



## UNIVERSIDAD MICHOAQUANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

### INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

EFECTO DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS DE  
*Physalis ixocarpa* EJERCIDO POR BACTERIAS AISLADAS DE  
DIVERSOS CULTIVOS AGRÍCOLAS Y EL EFECTO ANTIFÚNGICO  
DE SUS COMPUESTOS VOLÁTILES SOBRE *Botrytis cinerea*.

Tesis que presenta

**Biól. Daniel Rojas Solis**

para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Biología  
Experimental.

Asesor

Doctor en Ciencias Genómicas Gustavo Santoyo Pizano.

Morelia, Mich. México, Febrero 2015

## **Agradecimientos**

**Quiero agradecer a mi familia. A Jesús Rojas Vázquez, por siempre pregonar con su ejemplo y brindarme su apoyo, a mi hermano Manuel Jesús Rojas Solis, que más que un hermano ha sido un amigo y confidente de vida, a mi cuñada Allison Avilés Rincón por su amistad y por traer a mi primero sobrino en camino, pero sobre todo a mi madre Irma Solis Muñoz, quien ha permitido que yo este por terminar este programa de maestría, y que me inculcado que en base al esfuerzo y dedicación se puede conseguir cualquier cosa que te propongas.**

**Agradecer a CONACYT por apoyarme con esta beca (276867) para poder obtener el grado**

**Al Dr. Gustavo Santoyo Pizano por la asesoría otorgada para la realización de esta tesis y por todo el apoyo e impulso que me ha brindado. Al Dr. Eduardo Valencia Cantero, por el entusiasmo con el transmite sus conocimientos y por la revisión de este trabajo. A la Dra. Lourdes I. Macías Rodríguez por la atenta corrección y aportación a esta tesis. Al Dr. Homero Reyes de la Cruz y al Dr. Ernesto García Pineda por todo el tiempo invertido en la revisión de este trabajo, y las correcciones minuciosas.**

**A todo el laboratorio de Recombinación y Diversidad Genómica en especial a Miguel Contreras Pérez por toda su amistad y la ayuda que me brindo, por supuesto no puedo dejar de mencionar a Roció Hernández León, Julie Hernández Salmerón, Claudia Hernández Pacheco, y Cristina Prieto Barajas por toda su ayuda, buenos consejos, y claro los buenos momentos. A todo el laboratorio de Ecología Microbiana, en especial a Liz Avilés y Diana Cástulo.**

**Por supuesto a toda la generación de la Maestría 2012-2014, sin su amistad y apoyo no habría empezado este trabajo. Quiero agradecer de manera especial a Ernesto Rodríguez, Luis Alberto Sánchez, Víctor Chávez, Enrique Matinés, Lucio Hernández por los buenos momentos que pasamos.**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.</b>	1
<b>ABSTRACT.</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. EL CULTIVO DE TOMATE.	3
1.2. EL TOMATE: PLAGAS Y ENFERMEDADES.	3
1.3. LA RIZÓSFERA.	4
1.4. LAS RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL.	5
1.5. MECANISMOS BACTERIANOS DE BIOCONTROL Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL.	5
1.6. COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES BACTERIANOS.	7
1.7. BIO-INOCULANTES.	8
1.8. EL HONGO FITOPATÓGENO <i>Botrytis cinerea</i> .	11
<b>2. ANTECEDENTES.</b>	12
<b>3. JUSTIFICACIÓN.</b>	25
<b>4. HIPÓTESIS.</b>	26
<b>5. OBJETIVOS.</b>	27
5.1. GENERAL.	27
5.2. PARTICULARES.	27
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.</b>	28
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	28
6.2. PLANTAS DE TOMATE Y DESINFECCIÓN DE SEMILLAS.	28
6.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROMOTOR DE RIZOBACTERIAS EN EL CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS DE TOMATE.	29
6.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES.	29
6.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE TOMATE.	30

6.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL VOLÁTIL DIMETIL DISULFURO (DMDS) SOBRE EL MICELIO DE <i>B. cinerea</i> .	31
6.7. ANALISIS ESTADÍSTICO.	32
<b>7. RESULTADOS.</b>	33
7.1. EFECTO DE PROMOCIÓN EJERCIDO EN PLÁNTULAS DE TOMATE POR RIZOBACTERIAS.	33
7.2. EVALUACIÓN DE LOS VOLÁTILES EMITIDOS POR RIZOBACTERIAS SOBRE LA INHIBICIÓN DEL HONGO <i>B. cinerea</i> .	37
7.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN LAS RIZOBACTERIAS <i>P. fluorescens</i> , <i>S. maltophilia</i> Y <i>B. phytofirmans</i> .	41
7.4. INHIBICIÓN DE <i>B. cinerea</i> CAUSADA POR EL COMPUESTO DMDS.	44
<b>8. DISCUSIÓN.</b>	47
<b>9. RESUMEN DE RESULTADOS.</b>	56
<b>10. CONCLUSIÓN.</b>	57
<b>11. PERSPECTIVAS.</b>	58
<b>12. BIBLIOGRÁFIA.</b>	59
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>FIGURA 1.</b> Efecto antifúngico de la co-inoculación de las cepas de <i>Pseudomas fluorescens</i> UM16, UM240, UM256 y UM270 con el fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i> .	15
<b>Figura 2.</b> Efecto de inhibición de <i>B. thuringiensis</i> UM96 sobre del crecimiento del micelio de <i>B. cinerea</i> .	16
<b>Figura 3.</b> Efecto de las rizobacterias sobre el crecimiento en plántulas de <i>Solanum nigrum</i> .	18
<b>Figura 4.</b> Crecimiento del micelio de <i>Fusarium culmorum</i> expuesto a dimetil disulfuro (DMDS).	21
<b>Figura 5.</b> Mantenimiento del sistema de resistencia inducido por la aplicación de DMDS.	22
<b>Figura 6.</b> Efecto de los compuestos volátiles emitidos por las PGPR	23

<i>Bacillus subtilis</i> GB03 y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IN937.	
<b>Figura 7.</b> Efecto de promoción de peso total en plántulas de tomate por rizobacterias.	34
<b>Figura 8.</b> Efecto de promoción en la longitud del hipocotilo en plántulas de tomate por rizobacterias.	35
<b>Figura 9.</b> Efecto de promoción de longitud de la raíz en plántulas de tomate por rizobacterias.	36
<b>Figura 10.</b> Las rizobacterias inhiben el crecimiento del hongo <i>B. cinerea</i> .	37
<b>Figura 11.</b> Efecto inhibitorio de las rizobacterias sobre el hongo <i>B. cinerea</i> .	38
<b>Figura 12.</b> Efecto inhibitorio de las cepas aisladas de alfalfa sobre <i>B. cinerea</i> .	39
<b>Figura 13.</b> Efecto antagónico de las cepas aislada de sorgo y tomate sobre <i>B. cinerea</i> .	40
<b>Figura 14.</b> Estructura química del Dimetil Disulfuro (DMDS).	44
<b>Figura 15.</b> Efecto inhibitorio del DMDS como compuesto difusible sobre <i>B. cinerea</i> .	45
<b>Figura 16.</b> Efecto inhibitorio del DMDS como compuesto volátil sobre <i>B. cinerea</i> .	46
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>Tabla 1.</b> Bioinoculantes exitosos.	10
<b>Tabla 2.</b> Bionoculantes fallidos.	10
<b>Tabla 3.</b> Análisis de compuestos orgánicos volátiles producidos por cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y detectadas por análisis GC/MS.	14
<b>Tabla 4.</b> Efectos de volátiles bacterianos en el crecimiento de hongos.	20
<b>Tabla 5.</b> Compuestos volátiles de <i>B. phytofirmans</i> , <i>P. fluorescens</i> y <i>S. maltophilia</i> identificados por Microextracción en Fase sólida (SPME) empleando Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG-EM).	42

## RESUMEN

En la rizósfera existen diversas interacciones que se generan entre plantas y microorganismos, interacciones que se clasifican como benéficas, neutras y perjudiciales. Los efectos benéficos son llevados a cabo por bacterias promotoras de crecimiento vegetal o PGPR, por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de las cepas aisladas de rizósfera de plantas de alfalfa (*Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256, UM270), sorgo (*Bacillus thuringiensis* UM96) y tomate (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia phytofirmans*, y *P. fluorescens*) para promover el crecimiento de plántulas de tomate e inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* a través de los compuestos orgánicos volátiles que estas emiten.

Los resultados muestran efectos diferenciales ejercidos por las distintas rizobacterias empleadas en este trabajo. Al evaluar el efecto de la inoculación de las distintas cepas sobre semillas de tomate, las rizobacterias aisladas de rizósfera de tomate, así como *B. thuringiensis* UM96 de sorgo, mostraron una mejor capacidad de promoción de crecimiento, al promover el peso total de las plántulas e incrementar la longitud del hipocotilo, comparado con el efecto ejercido por las bacterias aisladas de rizósfera de alfalfa, de las cuales, UM256 y UM270 destacaron por promover una mayor longitud de la raíz. El hongo *B. cinerea* fue inhibido en porcentajes similares sin importar la fuente de aislamiento de cada cepa. Para determinar los compuestos responsables de tal inhibición se obtuvo el perfil cromatográfico de las bacterias aisladas de tomate y se comparó con el de las bacterias aisladas de alfalfa, el cual había sido obtenido anteriormente. De forma interesante, el compuesto volátil dimetil disulfuro (DMDS), fue encontrado en el perfil de volátiles de cada rizobacteria analizada, por lo que se realizaron ensayos de inhibición a diferentes concentraciones del compuesto puro, mostrando capacidad para inhibir el crecimiento del micelio de *B. cinerea*.

En conclusión las bacterias aisladas de rizósfera de tomate promovieron el crecimiento en plántulas de tomate; además de que sin diferenciar la rizósfera de donde fueron aisladas, todas las rizobacterias analizadas lograron inhibir de forma significativa el crecimiento del hongo *B. cinerea* a través de compuestos orgánicos volátiles, y en particular, el DMDS juega un papel relevante.

**Palabras clave:** PGPR, Biocontrol, Compuestos Orgánicos Volátiles, *Botrytis cinerea*.

## ABSTRACT

The rhizosphere exhibit different interactions between plants and microorganisms that are classified as beneficial, neutral and harmful. The beneficial effects are carried out by plant growth promoting rhizobacteria or PGPR.

In this paper, the ability of strains isolated from rhizosphere of alfalfa plants (*Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256 and UM270), sorghum (*Bacillus thuringiensis* UM96) and tomato (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia phytofirmans*, and *P. fluorescens*) was evaluated to promote tomato seedling growth and inhibit the growth of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* through the emission of volatile organic compounds (VOCs) by this bacterial strains.

The results showed differential effects exerted by rhizobacteria used in this work. To evaluate the effect on the plant growth promotion, inoculation of the total strains were tested on tomato seeds. In this respect, tomato and sorghum rhizosphere isolates showed better growth promotion capacity, by increasing the total weight of plants and seedling hypocotyl length compared with the effect exerted by the rest of rhizobacteria isolated from alfalfa, from which, UM256 and UM270 highlighted by promoting greater root length in tomato plants. The fungus *B. cinerea* was inhibited at similar rates regardless of the strain isolation source. To determine organic compounds responsible for the phytopathogen inhibition, the chromatographic profile of the tomato rhizobacteria was obtained and compared with alfalfa rhizobacteria previously reported. Interestingly, the volatile compound dimethyl disulfide (DMDS) was found in the volatiles profile of all rhizobacteria analyzed. Furthermore, inhibition assays were performed at different concentrations of the pure compound showing the ability to inhibit mycelial growth of *B. cinerea*.

In conclusion, bacteria isolated from rhizosphere of tomato promoted tomato seedlings growth; in addition, all rhizobacteria significantly inhibited *B. cinerea* growth regardless of the plant rhizosphere from which were isolated through the emission of VOC's. Particularly, the DMDS played an important role in the biocontrol activity against *B. cinerea*.

**Keywords:** PGPR, Biocontrol, Volatile Organic Compounds, *Botrytis cinerea*.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. El cultivo de tomate

México se encuentra entre los principales productores y exportadores de hortalizas en el mundo, se ubica en el cuarto lugar a nivel mundial y el primero del continente, una de estas hortalizas corresponde al cultivo de tomate.

El tomate verde (*Physalis ixocarpa*) de cáscara es una especie originaria de México, destaca por su alto contenido en vitamina C, B9 y potasio, pertenece a la familia *Solanaceae* y contempla 18 géneros distintos (Pérez, 1995). Alrededor de 81% del tomate es producido bajo condiciones de riego, el resto el 19 % es de temporal. El estado con mayor superficie cosechada y volumen de producción es Nayarit aportando 64,998 toneladas anuales, seguido por Sinaloa generando 62,880 toneladas anuales, Sonora con 18,856 toneladas y Michoacán aportando 17,324 toneladas anuales (SAGARPA, 2013).

### 1.2 El tomate: plagas y enfermedades.

Actualmente la productividad del tomate se ha visto disminuida por diversas causas derivadas tanto del sistema de riego como del uso intensivo de agroquímicos en la producción, así como, por el mismo costo de comercialización, además de la afectación causada por distintos organismos fitopatógenos como *Oidium sp.*, *Cercospora sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, siendo las enfermedades más comunes; cenicilla, manchas foliares, carbón blanco, moho gris y secadera o marchitez responsables de la disminución en la cosecha en hasta un 50% (Sánchez *et al.*, 2008).

Además existe la presencia de diversas plagas causantes de una gran cantidad de pérdidas para este cultivo, mosquita blanca (*Bemisia tamasi*), causando daño a través de tres distintas vías, chupando savia, transmitiendo enfermedades virales y favoreciendo el desarrollo de distintos hongos; el pulgón saltador (*Paratriozza cockerelli*), a través de la inyección de toxinas y fitoplasmas que causan amarillamiento y raquitismo en las plantas; minador de hoja (*Liriomyza spp.*), causante de fuertes defoliaciones y afectación a los frutos; gusano alfiler (*Keiferia lycopersicella*), causantes de pérdidas en hasta un 40% de los frutos, gusano soldado (*Spodoptera exigua*), causa defoliación y daño a los frutos y la polilla del tomate (*Tuta absoluta*), considerada como la plaga más importante de este cultivo (Sánchez, 2004).

### **1.3. La rizósfera**

La rizósfera se define como la porción de suelo que se encuentra influenciado por la raíz de las plantas. El término fue introducido originalmente por Lorenz y Hiltner en 1904 y se utilizó para delimitar la zona donde son liberados los exudados de la raíz y donde existe una gran proliferación de microorganismos (Hirsch and Mauchline 2012).

En la rizósfera se encuentran un mayor número de microorganismos con respecto del suelo, con un número que va de  $10^8$  y a  $10^9$  células por gramo de suelo (Bonkowski *et al.*, 2000), llegando a ser el doble de la que se encuentra en el suelo no rizosférico. Esto se debe a la constante liberación de exudados por la raíz de la planta (mucílagos, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, aminoácidos, fitosideróforos, flavonoides y vitaminas) que puede ser una constante fuente de carbono útil para el crecimiento de microorganismos heterotróficos (Grayston *et al.* 1998).

En la rizósfera se llevan a cabo interacciones microorganismo-planta, en las cuales las diversas especies de microorganismos puede tener diferentes efectos en la planta que pueden ser perjudiciales, neutros y benéficos (Whipps 2001).

#### **1.4 Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.**

Las bacterias que presentan un efecto benéfico se conocen como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal o PGPR las cuales establecen una relación simbiótica con la planta (Banchio *et al.*, 2009), y el cual fue propuesto ya hace algunas décadas por Kloepper y Schroth (1981).

Un gran número de géneros están considerados en esta clasificación, incluyendo *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter*, (Kennedy *et al.*, 2004). Las PGPR influyen directamente sobre el crecimiento de las plantas al actuar sobre el metabolismo de estas, promoviendo el aumento de la toma de agua y nutrientes limitantes en el suelo, además de la síntesis bacteriana de fitohormonas (Glick, 1995).

#### **1.5 Mecanismos bacterianos de biocontrol y promoción de crecimiento vegetal.**

Las bacterias rizosféricas presentan distintos mecanismos para además de promover el crecimiento de la planta, también proteger a la misma de la infección causada por organismos fitopatógenos; estos mecanismos se clasifican como directos e indirectos.

Los mecanismos indirectos se presentan cuando el microorganismo protege a la planta, por lo que de manera indirecta mejora la salud y por lo tanto, su desarrollo. Las bacterias por su parte sintetizan una gran variedad de metabolitos y proteínas con efecto antimicrobiano,

enzimas como glucanasas, celulasas, quitinasas, proteasas y lipasas con actividad en contra de fitopatógenos (Glick, 2012), además de la existencia de una amplia cantidad de antibióticos con actividad antimicrobiana y/o antifúngica con una gran diversidad química como el 2,4-diacetilfluoroglucinol y cianuro de hidrogeno o bien péptidos y lipopéptidos como las Iturinas (Haas and Défago, 2005). Otro mecanismo indirecto es la Inducción del Sistema de Resistencia (ISR) que se lleva a cabo a través de compuestos secretados por los microorganismos llamados elicidores que provocan una respuesta inmune de amplio espectro en la planta. Algunos compuestos elicidores que pueden disparar la ISR son el ácido salicílico, flagelos, lipopolisacáridos y sideróforos (Audenaert *et al.*, 2002).

Dentro de los mecanismos indirectos se incluye la capacidad de algunos microorganismos para conferir protección del estrés abiótico, como es la desecación y la alta salinidad del suelo. Algunas bacterias pueden sintetizar una enzima llamada ACC deaminasa, que puede degradar el ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilico), precursor directo de la síntesis de etileno, lo que disminuye su síntesis y permite un mayor desarrollo de las plantas que se encuentran en condiciones de estrés. Además, las bacterias sintetizan citocinas que también han mostrado capacidad de mejorar en la planta la resistencia a diversas condiciones ambientales adversas (Yang *et al.*, 2009).

Por otro lado existen mecanismos que son ejercidos directamente en la planta favoreciendo su crecimiento. Uno de los mecanismos directos de promoción vegetal por parte de los microorganismos es la facilitación de adquirir nutrientes de suelo (Bonkowski *et al.*, 2000).

Las bacterias tienen varios mecanismos que permiten la solubilización de nutrientes, como la liberación de iones para la adquisición de elementos esenciales como el hierro, que es

necesario para que las plantas puedan llevar a cabo la fotosíntesis (Mosqueda *et al.*, 2013), otro mecanismo para la adquisición de hierro es la síntesis de compuestos como los sideróforos que ayudan a la adquisición del hierro (Santoyo *et al.*, 2010). Los mecanismos para la mejora de fosforo, incluye la liberación de fosfatasas (alcalinas y acidas) (Franco-Correa *et al.*, 2010) y bajando el pH a través de la secreción de ácidos (Illmer and Schinner, 1992). Otro aspecto de importancia es la fijación de nitrógeno atmosférico, algunas de las bacterias que destacan como fijadoras de nitrógenos son los géneros *Azospirillum*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Glick, 2012). Aunque esto lo realizan a través de la internalización de los tejidos radiculares, formando estructuras globulares llamadas nódulos. Es aquí donde las condiciones de bajo oxígeno permiten llevar a cabo la función de la nitrogenasa para fijar el nitrógeno atmosférico en una forma asimilable por la planta, el amonio (Madigan *et al.*, 1999). Los mecanismos propuestos para la promoción del crecimiento de la planta por las PGPR incluyen la síntesis bacteriana de fitohormonas como AIA, citocininas y giberelinas, que estimulan el crecimiento y el desarrollo de la planta (Glick, 1999).

### **1.6. Compuestos orgánicos volátiles bacterianos.**

La síntesis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por las bacterias, son compuestos que poseen un peso molecular usualmente inferior a 300 g/mol y por su alta presión de vapor se encuentran en estado gaseoso (Duvadera and Negre, 2005). Todos los organismos producen estos VOCs, los cuales les permiten comunicarse entre sí, incluyendo las bacterias las cuales presentan un perfil singular de compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles bacterianos pueden tener diferentes funciones, tales como; infoquímicos para la comunicación entre bacterias de la misma especie o con otros taxa, señales de comunicación célula-célula, una posible válvula de liberación de carbón y como agentes de promoción de crecimiento y/o inhibidor del crecimiento de patógenos (Kai *et al.*, 2009). Esta última función es importante al beneficiar de forma indirecta la planta. La participación de los VOC's sobre la inhibición de hongos patógenos está sujeto a tres factores distintos; los hongos responden de manera diferente a distintas mezclas de compuestos volátiles, los sitios de acción pueden ser diferentes, los hongos poseen diferentes habilidades de detoxificación a metabolitos volátiles. Mientras los VOC's son capaces de modular el desarrollo de la planta y lograr así la promoción de crecimiento (Luna *et al.*, 2010).

## **1.7. Bio-inoculantes**

Los bio-recursos pueden ser definidos como cualquier material biológico aplicado al suelo para mejorar su calidad, el suministro de nutrientes y el crecimiento de la planta. Los bio-recursos se clasifican en bio-enmiendas, bio-fertilizante y bio-inoculantes. Los bio-inoculantes pueden contener cepas bacterianas únicas o consorcios de microorganismos que tienen el potencial de promover el crecimiento de la planta. Se pueden aplicar de diversas formas, ya sea directamente al suelo o a la semilla antes de ser sembrada. Son formulaciones utilizadas actualmente para aprovechar las funciones benéficas de los microorganismos y para aplicarlos en un amplia gama de tipos de suelos y cultivos (Roesti *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2013).

La fabricación y el uso de bio-inoculantes en la agricultura es una alternativa de suma importancia en la actualidad para eliminar o reducir el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos (Lucy *et al.*, 2004). Esto debido a que el uso desmedido de fertilizantes, los cuales son causantes de la eutrofización y contaminación de agua; aumentando la degradación del suelo y la pérdida de la biodiversidad, además de que su producción libera gases de efecto invernadero (Mulvaney *et al.*, 2009). De la misma manera los plaguicidas, tanto en su producción como en su aplicación, generan contaminación principalmente en suelo y mantos freáticos, lo que afecta a la salud humana (Akhtar *et al.*, 2009).

El éxito de los bio-inoculantes comerciales debe verse reflejado en una ganancia económica a través de mejores rendimientos de cultivos y la reducción en la aplicación de fertilizantes inorgánicos, de tal manera que el desarrollo de bio-inoculantes, basados en bacterias PGPR, son una alternativa para el desarrollo sustentable de la agricultura (Bhattacharyya y Jhan 2012). Actualmente han salido al mercado diversos bioinoculantes que han mostrado gran éxito en diversos cultivos de interés (Tabla 1). De la misma forma son muchos los desafíos para la mejora de los bio-inoculantes, quedando aún varias preguntas por resolver; como son el tiempo de vida media que presenta cada bio-inoculante, la influencia que puede ejercer sobre diferentes especies vegetales, la capacidad de sobrevivir en diversos climas y condiciones ambientales, la adaptabilidad de las cepas a los diferentes tipos de suelos y las interacciones que se puedan llevar a cabo con la microbiota rizosférica del cultivo. Por lo tanto, el reto actual de los bio-inoculantes es el desentrañar la contribución particular de cada mezcla en el crecimiento de las plantas y entender las interacciones potenciales entre microorganismos, las plantas y el ambiente, para su futura fabricación y aplicación. Lo

anterior evitará el desarrollo de bio-inoculantes con poca posibilidad de éxito en el campo (Tabla2).

Tabla 1. Bioinoculantes exitosos

Productos	Origen	Contenido	Efecto Biológico Atribuido	Aplicaciones	Referencia
<i>Bio-save</i>	U.S.A	<i>Pseudomonas syringae</i>	Fungicida	Papa	Valverde y Ferrais., 2010
<i>Bligh-ban</i>	Australia	<i>Pseudomonas fluorescens A506</i>	Bactericida	Tomate, fresa, papa, melocotón	Valverde y Ferrais., 2010
<i>Fosfoactive</i>	Argentina	<i>Azospirillum-Rhizobium</i>	Fijador de nitrógeno	Frijol, alfalfa, trigo, maíz	Valverde y Ferrais., 2010
<i>Bio-organics</i>	U.S.A	<i>Azospirillum lipoferum-Bacillus megaterium</i>	Antifúngico	Trigo	Valverde y Ferrais., 2010

Tabla 2. Bionoculantes fallidos

Producto	MPCP	Resultado	Cultivo	Referencia
<i>MycormaxJH Biotech Inc. Ventura US</i>	<i>Glomus</i>	< 5 % de colonización de la raíz. Incrementó RMS	<i>Zea mays</i>	Wiseman <i>et al.</i> , 2009
<i>Mazospirflo-2 Soligo Ltd. South Africa</i>	<i>Azospirillum brasiliense</i>	No incrementó RMS o Fosforo	<i>Zea mays</i>	Laditi <i>et al.</i> , 2012
<i>Bioestimulador Agrinova GmbH</i>	<i>Bacillus subtilis, Ascophyllum nodosum</i>	No hay efecto en disponibilidad de N en el suelo	<i>Lolium perenne</i>	Schenck zu Schweinberg, Mickan and Muller, 2009
<i>Bionova Hygiene GmbH, Stans, Switzaerland</i>	<i>Streptomyces griseus, Aspergillus oryzae, Mucor hiemalis</i>	No mejoró rendimientos o calidad del suelo	<i>Cultivos rotacionales (Papa, alfalfa, trigo, cebada)</i>	Mayer <i>et al.</i> , 2010

MPCP= Microorganismos promotores de crecimiento en plantas

RMS = Rendimiento de materia seca

## 1.8. El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

*B. cinerea* es un hongo Ascomycota patógeno de plantas, el cual se sabe que puede infectar a más de 200 especies vegetales, es comúnmente conocido como el moho gris, y ataca principalmente plantas dicotiledóneas, muchas de ellas de importancia agrícola como fresa, uva, lechuga, brócoli, tomate, pepino, varias leguminosas como el frijol y la alfalfa, entre muchas otras (Dean *et al.*, 2012).

*B. cinerea* es considerado un patógeno aéreo y ataca principalmente flores, frutos, hojas y brotes. Aunque también ha sido aislado de raíces tuberculosas, como la zanahoria, la papa, y el camote, no es considerado un patógeno del suelo (Droby and Lichter 2004). *B. cinerea* produce varios conidióforos ramificados con varias conidias elipsoidales, incoloras. A menudo forma esclerocios, estas estructuras generan resistencia a la desecación, rayos UV y el ataque de otros microorganismos. El esclerocio contiene en la corteza superior pigmentos melánicos, y las hifas están rodeadas por una matriz continua de  $\beta$ -glucanos, y las reservas de nutrientes intracelulares son proteínas, glucógeno, polifosfato y lípidos (Beever and Weeds 2004).

## 2. ANTECEDENTES

Existen múltiples trabajos reportados sobre rizobacterias con capacidades para mejorar el crecimiento, desarrollo y salud de diversas especies vegetales, incluyendo aquellas de importancia agrícola y hortícola (Santoyo *et al.*, 2012).

Uno de los géneros más comunes que habitan el suelo son *Pseudomonas*. En un trabajo realizado por Méndez y colaboradores (2011), se determinó la comunidad bacteriana en la rizósfera de remolacha de azúcar crecida en un suelo supresor del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Mediante el uso de PhyloChips, se obtuvieron más de 33,000 OTUs de bacterias y arqueas que estaban presentes en la rizósfera de plantas cultivadas en suelos supresores y conductores de enfermedades. Sin embargo, ni el número ni la presencia de taxones microbianos exclusivos podría estar relacionada con supresión de la enfermedad. En su lugar, la abundancia relativa de varios taxones se encontró como los responsables de suprimir la enfermedad causada por *R. solani*. El enfoque independiente del cultivo encontró especies pertenecientes a Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria y Firmicutes. De manera particular miembros de la familia *Pseudomonadaceae* fueron los grupos más abundantes e importantes en suprimir la enfermedad. Aunque se concluyó que la supresión de la enfermedad causada por *R. solani* no puede ser atribuida a un solo taxón, si no que fue provocada por un consorcio de microorganismos del género *Pseudomonas*.

En nuestro laboratorio contamos con antecedentes sobre aspectos benéficos de las bacterias del género *Pseudomonas* también. León y colaboradores en 2014, reportaron que de un análisis de colonias rizosféricas de plantas de *Medicago sativa*, realizaron un proceso de escrutinio para detectar cepas con alto potencial para biocontrolar fitopatógenos y a la vez,

promover el crecimiento de plantas *M. truncatula*. Por medio de ensayos de antagonismo *in vitro* contra el hongo *B. cinerea*, destacaron 4 cepas que mostraron los mejores resultados, estas fueron nombradas UM16, UM240, UM256 y UM270. Dichas cepas se caracterizaron a través de la secuenciación del gen ribosomal 16S y fueron identificadas como pertenecientes a la especie *Pseudomonas fluorescens*. Estos aislados mostraron capacidad de incrementar de manera significativa la biomasa y contenido de clorofila en plántulas de *M. truncatula* a través de los compuestos difusibles y compuestos volátiles. En base a este efecto de promoción se obtuvo el perfil de volátiles emitidos por las cepas rizosféricas de *Pseudomonas* (Tabla 3) para inferir la responsabilidad de los compuestos que pudieran estar participando en la promoción ejercida. En el perfil se encontraron una gran cantidad de compuestos azufrosos, destacando la presencia del compuesto dimetil disulfuro (DMDS). Las cuatro cepas mostraron adicionalmente capacidad para inhibir al hongo *B. cinerea* (Figura 1), así como otros fitopatógenos a través de los compuestos difusibles en el medio. Así mismo, fueron capaces de biocontrolar los síntomas de infección causada por *B. cinerea* en plántulas de *M. truncatula*. Se analizaron adicionalmente otras actividades conocidas en el biocontrol de fitopatógenos y promoción del crecimiento vegetal, tales como fenazinas, cianógenos y ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) deaminasa, así como la producción de biofilm, sideróforos, proteasas y ácido indol-3-acético, identificada en la mayoría de las cepas.

Tabla 3. Análisis de compuestos orgánicos volátiles producidos por cepas de *Pseudomonas fluorescens* y detectadas por análisis GC/MS. (León *et al.*, 2014)

Volatile compound	Rt (min)	UM16 %	UM240 %	UM256 %	UM270 %
<b>Methanethiol</b>	0.28	12.34	10.57	12.99	15.13
<b>Dimethyl sulfide</b>	0.36	16.86	17.12	13.26	23.4
2-Butanone	0.96	0.23	n.d.	0.24	n.d.
1-Nonene	1.05	1.09	1.03	1.75	2.02
<b>Methyl thiolacetate</b>	1.46	0.15	1.36	1.35	1.17
<b>Dimethyl disulfide</b>	1.72	30.26	22.89	13.84	5.62
1-Decene	1.95	1.53	1.82	1.13	0.53
1-Undecanol	3.56	35.07	38.77	52.50	50.01
<b>2,4-Dithiapentane</b>	5.32	1.00	0.96	0.52	n.d.
1-Dodecene	6.09	n.d.	0.44	0.48	n.d.
<b>Dimethyl trisulfide</b>	7.28	0.42	1.07	0.70	0.57
<b>S,S-Dimethyl dithiocarbonate</b>	9.15	0.13	0.52	n.d.	n.d.
2-Nonanone	11.65	0.26	0.54	0.18	n.d.
Decyl oxirane	16.83	0.30	1.03	0.46	n.d.
<b>Methyl methylthiomethyl disulfide</b>	17.07	0.12	0.41	n.d.	n.d.
2-Amino-5-methyl benzoic acid	17.69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Thiazole</b>	18.66	n.d.	0.58	0.31	0.41
Butylated hydroxytoluene	26.22	0.25	0.86	0.30	0.49
Dimethylhexadecilamine	31.4	n.d.	n.d.	n.d.	0.64

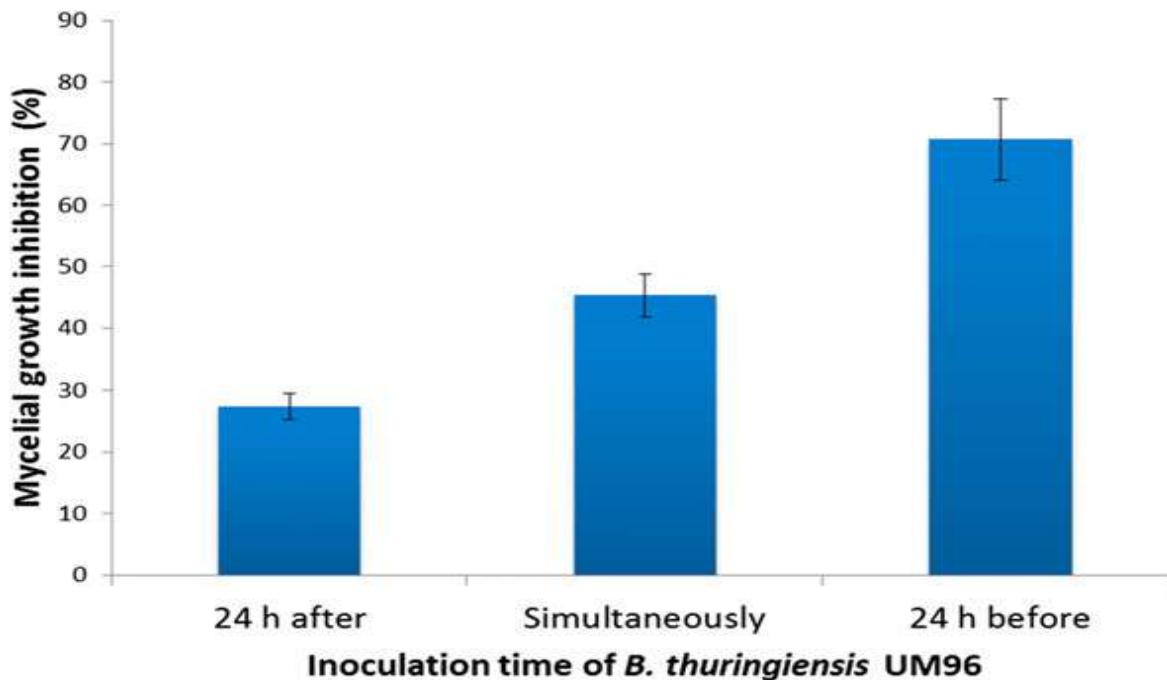


**Figura 1. Efecto antifúngico de la co-inoculación de las cepas de *Pseudomas fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270 con el fitopatógenos *Botrytis cinerea*.** Se muestra el efecto directo ejercido por los metabolitos difusibles producidos por las *Pseudomonas* sobre el micelio de *B. cinerea*. Los aislados bacterianos fueron estriados en la caja a manera de cruz, y un fragmento de micelio de 4 mm de diámetro fueron depositados en el centro de cada cuadrante. (León *et al.*, 2014)

Otro de los géneros bacterianos que han mostrado alto potencial de biocotrol es *Bacillus* (Santoyo *et al.*, 2012). En particular, bacterias de la especie *B. thuringiensis* han sido ampliamente estudiadas por su capacidad insecticida; sin embargo, estudios recientes muestran que también pueden tener capacidad biocontroladora de hongos fitopatógenos (Absalón *et al.*, 2014).

La bacteria rizosférica *Bacillus thuringiensis* UM96 demostró capacidad de inhibir el crecimiento del hongo *B. cinerea* en ensayos de biocontrol, de hecho cuando la cepa UM96 fue inoculada con 24 horas previas al hongo, está alcanzó un porcentaje de inhibición del 70% con respecto al tratamiento control (Figura 2). Se evaluó también la actividad de las enzimas líticas producidas por UM96, mostrando una alta actividad quitinolítica. El uso del compuesto allosamidin permitió asignar un papel específico a la actividad quitinasa de

UM96 en la inhibición del fitopatógeno. Finalmente la inoculación de *B. thuringiensis* logró biocontrolar significativamente los síntomas de enfermedad del moho gris causada por *B. cinerea* en plántulas de *M. truncatula* (Absalón et al., 2014).

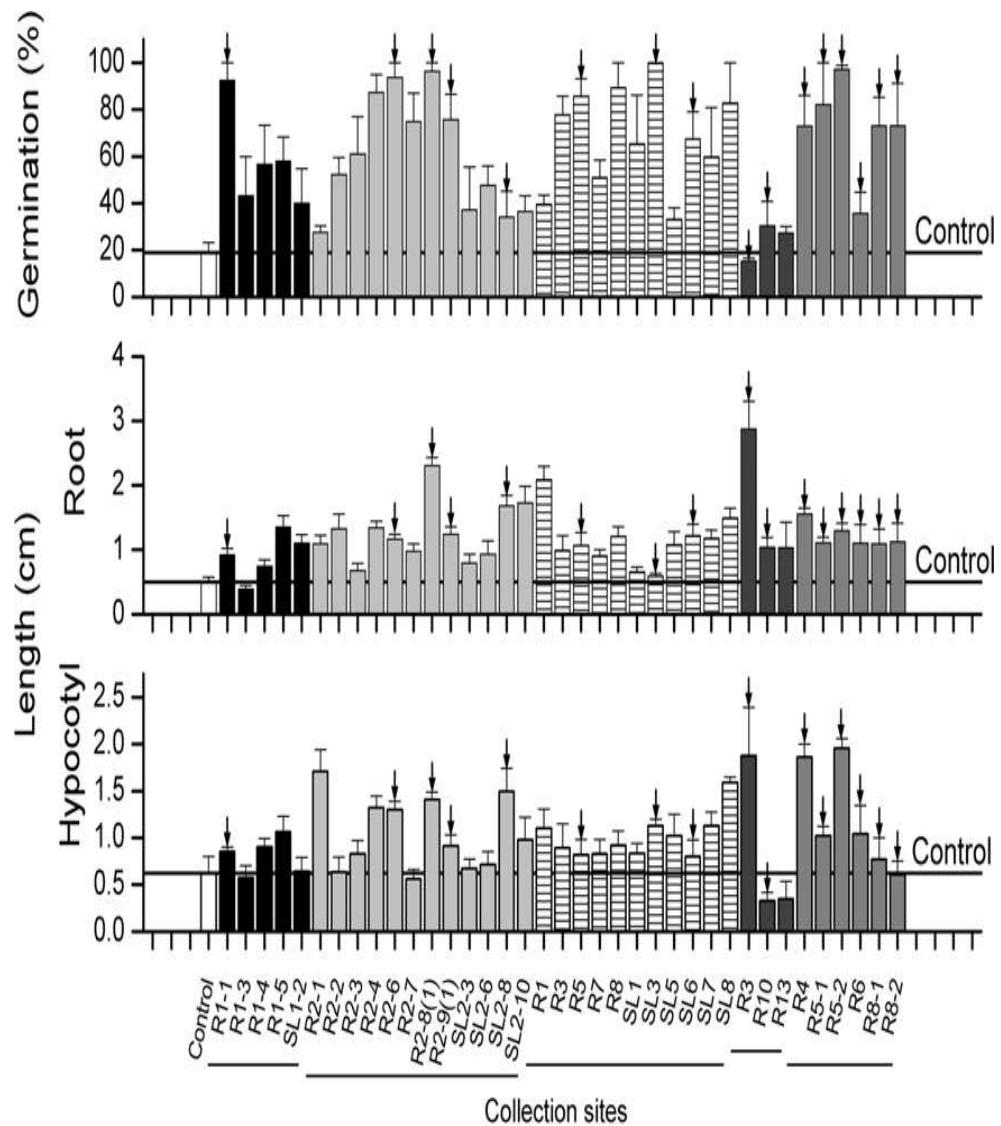


**Figura 2. Efecto de inhibición de *B. thuringiensis* UM96 sobre del crecimiento del micelio de *B. cinerea*.** El diámetro del crecimiento del hongo representa el promedio de tres replicas independientes, la medición se realizó del día 1 al día 6 y se compararon con el control (el cual no fue inoculado con bacteria). (Absalón et al., 2014).

La capacidad de *B. thuringiensis* de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos ha sido atribuida no sólo a quitinasas, sino también a varios compuestos producidos. Por ejemplo el antibiótico zwittermicina A cuya estructura se dilucidó como un aminopoliol linear (Stabb et al., 1994), que mostró actividad principalmente a Oomycetes como *Phytophthora medicaginis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Pythium aphanidermatum* y *Pythium torulosum* (Nair et al., 2004; Shao et al., 2008; Silo-Suh et al.,

1998), y algunos hongos fitopatógenos como son *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, y *Ustilago* (Silo-Suh *et al.*, 1994).

Long *et al.*, (2008) realizaron un trabajo en el cual 77 aislados fueron obtenidos de raíces, tallos y hojas de plantas de *Solanum nigrum*, seleccionando a los aislados que mostraron mejores capacidades de acuerdo a su habilidad a producir la ACC deaminasa, síntesis de la fitohormona IAA (ácido indolacético), solubilizar fosfatos y colonizar las plántulas. Las anteriores características están asociadas a la promoción de crecimiento en plantas. Los autores encontraron que 23 aislados presentaron actividad ACC deaminasa, 28 produjeron IAA, 6 aislados fueron capaces de solubilizar fosfato inorgánico y 24 fueron capaces de colonizar plántulas de *S. nigrum*. En un ensayo adicional mostraron que 37 de los 77 aislados promovieron diferencialmente distintos parámetros de crecimiento en *S. nigrum* (germinación, longitud de raíz e hipocotilo) (Figura 3), demostrando así que un alto porcentaje de la bacterias presentes en su hospedero pueden aportar a la planta diversos beneficios durante interacciones específicas planta-microorganismo.



**Figura 3. Efecto de las rizobacterias sobre el crecimiento en plántulas de *S. nigrum*.**

Porcentaje de germinación, longitud de la raíz (cm) e hipocotilo (cm), las diferentes barras representan el origen de los aislados. (Long *et al.*, 2008)

La anterior hipótesis se refuerza de acuerdo a lo reportado por Marasco *et al.*, (2012), en el cual se determina que las plantas de pimiento *Capsicum annum L.* bajo condiciones de sequía son capaces de seleccionar la microbiota que le proporcione algún beneficio para contrarrestar las condiciones adversas del ambiente. El análisis fue realizado para explorar

la estructura de la comunidad microbiana asociada al sistema radicular del pimiento. Se emplearon cuatro distintas fracciones para la determinación de la diversidad bacteriana: el suelo rizosférico, el suelo alrededor de la raíz y el tejido de la raíz para conocer las bacterias endófitas presentes, los cuales fueron comparados con un suelo no cultivado. Por medio del análisis del gen 16S y la técnica PCR-DGGE se encontró que las fracciones de suelo alrededor de la raíz, así como, el suelo rizosférico fueron dominados por el taxa *Proteobacteria* y el género *Bacillus*, el suelo no cultivado fue dominado por Actinobacterias mientras que algunas *Pseudoxanthomonas* sp. y Firmicutes fueron típicamente encontradas en fracciones de la endósfera, puntualizando el hecho de una mayor biodiversidad en términos de estructura de la comunidad en la fracción rizosférica en comparación a la fracción endosférica. La evaluación de las distintas habilidades de promoción de crecimiento en planta (PGPR) y de tolerancia a estrés abiótico fueron distribuidas diferencialmente en los diferentes microhabitats del sistema radicular del pimiento, las bacterias aisladas de las fracciones rizosféricas, endofíticas y suelo alrededor de la raíz exhibieron un largo numero de rasgos PGPR en comparación a los aislados del suelo no cultivado. Sin embargo, algunas habilidades como la aportación de nutrientes (solubilización de fosfatos, liberación de sideróforos), fueron más frecuentes en bacterias del suelo, mientras la síntesis de auxinas fue principalmente encontrada en bacterias endófitas.

Los volátiles bacterianos pueden actuar como fungistáticos o como fungicidas. Un reporte de volátiles bacteriano en el cual se demuestra que se afecta el desarrollo y crecimiento de los hongos fue el publicado por McCain (1996), mostrando que los volátiles emitidos por

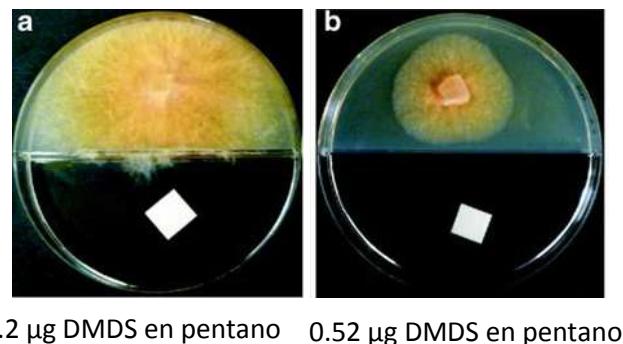
*Streptomyces griseus* redujeron la esporulación del hongo *Gloesporium gridum* e indujo la formación de esclerocios en *Sclerotium cepivorum* y *Rhizoctonia solani*.

Diversos VOC's bacterianos actúan como agentes bioactivos en hongos incluyendo varias aminas, benzaldehído, ciclohexanol, decanol, 2-etil-1-hexanol, nonanol, benzotiazol y dimetil trisulfuro, compuestos tales como metil pirazina, 2,5-dimetil pirazina, ácido 4-octilbenzoico, varios alcanos de cadena media y cadena larga, alquenos, aldehídos y alcoholes han mostrado efectos inhibitorios en varios hongos ( Tabla 4 ).

Tabla 4. Efectos de volátiles bacterianos en el crecimiento de hongos.

Bacteria	Hongo	Efectos	Compuestos Bioactivos	Referencia
<i>Pseudomonas</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	Formación temprana de esclerocios		Hayes <i>et al.</i> , 1969
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. corrugate</i> , <i>P. chloraphis</i> y <i>P. aurantiaca</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Pochonia chlamydospora</i> , <i>Chlonostachys rosea</i>	Inhibición de crecimiento del micelio y germinación de esporas	Ciclohexanol, decanol, 2-etil-1-hexanol, nonanal, benzotiazol, dimetil trisulfuro	Fernando <i>et al.</i> , 2005
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Alcaligenes fecalis</i> , <i>Arthrobacter nitroguajacolius</i> , <i>Lysobacter gummosus</i> , <i>Sporosarcina ginsengisoli</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Pochonia chlamydospora</i>	Inhibición de crecimiento del micelio	Acetamida, metanamina, 1-butanamina, benzaldehído, fenilacetaldehído, 1-deceno, benzotiazol	Zou <i>et al.</i> , 2007

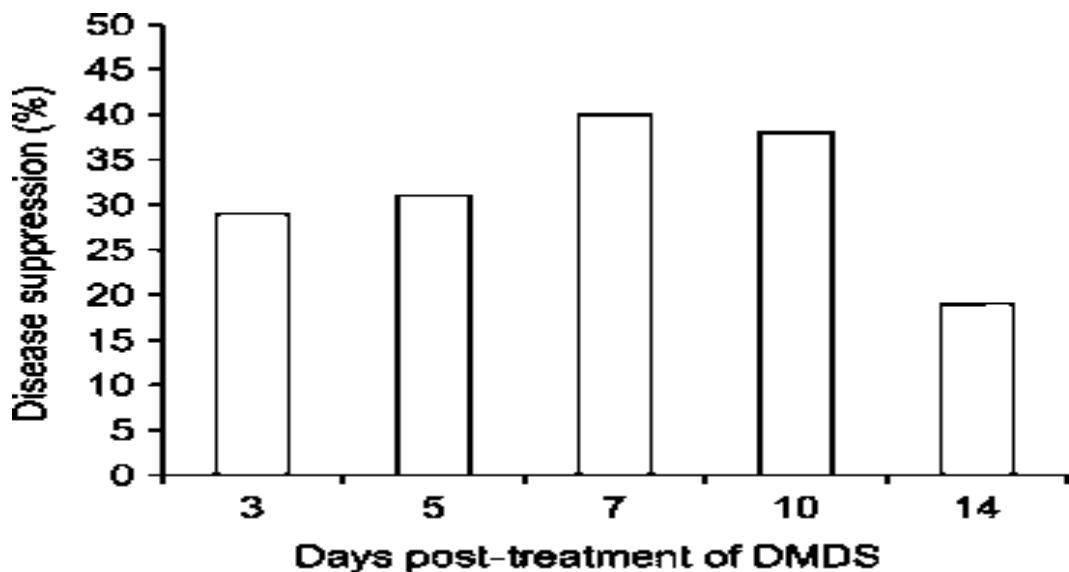
El crecimiento del micelio del hongo *Fusarium culmorum* mostró una inhibición dosis-dependiente ejercida por el compuesto dimetil disulfuro (DMDS) (Figura 4).



**Figura 4. Crecimiento del micelio de *Fusarium culmorum* expuesto a dimetil disulfuro (DMDS).** Las cajas divididas fueron inoculadas con *F. culmorum* de un lado. Papel filtro con pentano (a), 5.2 µg de DMDS en pentano, (b) 0.52 µg DMDS en pentano. (Zou *et al.*, 2007).

Sin embargo el compuesto DMDS, no logró inhibir el crecimiento de los hongos *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia clamydosporia* (Zou *et al.*, 2007).

El DMDS además de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, ha demostrado tener la capacidad de inducir el sistema de resistencia en planta (ISR), en un trabajo realizado por Chien-Jiu *et al.*, (2012), encontraron que dentro del pool de VOC's emitidos por la cepa de *Bacillus cereus* C1L se producía este compuesto, la aplicación de DMDS indujo ISR en plantas de maíz en contra del hongo *Cochliobolus heterostrophus*, la severidad de la enfermedad fue efectivamente suprimida por asperjado de la tierra a la concentración 10mM de DMDS en un 30-40% dentro de un periodo de 10 días antes de la inoculación del patógeno, cuando el DMDS fue aplicado 14 días antes de la inoculación del patógeno el nivel de protección decremento y la supresión de la enfermedad fue reducida en un 20% (Figura 5).

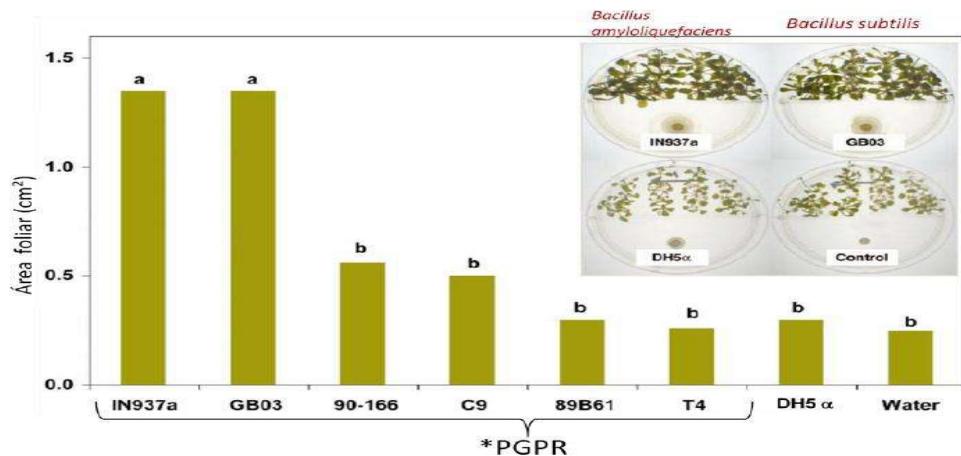


**Figura 5. Mantenimiento del sistema de resistencia inducido por la aplicación de DMDS.** El compuesto DMDS incrementa el porcentaje de supresión en maíz en contra del tizón foliar causado por el hongo *Cochliobolus heterostrophus*. (Chien-Jiu *et al.*, 2012).

Por otro lado el DMDS ha sido considerado como una potencial alternativa a fumigar con metil bromuro. La fumigación del suelo con DMDS pudo controlar efectivamente la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae* en una proporción de 80g/m<sup>2</sup> concentraciones que resultaron 18 veces por debajo a lo aplicado para el fumigante metil bromuro para mostrar resultados semejantes. Se mejoró adicionalmente el rendimiento de crecimiento en campos de papa (Fritsch, 2005). Sin embargo la fumigación con DMDS no logró controlar a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum* (Gerik, 2005).

El primer trabajo de promoción de crecimiento a través de VOCs fue reportado por Ryu *et al.*, (2003), en el cual el efecto de promoción sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* es atribuido a dos compuestos VOCs producidos por *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*

correspondientes a 2,3-butanediol y acetoína (Figura 6). Aunque aún permanece en las sombras el mecanismo por los cuales se presentó tal efecto de promoción.



**Figura 6. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por las PGPR *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a.** El desarrollo del área foliar de plantas de *A. thaliana*, comparado con otras PGPR como son *Serratia marcenscens* 90-166, *B. pasteurii* C-9, *Pseudomonas fluorescens* 89B61 y *B. pumilus* T4, así como un control negativo *E. coli* DH5 $\alpha$  y el control sin inocular (Ryu *et al.*, 2003).

De igual manera el DMDS participa en la inducción del crecimiento en planta. Esto se corroboró en un trabajo realizado por Meldau *et al.*, (2013), en el cual el DMDS contribuyó a la mejora en cuanto a la nutrición de azufre en plántulas silvestres de tabaco y la línea 35S-etr1(una línea insensible al etileno). Para ello emplearon distintas concentraciones de DMDS (0, 0.5, 5, 50, 500 y 2000 $\mu$ g), que fueron impregnadas en un algodón que se depositó de un lado en cajas petri con compartimentos separados y del otro lados fueron crecidas plántulas silvestres crecidas en un medio suplementado con diversas

concentraciones de MgSO<sub>4</sub> (0, 50 y 1000μM). Un efecto de promoción en las plantas fue observado a la concentración 50 μg de DMDS, el cual se vio potencializado a la concentración de 500 μg, favoreciendo en una mayor superficie foliar en las plántulas de tabaco de la línea silvestre.

### **3. Justificación**

Existe un gran interés en la agricultura por generar bioinoculantes basados en el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por sus siglas en inglés **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria). El uso de PGPRs en la agricultura se ha incrementado cada vez, debido a que son una alternativa sustentable para el ambiente. Sin embargo, se sabe muy poco si la fuente de donde son aisladas las PGPRs influye sobre sus capacidades posteriores para promover el crecimiento de la misma planta huésped. Por tal motivo, es de suma importancia realizar análisis comparativos de PGPRs con diferentes orígenes para evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal específico, así como también analizar si sus actividades antagónicas hacia hongos fitopatógenos se ven diferenciadas. Lo anterior redundará en un mejor conocimiento para desarrollar bioinoculantes basados en PGPRs que potencien las asociaciones planta-bacteria.

#### **4. Hipótesis**

Las rizobacterias aisladas de plantas de tomate presentan un efecto promotor mayor en plántulas de tomate con respecto a otras PGPR aisladas de diferentes cultivos agrícolas, e inhiben al hongo *B. cinerea* a través de los compuestos orgánicos volátiles.

## 5. Objetivos

### 5.1. General

Determinar el efecto de promoción de crecimiento en plántulas de *Physalis ixocarpa* ejercido por bacterias aisladas de diversos cultivos agrícolas y el efecto antifúngico de sus compuestos volátiles sobre *Botrytis cinerea*.

### 5.2. Particulares

1. Determinar el efecto de bacterias aisladas de tomate (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia phytofirmans*, *Pseudomonas fluorescens*), sorgo y alfalfa (*Bacillus thuringiensis* UM96 y *P. fluorescens* UM16, 240, 256 y 270) sobre el crecimiento en plántulas de tomate.
2. Evaluar el efecto inhibitorio de los compuestos volátiles producidos por las rizobacterias aisladas de diversos cultivos agrícolas sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea*.
3. Analizar el perfil de compuestos volátiles de las bacterias aisladas de tomate.
4. Determinar el efecto inhibitorio del volátil dimetil disulfuro (DMDS) sobre el micelio de *B. cinerea*.

## **6. Estrategia experimental.**

### **6.1. Material biológico**

Se emplearon las cepas asiladas alfalfa *Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270 (León *et al.*, 2014), *Bacillus thuringiensis* UM96 (Absalon *et al.*, 2010) aislada de sorgo y las cepas aisladas de tomate *Senotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia phytofirmans* y *Pseudomonas fluorescens* (Pacheco, comunicación personal), las cuales fueron sembradas de manera rutinaria en medio Agar Nutritivo (AN) a 30°C por un periodo de 24 horas para permitir su crecimiento. Para después trasladarse a refrigeración a 4°C y resembrar cada 3 semanas.

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* fue donado por el laboratorio de Ecología Microbiana, el hongo se creció en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) a 30°C por 3-5 días en total oscuridad, fue mantenido a 4°C y se resembro cada 3 semanas.

### **6.2. Plantas de tomate y desinfección de la semilla.**

Se utilizaron semillas de tomate (*Physalis ixocarpa*), las cuales fueron sometidas al siguiente método de desinfección; el método consistió primeramente en colocar las semillas en tubos eppendorf previamente estériles, las semillas fueron enjuagadas con agua bidestilada (H<sub>2</sub>ODDE) por 2 minutos y en agitación, proceso que se repitió tres veces. Posteriormente se colocó etanol al 96%, se llevó a vortex por 2 minutos para después decantar, a continuación las semillas fueron enjuagadas nuevamente con H<sub>2</sub>ODDE, para agregar el cloro comercial al 5%, y mantenerse en agitación por 8 minutos y finalmente enjuagar con agua bidestilada estéril en 6 ocasiones, las semillas se mantuvieron en vernalización por un periodo de 48 horas.

### **6.3. Determinación del efecto promotor de rizobacterias sobre el crecimiento en plántulas de tomate.**

Semillas de tomate (n=25) fueron inoculadas con cada una de las cepas bacterianas de manera individual, después de que estas fueron crecidas en caldo nutritivo hasta alcanzar crecimiento de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/ml, para la inoculación de las semillas, estas fueron previamente desinfectadas y colocadas en tubos eppendorf los cuales contenían 1ml de inóculo bacteriano, los tubos fueron colocados en agitación por un periodo de 20 minutos para permitir que las bacterias pudieran impregnarse en las semillas. Una vez inoculadas las semillas fueron colocadas en caja petri a las cuales previamente se le colocó un disco de papel filtro estéril y se humedeció con 1 ml de agua destilada estéril, posteriormente, las cajas se llevaron a la cámara de crecimiento con un ambiente controlado el cual consta de un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, una intensidad de luz de 200  $\mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$  a una temperatura de 22°C y una humedad del 80 %. Las cajas fueron colocadas en un ángulo de 65° de inclinación para favorecer el fototropismo positivo de la raíz. Se mantuvieran ahí por un periodo de 10 días para posteriormente medir los parámetros de interés correspondientes a longitud de raíz, hipocotilo y peso total de las plántulas y de esta manera determinar el efecto promotor ejercido de cada una de cepas bacterianas sobre tomate.

### **6.4. Evaluación del efecto inhibitorio de los compuestos volátiles**

Para evaluar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las cepas aisladas de tomate, sorgo y alfalfa sobre la inhibición del hongo *B. cinerea* se utilizaron cajas con compartimentos separados en los cuales de un lado fue colocado un fragmento del hongo *B.*

*cinerea* con un diámetro de 4 mm, del otro lado de la caja fueron colocados 10  $\mu$ l de inóculo bacteriano, previamente crecido en caldo nutritivo hasta alcanzar un crecimiento aproximado de  $1 \times 10^6$  CFU/ml, la interacción hongo-volátiles bacterianos se mantuvo por un periodo de 6 días, posterior a este tiempo se midió el crecimiento del micelio del hongo y se comparó con el tratamiento control en el que únicamente se creció al hongo *B. cinerea* sin interacción con bacterias, para de esta manera determinar el grado de inhibición ejercido.

#### **6.5. Análisis del perfil de compuestos volátiles de las bacterias aisladas de tomate.**

Para analizar los VOC's emitidos por las cepas aisladas de tomate, estas fueron crecidas por un periodo de tres días en cajas petri con medio agar nutritivo, para ello a cada caja se agregaron 30 ml de medio, una vez solidificado se estriaron 100  $\mu$ l de inóculo bacteriano, previamente crecido en caldo nutritivo con un crecimiento aproximado de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, las bacterias fueron crecidas a 30°C por un periodo de 3 días.

El análisis de VOCs se realizó mediante la técnica de Microextracción en Fase Solida SPME y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG-EM. En este estudio se empleó una fibra azul (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), la cual se activó por 30 minutos en el puerto de inyección del CG. Una vez activada la fibra se expuso por 1h en la muestra y posteriormente, los compuestos fueron desorbidos en el puerto de inyección del GC a 180 °C por 30 segundos.

Se realizaron 4 réplicas. Las condiciones de análisis en el cromatógrafo fueron las siguientes: Se empleó un GC Agilent 6850 serie II acoplado a un detector de MS Agilent modelo 5973. La presión durante los análisis cromatográficos fue de 7 Pa, con un voltaje de

70 eV, y se utilizó una columna HP-FFAP (30 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m) con un flujo de He de 1mL/min. Las condiciones de separación fueron:

Injector	Detector	Horno
180 °C	250 °C	$T_i: 40 \text{ } ^\circ\text{C}$ , $t_1: 5 \text{ min}$ , $R_1: 3 \text{ } ^\circ\text{C/min}$ , $T_f: 180 \text{ } ^\circ\text{C}$ , $t_2: 5 \text{ min}$ .
Splitless		

Los compuestos fueron identificados comparando los patrones de fragmentaciones de los espectros de masa con la base de datos NIST/EPA/NIH 2002. De esta manera se determinó el pool de volátiles emitidos por las cepas aisladas de tomate.

#### **6.6. Determinación del efecto inhibitorio del volátil dimetil disulfuro (DMDS) sobre el micelio de *B. cinerea*.**

Para evaluar el efecto ejercido por el compuesto volátil DMDS sobre la inhibición del hongo *B. cinerea*, se probó su actividad de manera directa sobre el medio y como volátil, para ello primero se adquirió el compuesto DMDS de manera comercial en cual se diluyó en etanol hasta obtener una concentración 1M de la cual se realizaron las diluciones que posteriormente fueron utilizadas, para analizar el efecto ejercido por el compuesto de manera directa, se prepararon cajas con medio Agar Papa Dextrosa a las cuales después de enfriar y antes de solidificar se adicionaron 100  $\mu$ l del compuesto DMDS a las concentraciones 0.3, 3.3, 33.3, 333.3 y 3333.3  $\mu$ M, posteriormente en el centro se colocó un fragmento del hongo *B. cinerea* de 4mm de diámetro, el crecimiento del hongo permaneció por un periodo de 6 días, después de este lapso se midió el micelio del hongo el cual se comparó con el tratamiento control en el cual únicamente se creció a *B. cinerea* sin

compuesto, y de esta manera determinar el grado de inhibición causado, para analizar el efecto de inhibición a través de la actividad de volátil de DMDS se realizaron ensayos en cajas con compartimentos separados, 100  $\mu$ l del compuesto DMDS fueron colocados de un lado de la caja, esto a las concentraciones 0.6, 6.6, 66.6, 666.6 y 6666.6  $\mu$ M, simultáneamente fue colocado del otro lado de la caja petri un fragmento del hongo *B. cinerea* con un diámetro de 4 mm fue inoculado, las cajas fueron incubadas en oscuridad a 30°C, y el crecimiento del diámetro del micelio fue medido al día 6, se comparó con el tratamiento control y se determinó el grado de inhibición ejercido.

### **6.7. Análisis estadístico**

La validación de los resultados, se realizó con un diseño totalmente al azar. Mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y una comparación de medias por la prueba de Duncan con un alfa de 0.05. Todos los análisis estadísticos fueron hechos utilizando el software Statistica 8.0.

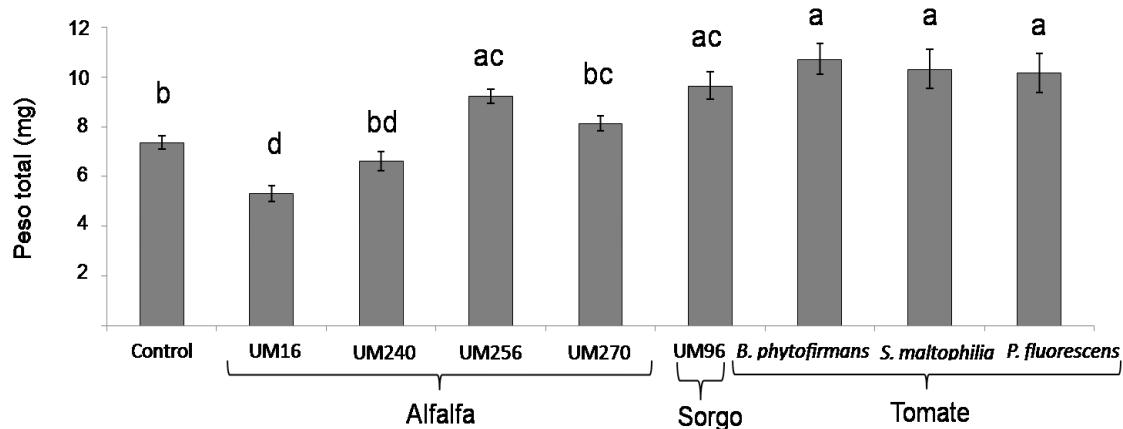
## 7. Resultados

### 7.1. Efecto de promoción ejercido en plántulas de tomate por bacterias aisladas de sorgo, alfalfa y tomate.

En este trabajo analizamos cepas aisladas de distintos cultivos agrícolas, tales como rizósfera de sorgo, alfalfa y tejidos internos de plantas tomate (endófitas), y analizamos el efecto promotor ejercido en plántulas de tomate. Se emplearon también cepas de *Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270, las cuales se cuenta con el antecedente de su capacidad para promover el crecimiento en plántulas de *Medicago truncatula*. Otra cepa que se analizó fue *Bacillus thuringiensis* UM96, aislada de sorgo y las bacterias endófitas aisladas de tomate *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia phytofirmans* y *P. fluorescens*.

En la Figura 7 se muestra el efecto de promoción ejercido por las rizobacterias aisladas de diferentes cultivos agrícolas sobre el peso total de las plántulas de tomate. De forma general se puede observar que existe un efecto promotor diferencial por las cepas analizadas. Es claro que se detectó un mayor efecto promotor entre la interacción de cepas endófitas aisladas de tomate, tales como *S. maltophilia*, *P. fluorescens* y *B. phytofirmans* logrando un incremento significativo del peso total por encima del promedio de peso presentado para el tratamiento control. Otro dato interesante lo podemos observar con respecto a *B. thuringiensis*, la cual fue aislada de sorgo y existen pocos datos sobre esta especie y su efecto promotor del crecimiento vegetal, ya que fue capaz de incrementar el peso total de las plántulas de manera significativa con respecto al control. Las cepas UM16, UM240 y

UM270 no lograron promover el crecimiento de las plántulas de tomate a excepción de UM256 que fue capaz de incrementar el peso total

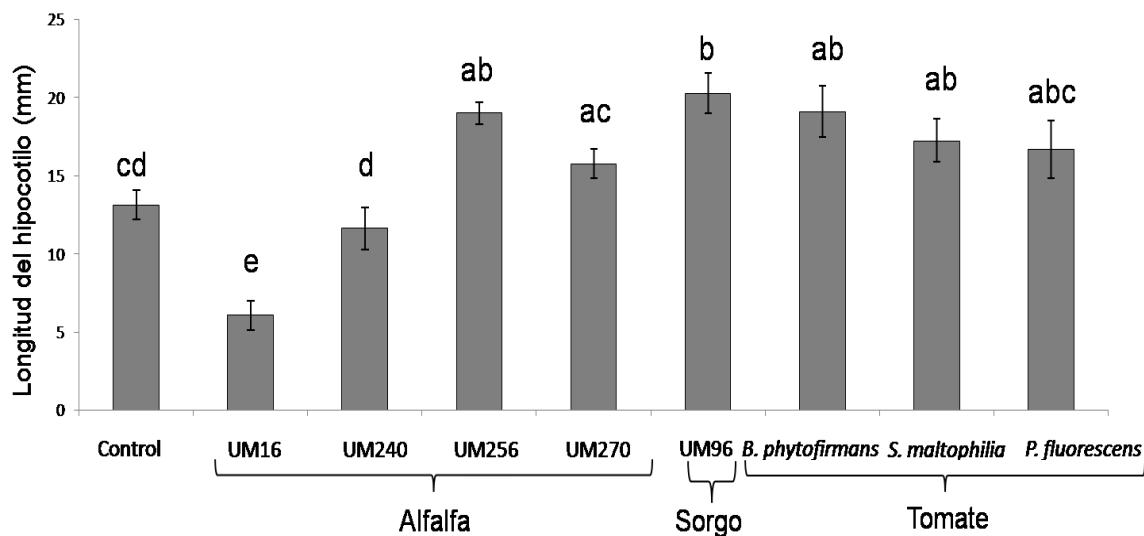


**Figura 7. Efecto de promoción de peso total en plántulas de tomate por rizobacterias.**

Inoculación de semillas de tomate con bacterias aisladas de diversos cultivos, el peso total de las plántulas se analizó 12 días después de la inoculación con las bacterias. Media  $\pm$  ES.

Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p < 0.05$ )  $n=25$ .

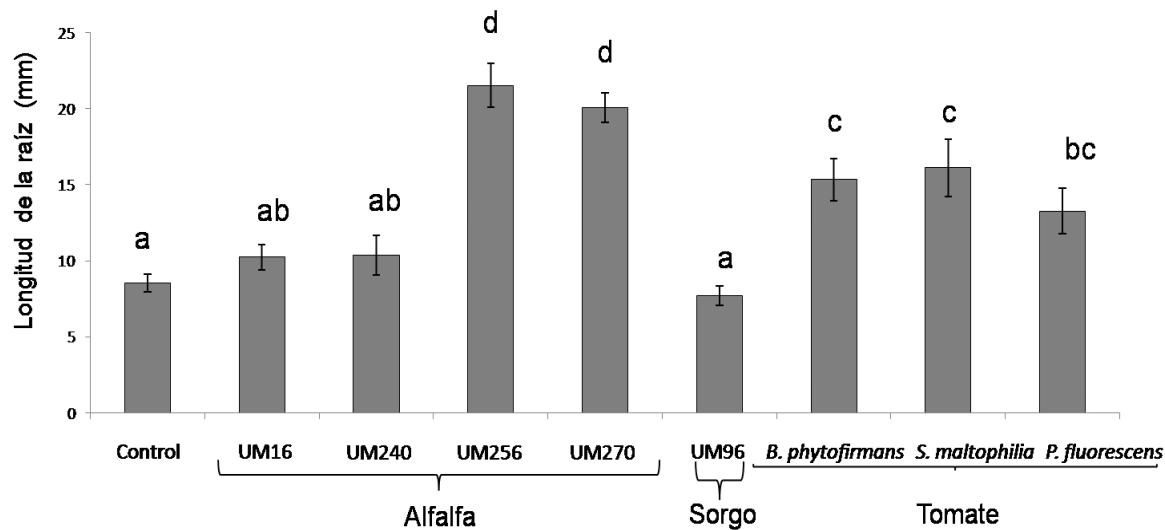
El efecto de promoción de la longitud del hipocotilo mostró algunas diferencias respecto al resultado anterior. La cepa de *P. fluorescens* UM256 fue capaz de incrementar la longitud del hipocotilo de manera significativa con respecto al tratamiento control, no así con las cepas de *P. fluorescens* UM16, UM240 y UM270. La cepa aislada de sorgo *B. thuringiensis* UM96 mantuvo esta capacidad a promover la longitud del hipocotilo de manera significativa. Con respecto al efecto ejercido por las cepas aisladas de tomate *B. phytofirmans* y *S. maltophilia* lograron incrementar la longitud del hipocotilo de manera significativa (Figura 8).



**Figura 8. Efecto de promoción en la longitud del hipocotilo en plántulas de tomate por rizobacterias.** Inoculación de semillas de tomate con bacterias aisladas de diversos cultivos, la longitud del hipocotilo de las plántulas se analizó 12 días después de la inoculación con las bacterias. Media ± ES. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p<0.05$ )  $n=25$ .

Finalmente el efecto de promoción ejercido sobre la longitud de la raíz se representa en la Figura 9. Durante este análisis se muestra que la cepa *P. fluorescens* UM256 mantuvo esta capacidad de promover la longitud de la raíz de manera significativa, mostrándose así que de las cepas aisladas de este cultivo UM256 fue la mejor en cuanto a los efectos de promoción ejercidos, para este parámetro de longitud radicular también se resalta el efecto mostrado por la cepa de *P. fluorescens* UM270 la cual también mantuvo la capacidad a promover una mayor longitud en la raíz y en conjunto con UM256 fueron quienes mostraron los mejores resultados de todas las cepas aisladas para este parámetro en particular. En el caso de *B. thuringiensis* UM96 no logró incrementar la longitud de la raíz,

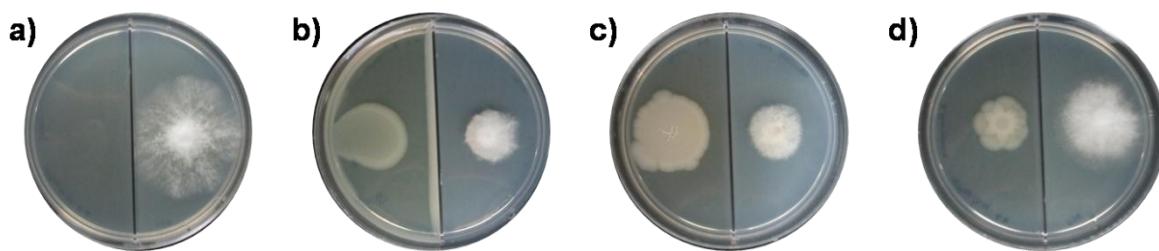
y para el caso de las cepas aisladas de tomate las tres *S. maltophilia*, *B. phytofirmans* y *P. fluorescens* lograron un incremento de la longitud radicular de manera significativa con respecto al control. Con estos resultados de promoción podemos sugerir que las bacterias que son aisladas de distintos cultivos presentan mejores capacidades cuando son aplicados en el cultivo del cual fueron aisladas, esto cuando se comparan los diferentes parámetros con respecto a las rizobacterias provenientes de un cultivo distinto. De forma general las cepas de tomate mostraron un mejor comportamiento en los parámetros analizados.



**Figura 9. Efecto de promoción de longitud de la raíz en plántulas de tomate por rizobacterias.** Inoculación de semillas de tomate con bacterias aisladas de diversos cultivos, la longitud de la raíz de las plántulas se analizó 12 días después de la inoculación con las bacterias. Media  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p<0.05$ )  $n=25$ .

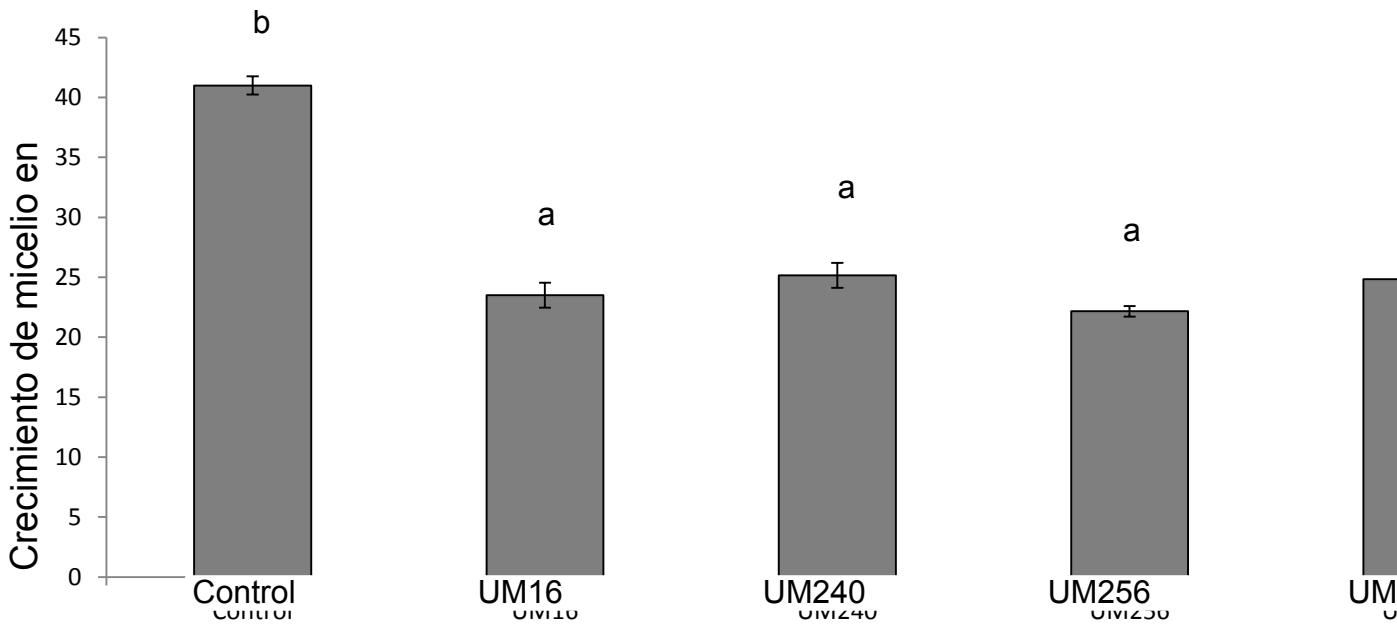
## 7.2. Evaluación de los VOC's emitidos por las cepas aisladas de sorgo, alfalfa y tomate sobre la inhibición del hongo *B. cinerea*.

Para conocer el efecto de compuestos volátiles se empleó el método de cajas Petri divididas, donde no existe contacto físico entre el hongo y el inóculo bacteriano. La Figura 10 muestra el efecto inhibidor de los VOC's emitidos por las distintas bacterias analizadas.



**Figura 10. Las rizobacterias inhiben el crecimiento del hongo *B. cinerea*.** Imágenes representativas se muestran en diferentes paneles (a-d). (a) Control crecimiento del hongo sin inóculo bacteriano. (b) Caja co-inoculada con *P. fluorescens* UM16 aislada de alfalfa, (c) *S. maltophilia* aislada de tomate y (d) *B. thuringiensis* aislada de sorgo.

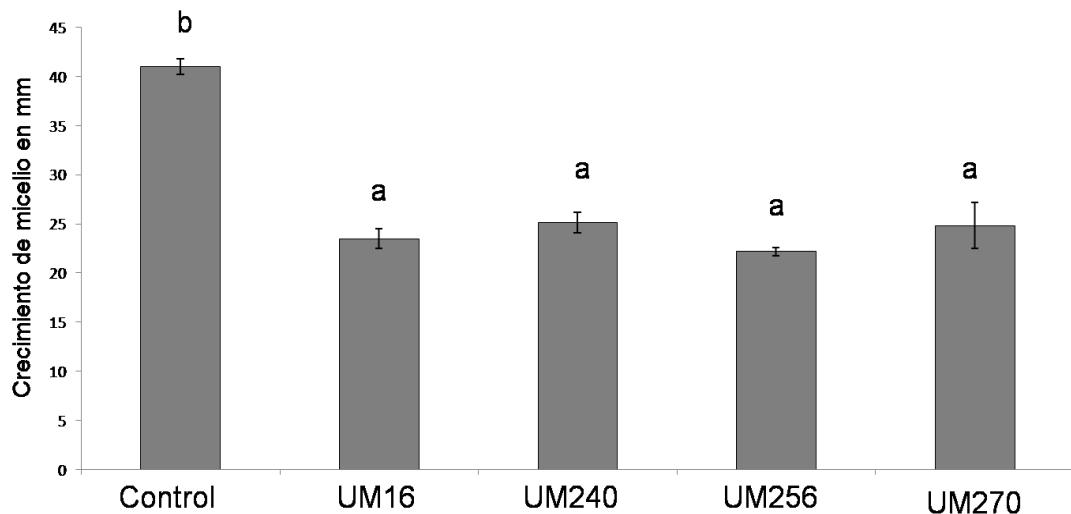
En la Figura 11 se muestra el efecto de inhibición ejercido por las cepas de *Pseudomonas* aisladas de alfalfa sobre la inhibición del hongo *B. cinerea*. Podemos observar en la gráfica que las cuatro cepas de *P. fluorescens* lograron inhibir el crecimiento del hongo de manera significativa con respecto al control, lográndose notar porcentajes de inhibición que se encuentran alrededor de un 40% del crecimiento del micelio.



**Figura 11. Efecto inhibitorio de las rizobacterias sobre el hongo *B. cinerea*.** Co-inoculación del hongo *B. cinerea* y 100  $\mu$ l de inóculo (D.O. 0.1) de *P. fluorescens* aisladas de alfalfa, en cajas con compartimentos separados para analizar el grado de inhibición ejercido por los VOC's sobre el micelio del hongo. Media  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p<0.05$ )  $n=3$ .

Para corroborar o descartar que la cantidad de inóculo se relacione directamente con el grado de inhibición ejercido por los volátiles emitidos por las bacterias, en la Figura 12 se evaluó el efecto ejercido por las bacterias aisladas de alfalfa, pero esta vez colocando 10  $\mu$ l del mismo inóculo bacteriano (D.O. 0.1). Lo que podemos ver es que las cuatro cepas de *P. fluorescens* lograron inhibir el crecimiento del hongo en porcentajes similares a los causados cuando se colocaron 100  $\mu$ l de inóculo bacteriano que se observa en la imagen anterior, con porcentajes que se encuentran cercanos al 40% de inhibición, descartándose así el hecho de que la cantidad de inóculo tiene una relación positiva con la inhibición del

hongo al menos para estas dos concentraciones analizadas, por lo que no descartamos que otras cantidades puedan arrojar resultados diferentes.

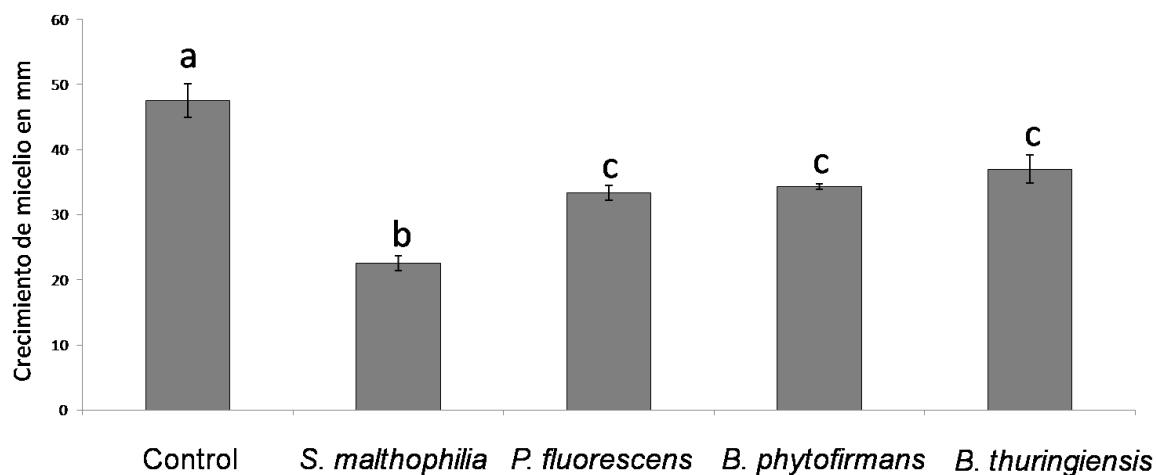


**Figura12. Efecto antagónico de las cepas aislada de alfalfa sobre el hongo *B. cinerea*.**

Co-inoculación del hongo *B. cinerea* y 10  $\mu$ l de inóculo de *P. fluorescens* aisladas de alfalfa, en cajas con compartimentos separados para analizar el grado de inhibición ejercido por los VOC's sobre el micelio del hongo. Media  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p<0.05$ )  $n=3$ .

Finalmente debido a que no se observaron diferencias al inocular 10 o 100 $\mu$ l en la inhibición sobre *B. cinerea* para el caso de las bacterias aisladas de alfalfa, decidimos evaluar el efecto de inhibición causado por las cepas de sorgo y tomate únicamente utilizando la cantidad de 10  $\mu$ l de inóculo, lo que podemos observar en la Figura 13, es que las cepas aisladas de tomate y sorgo lograron inhibir el crecimiento de *B. cinerea* de manera

significativa con respecto al tratamiento control, alcanzándose porcentaje de inhibición similares a los ejercidos por las cepas aisladas de alfalfa, el mayor efecto inhibitorio ejercido fue el causado por la cepa *S. maltophilia* aislada de tomate obteniendo un porcentaje de inhibición superior al 50%. De manera general todas las cepas mostraron capacidad de inhibir el micelio del hongo *B. cinerea* sin importar la especie de cultivo de donde fueron obtenidos.



**Figura 13. Efecto inhibitorio de las cepas aislada de sorgo y tomate sobre el hongo *B. cinerea*.** Co-inoculación del hongo *B. cinerea* y 10 $\mu$ l de inóculo, bacterias aisladas de sorgo (*B. thuringiensis*), tomate (*S. maltophilia*, *B. phytofirmans* y *P. fluorescens*), en cajas con compartimentos separados para analizar el grado de inhibición ejercido por los VOC's sobre el micelio del hongo. Media  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p<0.05$ )  $n=3$ .

### **7.3. Determinación del perfil de compuestos volátiles de las bacterias aisladas de tomate *P. fluorescens*, *S. maltophilia* y *B. phytofirmans*.**

En resultados previos observamos que las bacterias aisladas de alfalfa mostraron capacidad a inhibir al hongo *B. cinerea*, el perfil de volátiles emitidos por estas cepas ya se encontraba disponible (León *et al.*, 2014). Dentro del perfil se encontraron compuestos principalmente azufrados, de los cuales existen reportes que los relacionan con efectos fungicidas o fungistáticos. Los resultados anteriores proporcionaron evidencia de que los compuestos volátiles emitidos por las cepas aisladas de tomate inhiben el crecimiento del hongo *B. cinerea*. Debido a lo anterior, decidimos analizar el perfil de VOC's que son emitidos por dichas bacterias en cultivo axénico durante un crecimiento de 72 horas.

En total, se identificaron 37 compuestos que son producidos por las bacterias en cultivo axénico, dentro de ellos se encontraron compuestos con capacidad antifúngica y antimicrobiana como son el triclorometano el cual fue abundante en un porcentaje de área del 38% para el caso de *P. fluorescens* presentó el mayor porcentaje de área para los compuestos emitidos por esta cepa, isobutil isotiocianato el cual obtuvo porcentajes del 10.47% para *P. fluorescens* y 25.86% para *S. Maltophilia*, present el mayor porcentaje de área para los compuestos emitidos por estas bacterias y ácido propanoico presentando porcentajes de área relativamente bajos de 0.97% para el caso de *B. phytofirmans* y 1.16% para *S. Maltophilia*. Además, se observó la presencia del compuesto 3-hidroxi-2-butanona conocida como acetoína, con porcentajes de área de 8.11% para *S. maltophilia* y 3.49% para *B. phytofirmans* así como la 2,3-buteanediol con un porcentaje de área de 2.61% producida por *B. phytofirmans* aunque es interesante observar su presencia ya que es un producto de la acetoína, y los cuales como vimos en la parte de antecedentes han sido

reportados como compuestos capaces de promover el crecimiento en plántulas de *A. thaliana* (Tabla 4).

**Tabla 5.** Compuestos volátiles de *B. phytofirmans*, *P. fluorescens* y *S. maltophilia* identificados por SPME empleando CG-EM.

Compuestos volátiles identificados por SPME			
Compuestos	<i>B. phytofirmans</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. maltophilia</i>
	Área %		
Acetona	3.8	10.71	-
2-Butanona	0.99	2.32	2.24
Alcohol isopropílico	-	0.74	-
Etil propanoato	1.45	1.14	3.17
Etil isobutirato	6.78	0.82	6.14
3-Metil-2-pantanona	-	6.86	-
Triclorometano	-	38.85	-
Etil butanoato	6.55	-	-
Etil isovalerato	5.19	-	1.95
Dimetil disulfuro	2.63	2.11	2.65
Isobutanol	4.6	-	-
3-Metil butanonitrilo	-	12.93	-
S-Metil tiobutirato	3.36	-	5.91

1-Butanol	-	-	0.93
1,3-Diazina	-	3.24	-
S-Metil-3-metilbutanetioato	7.84	-	-
Etil tiglato	5.16	1.92	4.94
Metil pirazina	1.04	1.18	-
Acetoína	3.49	-	8.11
Isobutil isotiocianato	-	10.47	25.86
Ácido acético	6.03	-	5.4
Etil-3-hidroxibutanoato	16.21	0.48	6.24
2-Metiltioetanol	2.75	2.1	2.74
Ácido propanoico	0.97	-	1.16
Ácido-2-metilpropanoico	-	-	3.72
2,3-Butanediol	2.61	-	-
Fenil oxirano	1.65	2.43	2.14
Ácido butanoico	1.11	-	1.37
Mentol	0.78	-	-
Ácido-3-metilbutanoico	4.28	-	2.32
Metil salicilato	0.75	-	0.29
Ácido-2-butenoico	-	-	6.07
Acetamida	-	1.24	0.31
Etil fenilacetato	1.44	-	-
Butil butanoato	0.33	-	-
Alcohol bencílico	1.75	0.45	1.15

De la tabla 5 podemos resaltar que fueron pocos los compuestos que lograron ser producidos por las tres cepas aisladas de tomate, estos son los compuestos 2-butanona, etil propanoato, etil isobutirato, etil tiglato, etil-3-hidroxibutanoato, 2-metiltioetanol, fenil oxirano, alcohol bencílico. Un compuesto que resultó ser interesante fue el dimetil disulfuro, el cual fue producido por las tres cepas ocupando porcentajes de área de 2.63%, 2.1% y 2.65% para *B. phytofirmans*, *P. fluorescens* y *S. maltophilia* respectivamente, compuesto que fue el segundo en ocupar los mayores porcentajes de área en el perfil de volátiles emitidos por las cepas aisladas de alfalfa y del cual existen reportes que lo relacionan como un agente capaz de inhibir la presencia de distintos hongos fitopatógenos.

#### 7.4. Inhibición del hongo *B. cinerea* por el DMDS

El DMDS es un compuesto azufroso que tiene dos átomos de azufre unidos a dos moléculas de metano por un simple enlace (Figura 14), este compuesto ha mostrado capacidad para inhibir el crecimiento de distintos hongos. Nosotros decidimos analizar el efecto de inhibición causado por este compuesto en base a tres criterios; el primero de ellos es por ser de los compuestos volátiles emitidos en ocupar el mayor porcentaje de área y ser producido por bacterias aisladas de alfalfa; el segundo se debe a que este compuesto fue de los pocos que lograron ser emitidos por las tres cepas aisladas de tomate; y el tercero de ellos es debido a que es un compuesto que se puede usar de forma pura. El efecto de inhibición del compuesto se analizó a través de dos formas: como volátil en cajas Petri divididas y difundido directamente en el medio.

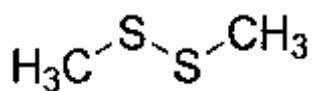
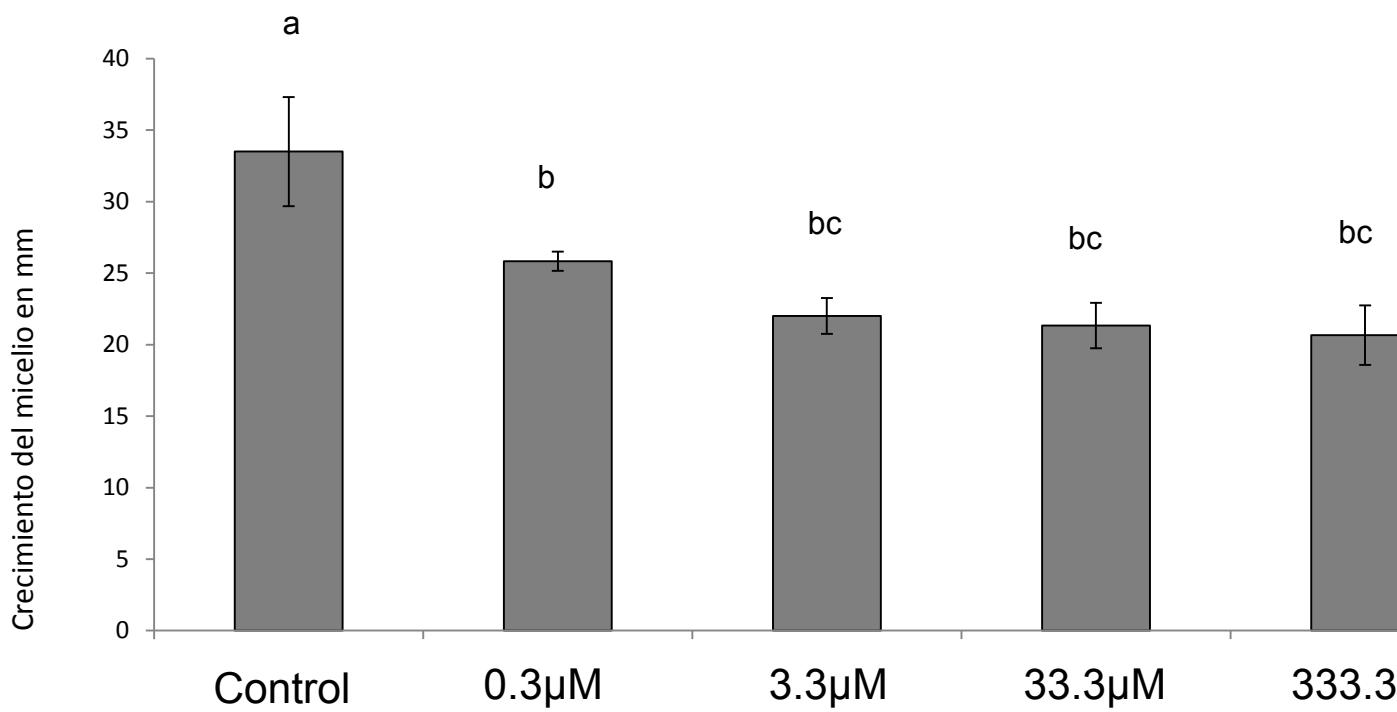


Figura 14. Estructura química del dimetil disulfuro (DMDS).

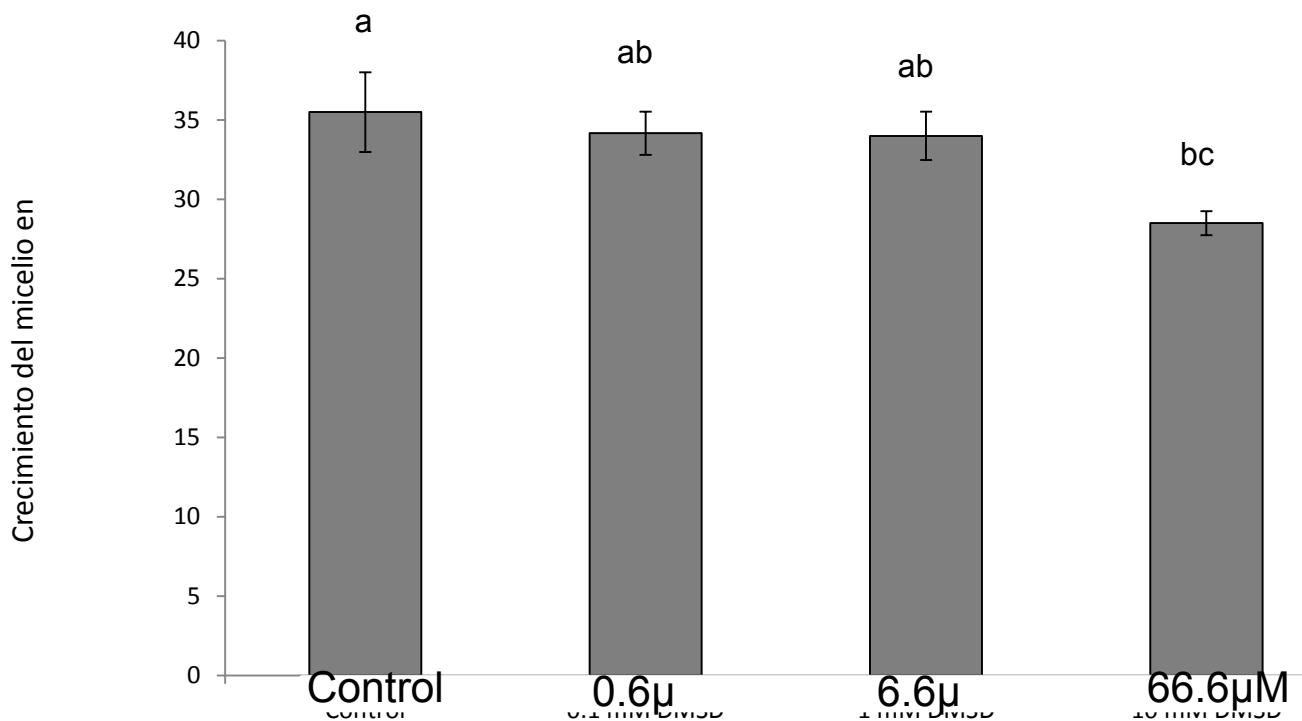
En la Figura 15 observa el efecto ejercido cuando el DMDS cuando fue colocado de manera directa sobre el medio. Se emplearon concentraciones diferentes que se fueron incrementando cada 10 veces. Se observó que a partir de 0.3  $\mu\text{M}$  el efecto de inhibición logró ser significativo con respecto al control, la inhibición se mantuvo en el resto de las concentraciones probadas. La mayor inhibición sobre *B. cinerea* con un porcentaje mayor a 50%, similar al efecto causado por los VOC's emitidos por *S. maltophilia*, esta concentración resulta demasiado alta para ser producida de manera natural por las bacterias, además el compuesto únicamente mostró un efecto fungistático debido que continuó su crecimiento después de unos días.



**Figura 15. Efecto inhibitorio del DMDS como compuesto difusible sobre *B. cinerea*.**

Co-inoculación del hongo *B. cinerea* y 100  $\mu\text{l}$  de DMDS a distintas concentraciones. Media  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p<0.05$ )  $n=3$ .

En la Figura 16 se observa el efecto de inhibición causado por el compuesto DMDS a través de su actividad como volátil, con concentraciones crecientes de 10 veces. La primera concentración usada fue 0.6  $\mu$ M. Nuevamente observamos que el compuesto DMDS fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo. Se observa que en forma volátil se requieren mayores concentraciones del compuesto DMSD para ejercer un efecto inhibitorio comparado al efecto directo como difusible en el medio, algún o algunos otros de los compuestos encontrados en el perfil de volátiles se encuentra actuando de manera individual o sinérgica para obtener el grado inhibición observado por el pool de volátiles que se observa en la Figura 13. Nuevamente DMDS actuó únicamente como fungistático impidiendo solo por un periodo de tiempo el crecimiento de *B. cinerea*.



**Figura 16. Efecto inhibitorio del DMDS como compuesto volátil sobre *B. cinerea*.** Co-inoculación del hongo *B. cinerea* y 100  $\mu$ l de DMDS a distintas concentraciones. Media  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencia significativa (Duncan  $p<0.05$ )  $n=3$ .

## 8. Discusión.

La rizósfera está compuesta de una gran cantidad de especies microbianas benéficas para las plantas: sin embargo, persiste la duda si estos efectos se ven potenciados cuando las bacterias son aplicadas en los cultivos de los cuales fueron previamente aisladas. Las plantas por su parte son organismos sésiles multicelulares, su crecimiento y desarrollo se ve influenciado por factores bióticos y abióticos. Las plantas presentan un gran número de mecanismos para asegurar su sobrevivencia, uno de estos es establecer comunicación con diferentes organismos ya sea mediante la emisión de compuestos volátiles o compuestos difusibles, en particular ha sido pobremente explorado si las condiciones y características del cultivo pueden promover la selección de microorganismos capaces de mejorar las condiciones de desarrollo para la planta. (Marasco *et al.*, 2012).

Se aislaron diversas cepas provenientes de diferentes fuentes, ya sea rizósfera o tejidos internos de la planta, las cuales fueron analizadas por su capacidad para promover el crecimiento en plántulas de tomate. En experimentos previos se observó que las cepas aisladas de alfalfa (*Medicago sativa*) mostraron capacidad de promover el crecimiento en plántulas de *M. Truncatula*, especie que está emparentada con las plantas de alfalfa por pertenecer al mismo género, por lo cual era para nosotros de suma importancia identificar si este efecto de promoción perduraba al momento de aplicarla en un cultivo totalmente distinto como es la solanácea tomate. De igual manera, era importante para nosotros hacer un análisis comparativo, así como identificar su efecto promotor con las bacterias aisladas de sorgo (*Sorghum bicolor*) y tomate (*Physalis ixocarpa*). Para los primeros parámetros analizados correspondientes a peso total (Fig. 7) y longitud del hipocotilo (Fig.8), la cepa de *P. fluorescens* UM256 fue capaz de promover el peso y la longitud del hipocotilo de las

cepas aisladas de alfalfa, que podría explicarse por una mayor capacidad de esta cepa a responder a los exudados emitidos por tomate, o a una mayor producción de la hormona giberelina, la cual es responsable del incremento del hipocotilo (Fu and Harberd, 2002). Aunque esta hipótesis requiere más estudios para determinar que hormonas están produciendo dichas bacterias. En este mismo sentido las cepas UM240 y UM270 no mostraron ningún efecto sobre las plántulas para estos dos primeros parámetros, UM16 mostró un efecto negativo, resultado que nos pareció de suma importancia debido a que esta cepa fue la que mostró la mayor capacidad a promover el crecimiento en plántulas de *M. truncatula* (León *et al.*, 2014), y mientras que en tomate ejerció un efecto negativo. Previamente analizamos la capacidad de colonización de las cepas de *Pseudomonas* para colonizar tomate siendo UM16 quien presento el menor número de unidades formadoras de colonia que fueron recuperadas, por tanto sugerimos que el número de bacterias no fue el suficiente como para mostrar un efecto positivo sobre las plántulas (Rojas y Santoyo, 2015. Resultados no publicados). Respecto a la longitud radicular las cepas aisladas de rizósfera de plantas de alfalfa, UM16 y UM270, fueron capaces de incrementar la longitud de la raíz, promoviendo fuertemente el crecimiento y modulando programas de desarrollo como es la rizogénesis. Esta capacidad puede ser debida a que esta cepa mostró la mayor capacidad de colonizar la rizósfera de tomate, estos resultados nos sugieren que a pesar que las cuatro cepas aisladas de alfalfa mostraron altos porcentajes de identidad en cuanto al gen ribosomal 16S, existen pequeñas diferencias que son las responsables de los efectos diferenciales mostrados, además de diferencias en la producción de metabolitos, compuestos difusibles y volátiles (León *et al.*, 2014). Sin embargo, existe interés en generar mutantes en cada uno de estos metabolitos y compuestos para poder asignar un papel

específico, así como poder descubrir nuevos papeles para compuestos difusibles o volátiles que aún no han sido descritos como promotores del desarrollo vegetal.

Existen diversas cepas de *Bacillus* que han mostrado capacidad a promover el crecimiento, tal es el caso, de *B. megaterium* (UMCV1) aislado de la rizósfera de maíz, que es capaz de estimular el crecimiento en plantas de frijol, la cual se puede atribuir a la producción de citocininas (Bucio *et al.*, 2007). Sin embargo, se desconoce si alguna cepa de *B. thuringiensis* haya mostrado capacidad a promover el crecimiento, por lo que fue de suma importancia para nosotros identificar que *B. thuringiensis* UM96 presentó capacidad para promover el peso total y longitud del hipocotilo en las plantas de tomate.

Las cepas endófitas aisladas de plantas de tomate (*P. ixocarpa*) *S. maltophilia*, *B. phytoformans* y *P. fluorescens*, fueron capaces de incrementar el peso total y la longitud del hipocotilo y de la raíz, reflejando que estas cepas mostraron mejores capacidades de promoción comparadas con las rizobacterias aisladas de otras fuentes rizosféricas. Lo anterior puede deberse a que fueron aplicadas o inoculadas en la especie de cultivo del cual fueron aisladas, es decir, tomate. Resultados que podrían ser explicados por una mayor adaptación, comunicación específica y/o una mejor capacidad de responder a los exudados producidos por las plántulas de tomate. Además, especies como *B. phytofirmans* ya han sido reportadas con anterioridad como bacterias capaces de promover el crecimiento, la cepa *B. phytofirmans* PsJN ha mostrado capacidad a promover el crecimiento en cultivos de papa (Frommel *et al.*, 1991) y uva (Barka *et al.*, 2000), vía reducción del nivel de la hormona inhibitoria de etileno por un alto nivel de 1-aminociclopropano-1-acido carboxílico (ACC) deaminasa, por lo que no descartamos que nuestra cepa este causando tal efecto de promoción a través de un mecanismo similar.

Diversas bacterias rizosféricas han tomado particular atención por varias décadas debido a su capacidad a proteger a las plantas en contra de fitopatógenos y en particular se ha destacado a la especie de *P. fluorescens* (Santoyo *et al.*, 2012). Se han llevado a cabo diversas búsquedas para seleccionar, aislar y caracterizar las mejores bacterias con antagonismo hacia fitopatógenos alrededor del mundo (Yanes *et al.*, 2012; Guiñazú *et al.*, 2013; Mavrodi *et al.*, 2012; Radish *et al.*, 2012). Nosotros analizamos un mecanismo directo de inhibición del hongo *B. cinerea*, a través de los volátiles emitidos por cepas aisladas de tomate, sorgo y alfalfa. Así mismo, se evaluó la capacidad de estas cepas para antagonizar al hongo, al colocar 100  $\mu$ l de inóculo bacteriano en las cajas con compartimentos separados. Se observaron porcentajes de inhibición que van de un 38% causado por *P. fluorescens* UM240, al valor más alto que fue ejercido por *P. fluorescens* UM256 con un porcentaje de 46% del crecimiento del micelio (Fig.11). Al momento de comparar estos resultados con los encontrados cuando se redujo la concentración bacteriana de 100 a 10  $\mu$ l de un inóculo de D.O. 0.1, los resultados obtenidos fueron similares, el mayor porcentaje de inhibición fue logrado por *P. fluorescens* UM16 con casi 52% y el más bajo lo presentó *P. fluorescens* UM270 logrando un porcentaje de inhibición del 35% (Fig. 12), aunque no mostraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición provocados por las cepas de *Pseudomonas* a esta concentración. El hecho de no haber encontrado diferencias entre estas dos concentraciones probadas podría ser debido a que el crecimiento mostrado por las bacterias no logró producir una cantidad distinta de volátiles o bien los volátiles producidos al momento de colocar 10  $\mu$ l de inóculo alcanzó el mayor efecto inhibitorio sobre el hongo *B. cinerea*, y posiblemente aunque la cantidad de volátiles emitidos por las bacterias hubiera sido mayor el efecto continuaría siendo el mismo. Sin embargo aún resta por analizar concentraciones distintas que nos permitan corroborar esta

teoría. No es sorprendente encontrar dichos resultados de inhibición debido a que estas cepas de *Pseudomonas* aisladas de alfalfa fueron capaces de inhibir el crecimiento de distintos hongos fitopatógenos como son *Diaporthe phaseolorum*, *Collectotrichum lindemuthianum*, *Rhizoztonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *B. cinerea*. Lo anterior debido a la síntesis de diversos metabolitos difusibles (León *et al.*, 2014).

Debido a estos resultados se optó por analizar el efecto de inhibición causado por las cepas aisladas de sorgo y tomate únicamente a la concentración de 10  $\mu$ l, *B. thuringiensis* fue quien mostró el menor porcentaje de inhibición de todas las cepas analizadas alcanzando un 22% (Fig. 13), sin embargo siguiendo con el trabajo realizado por (Absalón *et al.*, 2014), el cual es el primer reporte de inhibición del hongo *B. cinerea* por la cepa de *B. thuringiensis* a través de compuestos difusibles, ahora nosotros observamos también una grado de inhibición causado por los volátiles emitidos por esta cepa, por lo que este resultado corrobora la capacidad de esta cepa de actuar como antagonista en contra de este hongo fitopatógeno. Las cepas aisladas de tomate de igual manera mostraron capacidad de inhibir al hongo *B. cinerea*, *B. phytofirmans* alcanzó un porcentaje de inhibición de 27.7% a través de pool de volátiles emitidos, esta especie de manera particular *B. phytofirmans* PsJN ha sido reportada con anterioridad como responsable de disminuir el crecimiento de *B. cinerea* bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*, protegiendo a viñedos en contra de la enfermedad de moho gris (Barka *et al.*, 2002). Por su parte *P. fluorescens* logró inhibir al hongo en un 30 %. Esta especie en particular es una de las más comunes y abundantes habitantes de la rizósfera que tienen capacidad de inhibir o suprimir enfermedades en plantas a través de un largo arsenal de metabolitos antifúngicos (Haas and Défago, 2005) y promover su crecimiento, la emisión de compuestos orgánicos volátiles fueron capaces de promover el

crecimiento en plántulas de *A. thaliana* y *M. truncatula* (Farag *et al.*, 2006; Mosqueda *et al.*, 2013). Por último, *S. maltophilia* fue que mostró el mayor porcentaje de inhibición de las bacterias analizadas ejerció un porcentaje de inhibición de 53%. Especies como *S. maltophilia* R551-3 han presentado esta capacidad de biocontrol dentro de estos mecanismos se incluye la producción de antibióticos, actividades de enzimas extracelulares como proteasas y quitinasas (Ryan *et al.*, 2009).

En base a los resultados de inhibición observados es que decidimos obtener el perfil de VOC's emitidos por las cepas aisladas de tomate, y debido a que ya contábamos con la tabla de volátiles emitidos por las cepas aisladas de alfalfa, fue que podíamos inferir que tipo de compuestos estarían siendo los responsables de los efectos mostrados. Un primer antecedente de inhibición a través de compuestos volátiles, fue el reportado por McCain (1966), en el cual los volátiles emitidos por *S. griseus* redujeron la esporulación del hongo *G. gridum* e indujeron la formación de esclerocios en *S. cepivorum* y *R. solani*.

El resultado de inhibición de *B. cinerea* por la exposición a los volátiles producidos por cepas de *Pseudomonas* aisladas de alfalfa, se sugiere que fueron causados por los compuestos azufrosos principalmente, incluyendo DMDS. El DMSD ha sido previamente asociado con actividades antifúngicas y de protección hacia la planta (Huang *et al.*, 2012) Interesantemente la cepa UM270 fue la única capaz en producir el compuesto Dimetilhexadecilamina (DMHDA), el cual ha sido asociado con actividades de promoción de crecimiento y antifúngicas (Becerra *et al.*, 2013).

Del perfil de compuestos volátiles emitidos por las cepas aisladas de tomate (Tabla 5), podemos destacar la presencia del compuesto azufroso Isobutil isotiocianato que logró

ocupar grandes porcentajes de área para los volátiles emitidos por las cepas *P. fluorescens* y *S. maltophilia*, y junto con el compuesto DMDS fueron de los más abundantes, por lo que no sugiere que pueden ser los principales responsables de los efectos de inhibición mostrados. En el caso de los resultados ejercidos por *B. phytofirmans* a excepción de que también produjo el compuesto DMDS desconocemos que otro tipo de compuesto podría estar participando en tal efecto inhibitorio.

El primer estudio donde se planteó la posibilidad de que los VOCs emitidos por las PGPR participan en la promoción del crecimiento vegetal fueron realizados por Ryu *et al.* (2003), donde demostraron que la rizobacteria *B. subtilis* GB03 emite dos compuestos, acetoína y 2,3-butanediol, los cuales tuvieron efectos promotores en el crecimiento de la biomasa aérea de plantas de *A. thaliana*. Estos mismos compuestos ampliamente descritos fueron emitidos por la cepa *B. phytofirmans* y podían estar relacionados directamente en el efecto de promoción ejercido sobre las plántulas de tomate, mientras que *S. maltophilia* logró producir únicamente el compuesto acetoína que de igual manera podría ser en parte responsable del crecimiento en plántulas de tomate. Fue interesante observar que el compuesto volátil DMDS, fue producido por las bacterias aisladas de tomate, lo que sugiere que es uno de los principales volátiles responsables de la inhibición del crecimiento del micelio. El mecanismo preciso por el cual los volátiles azufrosos inhiben el crecimiento del hongo *B. cinerea* es actualmente desconocido, pues hasta hace poco tiempo se reportó como inhibidor de hongos. En los ensayos de inhibición, encontramos que al momento de analizar su actividad de forma directa al medio, se presentaron porcentajes de inhibición que van 22.8% para la concentración más baja utilizada a 45.7% a la concentración más alta (Fig.15), sin embargo el compuesto DMDS no pudo ser el único responsable en lograr

el efecto de inhibición observado, comparado al porcentaje de inhibición causado por el total de volátiles producido por las especies, debido que las bacterias producen de manera natural de 0.5 a 2.5  $\mu\text{M}$  de DMDS por ml de cultivo (Huang *et al.*, 2012), y a esa concentración el porcentaje de inhibición mostrado fue de 34%, además debemos considerar que de manera natural el compuesto actúa solo como volátil y no puede ser aplicado de manera directa a los organismos fitopatógenos. Por lo anterior no descartamos que algunos otros volátiles se encuentren actuando de manera individual o sinérgica para producir un mayor porcentaje de inhibición, ya que al momento de evaluar la actividad como volátil del DMDS, los porcentajes de inhibición fueron menores, los cuales son de un 4% para la concentración más baja a 40% para la concentración más alta analizada (Fig.16), y a la concentración de 6.6 $\mu\text{m}$  que es la más cercana a las concentraciones producidas de manera natural por las bacterias el porcentaje de inhibición alcanzó apenas un 5 %, por tanto aún resta por indagar la participación de alguno(s) compuestos que están participando en la inhibición observada por el total de volátiles emitidos por las diferentes cepas.

## 9. Resumen de resultados

- Se observaron diferencias significativas entre los efectos promotores de bacterias aisladas de tomate, alfalfa y sorgo sobre el crecimiento en plántulas de *P. ixocarpa*.
- Los compuestos volátiles de *P. fluorescens* UM16, UM240, UM256, UM270, *B. thuringiensis*, así como *S. matophilia*, *B. phytofirmans*, *P. fluorescences* lograron disminuir de forma significativa el crecimiento micelial de *B. cinerea*.
- El perfil cromatográfico de las bacterias aisladas de tomate arrojó una mayor cantidad de compuestos que los presentados por las bacterias aisladas de alfalfa, destacándose la presencia de 3-Hidroxi-2-butanona, dimetil disulfuro y 2,3-butanediol.
- El DMDS inhibió de forma significativa el crecimiento del micelio de *B. cinerea* actuando como compuesto difusible en el medio.
- Se observó también un efecto inhibitorio del crecimiento del micelio de *B. cinerea* por parte del DMDS actuando como volátil.

## **10. Conclusión.**

Las bacterias aisladas de tomate ejercieron una mayor capacidad de promoción, con respecto a las bacterias aisladas de sorgo y alfalfa por ser aplicadas en el modelo biológico del cual fueron obtenidas; además de que sin importar la fuente de aislamiento todas las bacterias lograron inhibir de forma significativa el crecimiento del hongo *B. cinerea* a través de compuestos orgánicos volátiles.

## 11. Perspectivas.

- Se pretende realizar ensayos de promoción con las diversas cepas de alfalfa, sorgo y tomate pero con la especie de cultivo del cual fueron respectivamente aisladas, para de esta manera corroborar la especificidad de la interacción planta-bacteria.
- Analizar el grado de inhibición de los compuestos volátiles emitidos por las bacterias aisladas de tomate, sorgo y alfalfa sobre otros hongos fitopatógenos a diferentes concentraciones bacterianas.
- Del perfil de compuestos volátiles obtenidos para las cepas de alfalfa y tomate analizar el efecto de inhibición sobre *B. cinerea* ejercido por los volátiles que ocuparon los mayores porcentajes de área como fueron 1-undecanol para el caso de los VOC's emitidos por las cepas aisladas de alfalfa e Isobutil isotiocianato para los VOC's emitidos por las cepas aisladas de tomate.

## 12. BIBLIOGRÁFIA

- Absalón, S. Rojas, D. Hernández, R. Prieto, C. Orozco, M. Peña, J. Sakuda, S. Valencia, E. and Santoyo, G.** (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 24:12, 1349-1362.
- Ahmad, F., Uddin, S., Ahmad, N., Islam, R.** (2013). Phosphorus–microbes interaction on growth: yield and phosphorus-use efficiency of irrigated cotton. *Arch. Acker.* 59, 341–351.
- Akhtar, M. Sengupt, D. and Chowdhury, A.** (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc. Toxicol.* 2 (1):1-12.
- Audenaert, K. Pattery, T. Cornelis, P. and Höfte, M.** (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:1147-1156.
- Banchio, E. Xie, X. Zhang, H. and Paré, P.** (2009). Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 653-657.
- Barka, E. Belarbi, A. Hachet, C. Nowak, J and Audran, C.** (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* L. co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 186:91–95.
- Barka, E. Belarbi, A. Hachet, C. Nowak, J and Audran, C.** (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol. Control* 24:135–142.
- Becerra, C. Rodríguez, L. Bucio, J. Cortez, I. Santoyo, G. Soberano, C. Cantero, E.** (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma*. 250, 1251–1262.
- Beever, R. and Weeds, P.** (2004) Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Pp. 29 – 52.

**Bhattacharyya, P. and Jhan, D.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.

**Bonkowski, M. Cheng, W. Griffiths, B. Alphei, J. and Scheu, S.** (2000). Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *Eur. J. Soil. Biol.* 36: 135-147.

**Bucio, J. Campos, J. Hernández, E. Velásquez, C. Fariás, R. Rodríguez, L. and Valencia, E.** (2007). *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *The American Phytopathological Society* 20 (2): 207-217.

**Dean, R. Kan, J. Pretorius, A. Hammond, E. Di Pietro, A. Spanu, P. Rudd, J. Dickman, M. Kahmann, R. Ellis, J. and Foster, G.** (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 414-430.

**Droby, A. and Lichter, A.** (2004). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development | 84 and management. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Pp. 349–367.

**Farag, M. Ryu, C. Sumner, L. and Paré, P.** (2006). GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry* 67, 2262–2268

**Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. and Barea, J.** (2010). Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Appl. Soil Ecol.* 45, 209–217.

**Fritsch, J.** (2005). Dimethyl disulfide as a new chemical potential alternative to methyl bromide in soil disinfestation in France. *ActaHort* 698:71–76

**Frommel, M. Nowak, J. and Lazarovits, G.** (1991). Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928–936.

**Fu, X. and Harberd, N.** (1995). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellins response. *Nature*. 421, 720-743.

**Glick, B. R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.

**Glick B. R.** (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*. 2012: 1-15.

**Grayston, S. Wang, S. Campbell, C. and Edwards, A.** (1998). Selective 86 influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30 (3): 369-378.

**Guiñazú, L. Andrés, J. Rovera, M. Balzarini, M. and Rosas, S.** (2013). Evaluation of rhizobacterial isolates from Argentina, Uruguay and Chile for plant growth-promoting characteristics and antagonistic activity towards *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina* sp. in vitro. *Eur. J. Soil Biol.* 54, 69–77.

**Haas, D. and Défago, G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Revi. Microbiol.* 3(4), 307-319.

**Hayes, T. Randle, P. and Last, F.** (1969). The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Ann Appl Biol* 64:177–187.

**Huang, C. Tsay, J. Chang, S. Yang, H. Wu, W. and Chen, C** (2012). Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Manag Sci*; 68: 1306–1310.

**Hirsch, P. and Mauchline, T.** (2012). Who's who in the plant root microbiome? *Nat. Biotechnol.* 30 961–962.

**Illmer, P. and Schinner, F.** (1992). Solubilization of inorganic phosphates by micro-organisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24, 389–395.

**Kai, M. Haustein, M. Molina, F. Petri, A. Scholz, B. and Piechulla, B.** (2009). Bacterial volatile and their action potential. *Microbiol Biotechnol*.81:1001-1002.

**Kennedy, J. Choudhury, A. and Kecskes, M.** (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop- farming systems: can their potential for plant growth promoting be better exploited? *Soild Biology and Biochemistry* 336:1229-1244.

**Kloepper, J. and Schroth, M.** (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. pp. 879-882. In: Proceddings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. *Station of Pathologic Vegetal et Phytobacteriologic*. Vol. 2.

**León, R. Rojas, D. Contreras, M. Orozco, C. Macías, L. Valencia, E. and Santoyo G.** (2014). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control* 81 (2015) 83–92.

**Long, H. Schmidt, D. Baldwin, I.** (2008) Native Bacterial Endophytes Promote Host Growth in a Species-Specific Manner; Phytohormone Manipulations Do Not Result in Common Growth Responses. *PLoS ONE* 3(7): e2702. doi:10.1371.

**Lucy, M. Reed, E. and Glick, B.** (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86 (1): 1–25.

**Madigan, M. Martinko, J. and Parker, J.** (1999). Bock. Biología de los microorganismos. 8a Edición revisada. Prentice Hall. Madrid, España.

**Marasco, R. Rolli, E. Ettoumi, B. Vigani, G. and Mapelli, F.** (2012). A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS ONE* 7(10): e48479. doi:10.1371.

**Mavrodi, O. Walter, N. Elateek, S. Taylor, C. and Okubara, P.** (2012). Suppression of Rhizoctonia and Pythium root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biol. Control* 62, 93–102.

**McCain, A.** (1966) A volatile antibiotic by *Streptomyces griseus*. *Phytopathology* 56:150

**McCully, M.** (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 983–990.

**Meldau, D. Meldau, S. Hoang, L. Underberg, S. Wunsche, H. and Baldwin, I.** (2013). Dimethyl Disulfide Produced by the Naturally Associated Bacterium *Bacillus* sp B55 Promotes *Nicotiana* attenuate Growth by Enhancing Sulfur Nutrition. *The Plant Cell* 10.1002/ps.3301.

**Méndez, R. Kruit, M. Bruijin, I. Dekkers, E. Voort, M. Scneider, J. Piceno, Y. DeSantis, T. Andersen, G. Bakker, P. and Raaijmakers J.** (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332, 1097–1100.

**Mulvaney, R. Khan, S. and Ellsworth, T.** (2009). Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. *J. Environ. Qual.* 38: 2295–2314.

**Mosqueda, C. Becerra, C. Rodríguez, I. Santoyo, G. Cortez, I. Cuevas, R. and Cantero, E.** (2013a). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* 362, 51–66.

**Mosqueda, C. Rodríguez, L. Santoyo, G. Rodríguez, R. and Cantero, E.** (2013). *Medicago truncatula* increases its iron uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol.* 58: 579–585.

**Nair, J. Narasimman, G. and Sekar V.** (2004). Cloning and partial characterization of zwittermicin A resistance gene cluster from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1. *J. Appl. Microbiol.* 97: 495–503.

**Roesti, D. Gaur, R. Johri, B. Imfeld, G. Sharma, S. Kawaljeet, K. and Aragno, M.** (2006). Plant growth stage: fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1111–1120.

**Ryan, R. Ryan, D. Sun, Y. Li, F. Wang, Y. and Dowling, D.** (2007) An acquired efflux system is responsible for copper resistance in *Xanthomonas* strain IG-8 isolated from China. *FEMS Microbiol Lett* 268: 40–46.

**Ryan, R. Monchy, S. Cardinale, M. Taghavi, S. Crossman, L, Avison, B. Berg, G. Leslie, D. and Dow, M.** (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7, 514-525.

**Ryu, C. Farag, M. Hu, H. Reddy, M. Wei, H. Paré, P. Kloepper, J.** (2003). Bacterial volatile promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS*. 100: 4927-4932.

**Sánchez Castro, Miguel A.** (2004). Manejo de enfermedades del tomate, curso de INCAPA “Manejo integrado de plagas y Enfemedades en Tomate, Chile y Papa”, Universidad de Chile.

**Santoyo, G. Mosqueda, C. and Govindappa, M.** (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22, 855–872.

**Santoyo, G. Cantero, E. Mosqueda, C. Cabriales, J. and Rodriguez, R.** (2010). Papel de los sideroforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra*. 28: 53-60.

**Shao, T. Bai, L. Zhang, J. Wang, G. Liu, D. Li, Z. Liu, J. Song, F. and Huang, D.** (2008). A nonribosomal peptide synthetase gene *tzw1* is involved in zwittermicin A biosynthesis in *Bacillus thuringiensis* G03. *Curr. Microbiol.* 57 (1): 61–65.

**Stabb, E. Jacobson, L. and Handelsman, J.** (1994) Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4404–4412.

**Shu, L. Lethbridge, B. Raffel, S. He, H. Clardy, J. and Handelsman, J.** (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ. Microbiol.* 60: 2023–2030. 100.

**Shu, L. Stabb, E. Raffel, S. and Handelsman, J.** (1998). Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* 37: 6–11.

**Whipps, J.** (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487–511.

**Yanes, M. Fuente, L. Altier, N. and Arias, A.** (2012). Characterization of native fluorescent *Pseudomonas* isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems. *Biol. Control* 63, 287–295.

**Yang, J. Kloepffer, J. and Ryu, C.** (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends. Plant Sci.* 14: 1-4.

**Zou, C. Mo, M. Gu, Y. Zhou, J. Zhang, K.** (2007) Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biol Biochem* 39:2371–2379.