



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

Estudio de *Bacillus velezensis* 83 como estimulador de resistencia
sistémica en *Arabidopsis thaliana* L.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Eduardo Martínez Terrazas

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Galindo Fentanes
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ángel Arturo Guevara García
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos, Febrero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dr. Enrique Galindo Fentanes.

Durante el mismo se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 924868.

También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través del proyecto (BG200618), y del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM para la asistencia a congresos nacionales.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su dirección y enseñanzas. Gracias por la confianza y la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A la Dra. Celia Flores Ocampo, por sus valiosos consejos, su paciencia y su compañía durante mi trayecto.

Al Dr. Mario Serrano, por permitirme trabajar dentro de su grupo de trabajo.

A los miembros del grupo de genómica funcional de eucariotes, y del grupo del Dr. Galindo, muchas gracias, compañeros.

A los amigos y compañeros que llegaron en esta travesía, Wendy, Ivette, Miguel, Roberto, Estefanía.

Índice general

Resumen	vii
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Las interacciones planta-microorganismo	2
2.2 El control biológico	2
2.3 Defensas de la planta	2
2.3.1 Señalización sistémica	4
2.3.1.1 Resistencia sistémica adquirida (RSA)	4
2.3.1.2 Resistencia sistémica inducida (RSI)	5
2.4 <i>Botrytis cinerea</i> como patógeno de estudio	6
2.5 <i>Bacillus</i> spp como bacterias benéficas asociadas a plantas	7
2.5.1 <i>Bacillus velezensis</i> una especie eficiente en la agricultura	8
2.5.2 Producción de acetoina y 2,3-butanodiol	9
3. Antecedentes: <i>B. velezensis</i> 83	10
4. Justificación	13
5. Hipótesis	13
6. Objetivo general	13
6.1 Objetivos Específicos	13
7. Estrategia experimental	14
8. Materiales y métodos	16
8.1 Microorganismo de estudio	16
8.1.1 Medios de cultivo	16
8.1.1.1 YPG	16
8.1.1.2 Mineral	16
8.1.2 Conservación de la cepa <i>Bacillus velezensis</i> 83	17
8.1.3 Preparación de inóculos de <i>Bacillus velezensis</i> 83 para producción de células	17

8.1.4 Obtención de células vegetativas	17
8.2 Material vegetal	17
8.2.1 Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis</i>	17
8.2.2 Condiciones de crecimiento.....	18
8.2.3 Diseño del sistema <i>in vitro</i> para estudiar efectos sistémicos por interacción de <i>B. velezensis</i> 83 con raíces de <i>A. thaliana</i> L.....	19
8.2.4 Aplicación del tratamiento con <i>Bacillus velezensis</i> 83	20
8.3 Manejo del patógeno	21
8.3.1 Condiciones de cultivo de <i>Botrytis cinerea</i>	21
8.3.2 Pruebas de infección de <i>B. cinerea</i> en <i>A. thaliana</i>	21
8.3.3 Determinación del porcentaje de incidencia de la infección.....	22
8.3.4 Análisis del medio de interacción raíz – <i>Bacillus velezensis</i> 83	22
8.3.5 Cinética de crecimiento y producción de metabolitos en el medio de interacción <i>B. velezensis</i> 83 – raíz de <i>A. thaliana</i> L.	22
8.3.6 Análisis de compuestos volátiles de <i>B. velezensis</i> 83 como posibles supresores directos del patógeno	23
8.4. Cuantificación mediante PCR a tiempo real del nivel de expresión de acumulación de los transcritos dependientes de fitohormonas.....	24
8.5 Ensayos con mutantes de <i>A. thaliana</i> L. para determinar la participación de las vías de señalización por fitohormonas	26
8.6 Métodos analíticos	27
8.6.1 Cuantificación de células totales.....	27
8.6.2 Determinación de la concentración de PGA	28
8.6.4 Determinación de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético.	29
8.6.5 Determinación de la concentración de glucosa y fructosa	30
8.7 Análisis estadístico	30
9. Resultados y discusión.....	31

9.1 Implementación del sistema <i>in vitro</i> para estudio de la interacción <i>B. velezensis</i> 83 – <i>A. thaliana</i> L.	31
9.2 Efecto de la concentración del inóculo y el tiempo previo de interacción de <i>B. velezensis</i> 83 sobre la incidencia de <i>B. cinerea</i> en las hojas de <i>A. thaliana</i>	33
9.3. Análisis de los medios hidropónicos provenientes de la interacción bacteria-raíz	34
9.4. Liberación de glucosa y fructosa por la raíz de <i>A. thaliana</i> sin la presencia de <i>B. velezensis</i> 83	41
9.5 Producción de acetoina por <i>B. velezensis</i> 83 en diferentes condiciones de interacción con la raíz de <i>A. thaliana</i> L.	44
9.6 Compuestos orgánicos volátiles de <i>B. velezensis</i> 83 como posibles supresores directos del crecimiento de <i>B. cinerea</i> en hojas	49
9.8 Determinación de las vías por fitohormonas en la resistencia mediada por <i>B. velezensis</i> 83 por el uso de mutantes de <i>A. thaliana</i>	61
10. Conclusiones	68
11. Perspectivas.	69
12. Referencias bibliográficas	70
Anexo 1. Procedimiento de extracción de RNA Total. Kit “Plant/Fungi Total RNA Purification” (Norgen Biotek Corp)	82
Anexo 2. Análisis de los resultados de la expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	84

Índice de Figuras

Figura 1. Activación simultánea en la misma hoja de las rutas de señalización de SA y JA en células adyacentes.....	6
Figura 2. Síntesis de acetoina y 2,3-butanodiol en <i>Bacillus</i>	10
Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia experimental seguida en este trabajo.....	15
Figura 4. Descripción de las cajas Magenta utilizadas.....	19
Figura 5. Desarrollo de plántulas de <i>A. thaliana</i> en el sistema implementado.....	20
Figura 6. Esquema del sistema in vitro de interacción entre <i>B. velezensis</i> 83 – <i>A. thaliana</i> L. ...	21
Figura 7. Imágenes representativas de A) hojas con lesiones y, B) hojas sin lesiones	22
Figura 8. Esquema de la modificación del modelo para evaluar el efecto de los VOC.....	24
Figura 9. Representación de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Para la cuantificación de bacterias se usó el cuadrante 3, cuyo volumen corresponde a 0.004 mm ³	28
Figura 10. Sistema in vitro utilizado para evaluar la interacción <i>B. velezensis</i> 83 – raíz de <i>A. thaliana</i> L.	32
Figura 11. Porcentaje de incidencia de lesión por <i>B. cinerea</i> en las hojas de <i>A. thaliana</i> en los diferentes tratamientos.	33
Figura 12. Concentración de acetoina en el medio de hidroponia, al momento de aplicar <i>B. cinerea</i> (A), y transcurridas 72 h (B) de la inoculación de <i>B. cinerea</i> en las hojas de <i>A. thaliana</i> L.	35
Figura 13. Concentración de 2,3-butanodiol en el medio de hidroponia, A) al momento de aplicar <i>B. cinerea</i> , B) transcurridas 72 h de aplicar <i>B. cinerea</i> en las hojas de <i>A. thaliana</i> L. Donde las letras mayúsculas representan significancias estadísticas solo dentro de un panel, sea A o B.	37
Figura 14. Concentración de glucosa en el medio de hidroponia, A) antes de aplicar <i>B. cinerea</i> , B) a las 72 h de aplicar <i>B. cinerea</i> en las hojas de <i>A. thaliana</i>	39

Figura 15. Concentración de fructosa en el medio de hidroponía, A) antes de aplicar <i>B. cinerea</i> , B) a las 72 h de aplicar <i>B. cinerea</i> en las hojas de <i>A. thaliana</i>	40
Figura 16. Cinéticas de liberación de glucosa y fructosa por la raíz de <i>A. thaliana</i> L. sin presencia de <i>B. velezensis</i> 83	43
Figura 17. Concentración de glucosa, fructosa y acetoína, en el medio de hidroponía donde fue inoculado <i>B. velezensis</i> 83 al T ₀ en raíces de <i>A. thaliana</i> y sin aplicación de <i>B. cinerea</i>	44
Figura 18. Concentración de glucosa, fructosa y acetoína en el medio de hidroponía donde fue inoculado <i>B. velezensis</i> 83 al tiempo 0 y con aplicación de <i>B. cinerea</i> a las 24h.....	45
Figura 19. Concentración de glucosa, fructosa y acetoína en el medio de hidroponía donde fue inoculado <i>B. velezensis</i> 83 al tiempo 0 y con aplicación de <i>B. cinerea</i> a las 48h.....	47
Figura 20. Efecto de los VOC producidos por <i>B. velezensis</i> 83 en medio suplementado con Glc y Fru; y la aplicación de acetoína y 2,3-butanodiol, en la incidencia de lesiones por <i>B. cinerea</i> .50	
Figura 21. Acumulación de transcritos de genes dependientes de JA	52
Figura 22. Acumulación de transcritos de genes dependientes de ET	54
Figura 23. Acumulación de transcritos de genes dependientes de SA	58
Figura 24. Acumulación de transcritos de genes para determinar la participación de las ROS y callosa, como mecanismos de defensa inducidos por <i>B. velezensis</i> 83	60
Figura 25. Efecto sobre la incidencia de <i>B. cinerea</i> , por la interacción de <i>B. velezensis</i> 83 en mutantes de <i>A. thaliana</i> L. con bloqueos de las respuestas medidas por fitohormonas.	62
Figura 26. Concentración de acetoína producida por <i>B. velezensis</i> 83, en el medio de interacción con mutantes de <i>A. thaliana</i> L.....	64
Figura 27. Efecto de la aplicación de acetoína sobre la incidencia de <i>B. cinerea</i> en <i>A. thaliana</i> Col-0 y mutantes con deficiencia en la señalización por fitohormonas	66

Índice de Tablas

Tabla 1. Productos comerciales de control biológico basados en <i>Bacillus velezensis</i>	9
Tabla 2. Composición del medio YPG.....	16
Tabla 3. Composición del medio mineral	16
Tabla 4. Composición del medio MS basal.....	18
Tabla 5. Composición de medio para germinación.	18
Tabla 6. Composición del medio Agar plant-MS.....	19
Tabla 7. Tratamientos de interacción de <i>B. velezensis</i> 83 con <i>A. thaliana</i> L. evaluados.....	21
Tabla 8. Condiciones evaluadas para la realización de cinéticas de interacción planta – <i>B. velezensis</i> 83.....	23
Tabla 9. Condiciones de las plantas para análisis de expresión de genes.	24
Tabla 10. Lista de oligos para qRT-PCR.....	26
Tabla 11. Algunos de los compuestos liberados por la exudación de raíces de <i>A. thaliana</i> Col-0 a medida que se desarrolla.	40
Tabla 12. Concentraciones de Glc, Fru y acetoína, a dos tiempos de corte (96 y 120 h) para los experimentos en ausencia y presencia del patógeno (<i>B. cinerea</i>) a dos tiempos de inoculación, y con y sin <i>B. velezensis</i> 83.....	48

Resumen

El género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. En particular, diversas especies dentro de este género pueden ser capaces de provocar resistencia sistémica inducida (RSI), definida como una mejora de la capacidad defensiva de la planta contra un amplio espectro de patógenos que se adquiere después de una estimulación. Este efecto es provocado por compuestos producidos por los microorganismos benéficos.

En este estudio se implementó un sistema *in vitro* con *Arabidopsis thaliana* L., para evaluar si la inoculación de *B. velezensis* 83, es capaz de inducir RSI contra la infección del patógeno modelo *Botrytis cinerea*. Para ello, primero se determinó la influencia de la concentración del inóculo aplicado, así como el tiempo de interacción previo a la inoculación del patógeno. Se encontró, que la aplicación de *B. velezensis* 83 disminuyó la incidencia de *B. cinerea*, presentándose la mayor supresión de lesiones en hojas, con la inoculación en raíz de 1×10^5 cel/mL de *B. velezensis* 83, 24 h previas a la inoculación de *B. cinerea* en hojas.

Se determinó que el crecimiento de *B. velezensis* 83 en interacción con la raíz de *A. thaliana* L., está acompañado de la producción de acetoina. Se realizó un seguimiento de la síntesis de acetoina y de la liberación de dos fuentes de carbono por la raíz de *A. thaliana*, por *B. velezensis* 83, bajo diferentes condiciones. Se observó que la síntesis de acetoina se acompaña primero del consumo de fructosa, hacia las 48 h. En plantas sin infectar, la síntesis de acetoina ocurre principalmente de las 24 a las 48 h; sin embargo, cuando en las hojas se aplican esporas de *B. cinerea* (a las 24 h de interacción), la producción de acetoina se prolonga hasta las 72 h, permitiendo alcanzar un título más alto.

Por qRT-PCR, se encontró que en comparación con plantas sin presencia de *Bacillus*, la aplicación de *B. velezensis* 83 en la raíz, incrementó considerablemente la expresión de los genes AOS y ACS6, lo que demostró que hay una interacción basada principalmente por Ácido Jasmonico/Etileno. En plantas infectadas, a las 48 h se apreció la mayor acumulación de transcrito para *PDF1.2*, siendo mayor en plantas pretratadas con *B. velezensis* 83. También se observó que los genes AOS, ACS6 y *PR4*, tienen menor acumulación en plantas pretratadas con *B. velezensis* 83, en comparación con plantas infectadas con *B. cinerea*; mientras que la acumulación de transcritos para *ICS1*, *PR1* y *NPR1*, fue mayor en las plantas preinoculadas con *B. velezensis* 83, lo que sugiere un cambio en la vía de señalización de fitohormonas a este tiempo. Este cambio demostró con plantas mutantes en la vía de señalización de SA, indicando que esta vía se requiere para el correcto control del patógeno, ya que la inoculación de *B.*

velezensis 83 no logró inducir una disminución de la incidencia de la enfermedad en estas mutantes.

Además, se determinó que el efecto observado es por interacción directa de *Bacillus* con la raíz, así como que, la aplicación de acetoína en concentraciones de 0.1-0.2 g/L produce una disminución en la incidencia de la enfermedad por *B. cinerea* en plantas tipo silvestre, pero no en mutantes afectadas en la vía de señalización de SA de forma más marcada.

1. Introducción

A nivel mundial las pérdidas agrícolas relacionadas con el ataque de plagas y enfermedades durante la pre y postcosecha pueden llegar hasta el 50 %. Por ello, la protección contra patógenos tiene una importancia primordial para la seguridad alimentaria. Con este propósito, por décadas se han usado pesticidas sintéticos que, si bien han contribuido a mejorar la productividad agrícola, simultáneamente han ocasionado la contaminación de los campos agrícolas y promovido el desarrollo de patógenos más resistentes, así como la eliminación de microorganismos benéficos y el aumento en el costo de la producción. Por ello es necesario usar modelos más sustentables, eficientes y de menor impacto al medioambiente, como es el uso de Agentes de Control Biológico (ACB) o sus metabolitos (Serrano-Carreón & Galindo, 2007; Serrano-Carreón *et al.*, 2010).

Los ACB se han descrito como mecanismos de biocontrol debido a la competencia por espacio y nutrientes que generan, el parasitismo, la producción de metabolitos antimicrobianos, la interferencia de *quorum sensing*, y la inducción de resistencia sistémica (RSI) basada en la estimulación de los mecanismos de defensa propios de la planta (Choudhary & Johri, 2009).

Las plantas han desarrollado una serie de respuestas constitutivas e inducibles para defenderse de los patógenos. Un aspecto fundamental de estas respuestas es entender cómo las poblaciones microbianas que se encuentran asociadas a la raíz establecen estas defensas y cuál es su función como reguladores de las respuestas inmunes (Rudrappa *et al.*, 2010). Estas interacciones planta-microorganismo se han estudiado mediante el uso de sistemas modelo de plantas, como lo es *Arabidopsis thaliana* L. (Ferreira-Saab *et al.*, 2018).

En el grupo del Dr. Enrique Galindo, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se cuenta con la cepa bacteriana *Bacillus velezensis* 83 (*B. v* 83), la cual es el principio activo de un producto comercializado para el control de varias enfermedades fúngicas en campo (Galindo *et al.*, 2013). Balderas-Ruíz *et al.*, (2020) reportaron que esta bacteria es capaz de colonizar la raíz, y promover el crecimiento de plantas. En esta interacción planta-bacteria, podrían estar involucrados procesos como la RSI.

Así, los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación representan aportes para una comprensión integral de los efectos de los ACB sobre las plantas, así como para mejorar la apreciación de las interacciones mutualistas, y promover el desarrollo de tecnologías agrícolas para un manejo integral de fitopatógenos.

2. Marco teórico

2.1 Las interacciones planta-microorganismo

La naturaleza sésil de las plantas las ha hecho extremadamente sensibles y flexibles ante el ambiente circundante (Deepika *et al.*, 2020). Las plantas son un nicho ecológico versátil y atractivo para diversos microorganismos que pueden colonizar tanto el interior de sus tejidos (endófitos), vivir en la superficie de partes aéreas (epífitas) o en su rizósfera, esta última que hace referencia a la región del suelo que se extiende a pocos milímetros de la superficie de sus raíces (rizobacterias) (Mousa & Raizada, 2015). Las raíces ejercen fuertes efectos sobre la rizósfera a través de la "rizodeposición" (producción de mucílagos) proporcionando nichos ecológicos adecuados para el crecimiento microbiano. Así, estas comunidades microbianas pueden emplearse con distintos fines, como la biofertilización, la fitoestimulación, el biocontrol y la fitorremediación (Bhattacharyya & Jha, 2012; Zheng *et al.*, 2013).

2.2 El control biológico

El control biológico se basa en el uso de enemigos naturales de las plagas. Ante la necesidad de proteger la salud humana, el control biológico de fitopatógenos se ha visto como un tratamiento eficiente y eficaz, con modos de acción complejos, pero que tienen el potencial para reemplazar el uso de pesticidas sintéticos, (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Petatán-Sagahón *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016).

Estos microorganismos se pueden encontrar de forma natural en asociación con diferentes tejidos y órganos de las plantas, interactuando directa o indirectamente con los patógenos. Se ha reportado un gran número de microorganismos potencialmente útiles para el control biológico, en los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Trichoderma* (Reinoso *et al.*, 2007; Elmahdi *et al.*, 2015). Lo interesante es que hasta el día de hoy se continúan describiendo nuevos modos de acción de estos ACB, por lo que su estudio dista mucho de ser un tema sin interrogantes (Serrano-Carreón *et al.*, 2010).

2.3 Defensas de la planta

A pesar de la presencia continua de diversos microorganismos en las inmediaciones de las plantas, las enfermedades ocurren con relativa baja frecuencia. Debido a los mecanismos de defensa eficientes para protegerse de las enfermedades (Thomma *et al.*, 2001). Así, las plantas han desarrollado múltiples estrategias de defensa, que incluyen una combinación de mecanismos constitutivos e inducibles que conllevan cambios morfológicos, moleculares, bioquímicos y/o

fisiológicos que ocurren poco tiempo después del ataque de microorganismos patógenos, tanto en el sitio de infección (innata), como en su periferia (respuestas locales) o, más tardíamente, en zonas distantes al sitio de infección (respuestas sistémicas) (Hahlbrock *et al.*, 1995; De León *et al.*, 2015). Se cree que la eficacia de estas barreras de defensa, así como la velocidad y el grado en que son inducibles, determinan si una planta se infecta o no por el patógeno potencial (Thomma *et al.*, 1998).

Ante el ataque de un patógeno, la respuesta innata, también conocida como respuesta independiente del huésped, por medio de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), comienza el reconocimiento de moléculas, glicoproteínas y polipéptidos. Ejemplos de estas moléculas son la flagelina y los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas, así como los peptidoglicanos y el ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, o bien la quitina y celulosa de hongos, que en conjunto, constituyen los llamados “patrones moleculares asociados a patógenos o a microbios” (PAMP o MAMP). Dicho reconocimiento desencadena una primera línea de defensa denominada “inmunidad activada por PAMPs” (PTI), mediante la cual la percepción de los microorganismos activa una cascada de respuestas, que de 1 a 5 minutos después de la activación de los PRR, llevan a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), de influxos de calcio (Ca^{2+}) y a la fosforilación de quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK). Posteriormente, entre los 5 y 30 minutos, se observa una acumulación de la hormona etileno (ET), la endocitosis de los PRR y posteriormente una reprogramación transcripcional de los genes de respuesta temprana (ERG), que conducen a la amplificación de las respuestas inmunitarias (Selim *et al.*, 2010; Farace *et al.*, 2015; Blanc *et al.*, 2018).

La PTI puede tener como consecuencia una reacción hipersensible (RH), que consiste en una necrosis rápida y localizada en el sitio alrededor del daño, que actúa directamente contra el patógeno, mediante la citotoxicidad generada por la acumulación de especies reactivas de oxígeno, que incluyen al anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Rudrappa *et al.*, 2010).

Estas respuestas locales llevan además a una rápida acumulación de enzimas del metabolismo de los fenilpropanoides, y de otras enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas y otros metabolitos secundarios (Bordiec *et al.*, 2011); ello como consecuencia de una activación transcripcional mediada por el reconocimiento del patógeno y que está restringida a una pequeña área alrededor de su sitio de ingreso (Farace *et al.*, 2015).

En particular, uno de los aspectos más fascinantes de respuesta de las plantas ante diferentes estímulos es su habilidad de generar señales en un tejido y transmitir las a partes distantes. Estas señales dan lugar a la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) como la β -1,3-glucanasa (GLU) y la quitinasa (CHI), y de enzimas oxidativas como la peroxidasa (POX), la lipoxigenasa (LOX) y las polifenol oxidasas. Adicionalmente, se han observado cambios bioquímicos que llevan a la acumulación de compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas (fitoalexinas), así como la formación de barreras físicas como la callosa y lignina, que disminuyen el crecimiento o la entrada del patógeno y la colonización de los tejidos (Choudhary *et al.*, 2007; Waewthongrak *et al.*, 2014).

2.3.1 Señalización sistémica

Las plantas perciben y responden constantemente a los cambios en su entorno, funciones esenciales para su supervivencia, desarrollo y reproducción. Sin embargo, estas respuestas de "aclimatación" no se limitan a los tejidos y órganos que inicialmente censan (perciben) el cambio de las condiciones ambientales, sino que se propagan rápidamente desde estos tejidos a las partes distales de la planta que aún no han experimentado directamente el estímulo o el estrés, lo que genera una respuesta sistémica en toda la planta que le permite sobrevivir a los cambios en su entorno inmediato o a las condiciones de estrés emergente. Este proceso, denominado señalización sistémica, consta de diferentes mensajeros que incluyen hormonas, péptidos pequeños, compuestos volátiles, Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno (ROS), señales eléctricas y cambios en la presión hidráulica. Se ha especulado que muchas de estas señales interactúan entre sí en un tipo de diafonía que influye en la duración, la frecuencia y la intensidad de las señales, determinando su impacto sistémico (Fichman *et al.*, 2020).

En el caso del control de patógenos, los mecanismos sistémicos de defensa, tienen la ventaja de permitir una respuesta eficiente contra hongos, bacterias, virus e insectos, gracias a la inducción de una variedad de respuestas de defensa que implican la acción de hormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), entre otras. En función del tipo de organismo inductor, la respuesta sistémica puede ser de dos tipos: inducida (benéfico) o adquirida (patógeno).

2.3.1.1 Resistencia sistémica adquirida (RSA)

En particular, la RSA depende de la hormona SA que se sintetiza en la planta a través de la ruta de los fenilpropanoides y cuyos niveles aumentan significativamente, tanto en tejidos infectados

como en tejidos distantes a los sitios de infección. Así, la RSA es un mecanismo inducible que establece los mecanismos de defensa en la planta y que se activa en los órganos sistémicos (distales) no infectados como respuesta a una infección de patógenos previa (primaria) (o contacto con sus productos). Ante una infección posterior, la RSA también logra establecer una activación más robusta y rápida con la que se expresan los mecanismos de defensa, confiriendo así una mayor resistencia contra un amplio espectro de patógenos de plantas (Van Wees *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015).

La activación de RSA requiere la translocación de una o más señales móviles desde los tejidos infectados hacia los órganos distales: en este caso, el sistema vascular funciona como un conducto para la translocación de factores que facilitan la comunicación intraplanta a larga distancia. En los últimos años, se han identificado varios metabolitos supuestamente implicados en la señalización de la RSA, entre los que se incluyen el éster metílico de SA (MeSA), el diterpenoide dehidroabietinal (DA), el ácido azelaico (AZA) y un factor dependiente de glicerol-3-fosfato (G3P). La señalización a larga distancia de algunos de estos metabolitos también requiere la proteína de transferencia de lípidos DIR1 (Shah & Zeier, 2013).

2.3.1.2 Resistencia sistémica inducida (RSI)

Las plantas responden activamente a estímulos químicos generados por los microorganismos con los que conviven, mismos que pueden inducir o condicionar los mecanismos de defensa a través de vías de señalización complejas e interconectadas, que activan la expresión de genes cuyos productos generan un mecanismo conocido como resistencia sistémica inducida (RSI), que confiere la defensa en las plantas contra una amplia gama de enfermedades. Así, la RSI constituye un estado de defensa mediado por JA y ET (García-Gutiérrez *et al.*, 2013), las cuales generalmente actúan en conjunto, con el fin de activar genes que codifican proteínas de defensa, como son inhibidores de proteinasas y defensinas, entre otros (Van Wees *et al.*, 2000).

En *A. thaliana*, se ha visto que la señalización de SA regula la defensa contra patógenos biotróficos (que se alimentan de células vivas del hospedante), mientras que la señalización de JA controla la defensa contra insectos (herbívoros) y patógenos necrotrofos (que matan activamente a las células del hospedante para la adquisición de nutrientes). Las vías de señalización de SA y JA se inhiben entre sí, es decir, una suprime a la otra dependiendo de la situación. Bajo ciertas condiciones, ambas vías de señalización (SA y JA) se activan simultáneamente dentro del mismo tejido durante la inmunidad a pesar del antagonismo descrito. Esto ocurre debido a una separación espacial en la que cada vía se induce en diferentes zonas

de los tejidos como se observa en la Figura 1 y que le permite a la hoja defenderse contra múltiples enemigos a la vez, lo que puede aumentar su probabilidad de supervivencia (Figura 1).

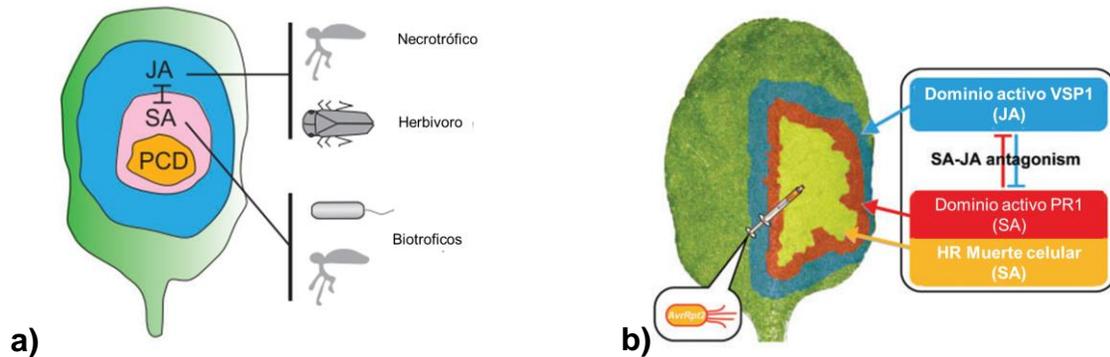


Figura 1. Activación simultánea en la misma hoja de las rutas de señalización de SA y JA en células adyacentes.

a) Defensa por separación espacial de actividades hormonales antagonicas. La señalización de SA se activa en la zona (rosa) que rodea la zona de muerte celular programada (amarilla). La señalización de JA se activa en la zona (azul) fuera de la zona activa de SA (Tomada de Tsuda, 2018). **b)** Resumen esquemático de la organización de patrones de dominios activos de SA y JA que aparecen alrededor del sitio de infección de *Pst_a2*. Tomado de (Betsuyaku *et al.*, 2018).

2.4 *Botrytis cinerea* como patógeno de estudio

B. cinerea es un hongo fitopatógeno necrotrófico que se disemina por viento, puede infectar a más de 200 diferentes cultivos. La infección es difícil de controlar debido a su amplia variedad de mecanismos de infección, es inoculado por diversos hospedantes y puede sobrevivir como micelio, conidios o por períodos prolongados como esclerocios. Aunque hay fungicidas para el control de *B. cinerea*, éstos han tenido una baja efectividad relativa debido a la plasticidad genética del patógeno ya que con relativa facilidad genera cepas resistentes a los fungicidas (Dean *et al.*, 2012).

Por ejemplo, Ajouz *et al.* (2011) analizaron 204 aislados de *B. cinerea* para determinar la sensibilidad al antifúngico pirrolnitrina usando un ensayo de germinación de esporas. Los resultados mostraron que los aislados exhibieron un amplio rango del grado de sensibilidad, con una diferencia de 8.4 veces los valores de CE₅₀ (concentración efectiva para reducir la germinación de esporas en un 50% en comparación con el control). Aún los aislados menos sensibles también fueron resistentes a múltiples fármacos. La existencia de este amplio rango de sensibilidad del hongo refleja el hecho de la presencia de cepas resistentes en el campo.

Así, debido a su relevancia económica y la disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares para estudiarlo (obtención de mutantes nulas y el silenciamiento de genes), se ha convertido en el patógeno fúngico necrotrófico más ampliamente estudiado como sistema modelo en fitopatología molecular (Williamson *et al.*, 2007).

2.5 *Bacillus* spp como bacterias benéficas asociadas a plantas

Bacillus es un género de bacterias Gram positivas, considerados como fábricas microbianas para la producción de moléculas biológicamente activas (antibióticos, volátiles y enzimas) (Gordillo & Maldonado, 2012) que funcionan en contra de una amplia gama de patógenos transmitidos a través de las semillas o presentes en el suelo (Mora *et al.*, 2011; Dimkić *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013). Además, debido a la formación de endoesporas (resistentes a luz ultravioleta y calor), estos microorganismos poseen una mayor longevidad. Estas características los han vuelto excelentes candidatos para bioformulaciones comerciales de ACB (Ait Kaki *et al.*, 2013; Lisiane-Berlitz *et al.*, 2014).

Un grupo importante de compuestos antimicrobianos que sintetizan diversas especies de *Bacillus* son los lipopéptidos cíclicos (CLP) como la surfactina, iturina y fengicina, los cuales recientemente se han estudiado con mayor interés como facilitadores de la colonización de la raíz de plantas e inductores del potencial de resistencia del hospedante. Jourdan *et al.* (2009) reportaron que la surfactina, en suspensiones de células de tabaco induce eventos tempranos relacionados con la defensa, como la alcalinización del medio extracelular, el influjo de Ca_2^+ , la producción de ROS y la modificación en el patrón de compuestos fenólicos, todo ello sin generar considerable fitotoxicidad o efecto adverso sobre la integridad y el potencial de crecimiento de las células. Además García-Gutiérrez *et al.* (2013) utilizando mutantes de *B. subtilis* defectivo en la producción de surfactina, también confirmaron el papel de este CLP en la respuesta inmune de la planta.

Waewthongrak *et al.* (2014) reportaron que los CLPs fengicina y surfactina de *B. subtilis* ABS-S14 inducen la expresión de genes relacionados con la defensa como: *GLU*, *CHI*, *POX* y *LOX* en *Citrus sinensis* cv. Así mismo, Debois *et al.* (2015) demostraron que *B. velezensis* S499 muestra una temprana acumulación de surfactina en el entorno de la raíz, que atenúa las reacciones defensivas de la planta que permiten el desarrollo de altas densidades del *Bacillus* sea sin alterar el desarrollo de la planta, a lo cual sigue una fuerte respuesta de defensa durante la percepción de los patógenos. Por otro lado, Farace *et al.* (2015) encontraron que la micosubtilina activa las vías de señalización de SA y JA, mientras que la surfactina induce una respuesta regulada por

SA. También, Rahman *et al.* (2015) demostraron que la aplicación en la raíz de surfactina o bien una cepa mutante que sólo produce surfactina, reduce significativamente la infección por *Magnaporthe oryzae*. Por su parte, Yamamoto *et al.* (2015) reportaron que la aplicación de iturina A y surfactina aumentó en más del 500 % la expresión génica de CHI y GLU en plantas de fresa a los 6 días de la infección respecto al control.

Estos antecedentes sugieren que la surfactina podría constituir una clase de MAMP inductor de resistencia sistémica inducida, por tanto, la variedad de lipopéptidos sintetizados por un agente de control biológico puede explicar por qué algunas cepas de *Bacillus* son más eficientes que otras para reducir enfermedades. Esto ha llevado a considerar la producción de CLPs como un criterio de selección de cepas para constituirse en ACB. Sin embargo, también hay que considerar otros inductores como la flagelina, LPS y compuestos volátiles (De Vleeschauwer & Höfte, 2009). En este sentido, Rudrappa *et al.* (2010) reportaron que la acetoína desencadena la RSI, a través de NPR1 dependiente de SA/ET y sin requerimiento de JA. Wu *et al.* (2018) demostraron que cuando la acetoína y el 2,3-butanodiol de *B. velezensis* FZB42 se absorben por la raíz se induce mejor el cierre de estomas en *A. thaliana* y *Nicotiana benthamiana*, que cuando son volatilizados, acompañado de la acumulación basal de H₂O₂ y NO. Por su parte, Selim *et al.*, (2010) encontraron que 1 µM de paenimyxin producido por *Paenibacillus* sp. B2 aplicado en raíces de *Medicago truncatula*, suprime el 95% de los síntomas necróticos causados por *Fusarium acuminatum*, aunque a 10 µM tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las plantas.

2.5.1 *Bacillus velezensis* una especie eficiente en la agricultura

Bacillus velezensis fue identificado por primera vez en 2005, aislando dos especies novedosas de muestras del río Vélez en Torre del mar en la provincia de Málaga, España (Rabbee *et al.*, 2019). Se sabe que esta bacteria ejerce efectos antagónicos contra los patógenos vegetales mediante la producción de diversos compuestos antimicrobianos. Además de la actividad antagonista específica de *B. velezensis* contra patógenos, se encontró que contribuye a la protección de las plantas al competir con microorganismos dañinos por nutrientes como el hierro (Li *et al.*, 2014). Por ejemplo, el endófito *B. velezensis* cepa CCO9, ampliamente distribuido en varias partes de tejido y órganos de la planta, se conoce por sus funciones de protección contra enfermedades en trigo, a través de estimular la resistencia de las plantas (Kang *et al.*, 2018). *B. velezensis* cepa SQRT3 puede inducir RSI en las plantas activando los genes asociados a la defensa del JA y el SA (Li *et al.*, 2017). *B. velezensis* cepa PEA1 demostró actividades antifúngicas y antivirales contra *Fusarium oxysporum* y el virus del mosaico del pepino (CMV) MN594112. PEA1 fue capaz de reducir la acumulación de la proteína de la cubierta viral (CMV-

CP) en 2.1 veces por inducción de RSI, en comparación con las hojas de *Datura stramonium* sin tratar (Abdelkhalek *et al.*, 2020). Lo anterior demuestra que las cepas de *B. velezensis* poseen genes que codifican para enzimas encargadas de la producción de compuestos bioactivos relacionados con el biocontrol que actúan en la rizosfera, y que estos genes se activan mediante la exposición de la bacteria a los exudados de las raíces que se producen, tras la infección de patógenos (Reva *et al.*, 2019).

En los últimos años, con base en análisis filogenómicos, muchas cepas de *B. subtilis* asociados a plantas se reclasificaron como especies de *B. velezensis*. Además, varios agentes de biocontrol comerciales basados en *B. subtilis* fueron re-categorizados como *B. velezensis* (Tabla 1). Estos agentes comerciales de biocontrol se utilizan ampliamente para controlar varios microorganismos patógenos en el suelo y para proteger las plantas de diversas enfermedades bacterianas y fúngicas (Fazole-Rabbee & Baek, 2020).

Tabla 1. Productos comerciales de control biológico basados en *Bacillus velezensis*

Nombre comercial	Agentes de biocontrol	Nombre actual	Patógenos diana (enfermedad)	Fabricante	Referencias
RhizoVital®	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>B. velezensis</i> FZB42	<i>R. solani</i> (pudrición del fondo en lechuga); <i>E. amylovora</i> (Tizón del fuego bacteriano)	ABiTEP, GmbH, Berlín, Alemania	(Chowdhury <i>et al.</i> , 2013; Fan <i>et al.</i> , 2018)
Botrybel	<i>B. amyloliquefaciens</i> AH2	<i>B. velezensis</i> AH2	<i>B. cinerea</i> (moho gris)	Agricaldes, España	(Anastassiadou <i>et al.</i> , 2020)
Serenade®	<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>B. velezensis</i> QST 713	<i>Trichoderma aggressivum</i> ; <i>Blumeria graminis</i> (Moho polvoriento)	AgraQuest Inc., California, Estados Unidos	(Pandin <i>et al.</i> , 2018; Matzen <i>et al.</i> , 2019)
Kodiak™	<i>B. subtilis</i> GB03	<i>B. velezensis</i> GB03 (AYTJ00000000)	<i>F. oxysporum</i> (marchitez por Fusarium); <i>R. solani</i> (enfermedad del algodón)	Gustafson Inc., Texas, Estados Unidos	(Brannen & Kenney, 1997; Krebs <i>et al.</i> , 1998; Choi <i>et al.</i> , 2014)
Taegro®	<i>B. subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i> FZB24	<i>B. velezensis</i> FZB24	<i>F. oxysporum</i> (marchitez del tomate); <i>Phytophthora infestans</i> (tizón tardío de la papa)	Novozymes, Virginia, Estados Unidos	(Kilian <i>et al.</i> , 1983; Borriss <i>et al.</i> , 2011; Keerthana <i>et al.</i> , 2018; Nguyen <i>et al.</i> , 2019)
Fungifree® AB	<i>Bacillus</i> sp. 83	<i>B. velezensis</i> 83	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AGRO&BIOTECNIA	(Balderas-Ruiz <i>et al.</i> , 2020)

2.5.2 Producción de acetoína y 2,3-butanodiol

Una de las características de la oxidación de carbohidratos como fuente de carbono, es la formación de múltiples subproductos, tal es el caso de la acetoína y el 2,3-butanodiol, que se

synthetizan a partir del piruvato proveniente de la glucólisis. En adición a esto, el ácido acético se puede formar por conversión de la acetoína a acetato (forma ionizada del ácido acético).

La función metabólica atribuida a la producción de estos compuestos reside en evitar la acumulación de acetato y la consecuente acidificación intracelular por mantenimiento del poder reductor, debido a la conversión reversible de acetoína a 2,3-butanodiol en donde el NAD⁺ es reducido a NADH (Magee y Kosaric, 1978). Por lo anterior, la producción de 2,3-butanodiol está fuertemente influenciada por la disponibilidad de oxígeno, siendo las condiciones de baja transferencia de oxígeno las que favorecen la producción de este metabolito (Alam *et al.*, 1990; Celinska y Grajek, 2009)

Las principales bacterias productoras de estos compuestos pertenecen a los géneros *Klebsiela*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Magee y Kosaric, 1987). Las bacterias dentro del género *Bacillus* producen 2,3-butanodiol como el principal producto derivado del metabolismo de carbohidratos. Por esta razón tanto el 2,3-butanodiol y su precursor, la acetoína, generalmente se asocian al crecimiento celular (Magee y Kosaric, 1987).

La vía biosintética del 2,3-butanodiol en *Bacillus*, implica la conversión de piruvato en α -acetolactato controlado por el gen *AisS*, seguido de la conversión de α -acetolactato en acetoína por una α -acetolactato-descarboxilasa (codificada por el gen *AisD*), con un paso final que convierte la acetoína en 2,3-butanodiol por acción de la enzima acetoína reductasa codificada por el gen *BdhA* (Wu *et al.*, 2018). Esta vía se esquematiza en la Figura 2.

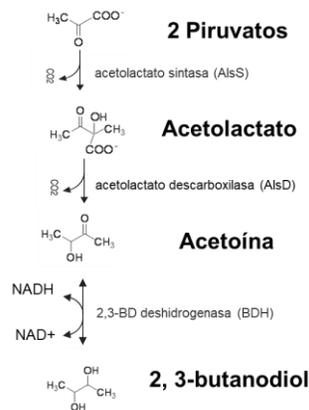


Figura 2. Síntesis de acetoína y 2,3-butanodiol en *Bacillus*.

3. Antecedentes: *B. velezensis* 83

Resulta particularmente interesante realizar estudios en el área de control biológico con cepas microbianas ya reconocidas por su efectividad comprobada en campo. En este sentido, en un

trabajo de colaboración entre el laboratorio del Dr. Enrique Galindo del Instituto de Biotecnología de la UNAM y el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (unidad Culiacán), se aisló de la filósfera de mango, una cepa de la bacteria *Bacillus velezensis* (83), que ha demostrado un eficaz control de antracnosis en mango a nivel de producción y postcosecha (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005), así como otras especies de hongos (como el causante de la cenicilla y el moho gris) que infectan a diversos cultivos comerciales (Aragón-Gómez, 2012; FMC, 2016). Actualmente esta cepa se comercializa como el ingrediente activo del producto *Fungifree AB*® para su aplicación foliar en una gran variedad de cultivos de interés agrícola (Galindo *et al.*, 2013).

Esta cepa se seleccionó mediante ensayos *in vitro* en donde demostró actividad antagonista contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Galindo *et al.*, 2015). En un inicio Morales-Sánchez (2007) estudió la cinética de crecimiento y esporulación de *B. velezensis* 83 en cultivo en lote para el desarrollo de un proceso para la producción de altas concentraciones de esporas. Posteriormente, Cristiano-Fajardo (2012) estudió los requerimientos nutricionales y el comportamiento fisiológico de esta cepa durante el crecimiento vegetativo y esporulación en un medio mineral suplementado con glucosa, con lo cual desarrolló un proceso de alta densidad celular donde se alcanzaron concentraciones de células vegetativas y esporas viables de 5.4×10^{10} UFC/mL y 3.13×10^{10} spo/mL, respectivamente identificando además la presencia de acetoina y 2,3-butanodiol en los medios de producción.

Por otro lado, con esta misma cepa, en cultivos suplementados con glucosa, Solis-Arcos (2010) identificó la síntesis de compuestos solubles termorresistentes con actividad antifúngica contra *Fusarium* spp. Esta actividad antifúngica se mantiene después de someterse a esterilización (120 °C), sugiriendo la presencia de antibióticos lipopéptidos, como iturinas, surfactinas y otros aún no identificados.

Por su parte, Mallqui-Crispin (2016) y Soriano-Peña (2016) al estudiar el efecto de la densidad celular y de la limitación nutricional en la esporulación de *B. velezensis* 83, respectivamente, en cultivos en lote y en lote alimentado, describieron que esta cepa produce acetoina y 2,3-butanodiol junto con los CLPs surfactina y bacilomicina, metabolitos que se han descrito como estimuladores del crecimiento en plantas e inductores de resistencia sistémica inducida, lo que sugiere que esta cepa, podría ser capaz de inducir resistencia sistémica inducida. Luna-Bulbarela *et al.* (2018) evaluaron la actividad antifúngica de los homólogos de bacilomicina D producida por *B. velezensis* 83 contra *Colletotrichum gloeosporioides*, y demostraron que estos lipopéptidos inhiben tanto la germinación de las esporas como el crecimiento del micelio, por inducción de daño a las membranas celulares.

Desde otra perspectiva, Mezo *et al.* (2015), observaron que la aplicación de Fungifree AB® al suelo a una dosis de 2.5 kg/ha tuvo un efecto positivo en el desarrollo de raíces de maíz, lo que sugiere que esta cepa de *B. velezensis* 83 puede emplearse eficazmente como inoculante microbiano y promotor de crecimiento. Partiendo de estas observaciones Barrera-Ortiz (2018) estudió *in vitro* los efectos de inocular *B. velezensis* 83 en *Arabidopsis thaliana*, observando que la bacteria coloniza a la raíz durante su desarrollo, con efectos de aumentos en el peso fresco del follaje y raíz, así como en el número de raíces secundarias, aunque con efectos negativos cuando se emplean altas concentraciones de bacteria bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Recientemente Balderas-Ruíz *et al.* (2020), reportaron que en el genoma de *B. velezensis* 83 hay diez grupos de genes biosintéticos que codifican para enzimas involucradas en la producción de metabolitos secundarios asociados con la actividad de biocontrol. En el mismo trabajo se reportó, por medio de un ensayo de co-cultivo *in vitro*, que *B. velezensis* 83 promueve el desarrollo de raíces laterales y hojas más grandes en *A. thaliana*. Además, cuando esta cepa se aplicó al sustrato de plántulas de maíz causó un aumento del 12% en altura y del 45% de la biomasa de la raíz en relación con las plántulas control no inoculadas.

4. Justificación

La cepa de *B. velezensis* 83 se ha usado eficientemente para el control de fitopatógenos, sin embargo, no se han identificado con detalle los mecanismos de acción involucrados. Ensayos *in vitro* con *A. thaliana* sugieren que este ACB puede establecer una relación positiva con la raíz de la planta, por lo cual podría ser capaz de promover RSI debido a que, en medios sintéticos, se ha demostrado que produce inductores como CLP (surfactina y bacilomicina), acetoina y 2,3-butanodiol. La demostración de que *B. velezensis* 83 causa RSI, permitiría implementar nuevos métodos de aplicación en campo del producto *FungiFree* AB®.

5. Hipótesis

Bacillus velezensis 83 causa resistencia sistémica inducida en *Arabidopsis thaliana* L.

6. Objetivo general

Evaluar en un sistema *in vitro* si *Bacillus velezensis* 83 causa resistencia sistémica inducida en *Arabidopsis thaliana* L.

6.1 Objetivos Específicos

- Desarrollar un sistema *in vitro* que permita realizar inoculaciones con *Bacillus velezensis* 83 en raíces de plantas de *A. thaliana* L.
- Determinar si la inoculación de *B. velezensis* 83 en raíz le confiere a *A. thaliana* L. protección contra *B. cinerea*, y definir si la concentración de células de *B. velezensis* 83 modifica el efecto.
- Identificar analíticamente la presencia de metabolitos de *B. velezensis* 83 en las interacciones con la raíz de *A. thaliana* L.
- Definir, a través del uso de líneas afectadas en la señalización mediada por SA, JA o ET y análisis de la expresión de genes, las vías de fitohormonas que pudieran controlar la señalización sistémica que media las respuestas de RSI provocadas por *B. velezensis* 83.

7. Estrategia experimental

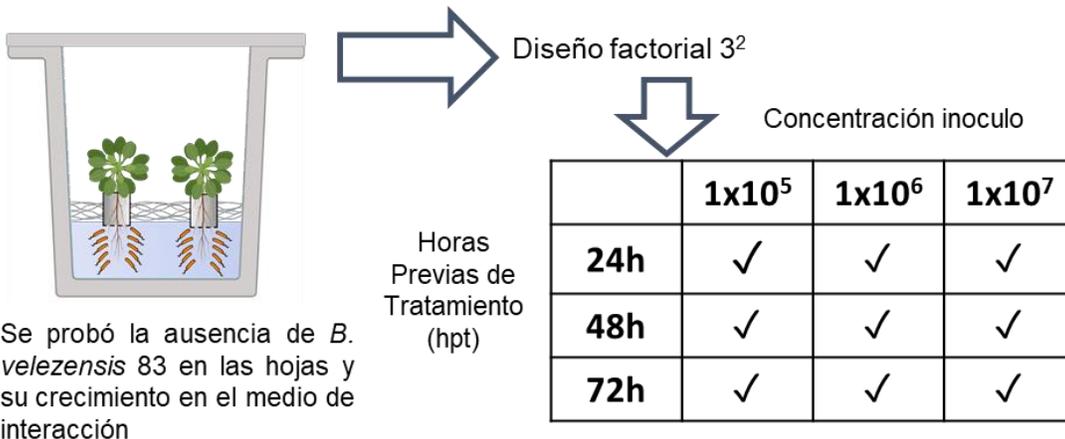
En este estudio se buscó determinar si *Bacillus velezensis* 83 induce resistencia sistémica en *Arabidopsis* como un mecanismo para ejercer biocontrol. Para comprobar esta vía de acción se propuso el uso de un patosistema entre el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* y la planta modelo *A. thaliana* L. Para ello se desarrolló un sistema *in vitro* que permitiera estudiar el efecto de *B. velezensis* 83 de forma individual, disminuyendo así el efecto por factores bióticos o abióticos que son difíciles de controlar en condiciones de invernadero. En la primera etapa de selección, se evaluó la concentración del inóculo de *B. velezensis* 83 en medio líquido (hidroponía), donde estaba en contacto con una sección de la raíz. Asimismo, se evaluó, el efecto del tiempo de interacción (24, 48 y 72 h) después de la inoculación (ddi). En estas plantas se aplicaron esporas de *B. cinerea* en las hojas, para analizar la incidencia de hojas con lesiones, comparando los resultados entre las plantas tratadas y no tratadas (testigo).

A su vez, el manejo de un medio líquido estéril donde sólo se aplica la bacteria de interés a la raíz de *A. thaliana* L., facilita el análisis de compuestos suministrados por la planta y producidos por la bacteria en esas condiciones. Derivado de la experiencia en el estudio previo de la bacteria *B. velezensis* 83 en el grupo del Dr. Galindo, se analizó la presencia del: ácido poliglutámico (PGA), lipopéptidos, acetoina y 2,3-butanodiol, para los cuales se cuenta con metodologías estandarizadas para su cuantificación por HPLC.

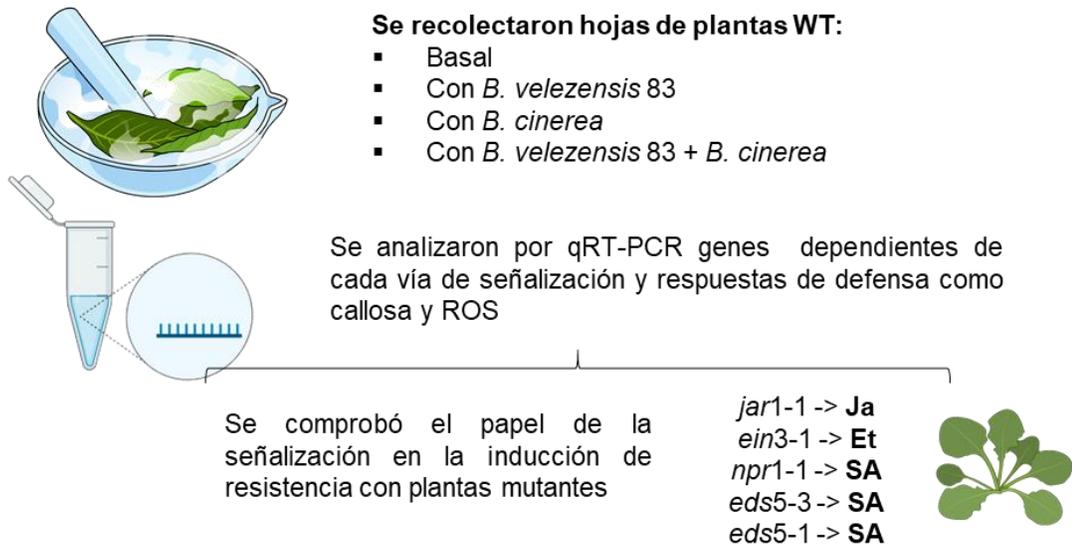
Como resultado de una primera etapa de selección de variables, se identificó una concentración y un tiempo de interacción, que permitió apreciar un efecto claro y reproducible de protección contra *B. cinerea* en las plantas. Considerando estas condiciones, se determinó si la infección de las plantas involucraba la producción de acetoina, para lo cual se monitoreó la producción de acetoina mediante la toma de muestras del medio líquido, comparando la producción en plantas infectadas y sin infectar con *B. cinerea*.

Con la finalidad de conocer si se activa una señalización mediada por fitohormonas en esta RSI, se determinó la acumulación de transcritos correspondientes a genes marcadores para la síntesis y respuesta de SA, JA y ET, por PCR en tiempo real. Posteriormente, con el fin de determinar la importancia de la integridad de estas vías en los efectos de resistencia observados, se emplearon líneas mutantes de *A. thaliana* L., que tienen comprometida la señalización de las vías de fitohormonas mediadas por JA, ET y SA. Adicionalmente, se evaluó el efecto que tiene, por sí misma, la aplicación de acetoina en plantas silvestres y mutantes. En la Figura 3 se esquematiza la estrategia de trabajo que se siguió en esta investigación.

1. Sistema *in vitro* de interacción



2. Papel de la señalización por fitohormonas SA, JA y Et



3. Cuantificación de metabolitos de *B. velezensis* 83 en la interacción

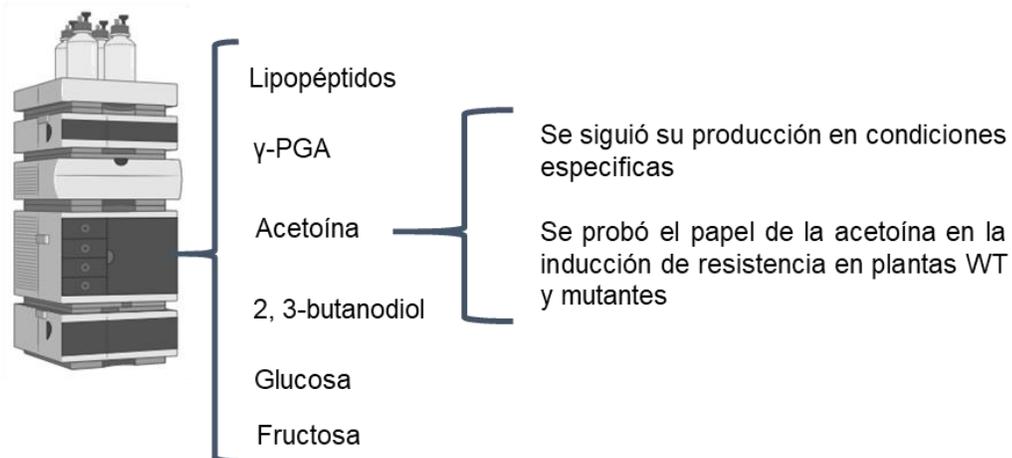


Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia experimental seguida en este trabajo.

8. Materiales y métodos

8.1 Microorganismo de estudio

La cepa que se usó fue *B. velezensis* 83, constituyente activo del fungicida FungiFree®, originalmente aislada de la filosfera de plantas de mango, y que fue proporcionada por la empresa Agro&Biotecnia S de RL de CV, Cuernavaca, Morelos. La cepa se conservó en forma de esporas desarrolladas en medio mínimo con glicerol al 40% (v/v) a -20°C.

8.1.1 Medios de cultivo

8.1.1.1 YPG

Este medio (Tabla 2), se utilizó para la reactivación de la cepa (almacenada en stocks de glicerol 40%) y para la generación de inóculos. En este medio no se ajusta el pH.

Tabla 2. Composición del medio YPG

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Dextrosa	10
Agar (YPG solido)	16

8.1.1.2 Mineral

Se utilizó el medio mineral (Soriano-Peña, 2016) para la conservación de la cepa (Tabla 3).

Tabla 3. Composición del medio mineral

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	15
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.29
K ₂ HPO ₄	2.66
KH ₂ PO ₄	3.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.635
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.032
CaCl ₂	0.17
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.08

Para la elaboración del medio se preparó una solución con el sulfato de amonio y los fosfatos de potasio, ajustando el pH a 7.2 con NaOH 2N. Las sales restantes y la glucosa se esterilizaron individualmente, y se añadieron bajo condiciones estériles.

8.1.2 Conservación de la cepa *Bacillus velezensis* 83

La bacteria fue proporcionada por la empresa Agro&Biotecnia S. de R.L. de C.V., se propagó para preservarla en glicerol (40% v/v), para lo cual a partir del criotubo proporcionado la cepa se inoculó en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio mineral (Tabla 3) bajo agitación continua a 200 rpm, a 30°C por 24 horas. El cultivo se mezcló con glicerol al 80% (v/v) en relación 1:1 en condiciones estériles (40 % v/v final) y se conservó a -20 °C en un ultracongelador hasta su uso.

8.1.3 Preparación de inóculos de *Bacillus velezensis* 83 para producción de células.

En primera instancia, para la reactivación de la cepa, se tomó un inóculo de la bacteria conservada en glicerol al 40 % (v/v) y en condiciones estériles se estirió en medio YPG-agar en caja Petri. Se incubó a 30 °C por 12 h. Se tomaron dos asadas de las colonias formadas para inocular matraces de 500 mL con 100 ml de medio caldo YPG, que se incubaron a 30°C y 200 rpm por 12 h.

8.1.4 Obtención de células vegetativas

Para obtener células libres de metabolitos, las muestras se colocaron en tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron (10 minutos a 6500 g). La pastilla se resuspendió con solución salina 0.85% y el proceso se repitió dos veces más. Al final, el paquete celular de tres tubos se resuspendió en 10 ml de agua destilada, y se determinó la concentración de células por conteo total.

8.2 Material vegetal

Se emplearon semillas de *A. thaliana* L. ecotipo Columbia-0 (Col-0).

8.2.1 Esterilización de semillas de *Arabidopsis*

Se siguió el procedimiento descrito por Rivero *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Se transfirieron alrededor de 400 semillas a un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 700 µL de etanol al 70%. El tubo se mantuvo con agitación durante 30 minutos y se centrifugó 1 min a 2000 g. En condiciones de esterilidad se descartó el etanol al 70 % y se agregaron 700 µL de etanol absoluto. Las semillas se mezclaron por inversión 2 veces, se eliminó la mayor parte del etanol absoluto y el remanente se dejó secar completamente en una campana de flujo laminar.

Para los medios y soluciones de crecimiento se empleó el medio MS basal (Murasnige y Skoog, 1962) (Tabla 4).

Tabla 4. Composición del medio MS basal.

Componente	(mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650
H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂	332.2
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.025
Na ₂ -EDTA	37.26
FeSO ₄ • 7H ₂ O	27.8
MgSO ₄	180.7
MnSO ₄ • H ₂ O	16.9
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.25
KI	0.83
KNO ₃	1900.0
K ₂ HPO ₄	170.0
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	8.6

8.2.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas desinfectadas se cultivaron en medio MS para germinación (Tabla 5). Se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 2 días y se transfirieron a una cámara de crecimiento durante 3 días con un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad con 60 a 70% de humedad relativa (Murasnige y Skoog, 1962).

Tabla 5. Composición de medio para germinación.

Componente	Concentración (g/L)
MS 0.2X	0.867
Sacarosa	10
Agar	10

El medio se ajustó a pH 5.7 con NaOH 1M, y se esterilizó a 121 °C por 15 min.

8.2.3 Diseño del sistema *in vitro* para estudiar efectos sistémicos por interacción de *B. velezensis* 83 con raíces de *A. thaliana* L.

Se llevó a cabo una revisión de la literatura sobre sistemas de crecimiento *in vitro*, buscando que el desarrollo de la raíz ocurriera en medio líquido (hidroponía) y que las plantas de *A. thaliana* llegaran a formar la roseta de hojas de alrededor de 0.8 cm de diámetro, con el fin de poder aplicar el inóculo de *B. cinerea*. Este sistema surgió de la combinación de los modelos propuestos por Conn *et al.* (2013), Strehmel *et al.* (2014), Burrell *et al.* (2017) y Grady *et al.* (2019), con algunas modificaciones. A continuación, se describe el sistema que se usó.

Plántulas de 4 días postgerminación se trasplantaron a columnas de fondo abierto (de 1 mL de volumen) conteniendo Agar plant-MS (Tabla 6) que se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo 0.5 mL de medio MS 0.5X. Estos a su vez se colocaron en una caja Magenta de policarbonato, de 77 mm × 77 mm × 97 mm estéril (Figura 4) en la que se colocó una base de espuma de poliestireno estéril con 20 mL de agua destilada estéril.

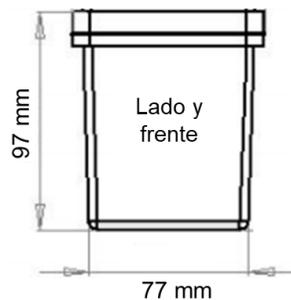


Figura 4. Descripción de las cajas Magenta utilizadas.

Las cajas Magenta se transfirieron a una cámara de crecimiento durante 15 días con un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad con 60 a 70% de humedad relativa.

Tabla 6. Composición del medio Agar plant-MS.

Componente	Concentración (g/L)
MS 0.2X	0.867
Sacarosa	6
Agar Plant	7

El medio se ajustó a pH 5.7 con NaOH 1M, y se esterilizó a 121 °C por 15 min.

8.2.4 Aplicación del tratamiento con *Bacillus velezensis* 83

Después de los 15 días de crecimiento, se obtuvieron plantas con una roseta de 6 a 8 hojas, y con una raíz que emergió varios mm hacia abajo de la columna con “Agar Plant”, adquiriendo un tamaño y desarrollo apropiados para realizar infecciones con *B. cinerea*. (Figura 5).

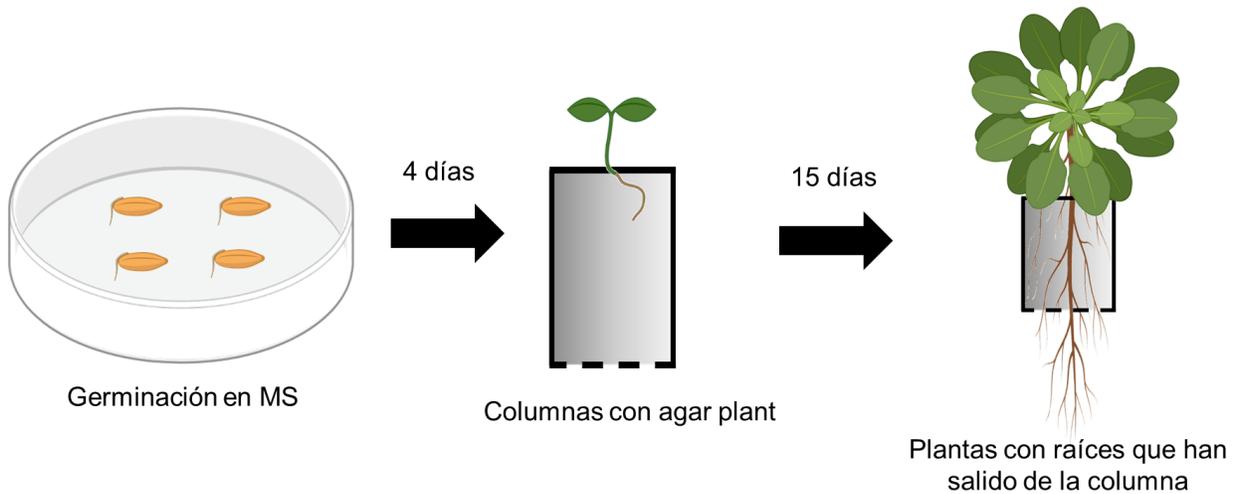


Figura 5. Desarrollo de plántulas de *A. thaliana* en el sistema implementado

Para la interacción de *B. velezensis* 83 con la raíz de la planta, las columnas con las plantas se traspasaron a una caja Magenta (6 plantas por caja) apoyándolas a una altura de 1 pulgada en una malla metálica con orificios de 0.5 pulgadas de diámetro. En el fondo de la caja se aplicaron 25 mL de medio líquido (MS 0.5 X, pH 7) y se agregó una cantidad de células vegetativas de *B. velezensis* 83 para alcanzar la concentración que corresponda al tratamiento indicado. En la Figura 6 se ilustra el sistema utilizado. En la Tabla 7 se consignan los tratamientos y tiempos de interacción evaluados, especificando la clave con la que se identificarán en la descripción de los resultados.

Las cajas donde se aplicaron los tratamientos se mantuvieron en una agitadora orbital a 30 rpm en un cuarto de cultivo vegetal a 25°C con un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad.

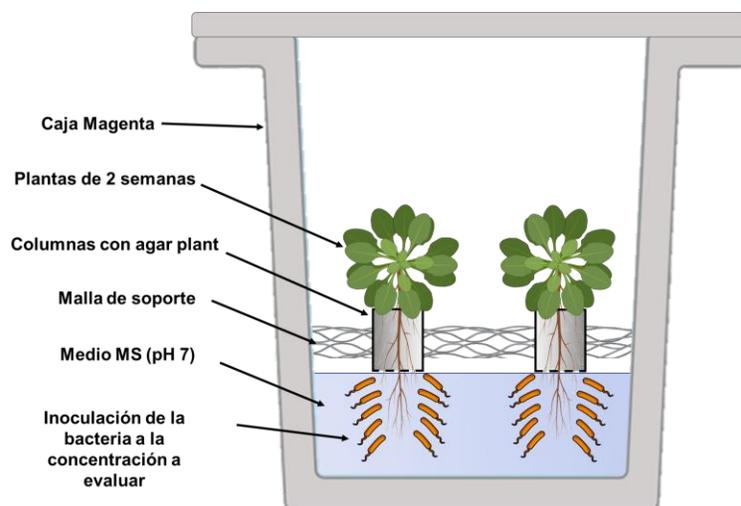


Figura 6. Esquema del sistema *in vitro* de interacción entre *B. velezensis* 83 – *A. thaliana* L.

Tabla 7. Tratamientos de interacción de *B. velezensis* 83 con *A. thaliana* L. evaluados

Concentración de células/mL	24 h de interacción	48 h de interacción	72 h de interacción
1×10^5	5-24	5-48	5-72
1×10^6	6-24	6-48	6-72
1×10^7	7-24	7-48	7-72

8.3 Manejo del patógeno

8.3.1 Condiciones de cultivo de *Botrytis cinerea*

Se empleó la cepa de *B. cinerea* B05.10, la cual se cultivó en placas con agar de papa dextrosa (39 g/L) incubándose por 9 días a 25°C para esporulación (Hahn *et al.*, 2014). Las esporas se recuperaron del crecimiento micelar, para lo cual se vertieron 10 mL de agua destilada estéril y la superficie del micelio se raspó cuidadosamente con una varilla de vidrio flameada, la suspensión de esporas se recuperó en un tubo estéril y se filtró con gasa estéril. Se cuantificó la concentración de esporas mediante cuenta total en cámara de Neubauer y se calculó el volumen necesario para el inóculo a utilizar en las pruebas posteriores.

8.3.2 Pruebas de infección de *B. cinerea* en *A. thaliana*

Se empleó el método descrito por Ferreira-Saab *et al.*, (2018) para lo cual se preparó, en medio caldo papa dextrosa 0.25 X una suspensión de esporas a 5×10^4 esporas/mL, de la que se

inocularon 5 µL en las hojas de las plantas. Las cajas se volvieron a colocar en agitación en el cuarto de cultivo y los resultados se evaluaron a las 72 h posteriores a la inoculación del patógeno.

8.3.3 Determinación del porcentaje de incidencia de la infección.

Para calcular el índice de incidencia se contó el número de hojas que mostraron lesiones características, y se determinó el porcentaje de incidencia con relación al número total de hojas inoculadas, con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de incidencia} = \frac{\text{Número de hojas con lesiones}}{\text{Número de hojas inoculadas}} * 100$$

En la Figura 7 se presenta cómo se distinguió entre hojas con y sin lesiones.

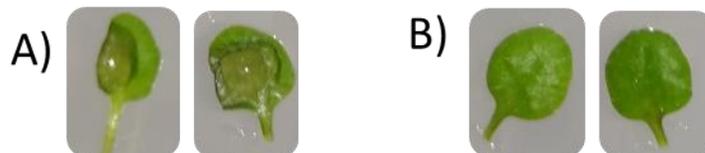


Figura 7. Imágenes representativas de **A)** hojas con lesiones y, **B)** hojas sin lesiones

8.3.4 Análisis del medio de interacción raíz – *Bacillus velezensis* 83

Se tomaron muestras de 2 mL del medio líquido donde interaccionaron *B. velezensis* 83 con la raíz de *A. thaliana* L. al momento de inocular *B. cinerea* (tiempo 0) y a las 72 h posteriores a la infección. Las alícuotas recuperadas se centrifugaron a 12,000 g por 15 min para compactar las células del medio. El sobrenadante libre de células se preservó a -20°C hasta su posterior análisis mediante HPLC, para la cuantificación de PGA, lipopéptidos, acetoina, 2,3-butanodiol, glucosa y fructosa.

8.3.5 Cinética de crecimiento y producción de metabolitos en el medio de interacción *B. velezensis* 83 – raíz de *A. thaliana* L.

La cinética de crecimiento bacteriano y de producción de metabolitos, se determinó bajo cada una de las condiciones especificadas en la Tabla 8.

En todas las condiciones se partió de un volumen de 50 mL de líquido de hidroponia inoculado con células vegetativas de *B. velezensis* 83 a una concentración de 1×10^5 cel/mL. En cada caja Magenta se colocaron 9 plantas, conservándose en las mismas condiciones de los otros ensayos realizados (sección 8.2.4). Para los análisis se tomaron dos muestras de 1 mL cada 6 o 12 h, que

se centrifugaron a 12,000 g por 15 min para separar las células del medio. El sobrenadante libre de células se preservó a -20°C hasta su posterior análisis por HPLC.

Tabla 8. Condiciones evaluadas para la realización de cinéticas de interacción planta – *B. velezensis* 83

Clave	Inoculación de <i>B. velezensis</i> 83	Inoculación de <i>B. cinerea</i> (<i>B. c</i>)	Tiempo al que se inoculó <i>B. cinerea</i>
<i>A. thaliana</i> Basal	-	-	NA
<i>A. thaliana</i> + <i>B. c</i> 24h	-	X	24 h
<i>A. thaliana</i> + <i>B. c</i> 48h	-	X	48 h
<i>A. thaliana</i> + <i>B. v</i> 83	X	-	NA
<i>A. thaliana</i> + <i>B. v</i> 83 + <i>B. c</i> 24h	X	X	24 h
<i>A. thaliana</i> + <i>B. v</i> 83 + <i>B. c</i> 48h	X	X	48 h

8.3.6 Análisis de compuestos volátiles de *B. velezensis* 83 como posibles supresores directos del patógeno

Una vez establecidas las condiciones para la aplicación de *B. velezensis* 83, que favorecían la resistencia a *B. cinerea*, se procedió a comprobar que el efecto no estuviera mediado por la acumulación de compuestos orgánicos volátiles (VOC) dentro de la caja Magenta.

Para esto, las columnas para el trasplante de las plántulas se sellaron del fondo con película plástica, para evitar que la raíz estuviera en contacto con *Bacillus* o los compuestos a evaluar. Las plantas se crecieron en las mismas condiciones experimentales y, a los 15 días, se transfirieron a cajas con mallas de 1.5 pulgadas de alto. Se evaluó la presencia de *B. velezensis* 83 en el medio con Glc y Fru, así como la aplicación de acetoina y 2,3-butanodiol. Para esto, en el fondo se vertieron 25 mL de medio MS 0.5X, con soluciones patrón estériles de Glc y Fru, para tener una concentración final de 0.3 g/L de cada una. Posteriormente, se aplicó el inóculo de *B. velezensis* 83 para alcanzar una concentración de 1×10^5 cel/mL. El inóculo de *B. cinerea* se aplicó en las hojas de las plantas y las cajas se cerraron e incubaron en el cuarto de cultivo en las condiciones ya mencionadas.

En otros experimentos, usando soluciones patrón de acetoina y 2,3-butanodiol esterilizadas por filtración, se ajustaron sus concentraciones en el medio 0.2 y 0.05 g/L, respectivamente. Al igual que la condición anterior, al momento de aplicar los tratamientos se inocularon las hojas con *B.*

cinerea y las plantas se incubaron por 72 h en el cuarto de cultivo, una vez ocurrida la infección, se midió la magnitud de las lesiones. En la Figura 8 se esquematiza el diseño utilizado.

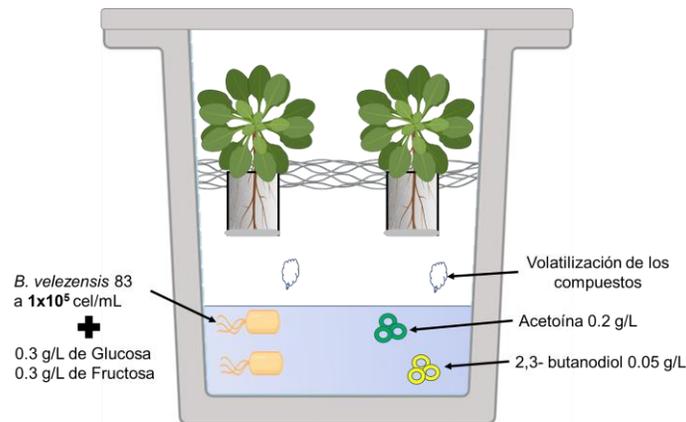


Figura 8. Esquema de la modificación del modelo para evaluar el efecto de los VOC

8.4. Cuantificación mediante PCR a tiempo real del nivel de expresión de acumulación de los transcritos dependientes de fitohormonas.

Se definieron las cuatro condiciones de estudio que, se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de las plantas para análisis de expresión de genes.

Clave	Infección con <i>B. cinerea</i>	Tratamiento con <i>B. velezensis</i> 83
<i>B. cinerea</i>	✓	✗
<i>B. velezensis</i> 83 + <i>B. cinerea</i>	✓	✓
<i>B. velezensis</i> 83	✗	✓
Basal	✗	✗

Para esto, se utilizaron plantas tipo silvestre (*Col-0*), crecidas de la manera ya descrita; al mismo tiempo, las plantas se transfirieron de las condiciones de crecimiento a las condiciones experimentales de hidroponía (como se define en los puntos **8.2.3** y **8.2.4**). En este paso, solo a los tratamientos "*B. v83*" y "*B. v83* + *B. cinerea*", se les realizó la inoculación de 1×10^5 cel/mL de *B. v83* en el líquido de interacción. Después de 24 h de este proceso, a las plantas de los tratamientos "*B. cinerea*" y "*B. v83* + *B. cinerea*" se les realizó la aplicación del inóculo de infección

de *B. cinerea* (véase punto **8.3.2**). El momento en que las plantas infectadas con *B. cinerea* se colocaron en el cuarto de cultivo junto con los otros dos tratamientos se consideró como el tiempo 0, para la toma de muestras.

Las muestras para el análisis posterior consistieron de las hojas de seis plantas colectadas, a las 6, 12, 48 y 72 h posteriores a la infección y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Para la extracción del ARN total se utilizó el kit “Plant/Fungi Total RNA Purification” (Norgen Biotek Corp), siguiendo las especificaciones del fabricante, como se detalla en el **Anexo 1**. La concentración y pureza del RNA se midió con un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000. El RNA se trató con DNAsa usando el kit Turbo-DNase (Ambion Inc., USA), y el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) se empleó para la síntesis de cDNA, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para las reacciones de qRT-PCR, se utilizaron aproximadamente 5 ng de cDNA, una mezcla de 10 $\mu\text{mol/mL}$ de cada oligonucleótido requerido y 5 μL de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) en un volumen final de 10 μL de reacción. La secuencia de oligonucleótidos empleados en este estudio se detalla en la Tabla 10. El análisis de PCR en tiempo real (RT-qPCR) se llevó a cabo en el equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron de: 2 min a 50°C, 15 min a 95°C; y 45 repeticiones del ciclo 95°C por 15 s, 60°C por 30s y 72°C por 30 s. Por último, se obtuvo una curva de disociación. Todos los análisis de qRT-PCR se realizaron con tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas.

Los niveles del transcrito para actina utilizado recurrentemente por otros autores para analizar la expresión génica de *A. thaliana*, se utilizó para normalizar los resultados. La cuantificación de los niveles de expresión se realizó con base en el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ reportado por Livak & Schmittgen (2001) descrito en el **Anexo 2**.

Tabla 10. Lista de oligos para qRT-PCR.

Observación	Gen	Secuencia (5'-->3')
Defensa-Ac. Salicílico	<i>PR1</i>	TTC TTC CCT CGA AAG CTC AA
		AAG GCC CAC CAG AGT GTA TG
Defensa-Ac. Salicílico	<i>ICS1</i>	TTC TCA ATT GGC AGG GAG AC
		CCC GAC TGC AAA TTC ACT CT
Defensa-Ac. Salicílico	<i>NPR1</i>	TCT TGC CGA TGA CAA CCA GC
		GCC TTT GAG AGA ATG CTT TA
Defensa-Etileno	<i>PR4</i>	GTA CCA CCG CGG ACT ACT GT
		TGG AGC AAT AAG CAG TCA CG
Defensa-Etileno	<i>ACS6</i>	TGG TTG GTT AAA GGC CAA AG
		TGG TCC ATA TTC GCA AAA CA
Defensa-Jasmonatos	<i>PDF1.2</i>	CCA AGT GGG ACA TGG TCA G
		ACT TGT GTG CTG GGA AGA C
Defensa-Jasmonatos	<i>AOS</i>	ATC CAA AGA TCT CCC GAT CC
		GTG GAT TCT CGG CGA TAA AA
Defensa-ROS	<i>ZAT12</i>	ATC AAG TCG ACG GTG GAT GT
		ACA AAG CGT CGT TGT TAG GC
Callosa	<i>GSL5</i>	CTG GAA TGC TGT TGT CTC TGT TG
		TCG CCT TTT GAT TTC TTC CCA GT
Endógeno	Actina	GCC ATC CAA GCT GTT CTC TC
		GCT CGT AGT CAA CAG CAA CAA

8.5 Ensayos con mutantes de *A. thaliana* L. para determinar la participación de las vías de señalización por fitohormonas

Para determinar la posible participación de las vías del ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico, en la señalización sistémica que implicada en la resistencia inducida por *B. velezensis* 83, se emplearon las líneas mutantes *ein3-1* (etileno) (Chao *et al.*, 1997), *jar1-1* (ácido jasmónico) (Pieterse *et al.*, 1998), *eds5-3*, *eds5-1* (ácido salicílico) (Nawrath *et al.*, 2002) y *npr1-1* (ácido salicílico) (Cao *et al.*, 1997), proporcionadas por el laboratorio del Dr. Mario Serrano del CCG.

La obtención de plántulas se realizó como se describe para las plantas de tipo silvestre (*Col-0*) (secciones 8.2.3-8.2.4). Las mutantes se trataron únicamente con una concentración de 1×10^5 cel/mL de *B. velezensis* 83, y un tiempo de interacción de 24 h. En las hojas de las plantas se aplicó el inóculo de *B. cinerea* (ver sección 8.3.2), y las cajas Magenta se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento. Pasadas 72 h, se registraron los datos de incidencia de hojas

infectadas y se tomaron alícuotas del medio hidropónico para determinar la concentración de acetoína producida.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de aplicar acetoína en el medio hidropónico, empleando las concentraciones determinadas que *B. velezensis* 83 sintetiza bajo las condiciones experimentales. Para esto, se empleó el mismo set de plantas mutantes en iguales condiciones de crecimiento, con la diferencia de que las plantas se traspasaron de las condiciones de crecimiento a las experimentales 24 h antes de realizar la infección, para asegurar la ausencia de contaminación en los medios determinado por visualización de que el líquido de interacción siga transparente. Después de 24 h en estas condiciones, se realizó la aplicación del inóculo de *B. cinerea* en las hojas.

Posteriormente, en el medio líquido se aplicó una alícuota de un *stock* de acetoína (esterilizada con filtro de 0.2 μm) para conseguir la concentración final a evaluar. Las cajas con plantas se mantuvieron en el cuarto de cultivo en oscuridad y, después de 72 h se midió la incidencia de hojas infectadas.

8.6 Métodos analíticos

8.6.1 Cuantificación de células totales

La cuantificación de células totales (sin distinción de tipos celulares, ni viabilidad) se llevó a cabo mediante conteo directo al microscopio, utilizando una cámara de Neubauer, la cual permite una cuenta directa con respecto a un volumen constante.

En la Figura 9, se presenta la cuadrícula de una cámara de Neubauer. En el centro de la cuadrícula de la cámara, se encuentra un cuadrado conformado por otros 25 cuadrados con lados de 0.20 mm de longitud, con un área de 0.04 mm². A su vez, cada uno de estos cuadrados está dividido en 16 cuadrados de 0.02 mm de longitud. La profundidad de la cámara es de 0.1 mm.

Debido al tamaño de las células de la bacteria, conviene trabajar sobre los cuadrados de 0.04 mm² de superficie (cuadrante 3). De esta forma, se mantiene un volumen de 0.004 mm³, equivalente a 4x10⁻⁶ mL.

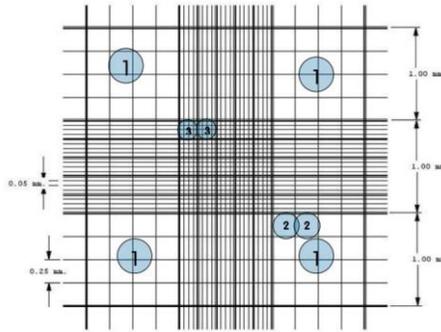


Figura 9. Representación de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Para la cuantificación de bacterias se usó el cuadrante 3, cuyo volumen corresponde a 0.004 mm^3 .

Así, la muestra homogénea (se realizaron diluciones en caso de ser necesarias) se colocó en la cámara, se observó bajo el microscopio con el objetivo de 40X y se realizó el conteo celular (4 cuadrantes). La concentración celular se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = \frac{\text{Promedio de células por cuadrante}}{0.004 \text{ mm}^3 / 1000} * \text{Factor de dilución}$$

8.6.2 Determinación de la concentración de PGA

La concentración del ácido L-γ-poliglutámico (PGA) en el medio libre de células se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés), usando una columna ultrahidrogel 500 y una columna lineal con precolumna, acopladas a un equipo de HPLC con un detector de índice de refracción (Waters 2414). Como fase móvil se utilizó nitrato de sodio 0.1 M a una temperatura de 38°C con un flujo de 0.8 mL/min. El volumen inyectado de las muestras (medio utilizado en el sistema libre de células) y los estándares fueron de 100 μL.

Se realizó una curva de calibración con estándares de PGA como sal de sodio (Sigma-Aldrich). Para la determinación del peso molecular del PGA se realizó una curva de calibración con estándares de óxido de polietileno (Waters).

8.6.3 Determinación de la concentración de lipopéptidos

La concentración de surfactina y bacilomicina en el medio libre de células se determinó por HPLC usando un sistema de HPLC Waters 2695, utilizando una columna Zorbax C8 (4,6 mm x 150 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). Los componentes de la fase móvil fueron (A) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y (B) 0.1% de TFA en acetonitrilo.

Los productos se eluyeron a 30°C con un flujo de 0.5 ml/min, con un 37 % de disolvente B durante 10 min, seguido de un gradiente lineal del 37-80 % durante 1 min y se mantuvo al 80 % durante otros 10 min; posteriormente se estableció, un nuevo gradiente lineal del 80-37 % durante 1 minuto y se finalizó con el 37 % durante 8 minutos. El patrón de elución se controló determinando la absorbancia a 205 nm. Se utilizaron surfactina e iturina puras (Sigma Chemical) como muestras patrón para obtener una curva estándar.

8.6.4 Determinación de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético.

La concentración de ácido acético, 2,3-butanodiol y acetoína en el medio libre de células se determinó mediante HPLC de acuerdo con lo reportado por Soriano (2016). Se utilizó un módulo de separación Waters 2695 equipado con una columna para análisis de ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (de 7.8 x 300 mm), empacada con una resina de estireno-divinilbenceno. La fase móvil fue ácido sulfúrico 5 mM, a un flujo de 0.6 mL/min y una temperatura de columna de 50°C. El volumen de inyección de las muestras (medio libre de células) y de los estándares fue de 20 µL. La detección del ácido acético y el 2,3-butanodiol se realizó con un detector de índice de refracción (Waters 2414). La detección de la acetoína se realizó con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996) con una longitud de onda de 210 nm.

Debido a que, durante la detección de los compuestos en el detector de índice de refracción, la acetoína y el 2,3-butanodiol (y un isómero del 2,3-butanodiol), mostraron el mismo tiempo de retención, fue necesario realizar la corrección de la cuantificación de estos productos para no sobreestimar la concentración de 2,3-butanodiol en el medio. Para ello se determinó el área neta del 2,3-butanodiol (y su isómero) y se restó el área de la acetoína de la siguiente manera:

1. Se obtuvo el área de la acetoína en el detector de arreglo de diodos
2. Se determinó la concentración del área de la acetoína, por interpolación con la curva de calibración para la acetoína realizada en el detector de arreglo de diodos.
3. La concentración de acetoína se convirtió a área por interpolación con la curva de calibración del 2,3-butanodiol correspondiente al detector de índice de refracción (que fueron equivalentes).
4. El área resultante se restó del área del 2,3-butanodiol (y su isómero), para obtener el área neta correspondiente sólo del 2,3-butanodiol.
5. Se determinó la concentración del 2,3-butanodiol (y su isómero) por interpolación con la curva de calibración del 2,3-butanodiol realizada utilizando el detector de índice de refracción.

8.6.5 Determinación de la concentración de glucosa y fructosa

El método utilizado (columna, fase móvil y flujo) para la determinación de acetoina, 2,3-butanodiol y ácido acético permitió detectar y cuantificar la presencia de glucosa y fructosa en medio (como compuestos secretados por la raíz de *A. thaliana*) utilizando el detector de índice de refracción (Waters 2414). La glucosa se presentó a un tiempo de retención de 8.9 min, mientras que la fructosa a los 9.6 min, corroborados con una curva de calibración con los estándares de cada uno de estos compuestos.

8.7 Análisis estadístico

Para discernir diferencias significativas, se realizó un análisis estadístico, con el programa MINITAB 19, con el cual se realizaron los análisis de varianza ANOVA y prueba de Tukey, con un nivel de confianza de 95% ($\alpha \leq 0.05$). Los gráficos se realizaron con el apoyo de GraphPad Prism (Versión 8.0.2).

9. Resultados y discusión.

DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE *B. VELEZENSIS* 83 EN LA RESISTENCIA DE *A. THALIANA* HACIA *B. CINEREA*

9.1 Implementación del sistema *in vitro* para estudio de la interacción *B. velezensis* 83 – *A. thaliana* L.

Las raíces de las plantas son responsables de la absorción de nutrientes, y exudan nutrientes y compuestos orgánicos que influyen las propiedades físicas y químicas del suelo, desarrollando un complejo lenguaje químico con los microorganismos de la rizosfera. En particular, se sabe que dichos microorganismos pueden mejorar la absorción de nutrientes e inician interacciones simbióticas: induciendo resistencia sistémica a enfermedades, suprimiendo la colonización de patógenos de raíces y estimulando la colonización endofítica (Moe, 2013).

La exudación de la raíz varía en cantidad y en el tipo de compuestos sintetizados en función de factores ambientales, interacciones planta-microbio, y factores innatos como la arquitectura del sistema de raíces y la etapa de desarrollo de la planta (Badri *et al.*, 2008; Kuijken *et al.*, 2014). La exudación de la raíz incluye la secreción de una gran variedad de metabolitos primarios que contienen carbono, en forma de azúcares y aminoácidos, además de compuestos de bajo peso molecular (ácidos orgánicos) que se liberan de forma pasiva, así como compuestos de alto peso molecular (polisacáridos, proteínas) y compuestos secundarios (Hao *et al.*, 2010).

Los exudados de las raíces en el suelo son técnicamente difíciles de medir porque las raíces son de difícil acceso y los exudados pueden estar unidos por minerales o consumirse por microorganismos. Por lo tanto, los sistemas de cultivo hidropónico se utilizan con frecuencia para estudiar estos exudados. Estos sistemas presentan la ventaja de que evitan el daño mecánico ocasionado al eliminar las raíces de los sustratos sólidos; se ha determinado que en los sistemas hidróponicos los microorganismos pueden asimilar rápidamente compuestos simples como azúcares y ácidos orgánicos (Kawasaki *et al.*, 2018). En particular, contar con un sistema confiable es una ventaja experimental importante, debido a que un pequeño cambio en los exudados de la raíz puede provocar alteraciones considerables en la población de microorganismos en la rizosfera. El grado en que los exudados de la raíz afecta la estructura y la función de la comunidad microbiana de la rizosfera, es un área de investigación importante (Hao *et al.*, 2010).

Así, con la finalidad de estudiar a *B. velezensis* 83 como un agente inductor de RSI en *A. thaliana*, se propuso usar un método *in vitro*, que permitiera analizar los fenómenos que ocurren en esta interacción benéfica, evitando los efectos por factores bióticos o abióticos que no puedan ser controlados en otras condiciones, y asegurando estudiar únicamente los efectos de esta bacteria en un sistema *in vitro*. En la Figura 10 se ilustra el montaje final del sistema de interacción desarrollado.

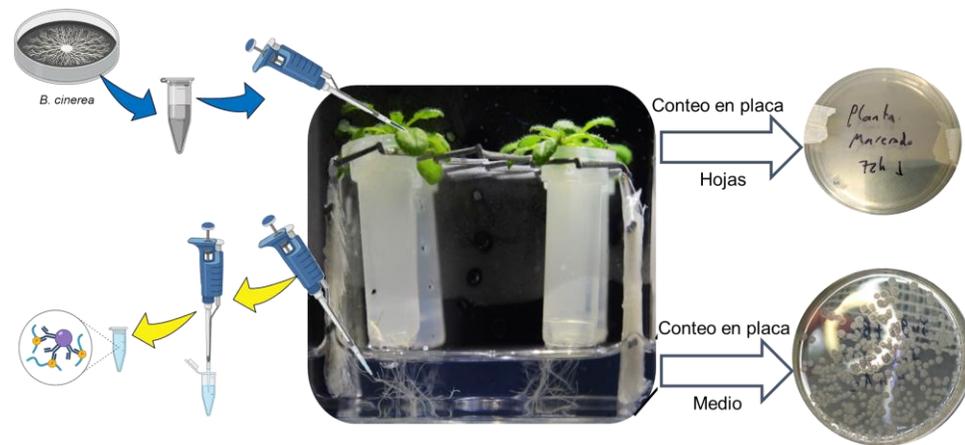


Figura 10. Sistema *in vitro* utilizado para evaluar la interacción *B. velezensis* 83 – raíz de *A. thaliana* L.

Como se puede apreciar en la Figura 10, una sección de la raíz de *A. thaliana* L. se encuentra dentro del medio hidropónico, sección que no tiene estrés por daño mecánico debido a que esta creció naturalmente saliendo del agar de la columna por sí sola, desarrollándose en el medio líquido del tubo durante la primera etapa de desarrollo.

Debe considerarse que con el sistema de cultivo hidropónico la arquitectura radicular se modifica debido a la falta de impedimentos mecánicos, diferente disponibilidad de nutrientes y el estado de O_2/CO_2 , en comparación con las plantas cultivadas en el suelo (Strehmel *et al.*, 2014). En particular, dadas las características del modelo empleado, el líquido hidropónico al estar en todo el fondo de la caja Magenta tiene contacto homogéneo con las raíces de todas las plantas, de tal forma que dentro de una caja se asegura que las seis plantas de cada tratamiento estén expuestas uniformemente a la condición evaluada. A su vez, por ser un medio líquido, se puede tomar muestras fácilmente para llevar a cabo los análisis para identificar compuestos o cambios en su composición que ayuden a identificar los fenómenos que ocurren en dichas interacciones a evaluar.

9.2 Efecto de la concentración del inóculo y el tiempo previo de interacción de *B. velezensis* 83 sobre la incidencia de *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana*.

Se realizaron tres réplicas con dos muestras biológicas cada una (una caja Magenta con 6 plantas). Los tratamientos en cada réplica se infectaron al mismo tiempo con un mismo inóculo de *B. cinerea*. En la Figura 11 se presentan los porcentajes de incidencia (daño por *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana*) en los tratamientos y controles.

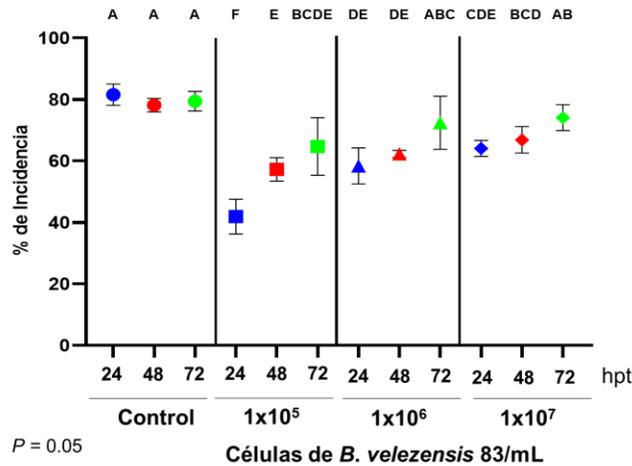


Figura 11. Porcentaje de incidencia de lesión por *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana* en los diferentes tratamientos.

En la Figura 11 se indican (con letras mayúsculas) los resultados de las diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados de concentración de células de *B. velezensis* 83 y del tiempo de pretratamiento de estos. En la misma Figura un color distingue los tratamientos de tres diferentes concentraciones de células de *B. velezensis* 83 inoculadas con idéntico tiempo de interacción. En particular se observa, que, con excepción de los tratamientos de 10^6 y 10^7 células, evaluados a las 72 h, la incidencia de *B. cinerea* en los tratamientos analizados difiere de forma significativa, respecto a las plantas control. Esto confirma que la inoculación de *B. velezensis* 83 tiene un efecto de biocontrol en *A. thaliana* L.

Este experimento muestra que, bajo estas condiciones, la concentración de células bacterianas de *B. velezensis* 83 y el tiempo de incubación juegan un papel importante para ejercer protección contra *B. cinerea*. En particular se observa que la aplicación de 1×10^5 cel/mL con un tiempo de interacción de 24 h disminuyó la incidencia en un 50% en promedio, con respecto al testigo sin inocular. Los datos obtenidos indican que este tratamiento, fue estadísticamente diferente a todos los otros tratamientos evaluados. Aún, cuando otros tratamientos muestran también diferencia

respecto a los controles, más adelante se mostrará que la condición de 1×10^5 células por mL mostró un comportamiento interesante en la síntesis de metabolitos, que lo vuelven el tratamiento idóneo para continuar los estudios subsiguientes con el fin de estudiar este efecto aparente de RSI contra *B. cinerea*.

9.3. Análisis de los medios hidropónicos provenientes de la interacción bacteria-raíz

Se realizó un primer análisis exploratorio en el que se emplearon todas las muestras de dos réplicas experimentales con los tratamientos a las 72 h de la aplicación de las esporas de *B. cinerea*. Las muestras se analizaron para la presencia de lipopéptidos, γ -PGA, acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético. Los cromatogramas para lipopéptidos y γ -PGA no detectaron la presencia de estos compuestos en ninguna de las muestras analizadas. No detectar estos compuestos en el medio hidropónico no indica necesariamente que no se produzcan, sino que quizá su producción sólo se lleve a cabo por las células que están adheridas a la raíz. En vista de que estos compuestos son necesarios para la formación del *biofilm*, es posible que no se encuentren libres (en concentraciones detectables) en el medio de interacción. Para comprobar su presencia en la superficie de la raíz, se tendrían que usar metodologías como la ionización con láser-plasma de baja temperatura acoplado a espectrometría de masas (LTP-MS) (Martínez-Jarquín & Winkler, 2017).

Otro factor que pudo influir en la no detección de lipopéptidos y γ -PGA, es el descenso del pH en el medio, producto de la liberación de ácidos orgánicos por parte de la planta y de *B. velezensis* 83, ya que algunas mediciones realizadas al azar entre los experimentos al finalizar el tiempo experimental reportaron valores pH cercanos a 3. En este sentido, Cristiano Fajardo (2020) demostró que en *B. velezensis* 83, la síntesis de los lipopéptidos surfactina y bacilomicina D (controlados por quórum) disminuye considerablemente en el cultivo en lote a pH 5.0, a diferencia de los cultivos a pH 6.8. Además, se observó también una disminución dramática en la síntesis de γ -PGA, posiblemente porque se afecta el transporte del polímero y la actividad de la poli- γ -glutamato sintetasa por el ambiente ácido. Sin embargo, a pH 5 se evidenció un incremento significativo en la síntesis de acetoína y 2,3-butanodiol.

Como se puede apreciar en la Figura 12 (B), a las 72 h de la inoculación de *B. cinerea*, la acetoína se encuentra en mayor concentración en los tratamientos donde se aplicaron 1×10^5 cel/mL de *B. velezensis* 83, en comparación con los tratamientos donde el inóculo inicial fue mayor; de manera particular sobre este grupo de tratamientos con la misma concentración del inóculo, las condiciones donde se aplicó *B. velezensis* 83 por 24 y 48 h previas al confrontamiento de la planta

con *B. cinerea*, presentaron valores muy similares. Este resultado indica que es posible que exista una relación entre la síntesis de acetoina y la reducción de la incidencia de *B. cinerea*, pero se requerirían más datos con el fin de describir la asociación entre las variables, lo cual podría realizarse a través de evaluar concentraciones definidas de acetoina en el medio hidropónico.

De forma general, la Figura 12 (A) muestra que, en ausencia del patógeno, con la concentración de 10^7 células/mL se observaron las concentraciones más bajas de acetoina (menor a 20 mg/L), para los tres tiempos de interacción. Cuando se inoculó la bacteria a una concentración de 10^6 células/mL, la síntesis de acetoina no mostró diferencias significativas en función del tiempo de exposición de la bacteria. Las concentraciones promedio de acetoina se encontraron en un rango de entre 70 y 120 mg/mL para los tres tiempos de exposición, pero sin ser diferentes entre ellas de forma estadística. En el caso de la aplicación de 10^5 células/mL, se observó un incremento en la síntesis de acetoina, en función del tiempo de interacción. A las 24 h, la concentración de acetoina fue muy baja (menor a 10 mg/L) y ésta se incrementó hasta valores superiores a los 80 mg/L a las 48 y 72 h de exposición.

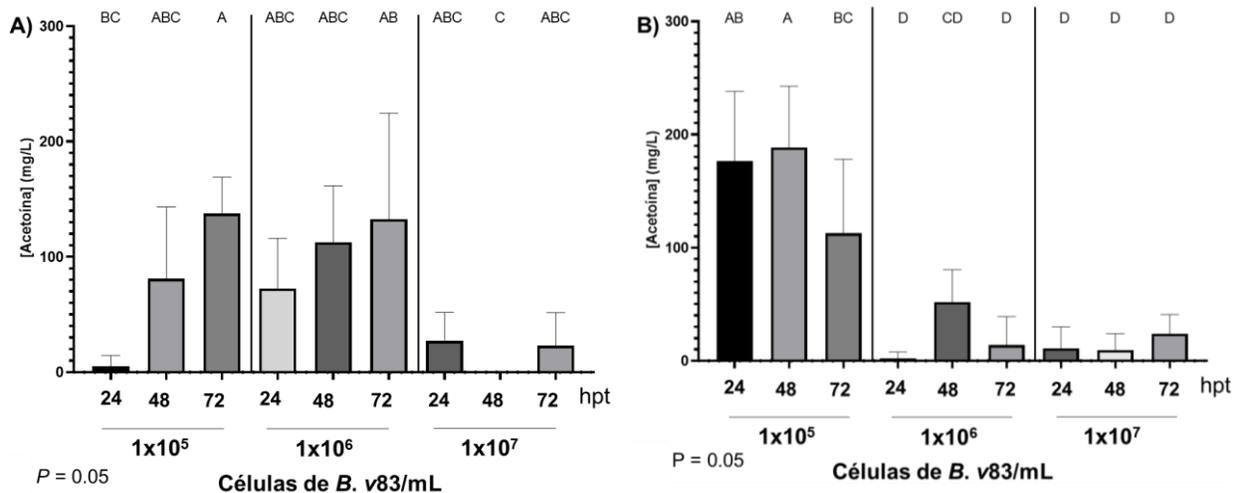


Figura 12. Concentración de acetoina en el medio de hidroponia, al momento de aplicar *B. cinerea* (A), y transcurridas 72 h (B) de la inoculación de *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana* L.

Los resultados de la Figura 12, demuestran que la acetoina se produce en la interacción de *B. velezensis* 83 con la raíz de *A. thaliana* L, bajo estas condiciones. En vista de que el medio hidropónico carece de una fuente de carbono, la acetoina sería producto de la utilización de los compuestos de carbono suministrados por la raíz de *A. thaliana* L. Por ello, se esperaría que, en condiciones de campo *B. velezensis* 83 fuera capaz de producir este metabolito al colonizar la raíz de los cultivos. Por otro lado, las cajas Magenta al tener un bajo intercambio gaseoso con el

exterior propician que haya una posible limitación de oxígeno, lo que pudiera inducir la producción del 2,3-butanodiol y acetoína, de acuerdo a lo reportado, ya que se propone que bajas concentraciones de oxígeno proporcionan un sumidero de electrones alternativo para la regeneración de NAD⁺ (Xiao & Xu, 2007).

Por otro lado, aunque se detectó la presencia de ácido acético, las concentraciones fueron menores a 30 mg/L y no hubo diferencias significativas entre el conjunto de tratamientos ya sea en términos del tiempo de exposición y para las distintas concentraciones de células evaluadas de *B. velezensis* 83. Solo los tratamientos con concentraciones de 1×10^6 y 1×10^7 cel/mL con 72 h previas de tratamiento (hpt), fueron diferentes al tratamiento con 1×10^7 cel/mL y 48 hpt, mientras que todos los demás tratamientos fueron estadísticamente similares entre ellos. Esto sugiere que la presencia del ácido acético tendría una importancia relativa baja en el fenotipo de protección.

Por su parte, como se aprecia en la Figura 13, el 2,3-butanodiol (2,3-BD) aunque en concentraciones menores a la acetoína, tuvo un patrón de cambio similar al observado con la acetoína, sobre todo si se compara entre el momento de aplicar el patógeno (Figura 12 A) y las 72 hpt (Figura 13 B). Todas las concentraciones fueron menores a 40 mg/L. Sin embargo, el 2,3-BD en el tratamiento de 10^5 células por mL con 24 h de interacción, pasó de apenas ser detectable (Figura 13 A) a tener la concentración más alta entre los tratamientos (Figura 13 B), lo cual sugiere que también puede ser responsable del efecto de protección en *A. thaliana*, en vista de que, bajo tales condiciones, se logró la menor incidencia de la enfermedad (Figura 11). Sin embargo, el efecto podría deberse sólo a la presencia de acetoína (Figura 12).

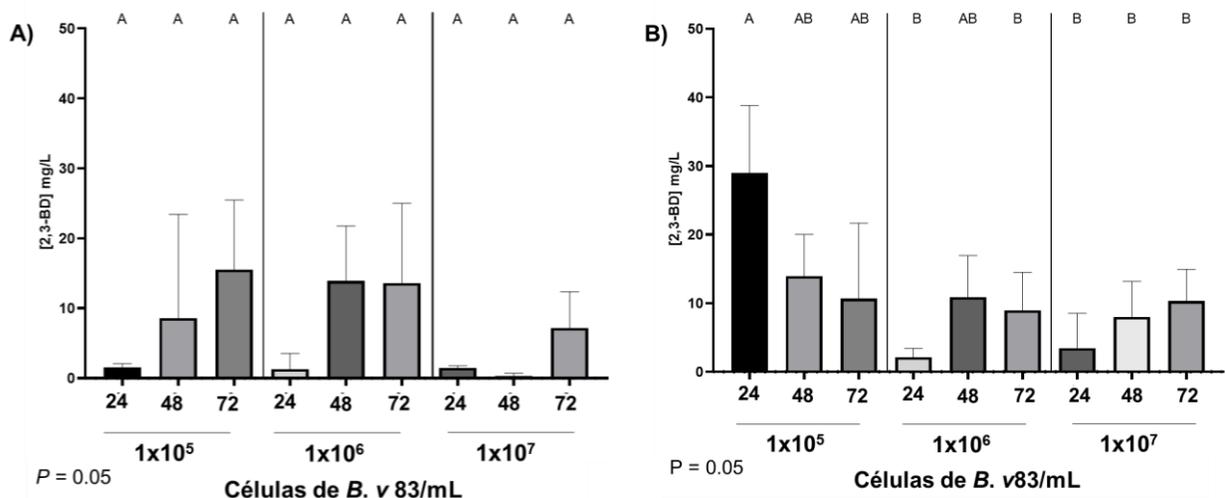


Figura 13. Concentración de 2,3-butanodiol en el medio de hidroponía, A) al momento de aplicar *B. cinerea*, B) transcurridas 72 h de aplicar *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana* L. Donde las letras mayúsculas representan significancias estadísticas solo dentro de un panel, sea A o B.

En este contexto, Rudrappa *et al.* (2010) descubrieron que la aplicación exógena de acetoína desencadena RSI y protege a las plantas contra la patogénesis de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Además, mutantes de *B. subtilis* en la biosíntesis de acetoína que producen niveles reducidos de este compuesto confieren protección reducida a *A. thaliana*. Un análisis utilizando FB17 y mutantes de *A. thaliana* comprometidas con la defensa indicó, que la resistencia al patógeno DC3000 se produce a través de NPR1 y requiere de ácido salicílico (SA)/etileno (ET), mientras que el ácido jasmónico (JA) no es esencial. Interesantemente, también demostraron que el 2,3-butanodiol no protegió a las plantas contra las infecciones del patógeno DC3000, por lo cual estos autores sugieren la importancia de la acetoína, pero no del 2,3-butanodiol, para la protección en *A. thaliana* contra el patógeno DC3000.

Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación exógena de 2,3-butanodiol o la exposición a cepas productoras de 2,3-butanodiol (por ejemplo, *B. subtilis*) desencadena resistencia contra el patógeno bacteriano *Erwinia carotovora* en *A. thaliana* (Ryu *et al.*, 2004). Varios estudios han demostrado un efecto positivo de este compuesto volátil en la resistencia de la planta. Por ejemplo, la aplicación de 2,3-butanodiol en *Nicotiana* sp. parece aumentar la resistencia contra *Colletotrichum orbiculare* (D'Alessandro *et al.*, 2014). También Shi *et al.* (2017) reportaron que el 2,3-butanodiol [250 µM] induce las defensas de la planta *bentgrass* contra *Rhizoctonia solani*, comprobando, mediante un análisis de transcriptoma que el 2,3-butanodiol puede inducir cambios en las vías de RSI. Por su parte, Cortes-Barco *et al.* (2010) informaron que el ISR se activaba con 2,3-butanodiol, reduciendo el área foliar enferma de *Agrostis stolonifera* en un 20–40% para los patógenos fúngicos *Microdochium nivale*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia homoeocarpa*, en comparación con el control (agua).

En otro estudio, Han *et al.* (2006) informaron que la aplicación de 2,3-butanodiol indujo resistencia sistémica en tabaco a *E. carotovora* subsp. *carotovora* SCC1, pero no a *P. syringae* pv. *tabaci*; además de que se reporta que la forma isomérica del butanodiol 2S, 3S-butandiol no tuvo efectos. Estos reportes, aunados a los resultados aquí obtenidos, apoyan que la acetoína y el 2,3-butanodiol producidos por cepas de *Bacillus*, representan inductores de RSI, lo que lleva a considerarlos como productos potencialmente eficaces contra bacterias y hongos patógenos en plantas. En este estudio, tomando en consideración que el tratamiento con 10⁵ células por mL y con 24 h de interacción mostró la incidencia más baja, implicaría que concentraciones de acetoína

en el orden de 100-250 mg/L y de 30-40 mg/L para 2,3-butanodiol, correlacionan con una disminución de la incidencia en un 50 % (Figura 11).

Al analizar los cromatogramas para la identificación de los compuestos anteriores, se observaron tres picos con tiempos de retención entre 8 y 10 min. Estos picos corresponden al ácido cítrico, glucosa y fructosa, respectivamente (corroborados con estándares). Se destaca que a las 72 h de aplicar el patógeno, las concentraciones de glucosa (Figura 14 B) y de fructosa (Figura 15 B), en todos los tratamientos, fueron muy bajas y son estadísticamente iguales. Lo anterior, indica que la disponibilidad de estas fuentes de carbono no sería una variable que diferencie a una condición en particular. Esto sugiere que las diferencias en la producción de acetoina no se deben a la disponibilidad de la fuente de carbono (glucosa y fructosa).

Cabe recordar que las raíces no solo facilitan que las plantas absorban minerales y agua del suelo, sino que también sirven como una fuente importante de nutrientes para los microorganismos que residen en la rizosfera (Sasse *et al.*, 2018). Se estima que aproximadamente el 10% del carbono neto fijado fotosintéticamente se libera en el suelo por las raíces de las plantas cultivadas como exudados que se distribuyen en la rizosfera. En cultivos hidropónicos se han encontrado carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos, compuestos fenólicos, ácidos grasos, esteroides, enzimas, vitaminas, hormonas y nucleósidos. Estos compuestos se liberan por diversos mecanismos en forma de mucílago (capa gelatinosa que rodea la punta de la raíz y que se compone principalmente de polisacáridos de 10^6 - 10^8 Da de tamaño) y de exudados (compuestos difusibles que se pierden pasivamente por la raíz). Además se establece que los compuestos orgánicos dominantes en las raíces reflejan aquellos compuestos centrales para el metabolismo celular e incluyen azúcares libres (glucosa, fructosa, sacarosa), aminoácidos (glicina, glutamato) y ácidos orgánicos (citrato, malato, oxalato) (Jones *et al.*, 2009).

En particular (Figura 14 A) se aprecia que, en el caso de la glucosa, en el tratamiento con 10^5 cel/mL (con 24 h de interacción con la planta, sin el patógeno), la concentración de glucosa fue cercana a 200 mg/L. En este tiempo, las muestras no contenían acetoina (Figura 12 A). Sin embargo, 72 h después de la interacción con el patógeno, fue el tratamiento que resultó en la mayor concentración de acetoina y 2,3-butanodiol. Es posible que, en los tratamientos con mayor concentración de células, el sustrato no es suficiente y las células solo usan la fuente de carbono para crecimiento o fuente de energía, y no puede ser desviado hacia la síntesis de acetoina y 2,3-butanodiol. Basado en esto, se consideró que la concentración de 10^5 cel/mL es la más

adecuada para estudiar la interacción de *B. velezensis* 83 con la raíz de *A. thaliana* L. en los experimentos sucesivos.

Respecto al consumo de azúcares, Wang *et al.* (2019) al evaluar los cambios en el exudado de la raíz mediados por *B. cereus* AR156 en interacción con tomate, para el biocontrol de *Ralstonia solanacearum*, encontraron que se indujo la secreción de D -pinitol, fructosa, treonina, ácido láctico, sacarosa y ácido hexanoico en los exudados de raíz. De estos, el ácido láctico y el ácido hexanoico indujeron el crecimiento y la capacidad móvil de las células *in vitro* de *Bacillus*. Además, la fructosa, el ácido láctico, la sacarosa y la treonina, al aplicarse en concentraciones específicas estimularon la formación de biopelículas e incrementaron la colonización de la raíz.

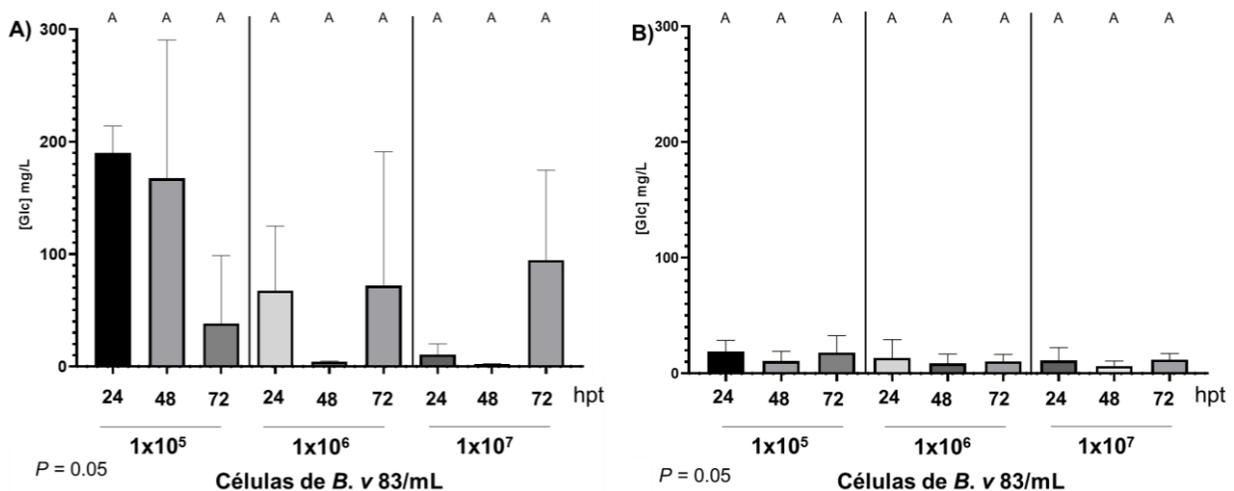


Figura 14. Concentración de glucosa en el medio de hidroponia, A) antes de aplicar *B. cinerea*, B) a las 72 h de aplicar *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana*.

En lo que respecta a la fructosa, se puede observar en la Figura 15 B que, pasadas las 72 h de interacción con el patógeno, las concentraciones obtenidas bajo todas las condiciones fueron menores a 15 mg/L. Por otro lado, en la Figura 15 A se puede observar que los tratamientos con 10⁵ cel/mL (con 24 y 48 h de interacción previa, antes de la aplicación del patógeno) presentaron la concentración más alta del compuesto de entre todos los tratamientos, comportamiento similar a lo observado con glucosa (Figura 14 A). Cabe mencionar que las plantas utilizadas al inicio del experimento tenían 15 días, mientras que al final del experimento tenían alrededor de 21 días, una edad comprendida entre los tiempos descritos en la Tabla 11, donde se puede ver que, en su estado basal a mayor edad *A. thaliana*, tiende a disminuir la secreción de glucosa y fructosa. Estos datos sugieren dos posibilidades: una, que la fuente de carbono aumente por la percepción del patógeno (para que *B. velezensis* 83 las metabolice a acetoina); o dos, que alguna señal de

comunicación de la planta provoque que *B. velezensis* 83 no degrade la acetoina que ha producido, con el fin de que ésta no disminuya y se continúe acumulando a favor de actuar sobre la planta.

Dentro del panorama de los exudados, Strehmel *et al.*, (2014) exploraron la composición química de los exudados de la raíz de *A. thaliana* en plantas hidropónicas en condiciones estériles y analizaron los exudados por UPLC/ESI-QTOFMS en fase inversa, detectando un total de 103 compuestos, de los cuales, más de 90 se caracterizaron estructuralmente y se clasificaron. Así, queda claro que los resultados presentados aquí son solo una parte de los metabolitos que pueden estar presentes.

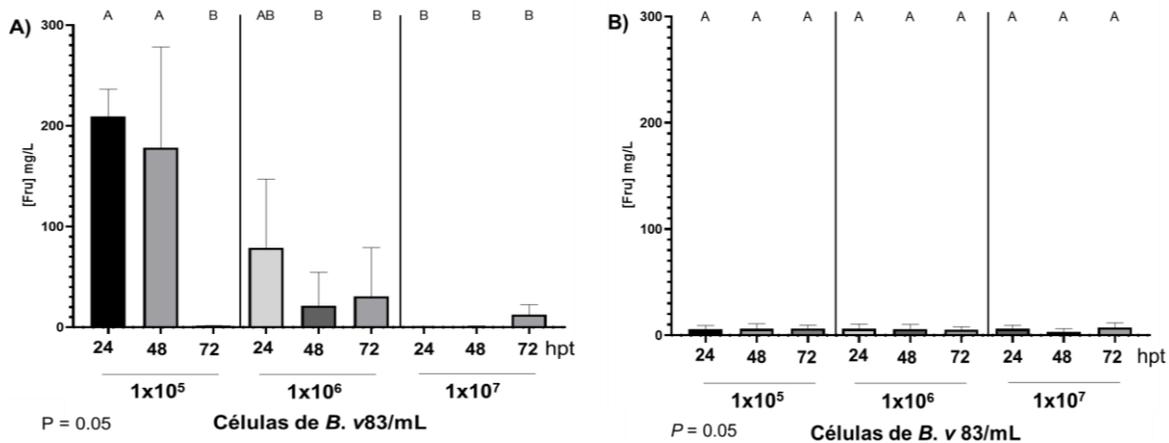


Figura 15. Concentración de fructosa en el medio de hidroponia, **A)** antes de aplicar *B. cinerea*, **B)** a las 72 h de aplicar *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana*.

Por otro lado, Chaparro *et al.* (2014) mencionan que los exudados de raíces pueden influir en la estructura de las comunidades microbianas de la rizosfera. Sin embargo, el conocimiento de la conexión entre el desarrollo de plantas, la exudación de raíces y el ensamblaje de microbiomas es todavía limitado. Por su parte Chaparro *et al.* (2013) reportaron, que la mayor acumulación de azúcares y alcoholes en exudados de la raíz, se observa en las etapas tempranas de desarrollo de la planta y que éstos disminuyen durante el desarrollo. Algunos de los datos reportados por estos autores, para algunos compuestos que también han sido estudiados en este trabajo, se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Algunos de los compuestos liberados por la exudación de raíces de *A. thaliana* Col-0 a medida que se desarrolla.

Compuesto	14-17 días	21- 24 días
Fructosa	266,676.66	67,314.25

Glucosa	43,6110	42,315.75
Glicerol	274,263.33	103,075.25
Sacarosa	28,497.63	1,982.77
Ácido succínico	193.23	1,215.59

Los compuestos se detectaron usando GC-MS. Los números indican el área promedio bajo la curva de tres réplicas. Tomado de Chaparro *et al.* (2013).

9.4. Liberación de glucosa y fructosa por la raíz de *A. thaliana* sin la presencia de *B. velezensis* 83

Con el propósito de conocer si en el sistema de cultivo hidropónico empleado, la disponibilidad o suministro de las dos fuentes de carbono medidas previamente se afectaría por la edad de la planta (al inicio, respecto al final del experimento), o bien en respuesta a la presencia del patógeno *B. cinerea*, se adecuó el sistema (mayor volumen y número de plantas por caja) para el muestreo del líquido hidropónico durante 120 h (debido a que al tomar 13 muestras de 2 mL, el volumen original de 25 mL no sería suficiente). Además, de esta forma se consiguió que, hasta la toma de la última muestra, las raíces siempre estuvieran sumergidas en el medio líquido. Los resultados fueron graficados en concentración respecto al tiempo, y se presentan en la Figura 16.

Lo primero que se buscaba contestar era si el aporte de glucosa y fructosa diferían. Como se puede apreciar en los seis gráficos de la Figura 16, para ambas fuentes de carbono hay una liberación similar; en particular, la fructosa está presente entre 5-10 % más que la glucosa, bajo las condiciones en las que se evaluaron.

Por otro lado, se buscaba comprobar si una de estas fuentes de carbono, sería más abundante después de aplicar el patógeno; como un posible mecanismo por el cual la planta reclute microbiota benéfica para combatir al patógeno. En las Figuras 16 C y D se muestra que cuando *B. cinerea* se aplica a las 24 h, las plantas tienen una concentración más baja de Glc y Fru a las 96 h del experimento, respecto a las plantas que no fueron infectadas (Figura 16 A y B). Por el contrario, cuando las plantas se infectaron a las 48 hpt (Figura 16 E y F), las concentraciones de Glc y Fru fueron mayores a las 96 h y 120 h, en comparación a las plantas sin infectar. Esto podría favorecerse debido a que las plantas infectadas hasta las 48 hpt, tienen más tiempo de adaptarse al cambio de las condiciones, lo que favorecería tener una raíz que responda mejor al estrés causado por *B. cinerea*, en comparación con las plantas que fueron infectadas a las 24 h.

En la rizosfera, el carbono orgánico se considera la fuerza impulsora de la densidad y actividad microbiana. Los aportes de carbono de las raíces al suelo varían según los parámetros ambientales (potencial hídrico, luz, compactación del suelo, temperatura) y parámetros biológicos

(especies de plantas, etapa de desarrollo). En plantas cultivadas bajo CO₂ elevado, se reporta con frecuencia un aumento de la relación C/N del material de raíz (Baudoin *et al.*, 2003). Esto da como resultado una mejor rizodeposición, mejorando también el flujo de aminoácidos en las raíces (Cheng y Gershenson, 2007). Cabe recordar que las cajas Magenta, al estar cerradas, se podría favorecer un aumento en la concentración de CO₂, en parte derivado de la respiración de *B. velezensis* 83.

Se ha descrito que los tres métodos principales por los cuales las plantas secretan químicos en la rizosfera son: a) la difusión a través de la membrana, b) el uso de canales iónicos para compuestos de bajo peso molecular y e) el transporte vesicular para compuestos de alto peso molecular (Badri & Vivanco, 2009). En este sentido los mecanismos de transporte activo primario también pueden desempeñar un papel en la secreción de productos químicos en la rizosfera, ya que las mutaciones que inactivan los sistemas de transporte de casetes de unión a ATP (transportadores ABC), expresados en altos niveles en los tejidos de la raíz, dieron como resultado alteraciones en los perfiles del exudado de la raíz (Badri *et al.*, 2009a).

Por su parte Badri *et al.*, (2009b) reportaron que varios compuestos estaban presentes en concentraciones más altas en los exudados de la raíz de la mutante *abcg30* (un transportador abc que participa en la secreción radicular de fitoquímicos), una línea que en comparación al tipo silvestre (*Col-0*) adquirió una comunidad microbiana más abundante de bacterias potencialmente beneficiosas. Estos compuestos fueron: ácido benzoico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido linolénico, cianidina, malato de sinapoilo y ácido 3-indol acético.

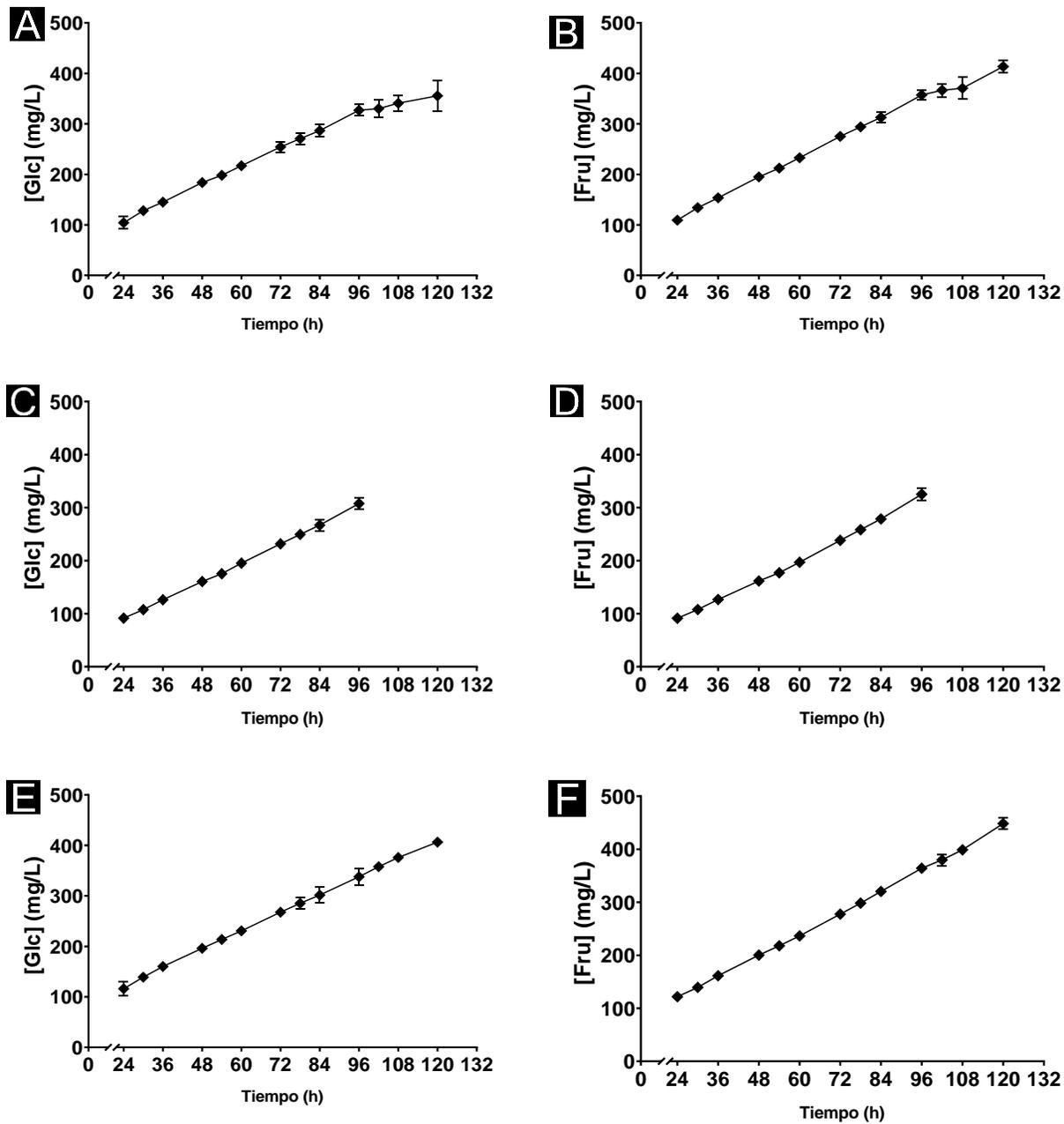


Figura 16. Cinéticas de liberación de glucosa y fructosa por la raíz de *A. thaliana* L. sin presencia de *B. velezensis* 83, con la descripción de las condiciones descritas en la Tabla 7, donde **A** y **B**, corresponden a “*A. thaliana* Basal”; **C** y **D**, son de “*A. thaliana* + *B. c* 24h”; **E** y **F**, son de “*A. thaliana* + *B. c* 48h”.

9.5 Producción de acetoína por *B. velezensis* 83 en diferentes condiciones de interacción con la raíz de *A. thaliana* L.

Al observar que en el medio de interacción de la raíz con *B. velezensis* 83, se produce acetoína al usar Glc y Fru como fuentes de carbono, quedo la incógnita de que es lo que sucedía dentro de las 72 h que transcurren desde que se aplica *B. cinerea* hasta el momento en que se cuantifican las lesiones. Por ello, se procedió a realizar un seguimiento que permitiera aclarar cómo era la producción de estos compuestos.

En la Figura 17, se presenta la evolución de las concentraciones de Glc, Fru y acetoína, a través del tiempo, cuando las plantas no están infectadas. Esto se hizo con la finalidad de identificar si ocurre la síntesis de acetoína, sin el posible estímulo de la infección de *B. cinerea*. Se comprobó (Figura 17) que hay síntesis de acetoína en el medio, siendo la fase más pronunciada de producción entre las 36 y 48 h de cultivo. En las posteriores 12 h, ya no se observaron cambios significativos y, entre las 65 y las 84 h, nuevamente se observó un ligero incremento. Por su parte, de las dos fuentes de carbono, la Fru es la que parece emplear *B. velezensis* 83 para la síntesis de acetoína, debido a que hubo un consumo completo hacia las 48 h, tiempo en el que se observó la acumulación más importante de acetoína en el medio. En lo que respecta a la Glc se observó una ligera disminución entre las 48 y 72 h, periodo en que prácticamente ya no había Fru disponible.

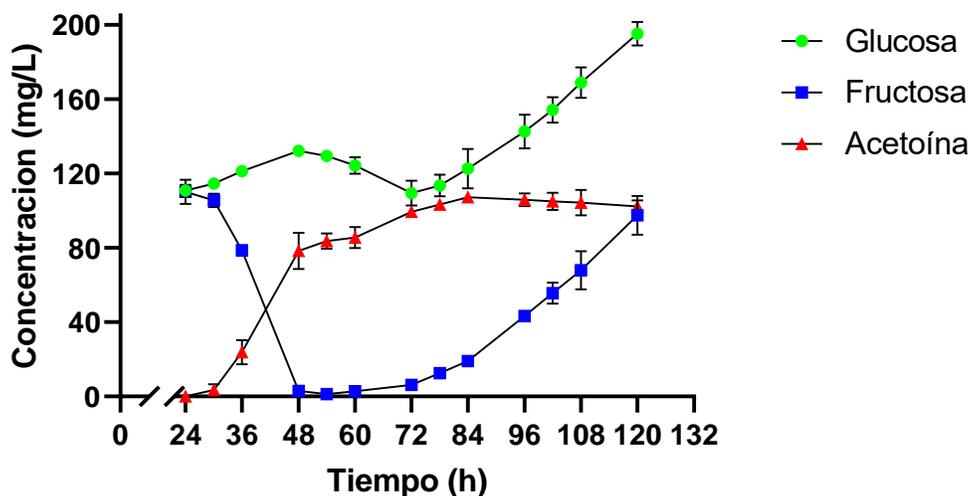


Figura 17. Concentración de glucosa, fructosa y acetoína, en el medio de hidropónia donde fue inoculado *B. velezensis* 83 al T_0 en raíces de *A. thaliana* y sin aplicación de *B. cinerea*.

Es interesante ver que después de las 72 h hubo un incremento en la concentración de ambas fuentes de carbono. Es posible que, en estas condiciones, después de las 72 h el flujo de glucosa y fructosa, de la raíz al medio, superó su consumo, resultando en una acumulación a partir de este tiempo y hasta el final del experimento.

Se ha descrito que la acetoína y el 2,3-DB son compuestos que se generan a partir de una vía alternativa para el catabolismo del piruvato, la cual se favorece en condiciones de pH bajo o limitación de oxígeno. En particular, el entorno de la rizosfera tiene una presión parcial de O_2 baja y que puede dar lugar a condiciones que estimulan la vía del 2,3-BD en *Bacillus* en condiciones naturales (Wu *et al.*, 2018). Este efecto se puede ver en el aumento de la acetoína entre las 36 y 48 h, tiempo en que no se abrieron las cajas, por lo cual es posible que se haya favorecido la disminución de O_2 .

Por otro lado, se evaluó la producción de acetoína cuando, pasadas 24 h de la inoculación de *B. velezensis* 83, se inoculó *B. cinerea* en las hojas. Debido a que a las 72 h de aplicar el patógeno se concluye el experimento, estas mediciones se realizaron hasta las 96 h. En la Figura 18 se puede apreciar que desde las 36 h hasta las 72 h la acetoína se fue acumulando en el medio de forma importante. Esto difiere a lo observado en la Figura 17, en donde la fase de incremento pronunciado de acetoína sucedió en las primeras 48 h. Esto sugiere que, aunque la acetoína es un metabolito que *B. velezensis* 83 produce en ausencia del patógeno, su síntesis es mayor en respuesta a algún estímulo de la planta cuando ésta se enfrenta a una infección. Esto, apunta a que *B. velezensis* 83 es capaz de establecer una comunicación química con la planta, donde la acetoína es clave, en favor de ayudar a la planta a adquirir resistencia contra patógenos.

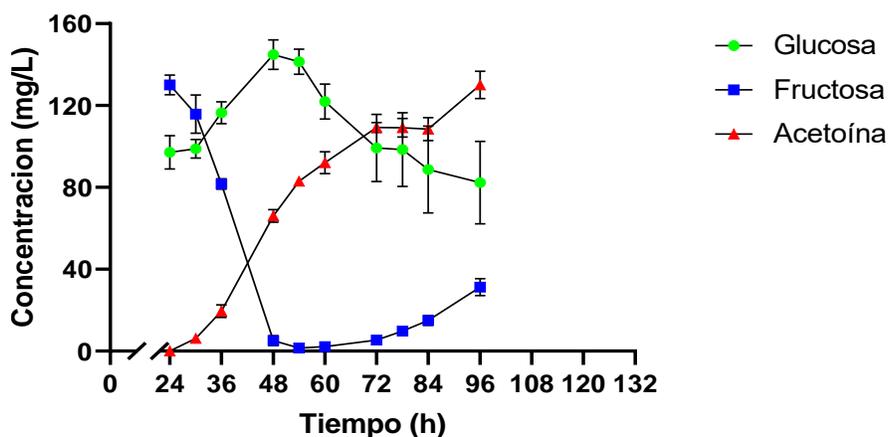


Figura 18. Concentración de glucosa, fructosa y acetoína en el medio de hidroponía donde fue inoculado *B. velezensis* 83 al tiempo 0 y con aplicación de *B. cinerea* a las 24h.

Al igual que lo observado en la Figura 17, la Fru se consume completamente hacia las 48 h (Figura 18), evidenciando nuevamente que la Fru se consume primero que la Glc en el medio de interacción con la raíz. La Glc, al igual que en el tratamiento con plantas sin infectarse consume después de las 48 h (cuando se termina la Fru). Sin embargo, su consumo continuó hasta las 96 h (Figura 18).

Los aminoácidos (*aa*) también son compuestos que se utilizan como fuente de carbono y nitrógeno. Lo interesante, es que podría ser la presencia de *aa* en determinados momentos de los experimentos realizados, los responsables de inducir el incremento en la síntesis de acetoína o incluso el consumo de Glc. En este sentido se ha descrito un catabolismo selectivo de los *aa* sobre los azúcares en las bacterias que residen en la rizosfera, a la vez que ocurre la represión de la asimilación de glucosa (Moe, 2013). En particular, se ha descrito que el suministro de leucina y valina (por la raíz) desvía el flujo del α -acetolactato (precursor de acetoína, leucina y valina) hacia acetoína (Xiao & Xu, 2007). Por otro lado, los *aa* en el medio, también modulan la expresión de genes involucrados en la competencia y la esporulación en *B. subtilis* (Mäder *et al.*, 2002). En particular *aa* de cadena ramificada pueden altera fenotipos clave como el transporte de nutrientes, el catabolismo, la competencia, la síntesis de antibióticos y la quimiotaxis a través del regulador transcripcional global CodY de *B. subtilis* (Shivers & Sonenshein, 2004). Estos reportes proponen a los *aa* secretados por la raíz como unas de las señales de las plantas infectadas, que estaría favoreciendo que *B. velezensis* 83 produzca más acetoína, aun cuando la disposición de la fuente de carbono no tiene un cambio significativo de liberación entre plantas infectadas y no (Figura 16), por lo cual, el estudio en el perfil de *aa* en el medio de interacción entre diferentes condiciones, sería un punto interesante que abordar en futuros trabajos.

Adicionalmente, en este trabajo se evaluó la producción de acetoína, y los cambios en la concentración de Glc y Fru, cuando las plantas fueron inoculadas con *B. cinerea* a las 48 h de interacción, debido a que este tratamiento también presentaba una concentración cercana a 200 mg/L de acetoína al final de los experimentos (Figura 12) y una incidencia de la enfermedad cercana al tratamiento con 24 h de interacción previa (Figura 11). En la Figura 19, se puede observar que la fase de mayor producción de acetoína se presentó entre las 30 y 48 h (previo a la aplicación de *B. cinerea*). Entre las 48 y 84 h, los cambios en la concentración de acetoína fueron mínimos. Posteriormente, se presentó nuevamente un incremento de acetoína hacia las 120 h. Esto sugiere que la síntesis de acetoína, respondió más tardíamente a la señalización que la planta podría inducir derivada de la presencia del patógeno, ya que como se había observado en la Figura 17, la acetoína en el medio no incrementa su concentración posterior a las 84 h

cuando la planta no está en confrontación con el patógeno, mientras que en las condiciones experimentales de la Figura 19, en respuesta a la infección, la síntesis de acetoína está nuevamente activa.

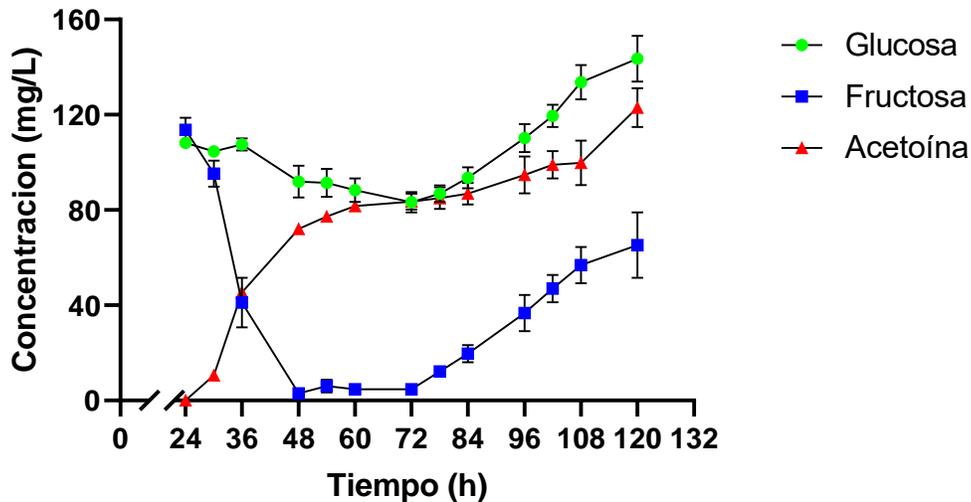


Figura 19. Concentración de glucosa, fructosa y acetoína en el medio de hidroponía donde fue inoculado *B. velezensis* 83 al tiempo 0 y con aplicación de *B. cinerea* a las 48h.

El papel del sistema inmune de la planta en el ensamblaje de un microbioma protector es en gran parte desconocido (Sharma *et al.*, 2019). Los resultados de este estudio sugieren que *B. velezensis* 83 produce acetoína en respuesta a estímulos de la planta, lo cual comprueba que puede asociarse con la planta para protegerla contra enfermedades, además del efecto promotor de crecimiento ya reportado (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Estos resultados, ayudan a comprender mejor cómo los microorganismos interactúan con sus anfitriones. En este sentido, Berendsen *et al.* (2018) demostraron que *A. thaliana* promueve específicamente tres especies bacterianas en la rizosfera, tras la activación de la defensa foliar por el patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Las bacterias promovidas se aislaron y se descubrió que, por separado, estas bacterias no afectaron significativamente a la planta, pero juntas indujeron resistencia sistémica y promovieron el crecimiento de la planta.

Aun así, el mecanismo por el cual las plantas seleccionan microorganismos beneficiosos no es un proceso bien entendido. Algunos ejemplos bien estudiados disponibles en la literatura (*Rhizobium*), queda mucho por aprender sobre el impacto que la química de la rizosfera tiene en la estructura y función de la comunidad microbiana (Vannier *et al.*, 2019).

Con la finalidad de comparar mejor las concentraciones de la acetoína producida por *B. velezensis* 83 y las fuentes de carbono suministradas por la planta, en la Tabla 12 se comparan las concentraciones cuantificadas a las 96 h (debido a que los experimentos con aplicación del patógeno a las 24 h se terminan en ese tiempo de muestreo) y a las 120 h (en base a que los experimentos con aplicación del patógeno a las 48 h terminan en ese tiempo de muestreo).

Tabla 12. Concentraciones de Glc, Fru y acetoína, a dos tiempos de corte (96 y 120 h) para los experimentos en ausencia y presencia del patógeno (*B. cinerea*) a dos tiempos de inoculación, y con y sin *B. velezensis* 83.

Experimento	96 h			120 h		
	Glc (mg/L)	Fru (mg/L)	Acetoína (mg/L)	Glc (mg/L)	Fru (mg/L)	Acetoína (mg/L)
<i>A. thaliana</i> Basal	326.8 a	357.3 a	NA	355.5 b	413.4 b	NA
<i>A. thaliana</i> + <i>B. c</i> 24h	307.6 a	325.1 b	NA	NA	NA	NA
<i>A. thaliana</i> + <i>B. c</i> 48h	337.8 a	364.1 a	NA	406.3 a	448.4 a	NA
<i>A. thaliana</i> + <i>B. v</i> 83	142.6 b	43.4 c	105.8 b	195.2 c	97.4 c	102.2 b
<i>A. thaliana</i> + <i>B. v</i> 83 + <i>B. c</i> 24h	82.3 c	31.3 c	130.0 a	NA	NA	NA
<i>A. thaliana</i> + <i>B. v</i> 83 + <i>B. c</i> 48h	110.2 c	36.7 c	94.7 c	143.5 d	65.3 d	123.0 a

NA = No Aplica la medición. Las letras por columna indican diferencias significativas para cada analito cuantificado en el tiempo correspondiente.

Como se aprecia en la Tabla 12, a las 120 h, las plantas infectadas a las 48 h (del experimento "*A. thaliana* + *B. c* 48h"), alcanzaron concentraciones más altas de Glc y Fru (406.4 y 448.4 mg/L respectivamente), con respecto a las plantas que no fueron infectadas (*A. thaliana* Basal) (355.5 y 413.4 mg/L, respectivamente), lo cual sugiere que hay un mayor aporte de ambas fuentes de carbono en respuesta al patógeno, ya que la concentración de ambos compuestos a las 96 h no presentaba diferencias. Por otro lado, se puede apreciar que, a las 96 h, en el tratamiento "*A. thaliana* + *B. v* 83 + *B. c* 24h" se registró la mayor concentración de acetoína (130.0 mg/L) de los tres tratamientos donde se aplicó *B. velezensis* 83 (*A. thaliana* + *B. v* 83; *A. thaliana* + *B. v* 83 + *B. c* 24h; *A. thaliana* + *B. v* 83 + *B. c* 48h), incluso esta concentración fue superior a la registrada a las 120 h para los tratamientos "*A. thaliana* + *B. v* 83 (102.2 mg/L) y *A. thaliana* + *B. v* 83 + *B. c*

48h (123.0 mg/L)". Esta concentración sugiere que la planta infectada utiliza una señal química que lleva a una mayor producción de acetoina. Además, indica que la respuesta de *B. velezensis* 83 es más eficiente cuando dicha señal se secreta en tiempos tempranos de la producción, debido a que en las plantas con presencia de *B. velezensis* 83, pero infectadas hasta las 48 h (*A. thaliana* + *B. v* 83 + *B. c* 48h), la concentración de acetoina, incluso a las 120 h sigue siendo menor.

Estos resultados permiten indicar que *B. velezensis* 83 presenta una respuesta al estar en interacción estrecha con la raíz de las plantas, a su vez esta interacción lleva a una protección de las plantas a las enfermedades, no solo por la antibiosis en las hojas. Con base a esto, se propone incluir como criterio para la selección de cepas PGPR, la realización de pruebas de interacción con la raíz de plantas, como las realizadas en este estudio, de tal forma que se complemente con su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos *in vitro*.

Siguiendo con esta consideración, Reva *et al.* (2019) encontraron que la exposición de cuatro cepas de *B. velezensis* a los exudados de raíces de maíz no produjo un aumento significativo en la expresión de los genes PKS-NRPS, incluso en algunos casos, provocó una regulación negativa. En particular las cepas UCMB5113 y At1 (productoras sobresalientes de antibióticos polipeptídicos en medio de cultivo) no tienen un efecto de biocontrol *in vivo* en plantas. Con ello, estos autores sugieren que la regulación genética en respuesta a las señales ambientales podría jugar un papel importante durante la selección de cepas bioactivas, junto a la relación filogenética, el repertorio de genes inducidos, la capacidad de crecer en los exudados de la raíz como única fuente de nutrientes y/o una fuerte actividad antagonista.

9.6 Compuestos orgánicos volátiles de *B. velezensis* 83 como posibles supresores directos del crecimiento de *B. cinerea* en hojas

Los resultados presentados en este documento han confirmado que la aplicación de *B. velezensis* 83 reduce la incidencia de *B. cinera* en *A. thaliana*. Sin embargo, las características propias del modelo empleado para evaluar este efecto pueden implicar una acumulación de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en el interior de la caja Magenta, los cuales pueden inhibir directamente el desarrollo del hongo, lo que podría ser confundido con un efecto de inducción de las defensas propias de la planta. Así, con el propósito de descartar esta posible vía de acción, se cultivaron plantas tipo silvestre (*Col-0*), las cuales se transfirieron a cajas Magenta con un soporte más alto (Véase metodología sección **8.3.6**) con la finalidad de no tener contacto directo con el medio líquido que contiene la bacteria y los compuestos evaluados. Los resultados de incidencia de las lesiones en estas condiciones se presentan en la Figura 20.

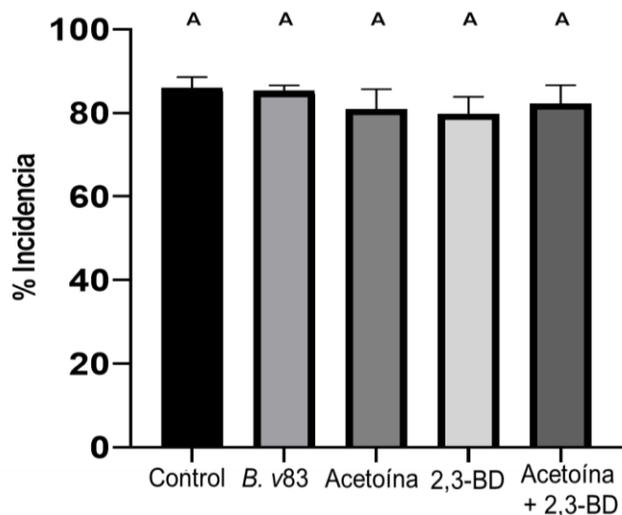


Figura 20. Efecto de los VOC producidos por *B. velezensis* 83 en medio suplementado con Glc y Fru; y la aplicación de acetoína y 2,3-butanodiol, en la incidencia de lesiones por *B. cinerea*.

Los resultados presentados en la Tabla 12 dejan en claro que el efecto reportado previamente en este estudio es producto de la interacción directa de *B. velezensis* 83 con la raíz de *A. thaliana* L. Los datos de la Figura 20 indican claramente que, no hubo diferencia entre los tratamientos, frente al control en este experimento, para probar el efecto de la posible volatilización de los compuestos. En este sentido, Wu *et al.* (2018) reportaron que la acetoína y el 2,3-butanodiol producidos por *B. amyloliquefaciens* cepa FZB42 indujeron el cierre del estomas en *A. thaliana*. Aunque ambos compuestos podrían funcionar mediante la absorción por la raíz y su volatilización para inducir el cierre del estoma, la aplicación directa a la raíz presentó una marcada disminución en el ancho promedio de las aberturas del estoma, a diferencia de la exposición a los compuestos volatilizados, donde el número de estomas abiertos y el ancho de sus aberturas se mantuvo prácticamente igual al de las plantas control. Así, la absorción en la raíz fue claramente más eficiente en el efecto observado.

A pesar de su naturaleza volátil, tales moléculas pueden aplicarse en campo, ya que muchos VOC, como el 2,3-BD, son solubles en agua, económicos (<USA \$ 1/kg), funcionan a concentraciones extremadamente bajas ($\mu\text{g/ml}$) y parecen ser inocuos para animales y humanos. Por ejemplo, en condiciones de cámara de crecimiento, la aplicación directa de acetoína en las raíces mostró una reducción significativa del crecimiento de patógenos a las 96 h después del desafío (Kim *et al.*, 2011).

PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR FITOHORMONAS EN LA RESISTENCIA INDUCIDA POR *B. VELEZENSIS* 83

9.7. Análisis de la expresión de genes para identificación de las vías por fitohormonas inducidas por *B. velezensis* 83.

Con los resultados anteriores se demostró que la aplicación de *B. velezensis* 83 en la raíz de *A. thaliana* confiere un fenotipo de resistencia al posterior enfrentamiento contra *B. cinerea*. Además, la ausencia de contacto directo (experimento de volátiles) sugiere que el efecto de resistencia observado sería derivado de la estimulación de las defensas propias de la planta, las cuales podrían estar mediadas por vías de señalización dependientes de fitohormonas. Con base a esto, se realizó una cuantificación por PCR en tiempo real de transcritos marcadores (Tabla 10) para vías que han sido asociadas a la inmunidad vegetal, como lo son las mediadas por SA, JA y ET.

Se ha encontrado que la RSI mediada por organismos benéficos, depende principalmente de la señalización de JA/ET. Con el fin de conocer su papel en el modelo estudiado se cuantificó la acumulación del transcrito del gen *PDF1.2* (Defensina Vegetal, cuya activación es independiente de la respuesta a SA) y del gen *AOS*, para evaluar la posible participación de JA. En la Figura 21 se presentan los resultados obtenidos. Los datos se presentan en dos comparaciones, con la finalidad de visualizar si la inoculación de *B. velezensis* 83 modula los niveles de los transcritos, cuando las plantas solo son infectadas con *B. cinerea* respecto a plantas pretratadas con *B. velezensis* 83 e infectadas (izquierda); y comparando plantas que no son infectadas con el patógeno ni inoculadas con *B. velezensis* 83, respecto a plantas que interaccionan solo con *B. velezensis* 83 (derecha).

En la Figura 21 A, en los tiempos 12, 48 y 72 h, los niveles de transcrito de *PDF1.2* son mayores en plantas pretratadas con *B. velezensis* 83, respecto a plantas sin *B. velezensis* 83 y, como se presenta en la Figura 21 B, este nivel no se observa cuando hay interacción sólo con *B. velezensis* 83. Esto tiene sentido, ya que se ha demostrado que el producto de *PDF1.2* posee actividad antifúngica *in vitro*; de tal forma que al tener una expresión tan alta (alrededor de 3 veces más Figura 21 A a las 48 h), es posible que esté involucrado en la resistencia promovida por el pretratamiento con *B. velezensis* 83 y, por tanto, ante la ausencia del patógeno no hay necesidad de su expresión. Otro punto a destacar es que los niveles del transcrito de *PDF1.2* no aumentan por la presencia de *B. velezensis* 83, ya que como se muestra en la Figura 21 B, posterior a las 6 h, sus niveles son bajos.

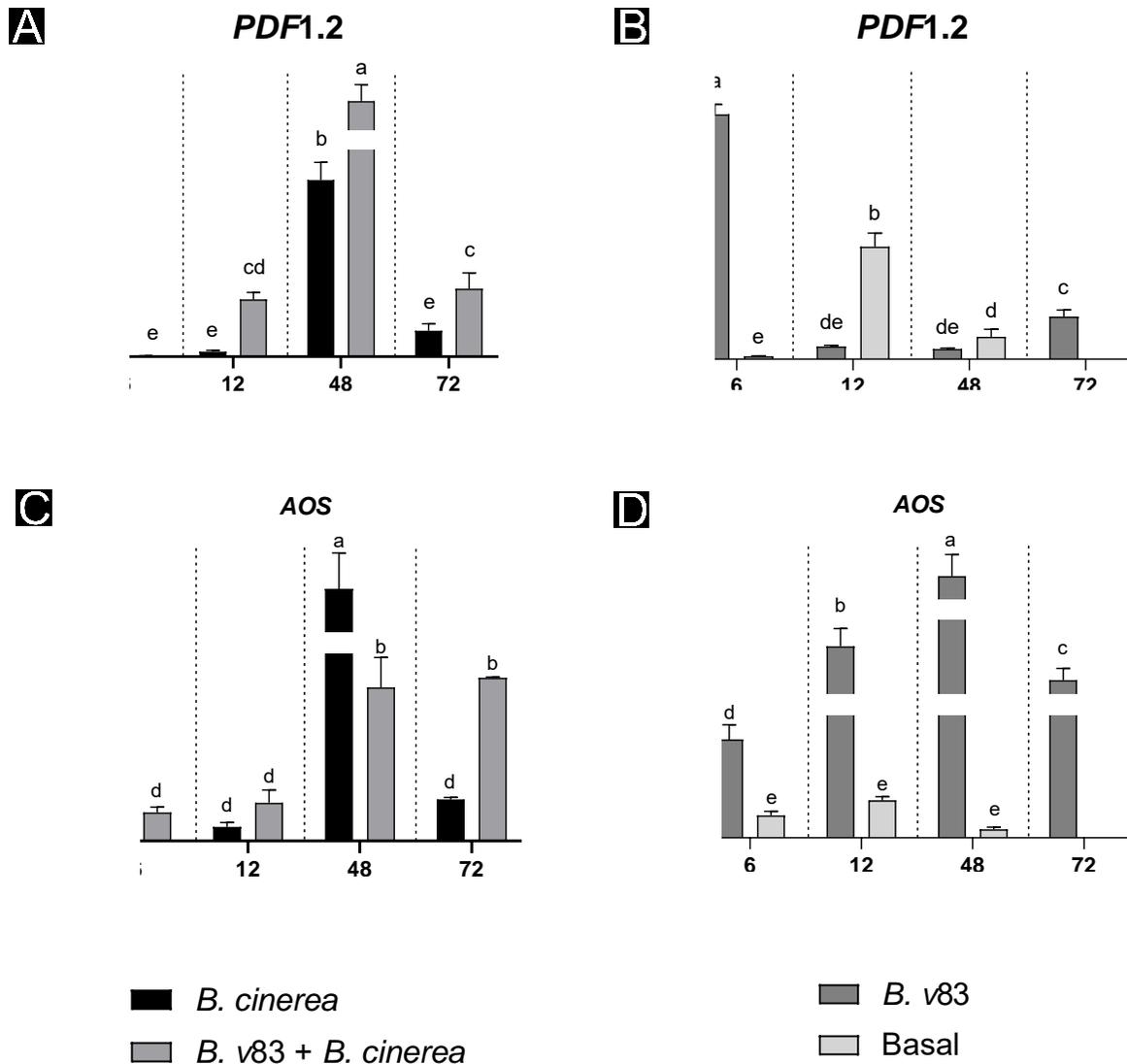


Figura 21. Acumulación de transcritos de genes dependientes de JA. En A y C, se comparan la acumulación de transcritos en plantas infectadas con *B. cinerea* y en plantas pretratadas por 24 h con *B. velezensis* 83 y, posteriormente, infectadas con *B. cinerea*. En B y D, se comparan la acumulación de transcritos en plantas en condiciones estériles (basal) y plantas pretratadas por 24 h con *B. v. elezensis* 83.

Ahora bien, el transcrito para la AOS (que codifica para una óxido sintasa, clave en la vía biosintética de JA) en las plantas con *B. velezensis* 83 se acumula notablemente en todos los tiempos medidos (Figura 21 D) con respecto a plantas “Basal”, alcanzando los mayores niveles a las 48 h. Esto indica que la presencia de *B. velezensis* 83 está activando respuestas dependientes de la vía de JA en las hojas (recordar que *B. velezensis* 83 solo se encuentra en la raíz), sugiriendo que hay una señalización sistémica con una respuesta clara a las 48 h. Ahora

bien, la acumulación de transcritos de AOS hasta las 48 h en plantas pretratadas con *B. velezensis* 83 e infectadas con el patógeno, fueron menores a lo obtenido en plantas solo infectadas con el patógeno (Figura 21 C). Mientras que, en la Figura 21 C, hacia las 72 h, en las plantas infectadas, pero sin presencia de *B. velezensis* 83 la acumulación de transcritos de AOS, cae drásticamente respecto al valor que tenía a las 48 h, en las plantas infectadas, pero con pretratamiento de *B. velezensis* 83, la expresión se mantiene. Esto puede deberse a que el estímulo de *B. velezensis* 83 en la planta lleva a un incremento en la expresión que compensa una posible degradación del mRNA de AOS que ocurriría en las hojas entre las 48 y 72 h; precisamente esta preservación del nivel de expresión de AOS, indicaría que respuestas dependientes de JA están tomando acción en la planta producto del estímulo de *B. velezensis* 83 y estas a su vez, son las responsables de que la aplicación de *B. velezensis* 83 induzca una protección.

También se buscó conocer el papel de una posible señalización por ET, ya que la inducción de la señalización de ET frecuentemente se sincroniza a la señalización de JA (Kwon *et al.*, 2010). Para esto se midió la acumulación de transcritos de los genes *PR4* (proteína similar a la heveína) y *ACS6* (ACC sintasa, enzima clave para la biosíntesis de etileno).

Las proteínas relacionadas con patogénesis (PR) se han definido como proteínas vegetales que se inducen en situaciones patológicas o relacionadas (necrosis o RH). Aunque algunas están implicadas en la defensa, su principal característica es que su expresión se induce por un patógeno. Aun así, se ha descrito que la proteína *PR4* se induce también por etileno o por O₃ en *Arabidopsis* (Guevara-Morato *et al.*, 2010). En la Figura 22 F se muestra que las plantas inoculadas con *B. velezensis* 83 a las 6 h tuvieron una mayor acumulación del transcrito para *PR4*, posiblemente porque de la interacción con la bacteria, hay una activación de defensas que llevan a la expresión de *PR4*. Posteriormente, la planta reconocería a la bacteria como benéfica o simbiótica, lo que disminuiría la acumulación del transcrito de *PR4*. Ahora bien, en la Figura 22 E, se aprecia que la acumulación de transcrito de *PR4* en las plantas infectadas con *B. cinerea*, se mantuvo de las 6 a las 12 h, seguido de un incremento hacia las 48 h y a las 72 h, con un descenso final de alrededor de 20 veces el valor alcanzado a las 48 h. Por su parte, las plantas pretratadas con *B. velezensis* 83 e infectadas con el patógeno, a las 12 h tuvieron que incremento en la acumulación de transcrito de alrededor de 4 veces hacia las 48 h, pero cuyos valores fueron menores a lo determinado para las plantas *B. velezensis* 83. Esto indica que la presencia de *B. velezensis* 83 lleva a una expresión reducida del gen, pues *PR4* se expresa en respuesta a necrosis; por ello, como las plantas tratadas con *B. velezensis* 83 presentan menos lesiones,

tiene sentido que la expresión en estas plantas es menor que en plantas que solo se retaron con el patógeno.

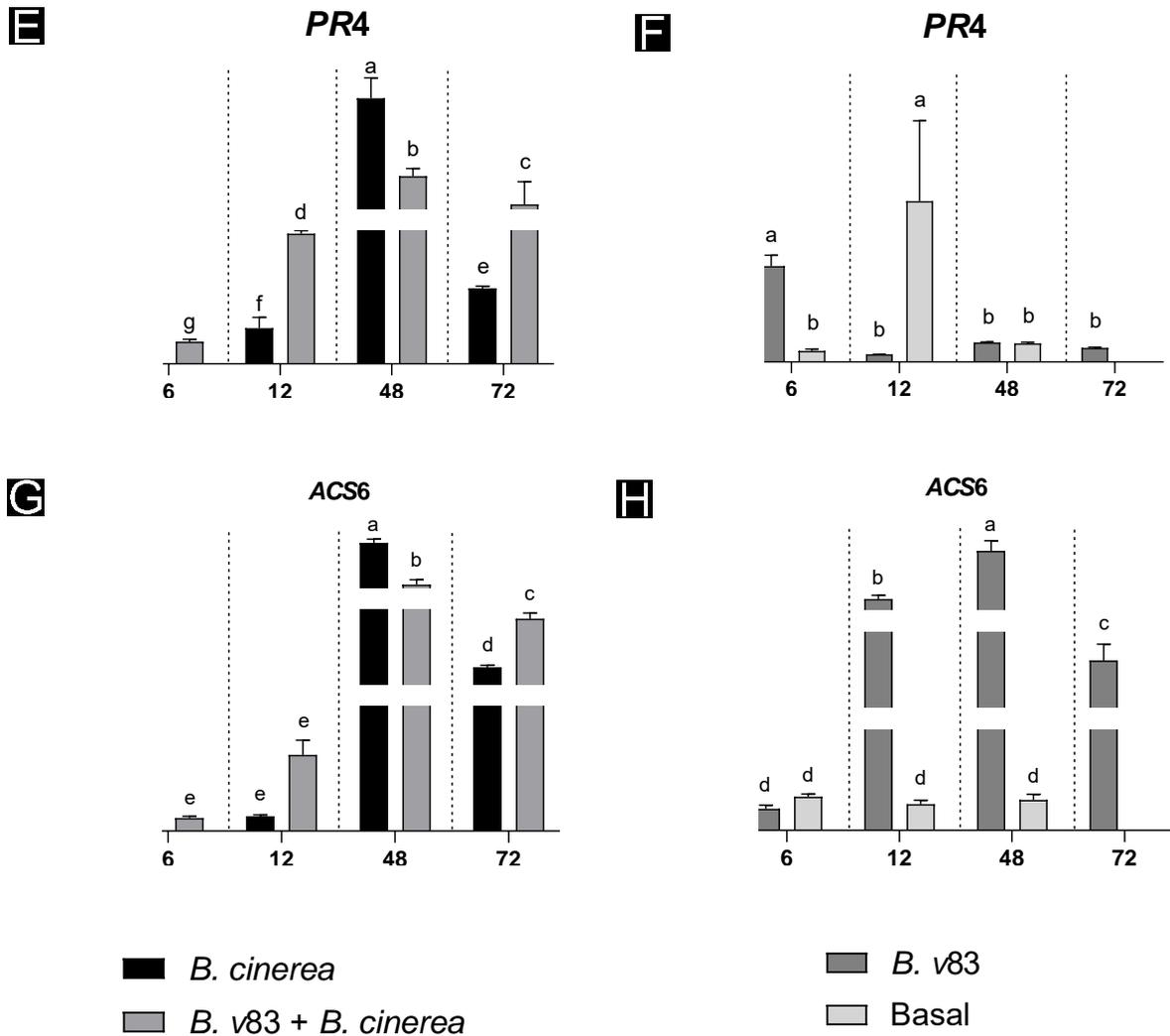


Figura 22. Acumulación de transcritos de genes dependientes de ET. En E y G, se comparan la acumulación de transcritos en plantas que fueron infectadas con *B. cinerea* y plantas que fueron pretratadas por 24 h con *B. velezensis* 83 y posteriormente se infectaron. En F y H, se comparan la acumulación de transcritos en plantas en condiciones (basales) y en plantas pretratadas por 24 h con *B. velezensis* 83.

En la Figura 22 H se observa que de las 12 a las 72 h las plantas con *B. velezensis* 83 alcanzaron una acumulación de transcrito superior a las plantas en condición basal, destacando en particular una mayor acumulación de transcrito de ACS6 las 48 h (que codifica para la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa que cataliza la conversión de S-adenosil-L-metionina en 1-aminociclopropano-1-carboxilato, un precursor directo del etileno). Este incremento, puede ser

indicativo de que *B. velezensis* 83 está activando en hojas una respuesta dependiente de ET, ya que la enzima producida por este gen tiene un papel importante en la síntesis de ET. Además, el incremento (12 a 48 h) y posterior descenso (48 a 72 h) en la acumulación de transcrito, es similar a lo observado para AOS (Figura 21 D), lo que indica que la señalización JA/ET, tiene un peso importante, y que actúan juntos en la interacción de *B. velezensis* 83 con *A. thaliana*.

Desde otra perspectiva, en la Figura 22 G se observó que a las 6 y 12 h entre las plantas infectadas con *B. cinerea* y aquellas pretratadas con *B. velezensis* 83 no hubo diferencias significativas en la acumulación de transcrito para ACS6, mientras que a la 48 h las plantas tratadas con *B. velezensis* 83 tuvieron una acumulación de transcrito de alrededor de un tercio a la de plantas infectadas sin *B. velezensis* 83. Es hacia las 72 h donde hay una diferencia significativa mayor en plantas con *B. velezensis* 83 respecto a plantas no tratadas (Figura 22 G). Este comportamiento de acumulación de transcrito fue similar a lo observado para PR4 (Figura 22 E), indicando en primer lugar que cuando hay una infección, hay una señalización de ET (por el incremento en la expresión de ACS6) que sería recíproco a una expresión para PR4; pero sin presencia de patógeno, aun cuando la señalización por ET se puede considerar más intensa (valores altos de ACS6 en la Figura 22 H), para las plantas con *B. velezensis* 83.

En *Arabidopsis*, se considera que el JA y ET actúan sinérgicamente en la respuesta a los patógenos. En el tomate, sin embargo, estas señales parecen actuar de manera independiente. Además, en ambas la aplicación exógena de SA induce resistencia frente a *B. cinerea*. Más interesante, O'Donnell *et al.*, (2001) encontraron que el etileno y el ácido salicílico actúan en una respuesta compatible, debido a que la síntesis y acción del ET llevan a una posterior acumulación de SA, que se correlacionó con la aparición de síntomas secundarios de la enfermedad (necrosis-muerte celular) en tomate por la infección de *Xanthomonas campestris*.

De igual forma, otros informes contradicen la hipótesis de un antagonismo entre SA y JA. Por ejemplo, Schenk *et al.* (2000) demostraron en *Arabidopsis* que un grupo de genes son coinducidos (55) y correprimidos (28) por SA y JA. Además, Thomma *et al.* (2000) observaron que tanto JA como SA contribuyen a la resistencia frente al hongo *Plectosphaerella cucumerina*, lo que refuerza la idea de que es poco probable que se produzca un antagonismo general entre las vías de señalización JA/ET vs SA en todos los sistemas biológicos.

El SA se ha reconocido como una señal esencial para el establecimiento de RSA, y sus niveles se correlacionan tanto con el aumento de la resistencia, como con la inducción de genes marcadores de RSA (incluidos genes [PR], que codifican proteínas antimicrobianas). Van Wees

et al. (2000) han reportado que la activación simultánea de la vía de SA y la vía de JA, da como resultado un efecto aditivo sobre la resistencia inducida contra *Pseudomonas syringae*, demostrando que ambas vías son compatibles para trabajar simultáneamente. Por este motivo, se determinaron los niveles de los transcritos de algunos genes marcadores de SA. Ahora bien, los resultados obtenidos (Figura 23) para la señalización de JA/ET hacia las 48 h, apuntan a que la presencia de *B. velezensis* 83 en plantas que son infectadas, lleva a una represión, respecto a las plantas sin *B. velezensis* 83 (Figuras 21 C y 22 G). Precisamente, cabe destacar que a las 48 h ocurrió lo contrario para los tres transcritos dependientes de SA (*PR1*, *ICS1* y *NPR1*), ya que los niveles se incrementaron en plantas pretratadas con *B. velezensis* 83 (Figura 23 A, C y E).

El aumento en los niveles de SA y su derivado SA-glucósido (SAG) se han descrito principalmente para la activación de la RSA. En particular, la expresión elevada del gen *PR1*, sensible a SA, se ha utilizado de forma rutinaria como marcador molecular de RSA (Shah & Zeier, 2013). Así, la aplicación de *B. velezensis* 83 en la raíz llevó a una expresión tres veces mayor de *PR1* a las 6 h respecto a plantas en condición basal, seguido de una disminución hacia las 12 h, con valores similares hacia los tiempos más largos de análisis (Figura 23 B). Mientras que las plantas infectadas pero pretratadas con *B. velezensis* 83, la acumulación del transcrito de *PR1* fue mayor a las 12 y 48 h, respecto a plantas infectadas, pero sin pretratar (Figura 23 A).

Se ha descrito que la acumulación de SA en hojas de *Arabidopsis* requiere una mayor expresión de la isocorismato sintasa 1 (*ICS1*). Los niveles obtenidos para el transcrito de *ICS1* indican que está ocurriendo una síntesis *in situ* de SA que, a su vez, estaría activando las defensas dependientes de SA. En la Figura 23 D se observa que la aplicación de *B. velezensis* 83 en la raíz de *A. thaliana*, lleva a un incremento de acumulación de transcrito de *ICS1* sólo a las 48 h respecto a plantas en condición basal; mientras que la acumulación de transcrito en plantas pretratadas con *B. velezensis* 83, e infectadas con *B. cinerea* a las 48 y 72 h, es mayor que a la de plantas infectadas sin pretratar (Figura 23 C). De esta manera, la presencia de *B. velezensis* 83 da lugar a una mayor acumulación de *ICS1*, sugiriendo un incremento en la síntesis de SA. Pareciera que la señalización mediada por SA (Figura 23 C y D) podría no estar muy inducida, si se compara, con la expresión de *AOS* y *ACS6* que tuvieron niveles de acumulación relativa más elevados (Figura 21 D y 22 H). Sin embargo, hay otras moléculas señal que pueden participar en la respuesta por SA, como el ácido pipecólico, capaz de orquestar la amplificación de defensas en RSA, y su aumento ocurre independientemente de la biosíntesis del SA dependiente de *ICS1*; o bien el MeSA que también se produce de forma independiente de *ICS1*. Por tanto, podría haber

acumulación de SA en las hojas independientemente de la expresión de *ICS1*. Para determinar si este fuera el caso sería necesario medir la concentración de SA en hojas (Shah y Zeier, 2013).

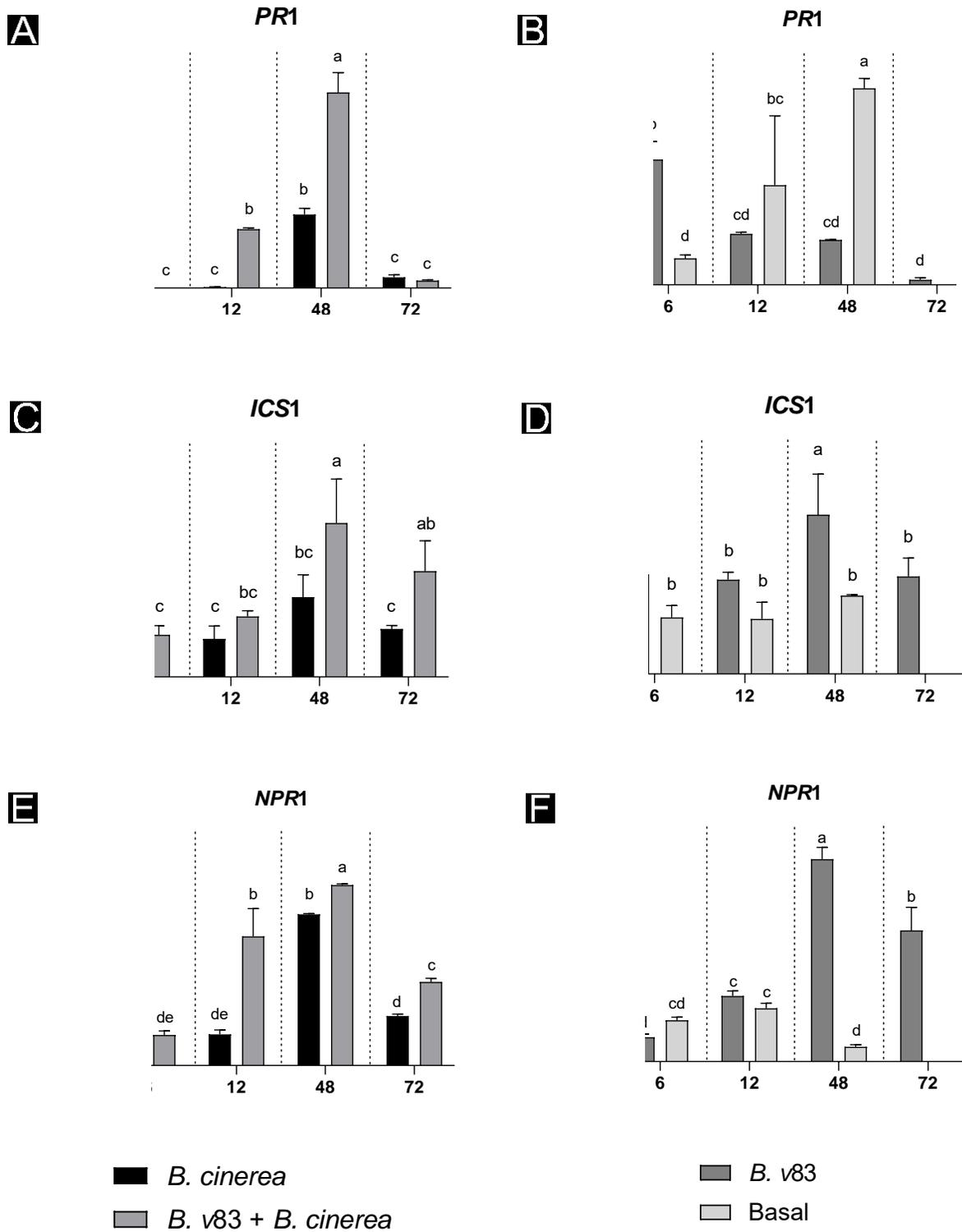


Figura 23. Acumulación de transcritos de genes dependientes de SA. En **A, C y E**, se comparan la acumulación de transcritos en plantas que se infectaron solo con *B. cinerea* y en plantas pretratadas por 24 h con *B. velezensis* 83. En **B, D y F** se comparan la acumulación de transcritos en plantas en condiciones basales y en plantas pretratadas por 24 h con *B. velezensis* 83.

En el sentido de qué otras moléculas intermedias en la señalización de SA pueden jugar un papel importante, Shah & Zeier (2013) sugieren que el papel de MeSA en la RSA en *Arabidopsis* probablemente se module por factores como la luz. Las condiciones experimentales en las que se mantuvieron las plantas en este trabajo fueron de oscuridad. Interesantemente Liu *et al.* (2011) demostraron que la duración de la exposición a la luz que reciben las plantas determina hasta qué punto se requiere MeSA para la señalización en la vía de SA, esto debido a que al realizar la inducción cuando las plantas recibieron muy poca exposición a la luz (en el período de noche/oscuridad), el MeSA y sus enzimas metabolizadoras fueron esenciales para el desarrollo de la RSA. También se ha mencionado que la RSA está influenciada por la disponibilidad de luz (Zeier *et al.*, 2004; Griebel & Zeier, 2008). Con base a esto, es posible que la acumulación de transcritos para *ICS1*, aunque aumentaron por la presencia de *B. velezensis* 83 (Figura 23 C y D), no fueron tan marcadas como para *AOS* y *ACS6*, ya que podría ser que el MeSA, para cuya síntesis no se requiere *ICS1*, fuera la principal molécula en esta señalización.

La determinación de los niveles del transcrito de *NPR1*, un componente central de la señalización de SA que promueve la activación transcripcional del 92.2% de los genes de esta vía (Huang *et al.*, 2020), mostró un alto nivel de acumulación desde las 12 h y hasta las 72 h, en plantas pretratadas con *B. v83* antes de la infección con *B. cinerea* respecto a plantas infectadas y no tratadas (Figura 23 E). Sin embargo, en las plantas que sólo se inocularon con *B. velezensis* 83, se alcanzó un incremento en la acumulación del transcrito de *NPR1* hacia las 48 h, comparadas con las plantas en condición basal (Figura 23 F). Aunque el nivel del transcrito fue elevado, este es menor al observado para los transcritos de los genes dependientes de JA/ET (*PDF1.2* "Figura 21A" y *PR4* "Figura 22E"). Estos datos son consistentes con las observaciones de Van Wees *et al.* (2000) quienes demostraron que *NPR1* se requiere tanto para la RSA como para la RSI, y que las plantas con ambos tipos de resistencia no presentan niveles elevados de transcripción para *NPR1*. Ello sugiere que un nivel basal de *NPR1* es suficiente para promover ambas respuestas, RSA y RSI; por lo cual, aun cuando los resultados de este trabajo mostraron incrementos en este transcrito menores a los de los genes de JA/ET, el hecho de que la presencia de *B. velezensis* 83 provoque un aumento en su acumulación, apoya su participación en los mecanismos de defensas inducidas que aparentemente potencian la resistencia observada.

Ahora bien, el sistema de defensa de la planta está regulado a través de una compleja red de varias cascadas de señalización. Los resultados de este trabajo ilustran claramente la dificultad de abordar el papel que juega una sola hormona, en el sistema biológico. Por lo tanto, aunque se sabe que ciertos subconjuntos de genes relacionados con la defensa se indican independientemente por ET, SA o JA, el funcionamiento de múltiples vías paralelas para el control génico es algo que se debe considerar, puesto que la respuesta de defensa de una planta es un proceso complejo que responde a diferentes señales y que puede estar regulado por todas estas hormonas en conjunto. La información hasta ahora conocida indica que las vías de acción de *B. velezensis* 83 para inducir la resistencia en plantas, constituyen una red compleja de regulación, por lo que los resultados que aquí se incluyen, relacionados con los niveles de los transcritos para los genes marcadores de algunas de las vías de señalización para algunas hormonas, solo muestran indicios de este proceso de respuesta.

Por ello, además de los genes inducidos por fitohormonas, se midió la expresión de otros dos genes para explorar la participación de otros mecanismos, como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (*ZAT12*) y la síntesis de callosa (*GSL5*). Esto, en parte, debido a que los órganos distantes al sitio de infección pueden 'comunicar' la percepción de los estímulos, por medio de varios mecanismos, entre los que están incluidas las ROS, con conexiones claras con la señalización de Ca^{2+} citosólico libre y la rápida propagación de señales eléctricas (Grenzi *et al.*, 2020). Por su parte, la síntesis de callosa en las hojas se ha descrito como un mecanismo de defensa implicado en el control de hongos al lograr un reforzamiento de la pared celular y así restringir el crecimiento del patógeno. Los niveles relativos de los transcritos para estos genes se presentan en la Figura 24.

El JA es un regulador crítico de las respuestas a heridas y se sintetiza en 1 minuto en hojas distales tras el daño tisular, sin embargo, esta velocidad de respuesta implica que debe haber señales rápidas que actúan a larga distancia. Algunas de estas señales son los potenciales de onda lenta (SWP), el glutamato, el Ca^{2+} y las ROS (Shao *et al.*, 2020). Los resultados de expresión de *ZAT12*, a las 48 h tienen el valor más alto de acumulación de transcrito (Figura 24 A), lo cual sugiere que la expresión de *PDF1.2* a las 48 h, estaría favorecida por la producción de ROS (Figura 21 A) (Gilroy *et al.*, 2016).

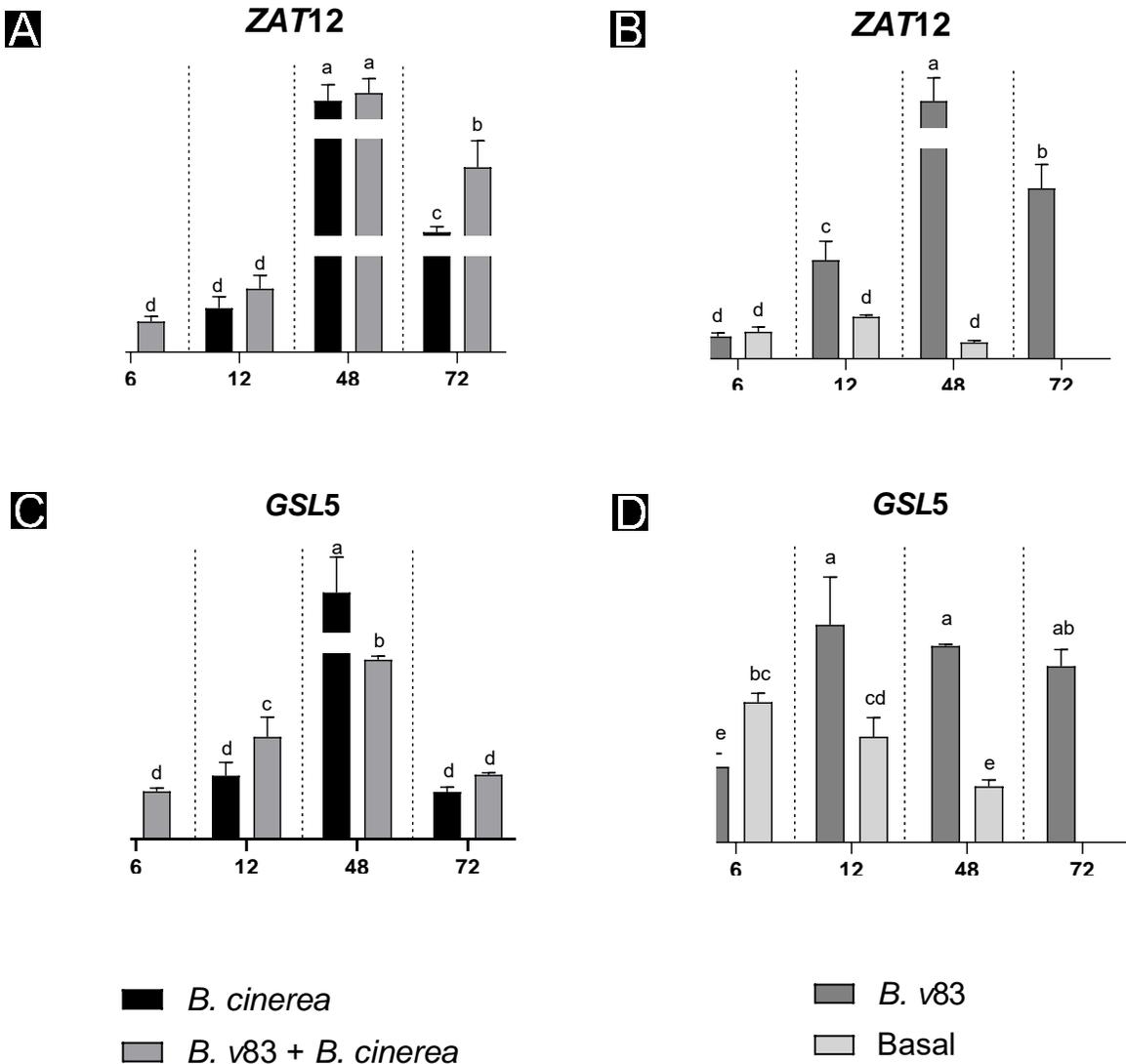


Figura 24. Acumulación de transcritos de genes para determinar la participación de las ROS y callosa, como mecanismos de defensa inducidos por *B. velezensis* 83. En **A** y **C**, se comparan la acumulación de transcritos en plantas que fueron infectadas con *B. cinerea* y plantas que fueron pretratadas por 24 h con *B. velezensis* 83 y posteriormente fueron infectadas con *B. cinerea*. En **B** y **D**, se comparan la acumulación de transcritos en plantas en condiciones estériles (basal) y plantas pretratadas por 24 h con *B. velezensis* 83.

Recordando los resultados de producción de acetoina por *B. velezensis* 83 en las plantas infectadas (Figura 18), se puede ver que a las 72 h de análisis (correspondiente a 48 h en este experimento) es cuando la acumulación de acetoina en el medio, llega a superar los 0.1 g/L. Esto, indica que se alcanzó una concentración suficiente para inducir una respuesta en las plantas, por lo cual, suponemos que la acetoina coordina la respuesta mediada por ROS, debido a que el

transcrito de *ZAT12* presentó su máximo nivel también a las 48 h en plantas a las que solo se les inoculó *B. velezensis* 83, respecto a las plantas en condición basal (Figura 24 B). También cabe hacer notar que a las 72 h es cuando la concentración de acetoina en el medio supera los 0.1 g/L en plantas solo inoculadas con *B. velezensis* 83 (Figura 17). En este sentido, Peng *et al.* (2019) describieron con la mutante GJ11 Δ bdh de *B. velezensis* GJ11 (sobreproductora de acetoina), que la acetoina induce una condición preventiva en las plantas, caracterizada por un aumento significativo de H₂O₂, de la deposición de callosa y de las actividades enzimáticas de POD, PAL y PPO.

Con base a lo anterior, otra respuesta se decidió evaluar la síntesis de callosa mediante la medición de la expresión de un gen que codifica para una de las sintetetas involucradas. Lo que se puede ver en la Figura 24 C es que a las 48 h la expresión de *GSL5* es menor en las plantas pretratadas con *B. velezensis* 83 en comparación a plantas no tratadas; sin embargo, a las 12 h la expresión es mayor, esto es particularmente importante, ya que no es necesario que la sintetasa se exprese todo el tiempo, porque una vez que en las hojas ocurre la síntesis de callosa, la actividad sintetasa ya no se requiere, es decir, la deposición de callosa es necesaria en tiempos tempranos para contener más eficientemente el desarrollo del patógeno, así, el aumento a las 12 h es indicativo de que está ocurriendo un proceso temprano de síntesis de callosa, que estaría favoreciendo la resistencia contra *B. cinerea*. Por su parte en plantas sin *B. velezensis* 83, en las cuales se puede asumir (por una expresión alta a las 48 h, Figura 24C) que este mecanismo de defensa se activa en tiempos más tardíos, haciéndose menos eficiente.

Ahora bien, en la Figura 24 D se aprecia que, desde las 12 y hasta las 72 h, la expresión de *GSL5* en las plantas con *B. velezensis* 83, no tiene cambios, por lo cual, se puede considerar que el aumento en la deposición de callosa en las hojas es parte de la prevención que induce la interacción de *B. velezensis* 83 con la planta. En este mismo sentido, en trabajos posteriores otro mecanismo de defensa inducible que sería interesante analizar es la producción de camalexina, que no está controlada directamente por SA, ET o JA (Thomma *et al.*, 2001).

9.8 Determinación de las vías por fitohormonas en la resistencia mediada por *B. velezensis* 83 por el uso de mutantes de *A. thaliana*.

En este trabajo, no se buscó establecer qué vía de señalización actúa ante una infección de *B. cinerea*, ya que anteriormente varios estudios lo han abordado. Aquí se buscó determinar qué vía de señalización se utiliza y se induce por *B. velezensis* 83 para promover en *A. thaliana* una defensa sistémica contra *B. cinerea*. Por ello, al comprobar que la interacción directa de *B.*

velezensis 83 con la raíz de *A. thaliana* tiene un efecto en la incidencia de la enfermedad ocasionada por *B. cinerea*, así como que ciertos genes marcadores de tres vías de fitohormonas presentaron incrementos en diferentes momentos durante las interacciones, se decidió emplear mutantes de *A. thaliana* afectadas en esas vías de señalización, con la finalidad de confirmar su participación y evaluar su importancia para la resistencia inducida por *B. velezensis* 83 contra *B. cinerea*. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 25.

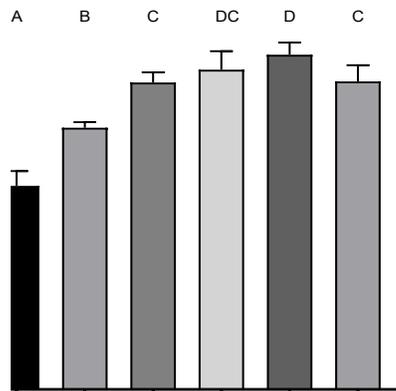


Figura 25. Efecto sobre la incidencia de *B. cinerea*, por la interacción de *B. velezensis* 83 en mutantes de *A. thaliana* L. con bloqueos de las respuestas medidas por fitohormonas.

En la Figura 25, se observa que, en la planta de tipo silvestre (*Col-0*) la incidencia de la enfermedad fue de alrededor del 50 %. Sin embargo, en la mutante *jar-1* (comprometida en la señalización por JA), la incidencia fue de 77 %. Como se observó en los resultados de qRT-PCR, la acumulación de transcrito del gen *AOS* fue mayor, en plantas que fueron inoculadas con *B. velezensis* 83 en comparación con las plantas en condición basal (Figura 21 D). Por su parte, en plantas infectadas con *B. cinerea*, el pretratamiento con *B. velezensis* 83 indujo una mayor expresión de *PDF1.2* (en comparación con plantas solo infectadas con *B. cinerea* (Figura 21 A). Ambos resultados, refuerzan que la señalización por JA tiene un peso importante en la comunicación *B. velezensis* 83 – Planta y la inducción de defensas para el control de *B. cinerea* en hojas.

Ahora bien, los resultados de expresión para *ACS6/AOS* y *PR1/ICS1/NPR1* a las 48 h (Figuras 21C/22G y 23 A/C/E) supone un cambio en las vías de señalización, que tendría sentido en este momento. Es a las 48 h cuando se comienzan a apreciar las lesiones por *B. cinerea*, por lo cual

es un momento clave, en el que la planta debe ser capaz de controlar la necrosis por el patógeno, motivo por el cual, el aumento de expresión de todos los genes dependientes de SA, pero la supresión de genes de JA/ET, toma sentido que plantas mutantes deficientes en la señalización de SA (Figura 25 *npr1-1*, *eds5-3* y *eds5-1*) pierdan por completo el fenotipo de resistencia que se observa en plantas tipo silvestre (*Col-0*).

El SA es fundamental para la defensa contra patógenos, especialmente como componente de la RSA; sin embargo, se han reportado organismos benéficos que utilizan esta vía para la inducción de defensas. Es por ello que se analizaron las mutantes *eds5-3*, *eds5-1* y *npr1-1* para evaluar la importancia de la vía por SA en la interacción con *B. velezensis* 83. Como se aprecia en la Figura 23, en éstas tres líneas, la incidencia de la enfermedad fue cercana al 80 %, lo cual demuestra que la respuesta de defensa mediada por SA es fundamental para la resistencia inducida por *B. velezensis* 83. La falta de integridad en la señalización por SA impidió que las plantas fueran resistentes a *B. cinerea* después de haber sido pretratadas con *B. velezensis* 83. Previamente García-Gutiérrez *et al.* (2013), observaron respuestas dependientes de SA e independientes de JA en la activación de RSI, sugiriendo una actividad cooperativa de las vías de señalización de SA y JA/ET, lo cual es similar a lo visto en este estudio.

También se empleó la mutante “*ein3-1*” (ethylene insensitive3), que está limitada en la respuesta a ET, debido a que carecen de un factor de transcripción central en esta vía de señalización, ya que regula la mayoría de los cambios de expresión génica asociados a ET. La incidencia de la enfermedad obtenida con esta mutante fue de 66 % (Figura 25), lo que indica que algunos mecanismos de defensa dependientes de ET son esenciales para la protección inducida por *B. velezensis* 83. Sin embargo, dado que esta mutación está abajo del receptor de etileno y de la cascada de cinasas, bien podría haber una interconexión en la vía de señalización activada por el receptor, que permite la activación de otras vías independientes de EIN-3. En este caso, la incidencia (70 %), fue menor a la exhibida por las mutantes con bloqueo en JA y SA (80%) (Figura 25). Con el fin de comprobar en definitiva el papel del ET, sería necesario emplear otras mutantes, como *ein2-1* o *etr1-1* afectadas en esta vía.

Por otro lado, tomando en consideración que la mutante *npr1-1* presentó una incidencia del 80 %, indicando que la respuesta de defensas inducidas por *B. velezensis* 83 dependen fuertemente de este regulador maestro, tiene sentido que la incidencia en *ein3-1* no tuvo valores tan altos como a los observados con las líneas mutantes de SA. A este respecto, Huang *et al.* (2020) observaron que, en la formación del gancho apical, *NPR1* actúa como un correpresor transcripcional de *EIN3*, interfiriendo con la actividad de unión a sus genes blanco. En lo

observado en el presente trabajo, este efecto sirve para explicar, cómo es que los efectos de resistencia inducidos por *B. velezensis* 83 están menos afectados en las plantas de *ein3-1*, en comparación con las plantas de *npr1-1*. Como fue evidente en los resultados de qRT-PCR, *NPR1* se induce desde las 12 h en plantas infectadas y pretratadas con *B. velezensis* 83 (Figura 23 E), mientras que la expresión de *ACS6* se reprime en las mismas plantas hacia las 48 h, respecto a plantas infectadas sin tratamiento con *B. velezensis* 83 (Figura 22 G).

9.9 Síntesis de acetoina en las plantas mutantes de *A. thaliana* durante la interacción de *B. velezensis* 83

Con base a los resultados anteriores, se realizó un análisis del medio hidropónico de interacción, en todas las líneas usadas en el experimento anterior, para evaluar si en estas mutantes está afectada la síntesis de acetoina, o bien, si existe alguna afectación en su producción debido a la deficiencia en las respuestas mediadas por fitohormonas. Los resultados se presentan en la Figura 26.

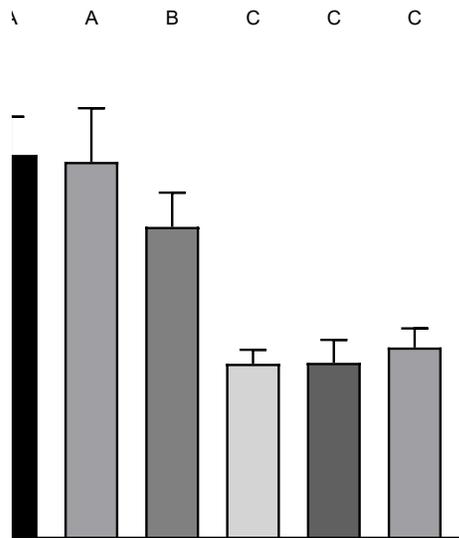


Figura 26. Concentración de acetoina producida por *B. velezensis* 83, en el medio de interacción con mutantes de *A. thaliana* L.

Como se muestra en la Figura 26, la concentración de acetoina en el medio al final del experimento con la planta de tipo silvestre (*Col-0*) y la mutante *ein3-1*, fue prácticamente igual (alrededor de 0.2 g/L). Tomando en cuenta, los resultados de incidencia de *B. cinerea* (Figura

25), de que aun cuando la incidencia de infección en *ein3-1* aumentó respecto al valor de incidencia que se obtuvo para *Col-0*, no fue en la misma magnitud que la observada en las líneas deficientes en SA (Figura 25). En éstas últimas, la concentración de acetoina sintetizada por *B. velezensis* 83 en el medio de interacción fue de la mitad que la alcanzada en *Col-0* (Figura 26).

En términos de la formación de biopelículas, Rudrappa *et al.*, (2007) demostraron que *B. subtilis* FB17 colonizó y formó biopelículas en la superficie de la raíz de *A. thaliana Col-0* y en las líneas mutantes *cpr 1-1*, *acd 2 -2*, *pad 4-1*, *cpr 6-1*, *etr 1-1*, *jar 1-1*, *ein 4-1*, *eds 1-1*, *npr 1-1* y *npr/ndr*. Esto sugiere que la formación de biopelículas por *Bacillus* es independiente de cualquiera de las vías de resistencia a enfermedad, por lo cual, es posible que en la interacción de *B. velezensis* 83 con las mutantes para SA de *A. thaliana*, la producción de acetoina sea independiente de una deficiencia en la colonización, aunque esta suposición faltaría de ser comprobada en futuros trabajos.

Por su parte, Ryu *et al.* (2004) identificaron al 2,3-butanodiol y a la acetoina como inductores de la RSI en *A. thaliana* contra *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Estos autores demostraron que los VOC bacterianos inducen la RSI en varios mutantes de *Arabidopsis*: una línea *coi1*, *ein2*, *npr1* y la transgénica *nahG*. Encontraron que, a dosis bajas, la actividad biológica de estos compuestos en *A. thaliana* es suficiente para activar RSI.

9.10 Acetoina como inductor de la RSI contra *B. cinerea*.

Para aclarar si la concentración de acetoina es determinante para la resistencia en las líneas mutantes, se evaluó el efecto de su aplicación exógena a diferentes concentraciones en el medio de interacción de la raíz de plantas tipo silvestre (*Col-0*) y las líneas mutantes. Se evaluaron dos concentraciones de acetoina; 1) 0.2 g/L, que es la que se encontró cuando *B. velezensis* 83 estuvo en interacción con plantas tipo silvestre (*Col-0*) (Figura 26) y 2) 0.1 g/L, que es la que se encontró en mutantes para SA (Figura 26). Los resultados se presentan en la Figura 27.

Se puede observar que en plantas de tipo silvestre (*Col-0*), la acetoina en ambas concentraciones disminuye la incidencia de *B. cinerea*, lo que comprueba que es un inductor eficiente del mecanismo contra el ataque de hongos. Esto es relevante, ya que, estas concentraciones son las que se observaron en el presente trabajo, que *B. velezensis* 83 fue capaz de sintetizar en la interacción con la raíz de *A. thaliana* tanto en interacción con plantas sanas (Figura 17), como con plantas infectadas (Figura 18). Además, en estudios previos, se había limitado al uso de bacterias fitopatógenas para evaluar el papel de la acetoina en las defensas inducibles en *A.*

thaliana. El presente trabajo es el primer reporte donde se comprueba que la acetoina induce los mecanismos de defensa contra un hongo (*B. cinerea*) en *A. thaliana*.

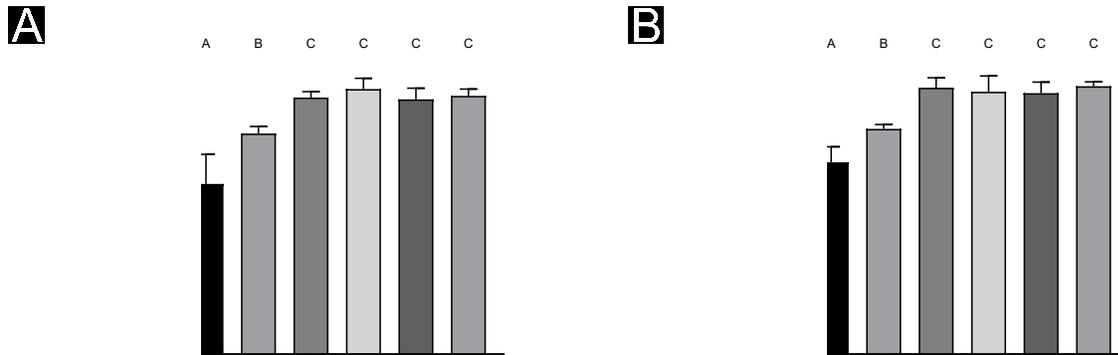


Figura 27. Efecto de la aplicación de acetoina sobre la incidencia de *B. cinerea* en *A. thaliana* Col-0 y mutantes con deficiencia en la señalización por fitohormonas. **A)** Tratamientos con aplicación de 0.1 g/L de acetoina en el medio líquido. **B)** Tratamientos con aplicación de 0.2 g/L de acetoina en el medio líquido.

En este sentido Wu *et al.* (2018) reportaron que la acetoina y el 2,3-BD de *B. amyloliquefaciens* FZB42 usaron las vías de señalización de SA y ácido abscísico para cerrar los estomas y estimularon la acumulación de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico en *A. thaliana*. Esto demuestra que la acetoina, puede inducir la señalización por SA, lo cual corresponde a lo observado en este trabajo con *B. velezensis* 83, que libera acetoina en el medio, y con las evaluaciones con las mutantes, donde se observó que la señalización por SA es necesaria para obtener protección derivada de la interacción en raíz con *B. velezensis* 83.

Kierul *et al.* (2015) investigaron el nivel de síntesis de proteínas de *Bacillus* FZB42 en exudados de la raíz del maíz durante la fase tardía de crecimiento exponencial y estacionario. Encontraron que la proteína con mayor secreción fue la acetolactato sintasa AlsS, una enzima involucrada en la síntesis en fase post-exponencial de acetoina y 2,3 butanodiol. Esto apoya, que la síntesis de acetoina, es una estrategia general para el establecimiento de la RSI, presente en varios *Bacillus*. En este estudio, se logró cuantificar la producción de acetoina directamente en la interacción de *B. velezensis* 83 con *Arabidopsis*, que aunque fue baja comparada a los valores de hasta casi 10 g/L obtenido en biorreactor (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020), demostró ser suficiente para obtener protección contra el patógeno en estudio.

Al respecto, se ha reportado que el tratamiento con concentraciones bajas de volátiles individuales como 0.2 pg de 2,3-butanodiol (Ryu *et al.*, 2004), 0.001 ppm de acetoina (Ann *et al.*, 2013) y 100 μ M de volátiles puros entre ellos acetoina y 2,3-butanodiol (Sharifi *et al.*, 2013), son suficientes para suprimir infecciones en planta. Estos datos, en conjunto apuntan a que concentraciones bajas de acetoina provocan la RSI en la planta, que de acuerdo con Sharifi & Ryu (2016) es un mecanismo indirecto del cual depende el 90.63% de la supresión de la enfermedad; mientras que, la inhibición directa del crecimiento y desarrollo de hongos por concentraciones bajas de volátiles representa el 9,36% de la supresión total de la enfermedad.

Los mecanismos moleculares subyacentes al proceso de preparación de los mecanismos de defensa están lejos de entenderse completamente, pero existe un consenso en el sentido de que las plantas en estado de preparación conservan cierta memoria. Se han sugerido dos mecanismos potenciales. Uno implica la acumulación de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK). El otro es que los cambios epigenéticos en la metilación del ADN y las modificaciones de histonas pueden ser portadores de memoria ante el estrés y desencadenantes de respuestas inmunes. Esta preparación de la defensa parece mejorar generalmente la salud de las plantas, ya sea al reducir los efectos del daño de los herbívoros o los síntomas de la enfermedad, o bien al afectar el crecimiento o la replicación de plagas o patógenos (Westman *et al.*, 2019).

Este estudio aporta una nueva visión sobre el papel de la acetoina como un fuerte inductor de la respuesta de defensa, en primer lugar, debido a que se ha reportado que las cepas de *B. velezensis* son sobreproductoras de acetoina y 2,3-BD (Petrova *et al.*, 2019). Además, como se ha discutido, las condiciones de bajo pH y limitación de O₂ (condiciones comunes en la rizosfera), así como la misma síntesis de la acetoina proporciona un sumidero de electrones alternativo para la regeneración de NAD⁺, permitiendo proponer que la acetoina y el 2,3-BD son inductores que la bacteria opta por producir, por sobre los CLP's, cuya síntesis requiere más energía, así como sobre *aa* cuya síntesis involucra la formación del anillo peptídico, actividades ambas que se pueden considerar como un estilo de vida derrochador de energía, que pondría a la bacteria en desventaja ante eventualidades de baja disponibilidad de nutrientes en la naturaleza.

10. Conclusiones

- Se diseñó un sistema *in vitro* que permitió evaluar de manera confiable y reproducible los efectos sistémicos de la interacción bacteria-raíz en plantas de *A. thaliana*.

Interacción *B. velezensis* 83 con *A. thaliana*

- El tratamiento 1×10^5 cel/mL con un tiempo de interacción de 24 h, induce el menor porcentaje de incidencia de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana*.
- La fructosa demostró ser la fuente de carbono proporcionada por la planta, que se consume primero (a las 48 h en todas las condiciones) en la interacción con *B. velezensis* 83.
- Después de 24 h de infección de las plantas, la concentración de acetoina tiene un aumento en el medio de interacción hasta las 72 h. Mientras que en condiciones sin patógeno, la producción de acetoina en el medio, ocurre solo hasta las 48 h.
- La aplicación de acetoina y 2,3-BD en el medio, o fuentes de carbono para favorecer la síntesis de estos compuestos por *B. velezensis* y su volatilización, no tuvo efectos sobre la incidencia de *B. cinerea*.

Análisis de expresión génica en *A. thaliana*

- La acumulación de transcritos de genes marcadores de las vías de SA, JA y ET, indican que hay una estimulación de las tres vías por parte de *B. velezensis* 83, las cuales actúan en diferentes momentos de la infección.
- La producción de ROS y síntesis de callosa se estimula por la presencia de *B. velezensis* 83 en *A. thaliana*.
- La síntesis de acetoina afecta negativamente en la interacción con mutantes para SA, lo que apoya que la señalización por esta fitohormona está implicada no solo para el reforzamiento de las defensas de la planta, sino para la correcta interacción con *B. velezensis* 83.
- La aplicación de 0.1-0.2 g/L de acetoina en el medio líquido, reduce la incidencia de *B. cinerea* en *A. thaliana*, sin embargo, su efecto es menor en mutantes deficientes en SA, JA y ET.

11. Perspectivas.

- En este trabajo, solo se monitoreó la concentración de un par de fuentes de carbono suministrados por la planta, por lo que para acercarse a conocer qué compuestos suministrados por la planta pueden favorecer que *B. velezensis* 83 produzca más acetoina en el medio, resulta interesante, analizar la presencia de aminoácidos, ácidos orgánicos y otros carbohidratos en el medio, en respuesta a la infección.
- Con los resultados de la acumulación de transcritos, se identificó que la planta tiene una respuesta mediada por las vías de señalización de JA, ET y SA. Sin embargo, para entender mejor la interconexión de señalización, sería beneficioso hacer análisis más robustos de expresión tales como RNA-seq, que además permitirían inferir cambios en el metabolismo de la planta.
- Los lipopéptidos, recurrentemente implicados en la activación de los mecanismos de defensa, no se detectaron en el medio de interacción, por lo cual, para discernir si realmente tienen un papel en este mecanismo, se tendría que generar mutantes de *B. velezensis* 83 afectadas en la síntesis de acetoina y 2,3-BD para descartar la participación de otros compuestos en estos mecanismos.

12. Referencias bibliográficas

- Abdelkhalek, A., Behiry, S. I., & Al-Askar, A. A. (2020). *Bacillus velezensis* pea1 inhibits Fusarium oxysporum growth and induces systemic resistance to cucumber mosaic virus. *Agronomy*, 10(9). pp. 1–18.
- Ait Kaki, A., Kacem Chaouche, N., Dehimat, L., Milet, A., Youcef-Ali, M., Ongena, M., & Thonart, P. (2013). Biocontrol and plant growth promotion characterization of *Bacillus* species isolated from *Calendula officinalis* rhizosphere. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4). pp. 447–452.
- Ajouz, S., Walker, A. S., Fabre, F., Leroux, P., Nicot, P. C., & Bardin, M. (2011). Variability of *Botrytis cinerea* sensitivity to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. *BioControl*, 56(3). pp. 353–363.
- Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Brancato, A., Bura, L., Carrasco Cabrera, L., Chaideftou, E., Chiusolo, A., Crivellente, F., De Lentdecker, C., Egsmose, M., Fait, G., Greco, L., Ippolito, A., Istace, F., Jarrah, S., Kardassi, D., Leuschner, R., Lostia, A., Villamar-Bouza, L. (2020). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus amyloliquefaciens* strain AH2. *EFSA Journal*, 18(7). pp. 1–18.
- Ann, M. N., Cho, Y. E., Ryu, H. J., Kim, H. T., & Park, K. (2013). Growth promotion of tobacco plant by 3-hydroxy-2-butanone from *Bacillus vallismortis* EXTN-1. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 17(4). pp. 388–393.
- Aragón Gómez, W. I. (2012). Desarrollo de un marcador molecular específico para el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. Tesis en Maestría en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM.
- Badri, D. V., Loyola-Vargas, V. M., Broeckling, C. D., De-la-Peña, C., Jasinski, M., Santelia, D., Martinoia, E., Sumner, L. W., Banta, L. M., Stermitz, F., & Vivanco, J. M. (2008). Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of arabidopsis ATP-binding cassette transporter mutants. *Plant Physiology*, 146(2). pp. 762–771.
- Badri, D. V., Quintana, N., El Kassis, E. G., Kim, H. K., Choi, Y. H., Sugiyama, A., Verpoorte, R., Martinoia, E., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2009a). An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota. *Plant Physiology*, 151(4). pp. 2006–2017.
- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009b). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 32(6). pp. 666–681.
- Balderas-Ruíz, K. A., Bustos, P., Santamaria, R. I., González, V., Cristiano-Fajardo, S. A., Barrera-Ortíz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, Á. A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*, 10(163). pp. 1–19.

- Barrera-Ortiz, S. (2018). Estudio de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 en *Arabidopsis thaliana*. Cartel. IV Simposio de verano 2018, IBT.
- Baudoin, E., Benizri, E., & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(9). pp. 1183–1192.
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., De Jonge, R., Burgman, W. P., Burmølle, M., Herschend, J., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME Journal*, 12(6). pp. 1496–1507.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., & Fukuda, H. (2018). Salicylic acid and jasmonic acid pathways are activated in spatially different domains around the infection site during effector-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 59(1). pp. 8–16.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4). pp. 1327–1350.
- Blanc, C., Coluccia, F., L'Haridon, F., Torres, M., Ortiz-Berrocal, M., Stahl, E., Reymond, P., Schreiber, L., Nawrath, C., Métraux, J.-P., & Serrano, M. (2018). The cuticle mutant *eca2* modifies plant defense responses to biotrophic and necrotrophic pathogens and herbivory insects. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(3). pp. 344–355.
- Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix, H., Dhondt, S., Ait Barka, E., Kauffmann, S., Jeandet, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Clément, C., Baillieul, F., & Dorey, S. (2011). Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 62(2). pp. 595–603.
- Borriss, R., Chen, X. H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spröer, C., Junge, H., Vater, J., Pühler, A., & Klenk, H. P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7 T and FZB42 T: A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete gen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8). pp. 1786–1801.
- Brannen, P. M., & Kenney, D. S. (1997). Kodiak® - A successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(3). pp. 169–171.
- Burrell, T., Fozard, S., Holroyd, G. H., French, A. P., Pound, M. P., Bigley, C. J., James Taylor, C., & Forde, B. G. (2017). The Microphenotron: A robotic miniaturized plant phenotyping platform with diverse applications in chemical biology. *Plant Methods*, 13(1). pp. 1–20.

- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., & Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1). pp. 57–63.
- Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Muy-Rangel, M. D., Sañudo-Barajas, A., Márquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., de la Garza-Ruiz, Z., Patiño-Vera, M., & Galindo-Fentanes, E. (2005). Control biológico de antracnosis y su efecto en la calidad poscosecha del mango en sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1). pp. 24–32.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., & Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89(7). pp. 1133–1144.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE*, 8(2). pp. 1–10.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal*, 8(4). pp. 790–803.
- Cheng, W., & Gershenson, A. (2007). Carbon fluxes in the rhizosphere. En *The rhizosphere: an ecological perspective* (pp. 31–56). Elsevier Academic Press.
- Choi, S. K., Jeong, H., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2014). Genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* GB03, an active ingredient of the first commercial biological control product. *Genome Announcements*, 2(5). pp. 2–3.
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5). pp. 493–513.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4). pp. 289–297.
- Chowdhury, S. P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., & Grosch, R. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS ONE*, 8(7). pp. 1–10.
- Conn, S. J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., Aukett, L., Conn, V., Shearer, M. K., Fuentes, S., Tyerman, S. D., & Gilliam, M. (2013). Protocol: Optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods*, 9(1). pp. 1–11.
- Cortes-Barco, A. M., Hsiang, T., & Goodwin, P. H. (2010). Induced systemic resistance against three foliar diseases of *Agrostis stolonifera* by (2R,3R)-butanediol or an isoparaffin mixture. *Annals of Applied Biology*, 157(2). pp. 179–189.

- Cristiano-Fajardo, S. A. (2012). Estrategias de cultivo en lote y lote alimentado para el crecimiento vegetativo y la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM.
- Cristiano Fajardo, S. A. (2020). Producción de metabolitos asociados al sobreflujo de carbono, crecimiento y esporulación de *Bacillus velezensis* 83 en función de la velocidad específica de consumo de glucosa. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM.
- D'Alessandro, M., Erb, M., Ton, J., Brandenburg, A., Karlen, D., Zopfi, J., & Turlings, T. C. J. (2014). Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant, Cell and Environment*, 37(4). pp. 813–826.
- de León, I. P., Hamberg, M., & Castresana, C. (2015). Oxylipins in moss development and defense. *Frontiers in Plant Science*, 6(483). pp. 1–12.
- De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2009). Chapter 6 Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Advances in Botanical Research*, 51(C). pp. 223–281.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4). pp. 414–430.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauw, E., & Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental Microbiology Reports*, 7(3). pp. 570–582.
- Deepika, Ankit, Sagar, S., & Singh, A. (2020). Dark-induced hormonal regulation of plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 11. pp. 1–10.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., & Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3). pp. 312–321.
- Elmahdi, S., Kadir, J., Tengku, M., Mohamed, M., Vadamalai, G., & Akter, S. (2015). Isolation, screening and characterization of effective microbes with potential for biological control of *Fusarium* wilt of rock melon. *World Journal of Agricultural Research*, 3(1). pp. 11–16.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9. pp. 1–14.
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E. A., Jacquard, C., & Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*, 16(2). pp. 177–187.

- Fazle Rabbee, M., & Baek, K. H. (2020). Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules*, 25(21). pp. 1–16.
- Feng, D. X., Tasset, C., Hanemian, M., Barlet, X., Hu, J., Trémousaygue, D., Deslandes, L., & Marco, Y. (2012). Biological control of bacterial wilt in *Arabidopsis thaliana* involves abscissic acid signalling. *New Phytologist*, 194(4). pp. 1035–1045.
- Ferreira-Saab, M., Formey, D., Torres, M., Aragón, W., Padilla, E. A., Tromas, A., Sohlenkamp, C., Schwan-Estrada, K. R. F., & Serrano, M. (2018). Compounds Released by the Biocontrol Yeast *Hanseniaspora opuntiae* Protect Plants Against *Corynespora cassiicola* and *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9(1596). pp. 12.
- Fichman, Y., Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2020). Untangling the ties that bind different systemic signals in plants. *Science Signaling*, 13(640). pp. 8–10.
- FMC. (2016). FungiFreeAB. Cultivos con calidad de exportación (pp. 1–17).
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M. A., Rayo, E., Isauro, D., & Jurado, C. (2013). The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3). pp. 1–23.
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Balderas-Ruiz, K. A., Muñoz-Celaya, A. L., Mezo-Villalobos, M., & Arroyo-Colín, J. (2015). Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Fungifree AB®, el primer biofungicida 100% mexicano. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1). pp. 52–60.
- García-Gutiérrez, L., Zerriouh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., & Pérez-García, A. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microbial Biotechnology*, 6(3). pp. 264–274.
- Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology*, 171(3). pp. 1606–1615.
- Gordillo, M. A., & Maldonado, M. C. (2012). Purification of peptides from *Bacillus* strains with biological activity. En S. Dhanarasu (Ed.), *Chromatography and Its Applications* (pp. 201–224).
- Grady, E. N., MacDonald, J., Ho, M. T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Renaud, J., & Yuan, Z. C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19(1). pp. 1–14.
- Grenzi, M., Bonza, M. C., Alfieri, A., & Costa, A. (2020). Structural insights into long-distance signal transduction pathways mediated by plant glutamate receptor-like channels. *New Phytologist*. pp. 1–7.

- Griebel, T., & Zeier, J. (2008). Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in arabidopsis: Phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiology*, 147(2). pp. 790–801.
- Guevara-Morato, M. Á., De Lacoba, M. G., García-Luque, I., & Serra, M. T. (2010). Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities. *Journal of Experimental Botany*, 61(12). pp. 3259–3271.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nurnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. R., & Schmelzer, E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10). pp. 4150–4157.
- Hahn, M., Viaud, M., & Kan, J. Van. (2014). The genome of *Botrytis cinerea*, a ubiquitous broad host range necrotroph. En R. A. Dean (Ed.), *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens* (pp. 19–45). Springer Berlin Heidelberg.
- Han, S. H., Lee, S. J., Moon, J. H., Park, K. H., Yang, K. Y., Cho, B. H., Kim, K. Y., Kim, Y. W., Lee, M. C., Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2006). GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. tabaci in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8). pp. 924–930.
- Hao, W. ya, Ren, L. xuan, Ran, W., & Shen, Q. R. (2010). Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f.sp. niveum. *Plant and Soil*, 336(1). pp. 485–497.
- Huang, P., Dong, Z., Guo, P., Zhang, X., Qiu, Y., Li, B., Wang, Y., & Guo, H. (2020). Salicylic acid suppresses apical hook formation via NPR1-mediated repression of EIN3 and EIL1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 32(3). pp. 612–629.
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*, 321(1–2). pp. 5–33.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4). pp. 456–468.
- Kang, X., Zhang, W., Cai, X., Zhu, T., Xue, Y., & Liu, C. (2018). *Bacillus velezensis* CC09: A potential ‘Vaccine’ for controlling wheat diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(6). pp. 623–632.
- Kawasaki, A., Okada, S., Zhang, C., Delhaize, E., Mathesius, U., Richardson, A. E., Watt, M., Gilliam, M., & Ryan, P. R. (2018). A sterile hydroponic system for characterising root exudates from specific root types and whole-root systems of large crop plants. *Plant Methods*, 14(1). pp. 1–13.

- Keerthana, U., Nagendran, K., Raguchander, T., Prabakar, K., Rajendran, L., & Karthikeyan, G. (2018). Deciphering the Role of *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* in the Management of Late Blight Pathogen of Potato, *Phytophthora infestans*. Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences, 88(3). pp. 1071–1080.
- Kierul, K., Voigt, B., Albrecht, D., Chen, X. H., Carvalhais, L. C., & Borriss, R. (2015). Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Microbiology (United Kingdom), 161(1). pp. 131–147.
- Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G., & Hain, R. (1983). FZB24@ *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 1(1). pp. 72–93.
- Kim, J. S., Lee, J., Lee, C. H., Woo, S. Y., Kang, H., Seo, S. G., & Kim, S. H. (2015). Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. Plant Pathology Journal, 31(2). pp. 195–201.
- Kim, Y. C., Leveau, J., McSpadden Gardener, B. B., Pierson, E. A., Pierson, L. S., & Ryu, C. M. (2011). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 77(5). pp. 1548–1555.
- Krebs, B., Höding, B., Kübart, S., Workie, M. A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., & Hevesi, M. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. Journal of Plant Diseases and Protection, 105(2). pp. 181–197.
- Kuijken, R. C. P., Snel, J. F. H., Heddes, M. M., Bouwmeester, H. J., & Marcelis, L. F. M. (2014). The importance of a sterile rhizosphere when phenotyping for root exudation. Plant and Soil, 387, 131–142.
- Kwon, Y. S., Ryu, C. M., Lee, S., Park, H. B., Han, K. S., Lee, J. H., Lee, K., Chung, W. S., Jeong, M. J., Kim, H. K., & Bae, D. W. (2010). Proteome analysis of Arabidopsis seedlings exposed to bacterial volatiles. Planta, 232(6). pp. 1355–1370.
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. Frontiers in Microbiology, 5. pp. 1–10.
- Li, C., Hu, W., Pan, B., Liu, Y., Yuan, S., Ding, Y., LI, R., Zheng, X., Shen, B., & Shen, Q. (2017). Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain SQRT3-mediated induced systemic resistance controls bacterial wilt of tomato. Pedosphere, 27(6). pp. 1135–1146.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2016). Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of *Peach Gummosis*. PLOS ONE, 11(9). pp. 1–22.

- Lisiane Berlitz, D., Knaak, N., Correa Cassal, M., & Fiuza, L. M. (2014). *Bacillus* and biopesticides in control of phytonematodes. En K. Sahayaraj (Ed.), Basic and Applied Aspects of Biopesticides (pp. 3–16). Springer.
- Liu, P. P., von Dahl, C. C., & Klessig, D. F. (2011). The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. *Plant Physiology*, 157(4). pp. 2216–2226.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4). pp. 402–408.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1). pp. 541–556.
- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*, 127. pp. 145–154.
- Mäder, U., Homuth, G., Scharf, C., Büttner, K., Bode, R., & Hecker, M. (2002). Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression modulated by amino acid availability. *Journal of Bacteriology*, 184(15). pp. 4288–4295.
- Mallqui Crispin, Y. L. (2016). Efecto de la densidad celular en la esporulación de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM.
- Martínez-Jarquín, S., & Winkler, R. (2017). Low-temperature plasma (LTP) jets for mass spectrometry (MS): Ion processes, instrumental set-ups, and application examples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 89. pp. 133–145.
- Matzen, N., Heick, T. M., & Jørgensen, L. N. (2019). Control of powdery mildew (*Blumeria graminis* spp.) in cereals by Serenade®ASO (*Bacillus amyloliquefaciens* (former *subtilis*) strain QST 713). *Biological Control*, 139. pp. 104067.
- Mezo, M., Aranda, S., & Isauro, D. (2015). Potencial de Fungifree AB® como promotor de crecimiento de cultivos agrícolas: efecto en el desarrollo de raíces de dos genotipos de maíz. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 11.
- Moe, L. A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, 100(9). pp. 1692–1705.
- Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14. pp. 213–223.
- Morales-Sánchez, D. (2007). Desarrollo de un proceso de alta densidad celular para la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83 con alta viabilidad. Tesis de Maestría. IBT-UNAM

- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2015). Biodiversity of genes encoding anti-microbial traits within plant associated microbes. *Frontiers in Plant Science*, 6(231). pp. 1–25.
- Murasnige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15. pp. 473–497.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., & Métraux, J. P. (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell*, 14(1). pp. 275–286.
- Nguyen, M. L., Glaes, J., Spaepen, S., Bodson, B., du Jardin, P., & Delaplace, P. (2019). Biostimulant effects of *Bacillus* strains on wheat from *in vitro* towards field conditions are modulated by nitrogen supply. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 182(3). pp. 325–334.
- O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J., & Klee, H. J. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant Journal*, 25(3). pp. 315–323.
- Pandin, C., Le Coq, D., Deschamps, J., Védie, R., Rousseau, T., Aymerich, S., & Briandet, R. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: A biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease. *Journal of Biotechnology*, 278. pp. 10–19.
- Peng, G., Zhao, X., Li, Y., Wang, R., Huang, Y., & Qi, G. (2019). Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological Research*, 227. pp. 126297.
- Petatán-Sagahón, I., Anducho-Reyes, M. A., Silva-Rojas, H. V., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A., Cárdenas-Álvarez, I. O., & Mercado-Flores, Y. (2011). Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9). pp. 5522–5537.
- Petrova, P., Velikova, P., & Petrov, K. (2019). Genome Sequence of *Bacillus velezensis* 5RB, an Overproducer of 2,3-Butanediol. *Microbiology Resource Announcements*, 8(1). pp. 3–4.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., & Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in arabidopsis. *Plant Cell*, 10(9). pp. 1571–1580.
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(6). pp. 1–13.
- Rahman, A., Uddin, W., & Wenner, N. G. (2015). Induced systemic resistance responses in *Perennial ryegrass* against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin

- lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Molecular Plant Pathology*, 16(6). pp. 546–558.
- Reinoso, Y., Vaillant, D., Casadesus, L., Garcia, E., & Pazos, V. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanida*, 11(1). pp. 35–40.
- Reva, O. N., Swanevelder, D. Z. H., Mwita, L. A., Mwakilili, A. D., Muzondiwa, D., Joubert, M., Chan, W. Y., Lutz, S., Ahrens, C. H., Avdeeva, L. V., Kharkhota, M. A., Tibuhwa, D., Lyantagaye, S., Vater, J., Borriss, R., & Meijer, J. (2019). Genetic, epigenetic and phenotypic diversity of four *Bacillus velezensis* strains used for plant protection or as probiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10. pp. 1–25.
- Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2014). Handling *Arabidopsis* plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses. En J. J. Sanchez-Serrano & J. Salinas (Eds.), *Arabidopsis Protocols*, *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1062, pp. 3–25).
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., Kunjeti, G., Donofrio, N. M., Czymbek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology*, 3(2). pp. 130–138.
- Rudrappa, T., Quinn, W. J., Stanley-Wall, N. R., & Bais, H. P. (2007). A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*, 226(2). pp. 283–297.
- Ryu, C., Farag, M. A., Hu, C., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Pare, P. W. (2004). Bacterial volatiles induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134. pp. 1017–1026.
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed Your Friends: Do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1). pp. 25–41.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., & Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21). pp., 11655–11660.
- Selim, S., Negre, J., Wendehenne, D., Ochatt, S., Gianinazzi, S., & Van Tuinen, D. (2010). Stimulation of defense reactions in *Medicago truncatula* by antagonistic lipopeptides from *Paenibacillus* sp. strain B2. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22). pp. 7420–7428.
- Serrano Carreón, L., Balderas Ruíz, K. A., Wong Urrea, M. A., Rosas Velázquez, D. R., & Galindo Fuentes, E. (2010). Biofungicidas para el control de la antracnosis del mango: logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes. *Claridades Agropecuarias*, 208. pp. 28–37.

- Serrano Carreón, L., & Galindo Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*, pp. 77–88.
- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4, pp. 1–16.
- Shao, Q., Gao, Q., Lhamo, D., Zhang, H., & Luan, S. (2020). Two glutamate- And pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*. *Science Signaling*, 13(640), pp. 1–14.
- Sharifi, Rohallah, Ahmadzadeh, M., Behboudi, K., & Ryu, C. M. (2013). Role of *Bacillus subtilis* volatiles in induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Iranian journal of plant protection science*, 44(1), pp. 91–101.
- Sharifi, Rouhollah, & Ryu, C. M. (2016). Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? *Frontiers in Microbiology*, 7(196), pp. 1–10.
- Sharma, S., Chen, C., Navathe, S., Chand, R., & Pandey, S. P. (2019). A halotolerant growth promoting rhizobacteria triggers induced systemic resistance in plants and defends against fungal infection. *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–17.
- Shi, Y., Niu, K., Huang, B., Liu, W., & Ma, H. (2017). Transcriptional responses of creeping bentgrass to 2,3-butanediol, a bacterial volatile compound (BVC) analogue. *Molecules*, 22(8), pp. 1–21.
- Shivers, R. P., & Sonenshein, A. L. (2004). Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Molecular Microbiology*, 53(2), pp. 599–611.
- Solis-Arcos, Y. (2010). Identificación parcial de antibióticos ciclo-lipopeptídicos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium* spp.
- Soriano-Peña, E. Y. (2016). Efecto de la limitación nutricional en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM.
- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S., & Scheel, D. (2014). Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 108, 35–46.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Broekaert, W. F., & Cammue, B. P. A. (2000). Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(5), pp. 421–427.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), pp. 15107–15111.

- Thomma, B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Broekaert, W. F., & Cammue, B. P. A. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, 13(1). pp. 63–68.
- Tsuda, K. (2018). Division of Tasks: Defense by the spatial separation of antagonistic hormone activities. *Plant & cell physiology*, 59(1). pp. 3–4.
- Van Wees, S. C. M., De Swart, E. A. M., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15). pp. 8711–8716.
- Vannier, N., Agler, M., & Hacquard, S. (2019). Microbiota-mediated disease resistance in plants. *PLoS Pathogens*, 15(6). pp. 1–7.
- Waewthongrak, W., Leelasuphakul, W., & McCollum, G. (2014). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit. *PLoS ONE*, 9(10). pp. 11.
- Wang, N., Wang, L., Zhu, K., Hou, S., Chen, L., Mi, D., Gui, Y., Qi, Y., Jiang, C., & Guo, J. H. (2019). Plant root exudates are involved in *Bacillus cereus* AR156 mediated biocontrol against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, 10(98). pp. 1–14.
- Westman, S. M., Kloth, K. J., Hanson, J., Ohlsson, A. B., & Albrechtsen, B. R. (2019). Defence priming in *Arabidopsis* – a meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1). pp. 1–13.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5). pp. 561–580.
- Wu, L., Li, X., Ma, L., Borriss, R., Wu, Z., & Gao, X. (2018). Acetoin and 2,3-butanediol from *Bacillus amyloliquefaciens* induce stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany*, 69 (22). pp. 5625-5635
- Xiao, Z., & Xu, P. (2007). Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(2). pp. 127–140.
- Yamamoto, S., Shiraishi, S., & Suzuki, S. (2015). Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Letters in Applied Microbiology*, 60(4). pp. 379–386.
- Zeier, J., Pink, B., Mueller, M. J., & Berger, S. (2004). Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: Uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta*, 219(4). pp. 673–683.
- Zheng, Y., Chen, F., & Wang, M. (2013). Use of *Bacillus*-based biocontrol agents for promoting plant growth and health. En D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management* (pp. 243–258). Springer.

Anexo 1. Procedimiento de extracción de RNA Total. Kit “Plant/Fungi Total RNA Purification” (Norgen Biotek Corp)

Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente.

También todas las soluciones estén a temperatura ambiente antes de su uso.

Se prepara la solución de lavado A.

Se calcula la cantidad de Tampón de Lisis C requerido para las reacciones que se vayan a realizar, se transfiere en un tubo estéril y se agregan 10 μ L de β -mercaptoetanol por cada 1 mL.

Se transfieren \leq 50 mg de tejido vegetal (previamente triturado en mortero con nitrógeno líquido) a un tubo de centrifuga de 2 ml y se agregan 600 μ L de tampón de lisis C. Agitar vigorosamente en el vórtex.

Incubar a 55°C durante 5 minutos. Ocasionalmente, mezclar el lisado 2 o 3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo.

Se ensambla una “*Filter column*” (proporcionada por el Kit) con uno de los tubos de recolección. Se coloca el lisado en la “*Filter column*” y se centrifuga por 2 minutos a 20,000 x g (~14.000 RPM).

Se transfiere el sobrenadante transparente a un tubo de microcentrifuga (evitando cualquier residuo en la parte inferior del tubo de recolección).

Se agrega un volumen igual de etanol al 96-100% al lisado recolectado anteriormente, y se mezcla usando un vortex.

Se ensambla una “*Spin Column*” (proporcionada por el Kit) con uno de los tubos de recolección. En esta se aplican 600 μ L del lisado clarificado con etanol y se centrifuga 1 minuto a \geq 3500 x g (~ 6000 RPM). Se desecha el sobrenadante y se vuelve a ensamblar la columna, se repite el proceso con los 600 μ L faltantes.

Se aplican 400 μ L de solución de lavado A a la columna y se centrifuga 1 minuto a 20.000 x g (~ 14.000 RPM). Se desecha el sobrenadante y se vuelve a ensamblar la columna para lavarla por segunda y tercera vez con la misma cantidad de solución y condiciones de centrifugado.

La columna se centrifuga 2 minutos a 20.000 x g (~ 14.000 RPM) para secar completamente la resina y se desecha el tubo de recolección.

Ahora la columna se coloca en un tubo de elución de 1.7 ml nuevo y se añaden 50 μ l de "solución de elución A" a la columna y se centrifuga 2 minutos a 200 x g (~ 2000 RPM), seguido de un centrifugado de 2 minutos a 20.000 x g (~ 14.000 RPM).

Finalmente, la muestra de RNA purificada se puede almacenar a -20° C. Se recomienda que las muestras se coloquen a -70° C para su almacenamiento a largo plazo.

Anexo 2. Análisis de los resultados de la expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La cuantificación del nivel de expresión de los genes se realiza utilizando una cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, basado en comparar los valores de Ct (Livak & Schmittgen, 2001). El valor de Ct es el número de ciclos donde el producto amplificado se eleva por encima de un umbral determinado, de los genes de estudio con respecto a los genes de referencia.

Para ello, se calcula en primer lugar la diferencia en el valor de Ct del gen de estudio con los genes de referencia. La amplificación de muestra para un determinado gen se realiza por triplicado y se utiliza el promedio de los Ct de los triplicados como resultado del gen problema. En el caso de los genes de referencia ocurre lo mismo. Así la diferencia entre los valores de Ct se calcula con la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ genes referencia}$$

Con objeto de comparar la expresión para cada marcador consideramos uno como calibrador. Este se utiliza para comparar la diferencia del Ct entre el gen problema y el gen referencia frente a la diferencia del Ct entre el calibrador y el gen de referencia. En este caso se ha utilizado como calibrador el valor obtenido en la condición de plantas en condición basal a las 6 h (Tabla 9). Con el calibrador se calcula entonces el $\Delta\Delta Ct$ con la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador})$$

Por último, el nivel de expresión de los genes problema en los diferentes tiempos y condiciones, se calcula mediante la siguiente expresión:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador})}$$

Mediante este método se han analizado los niveles de expresión de los genes mencionados en la metodología.

La cuantificación relativa siempre está basada en un transcrito de referencia. La normalización de un gen de interés con un estándar endógeno se hace utilizando la expresión del gen de referencia, para compensar las variaciones entre diferentes reacciones de PCR.