



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DE LOS CAMBIOS FISIOLÓGICOS EN FRESA  
(*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) DURANTE LA  
INTERACCIÓN CON *Bacillus* sp. M4-96 Y SU RELACIÓN  
CON LA INFECCIÓN POR *Botrytis cinerea***

TESIS QUE PRESENTA:  
**ALONDRA VICENTE HERNÁNDEZ**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

DIRECTOR DE TESIS:  
**D.C. LOURDES IVETH MACÍAS RODRÍGUEZ**

CO-DIRECTOR DE TESIS:  
**D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE DE 2016

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de **Bioquímica Ecológica** y **Biotecnología Vegetal** del **Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, bajo la dirección de la **D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez** y la co-dirección del **D.C. Rafael Salgado Garciglia**.

Esta investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **Proyecto con clave CB-2011-01-165738** y el Consejo de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, **Proyecto 2.24**.

Se reconoce a **CONACYT** por la beca otorgada (Registro de becario 332840) para la realización de los estudios de maestría.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá y mejor amiga **María Yolanda Hernández López** quien siempre me ha ayudado y ha estado a lo largo de todas las decisiones que juntas hemos tomado, siempre me enseñaste a luchar por lo que quiero; apoyo y amor incondicional es lo siempre eh recibido de ti y de mi papá **Amando Vicente Arguelles** quienes juntos han sido mis guías en este camino, los amo... Muchas gracias.

A mi hermano **Juan Carlos** por darme siempre su amor, sus regaños cuando los eh necesitado y su apoyo en todos esos momentos de dificultad, "Forrest, you can do it".

A mi hermano **Raúl y familia**, estamos separados por muchos kilómetros pero eso no evita que nos apoyemos y estemos juntos en los momentos necesarios.

A **Juan Carlos Zamudio Carreño** por acompañarme a lo largo de todos estos años y brindarme tu amor.

A la **D.C. Lourdes Macías Rodríguez** y **D.C. Rafael Salgado Garciglia** por haberme aceptado en sus respectivos grupos de trabajo, haberme tenido paciencia, haberme compartido sus conocimientos, experiencias y brindarme su confianza a lo largo de la realización de este proyecto, los admiro y respeto.

A la **Q.F.B. Perla García** por apoyarme, darme consejos y ayudarme con el trabajo, muchas gracias a ti, a **Arturo, Lupita y Omar** por hacer mi estancia en los laboratorios más amena y por todos los buenos momentos; lejos de ser solo compañeros de trabajo, ustedes se volvieron muy buenas amistades que estuvieron en las buenas y en las malas.

A la **M.C. Alejandra García** por su ayuda y a todo el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A mis sinodales los **D.C. Ernesto García Pineda, Eduardo Valencia Cantero y Homero Reyes de la Cruz** por formar parte de mi comité de evaluación, por sus conocimientos compartidos, ayuda brindada, comentarios y sugerencias.

Este trabajo está especialmente dedicado a **Ángel Emilio Acosta Granados**.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. GENERALIDADES DE LA PLANTA DE FRESA.....	3
2.1.1. Descripción botánica.....	3
2.1.2. Reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal en plantas de fresa .....	9
2.1.3. Importancia de la fresa a nivel nacional e internacional.....	11
2.1.4. Cultivares de fresa en México .....	13
2.2. FACTORES DE ESTRÉS QUE AFECTAN EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE LA FRESA.....	14
2.2.1. Factores de estrés abiótico que afectan al cultivo de fresa.....	14
2.2.2. Factores de estrés biótico que afectan al cultivo de fresa.....	14
2.2.3. Enfermedad del moho gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> .....	15
2.3. ESTRATEGIAS DE DEFENSA EN PLANTAS EN RESPUESTA A HONGOS FITOPATÓGENOS .....	17
2.3.1. Mecanismos de defensa química en plantas.....	19
2.3.2. Mecanismos de defensa física en plantas.....	21
2.4. SIMBIOSIS CON MICROORGANISMOS BENÉFICOS DEL SUELO .....	27
2.4.1. Las PGPR promueven el crecimiento y desarrollo vegetal .....	27
2.4.2. Las PGPR estimulan las estrategias de defensa en las plantas.....	31
2.5. ASPECTOS RELEVANTES DEL GÉNERO <i>Bacillus</i> .....	33
2.5.1. <i>Bacillus</i> sp. M4-96 .....	33
3. JUSTIFICACIÓN .....	37
4. HIPÓTESIS.....	38
5. OBJETIVO GENERAL .....	39
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	40

7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
7.1.1. Plántulas de fresa Cv. Aromas.....	42
7.1.2. Cultivo de la cepa de <i>Bacillus</i> sp. M4-96.....	44
7.1.3. Cultivo de <i>B. cinerea</i> y preparación de las suspensiones de esporas.....	44
7.2. MÉTODOS.....	45
7.2.1. Interacción planta – bacteria.....	45
7.2.2. Interacción mediante la emisión de compuestos volátiles.....	45
7.3. Análisis de los compuesto que produce <i>Bacillus</i> sp. M4-96 en el medio de cultivo.....	46
7.4. Cuantificación del contenido de tricomas.....	48
7.5. Identificación de los depósitos de calosa.....	48
7.6. Análisis de la composición de las gotas provenientes del proceso de gutación en las plantas de fresa durante el contacto físico entre <i>Fragaria</i> x <i>ananassa</i> y <i>Bacillus</i> sp. M4-96.....	48
7.7. Composición química de las hojas de fresa.....	49
7.8. Estudio tripartita <i>Fragaria</i> x <i>ananassa</i> - <i>Bacillus</i> sp.M4-96- <i>Botrytis cinerea</i> .....	49
7.9. Análisis estadístico.....	50
8. RESULTADOS.....	51
8.1. Efecto de <i>Bacillus</i> sp. M4-96 sobre el peso fresco de plantas de fresa PCF y mediante la emisión de COVs.....	51
8.2. Efecto de <i>Bacillus</i> sp. M4-96 sobre diversos parámetros del desarrollo de plantas de fresa PCF y mediante la emisión de COVs.....	53
8.3. Identificación de compuestos bioactivos de <i>Bacillus</i> sp. M4-96.....	54
8.4. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por <i>Bacillus</i> sp. M4-96 en plantas de fresa a los 30 días de interacción.....	55
8.5. <i>Bacillus</i> sp. M4-96 refuerza la defensa estructural promoviendo la formación de tricomas glandulares y no glandulares.....	57
8.6. <i>Bacillus</i> sp. M4-96 refuerza la defensa estructural promoviendo la deposición de calosa.....	59
8.7. <i>Bacillus</i> sp. M4-96 induce la activación de mecanismos de defensa química en plantas de fresa DCF.....	63
8.8. <i>Bacillus</i> sp. M4-96 es capaz de fortalecer los mecanismos de defensa en plantas de fresa retrasando la infección causada por <i>B. cinerea</i> .....	69
9. DISCUSIÓN.....	73

10. CONCLUSIÓN .....	82
11. PERSPECTIVAS .....	83
12. LITERATURA CITADA.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Imagen representativa de la morfología de una planta de fresa.	
Figura 2.	Estructura de un hidátodo.	6
Figura 3.	Imagen representativa del proceso de gutación en una hoja de fresa	7
Figura 4.	Cambios en ABA, IAA, y los niveles de GA1 durante el desarrollo de fresa	10
Figura 5	Porcentajes de producción de fresa en las principales entidades productoras de fresa en México	12
Figura 6	Ciclo de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	15
Figura 7	Infección causada en fresa por el hongo <i>Botrytis cinerea</i> (podredumbre gris)	16
Figura 8	Ruta simplificada de la producción de compuestos fenólicos	18
Figura 9	Dinámica de la pared celular durante una invasión por hongos necrótrofos	22
Figura 10	Fragmento de la estructura de una molécula de calosa	23
Figura 11	Imagen de depósitos de calosa en objetivos de 20X (A) y 40X (B) por microscopia de fluorescencia	23
Figura 12	Efecto de los COVs emitidos por las PGPR sobre el crecimiento foliar de <i>A. thaliana</i>	26
Figura 13	Efecto de los compuestos volátiles de diferentes rizobacterias sobre la biomasa de <i>A. thaliana</i>	27
Figura 14	Análisis histológico de la pared celular de hojas de cucurbitácea y Efecto supresor de UMAF6639 hacia el moho	29
Figura 15	La rizobacteria <i>Bacillus sp. M496</i> estimula el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante la producción de compuestos volátiles	31
Figura 16	Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria y en la zona de formación de primordios y cuantificación de la auxina	32
Figura 17	Plantas de fresa micropropagadas en medio MS 1X y 0.1X, bajo condiciones de cuarto de cultivo	38

Figura 18	Fotografía representativa del tratamiento previo al contacto físico (PCF) entre planta de fresa y <i>Bacillus sp.</i> M4-96	40
Figura 19	Fotografía representativa del sistema de interacción planta de fresa - <i>Bacillus sp.</i> M4-96 mediante la emisión de compuestos volátiles	42
Figura 20	Condiciones usadas en el CG-MS para el análisis de fitoreguladores	44
Figura 21	Efecto de <i>Bacillus sp.</i> M4-96 sobre el crecimiento de las plantas de fresa	47
Figura 22	Efecto de <i>Bacillus sp.</i> M4-96 sobre el desarrollo de plantas de fresa PCF y mediante la emisión de COVs	48
Figura 23	Efecto de <i>Bacillus sp.</i> M4-96 sobre el desarrollo de plantas de fresa PCF y mediante la emisión de COVs	50
Figura 24	Efecto de los COVs emitidos por <i>Bacillus sp.</i> M4-96 en plantas de fresa después de 30 días de interacción	51
Figura 25	Fotografías representativas de los tricomas en hojas de fresa en los tratamientos PCF y por COVs con <i>Bacillus sp.</i> M-46	53
Figura 26	<i>Bacillus sp.</i> M4-96 favorece la formación de tricomas en hojas de fresa en los tratamientos PCF y COVs	53
Figura 27	Inducción diferencial de la deposición de calosa en las hojas de fresa por efecto de <i>Bacillus sp.</i> M4-96 de acuerdo al tipo y tiempo de interacción	55
Figura 28	Número de depósitos de calosa en hojas de fresa durante las interacciones PCF, DCF y por COVs de <i>Bacillus sp.</i> M4-96	56
Figura 29	Diámetro de los depósitos de calosa de las hojas de fresa después de cada tratamiento (PCF, DCF y por COVs) con <i>Bacillus sp.</i> M4-96	57
Figura 30	<i>Bacillus sp.</i> M4-96 induce a la gutación en hojas de fresa después de 19 d del tratamiento DCF	58
Figura 31	Confirmación de la presencia de 2,4-di-tert-butil fenol, en el exudado foliar, mediante el análisis del compuesto puro por CG – EM	60
Figura 32	Identificación del 2,4-di-tert-butil-fenol en hojas de fresa inoculadas con <i>Bacillus sp.</i> M4-96 por CG – EM	63
Figura 33	Efecto fungistático del 2,4-di-tert-butil-fenol contra <i>Botrytis cinerea</i>	64
Figura 34	Ensayo de antagonismo <i>in vitro</i> <i>Bacillus sp.</i> M4-96 – <i>Botrytis cinerea</i>	65

Figura 35	Estudio tripartita <i>Bacillus sp.</i> M4-96 – <i>Fragaria x ananassa</i> cv. Aromas- <i>Botrytis cinerea</i> .	67
Figura 36	Los COVs de <i>Bacillus sp.</i> M4-96 retrasan la infección causada por <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de fresa	68
Figura 37	Modelo	80

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Taxonomía de la fresa	3
Tabla 2	Sustancias presentes en los fluidos provenientes de la gutación en plantas de arroz, trigo y cebada	8
Tabla 3	Taxonomía de <i>Botrytis cinerea</i>	14
Tabla 4	Estrategias de defensa en el reforzamiento de la pared celular en plantas de fresa	24
Tabla 5	Contenido de las soluciones stock del medio MS	37
Tabla 6	Volúmenes de las soluciones stock empleadas para la preparación del medio MS	38
Tabla 7	<i>Bacillus sp.</i> M4-96 produce ácido indol acético (AIA) y ácido giberélico (GA3) en medio MS 0.1X	49
Tabla 8	Composición química del exudado foliar obtenido durante la interacción planta – bacteria en el tratamiento DCF	59
Tabla 9	Contenido del 2,4-di-tert-butil-fenol en hojas y gotas de plantas de fresa	62

## RESUMEN

Las plantas de fresa pertenecen a la familia Rosaceae y de ellas se cosecha una de las frutas más populares en todo el mundo. El cultivo de la fresa tiene pérdidas anuales significativas a causa del hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* por lo que el uso de bioinoculantes representa una estrategia eficaz y sustentable para promover el crecimiento, desarrollo y la inmunidad vegetal. En este trabajo se estudió el efecto de *Bacillus* sp. M4-96 sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Aromas) y la activación de los mecanismos de defensa físicos y químicos de la planta contra el hongo *B. cinerea*. El estudio de la interacción planta-rizobacteria se realizó de tres formas, previo y durante el contacto físico (PCF, DCF respectivamente) y mediante la emisión de compuestos volátiles (COVs). Los resultados indicaron que *Bacillus* sp. M4-96 promueve el crecimiento y desarrollo de plantas de fresa en dos de los sistemas de interacción probados, previo al contacto físico y mediante la emisión de compuestos volátiles. Durante el contacto físico se observó que la bacteria indujo al fenómeno de la gutación en las hojas, las cuales tomaron una coloración ámbar-rojizo. Un análisis químico de la composición de estas hojas y de las gotas provenientes del fenómeno de la gutación, indicó la presencia de un compuesto fenólico con actividad antimicrobiana, el 2,4-di-tert-butil-fenol, que al ser probado contra *B. cinerea* mostró un efecto fungistático a una concentración de 100µg/mL. Adicionalmente, la bacteria estimuló la defensa física de la planta al incrementarse el número de tricomas glandulares y no glandulares conforme avanzaba el tiempo de la interacción. De igual forma, se incrementó la deposición de calosa de manera diferencial en función del tipo de interacción. Para corroborar que esta activación en los mecanismos de defensa ayudan a las plantas de fresa a contrarrestar la infección causadas por *B. cinerea*, se realizó un estudio tripartita donde plantas pre-tratadas con la bacteria o con los COVs, se infectaron con el hongo y se observó un retraso en la infección. Con estos resultados se concluye que *Bacillus* sp. M4-96 promueve el crecimiento, el desarrollo de plantas de fresa y potencia la defensa por la producción de depósitos de calosa, aumento de tricomas y un incremento de compuestos fenólicos, lo que lleva a un retraso en la infección por *Botrytis cinerea*.

**Palabras Clave:** Antimicrobianos, calosa, compuestos volátiles, defensa vegetal, interacción planta-rizobacteria.

## ABSTRACT

Strawberry plants belong to the Rosaceae family and produces one of the most popular fruits all over the world. The strawberry crop has significant annual losses due to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*; therefore, the use of bioinoculants represents an effective and sustainable strategy to promote growth, development and plant immunity. In this work the effect of *Bacillus* sp. M4-96 on the growth and development of strawberry plants (*Fragaria x Ananassa* Duch. Cv. Aromas) and the activation of the physical and chemical defense mechanisms of the plant against the fungus *B. cinerea* was studied. The study of plant-rhizobacteria interaction was performed in three ways, prior and during physical contact (PPC, DPC respectively) and through the emission of volatile compounds (VOCs). Results indicated that *Bacillus* sp. M4-96 promotes the growth and development of strawberry plants in two of the tested interaction systems, prior to physical contact and through the emission of volatile compounds. During physical contact it was observed that the bacteria induced guttation in the leaves, which took an amber-reddish coloration. A chemical analysis of the composition of these leaves and the droplets from the guttation indicated the presence of a phenolic compound with antimicrobial activity, 2,4-di-tert-butyl-phenol, when the compound was tested against *B. cinerea* showed a fungistatic effect at concentration of 100µg / mL. In addition, *Bacillus* sp. M4-96 stimulated the physical defense of the plant by increasing the number of glandular and non-glandular trichomes as the time of the interaction progressed. Likewise, the deposition of callose was differentially according to the type of interaction. To verify that this activation in defense mechanisms helps to strawberry plants to counteract the infection caused by *B. cinerea*, a tripartite study was carried out where plants pre-treated with the bacterial VOCs were infected with the fungus and a delay in infection was observed. With these results we conclude that *Bacillus* sp. M4-96 promotes growth and, development of strawberry plants and potency its defenses through callose deposits production, trichome increase and increasing phenolic compounds, conducting to a delay in infection by *Botrytis cinerea*.

Keywords: Antimicrobials, callose, volatile compounds, plant defense, plant-rhizobacteria interaction

## 1. INTRODUCCIÓN

La planta de fresa es uno de los cultivos más populares a nivel mundial debido al sabor y consistencia única de sus frutos; este cultivo como muchos otros, sufre de pérdidas anuales debido a la incidencia de plagas y enfermedades. La enfermedad más frecuente en las plantas de fresa es la podredumbre gris, causada por el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*, que se caracteriza por lesiones de color marrón ligero en puntos específicos de las hojas y un micelio blanco-algodonoso presente en el fruto. El punto crítico de la infección es durante la fase dos del ciclo de infección del hongo, que es cuando el micelio inicia el proceso de degradación de la pared, con la finalidad de penetrar e iniciar su dispersión en el resto de la planta (Benito *et al.*, 2000).

Las plantas cuentan con diversas estrategias de defensa para impedir o limitar el ataque de herbívoros y patógenos, principalmente contra hongos. Estas estrategias se clasifican de manera general en químicas y físicas: las químicas consisten en la biosíntesis de compuestos con actividad antimicrobiana como alcaloides, fenoles simples o polifenoles (taninos), aceites esenciales y terpenos en general, que son capaces de producir y almacenar en sus células; y entre las estrategias físicas se encuentran la producción de tricomas y el reforzamiento de la pared celular, con la finalidad de impedir que el micelio se propague y de esta manera detener la infección (Gutiérrez *et al.*, 2009).

El mecanismo de reforzamiento de la pared celular implica una serie de eventos como la producción de calosa, un polisacárido compuesto por moléculas de glucosa, unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,3. La calosa se encuentra localizada rodeando a los plasmodesmos ubicados en la pared celular, los cuales son aberturas que permiten la comunicación célula-célula, por lo que un engrosamiento y cierre de estas estructuras, representaría una ventaja contra la propagación del hongo (Arkhipova *et al.*, 2005).

La interacción de las plantas con microorganismos simbiotes como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), inducen entre diversos procesos, el reforzamiento de la pared celular en forma indirecta, impidiendo el ataque de diversos patógenos, además de promover el crecimiento de las plantas con las que se asocian (Dey *et al.*, 2014).

En este estudio se demuestra que la rizobacteria *Bacillus sp.* M4-96, promueve el crecimiento y desarrollo de plantas de fresa y a su vez potencia los sistemas de defensa químicos y físicos de la planta contra el ataque de *B. cinerea*, todo ello mediante la producción de diversos metabolitos de naturaleza volátil y no volátil.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. GENERALIDADES DE LA PLANTA DE FRESA

Las plantas de fresa pertenecen al género *Fragaria* (Tabla 1), nombre que se relaciona con la fragancia que posee (en latín, *fraga*), y son cultivadas por su fruto comestible. Las variedades cultivadas comercialmente son por lo general híbridos, en especial *Fragaria x ananassa*, proveniente de la hibridación de *F. chiloensis* y *F. virginiana*, que ha reemplazado casi universalmente a la especie silvestre, *F. vesca*, por el tamaño superior de sus frutos y su sabor característico (Darrow, 1966).

**Tabla 1. Taxonomía de la fresa (Frairé-Cordero et al., 2003)**

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Spermatophyta
<b>Clase</b>	Angiosperma
<b>Subclase</b>	Dicotyledoneae
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Género</b>	<i>Fragaria</i>
<b>Especie/Híbrido</b>	<i>Fragaria x ananassa</i>

#### 2.1.1. Descripción botánica

La planta de fresa es una planta herbácea perenne que produce brotes nuevos cada año. La planta presenta un tallo madre extremadamente compacto conocido como corona a partir del cual emergen las raíces, hojas, estolones filiformes (corredores) e inflorescencia (Fig. 1). El número de inflorescencias por planta depende del cultivar, el tamaño de la planta, el crecimiento, el momento de la

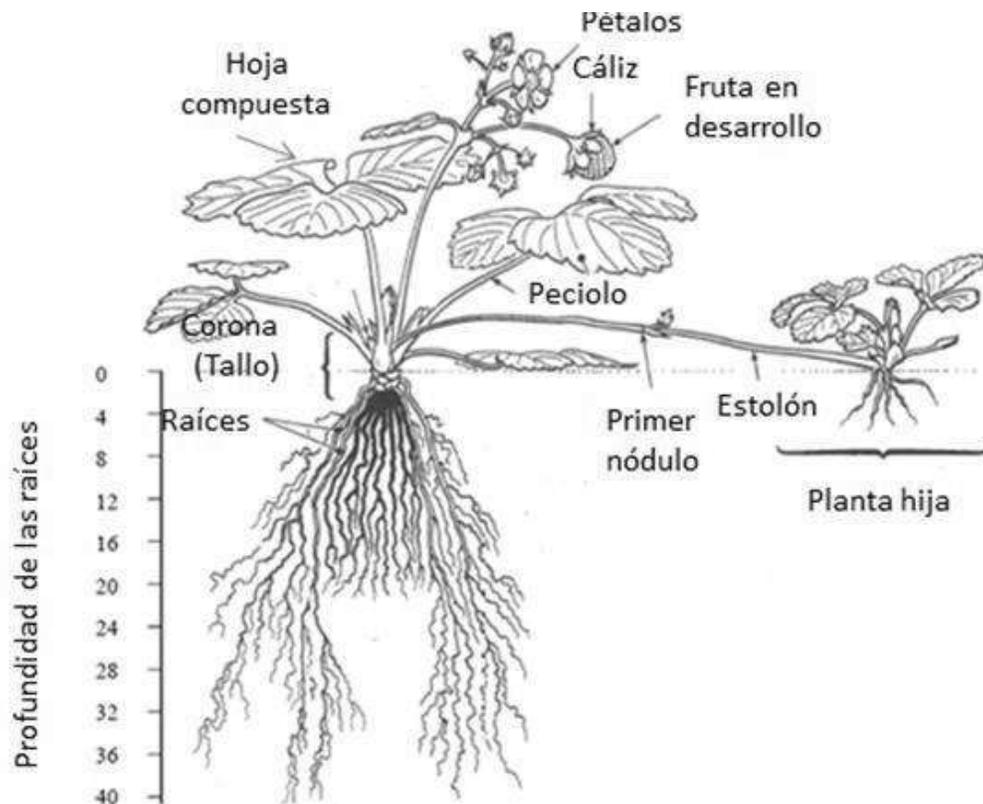
fertilización nitrogenada y las condiciones climáticas. Las condiciones del clima son especialmente importantes durante la iniciación floral y diferenciación (Higgs *et al.*, 1989).

Cada inflorescencia contiene generalmente dos flores primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, pero el número de flores por inflorescencia varía con el cultivar y las condiciones de cultivo, aunque normalmente oscilan entre 7 y 27 por inflorescencia. Los tallos florales no presentan hojas, en su extremo aparecen las flores, de cinco pétalos blancos, cinco sépalos y numerosos estambres (Sønsteby *et al.*, 2009). Una flor típica tiene diez sépalos, cinco pétalos, estambres, 20-30 y 60- 600 pistilos. El mayor número de pistilos están en la flor principal (Hancock, 1999). Cada óvulo fecundado da lugar a un fruto de tipo aquenio. El desarrollo de los aquenios, distribuidos por la superficie del receptáculo carnoso, estimula el crecimiento y la coloración de éste, dando lugar al “fruto” de la fresa, que es el área comestible, de forma cónica o casi redonda, de tamaño variable según la especie (de 15 a 22 mm de diámetro), coronada por sépalos verdes, es de color rojo y con un sabor que varía de ácido a muy dulce (Vásquez Romero *et al.*, 2006).

El género *Fragaria* tiene un sistema de raíces muy poco profunda, donde el 50 a 90% de las raíces se concentran en las primeros 15 cm del suelo, pero pueden extraer agua de las capas más profundas del suelo, llegando algunas raíces a penetrar hasta un metro de profundidad (Fig. 1) (Higgs *et al.*, 1989).

Los peciolos de las hojas son pilosos, cada uno soporta una hoja compuesta trifoliada en su mayoría, pero existen aquellas con cuatro o cinco folíolos ovales fuertemente dentados, éstos son verde brillante por el haz, mas pálidos por el envés, que manifiesta una nervadura muy destacada y una gran pilosidad. Las hojas están conectadas al cilindro vascular y por lo tanto el agua puede ser suministrada directamente del área de la corona (Hedrick, 1925).

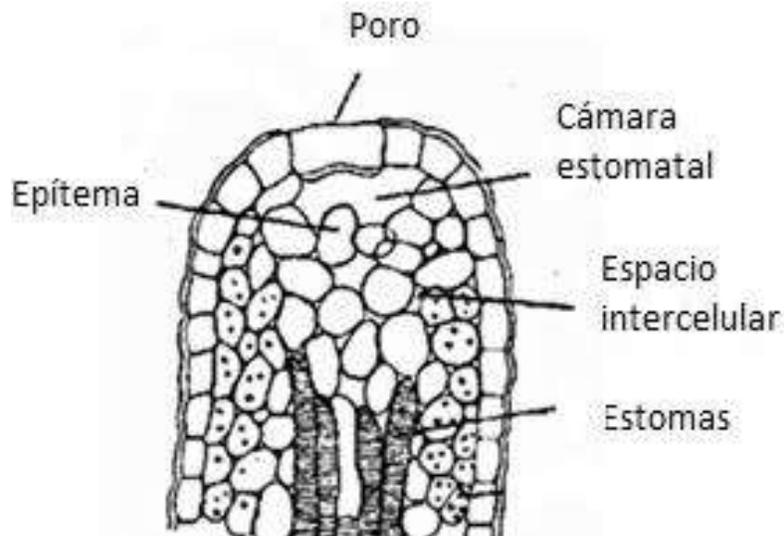
La mayoría de las especies se propagan asexualmente con la formación de estolones, los que producen una nueva planta en el segundo nodo y luego la planta hija desarrolla un nuevo estolón con una segunda planta hija y así sucesivamente. Una planta vigorosa produce entre 10 y 15 estolones en un año dependiendo del clima y las condiciones de crecimiento (Rolbiecki *et al.*, 1997).



**Figura 1. Morfología de una planta de fresa (Hancock, 1999).**

A lo largo de los márgenes y en las puntas de las hojas se localizan unas estructuras conocidas como hidátodos que participan en el fenómeno de la gutación, donde las venas principales del xilema terminan; cada hidátodo tiene un poro, el cual siempre permanece abierto, el poro lleva a una cavidad, seguido a esta cavidad se encuentra un arreglo de células llamadas epítima, que están en contacto cercano con las terminaciones de las venas del xilema (Fig. 2) (Singh, 2014). La fresa es una planta con una alta demanda de agua; en estas condiciones, los productores prefieren aplicar el riego en exceso para evitar

periodos de deficiencia hídrica, pero la alta humedad puede ocasionar principalmente pérdida de nutrimentos y propiciar el fenómeno de gutación (del latín *gutta*: gota) (Mass, 1987).



**Figura 2. Estructura de un hidátodo** (Singh, 2014).

La gutación ocurre cuando la transpiración producida a través de los estomas de las hojas, principal mecanismo de movimiento del agua de la planta, está limitado por el cierre de los mismos. Generalmente los estomas se cierran entre el anochecer y el amanecer, cuando las condiciones ambientales no favorecen una transpiración eficaz debido a que el aire se enfría y por lo tanto está saturado de agua; un fenómeno similar se presenta durante los días de lluvia y especialmente en climas tropicales. Cuando el contenido de agua en el suelo es demasiado alto, el agua entra a la planta a través de la raíz debido a que el potencial hídrico radicular es más bajo que el del suelo (Girolami *et al.*, 2009).

El agua se acumula en la planta, creando una presión en la raíz. Para controlar la presión excesiva resultante de esta absorción de agua, cuando los estomas están cerrados, intervienen otro tipo de válvulas denominados hidátodos. A través de ellos se evacúa el agua en forma de gotas en los márgenes de las hojas (Fig. 3)

(Girolami *et al.*, 2009). Durante su paso a través de los hidátodos, el flujo de gutación utiliza los vasos del xilema y el área apoplástica. Este proceso es muy frecuente y se detiene cuando el mecanismo de la evaporación de la planta se pone en marcha (Grunwald *et al.*, 2003)

La gutación no debe confundirse con el agua del rocío proveniente de la condensación de la humedad atmosférica en la planta, en este último caso las gotas son más finas y están distribuidas por la superficie de la hoja (Girolami *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Imagen representativa del proceso de gutación en una hoja de fresa.

La composición química de las gotas secretadas durante la gutación fue reportada previamente por Goatley *et al.* (1965), quienes recolectaron gotas de plantas de arroz, trigo y cebada identificando una amplia variedad de compuestos, de entre los más abundantes encontraron minerales tales como el potasio, calcio, magnesio; azúcares como la fructosa, galactosa, glucosa; y otros compuestos como fosfatos, ácido aspártico, asparagina e inositol, entre otros (Tabla 2).

**Tabla 2. Sustancias presentes en los fluidos provenientes de la gutación en plantas de arroz, trigo y cebada (Goatley *et al.*, 1965).**

COMPUESTOS	Concentración (mg/L)		
	ARROZ	TRIGO	CEBADA
P	1.1	0.7	2.3
K	18	27	30
Na	0.5	0.8	11
Ca	1.5	3.0	4.8
Mg	1.5	1.5	2.4
Mn	0.02	0.02	0.05
Fe	0.4	0.15	0.07
Cu	0.04	0.03	0.03
Zn	0.02	0.05	0.05
Al	0.06	0.08	0.08
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	1.0	1.0
Fosfato	2.0	0.9	1.0
Ión amonio	5.6	5.0	8.9
Arabinosa	2.5	5.6	4.1
Fructosa	10.3	4.4	1.8
Galactosa	10.3	7.6	4.0
Glucosa	18.7	2.6	38.7
Ribosa	1.0	tr	1.0
Sacarosa	3.8	4.9	0.0
Acido aspártico	2.2	0.5	3.6
Asparagina	2.5	1.9	9.5
Acido glutámico	0.7	0.0	0.0
Glutamina	0.8	0.3	1.2
Biotina	0.002	0.001	0.018
Inositol	9.0	0.25	4.5
Ácido pantoténico	0.040	0.085	0.080
Riboflavina	0.00025	0.0002	0.0002
Tiamina	0.00006	0.00005	0.0025
Uracilo	0.00	0.00	1.6

Un aspecto importante de los hidátodos es que son estructuras constitutivamente abiertas, donde por debajo de éstos se encuentra una pequeña cavidad, situada por encima del epítima, que está compuesta de tejido estrechamente asociado con los extremos del sistema vascular en las hojas de las plantas, donde microorganismos, incluidos agentes patógenos, tales como bacterias móviles,

podrían utilizar los hidátodos para entrar a la planta (Fukui *et al.*, 1999). El riesgo de invasión de la planta es más alto cuando se produce la gutación, ya que la película de agua sobre la superficie de la planta facilita el movimiento bacteriano (Guiry *et al.*, 2008; Lee, 2008).

Gu *et al.* (2012), presentaron evidencias sobre esta teoría, ya que encontraron en las gotas del proceso de gutación, a la bacteria entérica *Salmonella typhimurium*, un día después de su inoculación en plantas de tomate. La bacteria logró entrar por las puntas de las hojas, llegando inclusive al sistema vascular de éstas. De igual manera se tiene conocimiento que *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* coloniza el espacio intracelular de plantas de tomate y en una semana entra en los vasos de las venas marginales, de esta manera el patógeno se distribuye a lo largo de las orillas de la hoja donde se realizó la inoculación apareciendo síntomas de necrosis (Carlton *et al.*, 1998).

Poco se sabe sobre los mecanismos por los que la planta defiende sus aperturas contra los invasores potenciales, a excepción del estudio realizado por Grunwald *et al.* (2003), quienes encontraron la presencia de una serie de proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas PR (proteínas relacionadas a la patogénesis), en las gotas recolectadas durante el proceso de gutación en plantas de cebada.

### **2.1.2. Reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal en plantas de fresa**

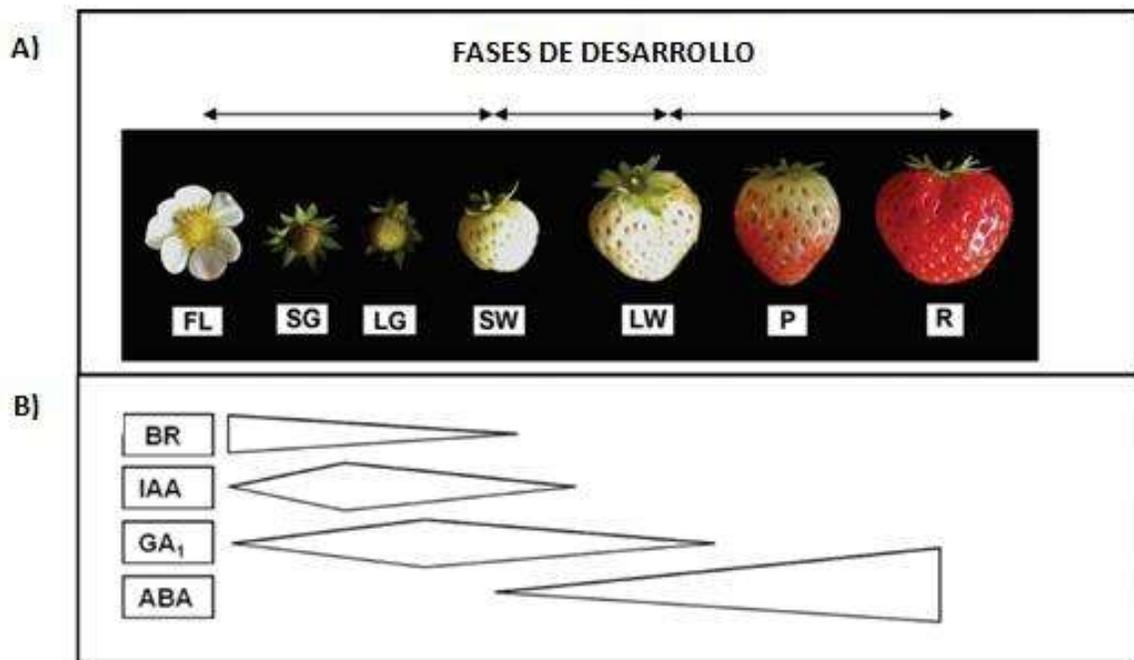
Una hormona vegetal o fitohormona, también denominados reguladores del crecimiento vegetal, son compuestos orgánicos sintetizados en un órgano específico de la planta y transportados a otra parte, donde producen una respuesta fisiológica. Son moléculas pequeñas esenciales para la regulación del crecimiento, desarrollo, reproducción y supervivencia de la planta. Para las plantas de fresa se sabe que las auxinas y giberelinas participan en una gran variedad de procesos; los primeros estudios informaron de una alta presencia de giberelinas

(GAs) en frutos de fresa (Perkins-Veazie, 1995), que en acción conjunta con auxina, promovían el desarrollo de dichos frutos. El crecimiento de la fruta, la elongación celular y la división celular son coordinados por un delicado equilibrio entre las dos fitohormonas (Csukasi *et al.*, 2011).

A ambos reguladores de crecimiento se les asocia en etapas de división celular en fresa (Csukasi *et al.*, 2011). En específico para giberelinas, un análisis de expresión de genes implicados en la percepción de GAs, la señalización y el metabolismo sugieren que el receptáculo es el principal responsable de la biosíntesis de GAs dentro del fruto de fresa, además de ser el sitio de acción de esta fitohormona, ya que está directamente involucrada en el desarrollo del receptáculo (parte muy importante de la fruta, ya que es responsable para la calidad de ésta) mediante la promoción de la expansión celular, principalmente durante las primeras etapas de crecimiento y desarrollo del fruto (Hytönen *et al.*, 2009, Kang *et al.*, 2013).

Las formas bioactivas de las GAs son GA1, GA3 y GA4, que se han monitoreado durante el desarrollo del fruto, siendo el contenido de GA4 extremadamente alta en el receptáculo, con un pico en la fase de expansión celular, jugando un papel destacado (Csukasi *et al.*, 2011).

Además de las fitohormonas ya mencionadas, se sabe que los brasinoesteroides (BR) se encuentran en cantidades altas durante la etapa de floración, disminuyendo en las primeras etapas de lo que se conoce como etapa blanca pequeña; la auxina ácido indolacético (AIA) tiene su mayor pico de abundancia durante las primeras etapas de engrosamiento del receptáculo al igual que las GAs; y el ácido abscísico (ABA) se ha reportado en pequeñas cantidades durante la etapa conocida como pequeña blanca, aumentando gradualmente hasta la etapa roja donde tiene su mayor pico de concentración (Fig. 4) (Symons *et al.*, 2012).



**Figura 4. Cambios en la concentración de BR (Brasinoesteroides), AIA (Ácido indolacético, GA<sub>1</sub> (Giberelina 1) y ABA (Ácido abscísico) durante el desarrollo de fresa (Symons *et al.*, 2012). A) Etapas del desarrollo del fruto de fresa: FL, Flor; SG, Verde pequeña; LG, Verde grande; SW, Blanca pequeña; LW, Blanca grande; P, Rosa; R, Roja. B) Cambios en la concentración de BR, ABA, GA<sub>1</sub> y AIA en las diferentes etapas de desarrollo.**

### 2.1.3. Importancia de la fresa a nivel nacional e internacional

Dentro de la demanda de productos agrícolas de los mercados internacionales, las frutas juegan un papel importante como generadoras de divisas para muchos países productores, tal es el caso de la naranja, la manzana y el plátano. Sin embargo, hay frutas cuyo fruto comercializado es menor y sin embargo constituyen una fuente significativa de ingresos para los productores. Este es el caso de la fresa (Macías-Rodríguez *et al.*, 2002).

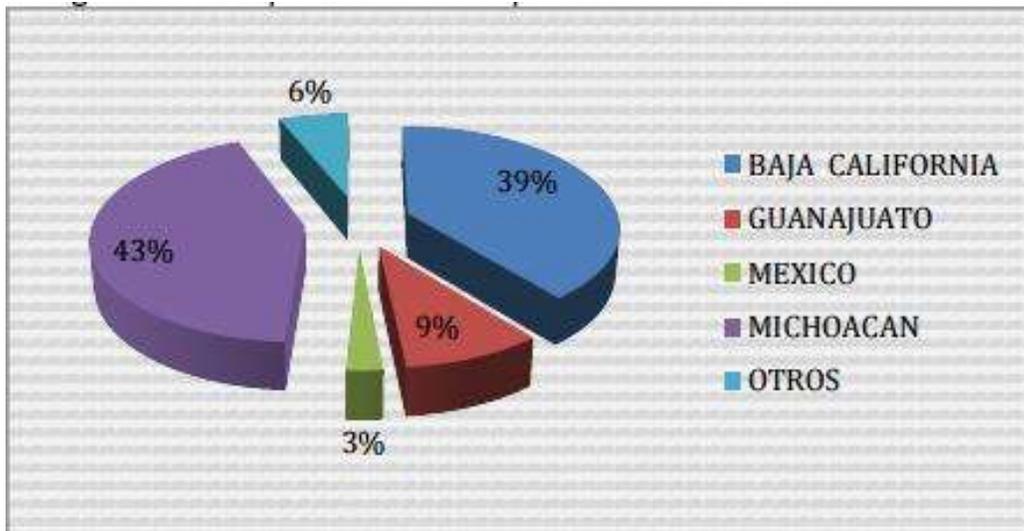
En 2014, los Estados Unidos de América (USA, de siglas en inglés) fue el mayor productor de fresa del mundo, teniendo aproximadamente 24,000 hectáreas destinadas a la producción de fresa, seguidos por España, Turquía y México. El

consumo de fresa en los Estados Unidos fue de 3.3 Kg per cápita en 2014, pero no todos los frutos que se consume en USA son producidos en el país; 110.5 millones de Kg son importados y la mayor parte de estas importaciones proceden de México, sobre todo en los meses de invierno.

Por su parte, México registró en 2008 una superficie cultivada de fresa de 6 mil 214 hectáreas, obteniéndose una producción de 208 mil 932.25 toneladas métricas, por lo que alcanzó un rendimiento promedio de 33.86 Ton/Ha (toneladas por hectárea) (SAGARPA 2010).

Las principales entidades productoras de esta frutilla son Baja California, Guanajuato, Estado de México y Michoacán; en esta última entidad se concentra la mayor producción nacional con una superficie cultivada de 3,215 Ha y una producción superior a las 106,905 Ton, seguido por el estado de Baja California con una superficie de 1,355 Ha y una producción de 70,410 Ton; el estado de Guanajuato con una superficie de 1,048 Ha y una producción de 18,065 Ton; Y por último, el estado de México con una superficie de 244 Ha y una producción de 5,068 Ton.

En la Fig. 5 se muestran los datos en porcentaje del valor de la producción de cada entidad productora de fresa en nuestro país (SAGARPA, 2009).



**Figura 5. Porcentajes de producción de fresa en las principales entidades productoras de fresa en México (SAGARPA, 2009).**

#### **2.1.4. Cultivares de fresa en México**

En México se siembran diferentes cultivares, cada uno con características específicas de sabor, color y tamaño e incluso algunos de ellas presentan, resistencia a plagas y enfermedades. Su siembra depende de cada región, debido a las características que éstos presentan. Cabe mencionar que los cultivares utilizados en México han sido desarrollados por la Universidad de California USA y Universidad de Florida USA (SAGARPA, 2009).

Para su cultivo en México, de USA se importa la “Planta Madre”, que al llegar se establece en viveros para su reproducción y posteriormente se trasplanta en las áreas de cultivo comercial para la producción de fruto. Entre los cultivares más utilizados en México se encuentran: “Festival”, “Sweet Charlie”, “Galexia”, “Camino Real”, “Albión”, “Camarosa”, “Aromas”, “Ventana” y “Diamante”. Existen otros cultivares pero debido a diferentes factores como el bajo rendimiento, susceptibilidad a plagas y enfermedades, entre otros, no se han adoptado en México (SAGARPA, 2009).

## **2.2. FACTORES DE ESTRÉS QUE AFECTAN EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE LA FRESA**

El estrés en las plantas puede ser definido como cualquier factor externo que influye negativamente en el crecimiento de la planta, la productividad, la capacidad reproductiva o la supervivencia. Esto incluye una amplia gama de factores que pueden ser ampliamente divididos en dos categorías principales: los factores de estrés biótico o factores biológicos del estrés; y los factores abióticos o ambientales (Rhodes *et al.*, 2001).

### **2.2.1. Factores de estrés abiótico que afectan al cultivo de fresa**

Algunos de los factores abióticos que afectan a las plantas de fresa son la disponibilidad de nutrientes en el suelo, la temperatura y la disponibilidad de agua. Cualquiera de estas condiciones ambientales son percibidas por los distintos órganos de la planta y la información se transmite internamente lo que conlleva a una modulación de vías de señalización, principalmente hormonales, que activan las respuestas de desarrollo y crecimiento vegetativo (Talón *et al.*, 1991; Zeevaart *et al.*, 1993). Las respuestas de la planta dependen del estado de desarrollo de la misma en el momento del estrés, de la duración y la severidad del mismo y de los factores ambientales que lo provoquen (Gillapsy *et al.*, 1993).

### **2.2.2. Factores de estrés biótico que afectan al cultivo de fresa**

Uno de los principales problemas en el cultivo de la fresa es la gran cantidad de enfermedades y plagas que atacan al cultivo, que resultan ser limitantes para la producción y la calidad del fruto. Por ejemplo, las plantas de fresa son susceptibles al ataque de insectos como *Tetranychus urticae* Koch que origina la enfermedad conocida como araña roja, las heridas provocadas por dichos insectos hace más susceptible a las plantas contra el ataque de otros organismos patógenos, como la bacteria *Xanthomonas fragariae* y algunos hongos como

*Oidium fragariae* que causa oidio o cenicilla, *Mycosphaerella fragariae* que causa la mancha purpura y *Botrytis cinerea* que origina la podredumbre gris o moho gris (INFROAGRO, 2002).

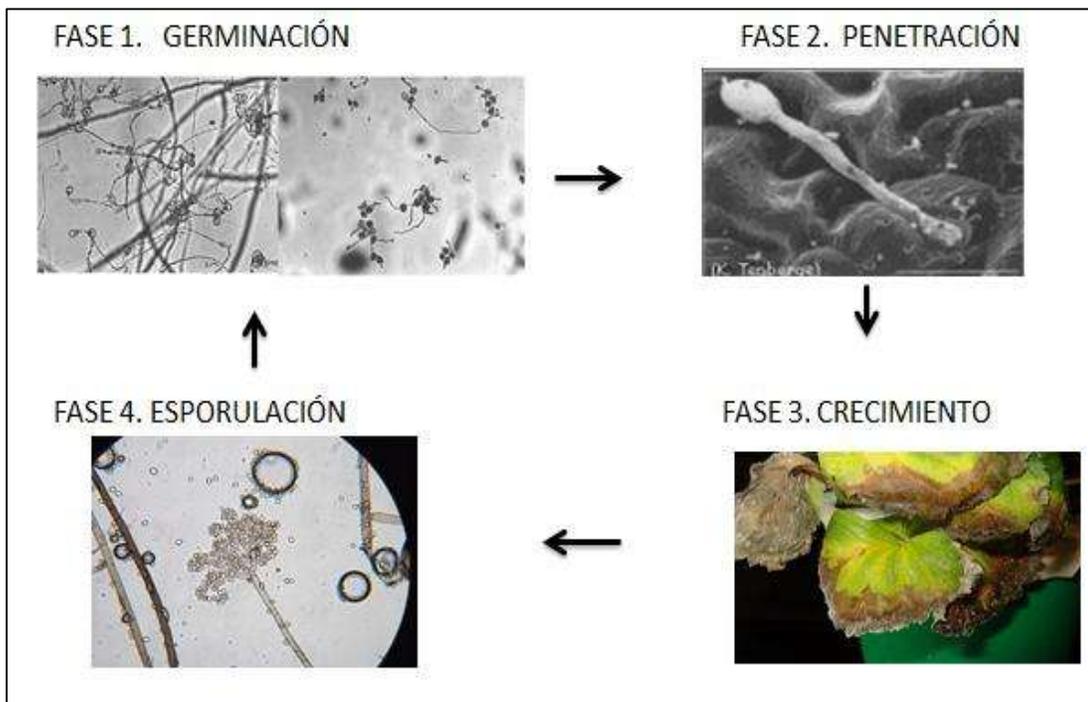
### 2.2.3. Enfermedad del moho gris causada por *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* es un ascomiceto de la familia *Sclerotiniceae* (Tabla 3) y un fitopatógeno necrótrofo que causa la enfermedad del moho gris o podredumbre gris. Puede infectar a cerca de 200 especies de plantas, causando considerables pérdidas económicas (Mathur *et al.*, 2002).

**Tabla 3. Taxonomía de *Botrytis cinerea*** (Frairé-Cordero *et al.*, 2003).

<b>Dominio</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Phylum</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Pezizomycotina
<b>Subclase</b>	Leotiomycetidae
<b>Orden</b>	Helotiales
<b>Familia</b>	Sclerotiniceae
<b>Género</b>	<i>Botrytis</i>
<b>Especie</b>	<i>B. cinerea</i>

El hongo puede permanecer latente en forma de micelio o también presentarse como esclerocio, una masa dura y compacta de micelio que está separado del hongo y puede germinar pasado el invierno. En la nueva germinación se producen conidióforos que derivan en conidias o esporas; éstas maduran, se desprenden y si las condiciones son favorables se produce la germinación. Generalmente el hongo se establece en partes enfermas del hospedero, iniciando un nuevo ciclo de infección que está dividido en fases (Fig. 6) (Staples *et al.*, 1995):



**Figura 6. Ciclo de infección de *Botrytis cinerea* (Benito et al., 2000).**

*Primera fase.*- Es la adición y germinación de las esporas sobre el huésped.

*Segunda fase.*- Es la penetración en el tejido vegetal, que puede ser a través de heridas o aberturas naturales o directamente a través de la actividad de distintas enzimas; esta segunda fase puede ser lograda degradando la cutícula a través de cutinasas y lipasas. Una vez penetrada la cutícula, el hongo necrótrofo produce varias enzimas tales como celulasas, hemicelulasas, acetilesterasas, poligalacturonasas y pectinmetilesterasas para degradar los polímeros de la pared celular de la planta y así poder facilitar la disponibilidad de nutrientes.

*Tercera fase.*- Es el establecimiento del patógeno en la zona de penetración, dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta (Benito et al., 2000).

*Cuarta fase.*- Inicia cuando sobre el tejido infectado, el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

El fruto de una planta de fresa es considerado como “fruto blando”, por su delicada textura ya que está recubierto por una cutícula muy delgada y es muy susceptible al daño físico o al ataque de *B. cinerea* por ser rico en azúcares. En la figura 7 se muestran imágenes de frutos de fresa infectados con *B. cinerea*.



**Figura 7. Infección causada en fresa por el hongo *Botrytis cinerea* (podredumbre gris) (Romanazzi *et al.*, 2014).**

### **2.3. ESTRATEGIAS DE DEFENSA EN PLANTAS EN RESPUESTA A HONGOS FITOPATÓGENOS.**

Las plantas disponen de un sistema inmune específico que consiste en el reconocimiento del agresor y de la agresión, desencadenando la inducción de una cascada de respuestas de defensa cuyo cometido es alertar al resto de los órganos vegetales de la existencia de peligro y, de este modo, preparar sus estructuras para ofrecer una respuesta sistémica generalizada en lo que se denomina respuesta sistémica; esto requiere de la existencia de moléculas

señalizadoras que se movilizan a través de los tejidos vegetales e inducen la expresión de genes relacionados con la defensa (Escobar, 2010).

Por ejemplo en el caso de microorganismos, la planta tiene la capacidad de percibir el conjunto de moléculas microbianas que se conoce como patrones moleculares asociados a microorganismos/patógenos (MAMPs/PAMP) (Boller *et al.*, 2009), mediante receptores ubicados en la superficie celular, que conduce a señalizaciones intracelulares, a una reprogramación transcripcional y a la biosíntesis de metabolitos de defensa, que limitan la colonización o infección microbiana (Dangl *et al.*, 2013).

Los mecanismos de defensa estructurales actúan en combinación con una serie de sustancias químicas de defensas preexistentes o inducidos por la presencia de los fitopatógenos. Las diferentes combinaciones entre ambos tipos de defensa son específicas para cada interacción patógeno-hospedante, e incluso, específicas según la edad de la planta, el tipo de planta, el órgano, el tejido afectado, la condición nutricional, etc. (Abbas, 2015).

La respuesta hipersensible (HR), es un proceso de muerte celular rápido y localizado de una o varias células de la planta huésped en respuesta a una invasión (Goodman *et al.*, 1994). Esta respuesta se caracteriza por una pérdida rápida de la integridad de la membrana en las células huésped afectadas y por la acumulación de diversas sustancias que restringen el crecimiento y la dispersión del patógeno (Goodman *et al.*, 1994).

A continuación se detallan los mecanismos que están implicados durante la defensa química y física de las plantas contra el ataque de patógenos.

### 2.3.1. Mecanismos de defensa química en plantas

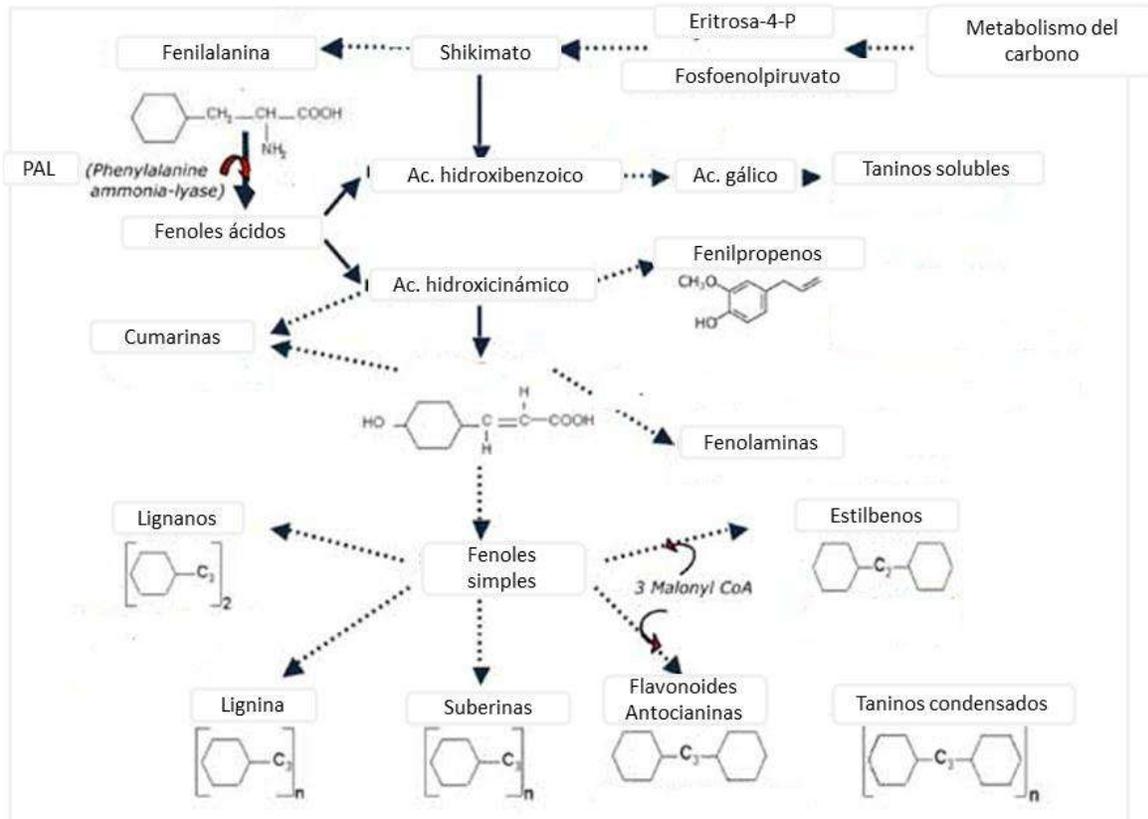
Cuando una planta es infectada por un patógeno, pueden ocurrir varios eventos. La planta puede ser capaz de no controlar el crecimiento o dispersión del patógeno permitiendo que ocurra la infección. Alternativamente la planta puede ser capaz de controlar la invasión de patógeno. En algunos casos la resistencia es pasiva y en otros casos la resistencia es un proceso activo en el cual la planta produce una cascada de respuesta de defensa (González *et al.*, 2006).

Algunas plantas responden a la invasión de patógenos, en particular al ataque de hongos, produciendo compuestos antifúngicos como las fitoalexinas y otros de diversa naturaleza química que incluso tienen la propiedad de ser volátiles a temperatura ambiente que cumplen la función como antimicrobianos o de transmitir información dentro de la planta y entre distintas plantas (González *et al.*, 2006).

Entre los metabolitos que están implicados en la defensa vegetal se encuentran los compuestos fenólicos que son sintetizados principalmente por la ruta del ácido shikímico (Fig. 8) y la mayoría de ellos cumplen funciones importantes contra el ataque de hongos patógenos (Hrazdina, 1992). Los mecanismos responsables por la toxicidad de los fenoles hacia microorganismos incluyen la adsorción y disrupción de membranas microbianas, interacción con enzimas, privación de iones metálicos, algunos de ellos logran insertarse en la doble hélice del ADN y unirse con las bases pirimidínicas (timina y uracilo), bloqueando la transcripción y de esta manera induciendo la muerte celular (Ames, 1983; Xia *et al.*, 2011).

Algunos compuestos fenólicos se encuentran almacenados en las células de las plantas como formas inactivas, pero pueden convertirse rápidamente en moléculas biológicamente activas por la hidrólisis de enzimas por parte de la planta en respuesta al ataque de patógenos. Los compuestos fenólicos libres son más tóxicos para el organismo invasor que aquellos en forma de polímero. La

distribución de los fenoles es a menudo tejido específico como por ejemplo en la cera de las hojas, en los exudados de los brotes o yemas y la fracción citoplasmática dentro de la epidermis (Xia *et al.*, 2011)..



**Figura 8. Ruta simplificada de la producción de compuestos fenólicos** (Modificada de Douce, 2005).

En la respuesta hipersensible, la oxidación de compuestos fenólicos provoca un incremento en las enzimas oxidantes de fenoles y la producción activa de especies reactivas de oxígeno, tales como peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y el anión superóxido, que tienen actividad sobre los patógenos (Bowell *et al.*, 1997). Diversos estudios sugieren que el oxígeno activo puede ser producido en tejidos como defensa directa, cuando algún patógeno intenta invadir tejidos del huésped (Joo *et al.*, 2004).

Como parte de la ruta del ácido shikímico, se produce el ácido corísmico que es convertido en ácido cinámico, el precursor del ácido benzoico y sus derivados como la vainillina y el ácido salicílico (SA) (Shah, 2003). El SA y su respectivo metil éster son moléculas de señalización muy importantes que desencadenan respuestas locales de defensa e inducen la resistencia sistémica adquirida (SAR) en la planta frente a microorganismos patógenos y herbívoros (Snoeren *et al.*, 2010).

### **2.3.2. Mecanismos de defensa física en plantas**

Principalmente a lo largo de las hojas y peciolo se localizan apéndices de la epidermis de la planta conocidos como tricomas, cuyo crecimiento y desarrollo es dependiente de las GAs (Peraza *et al.*, 1998). Los tricomas desempeñan diversas funciones, entre ellas dar protección contra insectos y microorganismos patógenos, puesto que son la primera barrera de defensa con la que se enfrentan. Los tricomas varían en tamaño desde unos pocos micrómetros a varios centímetros. Existen 2 tipos de tricomas, los no glandulares y los glandulares: Los primeros cumplen funciones de protección contra agresiones mecánicas, protección contra luz creando sombra sobre la epidermis y evitando la pérdida de agua en las plantas, son unicelulares y pueden ser no ramificados o tener de dos a cinco ramas; mientras que los tricomas glandulares son generalmente multicelulares, que consisten en una parte basal, tallo y células apicales diferenciadas, éstos pueden encontrarse en aproximadamente 30% de todas las plantas vasculares.

Los tricomas glandulares tienen en común la capacidad de producir, almacenar y secretar grandes cantidades de diferentes metabolitos secundarios activos como flavonoides, terpenoides y alcaloides que son almacenados en la punta con actividad antimicrobiana, repelente e incluso por sus propiedades pegajosas, que ayudan a atrapar insectos y otros organismos, formando así una combinación de

defensa química y estructural o física (Levin, 1973; Fahn *et al.*, 2000; Marthur *et al.*, 2000).

Adicional a este tipo de sustancias, recientes hallazgos han mostrado que un grupo de proteínas denominadas filoplaninas son secretadas por los tricomas glandulares de hojas de tabaco, e inhiben la germinación de esporas y por lo tanto impide el avance de la enfermedad causada por el oomiceto *Peronospora tabacina* (Antoaneta *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el crecimiento y desarrollo de tricomas se incrementa en una amplia variedad de plantas, en respuesta al daño producido por insectos, compuestos volátiles detectados como el etileno, así también como por el contacto con bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (Por sus siglas en ingles), tal como se muestra en el estudio realizado por Cappellari *et al.* (2015), donde plantas de menta mostraron un incremento significativo en comparación con las plantas control en la densidad de tricomas al estar en contacto con la bacteria *Bacillus subtilis* GB03. Mientras que la mayoría de las plantas producen tricomas constitutivamente, algunas especies responden al daño incrementando la densidad, cantidad y longitud de éstos.

Otro mecanismo conocido en defensa física de plantas, es el reforzamiento de los componentes de la pared celular, una estructura dinámica y un factor a menudo determinante en el resultado de las interacciones entre plantas y patógenos, siendo una de las primeras barreras físicas que los patógenos tienen que romper para colonizar el tejido vegetal, ya sea usando una combinación de enzimas de degradación para destruir la integridad de la pared celular como los hongos necrótrofos o por medio de una degradación más localizada y controlada como en los hongos biotróficos (Bellincampi *et al.*, 2014).

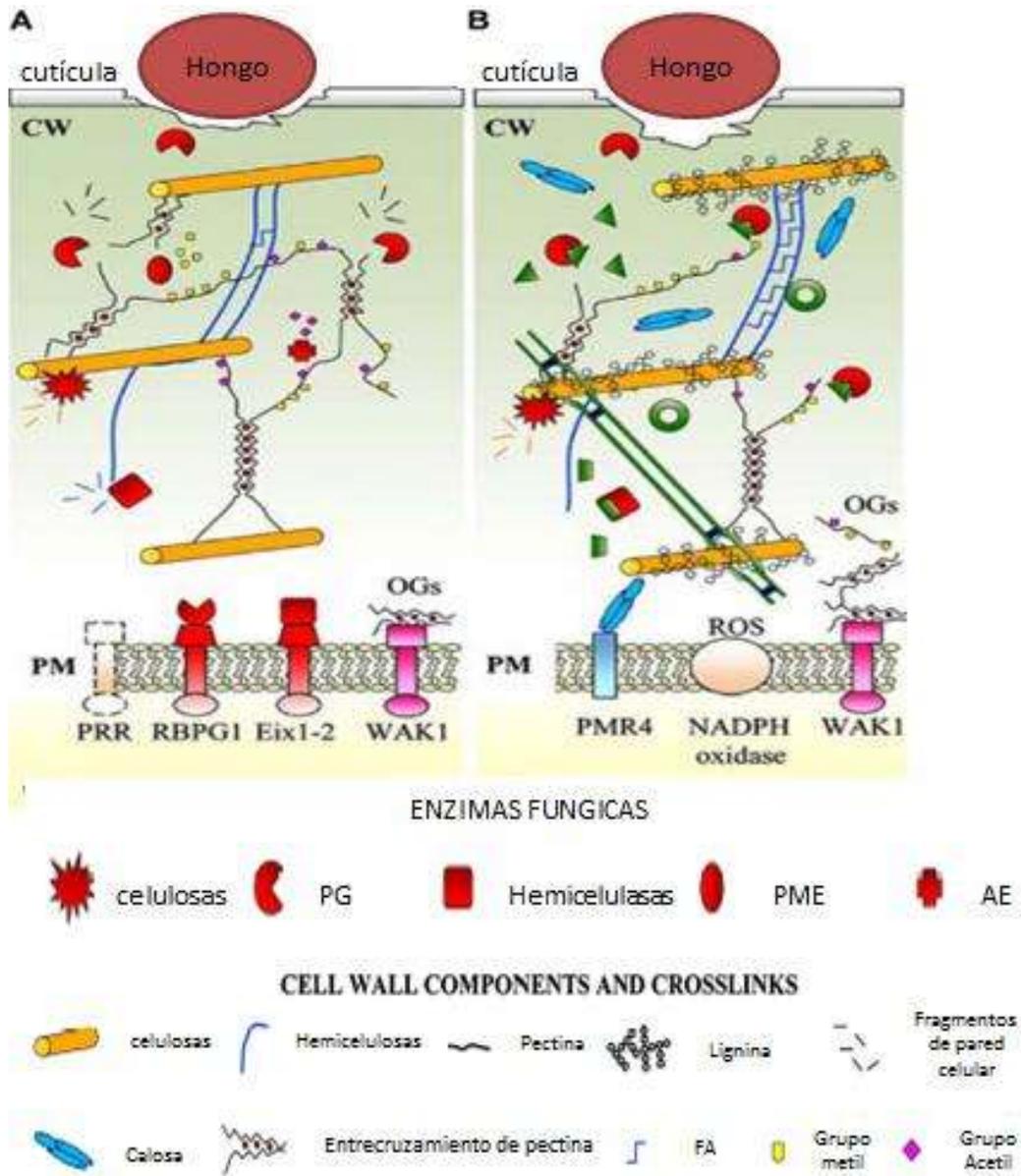
Evidencias indican que las células vegetales también usan mecanismos sofisticados de detección de la alteración de la integridad de la pared celular (CWI) durante el estrés biótico. La pérdida de la integridad de la pared celular inducida

por patógenos activa una diversidad de respuestas de defensa, incluyendo una remodelación de la pared celular requerida para prevenir la enfermedad. La sincronización de los diferentes procesos para el reforzamiento de la pared es clave para el éxito de defensa de la planta (Fig. 9) (Hamann, 2012; Pogorelko *et al.*, 2013).

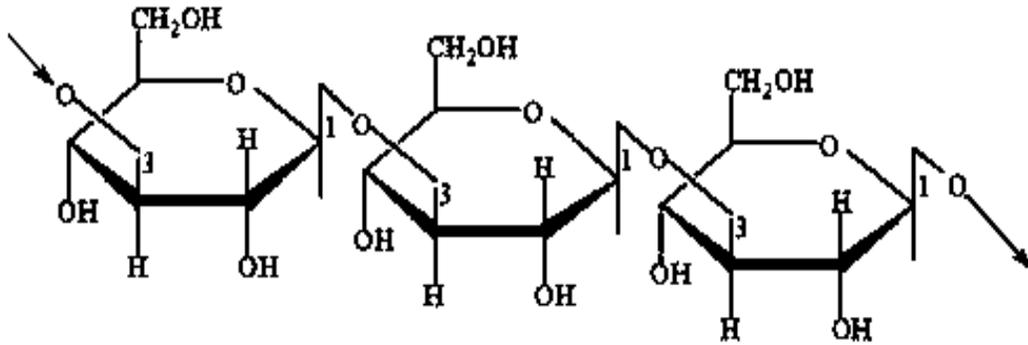
Una respuesta común por las plantas frente al ataque por patógenos es el reforzamiento de la pared celular mediante la deposición de calosa, logrando un engrosamiento en el sitio de penetración, más específicamente en los plasmodesmos para regular el movimiento de moléculas de célula a célula, mediante el control del límite de exclusión de tamaño, con la finalidad de evitar la propagación del patógeno. La calosa (Fig. 10), es un polisacárido compuesto por residuos de glucosa, unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,3 con una larga cadena helicoidal con ramificaciones  $\beta$ -1,6, siendo sintetizada por una enzima llamada calosa sintasa en el área de la membrana plasmática. Se deposita o destruye con mucha rapidez siempre que sea necesario aislar temporalmente una o más células formando estructuras muy compactas en la planta. La cantidad de la calosa acumulada depende del estímulo externo recibido (Arkhipova *et al.*, 2005).

Estudios realizados muestran que la calosa puede ayudar fuertemente en la resistencia a la penetración de patógenos cuando se depositan cantidades elevadas de ésta en momentos tempranos de la infección. En plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan la enzima calosa sintasa inducida por estrés, se detectó que la actividad de dicha enzima fue cuatro veces mayor que en las plantas no transgénicas, seis horas después de la inoculación con el patógeno *Golovinomyces cichoracearum*. La actividad de la calosa sintasa se relacionó con grandes depósitos de calosa, en los sitios de intento de penetración del patógeno (Ellinger *et al.*, 2013). La calosa es teñida con azul de anilina y observada en microscopio de fluorescencia (Fig.11) (Schenk *et al.*, 2015). Resultados similares se mostraron en el trabajo de Donofrio *et al.* (2000), en el que se demostró una relación estrecha entre la deposición de calosa en hojas de *A. thaliana* con el ataque del patógeno *Peronospora parasitica*. Los depósitos se encontraban en forma de collares, envolturas y envolturas gruesas, notando que esta formación de

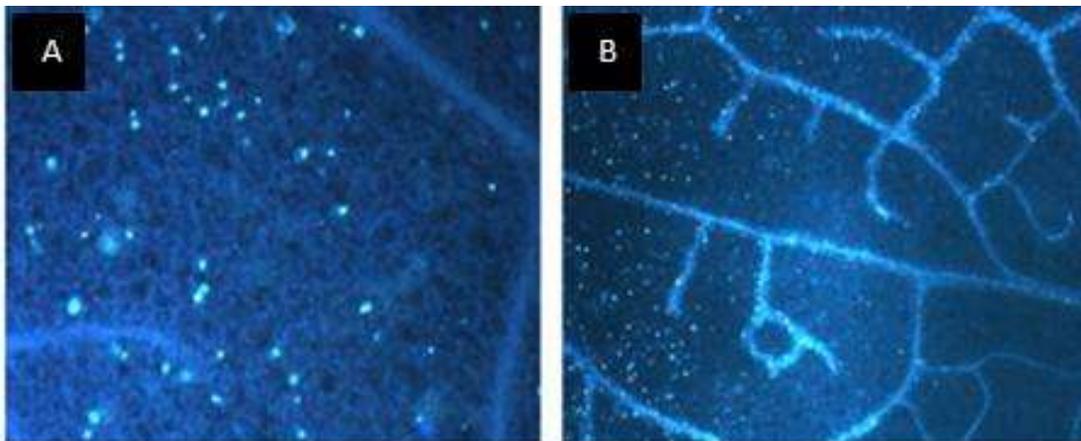
calosa se localizaba cerca del haustorio del patógeno durante la invasión. Bellincampi *et al.*, 2014



**Fig. 9. Dinámica de la pared celular durante una invasión por hongos necrótrficos** (Bellincampi *et al.*, 2014). A) Los hongos necrótrficos secretan un arsenal de enzimas que degradan la pared celular para facilitar la disponibilidad de nutrientes, estas enzimas son detectadas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), localizados en la membrana celular. B) Como primera línea de defensa, las plantas producen una variedad de inhibidores para las enzimas secretadas por el hongo, la inducción de peroxidasa, especies reactivas de oxígeno y la deposición de lignina y calosa.



**Figura 10.** Fragmento de la estructura de una molécula de calosa (Voigt *et al.*, 2008).



**Figura 11.** Imagen de depósitos de calosa en objetivos de 20X (A) y 40X (B) por microscopia de fluorescencia (Schenk *et al.*, 2015).

La calosa también puede contribuir a la defensa al impedir la transferencia de nutrientes al patógeno o posiblemente retrasando el crecimiento alargado (como el caso de las hifas) del patógeno, lo suficiente como para que otras defensas del huésped se vuelvan activas (Donofrio *et al.*, 2000).

En el reforzamiento de la pared celular también ocurre una lignificación (aumento de la producción de fenoles precursores de lignina y de  $H_2O_2$  en la pared, lo que permite su polimerización). La lignina es un polímero de cuerpos fenólicos (monolignoles) que son excitados por dictiosomas, se entrelazan en una red tridimensional alrededor de las microfibrillas por la acción de proteínas enzimáticas

que se encuentran en la membrana plasmática. Además ocurre un aumento en la producción y entrecruzamiento de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRPG) (Mims *et al.*, 2000).

En el caso del cultivo de fresa, hay investigaciones que indican que existe una clara relación entre la resistencia del pericarpio (piel) y la firmeza del fruto sobre la susceptibilidad a la infección por patógenos en plantas de fresa, ya que ésta en el fruto también se basa en la composición y estructura de la pared celular (Tabla 4).

**Tabla 4. Estrategias de defensa en el reforzamiento de la pared celular en plantas de fresa.**

ESTRUCTURA DE LA PLANTA	CULTIVAR DE FRESA (F. x <i>ananassa</i> )	TEJIDO	PATÓGENO	ACTIVIDAD DEFENSIVA	REFERENCIAS
Cutícula y pared celular	Chandler, Sweet Charlie	Fruto	<i>Botrytis cinerea</i>	Clara relación entre la fuerza de la piel o firmeza del fruto y la susceptibilidad a la infección por patógenos.	Gooding (1976); Barritt (1980)
Pared celular	Apollo , Sequoia, Surecrop	Peciolo	<i>Colletotrichum fragariae</i>	Engrosamiento de las paredes celulares y una deposición de carbohidratos está asociado con la restricción fúngica en el cultivar resistente.	Milholland (1982)
	Pájaro	Hoja, Peciolo	<i>Colletotrichum fragariae</i>	Engrosamiento de la pared celular	Salazar <i>et al.</i> (2007)

## 2.4. SIMBIOSIS CON MICROORGANISMOS BENÉFICOS DEL SUELO

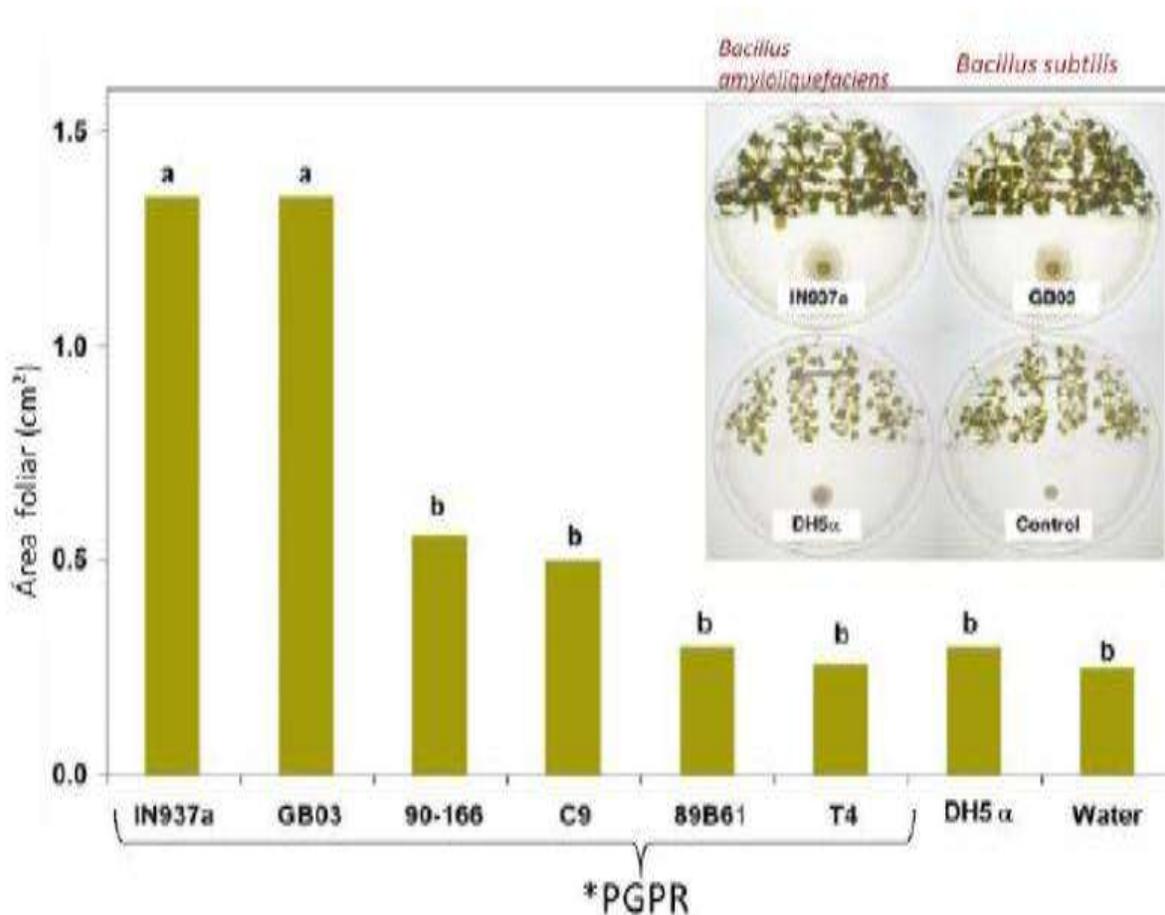
Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), se encuentran presentes en el suelo de manera natural, como parte de los microorganismos que habitan en la rizósfera (Banchio *et al.*, 2009). Las PGPR incluyen un amplio rango de bacterias colonizadoras de la raíz con la capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes y con ello el crecimiento y peso de la planta resultan favorecidos (Klopper y Schroth, 1978; Ping y Boland, 2004; Kai y Piechulla, 2009). Algunas rizobacterias que pertenecen a la categoría de las PGPR pertenecen a bacterias tanto Gram+ como Gram- (Haas *et al.*, 2002), siendo los géneros más abundantes *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Whipps, 2001; Ping y Boland, 2004; Ortíz-Castro *et al.*, 2008; Banchio *et al.*, 2009).

### 2.4.1. Las PGPR promueven el crecimiento y desarrollo vegetal

Los mecanismos propuestos para la promoción del crecimiento de la planta por las PGPR incluyen la síntesis bacteriana de fitohormonas como el AIA, las citocininas y las GAs. Por todos los beneficios que representan para las plantas, las PGPR se han propuestos como una herramienta alternativa para incrementar la producción de cultivos agrícolas (Glick *et al.*, 1995; 1999). Además de lo mencionado anteriormente, se tiene evidencia que algunos compuestos orgánicos volátiles producidos por las PGPR, denominados COVs, promueven el crecimiento vegetal e inducen la resistencia sistémica contra patógenos (Schulz *et al.*, 2007).

Evidencias de esto han sido presentadas por Ryu *et al.* (2003), quienes observaron que los volátiles emitidos por *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloloquefaciens* IN937a, lograron promover la biomasa aérea hasta un 50% en plantas de *A. thaliana*, comparadas con las plantas control (Fig. 12). En un análisis de los compuestos volátiles emitidos por dichas bacterias, encontraron que las 2 cepas presentaban variaciones en sus perfiles, sin embargo ambas bacterias

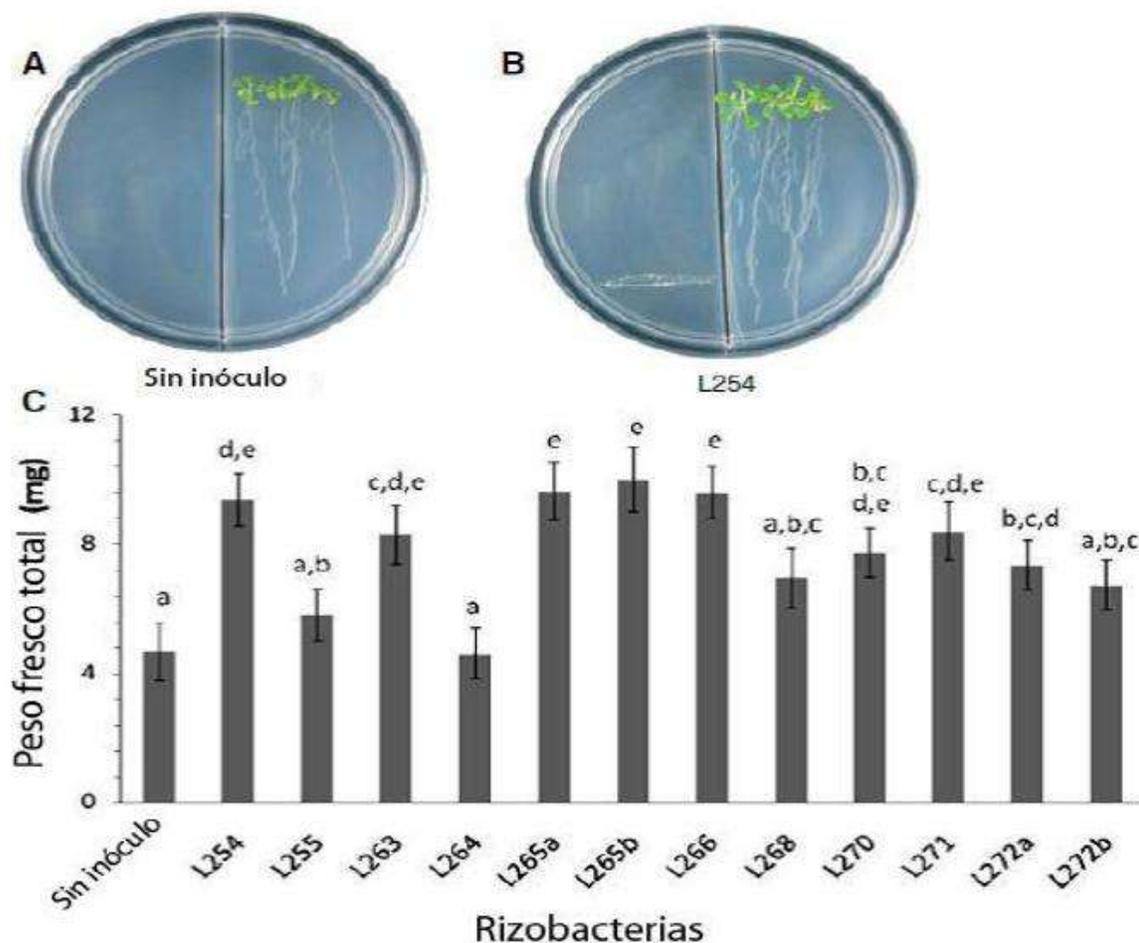
sintetizaron dos compuestos mayoritarios: la 3-hidroxi-2-butanona o acetoína y el 2,3-butanediol, considerados como los responsables de dicha promoción del crecimiento vegetal.



**Figura 12. Efecto de los COVs emitidos por las PGPR sobre el crecimiento foliar de *A. thaliana*.** (Ryu et al., 2003) Efecto promotor de *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a en plantas de *A. thaliana*, comparado con otras PGPR como *Serratia marcescens* 90-166, *B. pasteurii* C-9, *Pseudomonas fluorescens* 89B61 y *B. pumilus* T4, así como un control negativo *E. coli* DH5α y el control sin inocular.

En estudios más recientes, se analizó el efecto de los COVs de 12 rizobacterias aisladas de la rizósfera de limón sobre la promoción del crecimiento vegetal. Gutiérrez-Luna et al. (2010) observaron que las rizobacterias L254, L263, L265a,

L265b y L266 presentaron un mayor efecto promotor del crecimiento en plantas de *A. thaliana*; al incrementar el doble la biomasa comparadas con la plantas sin inocular (Fig. 13). Particularmente pudieron observar que nueve de las doce rizobacterias estimularon la longitud de la raíz primaria (LRP), de las cuales L263, L266 y L272a fueron las que presentaron un mayor efecto y en cuanto a las raíces laterales, la rizobacteria L265b fue la que incrementó en mayor cantidad el crecimiento de las raíces laterales.



**Figura 13. Efecto de los compuestos volátiles de diferentes rizobacterias sobre la biomasa de *A. thaliana*.** (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010). A y B) Fotografías representativas que muestran el efecto de la rizobacteria L254 sobre el crecimiento de *A. thaliana*. C) Peso fresco total de *A. thaliana* sin inóculo e inoculada con distintas rizobacterias.

Al caracterizar las rizobacterias de cada uno de los parámetros involucrados en crecimiento y desarrollo de la planta, determinaron que los aislados L254, L255 y L265a son pertenecientes a *Bacillus cereus*, L266 a *Bacillus simplex*, L270 a *Bacillus nealsonii* mientras que L272a tuvo un 100% de identidad con *B. cereus/thurigensis/anthracis* (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010).

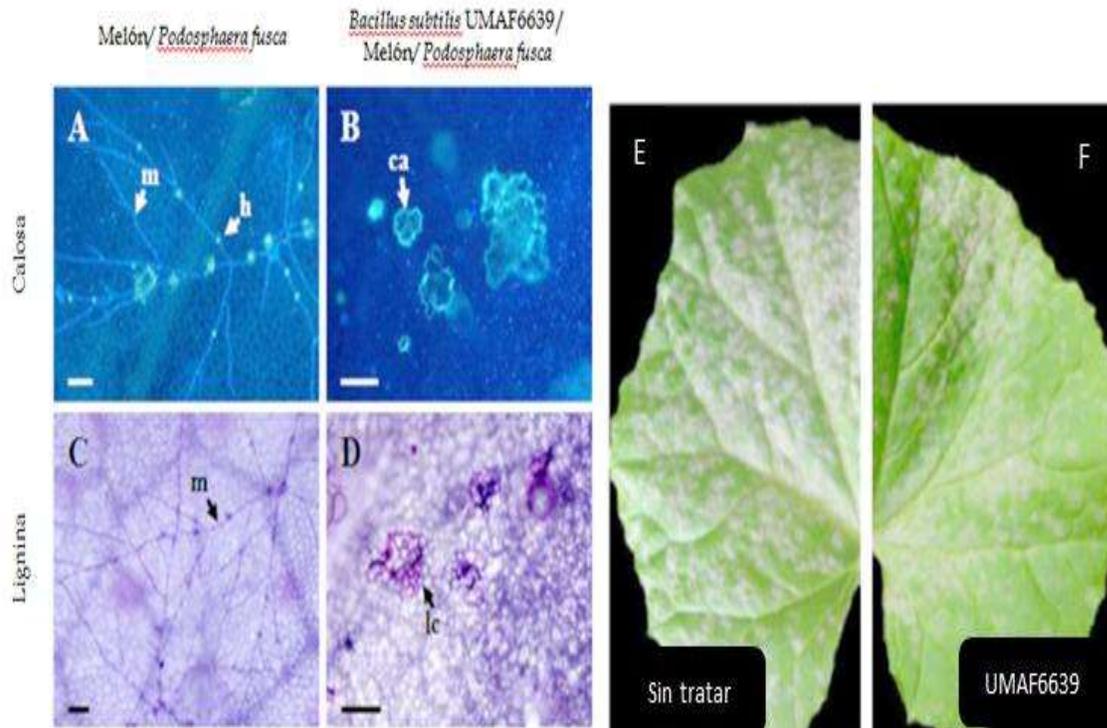
Particularmente para plantas de fresa se ha estudiado el efecto de bacterias del género *Azospirillum* en la promoción del crecimiento de tres cultivares comerciales ('Milsei', 'Selva', y 'Camarosa'). Éstas fueron inoculadas con cepas de *Azospirillum brasilense*: RLC1 (aislado de raíces), REC3 y PEC5 (obtenido de tejidos internos de raíces y estolones de plantas de fresa, respectivamente (Pedraza *et al.* 2007). El estudio arrojó que las diferentes cepas produjeron un efecto positivo en la promoción del crecimiento de plantas de fresa, expresándose en la longitud de la raíz, área de la raíz, peso seco de la raíz y peso de los retoños, teniendo mejores resultados con aquellas bacterias aisladas de tejidos internos de la planta (Pedraza *et al.*, 2010).

El género *Bacillus* por otro lado ha demostrado mejorar la calidad en el fruto de las plantas de fresa, aumentando el número y el peso de éstos por planta (Erturk *et al.*, 2012).

#### 2.4.2. Las PGPR estimulan las estrategias de defensa en las plantas

Otra característica importante de las PGPR es que controlan la presencia de fitopatógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos (Banchio *et al.*, 2009) e inducen un mecanismo de resistencia en la planta llamada "resistencia sistémica inducida" (ISR, por sus siglas en inglés). La resistencia inducida es un estado fisiológico mejorado de la capacidad defensiva provocado por un organismo no patológico o un estímulo ambiental específico, por el cual las defensas innatas de la planta se ven potencializadas contra subsecuentes desafíos bióticos (Van Loon *et al.*, 1998).

En cuanto a la inducción de estrategias físicas de defensa por PGPR, se tiene un estudio tripartita, que corrobora que la producción de depósitos de calosa en la planta reduce el avance de la infección producida por un patógeno. García-García-Gutiérrez *et al.* (2012) realizaron inoculaciones en las hojas de plantas de melón con *Bacillus subtilis* UMAF6639 y el patógeno *Podosphaera fusca*; un análisis histológico mostró un incremento en la acumulación de depósitos de calosa, que se correlacionó con una reducción de la sintomatología en las plantas tratadas en comparación con las control (Fig. 14) (García-Gutiérrez *et al.* 2012).



**Figura 14. Análisis histológico de la pared celular de hojas de melón y efecto supresor de UMAF6639 hacia *Podosphaera fusca*.** A y B) Detección de depósitos de calosa (ca). La haustoria (h) puede ser distinguida en puntos azules y la hifa (m) del hongo. C y D) Depósitos de lignina (lc) analizados con toluidina. E) Hojas de melón inoculadas con *Podosphaera fusca* sin tratamiento previo con *Bacillus* y con tratamiento previo (F).

Otra evidencia de esto es presentada por Tahmatsidou *et al.* (2005), quienes reportaron que *B. subtilis* F2B241 es capaz de suprimir al patógeno *Verticillium* en plantas de fresa variedad selva; se registró el rendimiento y peso del fruto, así como el peso fresco y seco de la raíz. Los resultados mostraron que el efecto de los tratamientos con *B. subtilis* F2B241 eran comparables con el control, sin embargo con diferencias significativas en la mayoría de los parámetros con el tratamiento con el patógeno. Se manifiesta que la rizobacteria ayuda a mitigar la enfermedad producida en plantas de fresa por *Verticillium* por medio de la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR).

Específicamente en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), se cuenta con un estudio tripartita que revela resultados similares; las plantas fueron inoculadas en el área de la raíz con *Azospirillum brasilense*, procediendo después a una inoculación con el hongo patógeno *Colletotrichum acutatum*, observándose modificaciones en la estructura de la pared celular, tales como el aumento en la producción de calosa, teniendo como consecuencia una reducción en la sintomatología de la antracnosis (Tortora *et al.* 2014).

## **2.5. ASPECTOS RELEVANTES DEL GÉNERO *Bacillus***

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño (4-10 µm), Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Una característica importante es que forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables. Aunque la mayoría de las especies de *Bacillus* son inocuas, algunas son patógenas para los humanos y animales (Layton *et al.* 2011).

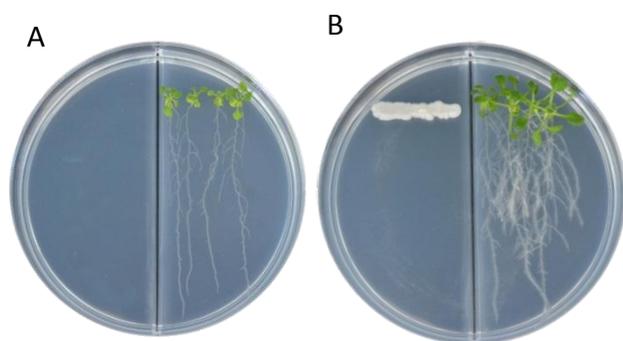
Se ha reportado que pueden actuar como promotoras del crecimiento y desarrollo vegetal como es el caso de *B. megaterium* UMCV1 que promueve el crecimiento de *A. thaliana* (López-Bucio *et al.*, 2007), mediante la síntesis de antibióticos o compuestos con efecto contra organismos patógenos de la rizósfera, o por la síntesis y excreción de fitohormonas a la rizósfera. Otra característica del género *Bacillus* es su habilidad para inducir la resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas.

### **2.5.1. *Bacillus* sp. M4-96**

En específico, la rizobacteria *Bacillus* sp. M496 fue aislada de la rizósfera de maíz a partir de un suelo proveniente de un campo agrícola de la localidad de El Lometón, (101°8', 19°42') municipio de Tarímbaro, Michoacán a una profundidad de 0 y 20 cm.

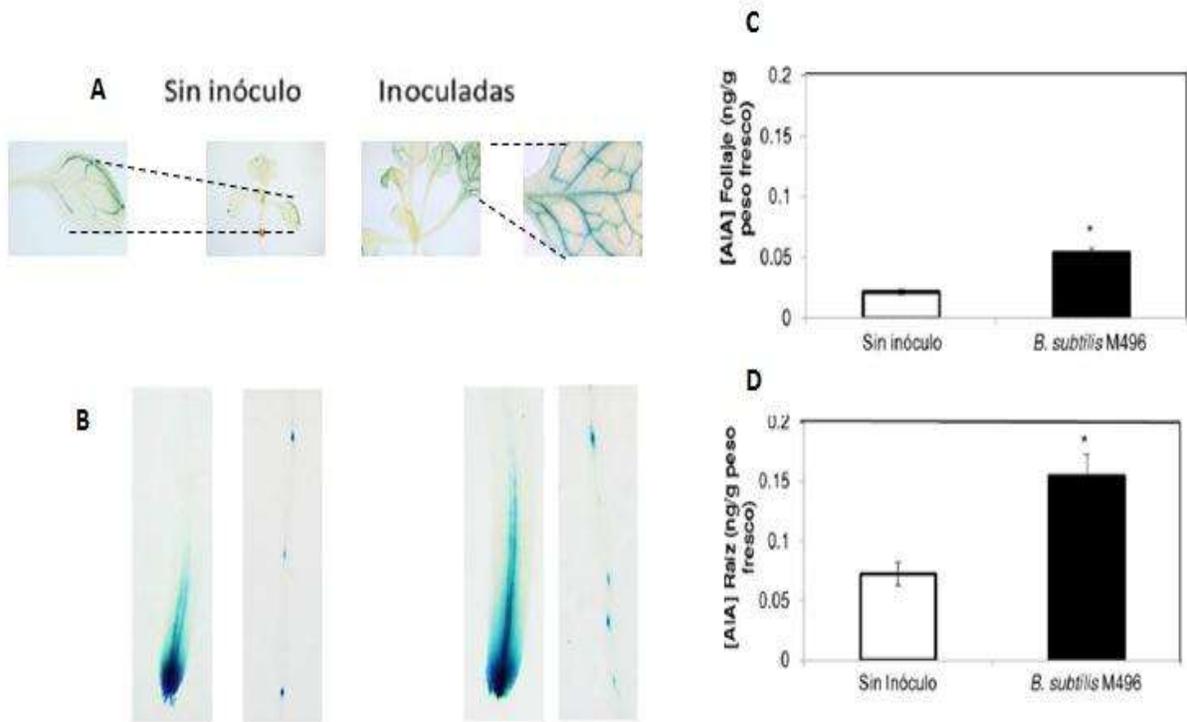
Pérez-Flores en el 2013 analizó que esta rizobacteria estimula el crecimiento de plantas de *A. thaliana* mediante la producción de compuestos volátiles. Usando placas divididas, colocaron la bacteria en una mitad de la placa y semillas de *Arabidopsis* en la otra mitad, de lo cual pudieron observar un notable incremento tanto en la biomasa aérea como radicular. Un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (CG-EM) reveló que la acetoína es el compuesto volátil producido mayoritariamente por la bacteria, suponiendo sea el responsable de dicho crecimiento vegetal (Fig. 15).

En este estudio, para tratar de determinar el mecanismo de señalización hormonal mediante el cual se ejerce este efecto, la línea transgénica de *A. thaliana* *DR5::GUS* fue expuesta a los compuestos volátiles de la cepa M4-96; esta línea expresa el marcador de respuesta a auxinas de tal manera que un aumento en la expresión del marcador infiere una activación de esta vía de señalización hormonal. Se observó un efecto promotor dependiente de la vía de las auxinas, debido a un incremento de la expresión en los meristemos apicales y en los haces vasculares, en comparación con las líneas no inoculadas. Esto se correlacionó con un incremento en la síntesis de AIA, a los 10 días después de la interacción tanto en la raíz como en el follaje, por lo que se concluyó que los COVs inducen la síntesis y el transporte de auxinas en plantas de *A. thaliana* (Fig. 16).



Compuestos volátiles identificados por SPME	
Compuesto	<i>Bacillus sp.</i> M4-96 %Área
Acetoína	74.03
Acetofenona	5.10
1-Octanol	2.96
Ciclodecano	2.16
9- Octadecanona	1.27

**Figura 15.** La rizobacteria *Bacillus sp. M496* estimula el crecimiento de *A. thaliana* mediante la producción de compuestos volátiles. (Pérez-Flores, 2013). A) Plantas control y plantas en interacción con *Bacillus*, mostrando una evidente promoción vegetal tanto en la biomasa área como en la radicular. B) Componentes mayoritarios identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas.



**Figura 16. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria y en la zona de formación de primordios en *A. thaliana* y cuantificación de la auxina AIA.** A y B) Plantas sin inóculo y expuestas a volátiles de *Bacillus* durante 10 días, donde se observa una expresión aumentada en las zonas de síntesis de auxinas. C y D) Cuantificación de AIA en el área foliar y radicular.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de fresa es muy importante a nivel mundial y para el Estado de Michoacán representa una entrada fuerte de divisas. En la literatura son muy escasos los estudios sobre las estrategias de defensa que se activan en las plantas de fresa durante la fase dos de la infección causada por el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*, el principal hongo patógeno que afecta al cultivo.

Los bioinoculantes estimulan no sólo el crecimiento y desarrollo vegetal sino también la inmunidad de las plantas. *Bacillus sp.* M4-96 es una rizobacteria que estimula el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* mediante la emisión de sus compuestos volátiles, por lo que resulta interesante determinar si esta rizobacteria promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas de fresa, así como la inducción de las estrategias de defensa estructural y química durante la fase dos de la infección causada por el hongo.

#### **4. HIPÓTESIS**

*Bacillus* sp. M4-96 promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Aromas) y la inmunidad contra el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta fisiológica de las plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) ante la inoculación de *Bacillus* sp. M4-96 y la infección con *Botrytis cinerea*

### 5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar el efecto de *Bacillus* sp. M4-96 sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de fresa.
- 2) Determinar si *Bacillus* sp. M4-96 induce respuestas de defensa en la planta que limiten el progreso de la infección causada por *Botrytis cinerea*.

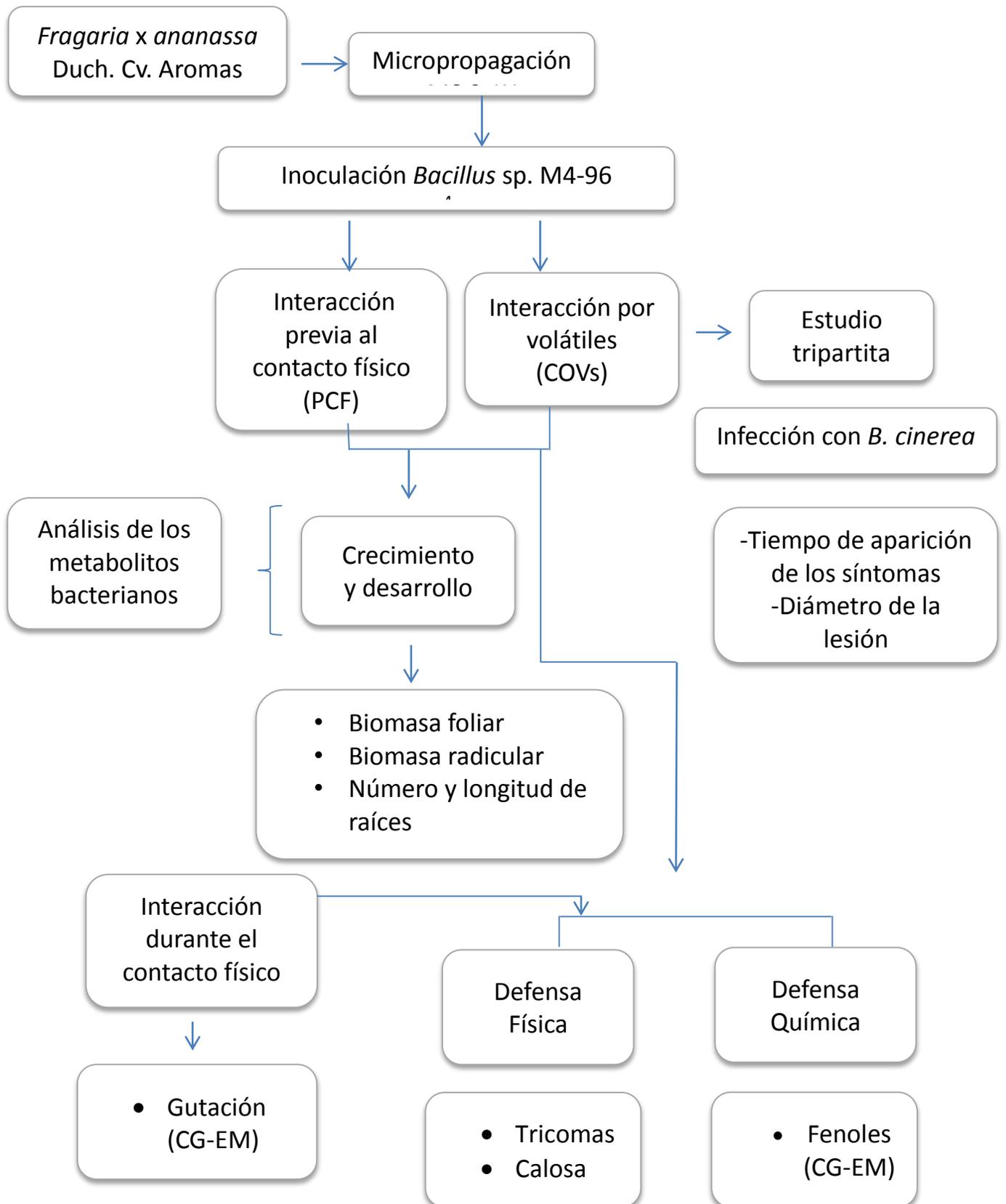
## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el estudio *in vitro* de la interacción plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) *Bacillus* sp. M4-96, las plantas fueron micropropagadas para obtener suficiente material vegetal; un grupo de plantas se designó como grupo control; otro grupo se inoculó con la bacteria en un extremo del frasco y se registraron diversas variables de crecimiento y desarrollo en dos tiempos diferentes, a los 8 d que fue previo, al contacto físico (PCF) y a los 30 d que fue durante el contacto físico (DCF).

Finalmente un último grupo de plantas fue expuesto a los compuestos volátiles de la bacteria por 8 y 30 d, es decir en este tratamiento no hubo un contacto físico. Las variables de crecimiento y desarrollo que se midieron fueron: cantidad de peciolo, longitud de peciolo, cantidad de raíces, longitud de raíces, biomasa foliar y biomasa radicular. Adicionalmente, se analizó el tipo de metabolitos difusibles que produce la rizobacteria con efecto promotor del crecimiento y desarrollo vegetal por cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-EM).

Para determinar el efecto de la rizobacteria sobre la estimulación de las estrategias de defensa en todos los grupos de plantas, las variables que se midieron fueron la producción de tricomas, la composición química de la hoja buscando de metabolitos relacionados con la biosíntesis de compuestos fenólicos por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y la acumulación de depósitos de calosa por microscopía de fluorescencia.

Finalmente, para validar el efecto de *Bacillus* sp. M4-96 sobre la estimulación de los mecanismos de defensa en las plantas, se realizó un estudio tripartita donde se utilizó al hongo necrótrofo *B. cinerea*.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 7.1.1. Plántulas de fresa Cv. Aromas

Se utilizaron plántulas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas), micropropagadas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del IIQB-UMSNH, para producir las necesarias durante la experimentación. La micropropagación se realizó con la siembra de segmentos de corona de tallo en medio de Murashige y Skoog (MS) con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar, pH 5.7 (Tapia-Rodríguez, 2002). Las plántulas de fresa de 30 días fueron trasplantadas en MS 0.1X (Tabla 5) y a los 20 d fueron inoculadas. Este medio fue utilizado con el propósito de controlar el crecimiento explosivo de la bacteria.

**Tabla 5. Contenido de las soluciones stock del medio MS 0.1X**

STOCK 1 (50 ml)	STOCK 2 (250 ml)	STOCK 3 (100ml)	STOCK 4 (100ml)	STOCK 5 (250 ml)	STOCK 6 (250 ml)
CaCl <sub>2</sub> (25 g)	MgSO <sub>4</sub> (9.25 g)	FeSO <sub>4</sub> (0.5 g)	MnSO <sub>4</sub> (1.62 g)	Glicina (0.5 g)	NH <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> (41.25 g)
-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (4.25 g)	NaEDTA (0.7 g)	ZnSO <sub>4</sub> (1.05 g)	Piridoxina (0.0125 g)	KNO <sub>3</sub> (47.5 g)
-	-	-	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0.62 g)	Ac. Nicotínico (0.025 g)	-
-	-	-	KI (0.84 g)	Tiamina HCL (0.0025 g)	-
-	-	-	NaMoO <sub>4</sub> (0.025g)	Mg-inositol (2.5 g)	-
-	-	-	CuSO <sub>4</sub> (0.0025 g)	-	-
-	-	-	CuCl <sub>2</sub> (0.0025 g)	-	-

La cantidad en volumen de las soluciones stock que se requieren para el medio MS 0.1X se indican en la Tabla 6.

Las condiciones de cultivo *in vitro* en toda la fase de experimentación fueron: 25°C, fotoperiodo de 16 h de luz, 2000 luxes. En la figura 17 se muestran fotografías representativas de las plantas cultivadas en el sistema *in vitro*.

**Tabla 6. Volúmenes de las soluciones stock empleadas para la preparación del medio MS**

STOCK	½ LITRO	1 LITRO
1	50µl	100µl
2	500µl	1ml
3	250µl	500µl
4	50µl	100µl
5	500µl	1ml
6	500µl	1ml



**Figura 17. Plantas de fresa micropropagadas en medio MS 0.1X bajo condiciones de cuarto de cultivo.**

### **7.1.2. Cultivo de la cepa de *Bacillus sp.* M4-96**

En un comienzo, la bacteria se encontraba en stocks de caldo de nutritivo (BIOXON, numero de catálogo 210300) con glicerina a -20°C, por lo que fue recultivada en placas Petri con medio nutritivo. La caja Petri con la bacteria se mantuvo en una incubadora a 37°C por 24 h para el apropiado crecimiento de la bacteria.

Para cuantificar la cantidad de bacteria que se utilizaría en cada ensayo, se preparó medio nutritivo en caldo en un matraz Erlenmeyer, se tomó una asada de *Bacillus sp.* M4-96 proveniente de la caja Petri y se inoculó el matraz. El recipiente se mantuvo en agitación constante por 24 h a 35°C. Cada tratamiento fue inoculado con  $1 \times 10^4$  UFC; la cantidad de células se midió por espectrofotometría, a una longitud de onda de 595nm y 0.02 de absorbancia, tomando como blanco caldo nutritivo sin inóculo (Olmez *et al.*, 2005).

### **7.1.3. Cultivo de *B. cinerea* y preparación de las suspensiones de esporas**

El medio utilizado para el mantenimiento del hongo fue el PDA (Papa-Dextrosa-Agar) (BIOXON, numero de catálogo 211900); el hongo fue crecido en caja Petri a una temperatura entre 25 – 28°C, durante 8 d.

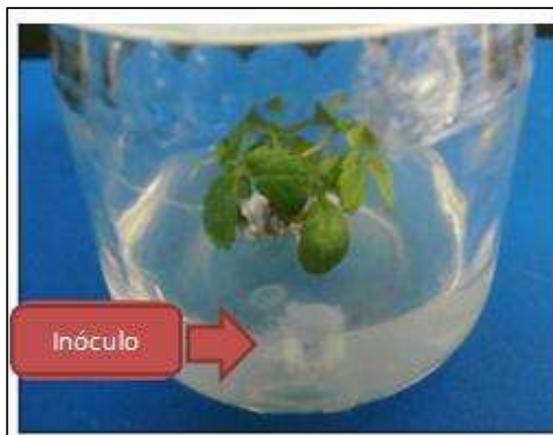
Al cabo de ese tiempo, en la caja podía notarse un cambio en la coloración del micelio de blanco a gris, indicativo de la producción de esporas. La recolección de esporas se realizó agregando agua destilada estéril a la caja Petri y agitando suavemente para remover la mayor cantidad de esporas. Éstas se recolectaron en un tubo eppendorf y se almacenaron en el refrigerador a 4°C.

La cuantificación de esporas se realizó en una cámara de Neubauer, con el protocolo y cálculos ya establecidos para este método.

## 7.2. MÉTODOS

### 7.2.1. Interacción planta – bacteria

Las plantas obtenidas de acuerdo al apartado 7.1.1., fueron inoculadas de la siguiente manera. En un extremo del frasco y sobre el medio de cultivo se depositó un inóculo de  $1 \times 10^4$  UFC. Al cabo de 8 d y previo al contacto físico (PCF) se midió el peso fresco, cantidad de raíces y peciolo, así como la longitud de los mismos con un vernier (Fig. 18). Estos mismos parámetros fueron medidos a los 30 d, momento en el cual la bacteria ya se encontraba colonizando la planta y este tiempo se designó como DCF (después del contacto físico).



**Figura 18. Fotografía representativa del tratamiento previo al contacto físico (PCF) entre planta de fresa y *Bacillus sp. M4-96*.**

### 7.2.2. Interacción mediante la emisión de compuestos volátiles

Para este sistema de interacción de compartimentos separados, la bacteria ( $1 \times 10^4$  UFC) se inoculó en un tubo Eppendorf de 1.5 cm con medio MS 0.1X que fue el mismo medio que se utilizó para los ensayos PCF y DCF. El tubo se introdujo dentro del frasco que contenía la planta micropropagada de acuerdo al apartado 7.1.1 y los parámetros de crecimiento y desarrollo vegetal fueron medidos a los 8 y 30 d después de la interacción (Fig. 19).



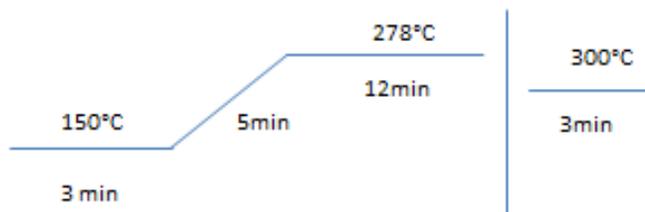
**Figura 19. Fotografía representativa del sistema de interacción planta de fresa - *Bacillus sp.* M4-96 mediante la emisión de compuestos volátiles.**

### **7.3. Análisis de los compuesto que produce *Bacillus sp.* M4-96 en el medio de cultivo.**

Para este protocolo se preparó 1 litro de medio MS 0.1X líquido, después de esterilizarlo se inóculo a la bacteria y se dejó 48h en agitación constante a 37°C. Posteriormente se centrifugó para separar las células y el sobrenadante se trató de la siguiente manera:

- a) Se bajó el pH a 3 con la finalidad de identificar la presencia de fitorreguladores como el ácido indol acético (AIA) y el ácido giberélico (GA3), ampliamente reportados para el género *Bacillus* y con efecto en el crecimiento y desarrollo vegetal (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2004; Arkhipova *et al.*, 2005; Idris *et al.*, 2007).
- b) Se agregó acetato de etilo, se mezcló y se recuperó la fase orgánica.
- c) La muestra se concentró en un rotavapor, se resuspendió en 2ml de acetato de etilo y se derivó para su análisis por cromatografía de gases (CG) de la siguiente manera:
  - 1) La muestra resuspendida se pasó a reactivales y se llevó a sequedad total con N<sub>2</sub> gaseoso

- 2) Se agregaron 2ml de la solución de cloruro de acilo en metanol (1:4 cloruro de acilo/metanol respectivamente)
- 3) Se sonicó 15 minutos
- 4) La muestra se calentó a 75°C por una hora
- 5) Se atemperó a 30 °C aproximadamente
- 6) Se volvió a secar con N<sub>2</sub> gaseoso
- 7) A cada muestra se le agregó 1ml de diclorometano y 1.5 ml de anhídrido acético
- 8) Se calentó nuevamente a 75°C por 1 hora
- 9) Se colocó la muestra en un vial ámbar
- 10) Se llevó a sequedad con gas N<sub>2</sub>
- 11) Finalmente, se agregaron 50µl de acetato de etilo y se inyectó 1µl en el CG —acoplado a un espectrómetro de masas (EM) bajo las condiciones de separación mencionadas en la figura 20.



**Figura 20. Condiciones usadas en el CG-MS para el análisis de fitorreguladores.**

- 12) Para la identificación de AIA se realizó un monitoreo selectivo de iones (SIM) con los iones 130 y 189 m/z, mientras que para el GA3 los iones seleccionados fueron 155, 195, 238 y 298 m/z. El tiempo de retención de los fitorreguladores y los iones utilizados en el SIM fueron obtenidos mediante el análisis previo de los estándares respectivos.
- 13) Finalmente se llevó a cabo la cuantificación de los fitorreguladores mediante la creación de curvas patrón con los estándares.

#### **7.4. Cuantificación del contenido de tricomas**

Se cuantificó el número de tricomas glandulares y no glandulares por hoja, las hojas tomadas de los 3 tratamientos (Control, Difusibles y volátiles) fueron lo más homogéneamente posible en tamaño, para ello la hoja se dividió en 4 cuadrantes y se observó en el microscopio de luz en un objetivo de 40X. El número de tricomas que se reporta corresponde a la sumatoria de los cuadrantes haciéndose el conteo respectivo de cada cuadrante de los tricomas, teniendo una n=5.

#### **7.5. Identificación de los depósitos de calosa**

El análisis de los depósitos de calosa se realizó en las hojas de cada tratamiento de la siguiente manera: (Schenk et al., 2015).

- a) 3 hojas de diferentes peciolo de la misma planta fueron clareadas en una solución 1:3 de ácido acético/etanol (v/v) por 8 h en tubos Falcon.
- b) Las hojas desteñidas fueron lavadas en una solución 150 mM de  $K_2HPO_4$  por 30 minutos.
- c) En un tubo Falcon cubierto con aluminio para proteger de la luz, se preparó una solución 150 mM de  $K_2HPO_4$  y 0.01% de azul de anilina (Colorante), las hojas se dejaron toda la noche en esta solución y posteriormente se lavaron con agua destilada y montadas en portaobjetos.
- d) Las muestras fueron observadas en un microscopio Zeiss de fluorescencia a una longitud de onda de 365nm.

#### **7.6. Análisis de la composición de las gotas provenientes del proceso de gutación en las plantas de fresa durante el contacto físico entre *Fragaria x ananassa* y *Bacillus* sp. M4-96**

El fenómeno de la gutación se presentó en las plantas DCF con la bacteria. Las gotas se recolectaron a los 20 d después del contacto físico en viales ámbar para evitar que algún compuesto se degradara al contacto con la luz. Posteriormente se

agregaron 50µl de acetato de etilo, para extraer los compuestos, posteriormente fueron derivados como se menciona en el apartado 7.3 y analizados en el CG-EM con las condiciones mencionadas en la figura 20.

### **7.7. Composición química de las hojas de fresa**

Para determinar si la bacteria induce la síntesis de compuestos fenólicos implicados en la defensa química en las plantas de fresa, las hojas de los tratamientos control y por interacción DCF, se colectaron y se pesó 0.5 g. Las hojas se molieron con nitrógeno líquido, se pasaron a tubos Falcon donde se les agregó agua destilada y se ajustó el pH a 3. La extracción se realizó con acetato de etilo, se recuperó la fase orgánica, la cual posteriormente se concentró en un rotavapor. La muestra se resuspendió en 50 µl de acetato de etilo y se inyectó 1 µl en el CG-EM bajo las condiciones de análisis de la figura 20.

Durante el análisis se identificó al 2,4-di-tert-butil-fenol, un compuesto con actividad antimicrobiana contra *Phytophthora cinnamomi* (Rangel-Sánchez *et al.*, 2013). La identidad del compuesto se corroboró mediante la comparación del tiempo de retención y el patrón de masas del compuesto puro. Para determinar el efecto antagónico de este fenol contra *B. cinerea in vitro*, las esporas del hongo se colocaron en un tubo Eppendorf, donde se agregó 1ml de caldo PD; el fenol fue agregado en concentraciones finales de 10, 100 y 1000 µg/ml al medio líquido que contenía  $1 \times 10^3$  esporas /ml. Después de 3 días de incubación en cámara de cultivo (24°C, 8h de luz por 16 de obscuridad, 60% humedad), el porcentaje de germinación fue observado usando un microscopio de luz.

### **7.8. Estudio tripartita *Fragaria x ananassa-Bacillus sp.M4-96-Botrytis cinerea***

Para validar el hecho de que *Bacillus sp. M4-96* refuerza la defensa física y química en plantas de fresa, se decidió realizar un estudio tripartita en el cual las plantas se dejaron 8 d en interacción con los compuestos volátiles de la bacteria (ver apartado 7.2.2), transcurrido este tiempo se inoculó  $1 \times 10^3$  esporas/ml de *B.*

*cinerea* (recuento hecho en la cámara de Neubauer), en la corona de las plantas. El grupo control consistió en las plantas inoculadas con el hongo sin el tratamiento previo con la bacteria. Se hicieron mediciones indirectas del avance de la infección tales como longitud de las lesiones por peciolo y número de peciolos necrosados por planta a los 3,6 y 9 días después de la inoculación del hongo.

Con el objetivo de conocer si los volátiles de la bacteria no inhibían el crecimiento del hongo, se realizaron ensayos de enfrentamiento en cajas Petri divididas, una mitad de la caja contenía medio PDA y la otra mitad agar nutritivo, donde fueron inoculados el hongo y la bacteria, respectivamente. Se procedió a realizar una medición del diámetro del crecimiento del hongo.

### **7.9. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se efectuó mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y una posterior comparación de medias por la prueba de Fisher LSD con un alfa de 0.05. Cuando se realizaron comparaciones entre dos tratamientos, se empleó la prueba t-Student para variables independientes con un alfa de 0.05. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software Statistica 7.0.

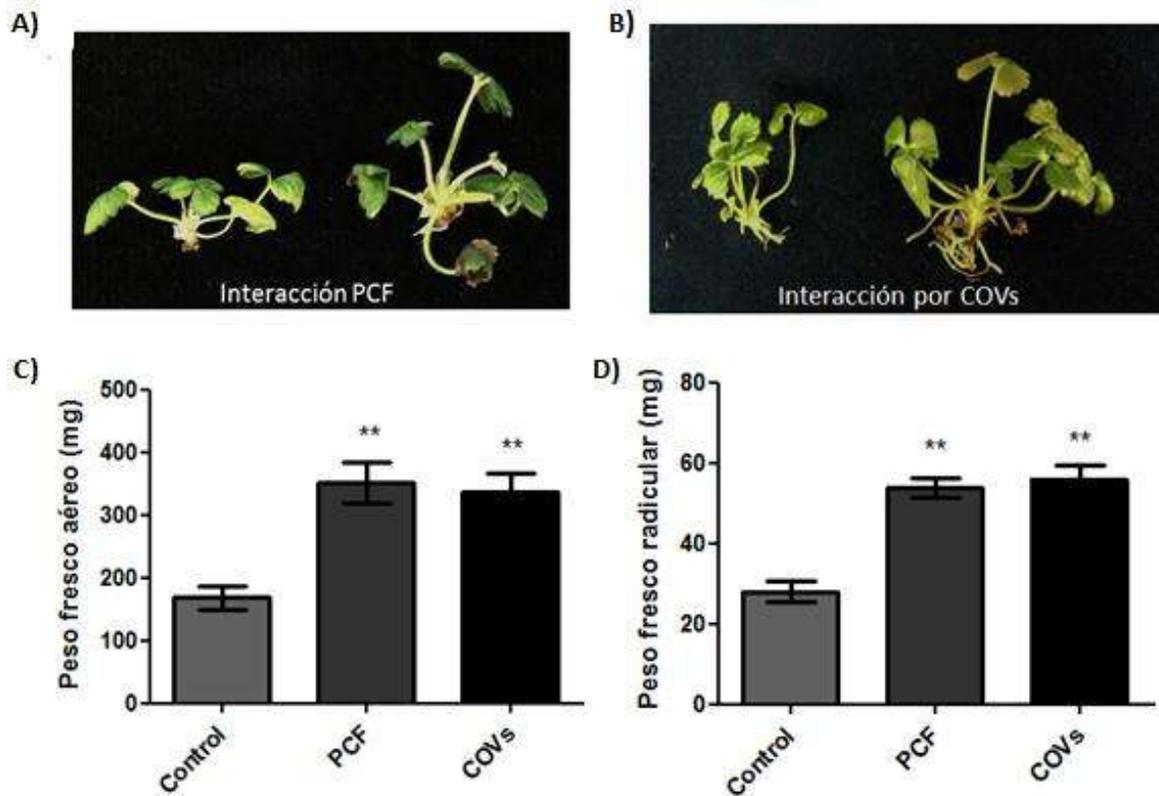
## 8. RESULTADOS

### 8.1. Efecto de *Bacillus* sp. M4-96 sobre el peso fresco de plantas de fresa PCF y mediante la emisión de COVs

Como primer resultado se muestra la acumulación del peso fresco aéreo y peso fresco radicular para las plantas control y las inoculadas con la bacteria, tanto en interacción PCF y por COVs.

A los 8 d se observó que en ambos tratamientos (PCF y COVs), la bacteria estimuló el crecimiento de la parte foliar y radicular de las plantas de fresa. En la figura 21 (A y B) se muestran fotografías representativas de una planta control y las inoculadas. Las plantas control presentaron un peso foliar promedio de 168.5 mg, mientras que las plantas en interacción con la bacteria PCF y por COVs el peso fue de 351 mg y 336.2 mg, respectivamente, es decir, la bacteria promovió el doble del crecimiento del follaje, comparado con el de las plantas control sin inóculo (Fig. 21C).

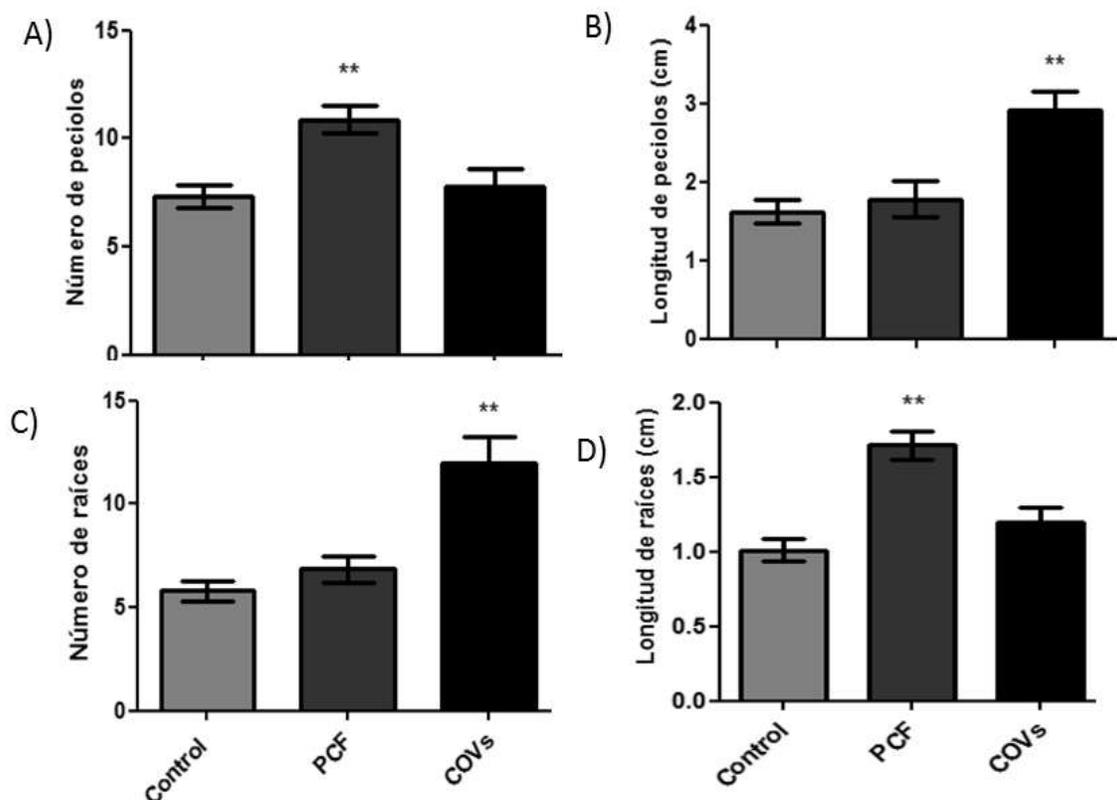
De igual forma en el caso del peso de la raíz, se observó un aumento significativo por efecto de la inoculación con *Bacillus* sp., ya que en el control axénico el peso fue de 28mg y en la interacción PCF y por COVs fue de 53.8 y 56 mg, respectivamente (Fig. 21D); es decir también hubo un incremento de hasta 2 veces más que en las plantas control.



**Figura 21. Efecto de *Bacillus sp.* M4-96 sobre el crecimiento de las plantas de fresa.** A) Fotografía representativa de una planta sin inóculo y en interacción DCF a los 8 d después de la inoculación. B) Fotografía representativa de una planta control y una que interactuó con los COVs de la bacteria a los 8 d después de la inoculación. C) Peso fresco del follaje. D) Peso fresco de la raíz en cada tratamiento. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los tratamientos. ANOVA. Fisher LSD  $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ .

## 8.2. Efecto de *Bacillus* sp. M4-96 sobre diversos parámetros del desarrollo de plantas de fresa PCF y mediante la emisión de COVs.

Particularmente, para determinar el efecto de la bacteria sobre los parámetros de desarrollo en los tratamientos PCF y por COVs, se midió el número de peciolo y raíces, así como su longitud. En la Fig. 22 (A-D), se puede observar una respuesta diferencial de la planta hacia el tipo de tratamiento bacteriano. Al tener plantas en interacción PCF se observó que la bacteria promovió un aumento en el número de peciolo por planta y la longitud de las raíces, mientras que en el tratamiento con COVs, hubo un aumento en la longitud de los peciolo y un incremento en el número de las raíces.



**Figura 22. Efecto de *Bacillus* sp. M4-96 sobre el desarrollo de plantas de fresa PCF y mediante la emisión de COVs.** A) Número de peciolo; B) longitud de peciolo; C) número de raíces; y D) longitud de raíces para cada tratamiento. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre tratamientos. ANOVA. Fisher LSD  $\alpha=0.05$ ,  $n=9$ .

### 8.3. Identificación de compuestos bioactivos de *Bacillus* sp. M4-96.

La respuesta diferencial de la planta en los tratamientos PCF y COVs observado en la figura 22 fue de gran interés, por lo que se decidió analizar el tipo de metabolitos microbianos que pudieran ser los responsables de este efecto.

En la Tabla 7, se reporta que la cepa M4-96, produce ambos fitorreguladores. Para el caso de la auxina, se encontró que produce 0.21 µg/L ( $1 \times 10^{-9}$  M), y de la giberelina 6.16 µg/L ( $1 \times 10^{-8}$  M). Los tiempos de retención y el patrón de masa de cada fitorregulador, se comparó con el de los compuestos puros para garantizar su identidad.

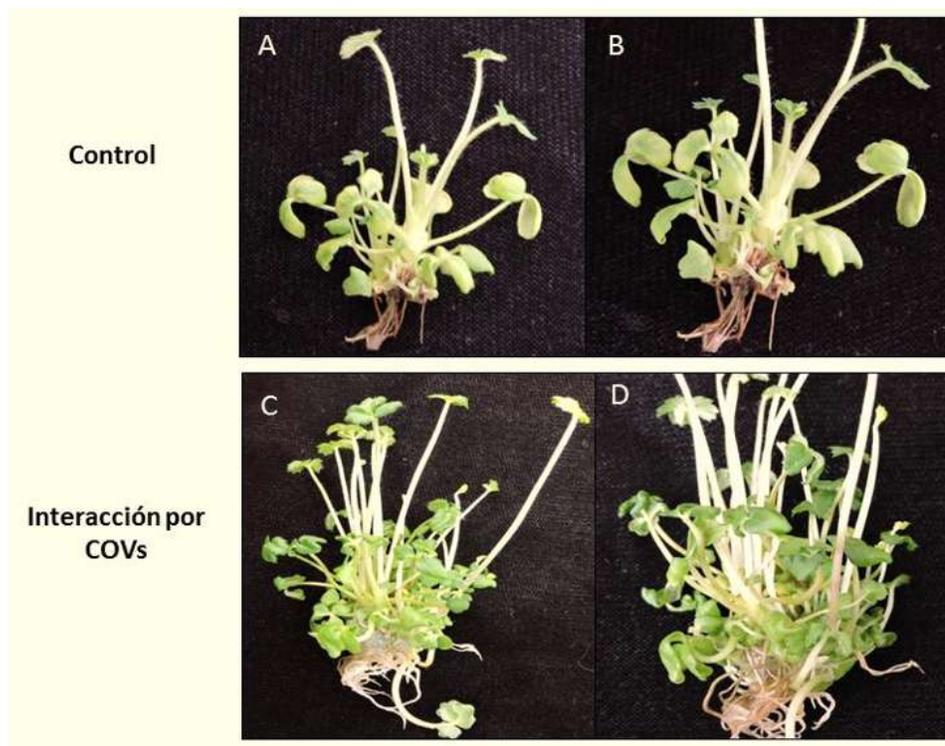
**Tabla 7. *Bacillus* sp. M4-96 produce ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA3) en medio MS 0.1X.**

Fitorregulador	Tiempo de retención (min)	Fragmentos m/z	Concentración µg/L
AIA	10.69	130, 189	0.21
GA3	17.98	195, 238, 298, 344	6.16

La identificación se realizó por CG-EM mediante un monitoreo selectivo de iones, la identidad de cada compuesto fue corroborada con el tiempo de retención de los compuestos puros y los valores m/z de cada fragmento.

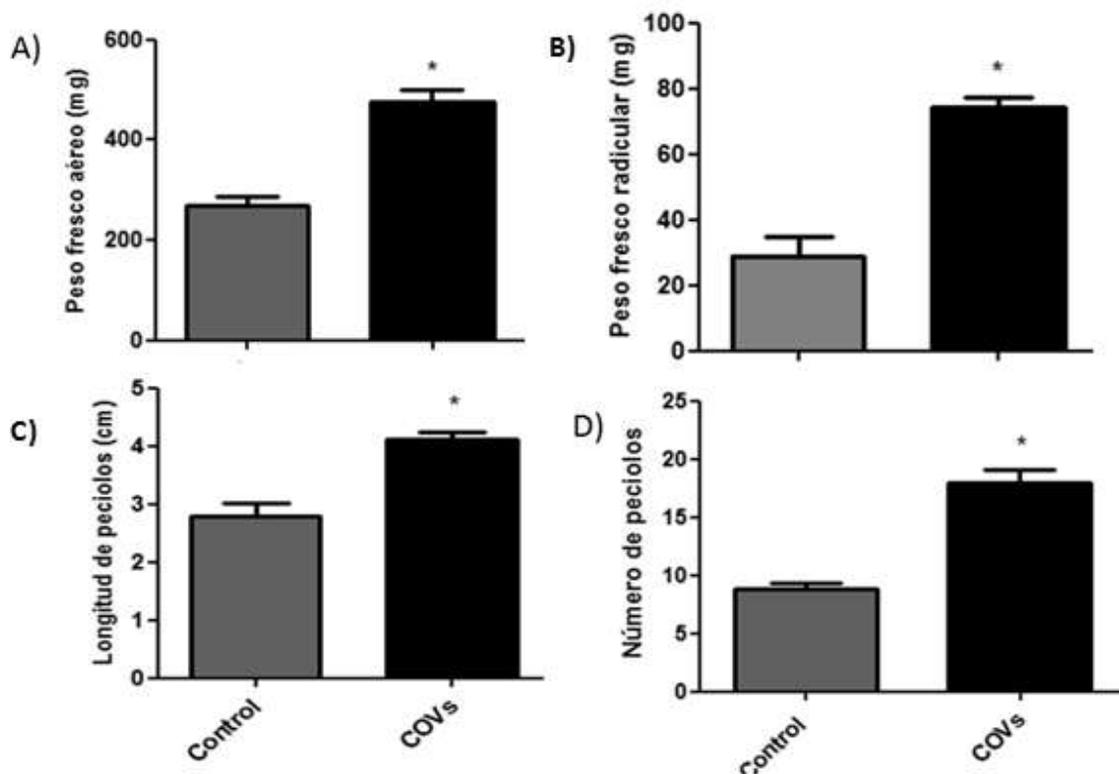
#### 8.4. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por *Bacillus* sp. M4-96 en plantas de fresa a los 30 días de interacción.

En este estudio fue de interés registrar las variables de desarrollo a los 30 d después de la interacción planta – microorganismo vía COVs, ya que la promoción del crecimiento en las plantas se mantuvo hasta ese tiempo. En la figura 23 se observan fotografías representativas de las plantas en cultivo axénico (Fig. 23 A - B) y las que fueron expuestas a los COVs bacterianos (Fig. 23 C - D). En las fotografías se aprecia claramente la emergencia de nuevos peciolos además de una mayor cantidad de nuevos brotes o coronas en las plantas tratadas con los COVs de *Bacillus*.



**Figura 23. Fotografías representativas del efecto de los COVs emitidos por *Bacillus* sp. M4-96 en plantas de fresa a los 30 días de interacción. A) Planta control de 30 días; B) acercamiento del área de la corona; C) Planta de fresa expuesta a los COVs bacterianos; D) acercamiento del área de la corona.**

Desafortunadamente, no se pudieron realizar mediciones en las raíces de las plantas de esta edad puesto que presentaron raíces grandes, abundantes y entrelazadas, sobre todo aquellas que fueron expuestas a los COVs. Sin embargo, en la figura 24 se muestran los resultados de peso fresco, número y longitud de peciolo. En ésta pueden observarse los datos de peso fresco del follaje y la raíz, que fueron significativamente diferentes a los de las plantas sin inóculo (Fig. 24 A – C), puesto que el peso fue prácticamente el doble para las plantas inoculadas (Fig. 25 A y B). Al comparar el peso fresco del follaje de las plantas inoculadas de 8 d (Fig. 21C) con el obtenido a los 30 d (Fig. 24A), la parte aérea tuvo un incremento del 42%, mientras que para las plantas control el aumento fue del 35%.

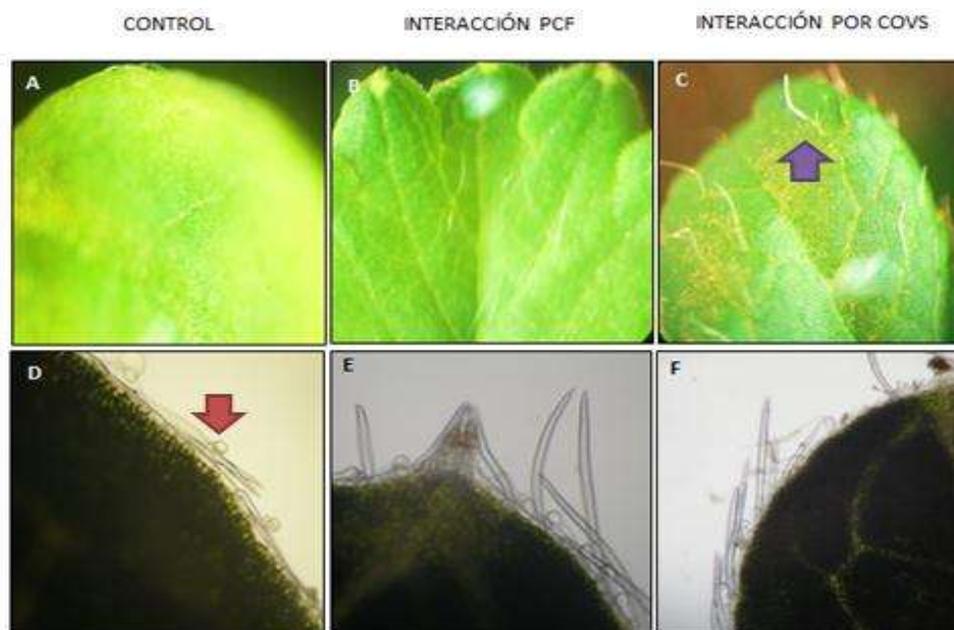


**Figura 24. Efecto de los COVs emitidos por *Bacillus* sp. M4-96 en plantas de fresa después de 30 días de interacción.** (A) Incremento del peso fresco aéreo (B), y peso fresco radicular. (C) Aumento en la longitud de los peciolo. (D) Aumento en el número de peciolo. Los datos fueron establecidos en mg para peso y cm para longitud por planta. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre tratamientos. t-student.  $\alpha=0.05$ ,  $n=7$ .

En el caso de la comparación del peso fresco de las raíces de acuerdo al tiempo (Fig. 21D y Fig. 24B), se registró un aumento del 36% en las plantas con la bacteria, mientras que para las plantas control, el aumento fue del 27%. Adicionalmente al peso, la longitud de los peciolo fue mayor (Fig. 22B y Fig. 24D), observándose la emergencia de nuevos peciolo (Fig. 22A y Fig. 24C)

### 8.5. *Bacillus* sp. M4-96 refuerza la defensa estructural promoviendo la formación de tricomas glandulares y no glandulares.

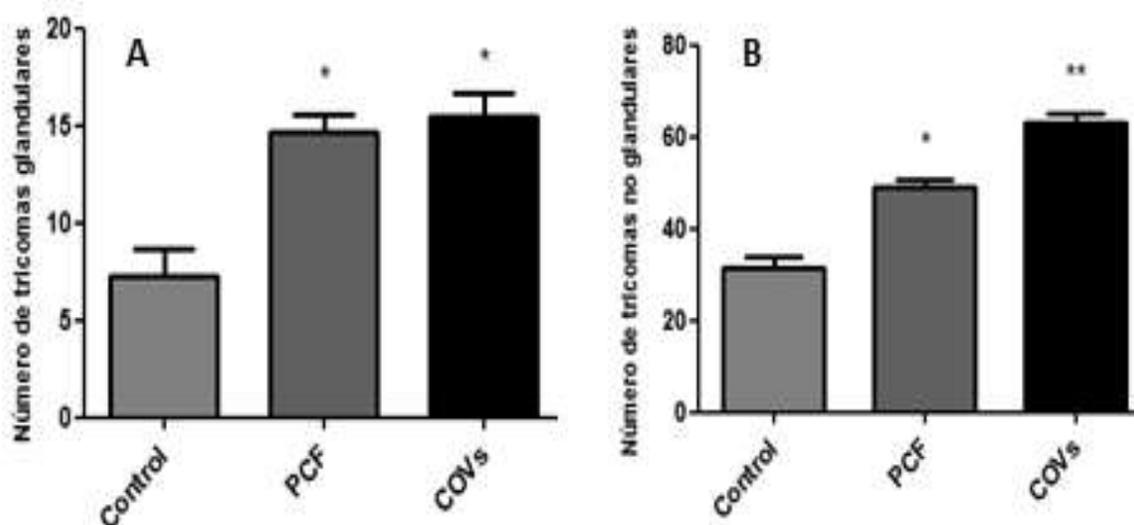
Después de 8 d de interacción en los tratamientos PCF y por COVs, la bacteria indujo un incremento en el número de tricomas comparado con el control (Fig. 25 A-F); e interesantemente, los tricomas glandulares se incrementaron al doble en ambos tratamientos (Fig. 25A), mientras que como en los no glandulares, el tratamiento PCF promovió el doble y por COVs casi el triple (Fig. 25B).



**Figura 25. Fotografías representativas de los tricomas en hojas de fresa en los tratamientos PCF y por COVs con *Bacillus* sp. M4-96. A y D) Plantas control; B) Aumento en el número de tricomas no glandulares en las hojas por una interacción PCF; C) y por COVs; E y F) aumento en la cantidad de tricomas glandulares en hojas por interacción PCF y por COVs, respectivamente. La flecha morada señala a un tricoma no glandular y la flecha roja muestra un tricoma glandular.**

En las imágenes de los paneles B y C de la figura 25, se observa que se vio favorecido un aumento en los tricomas no glandulares en ambas interacciones con la bacteria; (Fig. 25 A, B y C). El 90% de los tricomas localizados fueron no ramificados, sin embargo también fueron localizados algunos pocos con 3 ramificaciones.

Una observación adicional fue que los tricomas de las plantas que interactuaron con la bacteria, fueron más largos y gruesos y algunos de los tricomas no glandulares presentaron ramificaciones. De igual forma, hubo una mayor cantidad de los tricomas glandulares (Fig. 25 D, E y F). Notando además que éstos fueron de un tamaño mayor a aquellos observados en los controles.



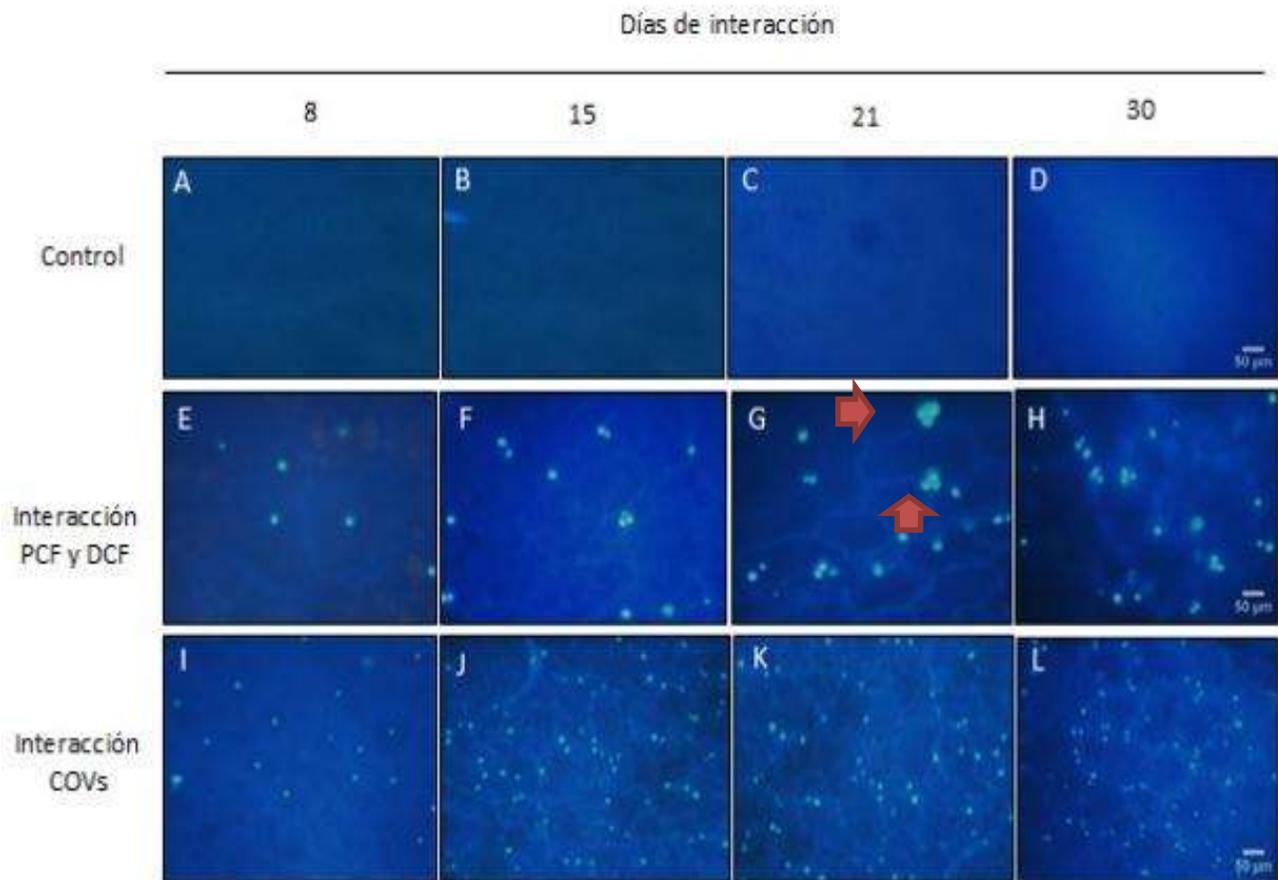
**Figura 26. *Bacillus* sp. M4-96 favorece la formación de tricomas en hojas de fresa en los tratamientos PCF y COVs.** A) Número de tricomas glandulares; B) Número de tricomas no glandulares. ANOVA. Fisher LSD  $\alpha=0.05$ ,  $n=5$ .

Los datos estadísticos confirmaron las observaciones. Cuando la planta mantenía una interacción previa al contacto físico existió un aumento en los tricomas no glandulares, comparadas con las plantas control. Sin embargo, la interacción con una mayor promoción en el desarrollo de estos tricomas fue inducida por los compuestos volátiles emitidos (Fig. 26A). Este aumento también pudo ser observado para los tricomas glandulares de la planta, como se muestra en la figura 26B

#### **8.6. *Bacillus* sp. M4-96 refuerza la defensa estructural promoviendo la deposición de calosa.**

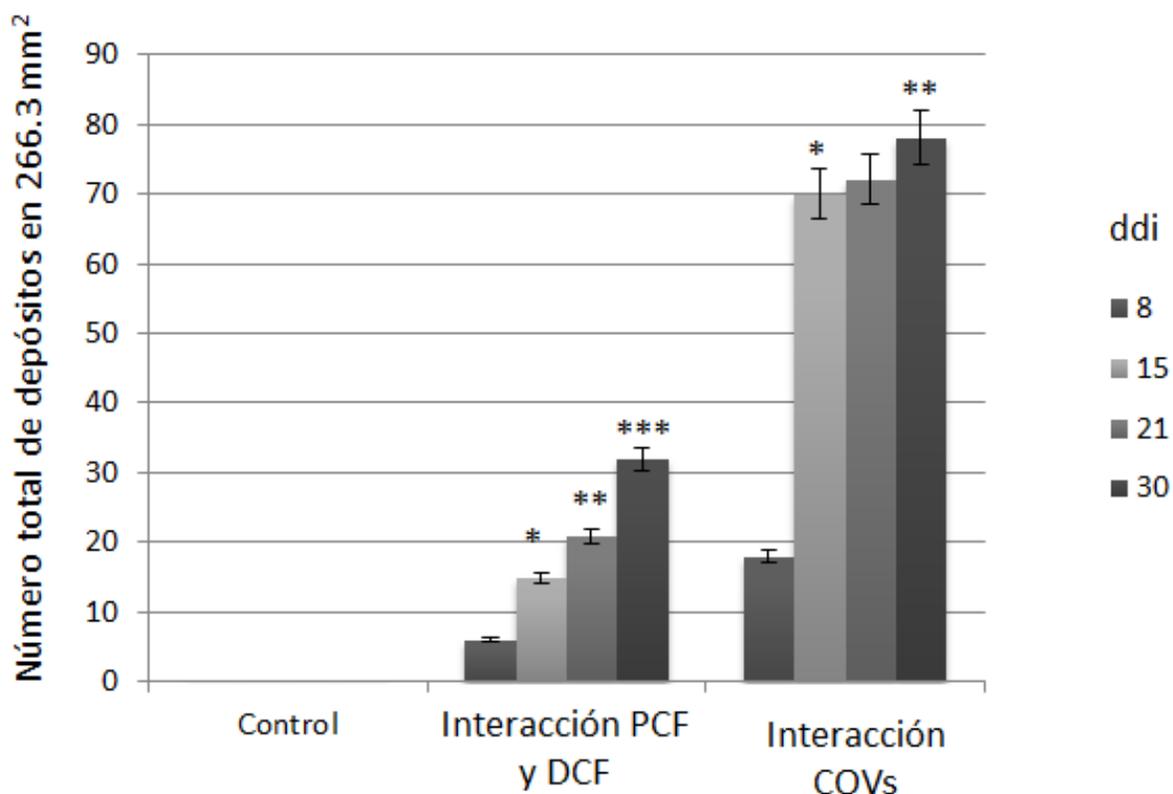
En este estudio, en las plantas control no se observó la deposición de calosa a ningún tiempo (Fig. 27 A-D), en cambio en las plantas tratadas con la bacteria PCF, DCF y por COVs, se pudo observar un aumento gradual en el número de depósitos con el tiempo (Fig. 27 E-L). En el tratamiento PCF y por COVs que fue de 8 d, se observó una respuesta diferencial por parte de la planta, ya que PCF, hubo un menor número de depósitos que por COVs (Fig. 27 E y Fig. 27 I). Después de los 8 d, ya existía un contacto físico de la bacteria con la planta y conforme transcurría el tiempo de la interacción, los depósitos incrementaron en número (Fig. 27), e incluso se formaron conglomerados en sitios específicos de la hoja desde los 15 d (Fig. 27 F – H, Fig. 29).

La deposición de calosa por efecto de los COVs bacterianos fue superior pero la distribución fue más uniforme, por su parte el tamaño de los depósitos fue muy similar en toda la hoja y no cambió con el tiempo de la interacción (Fig. 27 I-L, Fig. 28, Fig. 29 B - C).



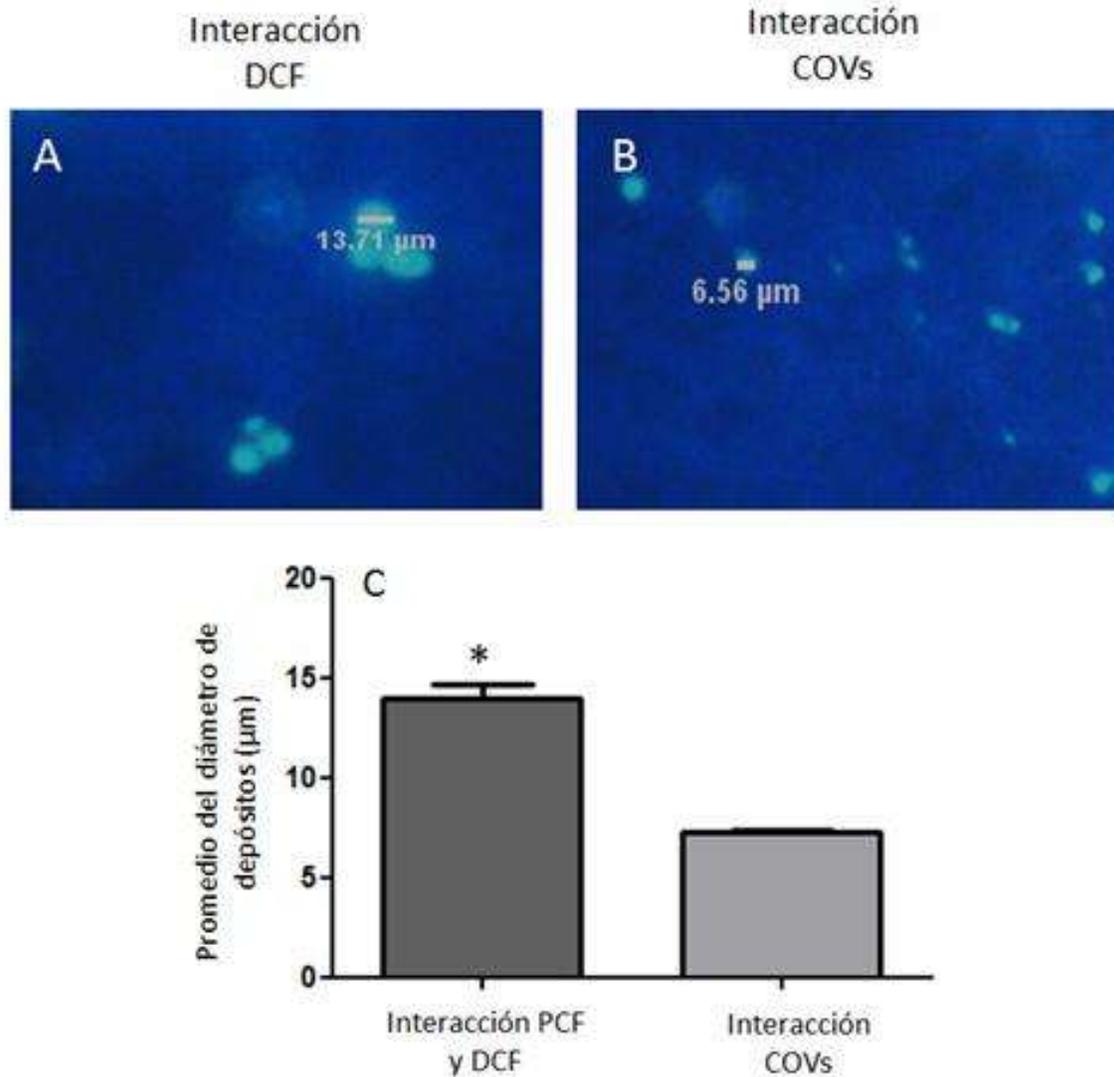
**Figura 27. Inducción diferencial de la deposición de calosa en las hojas de fresa por efecto de *Bacillus* sp. M4-96 de acuerdo al tipo y tiempo de interacción.** A-D) Hojas de fresa sin inóculo a los 8, 15, 21 y 30 d de crecimiento; E) Depósitos de calosa PCF (8 d) con la bacteria; F-H) Aumento de la deposición de calosa DCF (15 – 30 días) con *Bacillus*; I-L) Aumento gradual de los depósitos de calosa en hojas de fresa durante una interacción por compuestos volátiles. Las flechas muestran los conglomerados de calosa durante este tipo de interacción. Objetivo 40X.

La gráfica de la figura 28, muestra el número de depósitos obtenidos durante distintos tiempos de la interacción. Como se puede observar, el tratamiento con los COVs, fue el que indujo un mayor número de depósitos en las hojas de fresa, superando en un 42% a los tratamientos PCF y DCF.



**Figura 28. Número de depósitos de calosa en hojas de fresa durante las interacciones PCF, DCF y por COVs de *Bacillus sp. M4-96*.** ddi: días después de la interacción. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre la acumulación de calosa y el tiempo de interacción en comparación con el control sin inóculo. ANOVA. Fisher LSD  $\alpha=0.05$ ,  $n=3$ .

Otra observación importante, fue que el diámetro de los depósitos de calosa correspondientes a la interacción PCF donde fueron en promedio el doble de tamaño (13.71  $\mu\text{m}$ ) comparado con el diámetro de los depósitos obtenidos en el tratamiento con COVs (6.56  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 29 A - C).



**Figura 29. Diámetro de los depósitos de calosa de las hojas de fresa después de cada tratamiento (PCF, DCF y por COVs) con *Bacillus* sp. M4-96.** A) Imagen representativa del diámetro de los depósitos de calosa durante una interacción DCF; B) Imagen representativa del diámetro de los depósitos de calosa durante una interacción por COVs; C) Promedio del diámetro de los depósitos. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los promedios del diámetro de los depósitos, t-student.  $\alpha=0.05$ ,  $n=3$ .

### 8.7. *Bacillus* sp. M4-96 induce la activación de mecanismos de defensa química en plantas de fresa DCF

En el tratamiento DCF después de los 15 d de interacción de la planta con la bacteria, se observó que *Bacillus* indujo el fenómeno de la gutación en las hojas.

Las plantas mostradas en la Fig. 30 A – C son controles sin inóculo donde dicho fenómeno no se presentó. En la fotografía inferior (Fig. 30 D- F) se puede observar que este fenómeno apareció a los 19 d después de la interacción. En este tiempo, las gotas fueron transparentes, sin embargo a los 21 d de la interacción se observó un oscurecimiento de las hojas, un incremento en la aparición de gotas, notándose un color ámbar (Fig. 30 E). Al cabo de 26 d, las hojas se tornaron senescentes, pero aún continuaba el fenómeno de la gutación, aunque el color de las gotas cambió a café oscuro (Fig. 30 F).



**Figura 30. *Bacillus* sp. M4-96 induce a la gutación en hojas de fresa después de 19 d del tratamiento DCF.** A-C) Fotografías representativas de controles sin inóculo a los 19, 21 y 26 días; D) La gutación inició a los 19 d; E) Incremento en la gutación a los 21 d; F) Síntomas de senescencia en las hojas y de gutación a los 26 d. Las flechas señalan las gotas producidas a los diferentes días de interacción.

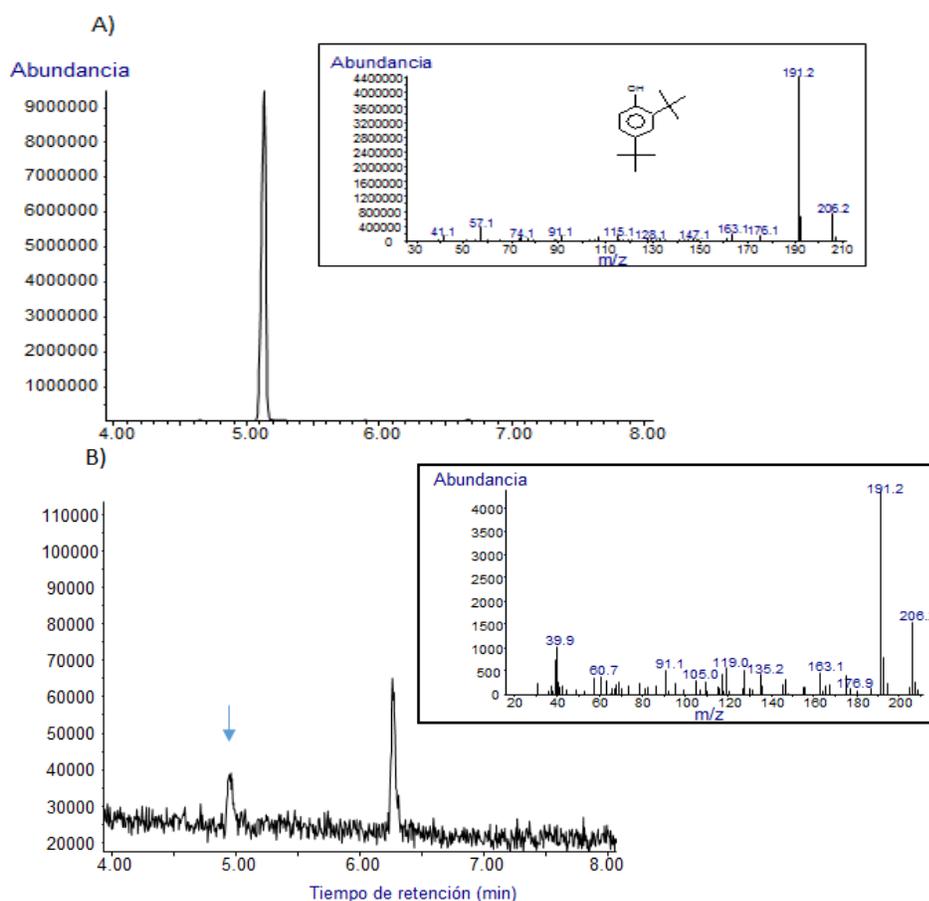
Debido a que el color de las gotas cambió conforme el tiempo de la interacción se incrementaba, se decidió analizar su composición química. Cabe mencionar que la cantidad de gotas obtenidas fue muy escasa, de ahí que sólo se muestra la composición de las gotas color ámbar – café (Tabla 8).

**Tabla 8. Composición química del exudado foliar obtenido durante la interacción planta – bacteria en el tratamiento DCF.**

Compuesto	Tr (min)	Cantidad normalizada del compuesto (%)	Valor $\pm$ error estándar
Desconocido	3.00	5.66	0.51
Desconocido	3.25	5.45	1.56
Valina	4.17	0.50	0.01
Dietilen glicol	4.46	28.27	0.72
Ciclohexilamina	4.78	0.96	0.43
2,4-Di-tert-butilfenol	5.12	0.63	0.32
Ácido dehidroacético	5.81	2.41	1.05
Prolina	6.17	1.08	0.05
Desconocido	6.29	10.2	0.32
Ácido aspártico	6.61	32.38	1.54
Ácido cítrico	7.01	1.32	0.03
Ácido glutámico	9.05	7.89	0.46
Ácido esteárico	19.39	3.31	0.24

- Los compuestos fueron identificados con la base de datos NIST 2.0
- Cantidad normalizada del compuesto = Área del pico del compuesto / Área total de los picos en el cromatograma
- Promedio  $\pm$  error estándar de la suma de tres determinaciones independientes.

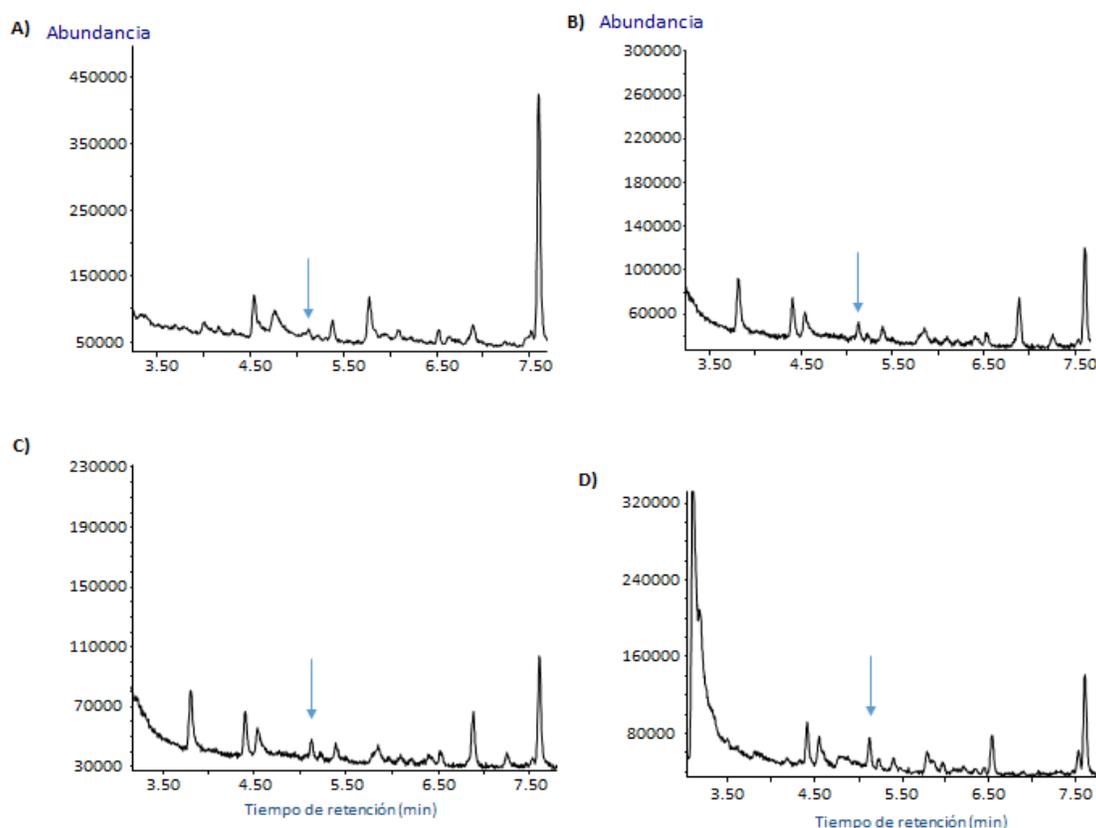
Entre los compuestos identificados en las gotas se encontró al 2,4-di-*tert*-butil fenol. Un compuesto reportado en la literatura con actividad antifúngica contra *Phytophthora cinnamomi* (Rangel-Sánchez *et al.*, 2013). Con la finalidad de garantizar su presencia en el exudado foliar, se analizó el compuesto puro bajo las mismas condiciones de análisis por CG – EM. En la figura 31 A – B, se encuentra el cromatograma del compuesto puro, el cual tuvo un Tr de 5.12 min; entre los fragmentos más abundantes en el patrón de masa se encuentra el ion molecular (206 m/z y el de 191 m/z (Fig. 31 A). Al comparar el tiempo de retención y el patrón de masa del compuesto puro con el de la muestra, se observó que fueron muy similares (Fig. 31 B).



**Figura 31. Confirmación de la presencia de 2,4-di-*tert*-butil fenol, en el exudado foliar, mediante el análisis del compuesto puro por CG – EM. (A) Cromatograma y patrón de masas del 2,4-di-*tert*-butil fenol comercial. (B) Región del cromatograma del exudado foliar donde aparece el 2,4-di-*tert*-butil fenol y su patrón de masas.**

Debido a que se identificó al 2,4-di-*tert*-butil fenol en el exudado foliar, se decidió determinar si este compuesto se encontraba en las hojas no inoculadas y en tiempos más tempranos de la interacción, es decir PCF. Para ello, se realizó una extracción ácida con acetato de etilo de las hojas de 8 y 30 d de las plantas control e inoculadas PCF y DCF.

En la Fig. 32 A-B, se muestra que el 2,4-di-*tert*-butil fenol se encuentra en forma natural en la planta de fresa. Interesantemente, la bacteria induce la síntesis de este compuesto fenólico PCF y DCF (Fig. 32 C-D).



**Figura 32. Identificación del 2,4-di-*tert*-butil-fenol en hojas de fresa inoculadas con *Bacillus sp.* M4-96 por CG - EM.** A y B) Cromatogramas representativos de los extractos de hojas de plantas control de 8 y 30 d, respectivamente; C y D) Cromatogramas representativos de las hojas de plantas de fresa inoculadas con la bacteria en los tratamientos PCF, a los 8 d después de la interacción y DCF a los 30 d después de la interacción, respectivamente. La flecha azul señala donde se encuentra el compuesto en los cromatogramas.

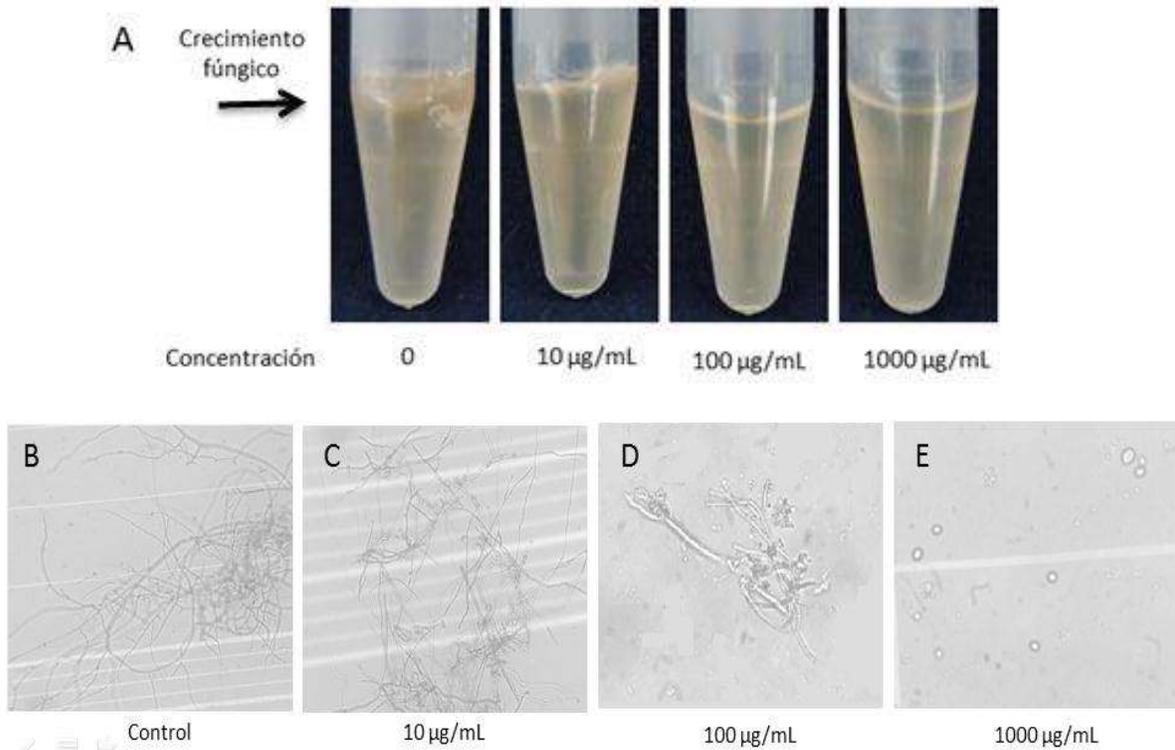
Como se contaba con el compuesto puro, se realizó una curva de calibración y en la Tabla 9 se presenta el resultado de la cuantificación. En las plantas control de 8 y 30 d, la concentración del compuesto fenólico fue similar, mientras que las plantas que estuvieron en interacción de 8 d con la bacteria presentaron un incremento significativo de 3.37  $\mu\text{g}$  y las plantas en interacción de 30 d (DCF) el aumento fue de 9.81  $\mu\text{g}$ . En cuanto al exudado foliar obtenido de las plantas DCF con la M4-96 fue de 0.06 ng/mL.

**Tabla 9. Contenido del 2,4-di-tert-butil-fenol en hojas y gotas de plantas de fresa. t-student.  $\alpha=0.05$ .**

Material	Control	Interacción física
	$\mu\text{g/g}$	
Hojas 8d	6.79 $\pm$ 1.43	10.16 $\pm$ 3.92
Hojas 30d	6.56 $\pm$ 0.58	16.37 $\pm$ 3.93
	$\text{ng}/\mu\text{L}$	
Gotas	----	0.06 $\pm$ 0.03

Posteriormente, se realizó un ensayo para determinar el efecto de este compuesto frente a *B. cinerea*. Para ello, se colocaron diferentes concentraciones del compuesto puro (10, 100 y 1000  $\mu\text{g}$ ) en 1 mL de caldo PDA en tubos Eppendorf y se inoculó con  $1 \times 10^3$  esporas/mL del hongo. En la figura 33 se observan fotografías representativas de los tubos inoculados y con las distintas concentraciones del 2,4-di-tert-butil fenol. A una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se aprecia el crecimiento de micelio y una mayor turbidez con respecto al tubo control, lo que indica que a esta concentración hubo germinación de las esporas, sin embargo a la concentración de 100 y 1000  $\mu\text{g}$  esta turbidez no se presentó.

En la figura 33 (B–E) se muestra la germinación de las esporas en medio sin fenol y a la concentración de 10 µg, pero a 100 µg hubo una reducción significativa en la germinación y desarrollo del hongo, y a 1000 µg ya hubo una inhibición total del crecimiento.

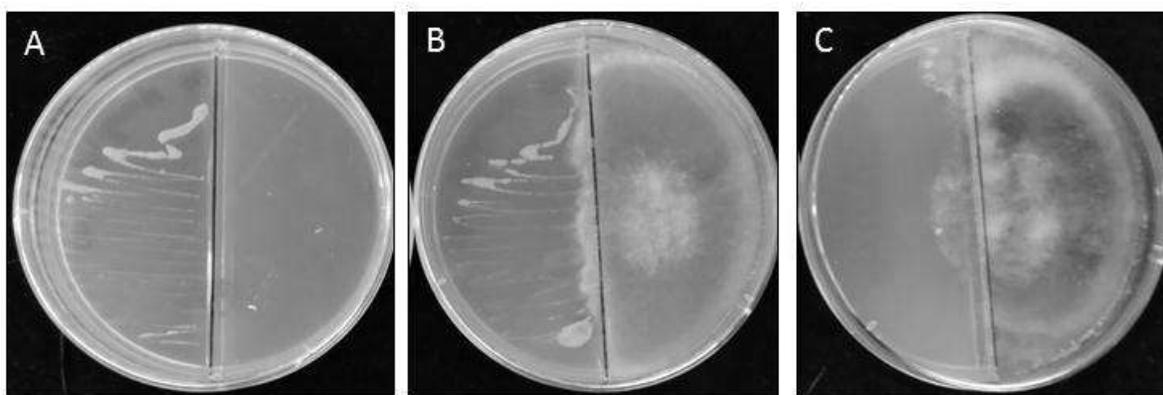


**Figura 33. Efecto fungistático del 2,4-di-tert-butil-fenol sobre *Botrytis cinerea*.** A) Fotografías representativas de los tubos Eppendorf con medio PDA en el caso del control y con medio PDA suplementado con el compuesto fenólico a distintas concentraciones e inoculados con esporas de *B. cinerea*. La flecha muestra el crecimiento de micelio en el tubo control y a la concentración de 10 µg del compuesto. B) Crecimiento de *B. cinerea* en medio PDA; C-E) Imágenes representativas del efecto del compuesto fenólico sobre la germinación y formación de micelio de *B. cinerea*.

### 8.8. *Bacillus sp.* M4-96 es capaz de fortalecer los mecanismos de defensa en plantas de fresa retrasando la infección causada por *B. cinerea*.

Para validar los resultados anteriores del apartado 8.2 y 8.3, que refieren que la bacteria activa las defensas físicas en la planta, incrementando el número de tricomas y la deposición de calosa, se realizó un estudio tripartita, enfrentando a las plantas inoculadas contra *B. cinerea* (Fig 34).

Sin embargo, previo al estudio tripartita se realizó un ensayo de antagonismo *Bacillus sp.* M4-96 – *B. cinerea* con la finalidad de descartar que los COVs emitidos por la bacteria no tuvieran algún efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo. En la figura 34 (A y B) se observa el crecimiento bacteriano y fúngico habitual, mientras que en la figura 34 C se observa que los COVs de la bacteria no presentan un efecto antagónico en contra del hongo



**Figura 34. Ensayo de antagonismo *in vitro* *Bacillus sp.* M4-96 – *Botrytis cinerea*.** A) Placa donde se muestra el crecimiento normal bacteriano en medio nutritivo después de 5 d; B) Placa donde se muestra el crecimiento fúngico normal después de 5 d; C) Crecimiento bacteriano y fúngico en placa Petri dividida después de 5 d.

Para el estudio tripartita, las plantas de fresa fueron pre-tratadas 8 d con los COVs de *Bacillus*, después de este tiempo se inoculó con *B. cinerea*, colocándose una alícuota con  $1 \times 10^3$  esporas/mL en el área de la corona.

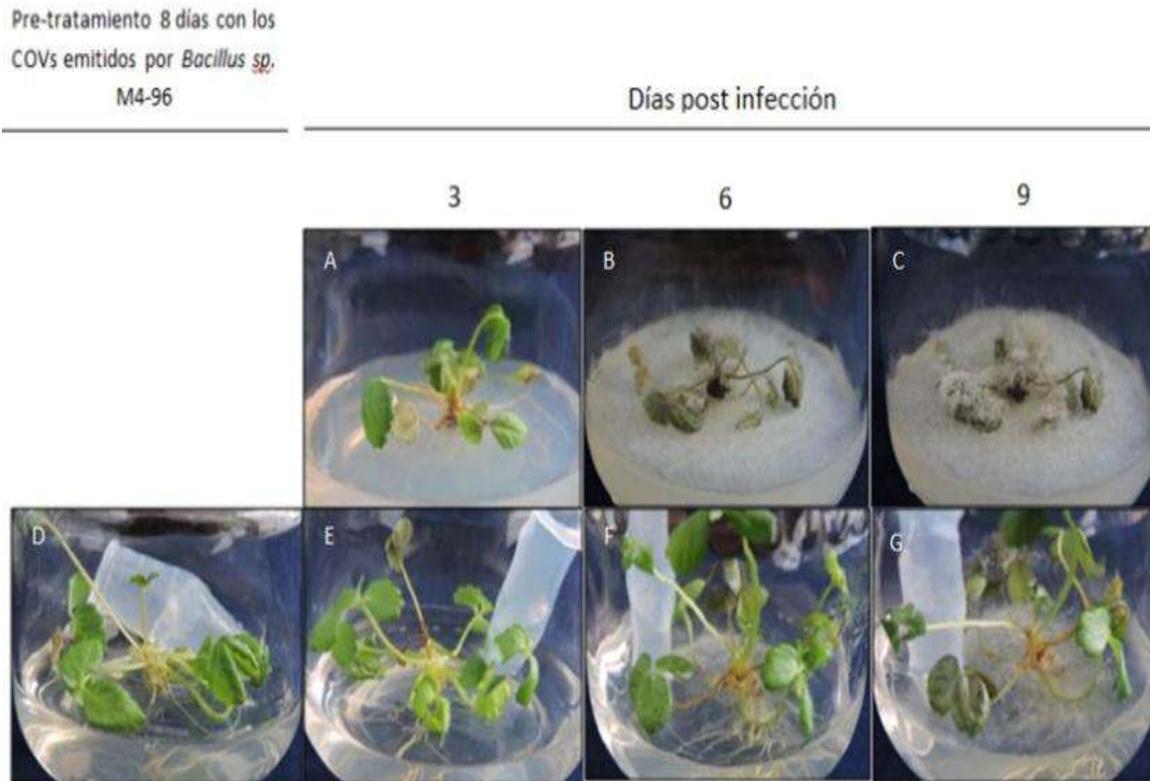
Los resultados mostraron que las plantas control mostraron síntomas de la enfermedad a los 3 días post infección (Fig. 35 A), como el inicio de una necrosis en la corona, misma que comenzó a propagarse por los peciolos hasta llegar al área de las hojas como se observa al día 6 de infección (Fig. 35 B); al día 9, una capa gruesa de micelio cubrió toda la planta e inclusive al medio de cultivo (Fig. 35 C).

Las plantas con el pre-tratamiento de 8 d con los COVs de *Bacillus* (Fig. 35 D), mostraron una reducción en el tiempo de aparición de los síntomas de la enfermedad. Al día 3 post-infección, la corona y peciolos se encontraban necrosados (Fig. 35 E) como en la figura 35 A. Sin embargo, los síntomas no avanzaron tan rápidamente como en las plantas no pre-tratadas. En la figura 35 F se observa que al día 6 la mayor parte de los peciolos no presentaban daño y con pocos síntomas de la infección y al día 9 se presentaron síntomas de necrosis en un poco más de la mitad de peciolos, al igual que las hojas conectadas a ellos (Fig. 35G), y no fue sino hasta el día 10 que los síntomas fueron comparables a los síntomas mostrados en la figura 35 C.

Para corroborar que efectivamente hubo un retraso en el proceso de la infección, se realizaron mediciones indirectas del avance del patógeno como la longitud de las lesiones por peciolo y el número de peciolos necrosados por planta.

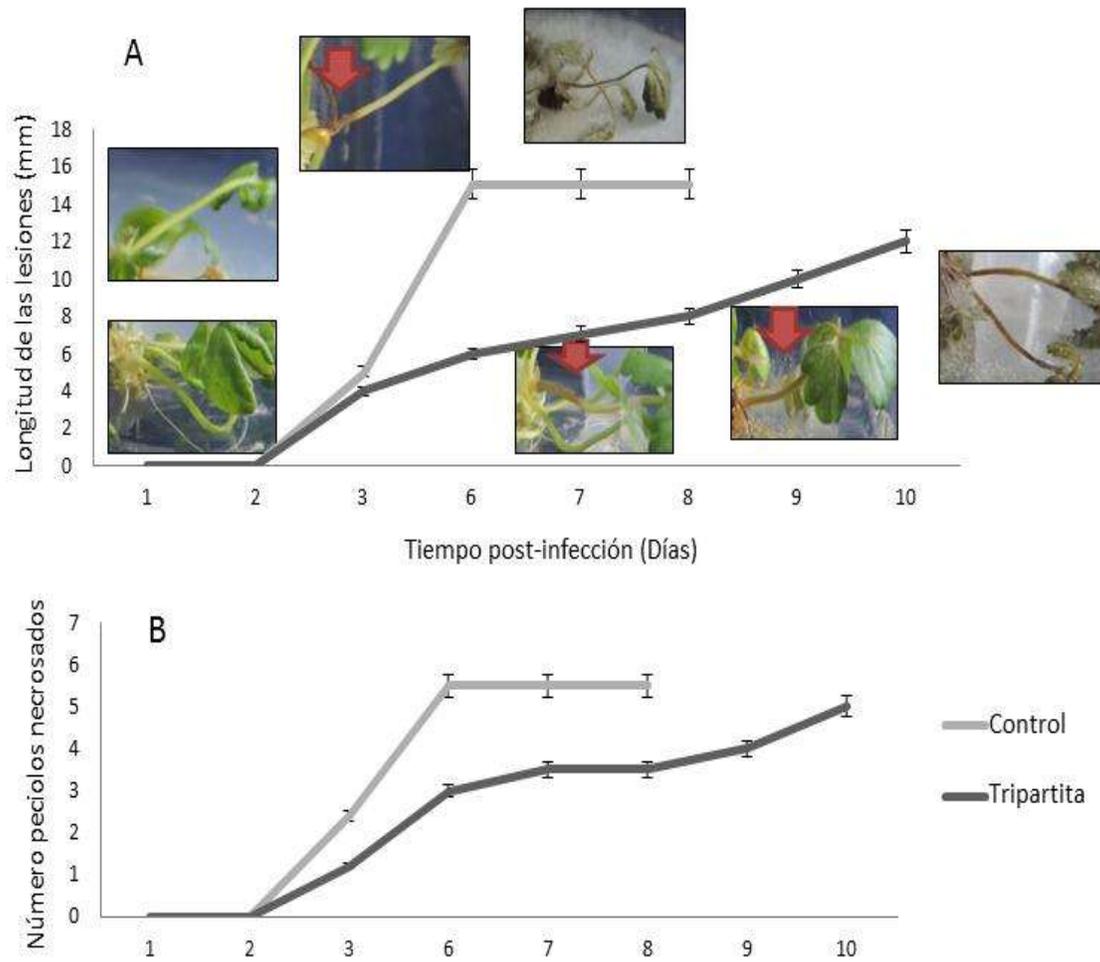
En la figura 36 A se muestran los resultados en cuanto a la longitud de las lesiones en los peciolos causados por el hongo, observando que la longitud se incrementó conforme transcurría la enfermedad, de tal forma que al día 6, los peciolos y las hojas mostraron necrosis generalizada. En cambio, para las plantas tratadas previamente con *Bacillus* sp. M4-96, en el día 6 todas las hojas y peciolos

mostraron un menor diámetro en las lesiones y no fue sino hasta el día 10 cuando las plantas mostraron los mismos síntomas que la plantas sin bacteria al día 6.



**Figura 35. Estudio tripartita *Bacillus sp.* M4-96 – *Fragaria x ananassa* Cv. Aromas- *Botrytis cinerea*.** A-C) Progresión de los síntomas de la enfermedad del moho gris en plantas infectadas con *B. cinerea*; D) Planta control de fresa en interacción con los COVs emitidos por la rizobacteria durante 8 días; E-G) Fotografías representativas del retraso en la aparición de los síntomas de la infección en las plantas debido al pretratamiento con *Bacillus sp.* M4-96 a los 3, 6 y 9 d post infección, respectivamente.

De igual forma para el número de peciolo necrosados (Fig. 36 B), las plantas infectadas al día 6, presentaron todos los peciolo necrosados, mientras que en las pre-tratadas sólo en la mitad de los peciolo hubo daño y no fue sino hasta el décimo día que presentaron todos sus peciolo necrosados; es decir hubo un retraso de 4 días en la infección causada por el hongo.



**Figura 36. Los COVs de *Bacillus* sp. M4-96 retrasan la infección causada por *Botrytis cinerea* en plantas de fresa. A) Medición de la longitud de las lesiones en los peciolo de la planta, las flechas muestran el avance de dichas lesiones. B) Número de peciolo infectados en el tiempo.**

## 9. DISCUSIÓN

La fresa es uno de los cultivos con mayor demanda a nivel mundial; ante este tipo de demanda el sector agrícola ha buscado alternativas para mejorar el rendimiento de los cultivos. Los bioinoculantes, productos a base de microorganismos tales como rizobacterias, poseen mecanismos de promoción del crecimiento de plantas mediante la producción de hormonas, mejora de la captación y absorción de nutrientes, reducción de los niveles de etileno y resistencia a enfermedades sistémicas; esta gama completa de mecanismos nos llevan a un mayor rendimiento de los cultivos vegetales (Luna-Martínez *et al.*, 2012).

El principal mecanismo indirecto de promoción del crecimiento de las plantas en las rizobacterias es como agentes de biocontrol (Glick, 2012). En general, la competencia por nutrientes, la exclusión de nichos, la resistencia y la producción de metabolitos antifúngicos son modos de actividad de control biológico en rizobacterias (Lugtenberg *et al.*, 2009). Se han reportado muchas rizobacterias que producen metabolitos antifúngicos como, HCN, fenazinas, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, piro-meteorina, viscosinamida, etc. (Bhattacharyya y Jha, 2012), resultando en un aumento de la resistencia por parte de las plantas hacia algunas bacterias patógenas, hongos y virus.

De igual manera, las rizobacterias producen compuestos bioactivos que ayudan al desarrollo vegetal; algunos de éstos son fitorreguladores (Lara *et al.*, 2011) o bien otros son de naturaleza volátil (Zhang *et al.*, 2007; Pérez-Flores *et al.*, 2013) que promueven dicho crecimiento.

En este trabajo se estudió el efecto de *Bacillus* sp. M4-96 sobre la promoción y el crecimiento vegetal así como la activación de mecanismos de defensa físicos y químicos en plantas de fresa.

Para determinar el efecto de los compuestos bioactivos que produce la bacteria sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, se establecieron dos tipos de interacción,

PCF (8 d de interacción) y mediante la emisión de COVs (8 y 30 d de interacción). Como se mostró en los resultados, después de 8 d de interacción con la bacteria PCF y por COVs (Figs. 21 y 22), PCF, *Bacillus* sp. M4-96 promovió el crecimiento de las plantas de fresa dos veces más en comparación con el control y moduló el desarrollo de la planta dependiendo del tipo de interacción. El número de peciolos y la longitud de las raíces se estimuló por una interacción PCF y el número de raíces y longitud de peciolos se incrementaron en el tratamiento por COVs. Esta respuesta de las plantas sugiere estrategias distintas de modulación en la que diversos mecanismos de señalización hormonal están implicados.

Estudios en fresa demostraron que sólo una aplicación de ácido 2-naftoxiacético en combinación con GA3 fue capaz de mantener la tasa de crecimiento a lo largo de todo el período de desarrollo (Thompson, 1969). Mientras que cada compuesto fue capaz de promover el crecimiento, ninguno de ellos solos fue capaz de mantener la tasa de crecimiento hasta el final del proceso de maduración; proponiéndose que en el crecimiento, la elongación celular y la actividad de división celular estén coordinadas por un delicado equilibrio entre las dos fitohormonas (de Jong *et al.*, 2009).

En la investigación realizada por Pérez-Flores (2013), se mencionó que los COVs de *Bacillus* sp. M4-96 modulan la biosíntesis y transporte de auxinas; en este mismo estudio se determinó el perfil de volátiles que produce la bacteria y se mencionó que el 74 % está constituido por acetoína. De acuerdo con Ryu *et al.* (2004) y Zhang *et al.* (2007), este compuesto bacteriano es uno de los responsables de la promoción y el crecimiento vegetal de *A. thaliana* mediante una activación de la síntesis y transporte de la vía auxínica.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron, los COVs de la M4-96 pudieran estar modulando la homeostasis de auxinas en las plantas de fresa favoreciendo el crecimiento y desarrollo; de acuerdo a la serie de datos obtenidos puede sugerirse además que no únicamente existe una estimulación de la vía auxínica

en la planta sino también una estimulación de síntesis de giberelinas, debido al fenotipo que se presenta en las plantas, ya que se tiene conocimiento que tanto las auxinas como giberelinas están implicadas en el desarrollo de la planta y del fruto de la fresa.

Ambos tipos de fitohormonas participan en la división celular y expansión de las células, sin interferir una con el funcionamiento de la otra (Csukasi *et al.*, 2011). Se cuenta con un reporte donde los volátiles emitidos por *Alcaligenes faecalis* JBCS1294 modulan no solo rutas auxínicas, si no también rutas de giberelinas en plantas de *Arabidopsis*, confiriéndole resistencia al estrés abiótico; es posible que los VOCs modulen otras vías de señalización hormonal incluida el de las giberelinas, pero no hay evidencia suficiente en la literatura

Un resultado interesante es que la estimulación por COVs continuó después de 30 d de interacción con los volátiles emitidos sugiriendo una correlación positiva donde a un mayor tiempo de exposición se presentó mayor crecimiento vegetal. De acuerdo con la figura 23, hubo un incremento en el número de coronas y en la figura 24, se muestra que el peso fresco, el número y la longitud de los peciolo también fue superior al de las plantas control. Este resultado sugiere que los COVs de *Bacillus* inducen la síntesis de AIA y GA3, y que a pesar de haber una interacción de 30 d sigue una estimulación continua de las vías hormonales, ya que de acuerdo a la literatura, el fenotipo que presentaron las plantas inoculadas se parece al de la aplicación exógena de AIA y GA3 en el medio de cultivo puesto que inducen a la brotación en plantas (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Agronómicamente, un aumento en el número de peciolo, implica un aumento en la cantidad de hojas, lo que es importante para que el fruto se resguarde entre las hojas, y se brinda una mayor protección haciéndolo menos susceptible al ataque de animales y a las condiciones climáticas, como pérdida de agua por exposición al sol. De igual forma para las raíces, un aumento en la longitud y en la cantidad de raíces resulta positivo para la planta, teniendo una mayor área de captación de

agua y nutrientes que como es bien sabido, el agua es un recurso importante en este cultivo para tener frutos de mayor tamaño.

En el tratamiento PCF, también hubo una estimulación del crecimiento y desarrollo a los 8 d (Fig. 21). Lo que se observó fue que la bacteria además de producir COVs con bioactividad, también produce fitorreguladores como el AIA y el GA3 (Tabla 7).

Las concentraciones de AIA producidas por *Bacillus* sp. M4-96 en la presente investigación, caen dentro de los rangos reportados en bacterias del género de *Bacillus*. Lara *et al.* (2011), establecieron que la concentración exógena ideal para la promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* respecto al AIA es  $1 \times 10^{-10}$  M y  $1 \times 10^{-9}$  M de GA3.

Además del efecto de la cepa M4-96 sobre el crecimiento y desarrollo, también se determinó que la bacteria activa mecanismos de defensa física y química en las plantas de fresa que ayudan a retrasar la infección por *B. cinerea*. Los resultados muestran que con los tratamientos PCF, DCF y por COVs, hay una inducción en el número de tricomas glandulares y no glandulares (Fig. 25), la síntesis de calosa (Fig. 27) y de compuestos fenólicos tales como el 2-4 di tert butil fenol (Fig. 31).

Después de 8 días de interacción (PCF y por COVs), se hicieron cuantificaciones del número de tricomas glandulares y no glandulares en la superficie de hojas de fresa, observando un aumento significativo de ambos tipos de tricomas (Fig. 24 y 25). Este aumento de tricomas puede deberse a la estimulación de la síntesis y producción de GA3 por parte de la bacteria. Esto concuerda con lo establecido por Traw *et al.* (2003), quienes en una mutante incapaz de producir giberelinas y tricomas, se restauró la producción de tricomas al adicionar giberelinas de manera exógena. De igual manera Perazza (1998), reporta que el crecimiento y desarrollo de los tricomas es dependiente de las giberelinas.

Los tricomas evitan la pérdida de agua en la planta y actúan como defensa física contra el ataque de insectos (tricomas no glandulares) y patógenos (tricomas glandulares), estos últimos mediante la producción de compuestos capaces de impedir el avance de infecciones; recientes hallazgos mostraron que un grupo de proteínas denominadas filoplaninas, secretadas por los tricomas glandulares de la superficie aérea de hojas de tabaco, inhibe la germinación y por lo tanto impide el avance de la enfermedad causada por el oomiceto *Peronospora tabacina* (Antoaneta *et al.*, 2013).

La calosa de igual forma representa un mecanismo de defensa físico que refuerza las paredes celulares haciendo más lenta la invasión del patógeno. Además, los depósitos de calosa intervienen en ganar tiempo para una inducción de respuesta de defensa adicional, que en conjunto pueden detener o aminorar la infección causada por patógenos (García-Gutiérrez *et al.* 2012).

Al realizar una cinética de la deposición de calosa en hojas de fresa, se observó un aumento en la formación de los depósitos (Fig. 27). En la interacción por COVs la distribución de los depósitos sobre la hoja fue homogénea mientras que para la interacción PCF (8 días) y DCF (15-30 días), los depósitos se localizaban en sitios específicos, probablemente en el área de los plasmodesmos mostrando una tendencia a formar asociaciones entre ellos, por lo que el diámetro fue mayor al observado en el tratamiento por COVs (Fig. 26 y 28). Este resultado demuestra que aún no se termina de comprender que tan compleja es la interacción planta-microorganismo.

En la literatura no hay reportes de que los COVs bacterianos inducen a la deposición de calosa, ni tampoco que la forma, tamaño y disposición sea distinta cuando la bacteria se encuentra en contacto físico con la planta. Por ello sería importante demostrar si este fenómeno se debe a que la bacteria es capaz de colonizar tejidos internos.

Diferentes cepas del género *Bacillus* se sabe estimulan mecanismos de defensa en plantas; se cuentan con reportes donde polisacáridos extracelulares de dichas cepas actúan como patrones moleculares asociados a microbios (MAMPS, por sus siglas en inglés) potenciando la inmunidad vegetal (Jiang *et al.*, 2016), induciendo mecanismos de defensa como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, deposición de calosa y producción de enzimas asociadas a defensa en plantas de *A. thaliana* (Singht *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016).

Otra observación importante de este estudio fue en el tratamiento DCF, ya que después de 15 d la planta secretó gotas a través de los hidátodos (Fig. 29). Este fenómeno generalmente se presenta en plantas que están bajo estrés hídrico (Girolami *et al.*, 2009), por lo que ésta pudiera ser la primera evidencia que muestra que una bacteria puede inducir el fenómeno de gutación en una planta. Al inicio de la gutación, las gotas eran transparentes, pero conforme avanzaba el tiempo de la interacción física, el color de las gotas y hojas se oscurecieron hasta llegar a una coloración ámbar (Fig. 29). Este cambio en la coloración fue analizada y de entre los compuestos identificados, el 2,4-di-tert-butil-fenol resultó ser un compuesto interesante porque de acuerdo a datos presentados en la literatura posee actividad antimicrobiana (Rangel *et al.*, 2013).

Interesantemente, con el paso de los días en la interacción, la concentración de este compuesto aumentó (Fig. 30). Se tiene reportado que el tejido del que están compuestos los hidátodos está estrechamente asociado con los extremos del sistema vascular en las hojas de las plantas, donde microorganismos, tales como bacterias móviles, podrían utilizar los hidátodos para entrar a la planta (Fukui *et al.* 1999), por lo que la acumulación de dicho compuesto fenólico en las hojas sugiere una defensa química por parte de la planta con el propósito de evitar la colonización de patógenos. En base a estos reportes, se realizó un análisis del efecto de este compuesto sobre *B. cinerea*, observando una reducción significativa en el crecimiento y el desarrollo del hongo a una concentración de 100 µg/mL; para la concentración de 1000 µg/mL hubo una inhibición total de la germinación

(Fig. 32), por lo que se concluye que en el caso de *B. cinerea*, el compuesto actúa como fungistático.

Para corroborar si los mecanismos de defensa físicos y químicos que induce *Bacillus* sp. M4-96 en las plantas de fresa le confiere protección contra la infección causada por *B. cinerea*; se realizó un estudio tripartita donde plantas previamente tratadas con la bacteria fueron expuestas al ataque del hongo. Se observó una reducción significativa en la sintomatología en plantas tratadas con los COVs de *Bacillus* donde después de 10 d de infección con el hongo, la planta había cedido a la infección a diferencia de los controles, donde la planta en un tiempo de 6 días post-infección se encontraba totalmente sintomática (Fig. 34).

Las mediciones indirectas del avance del patógeno fueron longitud de las lesiones por peciolo y el número de peciolos necrosados por planta, observando que ambas curvas para las plantas control avanzaban de manera más rápida que en las plantas con *Bacillus* (Fig. 35). Para descartar que los COVs de la bacteria no tuvieran algún efecto en el crecimiento y desarrollo adecuado del hongo, se realizó un ensayo de antagonismo (Fig. 33), donde se observó la germinación y crecimiento del micelio del hongo sobre el medio de cultivo en una misma medida que el control.

Por lo que, para los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere que este retraso y la reducción de los síntomas provocados por *B. cinerea*, se deben a la activación de una serie de mecanismos de defensa, entre ellos el reforzamiento de la pared celular de las hojas de plantas de fresa que actúan como barreras físicas, en específico un aumento en la síntesis de calosa así como una mayor formación de tricomas glandulares que como ya se mencionó en este trabajo, poseen sustancias que afectan el avance del ataque por hongos.

A continuación se muestra un modelo como el resumen de los resultados obtenidos en este proyecto. *Bacillus* sp. M4-96 produce compuestos volátiles que estimulan la síntesis de fitohormonas tales como auxinas y probablemente giberelinas en las plantas; esta estimulación impacta tanto en un aumento de peso fresco aéreo y radicular, en particular un aumento en las raíces, tricomas y elongación de peciolo así como en la deposición de calosa en hojas. En una interacción PCF, la planta capta no solo los volátiles emitidos por la bacteria sino también los compuestos difusibles secretados por la bacteria, entre ellos hormonas tales como ácido indolacético y ácido giberélico, impactando en un aumento de peso fresco aéreo y radicular, viéndose favorecido el aumento de tricomas, una elongación de las raíces y aumento en el número de peciolo, así como la activación de mecanismos de defensa tales como la deposición de calosa. La rizobacteria permite el desarrollo de plantas con mayor tamaño y con mecanismos de defensa activados que conllevan a un aumento en la inmunidad vegetal, de tal forma que cuando las plantas de fresa se enfrentan contra *Botrytis cinerea*, su sistema de defensa se encuentra potenciado, retrasando la infección. Estos resultados probablemente pudieran ser importantes durante el periodo de fructificación ayudando a reducir las pérdidas en el rendimiento de este cultivo.

En una interacción DCF (después de 15 días), los compuestos volátiles como los difusibles desencadenaron la formación de depósitos de calosa, aunado a esto, la carga bacteriana existente en el sistema *in vitro*, activó mecanismos de defensa químicos como la producción de fenoles, entre ellos el 2,4-di-tert-butil-fenol que posee actividad fungistática contra *B. cinerea*. De igual forma que en ambas interacciones anteriores, existe una potenciación de la inmunidad vegetal, sin embargo se desconoce si la planta es capaz de sobrevivir hasta la fase de fructificación (Fig. 37).

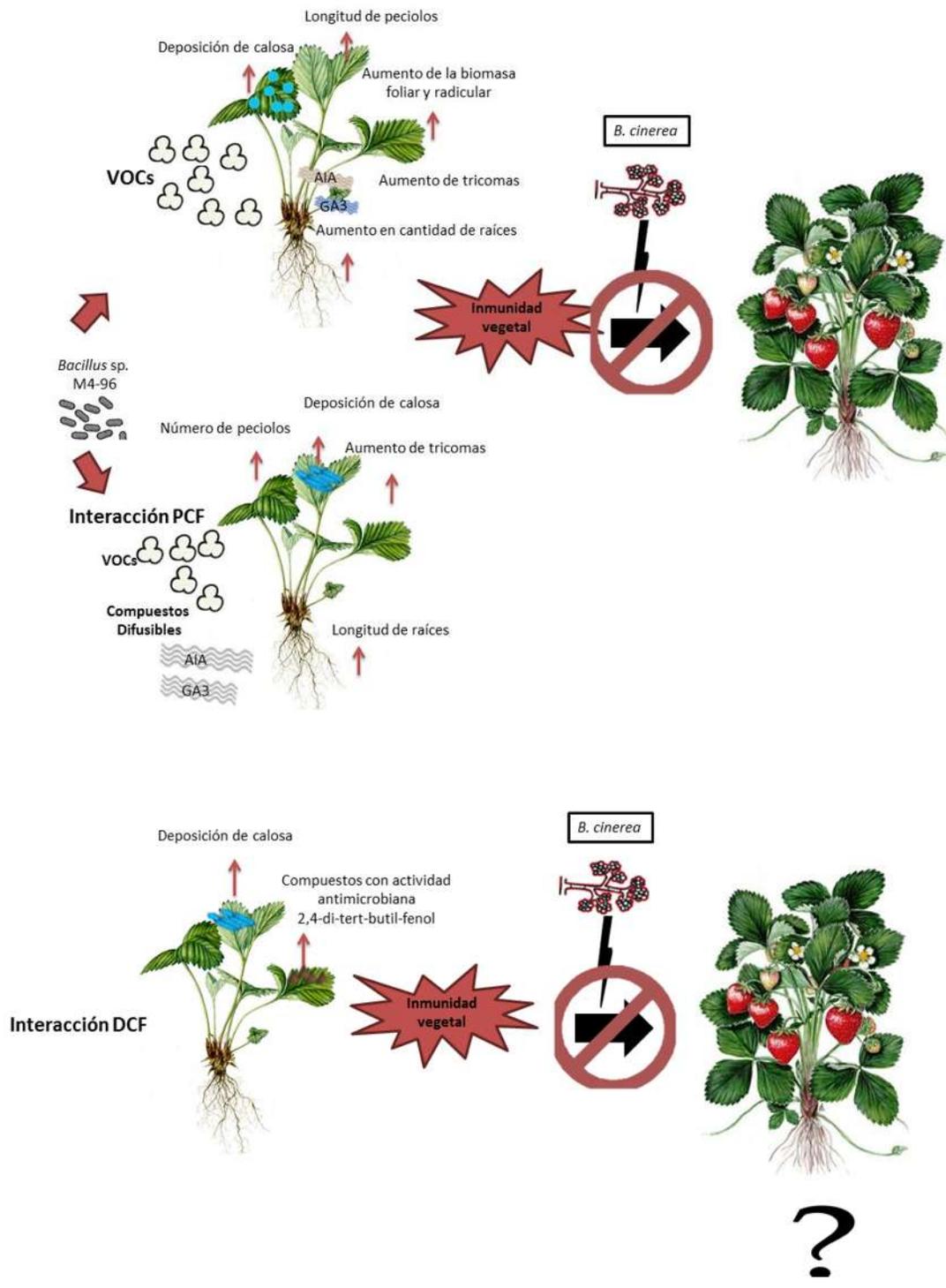


Figura 37. Modelo

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que *Bacillus* sp. M4-96 tiene un potencial biotecnológico aplicable a los cultivos de fresa. Además de ayudar al crecimiento, desarrollo y probablemente al rendimiento del fruto, esta rizobacteria tiene la capacidad de activar mecanismos de defensa en este cultivo, haciéndolo menos susceptible al ataque de patógenos como lo es *B. cinerea*, lo que puede reducir las pérdidas en el rendimiento de fresa.

## **10. CONCLUSIÓN**

*Bacillus* sp. M4-96 promueve el crecimiento y el desarrollo de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Aromas), además de potenciar la defensa por la producción de depósitos de calosa, por un aumento de tricomas y de compuestos fenólicos, lo que lleva a un retraso en la infección por *Botrytis cinerea*

## 11. PERSPECTIVAS

Este proyecto abrió paso a una amplia variedad de interrogantes, proponiendo las siguientes perspectivas:

- Determinar el efecto de los COVs por la inoculación *in vitro* con *Bacillus* sp. M4-96 sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento en plantas de fresa cultivadas en invernadero.
- Analizar el efecto de los COVs de *Bacillus* sp. M4-96 sobre la homeostasis de auxinas y giberelinas en plantas *in vitro*
- Determinar si los COVs de *Bacillus* sp. M4-96 contribuyen a la formación de lignina durante el reforzamiento de la pared celular en plantas *in vitro* de fresa.
- Evaluar si la inducción de calosa y el proceso de gutación en hojas de plantas de fresa *in vitro* es exclusiva de bacteria rizosféricas.
- Estudiar *in vitro* si *Bacillus* sp. M4-96 habita en la filósfera y la capacidad de activar la deposición de calosa, producción de tricomas y síntesis de compuestos fenólicos, en plantas vecinas no inoculadas.

## 12. LITERATURA CITADA

- Abbas A.** (2015). How pathogens attack plants. Plant pathology. [https://www.researchgate.net/publication/308642599\\_How\\_Pathogen\\_attacks\\_Plants](https://www.researchgate.net/publication/308642599_How_Pathogen_attacks_Plants)
- Ames BN.** (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221: 1256-1264.
- Arkhipova T., S. Veselov, A. Melentiev, E. Martynenko, G. Kudoyarova.** (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*. 272: 201-209.
- Benito E., Arranz M., Eslava A.** (2002). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinérea*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17. 43-46.
- Boller T., He SY.** (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324, 742–744.
- Carlton WM, Braun EJ, Gleason ML.** (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. The American Phytopathological Society.
- Dangl JL., Horvath, DM., Staskawicz, BJ.** (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341, 746–751.
- Darrow GM.** (1966). *The Strawberry: history, breeding and physiology*. Holt, Rinehart and Winston, New York, USA; p20-34.
- Dey R., Pal KK., Tilak KVBR.** (2014). Plant growth promoting rhizobacteria in crop protection and challenges. *Future challenges in crop protection against pathogens, fungal biology*. Springer Science+Business Media, New York, pp 31-58.
- Donofrio, NM., Delaney, TP.** (2001). Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis* nim1-1 and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 439–450.

**Ellinger D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., et al.** (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161, 1433–1444.

**Erturk Y., Ercisli S., Cakmakci R.** (2012) Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. *Journal of Plant Nutrition*, 35:6, 817-826.

**Escobar Bravo R.** (2010). Estrategias de defensa vegetal frente a patógenos y plagas. [www.encuentros.uma.es/encuentros130/estrategia.pdf](http://www.encuentros.uma.es/encuentros130/estrategia.pdf)

**Fahn A. Hallahan D.L., Gray JC.** (2000). Structure and function of secretory cells. In *Plant Trichomes*; Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, p. 37.

**Food and Agricultural Organization.** (2014). “Base de datos estadísticos”. Disponible en: <http://www.fao.org>.

**Fukui R, Fukui H, Alvarez AM.** (1999) Suppression of bacterial blight by a bacterial community isolated from the guttation fluids of anthuriums. *Appl Environ Microbiol* 65: 1020–1028.

**Ferrari S., Savatin DV., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., De Lorenzo, G.** (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4:49.

**Frairé–Cordero ML, Yañez MJ, Meto D, Velazquez G.** (2003). Hongos parásitos en el fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en postcosecha y algunos aspectos fisiológicos del fruto en anaquel. *Journal of Phytopathology.* 21(1).

**Gutiérrez-Mañero F., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F. Tadeo, M. Talon.** (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum.* 111: 206-211.

**Gutiérrez-Luna F, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, Cruz H, Macías-Rodríguez L.** (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis.* 2010;51:75–83.

**Goatley JL, Lewis RW.** (1966). Composition of guttation fluid from rye, wheat, and barley seedlings. *Plant Physiol*

**Gillapsy G., Be-David H., Gruissem.** (1993). W. Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*; 5:1439–1451.

**Girolami V., Mazzon L., Squartini A., Mori N., Marzaro M., Di Bernardo A., Greatti M., Giorio C., Tapparo A.** (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomology*, 102 (5), 1808 – 1815.

**Gonzalez J, Reyes F, Salas C, Santiago M, Codriansky N, Silva H** (2006). *Arabidopsis thaliana* A model host plant to study plant-pathogen interaction using Chilean field isolates of *B.cinerea*. *Biological Research*. 39,221-228.

**Gonzales WL, Negritto MA, Suarez LH, Gianoli E.** (2008). Induction of glandular and non-glandular trichomes by damage in leaves of *Madia sativa* under contrasting water regimes. *Acta Oecologica* 2008; 33:128-13.

**Guiry MD., Guiry GM.** (2008). *Vaucheria*. Algae base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.

**Grunwald I., Rupprecht I., Schuster G., Kloppstech K.** (2003). Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis-related proteins in non-infected barley plants. *Physiol Plant* 119:192–202.

**Hamann T.** (2012). Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front. Plant Sci.* 3:77.

**Hancock JF.** (1999). *Strawberries*. CABI Publishing.

**Hedrick UP.** (1925). *The small fruits of New York*. J.B. Lyons Co; Albany, New York.

**Higgs KH., Jones HG.** (1989). Empirical models of the conductance of leaves. *Plant, Cell & Environment* 12, 301-8.

**Hrazdina G.** (1992). Biosynthesis of flavonoids. *Plant Polyphenols*, Edited by R. W. Hemingway and P. E. Laks, Plenum Press, New-York, USA.

**Idris E., H. Bochow, H. Ross, R. Borriss.** (2004). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone-like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 111(6): 583-597.

**INFROAGRO** (2002). <http://www.infroagro.com>

**Jerry** (2012). Haifa Chemicals recommendations.

**Joo G., Y. Kim, I. Lee, K. Song y I. Rhee.** (2004). Growth promotion of red pepper seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology Letters*. 26: 487-491.

**Mathur S, Utkhede R.** (2002). Development of a dot blot technique for a rapid identification of *Botrytis cinerea*, the causal organism of grey mould in Green house tomatoes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77(%), 604-608.

**Macías-Rodríguez L, Quero E, López MG.** (2002). Carbohydrate Differences in Strawberry Crowns and Fruit (*Fragaria x ananassa*) during plant development. *J Agr Food Chem* 50: 3317–3321.

**Mass J.** (1987). Compendium of strawberry diseases. APS Press, St-Paul, Minn. pp. 137.

**Mathur, J.; Chua, N.** (2000). Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell* 12, 465–477.

**Mims C. W., Sewall T. C., Richardson, E. A.** (2000). Ultrastructure of the host-pathogen relationship in *Entomosporium* leaf spot disease of *Photinia*. *Int. J. Plant Sci.* 161, 291–295.

**Layton C., Maldonado E., Monroy L., Corrales C.L., Sánchez, L.C.** (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en 47 cultivos afectados por fitopatógenos. *Revista NOVA*, 16, 177-187.

**Lee RE.** (2008) *Phycology*, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.

**Levin DA.** (1973). The role of trichomes in plant defence. *Q Rev Biol* 48:3–15

**Luna Martínez, Laura, Martínez Peniche, Ramón A., Hernández Iturriaga, Montserrat, Arvizu Medrano, Sofía M., Pacheco Aguilar, Juan R..** (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 63-69.

**Olmez HK, Aran N.** (2005). Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *Int J Food Microbiol.* (2):135-43.

**Rhodes D., Nadolska-Orczyk, A.** (2001). *Plant Stress Physiology*. eLS.

**Rolbiecki S., Rzekanowski C.** (1997). Influence of sprinkler and drip irrigation on the growth and yield of strawberries grown on sandy soils. *Acta Hortic.* 439, 669-672.

**Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera** (2009). <http://www.gob.mx/siap>.

**Singh S.** (2014). Guttation: Quantification, microbiology and implications for phytopathology. *Progress in Botany* 75: Springer, Berlin Heidelberg. 187-214

**Shah J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-371.

**Snoeren TAL., Mumm R., Poelman E. H., Yang Y., Pichersky E., Dicke M.** (2010). The Herbivore-Induced Plant Volatile Methyl Salicylate Negatively Affects Attraction of the Parasitoid *Diadegma semiclausum*. *J. Chem. Ecol.* 36: 479-489.

**Pedraza RO, Motok J, Tortora ML, Salazar SM, Díaz-Ricci JC.** (2007). Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. *Plant Soil* 295:169–178

**Pedraza RO., Motok J., Salazar SM., Ragout AL., Mentel MI., Tortora ML., Guerrero-Molina MF., Winik B.C., Díaz-Ricci JC.** (2010). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 265-272.

**Perazza D., G. Vachon, M. Herzog.** (1998). Gibberellins promote trichome formation by up-regulating *GLABROUS1* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117: 375–383.

**Pogorelko G., Lionetti V., Bellincampi D., Zabolina, O.** (2013). Cell wall integrity: Targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens. *Plant Signal. Behav.* 8, 1–8.

**Schenk S T., Schikora, A.** (2015). Staining of Callose Depositions in Root and Leaf Tissues. *Bio-protocol* 5(6): e1429. <http://www.bio-protocol.org/e1429>.

**Sharma HC, Sujana G, Rao DM.** (2009). Morphological and chemical components of resistance to pod borer, *Helicoverpa armigera* in wild relatives of pigeonpea. *Arthropod-Plant Interact.* 3:151–61.

**Sonstebj A., Opstad N., Myrheim U., Heide OM.** (2009). Interaction of short day and timing of nitrogen fertilization on growth flowering of Korona strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.).

**Staples R., Meyer A.** (1995). Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiology letters.* 134, 1-7.

**Taiz L., Zeiger E.** (2006). *Plant physiology* 6th Ed. Sinauer Associates Inc. Usa.

**Tahmatsidou V., J O'Sullivan, AC. Cassells, D Voyiatzis,, G. Paroussi..** (2005). Comparison of AMF and PGPR inoculants for the suppression of *Verticillium* wilt of strawberry (*Fragaria x ananassa* Cv. Selva). *Applied Soil Ecology* 32:316-324.

**Talón M, Tadeo FR, Zeevaart JAD.** (1991). Cellular changes induced by exogenous and endogenous gibberellins in the shoot tips of the long-day plant *Silene armeria*. *Planta* 185:487-493.

**Tapia-Rodríguez A.** (2008). Determinación del efecto antifúngico de los extractos de las plantas *Achillea millefolium*, *Artemisia mexicana*, *Heterotheca inuloides* y *Eryngium carlinae* sobre hongos patógenos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Aromas). Tesis de licenciatura, facultad de biología, UMSNH.

**Tejera-Hernández B, Rojas-Badia M, Heydrich-Pérez M.** (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC, ciencias biológicas*, volumen 42, núm. 3. Centro nacional de investigaciones científicas. Ciudad de la Habana Cuba.

**Tortora ML., Díaz-Ricci JC., Pedraza RO.** (2012). Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil* 356: 279- 290.

**Vásquez Romero RE., Ballesteros Chavarro HG., Muños Osorio CA., Cuellar Chaparro ME.** (2006). Utilización de la abeja *Apis Mellifera* como agente polinizador en cultivos comerciales de fresa (*Fragaria chiloensis*) y mora (*Rubus*

*glaucus*) y su efecto en la producción. Bogotá, Colombia. Editorial Produmedios. P.33.

**Velarde BA.** (2009). Tesis de maestría. Modulación del transporte iónico por poliaminas y especies reactivas de oxígeno y su posible impacto en la respuesta de plantas al estrés salino. Universidad de Colima.

**Voigt C., Somerville S.** (2009). Insult resistant plants and methods of producing and using the same WO 2010087805 A2. Patents google.

**Xia D., Wu X., Shi J., Yang Q., Zhang Y.** (2011). Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) and their antimicrobial activity. LWT - Food Science and Technology 44(1):347-349.

**Zeevaart JAD, Gage DA, Talon M** (1993). Gibberellin A1 is required for stem elongation in spinach. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7401-7405.