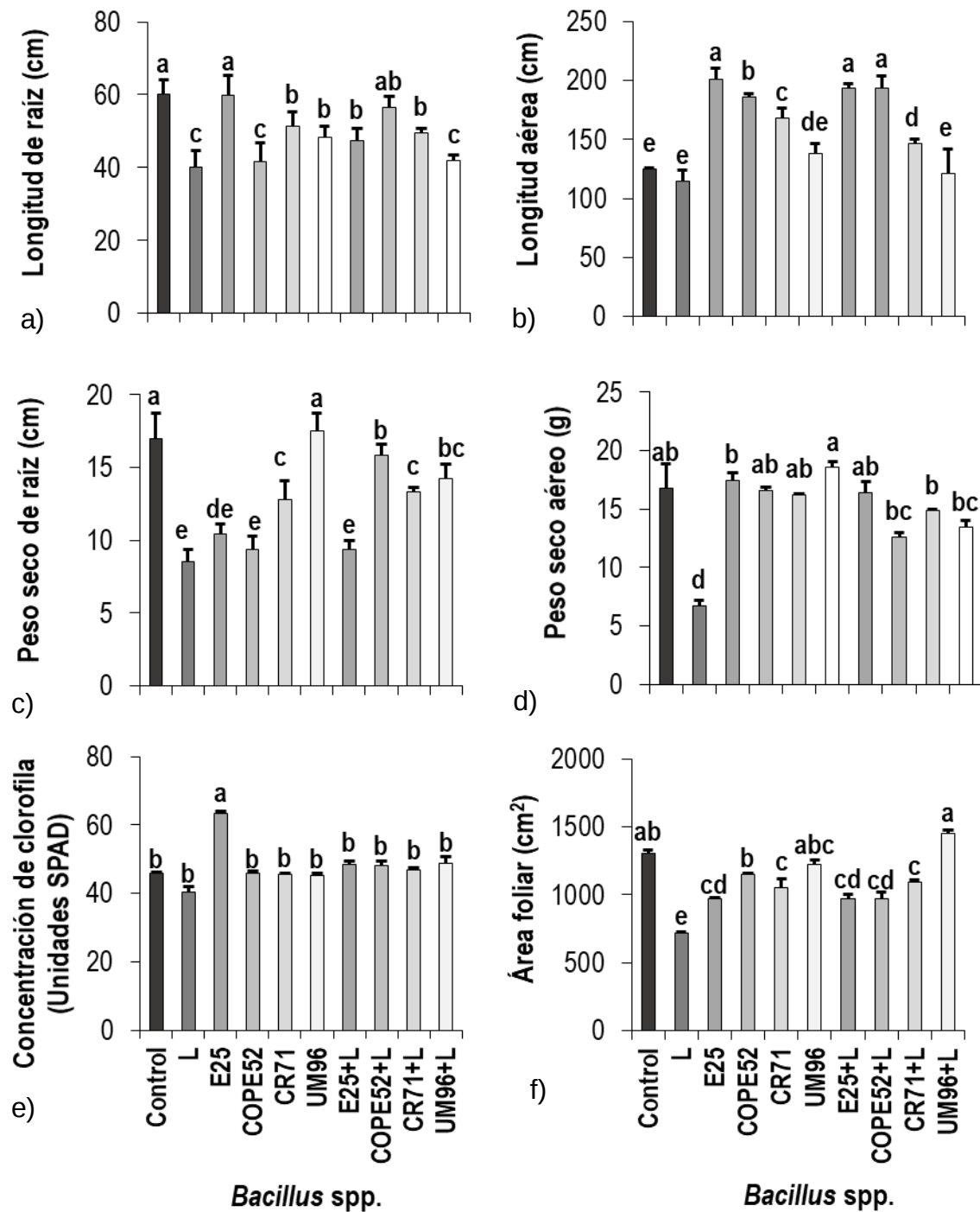


Figura 20. Efecto de la inoculación con las cepas endófitas E25, COPE52, CR71, UM96 de *Bacillus* spp., y el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp. (L), sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Longitud de raíz, b) Longitud aérea, c) Peso seco de raíz, d) Peso seco aéreo, e) Concentración de clorofila y f) Área foliar.

DISCUSIÓN

La zarzamora (*Rubus* sp.), es un producto de gran importancia para la exportación debido a su alta rentabilidad, rápida recuperación de inversión, versatilidad de uso y alta demanda existente en Norteamérica. En México, ha adquirido gran importancia comercial por la ventaja en la época de cosecha (Esquivel *et al.*, 2016). Sin embargo en los últimos años se ha visto seriamente dañada por diversos microorganismos fitopatógenos entre los que se encuentra *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp. Existen diversas formas de combatir el daño causado por dichos fitopatógenos, sin embargo, el más usado es el uso excesivo de productos químicos que causan daños al ambiente. En los últimos años se han estudiado diversos microorganismos capaces de contrarrestar los daños causados por diversos fitopatógenos y a su vez proveer de beneficios a la planta mediante diversos mecanismos al promover su crecimiento vegetal.

Los endófitos constituyen microorganismos colonizadores de plantas en una relación de simbiosis mutualista. Se encuentran en la mayoría de los ecosistemas que reducen los estresores bióticos y abióticos de los cultivos de las plantas al estimular las respuestas inmunes, excluyendo a los patógenos de las plantas por competencia de nicho, y participando en actividades antioxidantes y metabolismo fenilpropanoide, cuya activación produce defensa vegetal, soporte estructural y moléculas de supervivencia. El género *Bacillus* producen diferentes tipos de compuestos, lo que representa un alto potencial para PGPR y estrategias de manejo de cultivos (Ramos *et al.*, 2019).

En este estudio se utilizaron las cepas E25, COPE52, CR71 y UM96 del género *Bacillus* spp., para inocular plantas de *Rubus* sp., variedad Tupy, Kiowa y selección UM13, y evaluar el efecto de estas sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp. Los resultados obtenidos en esta investigación demostró que las cepas de *Bacillus* spp., ejercen marcados efectos promotorios sobre el crecimiento vegetal de las diferentes variedades y la selección de *Rubus*

sp., y que dichos efectos están en función de la cepa y los hongos fitopatógenos con los que sean inoculadas cada una de las variedades. En la variedad Tupy se presentaron efectos de promoción sobre el área foliar, contenido de clorofila e incremento en número de brotes por parte de la cepa UM96 e incluso cuando las plantas de esta variedad fueran inoculadas con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, con ello, se puede determinar que esta cepa ejerce un efecto de promoción y biocontrol o efectos preventivos sobre dicho patógeno. Es la cepa CR71 la que inhibe el peso seco de la raíz y la longitud aérea, sin embargo al inocular las plantas de la variedad Tupy en esta cepa y el hongo fitopatógeno *Lasioidiplodia* sp, se incrementa el peso seco aéreo. La variedad Kiowa se vio favorecida al ser inoculada con la cepa UM96 al presentar efectos de promoción sobre el peso fresco y aéreo de las plantas, además de ejercer un mecanismo de defensa ante la presencia de ambos hongos fitopatógenos. La selección UM13 no presentó efectos de promoción de crecimiento vegetal al ser inoculada con las cepas bacterianas, el efecto contrario lo presentaron las plantas que se inocularon con la cepa E25 al ejercer efectos inhibitorios sobre el peso seco de raíz. La cepa COPE52 promovió el crecimiento de raíz en presencia del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* y E25 incrementó el contenido de clorofila.

Bacillus subtilis (GLB191) y *B. pumilus* (GLB197), se probaron en campo durante dos años sucesivos mediante ocho tratamientos de rociado, se comprobó que ambas cepas logran recolonizar las hojas de vid y promover el crecimiento vegetal, así como contrarrestar los daños causados por *Plasmopara viticola*, que causa grandes pérdidas en las áreas de producción de vid (Zhang *et al.*, 2017).

En condiciones de invernadero se inocularon plantas de pepino con las cepas CZB5, CZB15, CZB20, CZB26 del género *Bacillus* sp., y con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*., después de seis semanas de inoculación con el patógeno, se concluyó con el experimento. Los resultados mostraron que las cepas *Bacillus* sp., redujeron significativamente la gravedad de los síntomas de marchitez del pepino

en un 51%, 41%, 47% y 58% respectivamente en comparación con el control (Lin *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha evaluado la capacidad de las cepas de *Bacillus* para producir diferentes tipos de compuestos que proveen de grandes beneficios a las plantas al promover su crecimiento vegetal. En 2014, Sang-Mo *et al.*, evaluaron los efectos de *P. putida* H-2-3 sobre plantas de Soja, y determinaron que es la secreción de giberelinas emitidas por estas cepas las que promueven el crecimiento de las plantas.

Figueredo *et al.* (2017), evaluaron la capacidad de *Bacillus* sp. CHEP5 para inducir resistencia sistémica contra *S. rolfsii*., en plantas de maní, reduciendo en ellas la incidencia del marchitamiento del tallo causado por el patógeno *S. rolfsii*. La capacidad de CHEP5 para proteger contra hongos patógenos y mejorar el rendimiento de semillas de maní extra grandes de 2.15% a 16.69%, indica que la coinoculación de rizobacterias beneficiosas podría ser una estrategia útil para incrementar la producción y un sistema de agricultura sustentable.

Wan *et al.* (2017), evaluaron el efecto de la cepa SN16-1 de *Bacillus amiloliquefaciens* sobre el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. sp. *lycopersici* (FOL) en la composición de la comunidad microbiana de la rizosfera del tomate. Los resultados demuestran que SN16-1 aumenta la abundancia de bacterias beneficiosas de los géneros de *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Massilia*, mientras que *Chthniobacter* y *Haloferula* se incrementaron con FOL.

CONCLUSIONES

Las bacterias endófitas del género *Bacillus* spp, promueven e inhiben el crecimiento de las plantas de *Rubus* sp, dependiendo de la variedad inoculada y del hongo fitopatógeno con el cual ejerzan algún tipo de interacción.

La variedad Tupy se ve beneficiada al ser inoculada con la cepa UM96, y aún con la inoculación del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* incrementa el contenido de clorofila, área foliar, peso seco aéreo y la longitud de raíz; en contraste, la cepa CR71 presenta efectos inhibitorios sobre las plantas inoculadas con el mismo hongo fitopatógeno. En la variedad Tupy no se presentaron efectos promotorios de crecimiento vegetal al ser inoculada con la cepa COPE52, es la cepa CR71 la que presenta efectos inhibitorios sobre el peso seco de raíz.

La variedad Kiowa se vio favorecida por la cepa CR71 al ejercer un efecto de promoción incluso ante la presencia del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* sobre el peso seco de raíz y aéreo.

La cepa E25 ejerce efectos inhibitorios sobre el peso seco de raíz de la selección UM13, sin embargo, promueve la aparición de nuevos brotes e incrementa el contenido de clorofila.

LITERATURA CITADA

- Castellanos** P, J. L., Oliva, J. A., Fresna S & Fraga S. (2002). "Posibilidades del uso de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, control biológico de hongos". Congreso Científico del INCA (nov 12-15, La Habana).
- Cattelan** A, J., Hartel P. G & Fuhrmann J, J. (1999). Screening for plant growth rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*. 63:1670-80
- Contreras** P. M., Santoyo P. G., De los Santo V. S., Gutiérrez G. M.A., Orozco M. M. C y Rocha G. M. C. (2019). First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in Michoacán state, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(3).
- Esquivel** P, G., Gudiño C, E., Rojas M, J. P y Ramírez M, C. A. (2016). Evaluación de fertilizantes foliares orgánicos e inorgánicos en Zarzamora (*Rubus* sp.) cv. "Tupy". *Ciencia Nicolaita*. 67: 25-30.
- Fernández** R. Novo. (1988). "Vida Microbiana del Suelo". 2da parte, Editorial Pueblo y Educación, La Habana, pp. 234-235.
- Figueredo** M. S., Tonelli M. L., Ibañez F., Morla F., Cerioni G., Tordable M. C., Fabra A. (2017). Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plant challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. *Microbiological Research*. 197, 65-73
- Glick** B. R., Patten C, L., Holguin G. & Penrose D. M. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College press*. London. 270 p.
- Gordon** T. C., Kikpatrick S., Henry P., Kong M & Broome J. (2016). First report of a wilt disease of blackberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease*, 100.
- Gholami** A., Shahsavani S & Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of

- maize. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 3: 19-24.
- Lin Y.**, Du D., Si C., Zhao Q., Li Z & Li P. (2014). Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. *Biological Control*, 71:7-15
- Muhammad N. A. A.** (2003). "In vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost inhabiting microbes", *African Journal of Biotechnology*, 2:161-164.
- Ramos M. J.**, Gómez F, R., Orozco F, A. A., Rodríguez P, C., González O, G & Tamez G, P. (2019). Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 10:463
- Sang-Mo**, K., Radhakrishnan R., Khan A. L., Min-Ji, K., Man J, P., Ra B, K., Hyun D, S., Jung, L. (2014). Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas Putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 84, 115-124.
- SIAP.** (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.infosiap.siap.gob.mx>. Último acceso: 3 de mayo del 2019
- Wan T.**, Zhao, H., & Wang, W. (2017). Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1 and plant pathogen *Fusarium oxysporum* on tomato rhizosphere bacterial community composition. *Biological Control*, 112, 1–9.
- Zhang X.**, Zhou Y., Li Y., Fu X & Wang Q. (2017). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection*, 96, 173-179.

V. DISCUSIÓN GENERAL

El género *Bacillus* se caracterizan por ser bacilos aerobios formadores de esporas y con estilos de vida versátiles al encontrarse en distintos ambientes. En los últimos años se ha implementado su uso como alternativa para reducir el uso de productos químicos, además de que promueven el crecimiento vegetal de las plantas y mejora su sanidad. Son capaces de colonizar sitios preferenciales tales como la rizosfera, endosfera y fotósfera formando parte del microbiota vegetal (Sivasakthi *et al.*, 2014; Rossmann *et al.*, 2017; Bhunia, 2018).

En este estudio se evaluaron las cepas E25, COPE52, CR71 y UM96 de *Bacillus* spp., y su efecto sobre dos variedades y una selección de *Rubus* sp., además de su efecto antagónico ante la presencia de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., ejerciendo dos tipos de emisión de compuestos (compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles). La cepa E25 presentó los mayores porcentajes de inhibición para ambos tipos de emisión sobre los dos hongos fitopatógenos. La cepa UM96 no presentó efectos inhibitorios sobre el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp., mediante ambos tipos de emisión y mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles no inhibe el crecimiento radial del fitopatógeno *F. oxysporum*. El efecto de las cepas endófitas del género *Bacillus* spp, sobre la promoción del crecimiento vegetal de las plántulas de *Rubus* sp., dependió del tipo de emisión que estas emitan y del tipo de la variedad o selección de *Rubus* sp., que sea inoculada, algunas de ellas sobre algunas variedades presentaron efectos inhibitorios como es el caso de la cepa UM96 que inhibió el crecimiento vegetal de las plántulas en condiciones *in vitro*. En general la longitud aérea y de raíz, peso seco fresco aéreo y de raíz, así como la concentración de clorofila incrementaron en altos porcentajes su promoción, pero mediante la emisión de diferentes cepas para el caso de cada variedad.

La variedad Tupy promovió su crecimiento vegetal ante la presencia de las bacterias E25, COPE52 y CR71 cultivadas *in vitro* y en efecto contrario UM96 inhibe

la promoción del crecimiento de esta variedad, en el caso del establecimiento de las plantas en invernadero las cepas del género *Bacillus* spp., exhiben diferentes tipos de promoción dependiendo del hongo fitopatógeno, la promoción del crecimiento de aéreo y de raíz, el peso seco y fresco, así como la concentración de clorofila y área foliar fueron incrementados de diferente manera por las diferentes cepas incluso dentro de la misma variedad. La cepa CR71 no presento efectos de promoción en la variedad.

Es la cepa E25 la que presenta mayores efectos de promoción sobre las plántulas de la variedad Kiowa cultivadas *in vitro* mediante ambos tipos de emisión volátiles y difusibles. Las plantas de la variedad Kiowa también se vieron favorecidas por esta cepa y por la cepa CR71, incluso al estar en presencia de los hongos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., incrementando el peso seco de raíz y aéreo, la longitud aérea y radicular.

Las cepas E25, COPE y CR71 presentan efectos de promoción sobre la selección UM13 cultivada *in vitro*, mediante ambos tipos de emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles, sin embargo la cepa E25 al estar en contacto con las plantas en condiciones de invernadero disminuye el peso seco de raíz de esta variedad y en contraste aumenta el porcentaje de concentración de clorofila sobre esta variedad y Ninguna de las cepas presenta efectos de promoción sobre el peso seco aéreo.

Los endófitos del género *Bacillus* producen compuestos aromáticos, lipopéptidos, hormonas vegetales, polisacáridos y varias enzimas relacionadas con el metabolismo del fenilpropanoide, lo que representa un alto potencial para PGPR y estrategias de manejo de cultivos (Ramos *et al.*, 2019). Son diversos los mecanismos que emplean las bacterias para ejercer promoción del crecimiento vegetal y para producir diferentes sustancias que contrarresten el ataque de microorganismos fitopatógenos, así como ayudar a las plantas a tolerar condiciones de estrés. Las especies *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. aryabhattai* pertenecientes al género *Bacillus*, se han reportado como productoras

de ACC desaminasa (Xu *et al.*, 2014; Chinnaswamy *et al.*, 2018; Nayak *et al.*, 2018), citocininas, giberelinas y ácido indolacético (Liu *et al.*, 2013; Salomon *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017). Se han reportado como antagonistas de patógenos como *Fusarium* en tomate, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en plantas de pepino (Lin *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2017) e incluso incrementar la abundancia de bacterias beneficiosas de los géneros de *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Massilia*, mientras que *Chthniobacter* y *Haloferula* se incrementaron con FOL (Wan *et al.*, 2017).

Diferentes especies de *Bacillus* se han reportado como promotores de crecimiento vegetal entre los que se encuentra *B. amyloliquefaciens* FZB42, que promovió el crecimiento de plantas, induce tolerancia a la sal sistémica en *Arabidopsis* y mejora el peso fresco y seco de ésta especie. (Liu *et al.*, 2017). La cepa *B. subtilis* BERA 71 fue probada sobre plantas de garbanzos expuestas a condiciones salinas, incrementó la absorción de minerales en condiciones de estrés y con NaCl y aumentó significativamente la síntesis de pigmentos fotosintéticos, incluidos clorofila a, clorofila b y carotenoides (Elsayed *et al.*, 2017).

B. licheniformis Rt4M10, se ha reportado como bacteria colonizadora de raíces de *Vitis vinífera* la cual fue capaz de mitigar el estrés y estimuló la producción de ABA en plantas, AIA y algunas giberelinas (Salomon *et al.*, 2014)

En plantas de soja inoculadas con *B. aryabhattai* SRB02, ésta cepa incremento los niveles de ABA, de AIA, citoquininas y giberelinas, incrementó el crecimiento de las plantas y éstas presentaron tolerancia a estrés bajo condiciones de altas temperaturas (Park *et al.*, 2017).

B. subtilis se ha reportado como una de las especies productoras de sideróforos y es la cepa CAS15, a la cual se le atribuye la inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (Yu *et al.*, 2011).

VI. CONCLUSIONES GENERALES

Las cepas Bacterianas del género *Bacillus* spp., presentan diferentes efectos de promoción vegetal sobre las diferentes variedades de *Rubus* sp., y diferente tipo de inhibición sobre los fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp.

La cepas del género *Bacillus* spp., presentan el diferentes tipos de inhibición dependiendo del hongo fitopatógeno, la cepa endófito y el tipo de emisión que esta emita. E25, CR71 y UM96, presentan efectos inhibitorios sobre el fitopatógeno *F. oxysporum* y E25, COPE52 y CR71 sobre el fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp., en el biocontrol *in vitro*.

La cepa UM96 presenta efectos inhibitorios sobre el crecimiento vegetal de las plantas de la variedad Tupy cultivadas *in vitro* mediante la emisión de compuestos difusibles. Son las cepas E25, COPE52 y CR71 las que ejercen un efecto promotor sobre la misma variedad mediante la emisión de compuestos difusibles. Es la cepa E25 la que presenta mayores efectos de promoción sobre las plántulas de la variedad Kiowa cultivadas *in vitro* mediante ambos tipos de emisión volátiles y difusibles. Las cepas E25, COPE52 y CR71 presentan efectos de promoción sobre la selección UM13 cultivada *in vitro*, mediante ambos tipos de emisión de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles.

Las cepas del género *Bacillus* spp., presentan diferentes tipos de efectos sobre las plantas inoculadas en invernadero, el efecto ejercido dependerá de la cepa y el hongo fitopatógeno con el que se inoculara cada una de las variedades y la selección.

El uso de las cepas de *Bacillus* spp., resulta ser eficiente como biocontrol, promoción y prevención en plantas de *Rubus* sp., sobre la presencia de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *Lasiodiplodia* sp., únicamente es importante

determinar el tipo de cepa que se utilizará para cada variedad o la selección y el tipo de promoción deseado.

VII. LITERATURA GENERAL

- Abdollahzadeh** J., Javadi A., Mohammadi G, E., Zare R & Phillips A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.
- Agrios** N. G. 1999. Fitopatología. 2ª. Edición. Ed. Limusa. México. 879 p.
- Albareda** M., Dardanelli M, S., Sousa C., Megías M., Temprano F., Rodríguez N, D. (2006). Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 67-73.
- Alves** A., Crous P. W., Correia A & Phillips A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13.
- Ali** S. T. C., Charles & Glick, B. R. (2017). Endophytic phytohormones and their role in plant growth promotion. In *Functional Importance of the Plant Microbiome*. pp. 89-105.
- Ali** S, T., Charles C, and Glick, B.R. (2012). Delay of Carnation flower senescence by bacterial endophytes expressing ACC deaminase. *Journal Applied Micobiology*. 113:1139-1144.
- Arteaga** L, E. El cultivo de la zarzamora *Rubus* sp. Memoria del taller teórico – práctico. Bacon C, and White J. (2000). *Microbial Endophytes*. New York.
- Bacon** C, and White J. 2000. *Microbial Endophytes*. New York.
- Bhunia** A, K. (2018). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In *Foodborne Microbial Pathogens*. pp. 193-207.
- Bhutani** N., Maheshwari, R., Negi, M & Suneja, P. (2018). Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters, *Israel Journal of Plant Sciences*, 65, 83-96
- Booth** C. 1970. *Fusarium oxysporum* CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria. No. 211. *Commonwealth Agricultural Bureaux*. London.

- Broekgaarden** C., Carls, L., Vos, I. A., Pieterse, C. M & Van Wees, S. C. (2015). Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiology*, 169, 2371-2379.
- Camelo** R, M., Vera M, S. P., Bonilla B, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12:159-166.
- Cano** M, R y Rodríguez J. A. (1989). Caracterización del fruto de cinco cultivares de zarzamora erecta (*Rubus* spp.). Memorias. SOMEFI III. Congreso Nacional. 32p.
- Castellanos** P, J. L., Oliva J. A., Fresna S; Fraga S. (2002). "Posibilidades del uso de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, control biológico de hongos". Congreso Científico del INCA (nov 12-15, La Habana).
- Cattelan** A. J., Hartel P, G & Fuhrmann, J. J. (1999). Screening for plant growth rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J*. 63:1670-80.
- Chen** L., Xin X., Zhang H & Yuon Q. (2013). Phytochemical proprieties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. *J Funct Foods*. 5:508-515.
- Chinnaswamy** A., Coba de la Peña, T., Stoll, A., De la Peña Rojo, D., Bravo J., Rincón, A & Pueyo, J. J. (2018). A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. *Annals of Applied Biology*, 172, 295-308.
- Clark** J. R. (1992). Blackberry production and cultivars in North America east of the Rocky Mountains. *Fruit Var. J*. 46: 217-222.
- Clark** C. E. F. (2011). "Emergence of Blackberry as a World Crop." *Chronica Horticulturae* 51: 13-18.
- Contreras** P. M., Santoyo P. G., De los Santo V. S., Gutiérrez G. M. A., Orozco M. M. C y Rocha G. M. C. (2019). First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in Michoacán state, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(3).

- Compant S.**, Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*. 42: 669-678.
- Corzo J.** 1995. Guía de producción manejo post-cosecha mercadeo, gremial de exportadores de productos no tradicionales, Guatemala. 38 p.
- Couillerot O.**, C. Prigent C, J. Caballero M & Menne L, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:505-512.
- Davidse G, M.**, Sousa S., Knapp S & Chiang C. F. (2014). Flora. Mesoamericana. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 608p
- De la Tejera, B y Ochoa F.** 2004. La zarzamora ante los retos productivos del mercado y del desarrollo local. Libro técnico. Universidad Autónoma de Chapingo, Campus Morelia. México. 175p.
- Del Toro, V y Carles F.** (2008). El cultivo de los Berries. Disponible en: <http://bdb.cma.gva.es/ficha.asp?id=12748>
- Dos Santos, M. E.** (2005). Hidroponía y promoción del crecimiento de las plántulas de tomate inoculadas con bacterias PGPT. UNQ Editorial SERIE DIGITAL Ciencia Y Tecnología 1:65-75.
- Elmer W. H.** (2006). Effects of acibenzolar-S-methyl on the suppression of *Fusarium* wilt of cyclamen. *Crop Protection*, 25(7), 671-676.
- Elsayed F, A. A.**, Abdulaziz A., Alqarawi A. H., Ramalingam R., Asma. A., Al-Huqail, Fatma O. N., Jahangir A. M., Raedah I. A & Dilduza E. (2017). Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms, *Journal of Plant Interactions*, 13:1, 33-44.
- Esquivel P, G;** Gudiño C, E; Rojas M, J. P y Ramírez M, C. A. (2016). Evaluación de fertilizantes foliares orgánicos e inorgánicos en Zarzamora (*Rubus sp.*) cv. "Tupy". Ciencia Nicolaita. 67: 25-30.
- FAO.** (2015). Food and Agriculture Organization. Disponible en: <http://www.fao.org> (Último acceso: 7 de junio 2018).

- Fernández R. N.** (1988). "Vida Microbiana del Suelo". 2da parte, Editorial Pueblo y Educación, La Habana, pp. 234-235.
- Glick B. R.** (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 1-8.
- Gordon T. C., Kikpatrick, S., Henry P., Kong, M & Broome J.** (2016). First report of a wilt disease of blackberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease*, 100.
- Hallman J., Quadt H. A., Mahaffee W. F., and Kloepper J. W.** (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- Hedrick U. P.** 1925. The small fruits of New York, J. B. Lyon, Albany, N. Y. 578p.
- Heinonen M.** (2007). Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics a Finnish perspective. *Molecular Nutrition and Food Research* 51:684-691.
- Hua Wei Z., Youg Chs & Ren X.** (2006). *Biology and chemistry of endophytes*. Nat Prod Rep.23:753-771.
- Jain S., Vaishnav A., Kumari S., Varma A., Tuteja N., & Choudhary D. K.** (2017). Chitinolytic *Bacillus*-mediated induction of jasmonic acid and defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plant against *R. solani* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 200-214
- Jha C. K., Patel B & Saraf M.** (2012). Stimulation of growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 891-99.
- Jennings D. L., Daybeny, H.A & Moore, J. N.** (1990). "Blackberries and raspberries." *Acta Hortic.* 290: 330-389.
- Koike S. T., and Gordon T. R.** (2015). Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop Protection*, 73, 67-72.
- Konić R, A., Šavikin K., Zdunić G., Janković T., Juranic Z., Menković N & Stanković I.** (2011). Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chemistry* 125:1412-1417.
- Lee B., Farag M. A., Park H. B., Kloepper J. W., Lee S. H & Ryu C. M.** (2012) Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant

- systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymaxa*, *PLOS One*. 7:e48744.
- Lee J., M. & Finn, C. E.** (2012). *Rubus* fruit phenolic research: the good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry* 130:785-796.
- López M, J.** (2006). Variedades de especie de frutos pequeños apropiadas para el clima subtropical. La experiencia de México. III Simposio Nacional de Morongo.
- Lin Y., Du D., Si C., Zhao Q., Li Z., Li P.** (2014). Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. *Biological Control*, 71:7-15
- Liu F., Xing, S., Ma, H., Du, Z & Ma, B.** (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9155-9164.
- Liu P., Yang & Kallio H.** (2010). Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major*) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* 121:1188-1197.
- Liu S., Hao H., Lu X., Zhao X., Wang Y., Zhang Y., Xie Z & Wang R.** (2017). Transcriptome profiling of genes involved in induced systemic salt tolerance conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in *Arabidopsis thaliana*. *Nature. Scientific Reports*. 7: 10795.
- Macculley M.** (2002). Niches for bacterium endophytes in crop plants: A plant Biologists view. *Aust J Plant Physiol*.28:983-990.
- Márquez S, H.A., Hernández L, R..., Orozco M, M. C., Velazquez S. I & Santoyo, G.** (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Chrysalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genet. Mol. Res.* 9:2372-2380.

- Matilla** M. A., & Krell, T. (2018). Plant Growth Promotion and Biocontrol Mediated by Plant-Associated Bacteria. In *Plant Microbiome: Stress Response*. pp. 45-80.
- Medda** R., Lyros O., Schmidt J. L., Jovanovic N., Nie L., Link B. J., Otterson M. F., Stoner G. D., Shaker R. and Rafiee P. (2015). Ant-inflammatory and anti angiogenic effect of black raspberry extract on human esophageal and intestinal microvascular endothelial cells. *Microvascular Research*, 97:167-180.
- Meena** K. K., Sorty A. M., Bitla U. M., Choudhary K., Gupta P., Pareek A. & Singh, H. B. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-16.
- Meza** M, A. C., Romo F, M. G., Duarte O, V. R y Navarro A, R. (2013). La zarzamora (*rubus* sp.), cultivo alternativo para el estado de Sonora, Revista Mexicana de Agronegocios. 33: 600-607.
- Molina** R, D., Bustillos C, M. R., Rodríguez A, O., Morales G. Y. E., Santiago S. Y., Castañeda L. M y Muñoz R. J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico, Biológicas. Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 17(2): 24-34
- Moore** J.N. (1997). Blackberries and raspberries in the southern United States: Yesterday, today and tomorrow. *Fruit Var. J.* 51: 148-157.
- Moore** J. N., Brown E & Sistrunk W. (1974). "Comanche" Blackberry. *Hortscience*. 8(3): 245-246.
- Moore** J. N., Brown, E & Sistrunk, W. (1977). "Cheyenne" Blackberry. *Hortscience*. 12(1): 77-78.
- Moore** J. N. & Skirvin R. M. 1990. Blackberry management. p. 214-244.
- Muhammad** N. A. A. (2003). "In vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost inhabiting microbes", *African Journal of Biotechnology*, 2:161-164.
- Muratalla** L. A., Muñoz, M. L y Reyes, M. A. G. (1999). Establecimiento y manejo del cultivo (*Rubus* spp). En curso de capacitación para productores de

- zarzamora y frambuesa de la Delegacion Cuajimalpa de Morelos, D.F. Mexico. Pp. 19-39.
- Nayak** A. K., Panda S. S., Basu A & Dhal, N. K. (2018). Enhancement of toxic Cr (VI), Fe, and other heavy metals phytoremediation by the synergistic combination of native *Bacillus cereus* strain and *Vetiveria zizanioides* L. *International Journal of Phytoremediation*, 20, 682-691.
- Nelson** P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* Species An Illustrated Manual for Identification. *The Pennsylvania State University Press*. USA. 193 p.
- Olanrewaju** O. S., Glick B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-15.
- Oliveira** A. L. M., Stoffels M., Schmid M., Reis V. M., Baldani J. I., Hartmann A. (2009). Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology*, 45: 106-113.
- Onofre** L. J., Hernández L. I., Girard, L. & Caballero M, J. (2009). ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6581–6590.
- Orberá** R, I., Pérez P, D., Ferrer S, N., Cortés R, Z., González G., Rives N., Acebo Y y Hernández A. (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en cuba, Cultivos Tropicales*, 28: 29-38.
- Pacheco** S., P. (1975). Cultivo de la frambuesa y zarzamora. Comisiòn nacional de fruticultura. Folleto No. 17.
- Park** Y. S., Dutta S., Ann M., Raaijmakers J. M., Park K. (2015). Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461:361-365.
- Park** Y. G., Mun B. G., Kang S. M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C. W & Lee, I. J. (2017). *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress

and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLOS One*, 12, 1-28.

Phillips A, J. L, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield M. J., Groenewald J. Z & Crous P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167.

Pillay V & Norwark J. (1997). Inoculum, density, temperature, and genotype effect on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), seedling inoculated with a *Pseudomonas* bacterium. *Can J Microbiol.* 43:354-361.

Pitt J & Hocking A. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3 ed. Springer. pp 125-127.

Ramos M. J., Gomez F. R., Orozco F. A. A., Rodriguez P. C., Gonzalez, O. G & Tamez G, P. (2019). Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 10:463

Rebollar Alvirer A. (2014). Manejo del Mildiu y Moho Gris de la zarzamora. 36p.

Rojas S, D., Hernández P & Santoyo, G. (2016). Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Phytalis ixocarpa* Brot. Ex Horm.). Revista Chapingo Serie Horticultura.Vol. XXII. 1:45-57.

Rojas S, D., Zetter S, E., Contreras P, M., Rocha G, M. C., Rodríguez M. L., & Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 13, 46-52.

Rosenblueth M & Martinez R, E. (2006). Bacterial endophytes and their interaction with host. *MPMI*.19:827-837.

Rossmann, M., Sarango F, S. W., Chiaramonte, J. B., Kmit, M. C. P., & Mendes, R. (2017). *Plant Microbiome: Composition and Functions in Plant Compartments*. In *The Brazilian Microbiome* (pp. 7-20).

Ryu, C. M., Farag, M. A., & Hu, C. H. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017– 1026.

- Saharasbudhe** Madhuri M. (2011). Screening for indole acetic acid production. *Ann. Biol Res.* 2:460-468.
- Saikia**, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K., & Saikia, R. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, 8, 1-13.
- Salomon** M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in *in vitro* cultured grapevine. *Physiologia Plantarum*, 151, 359-374.
- Sánchez** G, P. (2009). Nutrición de zarzamora. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.
- Schmidt** R., Cordovez V., De Boer. W., Raaijmakers, J., & Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME journal*, 9, 2329-2335.
- SEDRUA**. (2018). Secretaria de Desarrollo Rural y Agroalimentario. <https://www.sedura.michoacan.gob.mx/michoacan-productor-mundial-berries>. Último acceso 2 de agosto del 2018
- SIAP**. (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.infosiap.siap.gob.mx>. Último acceso: 3 de mayo del 2019
- SIAP-SAGARPA**. (2015). Panorama de la Zarzamora. R. Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Forestal y Pesquero. Mexico, DF.
- Sivasakthi** S., Usharani G., & Saranraj P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *African Journal of Agricultural Research*, 9, 1265-1277.
- Slippers** B., Crous P. W., Denman S., Coutinho T. A., Wingfield B. D & Wingfield M. J. (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83-101
- Tahir** H, A. S., Gu Q., Wu H., Niu Y., Huo R & Gao, X. (2017). *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum*

- and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Scientific Reports*, 7, 1-12.
- Tsavkelova E.**, Cherdyntseva T., Botina S., Netrusov A. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res.*162:69-76.
- Vidhyasri M. S.**, Gomathi V., & Siva K. U. (2019). Determination of potential plant growth promoting compounds from *Ochrobactrum* sp. (MH685438) by thermal desorption-gas chromatography. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(3): 3059-3063.
- Wan T.**, Zhao H., & Wang W. (2017). Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1 and plant pathogen *Fusarium oxysporum* on tomato rhizosphere bacterial community composition. *Biological Control*, 112, 1–9.
- Xin B.**, Zheng J., Liu H., Li J., Ruan L., Peng D., & Sun M. (2016). Thusin, a novel two-component lantibiotic with potent antimicrobial activity against several gram-positive pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-10.
- Xu Y. B.**, Chen, M., Zhang, Y., Wang, M., Wang, Y., Huang, Q. B., & Wang, G. (2014). The phosphotransferase system gene ptsI in the endophytic bacterium *Bacillus cereus* is required for biofilm formation, colonization, and biocontrol against wheat sharp eyespot. *FEMS Microbiology Letters*, 354(2), 142-152.
- Yu X.**, Ai C., Xin L., & Zhou G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47, 138-145.

VII. APÉNDICE

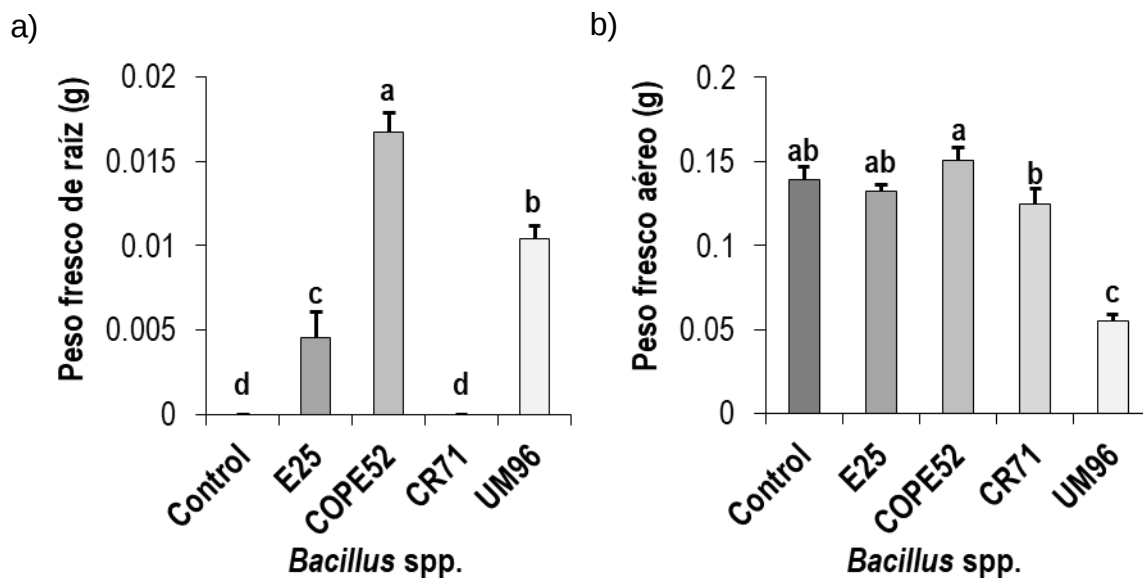


Figura 1A. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por cepas de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. var. Tupy. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo.

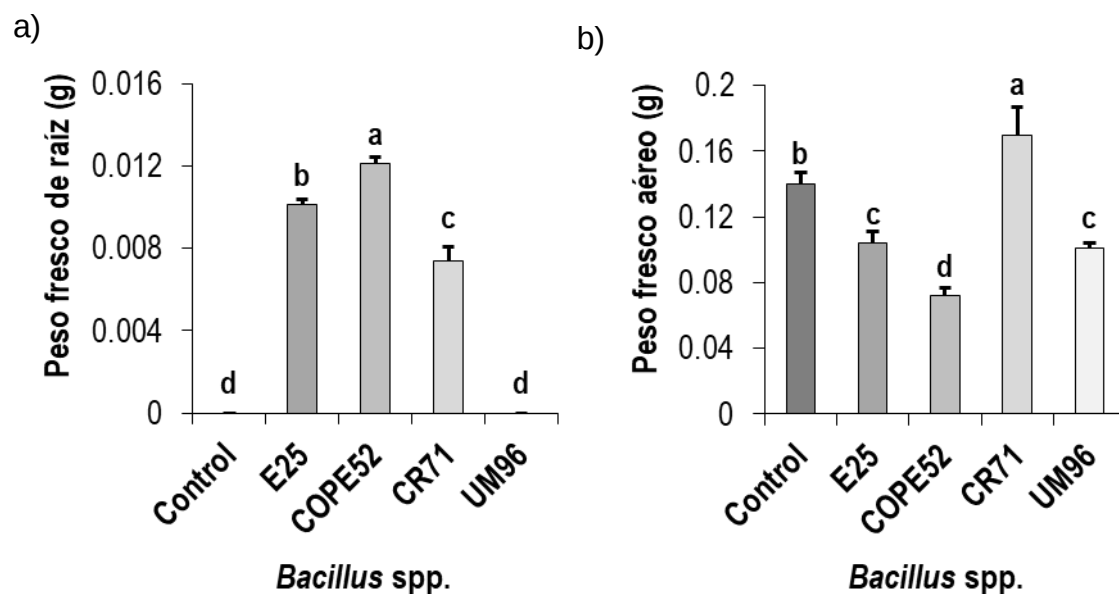


Figura 2A. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por cepas de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. var. Kiowa. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo.

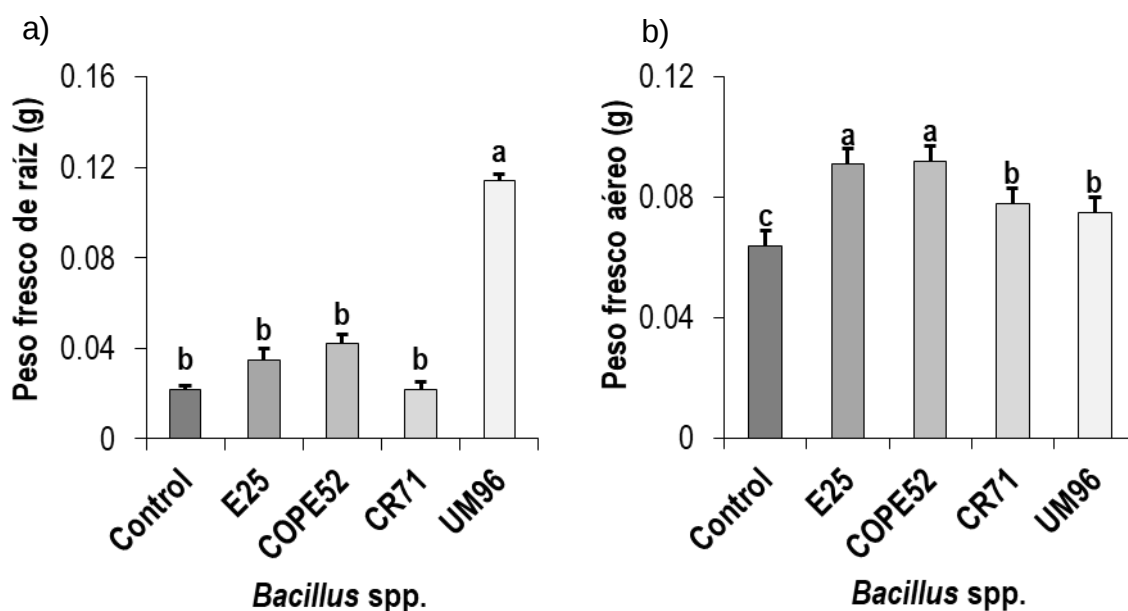


Figura 3A. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. var. Kiowa. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo.

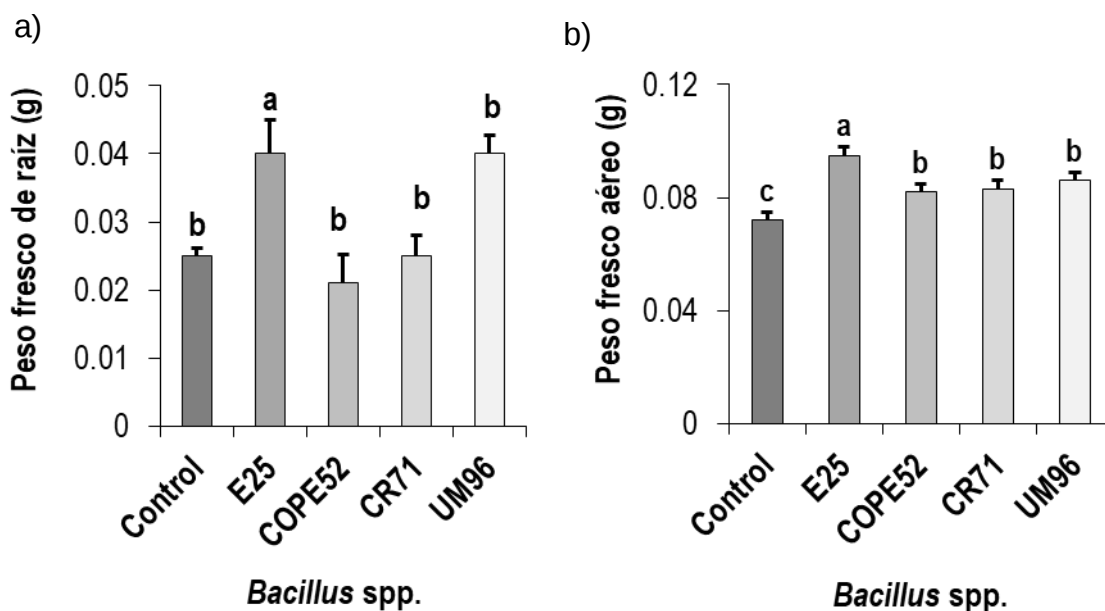


Figura 4A. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por cepas de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. var. Kiowa. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo.

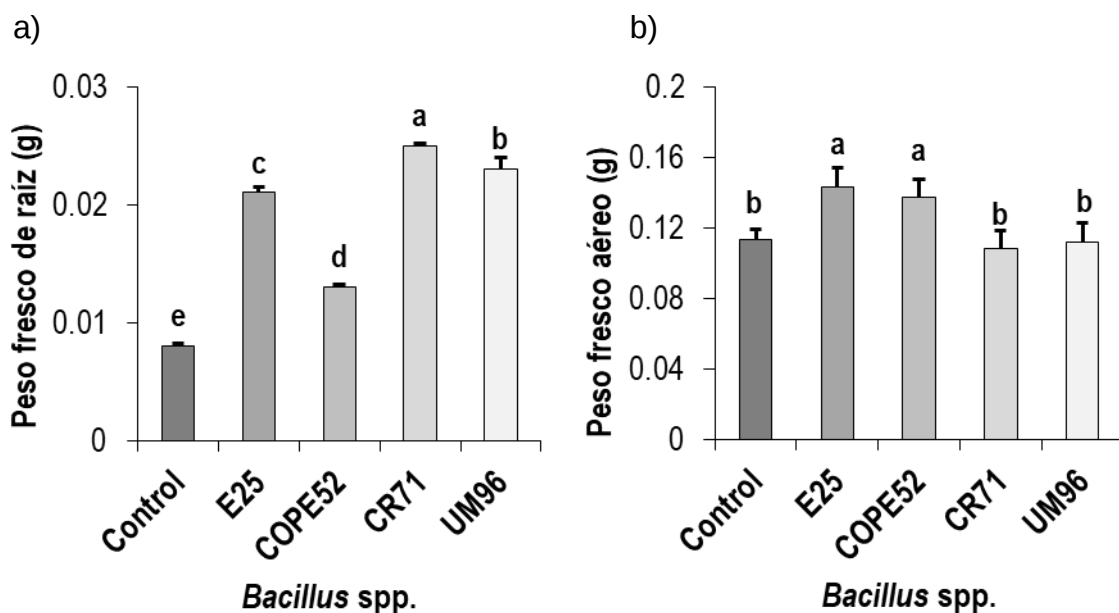


Figura 5A. Efecto de la emisión de compuestos difusibles por cepas de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. selección UM13. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo.

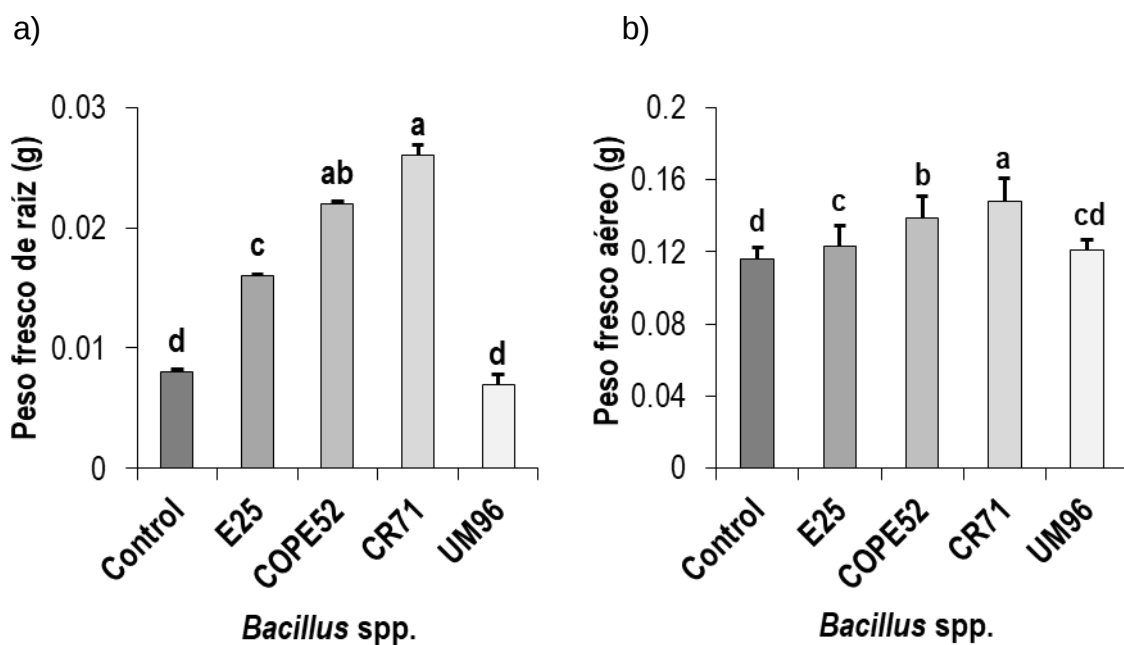


Figura 6A. Efecto de la emisión de compuestos orgánicos volátiles por cepas de *Bacillus* spp., sobre plántulas *in vitro* de *Rubus* sp. selección UM13. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo.

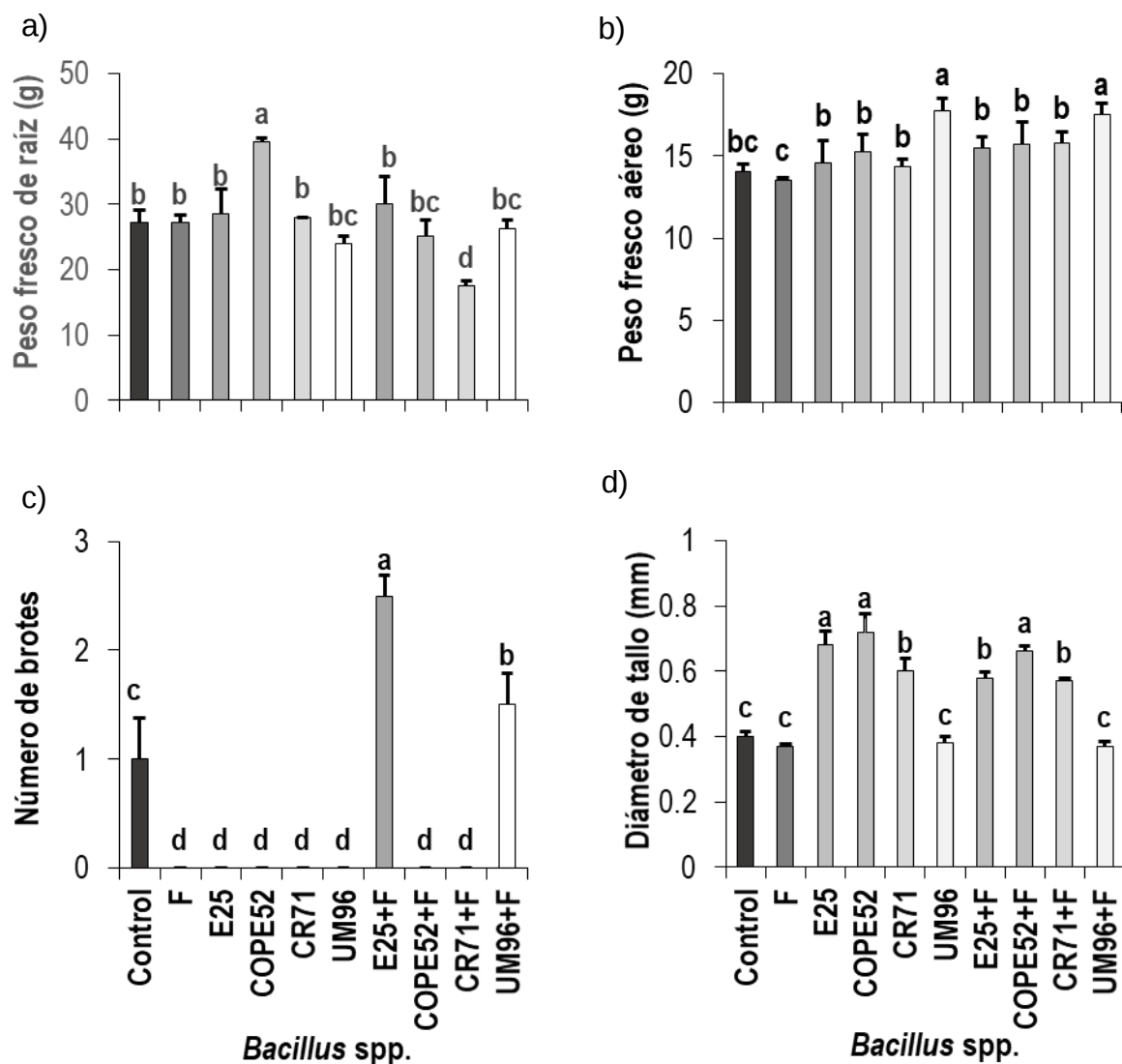


Figura 7A. Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *F. oxysporum*, sobre plantas de *Rubus* sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo, c) Número de brotes, d) Diámetro del tallo.

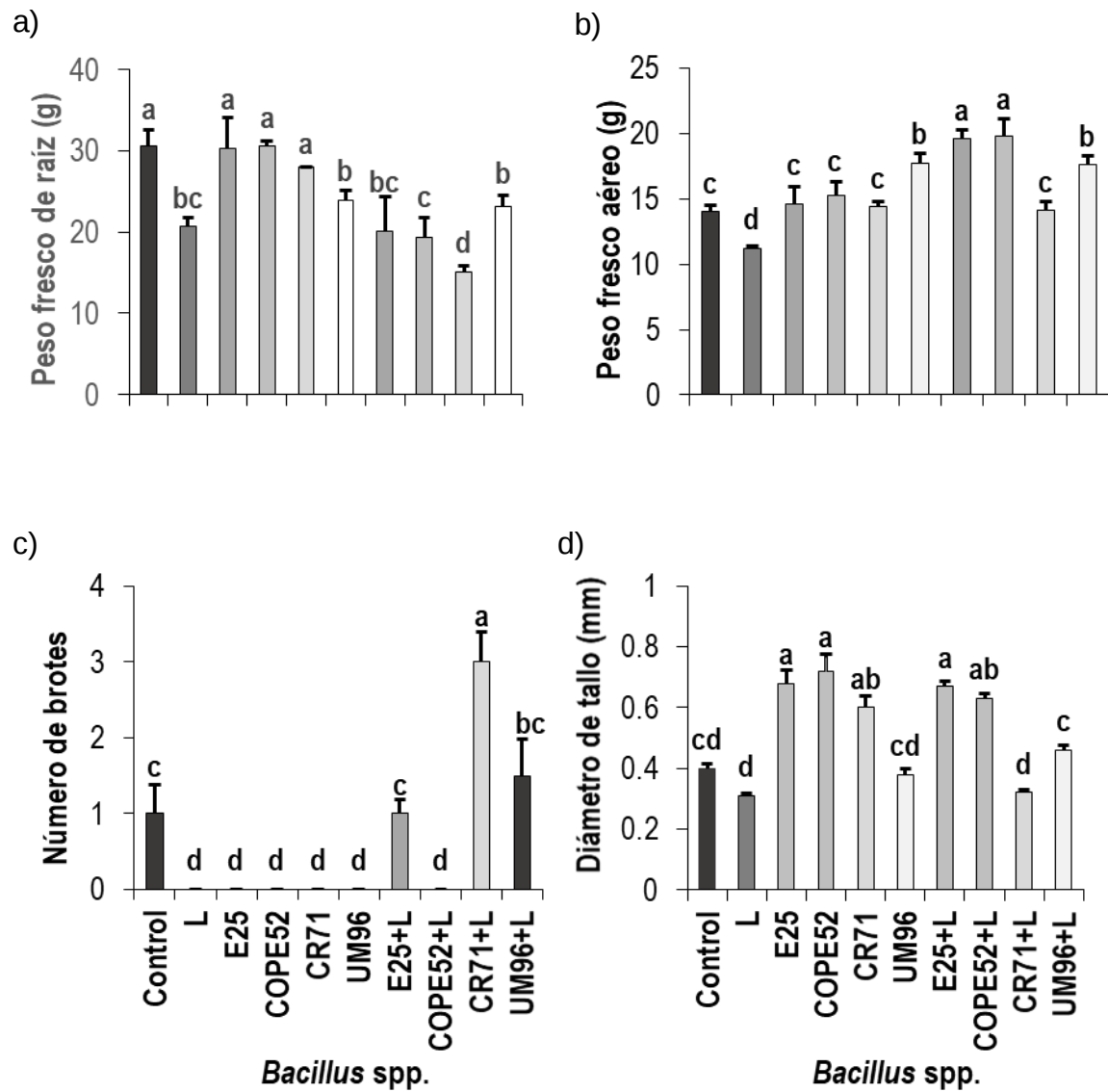


Figura 8A. Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *Lasiodiplodia* sp., sobre plantas de *Rubus* sp., var. Tupy crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo, c) Número de brotes, d) Diámetro del tallo.

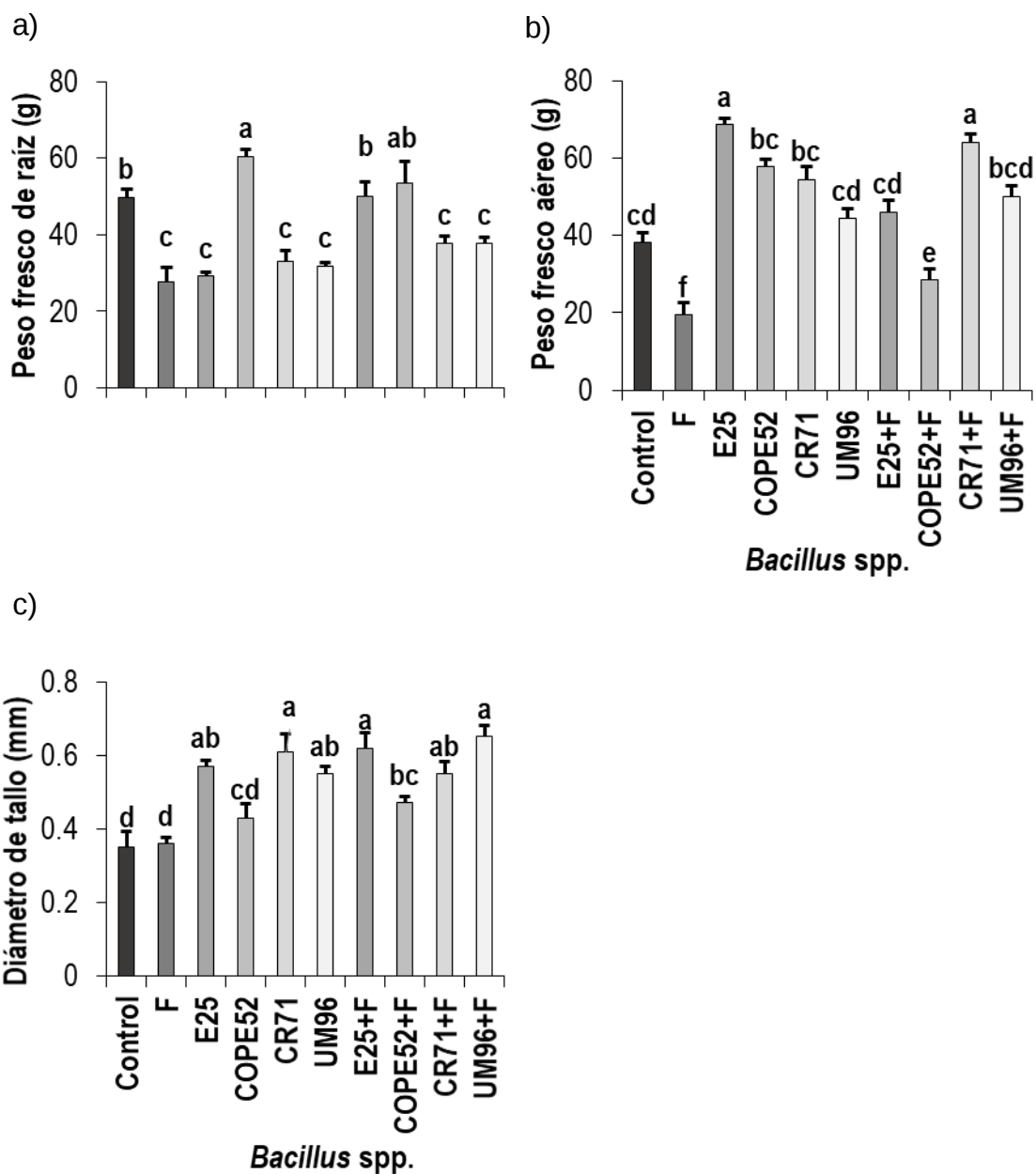


Figura 9A. Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y o *F.oxysporum*, sobre plantas de *Rubus* sp. var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo, c) Diámetro del tallo.

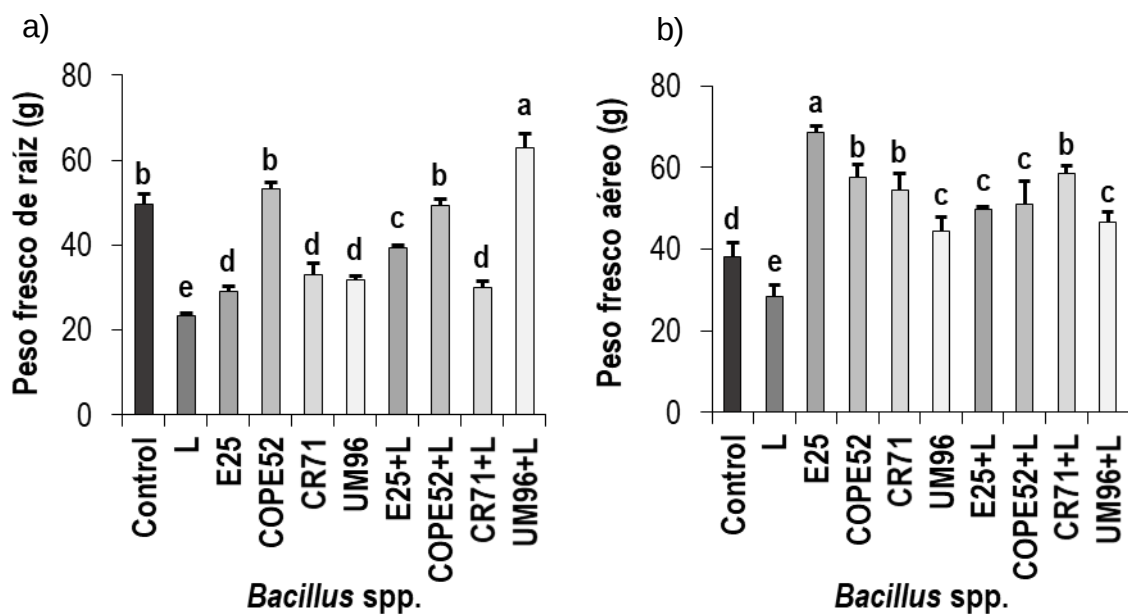


Figura 10A. Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *Lasiodiplodia* sp., sobre plantas de *Rubus* sp., var. Kiowa crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo.

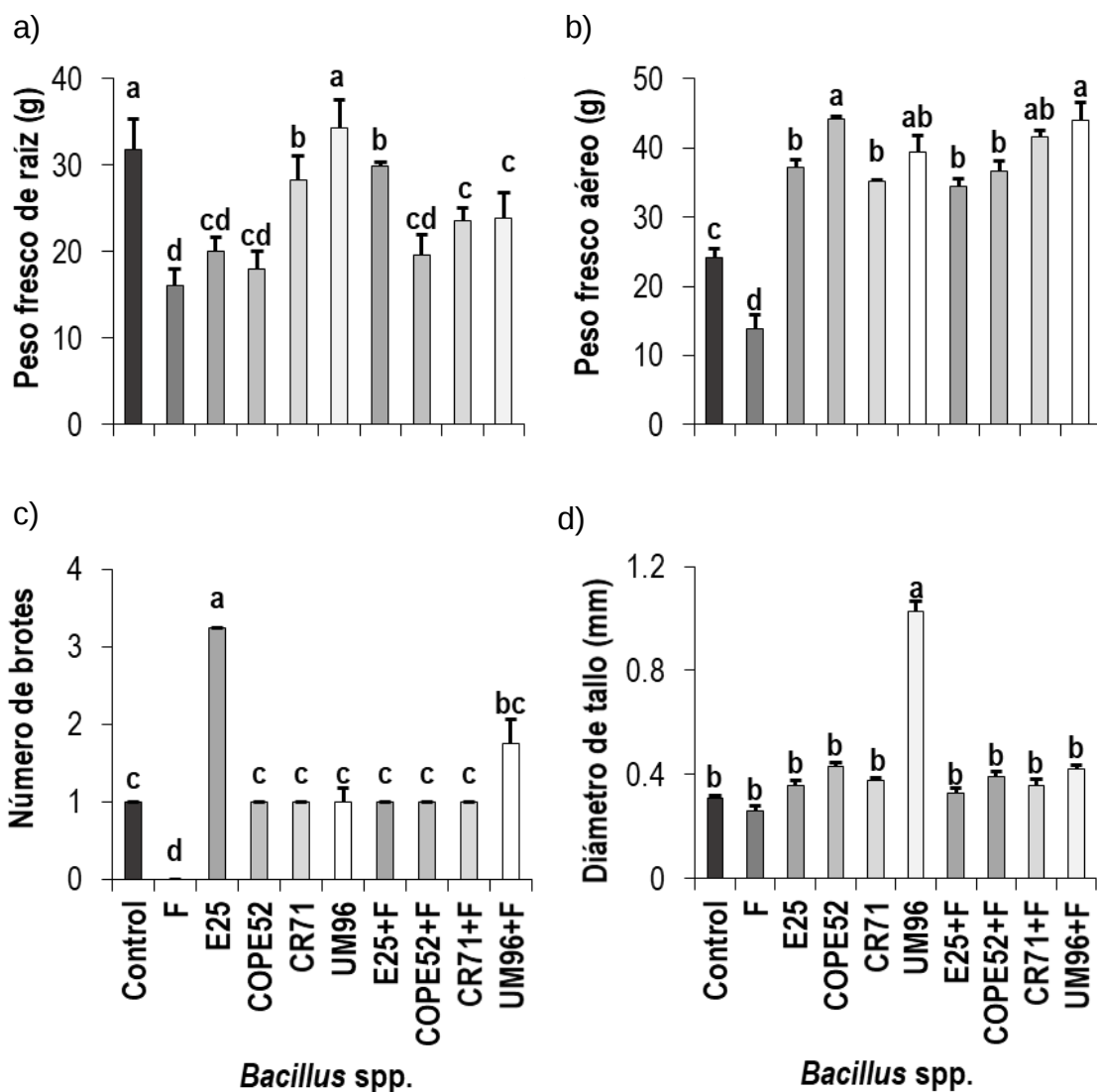


Figura 11A. Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *F.oxysporum*, sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo, c) Número de brotes y d) Diámetro del tallo.

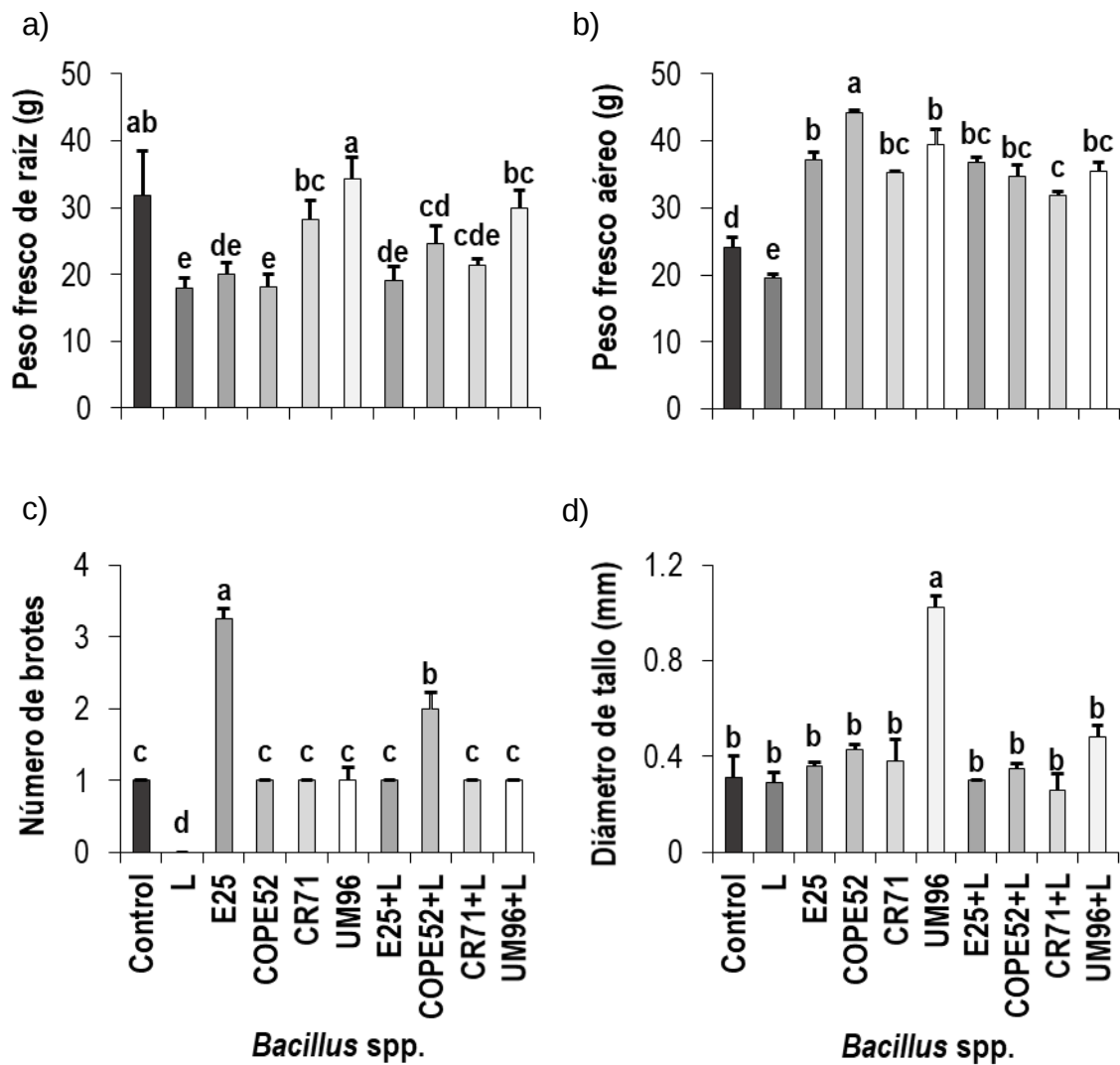


Figura 12A. Efecto de la inoculación con *Bacillus* spp., y *Lasiodiplodia* sp., sobre plantas de *Rubus* sp., selección UM13 crecidas bajo condiciones de invernadero. a) Peso fresco de raíz, b) Peso fresco aéreo, c) Número de brotes y d) Diámetro del tallo.