

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“AISLADO MICROBIANO PROVENIENTE DE LA MICROBIOTA  
DE LA PIEL DE ANFIBIOS CON CAPACIDAD BIOESTIMULANTE  
E INHIBITORIA EN CONTRA *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000”**

Presentada por:

**MARCELA ALLANIS VERA BARRÓN**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Lima – Perú

**2023**

---

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

# AISLADO MICROBIANO PROVENIENTE DE LA MICROBIOTA DE LA PIEL DE ANFIBIOS CON CAPACIDAD BIOESTIMULANTE E INHIBITORIA EN CONTRA *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

## INFORME DE ORIGINALIDAD

**16%**  
INDICE DE SIMILITUD

**15%**  
FUENTES DE INTERNET

**6%**  
PUBLICACIONES

**2%**  
TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	3%
2	<a href="https://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083">bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="https://digibug.ugr.es">digibug.ugr.es</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="https://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar">bibliotecadigital.exactas.uba.ar</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="https://orbi.uliege.be">orbi.uliege.be</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="https://www.colibri.udelar.edu.uy">www.colibri.udelar.edu.uy</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="https://core.ac.uk">core.ac.uk</a> Fuente de Internet	<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“AISLADO MICROBIANO PROVENIENTE DE LA MICROBIOTA  
DE LA PIEL DE ANFIBIOS CON CAPACIDAD BIOESTIMULANTE  
E INHIBITORIA EN CONTRA *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000”**

Presentada por:

**MARCELA ALLANIS VERA BARRÓN**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Ph.D. Roberto Carlos Mansilla Samaniego  
PRESIDENTE

---

Blgo. Juan Gabriel Juscamaita Morales  
MIEMBRO

---

Mg. Sc. Katty Ogata Gutiérrez  
MIEMBRO

---

Mg. Sc. Patricia Angélica Moreno Díaz de Saco  
ASESORA

---

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega  
Co-Asesor

## **DEDICATORIA**

A mi abuela Augusta Arana

Por su calidez, escucha activa y gran corazón

Este logro también es para mis padres

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Verónica y Cristian, por su apoyo incondicional y su esfuerzo por sacarnos adelante.

Al Dr. Mario Alberto Serrano, por su asesoría, enseñanza, motivación y la gran oportunidad para ser parte de este proyecto, en especial, por su apoyo constante hasta el día de hoy.

A Yordan Romero, estudiante de doctorado del CCG, por su tiempo, paciencia, disponibilidad, enseñanzas, consejos durante el proyecto y mi estancia.

A Ivette García, estudiante de doctorado del CCG, por todo su tiempo y enseñanza en el área de biología molecular.

A la técnica Martha Torres por su apoyo en el proyecto y por la amistad brindada.

A mis compañeros del laboratorio IV del Programa de Genómica Funcional de Eucariontes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM por hacer mi estancia muy enriquecedora.

A mi asesora, Mg. Sc. Patricia Moreno, por su orientación, guía y consejos en mi proceso de titulación.

Al proyecto PAPIIT IN203720 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de UNAM.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Agentes Bioestimulantes .....	3
2.2 Agentes de Control Biológico .....	7
2.3 Mecanismos de Acción de Agentes de Control Biológico.....	8
2.4 Microbiota de la Piel de Anfibios .....	10
2.5 Efecto de la microbiota de la piel de anfibios en plantas.....	11
2.6 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	12
2.7 Mecanismo de defensa vegetal .....	14
2.8 Técnicas moleculares utilizadas para evaluar la expresión de genes en tejidos vegetales.....	15
2.8.1 PCR .....	15
2.8.2 Síntesis de ADNc .....	16
2.8.3 qRT-PCR .....	16
2.8.4 Genes <i>housekeeping</i> .....	16
III. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	18
3.1 MATERIALES .....	18
3.1.1 Material biológico de estudio .....	18
3.1.2 Medios de cultivo.....	18
3.1.3 Soluciones y reactivos.....	18
3.1.4 Reactivos de biología molecular.....	19
3.1.5 Sustrato.....	19
3.1.6 Equipos de laboratorio .....	19

3.2 METODOLOGÍA .....	21
3.2.1 Evaluación de la actividad fitoestimulante en la planta modelo	
<i>Arabidopsis thaliana</i> con las cepas antagónicas.....	21
3.2.1.1 Esterilización de semillas .....	21
3.2.1.2 Interacción <i>in vitro</i> bacteria-planta .....	21
3.2.1.3 Cuantificación de pelos radiculares.....	21
3.2.2 Pruebas de antagonismo microbiano .....	21
3.2.2.1 Cultivo bacteriano .....	21
3.2.2.2 Cultivo de <i>Pseudomonas syringae</i> .....	22
3.2.2.3 Confrontación directa .....	22
3.2.2.4 Evaluación de posibles compuestos liberados que afectan el	
crecimiento de <i>P. syringae</i> .....	22
3.2.2.4.1 Técnica de doble capa de agar modificada .....	22
3.2.3 Efecto protector de la bacteria en plantas de <i>A. thaliana</i> ante la	
infección de <i>P. syringae</i> .....	22
3.2.3.1 Evaluación de la actividad antagónica durante la interacción	
tritrófica ( <i>A. thaliana</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> y bacteria de	
interés).....	23
3.2.3.2 Evaluación de infección por efecto de <i>P. syringae</i> en plantas	
de <i>A. thaliana</i> por conteo de unidades formadoras de colonia	
(UFC) en hojas infectadas de <i>A. thaliana</i> .....	23
3.2.4 Análisis molecular .....	24
3.2.4.1 Extracción de ARN .....	24
3.2.4.2 Síntesis de ADNc .....	24
3.2.4.3 Análisis por RT-PCR cuantitativa en tiempo real	
(qRT- PCR) .....	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
4.1 Evaluación de la actividad fitoestimulante en la planta modelo	
<i>A. thaliana</i> con la cepa aislada .....	26

4.1.1	Interacción <i>in vitro</i> bacteria-planta .....	26
4.1.2	Cuantificación de pelos radiculares .....	29
4.2	Pruebas de antagonismo microbiano.....	31
4.2.1	Confrontación directa.....	31
4.2.2	Evaluación de posibles compuestos liberados que afectan el crecimiento de <i>P. syringae</i> .....	33
4.2.2.1	Prueba de doble capa de agar modificada .....	33
4.3	Efecto protector de la bacteria en plantas de <i>A. thaliana</i> ante la infección de <i>P. syringae</i> .....	35
4.4	Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>P. syringae</i> en hojas infectadas de <i>A. thaliana</i> .....	36
4.5	Análisis molecular .....	40
4.5.1	Extracción de ARN .....	40
4.5.2	Síntesis de ADNc.....	41
4.5.3	Análisis por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT- PCR) .....	43
V.	CONCLUSIONES .....	48
VI.	RECOMENDACIONES .....	49
VII.	PERSPECTIVAS.....	50
VIII.	BIBLIOGRAFÍA .....	51
IX.	ANEXOS.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplos de productos a base de PGPR comercializados en Norte América, Europa, Asia y Latinoamerica .....	4
Tabla 2: Cuantificación de ARN total ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) post-tratamiento con LiCl [2M]. 1, 2 y 3 (réplicas biológicas). .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infección de <i>P. syringae</i> . .....	13
Figura 2. Efecto de inóculo bacteriano proveniente de la piel de ranas sobre el crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i> después de 11 días post inoculación .....	26
Figura 3. Gráfica del efecto de la bacteria C23F en el crecimiento de la raíz primaria en plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	27
Figura 4. Efecto de la bacteria C23F en la promoción de pelos radiculares .....	29
Figura 5. Gráfica del efecto de la bacteria C23F en la promoción de pelos radiculares en plántulas de <i>A. thaliana</i> . .....	30
Figura 7. Gráfica del crecimiento de <i>P. syringae</i> en presencia del inóculo bacteriano C23F. ....	32
Figura 6. Crecimiento de <i>P. syringae</i> en presencia del inóculo bacteriano C23F. ....	32
Figura 8. Crecimiento de <i>P. syringae</i> en presencia del inóculo bacteriano C23F. ....	33
Figura 9. Gráfica del crecimiento de <i>P. syringae</i> en presencia del inóculo bacteriano C23F. ....	34
Figura 10. Efecto protector de la bacteria C23F en plantas de <i>A. thaliana</i> ante la infección de <i>P. syringae</i> .....	36
Figura 11. Gráfica del conteo de UFC/mL post-infección de <i>P. syringae</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> .....	37
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa. ....	40
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR punto final para el gen de Actina .....	42
Figura 14. Gráfica de la evaluación de la expresión de genes del tratamiento con la cepa de interés (C23F) respecto al tratamiento control (CTRL) en plántulas de <i>A. thaliana</i> después de 11 días posinoculación. ....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo .....	68
Anexo 2. Protocolo de extracción de ARN Total con TRIzol.....	69
Anexo 3. Purificación de ARN con Cloruro de litio (LiCl) 2M.....	70
Anexo 4. Efecto fitoestimulante en plantas de <i>A. thaliana</i> bajo condiciones de invernadero .....	71
Anexo 5. Marcador 1Kb Plus Thermo Scientific™ .....	72
Anexo 6. Nomenclatura de los genes a analizar .....	73
Anexo 7. Fotos del desarrollo de la investigación.....	74
Anexo 8. Estadística de la qRT-PCR de los genes analizados.....	77

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la evaluación de la capacidad bioestimulante de bacterias aisladas de la piel de anfibios para inhibir a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. La capacidad fitoestimulante del aislado bacteriano C23F en plántulas de *A. thaliana* a nivel *in vitro* se determinó mediante los cambios observados en la estructura radical de la planta. Estos cambios fueron el acortamiento de las raíces primarias, la promoción de raíces laterales y, especialmente, un mayor incremento en el número de pelos radiculares. La modificación de la técnica de doble capa de agar permitió determinar la posible existencia de compuestos antimicrobianos que estaría liberando la bacteria C23F y que afectó el crecimiento de *P. syringae* a nivel *in vitro*. Pese a que la bacteria aislada no mostró una inhibición visible al confrontarla con el fitopatógeno durante la interacción tritrófica (planta, fitopatógeno, bacteria), si redujo en gran medida el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. syringae* presentes en hojas de la planta bajo condiciones de invernadero. Este hecho podría indicar que la bacteria pudo haber incrementado el sistema inmune de la planta, siendo este uno de los mecanismos de un agente de biocontrol. Adicionalmente, se extrajo ARN de plántulas de *A. thaliana* y se sintetizó ADNc que permitió cuantificar la expresión de los genes mediante la técnica qRT-PCR durante la interacción planta-bacteria. Los genes analizados fueron *PR1*, *PR4*, *PDF1.2*, *IAA1*, *SAUR* y *ZAT12*, relacionados a la síntesis de fitohormonas y la defensa vegetal. Se determinó la sobreexpresión de los genes *IAA1* y *ZAT12*, asociados a la síntesis de la auxina y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), respectivamente.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*, C23F, *Pseudomonas syringae*, desarrollo radicular, auxina, defensa vegetal

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the biostimulant capacity of bacteria isolated from the skin of amphibians to inhibit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The phytostimulant capacity of the isolated bacteria C23F in *A. thaliana* seedlings in *in vitro* conditions was determined through the visible changes in the plant's root structures. These changes were the shortening of the primary roots, the promotion of lateral roots and, especially, the increase of hair root promotion. The modification of the double-layer agar technique allowed us to determine the possible existence of antimicrobial compounds that the bacteria C23F would be releasing which, affected the growth of *P. syringae* in *in vitro* conditions. Even though the isolated bacteria did not show a visible inhibition when confronted with the phytopathogen, during the tritrophic interaction (plant, phytopathogen and bacteria), it reduced the number of colony-forming units (CFU) of *P. syringae* present in plant leaves under greenhouse conditions. This fact could indicate that the bacteria could be increasing plant's immune systems with it being one of the mechanisms of a biocontrol agent (BCA). Additionally, it was necessary to extract RNA from *A. thaliana* seedlings and synthesize cDNA to allow us to quantify gene expressions using the qRT-PCR technique during plant-bacteria interactions. The analyzed genes were *PR1*, *PR4*, *PDF1.2*, *IAA1*, *SAUR* y *ZAT12*, which are related to phytohormone synthesis and molecules associated with plant defense. It was determined that there was an overexpression of *IAA1* and *ZAT12* genes, which are associated with auxin synthesis and the production of reactive oxygen species (ROS), respectively.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, C23F, *Pseudomonas syringae*, root development, auxin, plant defense.

## I. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las actividades humanas que más utiliza fertilizantes y pesticidas químicos sintéticos no sólo para abastecer la demanda de alimentos, sino para contrarrestar el efecto de plagas que disminuyen considerablemente la producción (Vejan *et al.*, 2016). Si bien estos han contribuido sustancialmente con el incremento de la producción de cultivos y en la lucha contra enfermedades infecciosas causadas por fitopatógenos, también son considerados agentes de riesgo, al influir decisivamente en el grado de deterioro de la salud humana y del medio ambiente. Estos efectos abarcan desde la contaminación del subsuelo, aire, agua, hasta la pérdida del microbioma natural, tanto del suelo como de la planta (Bernal, 2021; Del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014; Espluga, 2001). Inclusive, pueden llegar a ser contraproducentes para la agricultura ya que dan lugar a nuevos brotes y selección de poblaciones resistentes de plagas. Por ello, se ha llevado a cabo diversos esfuerzos en la búsqueda de alternativas sostenibles para la agricultura como es el uso de microorganismos que puedan emplearse como fertilizantes biológicos (biofertilizantes) o bioestimulantes (Olanrewaju *et al.*, 2017). Si bien los estudios de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) han sido sumamente alentadores, su utilización en la industria agrícola no está muy extendida debido a los resultados inconsistentes al ser inoculados en campo; así como, variaciones respecto al sitio, tiempo y cultivo inoculado (Bishnoi, 2015; Vejan *et al.*, 2016). De ello surge la búsqueda de nuevas fuentes de microorganismos benéficos con potenciales efectos promotores del crecimiento vegetal.

En las últimas décadas, se ha estudiado con mayor interés la piel de anfibios como un importante órgano inmune innato y primera línea de defensa contra patógenos del medio ambiente, presentando así un gran potencial biotecnológico (Rebollar *et al.*, 2019; Varga *et al.*, 2019). En esa misma línea, también se ha reportado que bacterias que cohabitan en la piel de anfibios son también capaces de producir metabolitos antifúngicos para inhibir a diferentes patógenos (Varga *et al.*, 2019; Woodhams *et al.*, 2016). Debido a ello, el descubrimiento de estos metabolitos abre las posibilidades para la identificación de sustancias con potenciales usos biotecnológicos y diversas aplicaciones para el hombre y otros organismos (da Silva Peixoto *et al.*, 2020).

Por otra parte, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* es uno de los patógenos de plantas más comunes que infecta la filósfera, pero sobre todo su relevancia se debe a que es patógeno de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Como consecuencia, *P. syringae* pv *tomato* ha sido ampliamente utilizada como modelo de estudio para caracterizar los mecanismos moleculares de la patogénesis bacteriana, así como las respuestas de la planta a la infección (Preston, 2000; Xin y He, 2013).

El objetivo principal de la presente investigación fue: Evaluar la capacidad bioestimulante de bacterias aisladas de la piel de anfibios para inhibir *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, y como objetivos específicos se plantearon: (i) Identificar agentes fitoestimulantes para la planta modelo *A. thaliana* aislados de la microbiota de la piel de anfibios. (ii)

Determinar si los agentes bioestimulantes aislados tienen la capacidad de biocontrol contra *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. (iii) Evaluar la capacidad de biocontrol de bacterias aisladas de la piel de anfibios a nivel *in vitro* e invernadero en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. (iv) Determinar la expresión de los genes *IAA1* y *SAUR9* (auxina), *PR4* (etileno), *PDF1.2* (ácido jasmónico), *PRI*(ácido salicílico), *ZAT12* (especies reactivas de oxígeno, ROS) mediante la técnica de qRT-PCR durante la interacción planta-bacteria.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Agentes Bioestimulantes

Agentes bioestimulantes se definen como cualquier producto que contenga una sustancia y/o microorganismo que aplicándolos sobre la planta o rizósfera estimula diversos procesos fisiológicos como son: el incremento en absorción de nutrientes, la eficiencia del metabolismo, incremento de la tolerancia a estreses bióticos y/o abióticos. Esto trae como consecuencia, un incremento de la calidad y rendimiento del cultivo, independientemente de su contenido nutricional (Quiñones *et al.*, 2015).

Los principales mecanismos de acción de los agentes bioestimulantes son facilitar la asimilación de nutrientes como C, N, S, P y otros minerales, incrementar de la actividad fotosintética y un mayor incremento al estrés (Van Oosten *et al.*, 2017). Asimismo, también se le atribuye la producción de varias enzimas, carbohidratos, proteínas, amino ácidos, pigmentos y compuestos fenólicos en plantas (Singh y Vaishnav, 2021).

En una extensa revisión realizada por du Jardin (2015), clasificó los agentes bioestimulantes en siete categorías: ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen nitrógeno (N), extracto de algas y productos botánicos, quitosano y otros biopolímeros, compuestos inorgánicos, hongos y bacterias benéficas. Estos dos últimos, también denominados microorganismos eficientes (EM), mejoran la calidad del suelo, el crecimiento y la productividad de los cultivos (Higa y Parr, 2013). La categoría de hongos benéficos involucra a hongos endófitos y micorrízicos, estos últimos con capacidad de establecer simbiosis con casi el 90% de las especies de plantas (du Jardin, 2015; Lemus-Soriano *et al.*, 2021; Martínez-Alcántara y Quinones, 2017). Asimismo, la categoría de bacterias benéficas incluye a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), a las cuales se les atribuye funciones como el control biológico, el incremento de la disponibilidad de elementos minerales, nutrientes, la inducción de resistencia a enfermedades, el aumento de la resistencia al estrés abiótico y la modulación de la morfogénesis (du Jardin, 2015; Quiñones *et al.*, 2015). Cabe resaltar que, en la actualidad

existen diversas formulaciones y/o presentaciones de PGPR comerciales para diferentes variedades de cultivos (Tabla 1).

**Tabla 1:** Ejemplos de productos a base de PGPR comercializados en Norte América, Europa, Asia y Latinoamérica

<b>Productos</b>	<b>Rizobacterias</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Fabricante</b>
Amase®	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Calabaza, lechuga, tomate, pimiento	Lantmannen Bioagri, Suecia
Amnite A100®	<i>Azotobacter, Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium, Chaetomium</i>		Cleveland Biotech, UK
Azofer®	<i>Azospirillum brasilense</i>	Granos, frutos y flores	Biofábrica Siglo XXI, México
BactoFil A10®	<i>Azospirillum brasilense, Azotobacter vinelandii, B. megaterium, B. polymyxa, P. fluorescens</i>	Monocotiledóneas (cereales)	AGRO. Bio Hungary Kft, Hungría
BactoFil B10®	<i>Azospirillum lipoferum, Azotobacter vinelandii, B. megaterium, B. circulans, B. subtilis, P. fluorescens</i>	Dicotiledóneas (girasol, papa, colza)	AGRO. Bio Hungary Kft, Hungría
BiAgro 10®	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Legumbres	BIAGRO, Argentina, Brasil, Bolivia
Bioativo	Consortio de PGPR	Frijoles, maíz, caña de azúcar, arroz, cereales	Embrafros Ltda, Brasil
Ceres®	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cultivos hortícolas	Biovitis, France
Compete® Plus	<i>B. azotofixans, B. licheniformis, B. megaterium, B. polymyxa, B. pumilus, B. subtilis</i>	Cultivos de campo, árboles de viveros	Plant Health Care, USA
Dimargon®	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Algodón, soya, café	Biocultivos S.A, Colombia
FZB24®fl Rhizovital 42®	<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>Plantarum</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	Ornamentales, vegetales, cultivos de campo	ABiTEP GmbH, Alemania

Continuación ...

<b>Productos</b>	<b>Rizobacterias</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Fabricante</b>
Fosforina®	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Principalmente, tomate	LABIOFAM, Cuba
Gmax®PGPR	<i>Azotobacter</i> , <i>Phosphobacteria</i> , <i>P. fluorescens</i>	Cultivos de campo	Greenmax AgroTech, India
Inomix® Biostimulant Inomix®Biofertilisant Inomix®phosphore	<i>B. polymyxa</i> , <i>B. subtilis</i> <i>B. megaterium</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>P. fluorescens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cereales	IAB (Iabiotec), España
Micosat F® Uno Micosat F® Cereali	<i>Agrobacterium radiobacter</i> AR 39, <i>B. subtilis</i> BA 41, <i>Streptomyces</i> spp. SB14 <i>B. subtilis</i> BR 62, <i>Paenibacillus durus</i> PD 76, <i>Streptomyces</i> spp. ST 60	Frutas, vegetales, flores Cereales, tomates, girasoles, beterraga, soya	CCS Aosta Srl, Italia
Nitrasec	<i>Rhizobium</i> sp.	Leguminosas	Lage y Cia, Uruguay
Nitrofix®	<i>Azospirillum</i> sp.	Caña de azúcar, maíz, vegetales	SUMMA Biotechnologies Corporation, Cuba
Nitroguard® TwinN®	<i>Azospirillum brasilense</i> NAB317, <i>Azorhizobium caulinodens</i> NAB38, <i>Azoarcus indigens</i> NAB04, <i>Bacillus</i> sp. <i>Azospirillum brasilense</i> NAB317, <i>Azorhizobium caulinodens</i> NAB38, <i>Azoarcus indigens</i> NAB04	Cereales, azúcar, colza Beterraga, caña de azúcar, vegetales	Mapleton AgriBiotec Pty Ltd., Australia

Continuación ...

<b>Productos</b>	<b>Rizobacterias</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Fabricante</b>
Nodulest 10	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soya, frijol	Argentina
PGA®	<i>Bacillus</i> sp.	Frutas, vegetales	Organica technologies, USA
Rhizocell ® GC	<i>B. amyloliquefaciens</i> souche IT45	Cereales	Lallemand Plant Care, Canadá
Rhizofer®	<i>Rhizobium etli</i>	Leguminosas (frijol, haba, garbanzo)	Biofábrica Siglo XXI, México
Rizoliq®	<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Mesorhizobium ciceri</i> , <i>Rhizobium</i> spp.	Frijol mungo, frijol común, soya, maní, garbanzo	Rizobacter, Argentina
Rizoliq® Top	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Soya	Rizobacter, Argentina
Symbion®-N Symbion®-P Symbion®-K	<i>Azospirillum</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Azotobacter</i> <i>B. megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i> <i>Frateuria aurantia</i>	Cultivos de campo, vegetales	T. Stanes & Company Ltd, India
Zadspirillum	<i>Azospirillum brasilense</i>	Maíz	Semillera Guasch SRL, Argentina

FUENTE: Modificado de (Basu *et al.*, 2021; Kumar y Alope, 2020)

En ese sentido, diversos estudios han demostrado la efectividad de bacterias benéficas en la producción de varios cultivos de importancia económica como la palta (Lemus-Soriano *et al.*, 2021), los cítricos (Martínez-Alcántara y Quinones, 2017), tabaco (Calero-Hurtado *et al.*, 2019), frijol (Martínez-González *et al.*, 2017; Quintero Rodríguez *et al.*, 2018; Veobides-Amador *et al.*, 2018), pepino (Calero-Hurtado *et al.*, 2019) y vid (Jindo *et al.*, 2022).

Si bien se ha demostrado la efectividad de bioestimulantes en la agricultura como cultivos y plantas hortícolas, también han demostrado tener efectos benéficos en el tratamiento de especies forestales como lo demostraron Santacruz-García *et al.* (2022), al incrementar la tolerancia al estrés abiótico en plántulas de *Prosopis alba*, una especie forestal nativa de Argentina.

Es importante mencionar que así como muchos microorganismos actúan como agentes bioestimulantes o bioefectores como lo denominaron Van Oosten *et al.* (2017), también manifestaron buenos y hasta mejores resultados en plantas al haber interactuado como

consorcio de microorganismos, que como microorganismo individual (Singh y Vaishnav, 2021). Un claro ejemplo de ello es la interacción tripartita entre el hongo micorrízico arbuscular (HMA), planta y rizobacteria. De hecho, un estudio reciente demostró que la interacción de HMA, y una rizobacteria del género *Bacillus spp.* evidenció un mayor crecimiento y vigorosidad de la planta al estar actuando de manera sinérgica. El estudio reveló que se debía a una mejor solubilización y asimilación de nutrientes del suelo. Además de ello, se obtuvo plantas más tolerantes a situaciones de estrés como salinidad, toxicidad por metales pesados y sequía (Nanjundappa *et al.*, 2019).

## **2.2 Agentes de Control Biológico**

Se define a un agente de control biológico (ACB) como cualquier organismo vivo que, mediante un manejo no químico o sintético, reduce la actividad o supervivencia de un fitopatógeno, y esto se refleja como una reducción en la incidencia de la enfermedad causado por el patógeno en la planta (Pirttilä *et al.*, 2021; Ram *et al.*, 2018). Estos microorganismos además de ser benéficos, promueven una agricultura más sustentable. Inclusive, su uso se encuentra dentro del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) como medida sustentable para mitigar los efectos negativos en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

Algunos agentes de control biológico poseen genes o liberan ciertos productos o metabolitos que tienen la capacidad de reducir los efectos negativos de patógenos en plantas a través de diferentes mecanismos antagónicos (Valenzuela Ruiz *et al.*, 2020), pero también pueden estimular la resistencia natural de la planta (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006). Cabe mencionar que, estos microorganismos son generalmente de vida libre, activos en raíces o ambientes foliares Gómez Alvarez (2018).

Un claro ejemplo de agentes de control biológico son los hongos endófitos y es que ha sido tema de investigación en las últimas décadas por contribuir en la capacidad de la planta para adaptarse a diversas condiciones de estrés biótico y abiótico. Asimismo, estos microorganismos tienen la capacidad de establecer relaciones simbióticas específicas con su hospedero que también influye mucho para mantener esta relación en equilibrio y no ser detectado por la planta como potencial patógeno (De Silva *et al.*, 2019). Los hongos endófitos son, especialmente, conocidos por conferir resistencia a su hospedero ante el ataque de diversos patógenos, enfermedades y estreses abióticos mediante la segregación de metabolitos secundarios de carácter antifúngico o antibacteriano. No obstante, estos podrían

también influir en las comunidades de plantas. Cabe mencionar que, estos organismos tienen la competencia de ser ubicuos y colonizar los tejidos vegetales, ya sean aéreos o subterráneos (Gautam y Avasthi, 2019).

Especies del hongo *Trichoderma* han sido y siguen siendo los hongos endófitos más utilizados al ser altamente efectivos para controlar una amplia gama de hongos patógenos del suelo, así como hongos, bacterias y virus de la mayoría de plantas económicamente importantes (Ghazanfar *et al.*, 2018). Las tres especies más utilizadas como agentes de biocontrol en la agricultura son *T. virens*, *T. reesei* y *T. atroviride* (Poveda, 2021). Además de ser un excelente agente de biocontrol también promueve el crecimiento de la planta, el desarrollo de la raíz y estimula los mecanismos de defensa vegetal, es decir, actúa a su vez como un bioestimulante. De la misma forma, especies del género *Pseudomonas* spp. como es el caso de *P. fluorescent* que además de estimular el crecimiento vegetal incrementando la disponibilidad de nutrientes mediante la segregación de sideróforos, entre otros beneficios, también posee la capacidad para producir antibióticos como el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (Höfte y Altier, 2010). Por otro lado, el género *Bacillus* también ha sido ampliamente estudiado y hasta la fecha utilizado como agente de biocontrol al producir una variedad de compuestos antimicrobianos con muchos usos en la industria biotecnológica como son los antibióticos, hidrolasas y sideróforos. Asimismo, este género podría mejorar la respuesta de defensa vegetal ante el ataque de patógenos al inducir la resistencia sistémica inducida. Entre las formulaciones comerciales a base de *Bacillus*, se encuentran *B. subtilis*, *B. amyloquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. cereus*, entre otros (Borriss, 2011; Miljaković *et al.*, 2020).

Existen además otros microorganismos controladores que son actualmente utilizados como son las especies de los géneros *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Pantoea* (Ghazanfar *et al.*, 2018; Panpatte *et al.*, 2016).

### **2.3 Mecanismos de Acción de Agentes de Control Biológico**

Los agentes de control biológico son capaces de suprimir o reducir la actividad de poblaciones de patógenos mediante diversos mecanismos de acción. De hecho, muchas cepas clasificadas como ACB interactúan antagónicamente mediante más de un mecanismo de acción, esto podría deberse a su capacidad para desarrollar una variedad de combinaciones al interactuar con otro microorganismo (Köhl *et al.*, 2019); pero también a su capacidad de respuesta a condiciones del medio ambiente (Bardin y Pugliese, 2020). La

interacción o el modo de acción frente a un fitopatógeno, puede ser clasificado de dos formas: directa e indirecta. El antagonismo directo resulta de un contacto físico, mientras que el indirecto, involucra el desarrollo de una respuesta sistémica mediada por el hospedero (Junaid *et al.*, 2013; Vos *et al.*, 2015).

Los mecanismos o interacciones directas se clasifican en: parasitismo y antibiosis. El primero, involucra que un organismo obtiene sus nutrientes a expensas de otro. Si el hospedero fuese también un parásito como un patógeno se trataría de un caso de hiperparasitismo, esto ocurre generalmente en hongos. El principal mecanismo del parasitismo es mediante la excreción de enzimas degradadoras de pared celular que involucran quitinasas, glucanasas y proteasas; así como la producción de metabolitos secundarios en algunos casos (Köhl *et al.*, 2019). Por otro lado, el mecanismo de antibiosis es quizá la interacción mejor estudiada respecto a mecanismos de agentes de control biológico. Este modo de acción involucra la producción o liberación de una serie de compuestos tóxicos para el patógeno objetivo. Estos metabolitos podrían estar mediados por factores ambientales como temperatura, pH, etc. Además, en algunos casos son producidas en concentraciones bajas, suficientes para impedir la germinación, el crecimiento o esporulación de patógenos (Bardin y Pugliese, 2020).

Entre los mecanismos indirectos se encuentran la competencia por nutrientes y espacio y la inducción a la resistencia en el hospedero ante el ataque de patógenos. El primero, implica que el ACB limita o priva de nutrientes en el medio afectando el crecimiento y propagación del patógeno. Esto quiere decir que el microorganismo compite eficientemente por la disponibilidad de nutrientes, pero también por el espacio que ocupa (Bardin y Pugliese, 2020; Junaid *et al.*, 2013). Asimismo, algo que limita enormemente la disponibilidad de hierro (Fe) es la secreción de sideróforos, que son moléculas de bajo peso molecular muy afines al ión Fe convirtiendo de su forma insoluble  $Fe^{+3}$  a su forma asimilable como  $Fe^{+2}$ . Aquellos microorganismos con la capacidad de producir mayores cantidades de sideróforos son potenciales candidatos como ACB, sobre todo, para patógenos (Köhl *et al.*, 2019).

Adicionalmente, el segundo mecanismo indirecto es la inducción a la resistencia que puede ser mediante dos formas: la resistencia sistémica inducida (IRS) y resistencia sistémica adquirida (SAR). La primera, en respuesta a la colonización de raíces por parte de hongos, bacterias o microorganismos benéficos como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y es mediada principalmente por el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET).

Mientras que, SAR es activada ante el ataque de algún patógeno y a su vez es mediado por la acumulación de ácido salicílico (AS) (Narayanasamy, 2013; Vos *et al.*, 2015). La respuesta de SAR es desencadenada ante el reconocimiento de algunos estímulos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como pueden ser lipopolisacáridos, lipopéptidos, compuestos orgánicos volátiles o enzimas que desencadenan una serie de eventos en cascada que puede iniciar desde la reacción hipersensible unicelular, la muerte celular programada hasta lesiones necróticas (Compant *et al.*, 2005; Junaid *et al.*, 2013; Santoyo *et al.*, 2012). Además, los mecanismos de inducción a la defensa vegetal involucran también la producción de especies reactivas de oxígeno, la síntesis de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas, compuestos fenólicos, acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis y la formación de barrera físicas como el engrosamiento de la pared celular y la cutícula (Bardin y Pugliese, 2020; Köhl *et al.*, 2019).

#### **2.4 Microbiota de la Piel de Anfibios**

El término microbiota acuña a comunidades microbianas características ocupando un determinado hábitat con propiedades fisicoquímicas particulares. Esto no solo involucra a los microorganismos, sino que también abarca su actividad, es decir, su nicho ecológico. Esta microbiota forma una serie de redes dinámicas e interactivas, ya que puede cambiar respecto al tiempo (Berg *et al.*, 2020).

La microbiota o microbioma que habita la piel de los anfibios ha sido crucial para la supervivencia de sus hospederos, principalmente, por actuar como un excelente mecanismo de defensa ante el ataque del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), un potente patógeno que infecta la piel de anfibios y ha sido uno de los causantes del grave declive poblacional (Jani y Briggs, 2018). Las comunidades microbianas en la piel de anfibios pueden verse influenciadas por diversos factores, ya sea, el estadio actual en su ciclo de vida, ubicación geográfica, temporada, temperatura, humedad, contaminantes del medio e inclusive, si se trata de anfibios salvajes o en cautiverio (Ross *et al.*, 2019). Un estudio agregó también el factor de la influencia intrínseca del hospedero como factor de variabilidad en la genética poblacional de la microbiota de la piel de anfibio; sin embargo, los autores determinaron que se necesita más información para determinar si los rasgos específicos del linaje influyen considerablemente en la microbiota (Assis *et al.*, 2017). Cabe mencionar que, otro factor importante que determina la composición de las comunidades microbianas en la

microbiota de la piel de anfibios es la composición de la mucosa que incluye péptidos antimicrobianos, mucopolisacáridos, glicoproteínas y toxinas (Bletz *et al.*, 2017).

Diversos estudios han caracterizado la microbiota de diversas ranas encontrándose microorganismos, principalmente de los filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, siendo la primera la más abundante. Dentro de los filos mencionados se incluye a los órdenes Burkholderiales, Actinomycetales, Pseudomonadales, Enterobacteriales y Sphingomonadales. Asimismo, las principales familias reportadas son Xanthomonadaceae, Flavobacteriaceae y Bacillaceae por su capacidad de segregar fuertes sustancias antimicrobianas contra diversos patógenos (Assis *et al.*, 2017; Belden *et al.*, 2015; Bletz *et al.*, 2017; Christian *et al.*, 2018; Rebollar *et al.*, 2019), por lo que serían de gran relevancia en la industria biotecnológica. Hay que resaltar que además de que muchas especies microbianas presentan algún grado de tolerancia o inhibición contra el hongo *Bd*, algunas también exhiben un grado de inhibición contra bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* en cultivos *in vitro* (Assis *et al.*, 2017). Otro estudio donde se aisló la microbiota de 3 ranas con capacidad inhibitoria contra el hongo fue publicado por Rebollar *et al.* (2019). Las especies de estudio fueron ranas arbóreas (*Agalychnis callidryas* y *Dendropsophus ebraccatus*) y terrestre (*Craugastor fitzingeri*). Estas especies fueron colectadas de la comunidad de Gamboa, perteneciente al Canal de Panamá, ubicada en medio de un bosque lluvioso. Si bien el estudio pudo aislar e identificar diversas comunidades bacterianas con capacidad antifúngica contra el hongo *Bd*, la estructura de cómo estas comunidades se encuentran conformadas fue muy diferente entre ranas arbóreas y terrestres. De hecho, el estudio concluyó que especies arbóreas presentaron una mayor abundancia significativa de bacterias anti-*Bd* en comparación con aquella especie terrestre.

## **2.5 Efecto de la microbiota de la piel de anfibios en plantas**

Anteriormente, se reportó la capacidad antagónica de microorganismos aislados de la microbiota de la piel de anfibios contra patógenos. Recientemente, se exploró la idea que algunos aislados bacterianos podrían ser potenciales agentes de control biológico de algunos importantes fitopatógenos en la agricultura. En ese sentido, el primer reporte fue hecho por Susilawati *et al.* (2021) al exponer el efecto de tres bacterias, aisladas de la piel de tres ranas, en reducir el número de lesiones por antracnosis en hojas de pepino en condiciones de

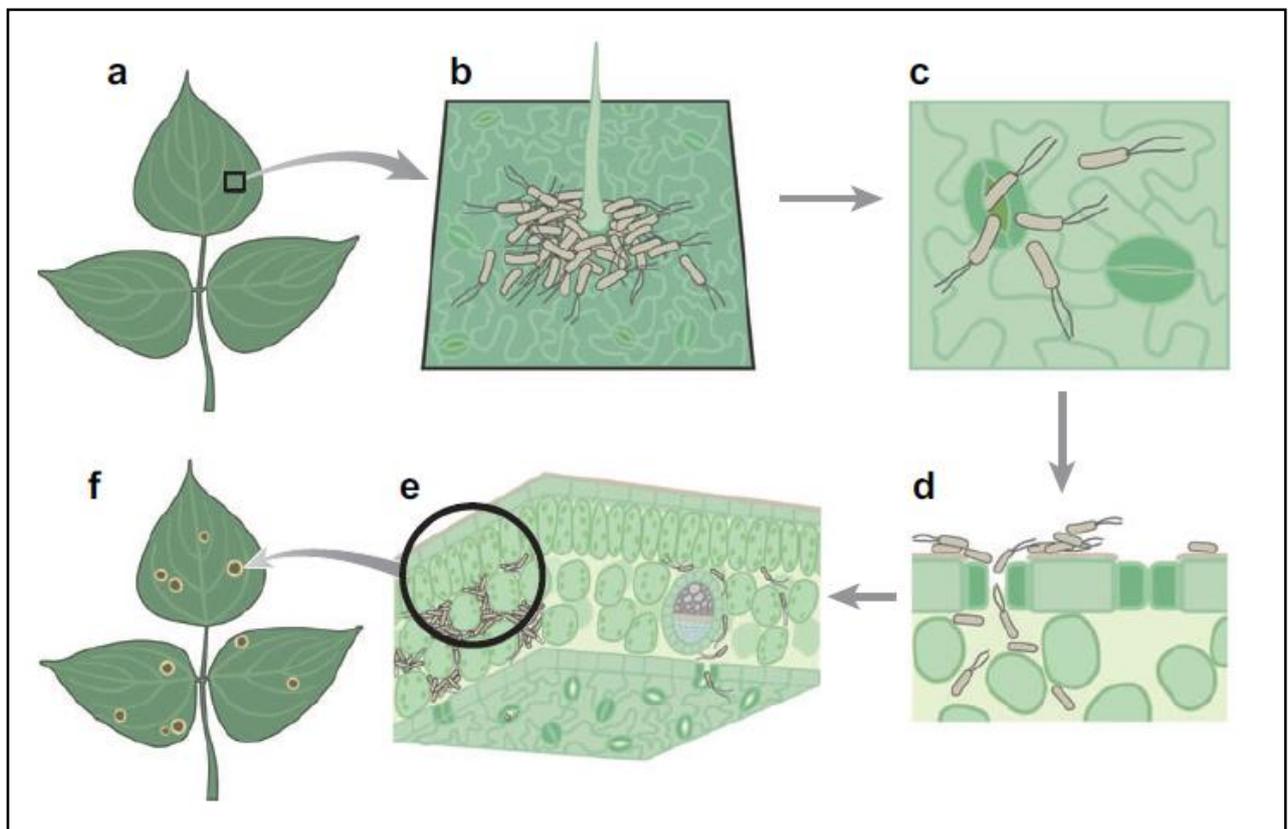
invernadero. Esta enfermedad es causada por el hongo patógeno *Colletotrichum orbiculare*. Asimismo, estos autores argumentaron que un posible mecanismo de acción de estos aislados bacterianos fue la producción de sustancias antifúngicas (antibiosis) que redujo el crecimiento del micelio y la germinación de conidias realizado en condiciones *in vitro*. Por otro lado, los estudios filogenéticos revelaron que las bacterias aisladas correspondieron a los géneros: *Paenibacillus* spp., *Raoultella* spp. y *Citrobacter* spp. Además, otro estudio realizado por Cevallos *et al.* (2022) evidenció la acción de especies del género *Acinetobacter*, aislados de dos ranas, disminuyendo el crecimiento del fitopatógeno *Botrytis cinerea*; sin embargo, el mecanismo de acción antifúngico estaría modulado por un componente genético.

## **2.6 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000**

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* es uno de los patógenos de plantas más comunes que infectan la filósfera (Xin *et al.*, 2018). Se encuentra clasificado dentro del filo Proteobacteria, subdivisión gamma, familia *Pseudomonadaceae*, género *Pseudomonas*, especie *Pseudomonas syringae* y patovariedad *tomato*. Su infección puede ser favorecida por la alta humedad en la hoja, temperaturas bajas e incluso prácticas agronómicas, que permiten a la bacteria diseminarse más entre las plantas hospederas (Preston, 2000). *P. syringae* posee dos fases de crecimiento para que su infección sea exitosa: la fase epífita, donde la bacteria vive en la superficie de los tejidos vegetales de las partes aéreas como hojas, flores, tallos o frutos y la fase endófito, donde la bacteria entra al tejido vegetal y coloniza el espacio intercelular apoplástico (Xin *et al.*, 2018; Xin y He, 2013) (Figura 1).

A *Pseudomonas syringae* pv *tomato* se le atribuye ser el agente causal de la mota bacteriana del tomate (Preston, 2000), ingresando típicamente mediante los estomas de las hojas o heridas, multiplicándose en el espacio intercelular (apoplasto) y produciendo eventualmente lesiones necróticas, a menudo rodeadas de halos cloróticos (Preston, 2000; Xin *et al.*, 2018). No obstante, su importancia radica en que ha servido como modelo para comprender el proceso de patogénesis bacteriana, los mecanismos moleculares que éste involucra durante las interacciones planta-patógeno, la susceptibilidad y señalización hormonal en el hospedero. Además de ello, es un patógeno de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Buell *et al.*, 2003; Preston, 2000; Xin *et al.*, 2018; Xin y He, 2013). Según Melotto *et al.* (2008) *P. syringae* pv. *tomato* es considerado un patógeno hemibiotrófico por su modo de patogénesis al iniciar como un patógeno biotrófico obteniendo sus nutrientes de células

vivas, colonizando la planta huésped de manera sigilosa y suprimiendo los mecanismos de defensa vegetal. Después, actúa como patógeno necrotrófico al causar muerte celular para poder crecer y alimentarse de este, permitiendo la colonización del patógeno (Vleeshouwers y Oliver, 2014). Melotto *et al.* (2008) propusieron que este patógeno pudo haber desarrollado un mecanismo de virulencia que contrarresta las defensas inmunes vegetales inducido por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), ejemplos de esto son la flagelina o los lipopolisacáridos (LPS). Uno de estos mecanismos se manifestó mediante la reapertura de los estomas de los tejidos vegetales luego de las 3 horas de exposición en plantas de *A. thaliana* según los experimentos realizados por Melotto *et al.* (2008) con el patógeno promoviendo el ingreso de factores de virulencia como el efector o fitotoxina denominado coronatina.



**Figura 1. Ciclo de infección de *P. syringae*.** (a) fase epífita, donde las células bacterianas se encuentran en la superficie y (b) fase endófitas, colonización de la bacteria en el apoplasto  
**FUENTE:** Modificado de Melotto *et al.* (2008)

## 2.7 Mecanismo de defensa vegetal

La respuesta de defensa vegetal ocurre luego del ingreso del patógeno a través de una herida, los estomas o lenticelas (Zaynab *et al.*, 2019). Jones y Dangl (2006) plantearon un modelo “zigzag” para ilustrar la evolución de la respuesta del sistema inmune vegetal. Estos mismos autores propusieron que el sistema inmune de las plantas actúa de dos maneras: la primera, a través de los receptores transmembranales de reconocimiento de patrones (PRRs) que responden a los PAMPs, como la flagelina en bacterias. La segunda, actúa dentro de la célula a través de las proteínas NB-LRR (del inglés: *nucleotide-binding leucine-rich repeat*), las cuales al reconocer una amplia diversidad de efectores moleculares (factores de virulencia), desencadenan una serie de respuestas de defensa.

En la primera etapa, los PAMPs son reconocidos por los PRRs, resultando en la activación de la inmunidad activada por PAMPs (PTI) pudiendo detener la colonización. En esa misma línea, Díaz Puentes (2009) agregó que durante la detección de los PAMPs ocurre una serie de eventos como: el cambio en el flujo de iones de la membrana celular, aumento en la expresión de genes relacionados con las defensas, la producción de fitoalexinas, e inducción de genes relacionados a la patogenicidad (PR).

En la segunda etapa, aquellos patógenos exitosos que logran superar la PTI, liberan efectores que contribuyen aún más a la virulencia del patógeno. Dichos efectores pueden interferir con la PTI, activándose de esta manera la susceptibilidad activada por efector (ETS). En la tercera etapa, estos “efectores” pueden ser reconocidos por las proteínas NB-LRR (codificados generalmente por los genes R de la planta). Esto involucra el reconocimiento genético del patógeno controlado por los genes de resistencia del hospedante (gen-por-gen), resultando en la activación de la inmunidad activada por efectores (ETI), siendo esta última una respuesta más amplificadora y acelerada que PTI, trayendo como consecuencia una respuesta hipersensible (HR). Doctor Robayo y Cabezas Gutiérrez (2000), sostuvieron que, durante la HR, se sintetizan especies reactivas de oxígeno (ROS) y sustancias tóxicas para los patógenos lo que conlleva al proceso de muerte celular programada en la zona afectada para limitar la propagación del patógeno (Jones y Dangl, 2006). Como última etapa, estos últimos autores sugirieron que, como producto de la selección natural, los patógenos seguirán evadiendo ETI, ya sea mediante la diversificación de genes efectores o adicionando efectores que supriman ETI. Si el efector es reconocido por las proteínas NB-LRR, ocurre nuevamente el sistema de resistencia gen-por-gen para luego, activar ETI permitiendo que

la planta llegue al umbral de HR. Como consecuencia, el desarrollo de estos eventos tiene lugar la evolución continua de ambos organismos.

Kombrink y Somssich (1995) propusieron tres tipos de respuesta vegetal ante el ataque de patógenos: respuesta inmediata, mecanismo de defensa localizado y defensa sistemática inducida. La respuesta inmediata involucra un cambio en el tránsito de iones  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{+2}$  a través de la membrana plasmática, así como la fosforilación y desfosforilación de proteínas. Además, estos mismos autores incluyeron la formación de especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y anión superóxido ( $O_2^-$ ) como primera línea de defensa vegetal al ser altamente tóxico contra patógenos o también demorar su ingreso mediante el endurecimiento de la pared celular. Este conjunto de respuestas suele ocurrir en minutos e inclusive, en segundos ante la estimulación de algún elicitador. El mecanismo de defensa localizado involucra la activación de rutas metabólicas para la producción de diversas enzimas, proteínas y metabolitos secundarios. Por lo general, ocurre la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), que son sintetizadas por la planta ante la infección de hongos, bacterias o virus. Las enzimas clave que se activan en este proceso en su mayoría pertenecen al metabolismo de los fenilpropanoides, estas vías de síntesis abarcan una variedad de compuestos como pigmentos, antibióticos (fitoalexinas), componentes estructurales como lignina, suberina y otros constituyentes de la pared celular (Zaynab *et al.*, 2019). Por último, la defensa sistemática inducida estaría ligada a la activación de las IRS y RSA, producto de la transducción de señales iniciadas localmente en el sitio de inicio donde ocurrió el ataque del patógeno.

## **2.8 Técnicas moleculares utilizadas para evaluar la expresión de genes en tejidos vegetales**

### **2.8.1. PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés, es una técnica molecular, muy utilizada hasta la fecha, que permite la amplificación de una secuencia específica de ADN. Este método consta de tres pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión. La primera etapa consiste en la separación o desnaturalización de las hebras complementarias de ADN, esto se logra aumentando la temperatura y generalmente, dura entre 30 y 90 segundos. La segunda etapa, involucra el alineamiento de los oligonucleótidos y las cadenas simples de ADN. Por último, la etapa de extensión consiste en que la enzima (ADN polimerasa) va agregando más oligonucleótidos, lo que va alargando la cadena

complementaria para las dos cadenas simples de ADN. Esto ocurre por cada ciclo y crece de manera exponencial generando millones de copias del fragmento seleccionado (Pedrosa Amado, 1999).

### 2.8.2. Síntesis de ADNc

El término ADNc hace referencia al ADN copia o complementario. Este ADN sintético fue transcrito a partir de un ARNm específico mediante la enzima transcriptasa inversa o transcriptasa reversa (RT). Este método consta de varios procesos. El primero, consiste en la unión de una secuencia corta de timinas, llamada oligo-dT, al extremo 3' del ARNm que consta de una cola de adeninas (poliA) a una temperatura de 42°C. Luego, se da la reacción de la enzima RT que va generando la cadena de ADN complementaria (ADNc) y posteriormente se sube la temperatura a un rango de 40-65°C para que la enzima RT comience a transcribir el ARNm y genere la cadena ADNc. Posteriormente, se eleva la temperatura (alrededor de 85°C) para inactivar a la enzima. Finalmente, se obtiene el ADNc que deberá cuantificado en un espectrofotómetro (Meis y Khanna, 2009).

### 2.8.3. qRT-PCR

La PCR cuantitativa en tiempo real, es una variante de la PCR de punto final o convencional. Su mecanismo de acción radica en el uso de un indicador fluorescentes que sirven como reporteros de los productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción de PCR. Es por ello, que recibió el nombre de “tiempo real” al estar monitoreando los productos de la PCR a medida que se van generando. Durante la amplificación, la velocidad con la que la señal fluorescente alcanza un nivel de umbral se correlaciona con la cantidad de secuencias objetivo original, permitiendo así su cuantificación (Valasek y Repa, 2005). Cabe mencionar que esta técnica utiliza ADN copia (ADNc) formado a partir de la purificación del ARN. (Bustin *et al.*, 2005).

### 2.8.4. Genes housekeeping

Estos genes también denominados controladores endógenos, permanecen constantes entre las células de diferentes tejidos y en diferentes condiciones experimentales, es decir, se expresan de forma constitutiva y son mínimamente regulados. Hasta la fecha, los genes *housekeeping* siguen siendo utilizados como referencias internas de ARN para el análisis cuantitativo en ensayos de RT-PCR. Entre los genes implicados en procesos celulares básicos se encuentran los genes ACTIN y CF150. El primero, se expresa aguas arriba ante cualquier proceso que resulte en un cambio de estado o actividad de una célula (en términos

de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión génica, etc.) como resultado de un estímulo de glucosa. El segundo, se expresa como una proteína asociada a la placa celular que está relacionada en secuencia con las proteínas involucradas en el tráfico de membrana (Bustin y Nolan, 2004; Jain *et al.*, 2006).

### III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se realizó en el Programa de Genómica Funcional de Eucariontes del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en la ciudad de Cuernavaca, estado de Morelos, México.

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Material biológico de estudio

El cepario aislado de la microbiota de la piel de anfibios pertenece a un estudio previo realizado por Rebollar *et al.* (2019) en la comunidad de Gamboa, Panamá, donde se aislaron 126 bacterias cultivables de la especie *Craugastor fitzingeri*, clase anfibia, orden anura, familia *Craugastoridae*. Se eligieron 3 de estas cepas para una prueba de bioestimulación preliminar, siendo la bacteria C23F la que mejor efecto mostró y la que se usó en el presente trabajo de investigación. Este mismo estudio determinó que la cepa C23F es una especie y género nueva, siendo la especie *Scandinavium goeteborgense* la más cercana a ella.

##### 3.1.2 Medios de cultivo

- Luria Bertani (LB)
- Murashige-Skoog 0.2X
- Triptona 1 por ciento

Ver Anexo 1

##### 3.1.3 Soluciones y reactivos

- Alcohol etílico al 100 por ciento
- Alcohol etílico al 70 por ciento
- cDNA Synthesis Kit® (Thermo Fisher Scientific)
- Cloroformo absoluto
- Cloroformo al 50 por ciento

- Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 10mM
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)
- Reactivo de TRIzol (Invitrogen™)

#### 3.1.4 Reactivos de biología molecular

- Agarosa al 1 por ciento
- Agua DEPC
- Bromuro de etidio
- Buffer de carga
- Buffer ADNsa
- Cloruro de litio 2M
- Desoxiribonucleótidos (dNTPs)
- EDTA
- Enzima ADNsa
- Enzima Retrotranscriptasa (RT)
- Inhibidor Rivoblock
- Marcador de 1 Kb
- Oligo dT
- PCR Master Mix
- Primers
- Taq ADN polimerasa

#### 3.1.5 Sustrato

- Musgo + vermiculita (3:1)

#### 3.1.6 Equipos de laboratorio

- Agitador magnético (Corning)
- Autoclave (Tomy ES-315)
- Balanza analítica (Sartorius)

- Charolas de germinación
- Discos de papel filtro
- Horno micro-ondas (SHARP Carousel)
- Matraces de 125 mL
- Micropipetas
- Microscopio óptico (ZEISS Axioscope 800 266)
- NanoPhotometer (IMPLEN NP80)
- Parafilm
- Pinzas de metal
- Placas Petri de plástico (60 mm)
- Placas Petri de vidrio
- Potenciómetro (PC45)
- Probetas
- Puntas para micropipetas
- Refrigeradora (Samsung)
- Regla de 30 centímetros
- REVCO (Thermo Scientific)
- Termociclador (MultiGene OptiMax)
- Tubos Eppendorf
- Vórtex (Fisher Genie 2)

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 Evaluación de la actividad fitoestimulante en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* con las cepas antagónicas

#### 3.2.1.1 Esterilización de semillas

Las semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 fueron desinfectadas mediante 3 lavados en alcohol al 70 por ciento, cada uno durante 30 segundos. Posteriormente, se realizó otros 3 lavados con alcohol al 100 por ciento, con una duración de 30 segundos por lavado (Modificado de Cohen *et al.* (2015).

#### 3.2.1.2 Interacción *in vitro* bacteria-planta

En placas con medio MS 0.2X (Murashige y Skoog), se sembraron semillas de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 durante 7 días a 24°C. Posteriormente, en placas con medio MS 0.2X se transfirieron 10 plántulas en un extremo de la placa, y en el extremo contrario se colocaron 10 µL del inóculo bacteriano que se distribuyó de manera lineal, sin chocar con el borde de la placa Petri (Modificado de López-Bucio *et al.* (2007). Después, fueron incubadas durante 7 días a 24°C con un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad y se midió la longitud de la raíz primaria con frecuencia interdiaria, durante 11 días. Finalmente, se guardó 5 plántulas por tratamiento en tubos Falcon conteniendo glicerol al 50 por ciento, para luego evaluarlas en el microscopio. Mientras que, otras cinco plantas fueron guardadas a -70°C para análisis molecular. Ver Anexo 2.

#### 3.2.1.3 Cuantificación de pelos radiculares

Las muestras previamente preservadas en glicerol al 50 por ciento, fueron montadas para ser vistas en el microscopio. La zona radicular fue dividida según lo establecido por Napsucialy-Mendivil y Dubrovsky (2018). Teniendo como sección de estudio, 2 cm desde la zona apical hasta la zona más distal del LRP (primordio de raíz lateral).

### 3.2.2 Pruebas de antagonismo microbiano

#### 3.2.2.1 Cultivo bacteriano

Para la pre-selección de la cepa bacteriana, se colocó el pre-inóculo de la bacteria en 6 mL de medio líquido Triptona 1% e incubados a 29°C con agitación constante. Una vez crecida la cepa bacteriana, se tomó 3 mL de este pre-inóculo y se centrifugó durante 5 min a 13,000

rpm; posteriormente, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ L de Triptona 1%.

#### 3.2.2.2 Cultivo de *Pseudomonas syringae*

Para el crecimiento de *Pseudomonas syringae* se utilizó el protocolo establecido por Jacob *et al.* (2017), con ayuda de un asa de Kolle se tomó una colonia de un cultivo previamente crecido en medio sólido LB (Luria Bertani) conteniendo rifampicina [50  $\mu$ g/mL]. Esta colonia se sembró en 15 mL de medio líquido LB, incubados a 29°C, hasta obtener una densidad óptica de 0.2 ( $\sim 2 \times 10^8$  bacterias/ mL).

#### 3.2.2.3 Confrontación directa

Se realizaron ensayos de confrontación directa de la cepa bacteriana C23F con el patógeno *P. syringae*. En placas Petri (60 mm) con medio sólido Triptona 1%, se esparció 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana de *P. syringae*. Luego se colocaron discos de papel filtro estériles (5 mm) en el centro de la placa, donde fue inoculado 7  $\mu$ L de la cepa C23F. Como control, se agregó el medio Triptona 1% sin bacterias. Las placas se incubaron por 24 h a 29°C (Modificado de Pérez y Terrón *et al.* (2014)).

#### 3.2.2.4 Evaluación de posibles compuestos liberados que afectan el crecimiento de *P. syringae*

##### 3.2.2.4.1 Técnica de doble capa de agar modificada

Este experimento se puede considerar una variante de la doble capa de agar, donde la siembra de la posible cepa productora C23F, se realizó de manera directa entre las dos capas de agar. En placas Petri de (60 mm), se colocó en el centro un disco de papel filtro estéril y se sembró 7  $\mu$ L de la cepa bacteriana, incubándose por 24 horas a 29°C. Una vez transcurrido el tiempo, se agregó la segunda capa de agar (medio LB) a punto de solidificar, conteniendo a *P. syringae* a una concentración de  $2 \times 10^8$  bacterias/ mL. Las placas se incubaron por 48 horas a 29°C (Modificado de Cesa-Luna *et al.* (2020)).

#### 3.2.3 Efecto protector de la bacteria en plantas de *A. thaliana* ante la infección de *P. syringae*

Para evaluar el efecto antagónico de las cepas de interés en plantas de *A. thaliana* ante la infección de *P. syringae* se siguió el protocolo descrito por Zeier *et al.* (2004). Se hizo crecer esta última en medio LB líquido con rifampicina [50  $\mu$ g/mL] hasta alcanzar una fase logarítmica ( $DO_{600}=0.6-1.0$ ). Luego, se centrifugó durante 10 minutos a 12,500 rpm.

Transcurrido el tiempo, el pellet obtenido fue resuspendido en 100 mL de MgCl<sub>2</sub> [10mM], esto sirvió como inóculo de la cepa fitopatógena. Posteriormente, la infiltración de *P.syringae* se realizó en la parte abaxial de la hoja, cuidando de no dañarla. Se infiltraron 3 hojas por planta, teniendo en cuenta que fueron 35 plantas por tratamiento. Concluida la infiltración, las plantas fueron incubadas a 24°C durante tres días con un fotoperiodo de 0 h de luz/ 24 h de oscuridad, donde se espera observar los síntomas.

### 3.2.3.1 Evaluación de la actividad antagónica durante la interacción tritrófica (*A. thaliana*, *Pseudomonas syringae* y bacteria de interés)

En placas con medio MS 0.2X (Murashige y Skoog), se sembró semillas de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 durante 7 días a 24°C. Posteriormente, las plantas se cultivaron en el invernadero a una temperatura de 22 a 23°C, con una humedad del 60% y un fotoperiodo de 16 h de luz durante aproximadamente 4 semanas. La primera bandeja correspondió al tratamiento control, es decir, se infiltraron las plantas con el medio donde fue resuspendida la cepa fitopatógena, es decir, MgCl<sub>2</sub>. Luego, como segundo tratamiento se inoculó solo con la suspensión bacteriana C23F, previamente crecidas en medio MS 0.2X líquido, a nivel de rizósfera. Como tercer tratamiento, se tuvo otra bandeja de plantas donde se infiltró solo al fitopatógeno. Finalmente, el cuarto tratamiento correspondió a otra bandeja de plantas donde se inoculó a la cepa C23F a nivel rizósfera durante una semana con frecuencia interdiaria. Transcurrida esa semana, se infiltró de manera foliar con el fitopatógeno. Ver Anexo 4.

### 3.2.3.2 Evaluación de infección por efecto de *P. syringae* en plantas de *A. thaliana* por conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en hojas infectadas de *A. thaliana*

Para corroborar que la cepa C23F previene la formación de síntomas severos del fitopatógeno y que también reduce el número de células del mismo en plantas de *A. thaliana*, se realizó el experimento de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. syringae*. La cuantificación de las mismas se realizó siguiendo el *protocolo* establecido previamente por Jacob *et al.* (2017). Este consistió en coleccionar 3 hojas (réplicas técnicas) por planta del tercer y cuarto tratamiento, descritos en el párrafo anterior, que fueron tratados con el fitopatógeno. Estas hojas se colocaron en etanol al 70 por ciento durante un minuto y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Después, con la ayuda de un sacabocado (0.9 cm de diámetro), se hizo una perforación del área de infección. Estos discos se sumergieron en un tubo Eppendorf conteniendo 1mL de MgCl<sub>2</sub> [10mM] y se molieron con ayuda de pistilos de plástico estéril. Posteriormente, de este mismo tubo, se realizaron

diluciones sucesivas hasta  $10^{-6}$ . Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de cada dilución y se sembraron, por triplicado, en placas Petri conteniendo medio LB con rifampicina [50  $\mu\text{g/mL}$ ]. Las placas se incubaron durante 24-36 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  y transcurrido el tiempo, se realizaron los cálculos para obtener el número de unidades formadoras de colonias por área de la hoja (UFC/  $\text{cm}^2$ ) según lo establecieron Muñoz-Rojas *et al.* (2016).

### 3.2.4 Análisis molecular

Para la evaluación de la expresión de los genes involucrados durante la fitoestimulación, es decir, durante la interacción planta-bacteria benéfica. Se utilizaron las plántulas que estuvieron en interacción solamente con la bacteria C23F sin la interacción con el fitopatógeno.

#### 3.2.4.1 Extracción de ARN

El tejido de cinco plantas de *Arabidopsis thaliana* fue colectado 24 horas después del tratamiento, éstas fueron colocadas en nitrógeno líquido y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El ARN total fue aislado usando el método de TRizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La integridad del ARN fue evaluada mediante la observación de bandas una electroforesis en gel de agarosa (1%), la concentración y pureza fueron determinadas por el NanoPhotometer (IMPLEN NP80).

#### 3.2.4.2 Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetizó utilizando el Kit® de síntesis (cDNA RevertAid H Minus First Strand, Thermo Fisher Scientific), siguiendo los protocolos del fabricante.

#### 3.2.4.3 Análisis por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La qRT-PCR se realizó en placas de 96 pocillos en Applied Biosystems StepOne™ y StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific), usando SYBR Green Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific) con 500 ng de ADNc como templado. Se utilizaron tres replicas biológicas, cada una de estas consistió en 5 plántulas por placa (se usó 3 placas con medio MS 0.2X por tratamiento). Asimismo, cada uno con tres réplicas técnicas, para cada uno de los genes analizados. Las condiciones de la qRT-PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de  $95^{\circ}\text{C}$  durante cinco minutos, seguido de otra desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos, el alineamiento a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos y la extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos para un total de 45 ciclos. Los valores de expresión génica se normalizaron utilizando la expresión media de los

genes *ACTIN* y *CF150* descritos anteriormente como genes de referencia estables (Czechowski *et al.*, 2005; Serrano y Guzmán, 2004). La normalización de los genes fue determinada mediante el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  previamente descrito por Schmittgen y Livak (2008).

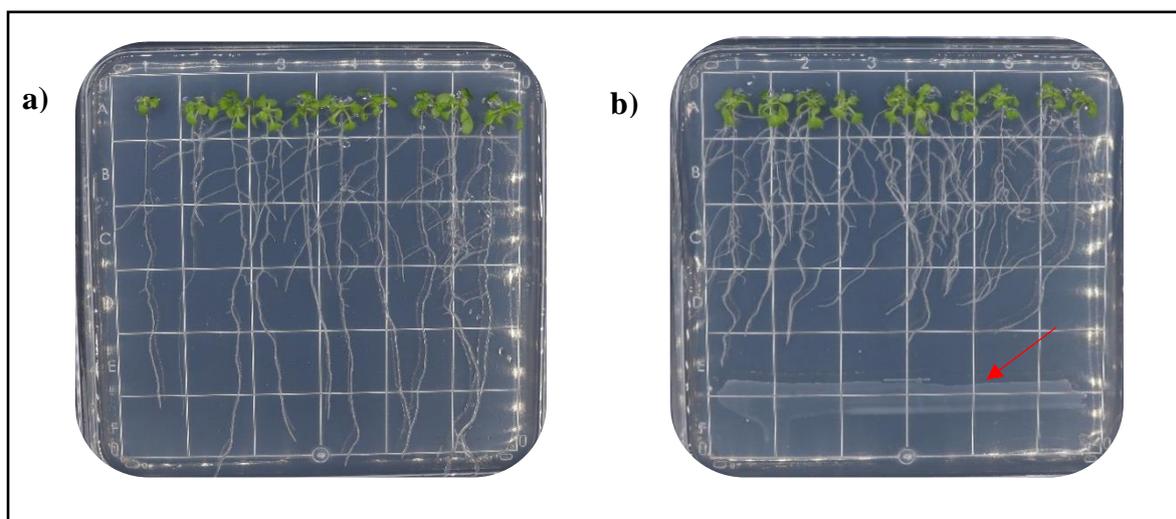
Los genes analizados fueron los siguientes: *PR1* (ácido salicílico), *PR4* (etileno), *PDF1.2* (ácido jasmónico), *AtIAA1* (auxina), *SAUR* (auxina), *ZAT12* (ROS). Ver Anexo 6.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación de la actividad fitoestimulante en la planta modelo *A. thaliana* con la cepa aislada

#### 4.1.1 Interacción *in vitro* bacteria-planta

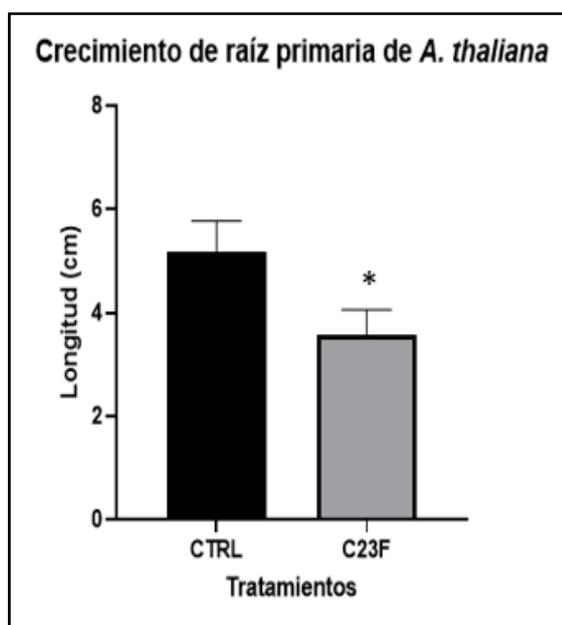
Los resultados obtenidos de la fitoestimulación *in vitro* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* se muestran en la Figura 2 donde se observa una reducción del crecimiento de la raíz primaria al haber sido tratadas con el inóculo bacteriano C23F (b), en comparación con el tratamiento control (a). La prueba t de Student reveló la existencia de una diferencia significativa (Gráfica 2) en la longitud de la raíz principal de las plántulas inoculadas respecto a las que no.



**Figura 2.** Efecto de inóculo bacteriano proveniente de la piel de ranas sobre el crecimiento de plántulas de *A. thaliana* después de 11 días post inoculación a) plántulas de *Arabidopsis* (Col-0) crecidas en medio agar Murashige y Skoog (MS) 0.2X y b) plántulas inoculadas con la bacteria C23F. La flecha roja indica la zona de inoculación.

Si bien la bacteria C23F se identificó como un género y especie nueva, de acuerdo a la secuenciación de su genoma y los análisis de filogenia, se determinó que su posición filogenética es cercana a *Scandinavium goeteborgense* (Rebollar *et al.*, 2019). Esta bacteria

fue recientemente reportada como género y especie nueva dentro de la familia *Enterobacteriaceae* por Marathe *et al.* (2019). Por otro lado, el acortamiento de la raíz primaria en plántulas de *A. thaliana* fue también reportado por López-Bucio *et al.* (2007) al estudiar el efecto de una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) debido principalmente, a la reducción de la proliferación celular a nivel del meristemo apical de la raíz y una disminución en el alargamiento de las células que salen del mismo. Sin embargo, este mismo estudio demostró que a pesar que la actividad meristemática a nivel de raíz primaria se vio disminuida en plántulas inoculadas, esto no ocurrió en los primordios de raíces laterales (LRP) y, por el contrario, presentaron una mayor actividad, lo que explicaría el aumento en la emergencia y crecimiento de raíces laterales. Estudios realizados en cultivos de arroz (Ambreetha *et al.*, 2018) y frijol (López-Bucio *et al.*, 2007) reportaron fenotipos similares a los observados en esta investigación. Dichos estudios explicaron que la principal razón de estos fenotipos se debe a las diversas modulaciones a nivel hormonal relacionados a la morfogénesis de la raíz y, por tanto, las modificaciones en la arquitectura de la misma. Siendo más puntuales, el rol que cumplen las hormonas auxina y etileno, reportadas por estos mismos autores, al mediar diversas señalizaciones en el desarrollo radicular. En ese sentido, surge la posibilidad de que el cambio de expresión hormonal daría lugar a modificaciones en la raíz.



**Figura 3. Gráfica del efecto de la bacteria C23F en el crecimiento de la raíz primaria en plántulas de *A. thaliana*** en plántulas sin inóculo (CTRL) y en plántulas inoculadas (C23F). Los valores mostrados representan la media de 10 plántulas  $\pm$  desviación estándar. La presencia de asteriscos indica que las medias difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ).

Con referencia a lo anterior, Vacheron *et al.* (2013) explicaron que producto de la interacción planta-bacteria benéfica, esta última segrega un conjunto de compuestos o sustancias que promueven el crecimiento vegetal. En este caso, la hormona auxina pudo haber sido liberada por la bacteria C23F, generando una gradiente de auxina en la raíz, lo que pudo generar los cambios en los niveles de esta hormona. Por tanto, explicaría el acortamiento de la raíz primaria y el aumento de la promoción de raíces laterales que se observan en la Figura 2b. Asimismo, el proceso de iniciación y desarrollo de las raíces laterales se encuentra muy ligada a la hormona auxina, al actuar como posible factor de señalización para inducir las células del periciclo ubicadas frente a los polos del xilema. Entre los sucesos claves que desencadena la regulación, transporte, síntesis y acumulación local de la hormona auxina se encuentran: el cebado de las células del periciclo, establecimiento de las células fundadoras y la sucesiva división celular asimétrica que dará lugar a los LRPs que se diferenciarán posteriormente en raíces laterales en la zona de diferenciación. Añadido a ello, la decisión de las células del periciclo en adquirir la identidad de células fundadoras para la formación de los LRPs es llevado a cabo en la zona denominada “meristemo basal”. Estudios previos sugieren que el destino de convertirse en células fundadoras podría estar influenciada por una señalización de auxina y de esta forma, enfatizando el importante rol que cumple esta hormona como modulador de la arquitectura radicular (De Smet, 2012; Dubrovsky *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2009; Verbon y Liberman, 2016).

Además de haber obtenido un acortamiento de la raíz primaria, se obtuvo una desviación o curvatura de la misma. En la Figura 2, las plántulas tratadas con la cepa C23F muestran un comportamiento agravitrópico de la raíz primaria en comparación con el tratamiento control. La desviación del crecimiento de la raíz del vector gravitrópico estaría fuertemente influenciada a un componente fitohormonal como es la auxina. Además de incrementar la respuesta a auxina en los primordios de raíces laterales, como se mencionó anteriormente, también cambia la expresión de transportadores de dicha hormona dentro de la punta de la raíz primaria (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2020; López-Bucio *et al.*, 2007).

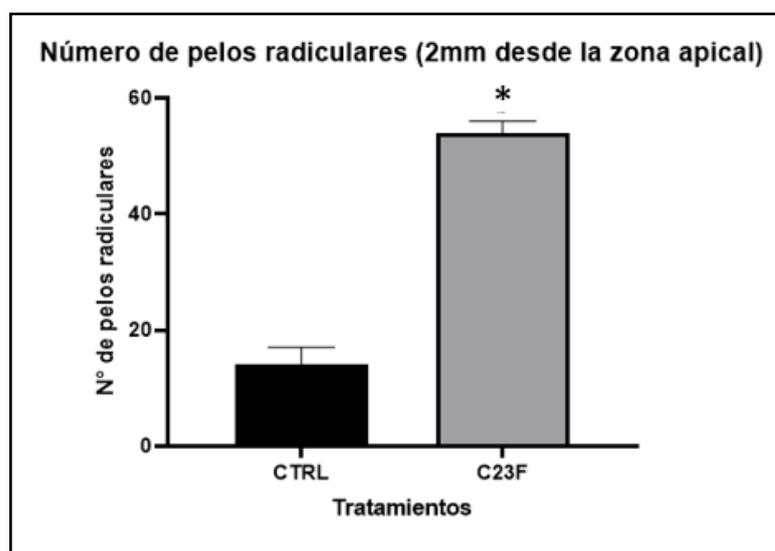
#### 4.1.2 Cuantificación de pelos radiculares



**Figura 4. Efecto de la bacteria C23F en la promoción de pelos radiculares.** Observación en microscopio de raíces de *A. thaliana* tomando como zona de estudio 0.2 cm desde la zona apical a) raíces de plántulas sin inóculo, b) raíces de plántulas inoculadas con C23F. La imagen obtenida en el microscopio fue con un lente objetivo de 10x. Escala de barra: 200  $\mu$ m

Uno de los tantos cambios estructurales que ocurren a nivel radicular en la interacción planta-microorganismo, se encuentra la promoción de los pelos radiculares. Para lograr una correcta evaluación se analizó el número de pelos radiculares de ambos tratamientos tomando como sección de referencia 0.2 cm desde la punta de la raíz de cada tratamiento. En la Figura 4, no solo se observa un mayor número de pelos radiculares en plántulas de *A. thaliana* al haber sido inoculadas con la cepa C23F, sino que fueron también visiblemente más largas al ser comparadas con el tratamiento control. El análisis estadístico reveló una diferencia significativa en el número de pelos radiculares de las plántulas inoculadas comparadas con el tratamiento control (Figura 5). Como se discutió anteriormente, la interacción planta-microorganismo benéfico trae como consecuencia una serie de modificaciones

morfofisiológicas en la planta hospedera, en este caso, los cambios a nivel radicular son atribuidos, principalmente, a la hormona auxina.



**Figura 5.** Gráfica del efecto de la bacteria C23F en la promoción de pelos radiculares en plántulas de *A. thaliana*. Plántulas sin inóculo (CTRL) e inoculadas (C23F). Los valores mostrados representan la media de 10 plántulas  $\pm$  desviación estándar. La presencia de asteriscos indica que las medias difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ).

Estudios previos realizados en plántulas de *A. thaliana* con rizobacterias (López-Bucio *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2014; Sukumar *et al.*, 2013; Zamioudis *et al.*, 2013) y con bacterias endófitas (Mercado-Blanco y Prieto, 2012; Verma *et al.*, 2018) mostraron no solo una sobreproducción de pelos radiculares, sino también un aumento en la longitud de los mismos. Según la literatura, los pelos radiculares son proyecciones especializadas provenientes de las células epidérmicas de la raíz. Además, cumplen un rol fundamental al aumentar el área superficial y volumen de suelo que puede acceder la raíz para facilitar la absorción de agua y nutrientes. Así mismo, podrían incrementar el anclaje de la raíz al suelo para un mejor soporte de la planta (Bibikova y Gilroy, 2002; Mercado-Blanco y Prieto, 2012; Zamioudis *et al.*, 2013). Cabe resaltar que, agregado al proceso de especificación de las células de la epidermis hasta la terminación en el crecimiento del pelo radicular, hay que considerar que también es un proceso plástico en su desarrollo al responder a diversos estímulos ambientales, como pueden ser eventos de estrés hídrico o nutricional (Bibikova y Gilroy, 2002).

En ese sentido, las hormonas auxina y etileno, fitohormonas relacionadas al crecimiento vegetal, podrían actuar como reguladores a diversas fases que dan lugar a un pelo radicular funcional (Zamioudis *et al.*, 2013). Una posible explicación de lo anterior, podría ser lo

planteado por Ribaudó *et al.* (2006), quienes sugirieron que altas concentraciones de IAA (ácido indol-3-acético) podría inducir la expresión de ACS (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa), enzima clave para la síntesis de etileno, incrementando los niveles de esta hormona. Este estudio, que evaluó el efecto de una rizobacteria en plantas de tomate, concluyó que el etileno actuaría como un intermediario en un mecanismo de señalización que conduce a la mejora en la densidad de pelos radiculares. Otra posible explicación la dieron Verbon y Liberman (2016), quienes sugirieron que la densidad de estos pelos puede verse incrementada por la colonización de bacterias debido a un aumento de las células corticales alrededor del eje radical. En otras palabras, mientras mayor sea el número de células corticales, mayor el número de células formadoras de pelos radicales.

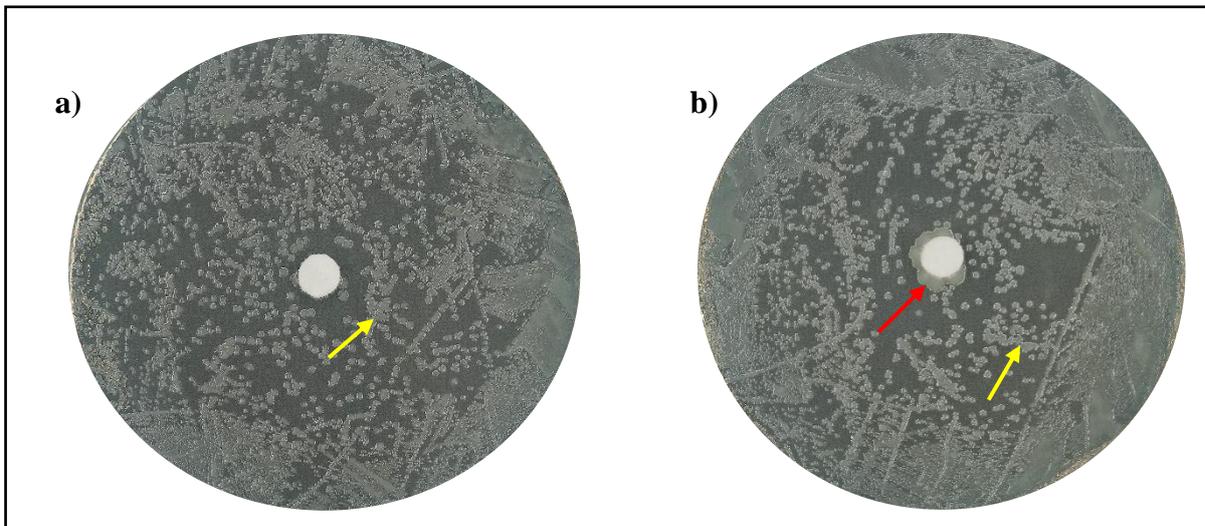
## **4.2 Pruebas de antagonismo microbiano**

### **4.2.1 Confrontación directa**

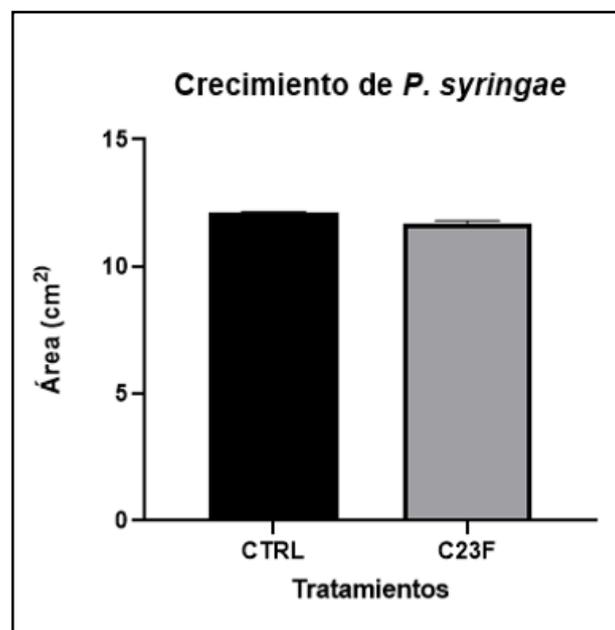
Una de los métodos para evaluar el antagonismo microbiano es la prueba de confrontación directa o inhibición simultánea, donde ambas especies bacterianas co-interaccionan una con otra en el momento del ensayo. Después de la incubación de ambas bacterias, la presencia de halos de inhibición alrededor de la cepa de interés inoculada en el centro es considerada indicativo de actividad antagónica (Cesa-Luna *et al.*, 2020; Molina-Romero *et al.*, 2017; Pérez y Terrón *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos al confrontar directamente a *P. syringae* y la cepa de interés C23F, no mostraron presencia de halos de inhibición traslúcidos como se esperaba en un inicio. Como se observa en la Figura 6b alrededor del disco de papel filtro, se observó el crecimiento de la cepa C23F con una coloración blanquesina, señalada en la figura con una flecha roja. Mientras que en el resto de la placa se pudo observar el crecimiento del fitopatógeno. Aunque visiblemente se pudo observar una disminución de colonias de *P. syringae* alrededor del disco conteniendo a la cepa C23F, la prueba t de Student determinó que no existió diferencia significativa al evaluar del área de crecimiento del fitopatógeno en ambos tratamientos (Figura 7).

El crecimiento de ambas cepas, obtenidas de la prueba de inhibición simultánea, podría sugerir que la cepa de interés C23F no es antagónica al fitopatógeno *P. syringae*. Por el contrario, la interacción de ambas cepas podría ser de tipo neutralista o sinérgica, ya que ambas cepas son capaces de crecer en el mismo medio. El término neutralismo fue definido por James *et al.* (1995) como aquella interacción donde ninguna de las poblaciones es afectada por la presencia de la otra. Mientras que en esta misma revisión se definió

sinergismo como la interacción que resulta en un incremento de producción o consumo de un producto en específico.



**Figura 6. Crecimiento de *P. syringae* en presencia del inóculo bacteriano C23F.** En placas con medio Triptona 1%, se sembró únicamente al fitopatógeno (a) y en interacción con la cepa de interés C23F en el centro (b). La flecha de color amarillo indica el crecimiento del fitopatógeno, mientras que la flecha de color rojo indica el crecimiento de la bacteria C23F.



**Figura 7. Gráfica del crecimiento de *P. syringae* en presencia del inóculo bacteriano C23F.** Placas donde solo creció el fitopatógeno (CTRL) y en presencia de la cepa de interés (C23F). Los valores mostrados representan la media de 3 placas  $\pm$  desviación estándar. La presencia de asteriscos indica que las medias difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ).

Si bien, estudios acerca del genoma de *P. syringae* pv *tomato* DC3000 revelaron genes que codificarían para factores de virulencia, toxinas y proteínas efectoras con sistema de secreción tipo III que facilita su patogénesis (Buell *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2009; Xin y He,

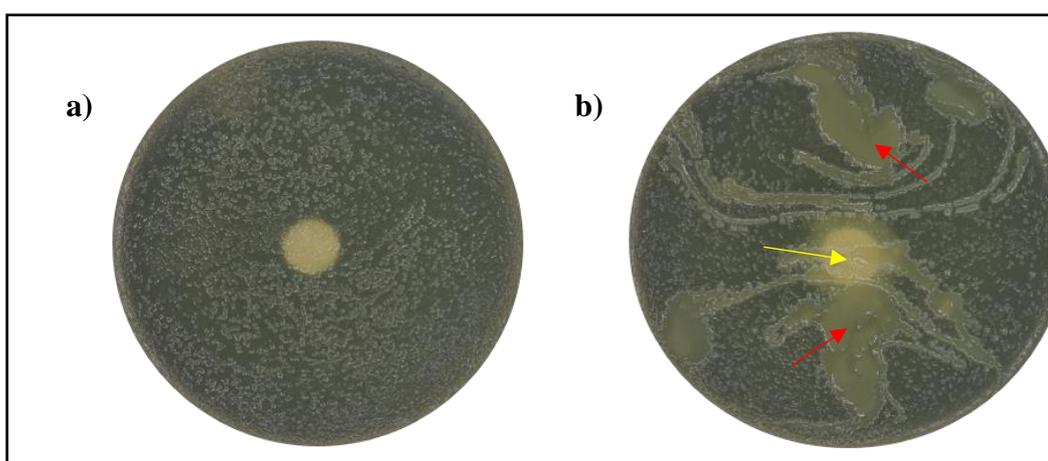
2013), son características propias para evadir el sistema de defensa vegetal y no de un hospedero bacteriano. Por lo cual, podría explicar por qué su potencial patogénico no impidió el crecimiento de la bacteria C23F.

#### 4.2.2 Evaluación de posibles compuestos liberados que afectan el crecimiento de *P. syringae*

##### 4.2.2.1 Prueba de doble capa de agar modificada

Si bien esta prueba es ampliamente utilizada para determinar la liberación de algún compuesto por parte de bacterias productoras, uno de los inconvenientes de su uso es no poder observar claramente las zonas de inhibición. La cepa de interés C23F, al pertenecer a la familia *Enterobacteriaceae*, podría tener la capacidad de segregar compuestos antimicrobianos contra el fitopatógeno *P. syringae* (Moxley, 2022). Por ello, se decidió evaluar la hipótesis de la posible cepa productora tenga que estar presente (viva) para que se encuentre continuamente segregando los compuestos que en cantidades suficientes podría inhibir al fitopatógeno. Por ello, basándonos en el experimento de doble capa de agar, se decidió no retirar a la cepa de interés, para comprobar esta hipótesis.

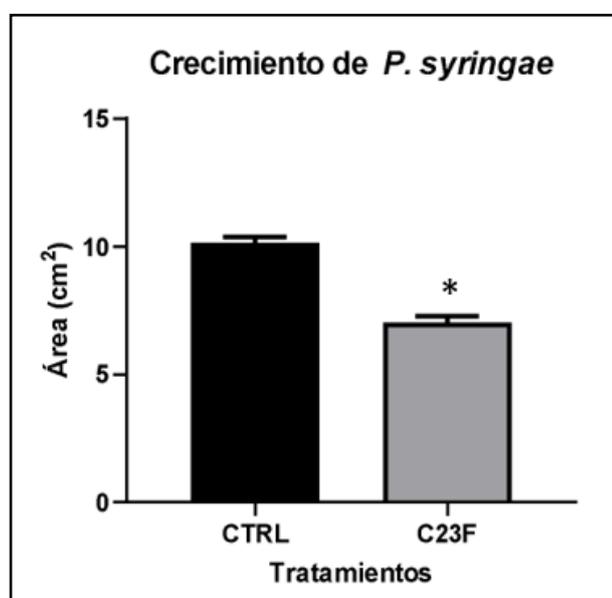
Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8, donde el tratamiento control (a) corresponde solamente al crecimiento de *P. syringae*. Sin embargo, el tratamiento con la cepa de interés (b) crecida previamente en la primera capa de agar se observó áreas donde no creció el fitopatógeno, señaladas en la figura con flechas de color rojo. Se midió el área de crecimiento del fitopatógeno en ambos tratamientos haciendo uso del programa ImageJ.



**Figura 8. Crecimiento de *P. syringae* en presencia del inóculo bacteriano C23F.** Se modificó la prueba de doble capa de agar sembrando únicamente al fitopatógeno (a) y en interacción con el crecimiento de C23F en la primera capa. Las flechas rojas indican las zonas donde no creció el fitopatógeno (zonas de inhibición). La flecha amarilla indica el punto de inoculación de la bacteria C23F en la primera capa de agar.

El análisis estadístico demostró la existencia de una diferencia significativa en el área de crecimiento ocupada por el fitopatógeno, siendo mucho menor en el tratamiento con la cepa C23F (Figura 9).

La presencia de zonas de inhibición, señaladas con flechas rojas en la Figura 8, corroboró la hipótesis planteada anteriormente estableciendo que la cepa si produciría algún compuesto antimicrobiano contra este fitopatógeno. Dicho esto, al ser necesario tener a la cepa de interés viva y presente en el medio, justificaría los resultados obtenidos en la (Figura 8). Existe la posibilidad que al haber incubado y mantenido a la cepa C23F en la primera capa de agar, esta tuvo más tiempo no solo para abastecerse de nutrientes del medio, sino también para producir la cantidad necesaria que tuvo un efecto antimicrobiano contra *P. syringae* como se observa en la Figura 8b. Por otro lado, existe también la posibilidad que la bacteria inoculada C23F sea más competente al poseer mayor capacidad de colonización en comparación del fitopatógeno, reduciendo su espacio y nutrientes a *P. syringae*. Asimismo, las zonas de inhibición observadas en la Figura 8b no presentaron una figura definida sino, irregular en toda la placa abriendo la posibilidad que la bacteria C23F podría ser móvil, siendo ésta una característica de la especie *Scandinavium goeteborgense* emparentada con la cepa utilizada (Marathe *et al.*, 2019).



**Figura 9.** Gráfica del crecimiento de *P. syringae* en presencia del inóculo bacteriano C23F. Placas donde solo creció el fitopatógeno (CTRL) y en presencia de la cepa de interés (C23F). Los valores mostrados representan la media de 3 placas  $\pm$  desviación estándar. La presencia de asteriscos indica que las medias difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ).

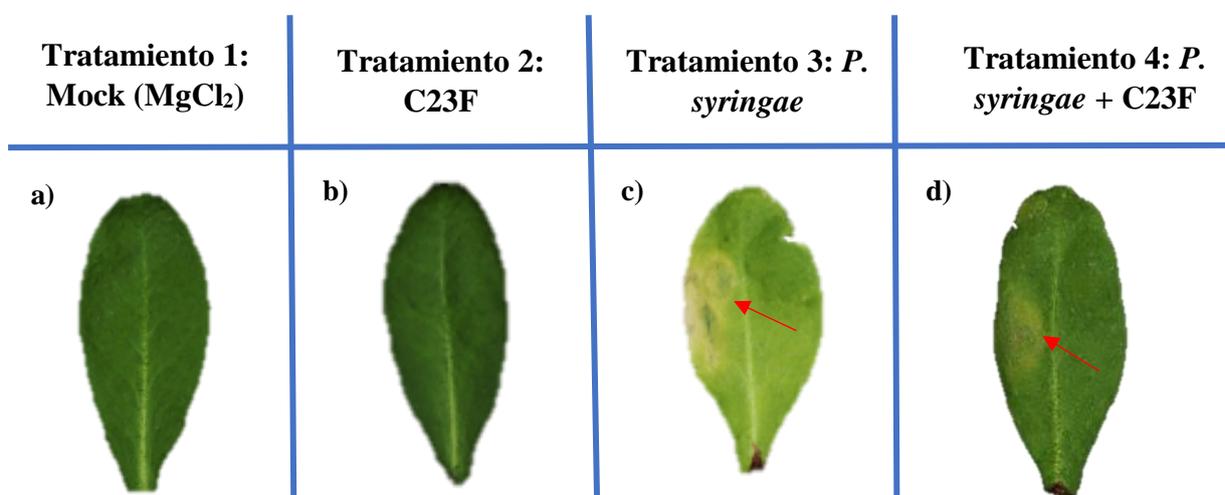
En las últimas décadas se ha dado mayor énfasis al estudio de la microbiota de la piel de anfibios, principalmente como principal mecanismo de defensa, principalmente, contra el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) causante de la disminución y extinción de varias poblaciones de anfibios (Becker *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2009; Rebollar *et al.*, 2019; Varga *et al.*, 2019; Walke y Belden, 2016; Woodhams *et al.*, 2016). Asimismo, se reportó que el principal mecanismo de acción es mediante la segregación de compuestos antifúngicos y antimicrobianos como es el caso de las bacteriocinas, compuestos orgánicos volátiles (VOC's), toxinas, etc. (Assis *et al.*, 2017; B. Assis *et al.*, 2020; Bletz *et al.*, 2019; Brucker *et al.*, 2008; Woodhams *et al.*, 2016). En estudios recientes, pudieron aislar y cultivar especies bacterianas de este microbioma satisfactoriamente, éstas demostraron tener un enorme potencial como posibles agentes biocontroladores contra hongos fitopatógenos (Cevallos *et al.*, 2022; Susilawati *et al.*, 2021). Tomando como referencia lo reportado anteriormente, se esperaría que la cepa de interés C23F estaría liberando algún compuesto de carácter antimicrobiano que inhibió el crecimiento de *P. syringae* (Figura 8).

#### **4.3 Efecto protector de la bacteria en plantas de *A. thaliana* ante la infección de *P. syringae***

Como se observó anteriormente, la confrontación de la cepa aislada de la piel de anfibios C23F contra el fitopatógeno a nivel *in vitro* (Figura 8); resultó en la disminución del crecimiento de *P. syringae* sugiriendo la producción de algún compuesto antimicrobiano. De esta manera, se planteó que la cepa C23F estaría también disminuyendo la infección de *P. syringae* en plántulas de *A. thaliana* en condiciones de invernadero. En la Figura 6 se observa que el tratamiento control no presentó alteración alguna en hojas de *A. thaliana* corroborando que el medio que se usó para suspender al fitopatógeno no tuvo ningún efecto en la plántula. Por otro lado, en el tratamiento solamente con la cepa C23F, no se observó ninguna lesión en la hoja y por el contrario, los resultados fueron similares a los observados en el tratamiento control. De esto se podría inferir que la cepa de interés no estaría causando algún efecto adverso en la planta o, dicho de otra forma, no estaría dañando a la planta. Esto es importante de mencionar, ya que, el interés del presente estudio es poder caracterizar esta cepa como posible agente bioestimulante y debe ser inocua para la planta. En el tercer tratamiento se observó una sección de la hoja con clorosis extendida por el lado donde se inoculó el patógeno. De esta forma se confirmó la efectiva infiltración del fitopatógeno en

las hojas. No obstante, la zona clorótica observada también pudo verse favorecida por las lesiones mecánicas durante la infiltración, que se observó en los bordes rotos (Figura 10c).

El ultimo tratamiento, mostró resultados muy interesantes ya que también se observó una lesión por clorosis, pero, esta fue visiblemente de menor en tamaño. Por lo que, podría deberse al efecto benéfico de la cepa C23F en la planta, inoculada previamente, ante la infección de *P. syringae*. Lo anterior, podría guardar relación con lo observado en la Figura 8 al observar a nivel *in vitro* la disminución del crecimiento del patógeno por la acción de C23F. Por otro lado, surgió la interrogante si la aparente reducción del tamaño de lesión por clorosis se correlaciona positivamente con una disminución en el número de células del patógeno. Para responder esta interrogante se necesitó llevar a cabo el conteo de unidades formadoras de colonias de *P. syringae*.

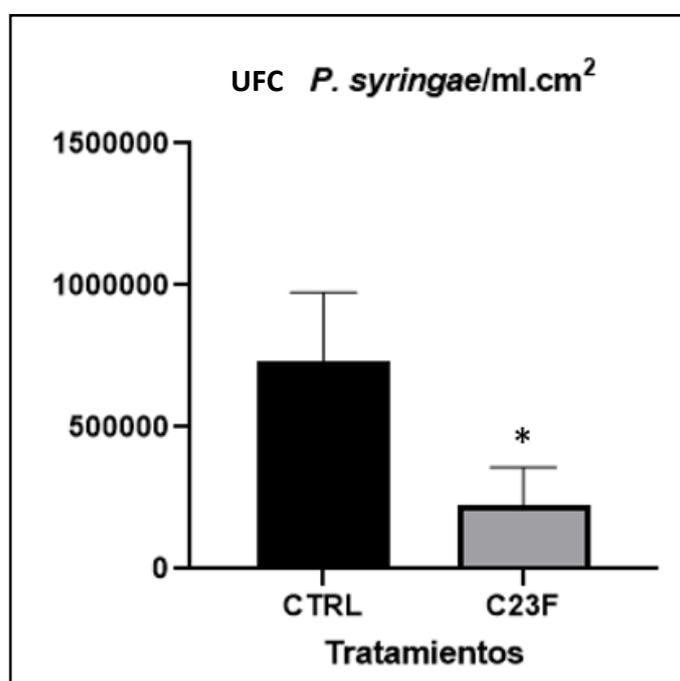


**Figura 10. Efecto protector de la bacteria C23F en plantas de *A. thaliana* ante la infección de *P. syringae*.** Se tomó una muestra representativa de cada tratamiento. Las flechas rojas indican las regiones cloróticas producto de la infección del fitopatógeno. En la figura se expone una muestra representativa de cada tratamiento.

#### **4.4 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. syringae* en hojas infectadas de *A. thaliana***

Las UFC/(mL.cm<sup>2</sup>) obtenidas del tratamiento entre plantas de *A. thaliana* y *P. syringae* fue de 7.34E+05. Mientras que, del tratamiento de la planta con el fitopatógeno y la cepa aislada C23F se obtuvo 2.23E+05. De esta manera, se observó una reducción promedio de 3.3 veces del número de UFC del patógeno al ser tratada con la cepa C23F. En otras palabras, la bacteria C23F redujo más del triple de la población del patógeno en plantas de *A. thaliana* en condiciones de invernadero. El análisis estadístico confirmó que existió una reducción significativa entre la cantidad de UFC de *P. syringae* en plantas tratadas con el inóculo bacteriano C23F (Figura 11). De esta manera, se pudo evidenciar un fuerte efecto protector

de la cepa C23F en plantas de *A. thaliana*, ante la infección de *P. syringae*. Asimismo, se confirmó que la reducción del tamaño de lesión se correlaciona positivamente con la reducción del número de células del patógeno. A simple vista, se asumiría que la máxima población que *P. syringae* podría alcanzar sería la que haga visible los síntomas de infección. Sin embargo, Katagiri *et al.* (2002) demostraron que la bacteria *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 alcanzó casi su máximo nivel de multiplicación, en plantas de *A. thaliana*, mucho antes de los síntomas visibles, como la clorosis. De ello se deduce que los datos obtenidos del tratamiento 3 no corresponderían necesariamente al máximo nivel de UFC/(mL.cm<sup>2</sup>) alcanzado por el fitopatógeno.



**Figura 11.** Gráfica del conteo de UFC/mL post-infección de *P. syringae* en plantas de *A. thaliana*. Se infectó plantas no inoculadas (CTRL) y plantas que fueron inoculadas previamente con la cepa C23F. Los valores mostrados representan la media de 3 placas  $\pm$  desviación estándar. La presencia de asteriscos indica que las medias difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ).

Anteriormente, se discutió que la cepa C23F podría estar liberando algún compuesto antimicrobiano que afectaría el crecimiento de *P. syringae* a nivel *in vitro*. Sin embargo, no se podría afirmar que la liberación de compuestos antimicrobianos o antibiosis sea el mecanismo responsable de acción de C23F. Existen otros mecanismos que podrían estar actuando en conjunto permitiendo que la bacteria C23F esté actuando como agente de biocontrol. En la revisión elaborada por Compant *et al.* (2005) refirieron otro mecanismo directo, denominado desintoxicación y degradación de agentes de virulencia. Estos mismos autores mencionaron que el mecanismo involucra la producción de proteínas que se unen irreversiblemente a las toxinas e inclusive, degradan compuestos tóxicos liberados por

algunos fitopatógenos. Además de ello también se discutió que algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) poseen la capacidad para interferir y desactivar el fenómeno de *quorum-sensing* del patógeno degradando las señales autoinductoras, necesarias para la expresión de numerosos factores de virulencia. La degradación de las señales autoinductoras se logra mediante la producción de enzimas de tipo lactonasas (Olanrewaju *et al.*, 2017). Por ello, la cepa C23F pudo haber reprimido la virulencia del fitopatógeno *P. syringae*, al degradar sus señales autoinductoras necesarias para activar la cascada de genes relacionados a sus factores de virulencia como genes *hrp* (codificantes para proteínas de secreción tipo III), su efector coronatina, necesario en su patogénesis (Melotto *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2018; Xin y He, 2013). También podría tratarse de una estrategia muy ingeniosa de los ACB, si bien no son tan comunes y tampoco mostraron resultados alentadores en campo (Compant *et al.*, 2005; Olanrewaju *et al.*, 2017). Asimismo, otro mecanismo directo es la producción de sideróforos, estos son compuestos de bajo peso molecular producidos en condiciones limitantes de hierro, poseen alta afinidad al hierro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) permitiendo formar el complejo hierro-sideróforo para ser asimilado por la bacteria (Olanrewaju *et al.*, 2017). Esta estrategia de competencia por hierro es también el método de acción de varios antagonistas fúngicos (Köhl *et al.*, 2019).

En ese sentido el involucrar no solo a ambas bacterias, sino también a un sistema más complejo como la planta, abre la posibilidad de que otros mecanismos podrían estar mediando el efecto protector de la cepa C23F ante el ataque de *P. syringae*. Dentro de los mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), existe el parasitismo o hiperparasitismo pero, implicaría que la cepa C23F tendría que estar adquiriendo algún nutriente de su hospedero, en este caso, *P. syringae*. Aunque no se puede determinar si ese fue el caso, Köhl *et al.* (2019) refirieron que este mecanismo es poco frecuente entre especies bacterianas y más bien es más frecuente en hongos patógenos.

Otro mecanismo de las PGPBs es la competencia por espacio y/o nutrientes como lo demostraron Innerebner *et al.* (2011) al aislar especies del género *Sphingomonas*, con capacidad para suprimir la infección y el crecimiento del patógeno *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 en hojas de *A. thaliana*, donde fueron aisladas inicialmente. Si bien la cepa C23F fue identificada al género más cercano *Scandinavium*, especies de este género asimilan algunos nutrientes que, a su vez, son asimilados por el fitopatógeno como el ácido gamma-aminobutírico (GABA), ácido aspártico, el aminoácido serina, entre otros (Maddock *et al.*,

2022; Rico y Preston, 2008). Esto podría implicar una posible competencia por asimilación de nutrientes dentro del apoplasto de la planta.

Otro mecanismo que podría explicar que la cepa C23F estaría actuando como agente de biocontrol contra *P. syringae* es la inducción de la resistencia en el hospedero, catalogado como mecanismo indirecto por Pal y Gardener (2006). Al interaccionar no solo la posible bacteria benéfica, sino también el fitopatógeno en la planta hospedera (interacción tritrófica), podrían estar ocurriendo dos mecanismos de defensa vegetal. El primero, la resistencia sistémica inducida (RSI), la cual es activada por un elicitor denominado patrón molecular asociado a microbios (MAMPs), en otras palabras, estímulos inductores producidos por microorganismos benéficos o no patogénicos. Entre los MAMPs más estudiados se encuentra la flagelina y estos suelen ser liberados en cantidades muy pequeñas (Köhl *et al.*, 2019). En ese sentido, el inóculo C23F al haber sido colocado días antes de la infiltración del fitopatógeno, pudo haber inducido la RSI y de esta manera, incrementar la resistencia del hospedero. Inclusive, Olanrewaju *et al.* (2017) indicaron que ciertas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) podrían preparar a la planta para reaccionar más rápido, con más fuerza ante posibles ataques posteriores de una amplia variedad de patógenos. Además, la activación de la RSI estaría involucrando señales de jasmonato, etileno e independiente del ácido salicílico. En ese sentido la RSI estaría asociada a un aumento de sensibilidad a estas hormonas, más que de un aumento de su producción (Compant *et al.*, 2005).

El segundo mecanismo es la resistencia adquirida sistémica (RSA) que ocurre con el reconocimiento de un patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs). La RSA generalmente conduce a la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) y que además es mediado por el ácido salicílico (Pal y Gardener, 2006). En ese sentido, la principal PR de *P. syringae* sería su toxina coronatina que cumple roles importantes durante la infección como la facilitación de la invasión de la bacteria a través del estoma, su persistencia en la planta, incremento de susceptibilidad a la enfermedad en partes no infectadas de la planta. Curiosamente, la coronatina que se asemeja al jasmonato, que al ser antagónico al ácido salicílico, evade la vía mediada por el ácido salicílico (Pal y Gardener, 2006). Por tanto, pese al gran arsenal patogénico de *P. syringae*, la activación de RSI por la bacteria C23F y sumado a la activación de RSA por parte del patógeno, pudo haber incrementado aún más la resistencia en la planta *A. thaliana* (Figura 10d).

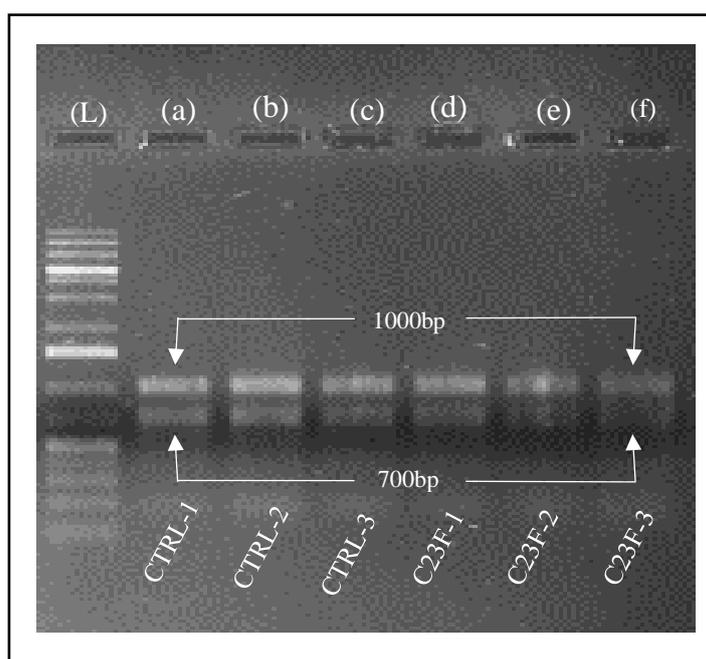
## 4.5 Análisis molecular

### 4.5.1 Extracción de ARN

Los resultados de la extracción de ARN total de las muestras del experimento de fitoestimulación (Figura 2), se visualizan en la Tabla 2. Asimismo, la integridad del mismo se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2: Cuantificación de ARN total ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) post-tratamiento con LiCl [2M]. 1, 2 y 3 (réplicas biológicas).**

Muestra	Cantidad ng/ $\mu\text{L}$	Cantidad $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
CTRL-1	308.88	0.30888	6.5
CTRL-2	190.28	0.19028	10.5
CTRL-3	336.80	0.33680	5.9
C23F-1	171.92	0.17192	11.6
C23F-2	220.08	0.22008	9.1
C23F-3	285.72	0.28572	7.0



**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa.** Los productos de extracción se visualizaron en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X, con un voltaje de 95 V durante 35 min a temperatura ambiente y teñidos con bromuro de etidio. La columna (L) corresponde al marcador molecular o ladder. Las columnas (a), (b) y (c) corresponden al tratamiento control con sus 3 réplicas biológicas. Las columnas (d), (e) y (f) corresponden al tratamiento con la cepa de interés con sus 3 réplicas biológicas.

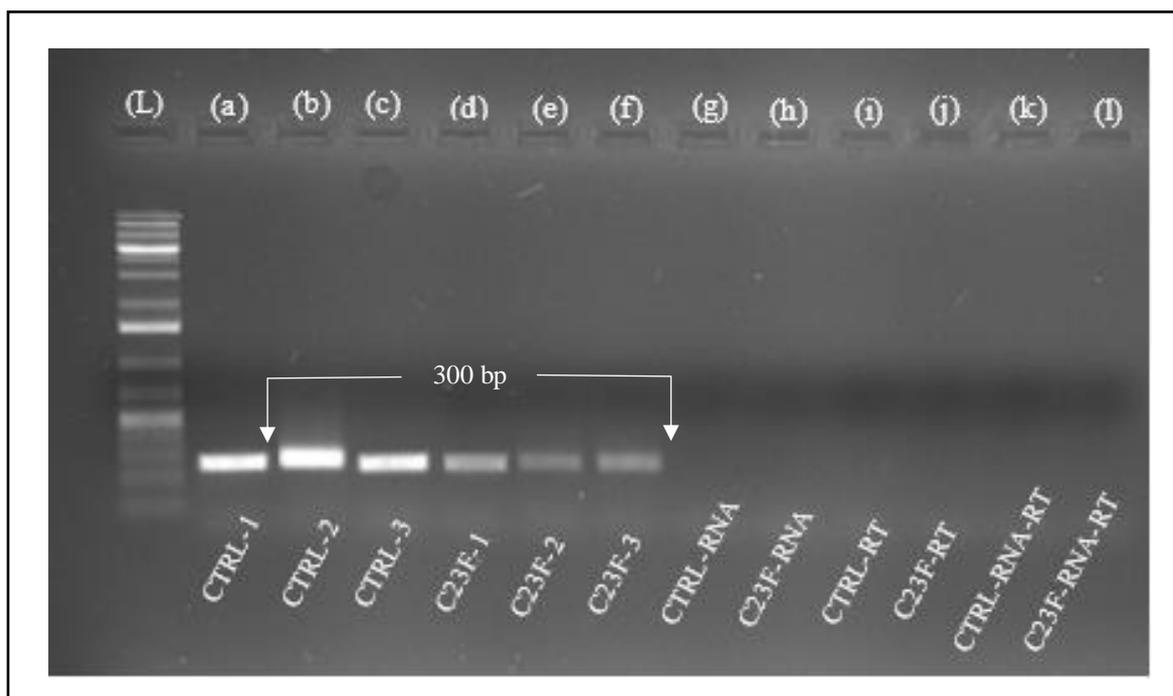
En la Tabla 2 se observa las cantidades obtenidas de ARN total no fueron homogéneas como se esperaba, de hecho, se pudo observar que se obtuvo mayor cantidad de ARN de muestras del tratamiento control (CTRL) en comparación con aquellas muestras tratadas con la bacteria C23F. Pese a que se partió con una cantidad aproximada de 0.1g de muestra vegetal, se obtuvo diferentes rendimientos de ARN. Lo anterior pudo deberse a diversos factores como el método de extracción ya que, entre una y otra réplica biológica pudo no haberse agregado la misma cantidad de reactivos. Por otro lado, hay que tomar en cuenta otros factores como presencia de ARNasas, proteínas y ADN que pese al uso del TRIzol (Invitrogen™) como reactivo para inhibir la activación de ARNasas y remover contaminantes por DNA, no siempre ocurre una eficiencia absoluta (Fleige y Pfaffl, 2006; Meng y Feldman, 2010). Cabe mencionar que, la adición de LiCl pudo también haber influido en la cantidad de ARN extraído, ya que su mecanismo consiste en precipitar el ARN para lograr una mejor purificación; sin embargo, el tiempo de exposición de la muestra y otra pudo haber generado pérdida de ARN en más de una muestra.

Por otra parte, a pesar de haber obtenido cantidades no homogéneas de ARN, gracias al tratamiento con LiCl, se obtuvo un ARN de buena calidad, tal como se observa en la Figura 12. La electroforesis tuvo como resultado la amplificación de fragmentos, siendo los tamaños aproximados de 1000 y 700 pb. Los pesos de los fragmentos parciales se estimaron mediante la comparación con el marcador GeneRuler™ 1 kb (Anexo 5). Estos fragmentos corresponderían a las bandas del ARN ribosomal conformados por las subunidades mayor (28S, 5.8S y 5S) y menor (18S). La banda superior (1000pb) correspondería a la subunidad mayor, mientras que la inferior (700pb), a la subunidad menor. En la Figura 12 también se observa una ligera diferencia de intensidad de fragmentos entre ambas subunidades ribosomales, siendo la mayor más intensa que la menor.

#### 4.5.2 Síntesis de ADNc

Después de utilizar el Kit® (cDNA RevertAid H Minus First Strand, Thermo Fisher Scientific) para la síntesis del ADNc siguiendo las condiciones del fabricante, se evaluó su integridad a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 13) para el gen housekeeping actina. Las bandas que amplificaron correspondieron a las muestras problema, es decir, a las tres réplicas biológicas del tratamiento control y las tres réplicas biológicas del tratamiento con la bacteria de interés C23F. Además, dichas bandas presentaron un tamaño de 300 pb. Cabe mencionar que, las seis muestras en total poseían todos los reactivos del kit además del templado de ARN utilizados para la síntesis de ADNc. De esta manera,

al observar la amplificación de bandas para el gen de actina, luego de la PCR punto final, se confirmó la síntesis del ADNc. Este gen housekeeping desempeña un papel general en los procesos celulares básicos como el mantenimiento de la estructura celular y, por lo tanto, generalmente no se ven afectados por factores externos (Hong *et al.*, 2008). Cabe recalcar que, el gen de actina es uno de los genes de referencia más conocidos y utilizados para el estudio de la planta *A. thaliana* así como  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina (Czechowski *et al.*, 2005).



**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR punto final para el gen de Actina.** La columna (L) corresponde al marcador molecular o ladder. Las columnas [(a), (b), (c)] corresponden al tratamiento control (CTRL) con sus respectivas réplicas biológicas 1,2 y 3. Las columnas [(d), (e), (f)] corresponden al tratamiento con la cepa de interés (C23F) con sus respectivas réplicas biológicas 1,2 y 3. Las columnas [(g), (h)] corresponden a los tratamientos sin ARN, [(i), (j)] corresponden a los tratamientos sin la enzima retrotranscriptasa (RT) y [(k), (l)] corresponden a los tratamientos sin ARN y sin RT.

Asimismo, se observa en la Figura 13 muestras donde no amplificaron las bandas, correspondientes al control negativo (sin ARN) (carriles g y h), muestras sin la enzima retrotranscriptasa (RT) (carriles i y j) y sin la adición de ambos en simultáneo (carriles k y l). La evaluación del control negativo sirvió para demostrar la integridad de los reactivos del kit. Por otro lado, se evaluaron las muestras sin la enzima RT para comprobar que el templado (ARN) estuviese libre de ADN genómico lo que podría generar un falso positivo. De la misma forma, al no observarse la amplificación de la banda en muestras donde no estuvo la enzima RT, ni el templado (ARN) se comprobó que los reactivos del kit se encontraban en óptimo estado y que el ARN utilizado se encontraba libre de algún agente contaminante, especialmente, ADN genómico.

#### 4.5.3 Análisis por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Finalmente, ya sintetizado el ADNc se realizó una qRT-PCR para evaluar el nivel de expresión de genes en plántulas de *A. thaliana* durante la interacción con la bacteria de interés C23F. Cabe mencionar que, el uso de esta técnica ha sido ampliamente extendida por su practicidad para analizar la expresión de un pequeño conjunto de genes de múltiples muestras. Además, proporciona una cuantificación precisa y sensible de los niveles de expresión, e inclusive de genes con niveles de expresión muy bajos (Hong *et al.*, 2008).

Se establecieron dos genes de referencia o *housekeeping* para la estandarización de los datos obtenidos de la qRT-PCR que fueron *ACTIN* (AT4G26410) y *CF150* (AT1G72150). El primero además de involucrarse en el mantenimiento de la estructura celular, es necesario para la expresión de algunos genes regulados por la glucosa. El segundo, una proteína asociada a la lámina media (formada durante la citocinesis en células vegetales) que está relacionada en secuencia con las proteínas involucradas también en el tráfico de membrana de otros eucariotas (Zhou *et al.*, 2019). Por otro lado, los genes de interés estudiados fueron el gen *PR1* (AT2G14610) que responde al ácido salicílico (AS), el gen *PR4* (AT3G04720) que responde a etileno, *PDF1.2* (AT5G44420) que responde a ácido jasmónico (AJ), *ZAT12* (AT5G59820), que responde a especies reactivas de oxígeno (ROS), *IAA1* (AT4G14560) que responde a auxina y *SAUR9* (AT4G36110) que responde principalmente a auxina. Los resultados obtenidos de la qRT-PCR para evaluar la expresión de genes se observan en la Figura 14. Pese a que se obtuvo una mayor expresión en todos los genes evaluados, estos se expresaron en diferente magnitud.

La expresión del gen *PR1* responde a AS, que también es considerado un marcador útil para la respuesta a la resistencia adquirida sistémica (RSA). El nivel de expresión obtenido del tratamiento tratado con la bacteria C23F fue 3.3 veces mayor que el tratamiento control. Sin embargo, esta no resultó ser significativa para el análisis estadístico, posiblemente debido a que uno de los valores no fue semejante al de las demás replicas biológicas. Asimismo, sobreexpresión de este gen puede sustentarse ya que AS se asocia con la activación de la RSA, relacionado al reconocimiento del algún PAMP, es decir, algún patógeno. Anteriormente, la bacteria C23F estimuló la promoción y aumento de raíces laterales y pelos radiculares en plántulas de *A. thaliana* calificándola como bacteria benéfica. No obstante, pudo ocurrir que inicialmente a nivel molecular la planta hospedera haya reconocido a la bacteria como un organismo extraño o potencial patógeno, lo que pudo haber desencadenado la sobre expresión de AS como mecanismo de defensa. Por otro lado, la expresión del gen

*PDF1.2* que responde a AJ, fue 0.3 veces mayor en el tratamiento con C23F que el tratamiento control. Sin embargo, en el análisis estadístico resultó que esta diferencia no fue significativa. La pequeña sobreexpresión de AJ en plántulas tratadas con C23F podría estar relacionada a la resistencia sistémica inducida (RSI) que anteriormente se discutió como posible método de acción de un microorganismo benéfico, ya que, prepara a la planta hospedera contra futuros ataques de patógenos. Cabe mencionar que, los resultados obtenidos mostraron niveles de expresión de AJ muy superiores a AS, lo que sugeriría que la sobreexpresión de uno, podría reprimir la expresión del otro tal como lo discutieron Pal y Gardener (2006) quienes afirmaron que AJ y AS son antagonicos entre sí.

La expresión del gen *ZAT12* que responde a ROS fue apenas 0.9 veces mayor en el tratamiento con la bacteria en comparación con el tratamiento control. Esta diferencia, aunque pequeña, fue significativa cuando se realizó el análisis estadístico. En este caso, al ser las tres réplicas biológicas muy cercanas entre sí, la pequeña diferencia entre ambos tratamientos, resultó ser altamente significativa. Este fue el único caso de todos los genes analizados que resultó en un nivel de significancia muy por encima del resto. La sobreexpresión de este gen juega un rol muy importante en la señalización del estrés abiótico en *A. thaliana* así como en el metabolismo de ROS (Davletova *et al.*, 2005). La expresión del gen *ZAT12* es inducida por estrés lumínico, osmótico o salino, bajas temperaturas, heridas, estrés oxidativo, sequía e inclusive por privación de nutrientes (Le *et al.*, 2016; Rizhsky *et al.*, 2004). La expresión de este gen en nuestro estudio podría explicarse por algún daño mecánico durante la colecta de muestras, es decir, que pudimos haber dañado el tejido o inclusive, pudo haber influido el tiempo que se mantuvo afuera antes de ser colocado al nitrógeno líquido. Por otro lado, recordemos que las plántulas se mantuvieron durante 11 días a 24°C en interacción con la bacteria; que pudo conllevar a una menor disponibilidad de nutrientes para la planta ya que la bacteria también tomaba nutrientes del medio para poder crecer. Este hecho no pudo haber existido en el tratamiento control, por lo cual explicaría que aquellas plántulas en interacción con la bacteria C23F pudieron tener menor disponibilidad de nutrientes de aquellas que no estuvieron en interacción con el inóculo bacteriano.

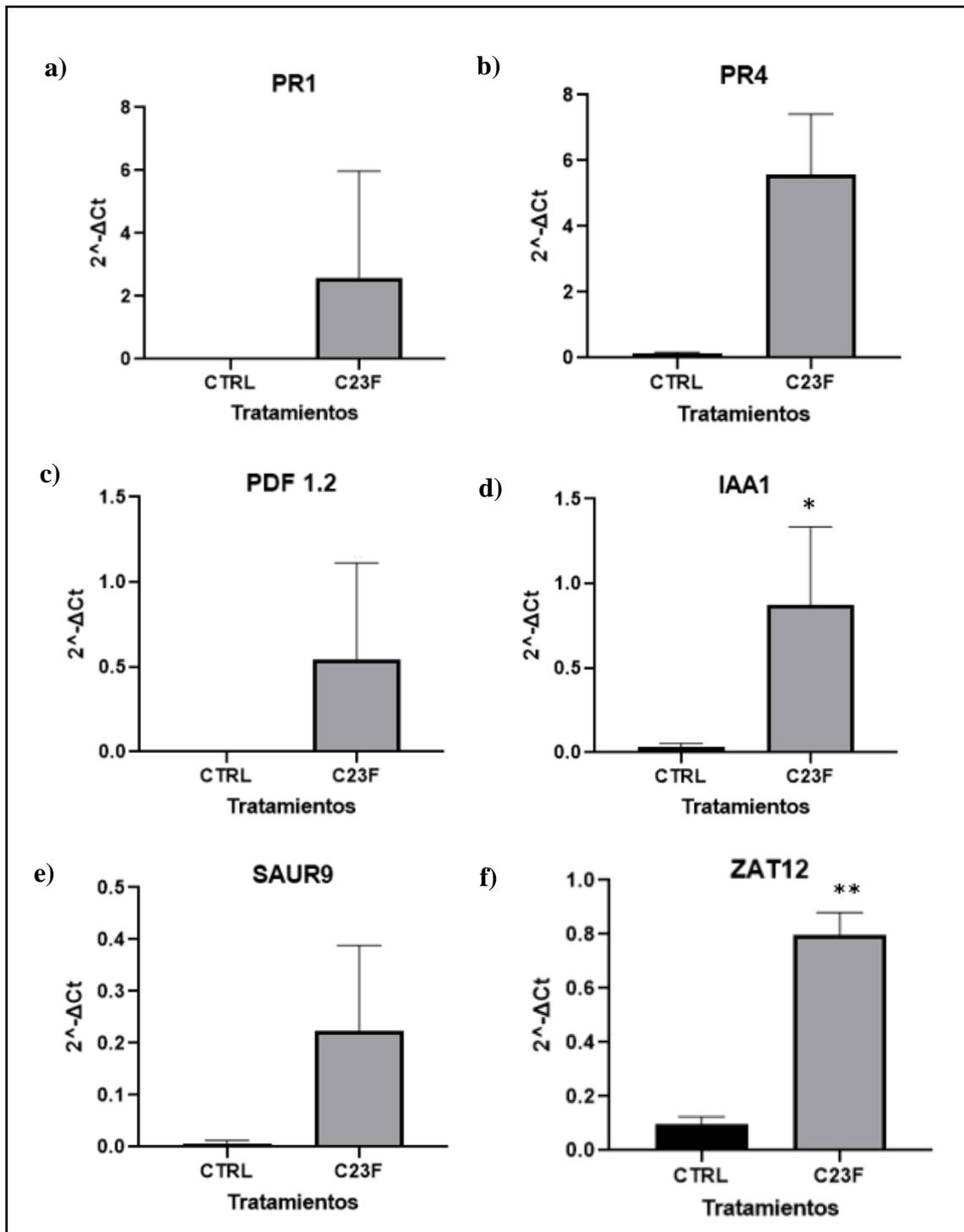
Por otro lado, se sabe que un mecanismo muy común de agentes de biocontrol es la producción de fitohormonas como son la auxina, ACC deaminasa (enzima que hidroliza al precursor en la síntesis de etileno), citoquininas y giberelinas. Pudiendo ser estas producidas por el microorganismo o mediante la modulación de la homeostasis en la planta hospedera

(Berg, 2009; Olanrewaju *et al.*, 2017; Ramos Cabrera *et al.*, 2018). Una de las fitohormonas más importantes y anteriormente discutidas fue la auxina. Como se observa en la (Figura 14d) la expresión del gen *IAA1* que responde a la hormona auxina fue de 1.3 veces más en el tratamiento con la cepa C23F que el tratamiento control. Mientras que, la expresión de *SAUR9* fue apenas cercano al 0.2. Según el análisis estadístico, la expresión del gen *IAA1* resultó ser significativa mientras que *SAUR9*, no. Este último gen se denomina *Small Auxin Upregulated RNA 9*, por sus siglas en inglés. Pese a que *SAUR9* expresa su respuesta a auxina, su regulación sería mucho más compleja y no solo dependería de la auxina; de hecho, estaría afectada por una variedad de factores que incluyen otras hormonas, otros factores de transcripción e inclusive, factores de respuesta a luz. En ese sentido, un estudio realizado por van Mourik *et al.* (2017) demostraron que además del gen *SAUR9*, *SAUR10* y *SAUR16* estarían involucrados a una respuesta por deficiencia de luz o un síndrome de evitación de la sombra, por sus siglas en inglés (SAS). Asimismo, estos mismos autores refirieron que esta respuesta ocurre en combinación con las hormonas auxina y brasinoesteroides. De esta manera, se sugeriría que la expresión del gen estudiado *SAUR9* estaría muy relacionada a condiciones de deficiencia de luz. De esta forma, estaría muy relacionado con los datos obtenidos en la Gráfica 14e, ya que las plántulas de *A. thaliana* no estuvieron expuestas a condiciones de sombra por un tiempo prolongado.

Por otro lado, el gen *IAA1* es también denominado Auxina (ácido indol-3-acético) (Jing *et al.*, 2023). El gen *IAA1* se expresa a lo largo del desarrollo de la planta con el nivel más alto de ARN en raíces, inflorescencias y flores. En ese sentido, Yang *et al.* (2004) demostró la importancia de este gen, usando mutantes *iaa1* que resultaron afectadas en la elongación de la raíz, la formación de raíces laterales, la elongación del hipocótilo, el tropismo de la raíz y el brote, morfología de la hoja e inclusive, la estructura de la inflorescencia. Por tanto, se presumiría el amplio rol de *IAA1* en diversos procesos regulados por la hormona auxina. Por si fuera poco, la auxina es la hormona más utilizada para explicar los efectos benéficos de las PGPB en el crecimiento de las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017). Según Sukumar *et al.* (2013), la hormona auxina cumpliría un rol importante como molécula señal involucrada durante la interacción con la planta hospedera al interferir con el desarrollo de las vías metabólicas, ya sea en la síntesis o señalización de auxina en la planta. De esta manera, no se habla solamente de una síntesis y secreción de auxina por parte de la bacteria como lo señalaron Vacheron *et al.* (2013), sino que involucraría también un ingreso de la hormona auxina a las células de la raíz en cantidades suficientes para alterar la arquitectura y

desarrollo de la raíz tal y como lo reportaron diversos autores (Ambreetha *et al.*, 2018; Jiménez-Vázquez *et al.*, 2020; López-Bucio *et al.*, 2007; Poupin *et al.*, 2016) y lo encontrado en el presente estudio.

Por último, la expresión del gen *PR4* que responde a etileno no resultó significativa. No obstante, hubo una mayor sobreexpresión de este gen en el tratamiento con la bacteria C23F en comparación del tratamiento control. Si bien es considerada como la hormona del estrés cuando se encuentra en condiciones generadas por salinidad, sequía, inundaciones, metales pesados, patógenos, heridas mecánicas (Babalola, 2010), también cumple un rol muy importante como regulador del crecimiento y desarrollo de la planta, además de la auxina. Sin embargo, una posible explicación acerca de la presencia de etileno al estar en interacción con el inóculo bacteriano, es que éste último promueva la producción de etileno en cantidades suficientes para promover el aumento de pelos radiculares tal y como lo reportaron Ribaudó *et al.* (2006) al estudiar el efecto de *Azospirillum brasilense* en plantas de tomate. Inclusive, estos mismos autores señalaron que la producción de IAA activada por la bacteria promotora del crecimiento de la planta, podría a su vez activar la enzima ACS (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa), esencial para la síntesis de etileno lo que podría explicar los cambios en la estructura radicular en concentraciones suficientes. Por consiguiente, esto explicaría el acortamiento de la raíz primaria y la promoción en la formación de pelos radiculares, señalado por Poupin *et al.* (2016) como uno de los roles agonísticos/sinérgicos de las hormonas auxina y etileno. Otro mecanismo existente de los PGBP es la producción de ACC deaminasa, la cual hidroliza los niveles de ACC, disminuyendo de esta forma los niveles de etileno en la planta al encontrarse bajo condiciones de estrés como se mencionó anteriormente. Como consecuencia, el ACC pasa a ser  $\alpha$ -ketobutirato y amonio para ser usados como fuentes de carbono y nitrógeno (Babalola, 2010; Olanrewaju *et al.*, 2017). Sin embargo, se podría descartar la idea que la bacteria C23F sea una productora de ACC deaminasa, ya que los niveles de etileno fueron altos en plantas inoculadas. Por el contrario, reforzaría la idea de que los altos niveles de IAA podrían estar induciendo a la enzima ACS resultando en un incremento de ACC y, por tanto, de los niveles de etileno que se observan en la Figura 14b. Por ello, tomando en consideración la expresión de genes estudiados, se le podría atribuir a la bacteria C23F como potencial promotor de crecimiento vegetal.



**Figura 14.** Gráfica de la evaluación de la expresión de genes del tratamiento con la cepa de interés (C23F) respecto al tratamiento control (CTRL) en plántulas de *A. thaliana* después de 11 días posinoculación. Los genes evaluados fueron: *PR1*, *PR4*, *PDF 1.2*, *IAA1*, *SAUR9*, *ZAT12* representados con las letras (a), (b), (c), (d), (e) y (f) respectivamente. Los valores mostrados representan la media de 3 réplicas biológicas con sus 3 réplicas técnicas  $\pm$  desviación estándar. La presencia de asteriscos indica que las medias difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ).

## V. CONCLUSIONES

- Se comprobó la capacidad bioestimulante de la bacteria C23F en la planta modelo *A. thaliana*, y la capacidad inhibitoria contra *P. syringae* pv. tomato DC3000.
- La bacteria C23F se comportó como agente fitoestimulante generando cambios estructurales en la raíz promoviendo la reducción de la raíz primaria, el aumento en la promoción de raíces secundarias y el número de pelos radiculares.
- La sobreexpresión del gen IAA1 (auxina) podría estar ligada a las modificaciones estructurales observadas en las raíces de las plántulas de *A. thaliana* estimuladas por la cepa C23F.
- Los genes PR1, PR4, PDF1.2 y SAUR no se sobreexpresaron durante la interacción planta-bacteria, lo cual estaría relacionado a la ausencia del patógeno en las plantas de donde se obtuvo el ADN complementario.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- El proceso de infiltración del fitopatógeno en hojas de *A. thaliana* toma un tiempo considerable, por lo que se sugiere realizarlo a tempranas horas del día o por la tarde para evitar que las plantas se estresen por la alta exposición de sol durante el día.
- Se recomienda utilizar la técnica de espectrometría de masas (EM) para la determinación de los posibles compuestos antimicrobianos que la bacteria C23F estaría liberando contra el fitopatógeno y aquellos componentes bioestimulantes que estaría liberando para la planta.
- Se sugiere realizar pruebas clínicas con el aislado bacteriano C23F para corroborar su inocuidad en humanos.

## **VII. PERSPECTIVAS**

- Dados los resultados, la cepa C23F podría usarse como un controlador biológico en forma de inoculante microbiano líquido.
- La producción de posibles sustancias antimicrobianas por parte de la cepa C23F, podría ser muy útil en la industria biotecnológica como la producción de nuevos fármacos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ambreetha, S., Chinnadurai, C., Marimuthu, P., & Balachandar, D. (2018). Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. *Rhizosphere*, *5*, 57-66.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.12.001)
- Assis, A.B. d., Barreto, C.C., & Navas, C.A. (2017). Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic Forest: Species, forest type, and potential against pathogens. *PLOS ONE*, *12*(7), e0179628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179628>
- Assis, A.B., R. Bevier, C., Chaves Barreto, C., & Arturo Navas, C. (2020). Environmental influences on and antimicrobial activity of the skin microbiota of *Proceratophrys boiei* (Amphibia, Anura) across forest fragments [<https://doi.org/10.1002/ece3.5949>]. *Ecology and Evolution*, *10*(2), 901-913. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ece3.5949](https://doi.org/10.1002/ece3.5949)
- Babalola, O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, *32*(11), 1559-1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
- Bardin, M. B. Pugliese, M. (2020). Biocontrol Agents Against Diseases. In M. L. Gullino, R. Albajes, y P. C. Nicot (Eds.), *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops* (pp. 385-407). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5_13)
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., B. El Enshasy, H. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability*, *13*(3), 1140. <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/3/1140>
- Becker, M.H., Walke, J.B., Cikanek, S., Savage, A.E., Mattheus, N., Santiago, C.N., Minbiole, K.P.C., Harris, R.N., Belden, L.K., & Gratwicke, B. (2015). Composition of symbiotic bacteria predicts survival in Panamanian golden frogs

- infected with a lethal fungus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1805), 20142881. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2881>
- Belden, L.K., Hughey, M.C., Rebollar, E.A., Umile, T.P., Loftus, S.C., Burzynski, E.A., Minbiole, K.P.C., House, L.L., Jensen, R.V., Becker, M.H., Walke, J.B., Medina, D., Ibáñez, R., & Harris, R.N. (2015). Panamanian frog species host unique skin bacterial communities [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01171>
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.C.C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G.H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J.A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G.S., Selvin, J., d Souza, R.S.C., van Overbeek, L., Singh, B.K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., & Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bernal, P. (2021). Microorganismos de interés para la agricultura del futuro: agentes de biocontrol y fijadores de nitrógeno. 6, 1-11.
- Bibikova, T. & Gilroy, S. (2002). Root Hair Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 383-415. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0007-x>
- Bishnoi, U. (2015). PGPR Interaction: An Ecofriendly Approach Promoting the Sustainable Agriculture System. In (Vol. 75, pp. 33 (81-113)). <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.09.006>
- Bletz, M.C., Bunk, B., Spröer, C., Biwer, P., Reiter, S., Rabemananjara, F.C.E., Schulz, S., Overmann, J., & Vences, M. (2019). Amphibian skin-associated Pigmentiphaga: Genome sequence and occurrence across geography and hosts. *PLOS ONE*, 14(10), e0223747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223747>
- Bletz, M.C., Perl, R.G.B., & Vences, M. (2017). Skin microbiota differs drastically between co-occurring frogs and newts. *Royal Society Open Science*, 4(4), 170107.

<https://doi.org/doi:10.1098/rsos.170107>

- Borriss, R. (2011). Use of Plant-Associated Bacillus Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 41-76). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_3)
- Brucker, R.M., Baylor, C.M., Walters, R.L., Lauer, A., Harris, R.N., & Minbiole, K.P.C. (2008). The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*, 34(1), 39-43. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9352-8>
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R. J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M., & Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10181-10186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731982100>
- Bustin, S., Benes, V., Nolan, T., y Pfaffl, M. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Bustin, S.A. & Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 15(3), 155.
- Calero-Hurtado, A., Quintero-Rodríguez, E., Olivera-Viciedo, D., Peña-Calzada, K., & Pérez-Díaz, Y. (2019). Influencia de dos bioestimulantes en el comportamiento agrícola del cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). *Revista de la Facultad de Ciencias*, 8(1), 31-44.
- Cesa-Luna, C., Baez, A., Aguayo-Acosta, A., Llano-Villarreal, R.C., Juárez-González, V. R., Gaytán, P., Bustillos-Cristales, M.d.R., Rivera-Urbalejo, A., Muñoz-Rojas, J., & Quintero-Hernández, V. (2020). Growth inhibition of pathogenic

microorganisms by *Pseudomonas protegens* EMM-1 and partial characterization of inhibitory substances. *PLOS ONE*, *15*(10), e0240545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240545>

- Cevallos, M.A., Basanta, M.D., Bello-López, E., Escobedo-Muñoz, A.S., González-Serrano, F.M., Nemeč, A., Romero-Contreras, Y.J., Serrano, M., & Rebollar, E. A. (2022). Genomic characterization of antifungal *Acinetobacter* bacteria isolated from the skin of the frogs *Agalychnis callidryas* and *Craugastor fitzingeri*. *FEMS Microbiology Ecology*, *98*(12), fiac126. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac126>
- Christian, K., Weitzman, C., Rose, A., Kaestli, M., & Gibb, K. (2018). Ecological patterns in the skin microbiota of frogs from tropical Australia. *Ecology and Evolution*, *8*(21), 10510-10519. <https://doi.org/10.1002/ece3.4518>
- Cohen, A.C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F.J., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C.N., & Piccoli, P.N. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum*, *153*(1), 79-90. <https://doi.org/10.1111/ppl.12221>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E.A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., & Scheible, W.R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, *139*(1), 5-17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
- da Silva Peixoto, A., de Sousa Guedes, D., Ferreira, A.K., Fernandes, R.R.S., Ribeiro, R. A. K., & Fernandes, G.d.S.T. (2020). Composição da comunidade bacteriana cutânea em anfíbios na região Oeste do Pará, Amazônia, Brasil. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, *11*(6), 411-427.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., & Mittler, R. (2005). The Zinc-Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *139*(2), 847-856. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068254>

- De Silva, N.I., Brooks, S., Lumyong, S., y Hyde, K.D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- De Smet, I. (2012). Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytol*, 193(4), 867-873. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03996.x>
- Del Puerto Rodríguez, A.M., Suárez Tamayo, S., De Silva, N.I., Brooks, S., Lumyong, S., y Hyde, K.D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133-148. Palacio Estrada, D.E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52, 372-387. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032014000300010&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010&nrm=iso)
- Díaz Puentes, L.N. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 32-55. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179214945004> (IN FILE)
- Dotor Robayo, M.Y. De Silva, N.I., Brooks, S., Lumyong, S., De Silva, N.I., Brooks, S., Lumyong, S., y Hyde, K.D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133-148. Hyde, K.D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133-148. Cabezas Gutiérrez, M. (2000). MECANISMOS DE RESISTENCIA SISTÉMICA EN PLANTAS. *Acta Iguazu*, 3(2), 1-19. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i2.10277>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., & Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8790-8794. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712307105>
- Espluga, J. (2001). Percepción del riesgo y uso de pesticidas en la agricultura. *Ecología política: cuadernos de debate internacional*, 22, 17-30.

- Fleige, S. & Pfaffl, M.W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2), 126-139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Gautam, A.K. & Avasthi, S. (2019). 14 - Fungal endophytes: potential biocontrol agents in agriculture. In A. Kumar, A. K. Singh, y K. K. Choudhary (Eds.), *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology* (pp. 241-283). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817004-5.00014-2>
- Ghazanfar, M.U., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M.I. (2018). Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*, 2(3).
- Gómez Alvarez, M. (2018). Comercialización de agentes de control biológico. In (pp. 762-793).
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., & Alfano, J.R. (2009). The Majority of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Can Suppress Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 22(9), 1069-1080. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1069>
- Hael-Conrad, V., Abou-Mansour, E., Díaz-Ricci, J.C., Métraux, J.P., & Serrano, M. (2015). The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 241, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.025>
- Harris, R.N., Brucker, R.M., Walke, J.B., Becker, M.H., Schwantes, C.R., Flaherty, D.C., Lam, B.A., Woodhams, D.C., Briggs, C.J., Vredenburg, V.T., & Minbiolo, K. P. C. (2009). Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *The ISME Journal*, 3(7), 818-824. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.27>
- Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Velázquez-del Valle, M.G., & Hernández-Lauzardo, A.N. (2006). Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. *Revista mexicana de fitopatología*, 24(1), 42-49. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224107> (IN FILE)
- Higa, T. & Parr, J. (2013). Microorganismos Benéficos y efectivos para una agricultura y

medio ambiente sostenibles. *Maryland (USA): Centro internacional de Investigación de Agricultura Natural, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos*, 13(2), 128-135.

- Höfte, M. & Altier, N. (2010). Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*, 161(6), 464-471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.007>
- Hong, S.Y., Seo, P.J., Yang, M.S., Xiang, F., & Park, C.M. (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology*, 8(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-112>
- Hu, Y., Yang, L., Na, X., You, J., Hu, W., Liang, X., Liu, J., Mao, L., Wang, X., Wang, H., & Bi, Y. (2012). Narciclasine inhibits the responses of *Arabidopsis* roots to auxin. *Planta*, 236(2), 597-612. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1632-z>
- Innerebner, G., Knief, C., & Vorholt Julia, A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against Leaf-Pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* Strains in a Controlled Model System. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3202-3210. <https://doi.org/10.1128/AEM.00133-11>
- Jacob, C., Panchal, S., & Melotto, M. (2017). Surface Inoculation and Quantification of *Pseudomonas syringae* Population in the *Arabidopsis* Leaf Apoplast. *Bio-protocol*, 7(5), e2167. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2167>
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K., & Khurana, J.P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 646-651. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.140>
- James, G.A., Beaudette, L., & Costerton, J.W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4), 257-262. <https://doi.org/10.1007/BF01569978>
- Jani, A.J. & Briggs, C. . (2018). Host and Aquatic Environment Shape the Amphibian Skin Microbiome but Effects on Downstream Resistance to the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Are Variable [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00487>
- Jiménez-Vázquez, K.R., García-Cárdenas, E., Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R., Ruiz-

- Herrera, L.F., Ramos-Acosta, B.P., Coria-Arellano, J.L., Sáenz-Mata, J., & López-Bucio, J. (2020). The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution. *The Plant Journal*, *103*(5), 1639-1654.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.14853>
- Jindo, K., Goron, T.L., Pizarro-Tobías, P., Sánchez-Monedero, M.Á., Audette, Y., Deolujay, A.O., van der Werf, A., Goitom Teklu, M., Shenker, M., & Pombo Sudré, C. (2022). Application of biostimulant products and biological control agents in sustainable viticulture: A review. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 3657.
- Jing, H., Yang, X., Emenecker, R.J., Feng, J., Zhang, J., de Figueiredo, M.R.A., Chaisupa, P., Wright, R.C., Holehouse, A.S., & Strader, L.C. (2023). Nitric oxide-mediated S-nitrosylation of IAA17 protein in intrinsically disordered region represses auxin signaling. *Journal of Genetics and Genomics*.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323-329.  
<https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Junaid, J.M., Dar, N.A., Bhat, T.A., Bhat, A.H., & Bhat, M.A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, *1*(2), 39-57.
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S.Y. (2002). The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. *The Arabidopsis Book*, *2002*(1).  
<https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy [Review]. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kombrink, E. & Somssich, I.E. (1995). Defense Responses of Plants to Pathogens. In J. A. Callow, J. H. Andrews, y I. C. Tommerup (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 21, pp. 1-34). Academic Press.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60007-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60007-5)
- Kumar, H.D. & Alope, P. (2020). Role of biostimulant formulations in crop production: An overview. *Int. J. Appl. Res. Vet. M*, *8*, 38-46.

- Le, C.T.T., Brumbarova, T., Ivanov, R., Stoof, C., Weber, E., Mohrbacher, J., Fink-Straube, C., & Bauer, P. (2016). ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA12 (ZAT12) Interacts with FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT) Linking Iron Deficiency and Oxidative Stress Responses *Plant Physiology*, *170*(1), 540-557.  
<https://doi.org/10.1104/pp.15.01589>
- Lemus-Soriano, B.A., Venegas-González, E., & Pérez-López, M.A. (2021). Efecto de bioestimulantes radiculares sobre el crecimiento en plantas de aguacate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *12*(6), 1139-1144.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, *20*(2), 207-217.  
<https://doi.org/10.1094/mpmi-20-2-0207>
- Maddock, D., Kile, H., Denman, S., Arnold, D., & Brady, C. (2022). Description of three novel species of Scandinavium: *Scandinavium hiltneri* sp. nov., *Scandinavium manionii* sp. nov. and *Scandinavium tedordense* sp. nov., isolated from the oak rhizosphere and bleeding cankers of broadleaf hosts. *Frontiers in Microbiology*, *13*.
- Marathe, N.P., Salvà-Serra, F., Karlsson, R., Larsson, DG. J., Moore, E.R.B., Svensson-Stadler, L., & Jakobsson, H.E. (2019). *Scandinavium goeteborgense* gen. nov., sp. nov., a New Member of the Family Enterobacteriaceae Isolated From a Wound Infection, Carries a Novel Quinolone Resistance Gene Variant [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, *10*.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02511>
- Martínez-Alcántara, B. & Quinones, A. (2017). Principales bioestimulantes y efectos en el cultivo de los cítricos. *Vida rural*(436), 56-60.
- Martínez-González, L., Maqueira-López, L., Nápoles-García, M.C., & Núñez-Vázquez, M. (2017). Efecto de bioestimulantes en el rendimiento de dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Biofertilizados. *Cultivos Tropicales*, *38*, 113-118.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-)

- Meis, J.E. & Khanna, A. (2009). RNA amplification and cDNA synthesis for qRT-PCR directly from a single cell. *Nature Methods*, 6(12), an12-an13. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.280>
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual review of phytopathology*, 46, 101-122. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>
- Meng, L. & Feldman, L. (2010). A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from Arabidopsis siliques and dry seeds [<https://doi.org/10.1002/biot.200900211>]. *Biotechnology Journal*, 5(2), 183-186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biot.200900211>
- Mercado-Blanco, J. & Prieto, P. (2012). Bacterial endophytes and root hairs. *Plant and Soil*, 361(1), 301-306. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1212-9>
- Miljaković, D., Marinković, J., y Balešević-Tubić, S. (2020). The Significance of Bacillus spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*, 8(7).
- Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, L., & Bustillos-Cristales, M.d.R. (2017). Antagonism assays to identify bacterial strains producing antimicrobial compounds. *Protoc PLoS ONE*. 2017b, 12(11), 1-2.
- Moxley, R. A. (2022). Family Enterobacteriaceae. In *Veterinary Microbiology* (pp. 41-55). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119650836.ch5>
- Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y., Baez, A., Quintero-Hernandez, V., Rivera-Urbalejo, A., & Pérez Y Terrón, R. (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. In (pp. 67-82). <https://doi.org/10.5281/zenodo.5525235>
- Nanjundappa, A., Bagyaraj, D.J., Saxena, A.K., Kumar, M., & Chakdar, H. (2019). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and Bacillus spp. in soil enhancing growth of crop plants. *Fungal Biology and Biotechnology*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0086-5>
- Napsucialy-Mendivil, S. & Dubrovsky, J.G. (2018). Genetic and Phenotypic Analysis of Lateral Root Development in Arabidopsis thaliana. *Methods Mol Biol*, 1761, 47-

75. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7747-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7747-5_4)

- Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of Action of Bacterial Biological Control Agents. In P. Narayanasamy (Ed.), *Biological Management of Diseases of Crops: Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents* (pp. 295-429). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6380-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6380-7_5)
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., & Babalola, O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Pal, K.K. & Gardener, B.M. (2006). Biological control of plant pathogens.
- Panpatte, D.G., Jhala, Y.K., Shelat, H.N., & Vyas, R.V. (2016). *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. In D.P. Singh, H.B. Singh, & R. Prabha (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives* (pp. 257-270). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_15)
- Pedrosa Amado, A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2), 0-0.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., y Bennett, M.J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14(7), 399-408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- Pérez, R., González, T., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1, 53-60.
- Pirttilä, A.M., Mohammad Parast Tabas, H., Baruah, N., & Koskimäki, J.J. (2021). Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. *Microorganisms*, 9(4), 817.
- Poupin, M.J., Greve, M., Carmona, V., & Pinedo, I. (2016). A complex molecular interplay of auxin and ethylene signaling pathways is involved in Arabidopsis growth promotion by Burkholderia phytofirmans PsJN. *Frontiers in Plant Science*, 7, 492.
- Poveda, J. (2021). Trichoderma as biocontrol agent against pests: New uses for a

mycoparasite. *Biological Control*, 159, 104634.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>

Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time [<https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>]. *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263-275.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>

Quintero Rodríguez, E., Calero Hurtado, A., Pérez Díaz, Y., & Enríquez Gómez, L. (2018). Efecto de diferentes bioestimulantes en el rendimiento del frijol común. *Centro Agrícola*, 45, 73-80.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852018000300073&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852018000300073&nrm=iso)

Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., & Del-Val Buedo, R. (2015). Bacterias bioestimulantes del crecimiento y la mejora del estado nutritivo de la planta. *Vida rural*(396), 40-46.

Ram, R.M., Keswani, C., Bisen, K., Tripathi, R., Singh, S.P., & Singh, H.B. (2018). Chapter 10 - Biocontrol Technology: Eco-Friendly Approaches for Sustainable Agriculture. In D. Barh y V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 177-190). Academic Press.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815870-8.00010-3>

Ramos Cabrera, E.V., Bonilla, B., & Aguilar, M. (2018). Interacciones entre Plantas y Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal. *CITECSA*, 10(15), 23-31.

<https://revistas.unipaz.edu.co/index.php/revcitecsa/article/view/162>

Rebollar, E.A., Bridges, T., Hughey, M.C., Medina, D., Belden, L.K., & Harris, R.N. (2019). Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. *The ISME Journal*, 13(7), 1763-1775.

<https://doi.org/10.1038/s41396-019-0388-x>

Ribaudo, C.M., Krumholz, E.M., Cassán, F.D., Bottini, R., Cantore, M.L., & Curá, J.A. (2006). *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(2), 175-185. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0128-5>

Rico, A. & Preston, G.M. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Uses

Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 21(2), 269-282. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0269>

- Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H., & Mittler, R. (2004). The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 279(12), 11736-11743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313350200>
- Ross, A.A., Rodrigues Hoffmann, A., & Neufeld, J.D. (2019). The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome*, 7(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0694-6>
- Santacruz-García, A.C., Senilliani, M.G., Gómez, A.T., Ewens, M., Yonny, M.E., Villalba, G.F., & Nazareno, M.A. (2022). Biostimulants as forest protection agents: Do these products have an effect against abiotic stress on a forest native species? Aspects to elucidate their action mechanisms. *Forest Ecology and Management*, 522, 120446. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120446>
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.d.C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of Bacillus and Pseudomonas: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Serrano, M. & Guzmán, P. (2004). Isolation and gene expression analysis of Arabidopsis thaliana mutants with constitutive expression of ATL2, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. *Genetics*, 167(2), 919-929. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.028043>
- Singh, H.B. & Vaishnav, A. (2021). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Sustainable Agriculture: Microorganisms as Biostimulants*. Elsevier.
- Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K., & Vanderleyden, J. (2014). Phenotypical and molecular responses of Arabidopsis thaliana roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium Azospirillum brasilense

- [<https://doi.org/10.1111/nph.12590>]. *New Phytologist*, 201(3), 850-861.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.12590>
- Sukumar, P., Legué, V., Vayssières, A., Martin, F.M., Tuskan, G.A., & Kalluri, U.C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant, Cell & Environment*, 36 5, 909-919.
- Susilawati, L., Iwai, N., Komatsu, K., & Arie, T. (2021). Antifungal activity of bacteria isolated from Japanese frog skin against plant pathogenic fungi. *Biological Control*, 153, 104498.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104498>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Valasek, M.A. & Repa, J.J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159.
- Valenzuela Ruiz, V., Gálvez Gamboa, G.T., Villa Rodríguez, E.D., Parra Cota, F.I., Santoyo, G., & Santos-Villalobos, S.d.l. (2020). Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género Bacillus: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11, 419-432.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342020000200419&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342020000200419&nrm=iso)
- van Mourik, H., van Dijk, A.D.J., Stortenbeker, N., Angenent, G.C., & Bemer, M. (2017). Divergent regulation of Arabidopsis SAUR genes: a focus on the SAUR10-clade. *BMC Plant Biology*, 17(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1210-4>
- Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 5.  
<https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Varga, J.F.A., Bui-Marinos, M.P., & Katzenback, B.A. (2019). Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens [Review]. *Frontiers in Immunology*, 9(3128). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128>

- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, *21*(5), 573. <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/573>
- Veobides-Amador, H., Guridi-Izquierdo, F., & Vázquez-Padrón, V. (2018). Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. *Cultivos Tropicales*, *39*, 102-109. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362018000400015&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362018000400015&nrm=iso)
- Verbon, E.H. y Liberman, L.M. (2016). Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*, *21*(3), 218-229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
- Verma, S.K., Kingsley, K., Bergen, M., English, C., Elmore, M., Kharwar, R.N., & White, J.F. (2018). Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. *Plant and Soil*, *422*(1), 223-238. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3339-1>
- Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I., & Santos-Villalobos, S.d.l. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, *36*, 95-130. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-330920180001000095&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-330920180001000095&nrm=iso)
- Vleeshouwers, V.G.A.A. & Oliver, R.P. (2014). Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, *27*(3), 196-206. <https://doi.org/10.1094/mpmi-10-13-0313-ia>
- Vos, C.M.F., De Cremer, K., Cammue, B.P.A., & De Coninck, B. (2015). The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology*, *16*(4), 400-412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12189>
- Walke, J.B. & Belden, L.K. (2016). Harnessing the Microbiome to Prevent Fungal Infections: Lessons from Amphibians. *PLOS Pathogens*, *12*(9), e1005796. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005796>

- Woodhams, D.C., Bletz, M., Kueneman, J., & McKenzie, V. (2016). Managing Amphibian Disease with Skin Microbiota. *Trends Microbiol*, 24(3), 161-164. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.010>
- Xin, X.-F., Kvitko, B., & He, S.Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316-328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Xin, X.F. & He, S.Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 51, 473-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Yang, X., Lee, S., So, J.-h., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., & Estelle, M. (2004). The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCFTIR1. *The Plant Journal*, 40(5), 772-782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02254.x>
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., & Pieterse, C.M. (2013). Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiol*, 162(1), 304-318. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212597>
- Zaynab, M., Fatima, M., Sharif, Y., Zafar, M.H., Ali, H., & Khan, K.A. (2019). Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103728. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103728>
- 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), 673-683. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1272-z>
- Zhou, H., Duan, H., Liu, Y., Sun, X., Zhao, J., & Lin, H. (2019). Patellin protein family functions in plant development and stress response. *Journal of plant physiology*, 234, 94-97.

## **IX. ANEXOS**

## **Anexo 1. Medios de cultivo**

### **1.1 Medio LB (Luria Bertani)**

Medio para el cultivo de bacterias. En 1 litro de agua destilada, se disolvió 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 5 g de cloruro de sodio (J.T. Baker 3624-01) y 15 g de agar bacteriológico (BIOXON). Luego, se esterilizó en autoclave a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) durante 18 minutos.

### **1.2 Medio Murashige-Skoog 0.2x (MS 0.2x) pH:5.7**

Medio de cultivo para plantas. En 1 litro de agua destilada, se disolvieron 0.892 g de Murashige-Skoog Basal Salt Mixture (SIGMA Life Science M5524), 6 g de sacarosa (J.T.Baker 4072-01), 7 g de agar bacteriológico (BIOXON) y se ajustó a un pH de 5.7. Después, se esterilizó en autoclave a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) durante 18 minutos.

### **1.3 Medio Triptona 1%**

En 1 litro de agua destilada se disolvieron 10 g de triptona y 15 g de agar bacteriológico (BIOXON). Luego, se esterilizó en autoclave a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) durante 18 minutos.

## **Anexo 2.** Protocolo de extracción de ARN Total con TRIzol

1. Etiquetar los tubos Eppendorf con el nombre de las muestras a analizar.
2. Introducir las muestras en los tubos Eppendorf. Se agrega la misma cantidad de muestra en cada tubo (5 plántulas).
3. Colocar los tubos Eppendorf perfectamente cerrados dentro del contenedor con nitrógeno líquido.
4. Empezar a triturar con los pistilos, previamente esterilizados, hasta obtener un polvillo fino.
5. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol, agitar vigorosamente haciendo uso del vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
6. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo frío, agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
7. Centrifugar a 12'500 rpm durante 15 min a 8°C.
8. Recuperar la fase acuosa, tomando la parte superior y transferir a un segundo tubo Eppendorf estéril.
9. Agregar 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío al segundo tubo y dejar durante un par de minutos a temperatura ambiente.
10. Agitar gentilmente con las manos e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
11. Centrifugar a 12'500 durante 15 min a 8°C. Pasado el tiempo, se debe observar el pellet en el fondo del tubo.
12. Desechar el sobrenadante con cuidado.
13. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de alcohol etílico (70%) al tubo conteniendo el pellet y centrifugar durante 5 min a 12'500 rpm a 8°C.
14. Desechar el alcohol, con cuidado de no llevarse el pellet y dejar secar ligeramente.
15. Suspender en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada libre de nucleasas ( $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC) y almacenar a -20°C.

### **Anexo 3.** Purificación de ARN con Cloruro de litio (LiCl) 2M

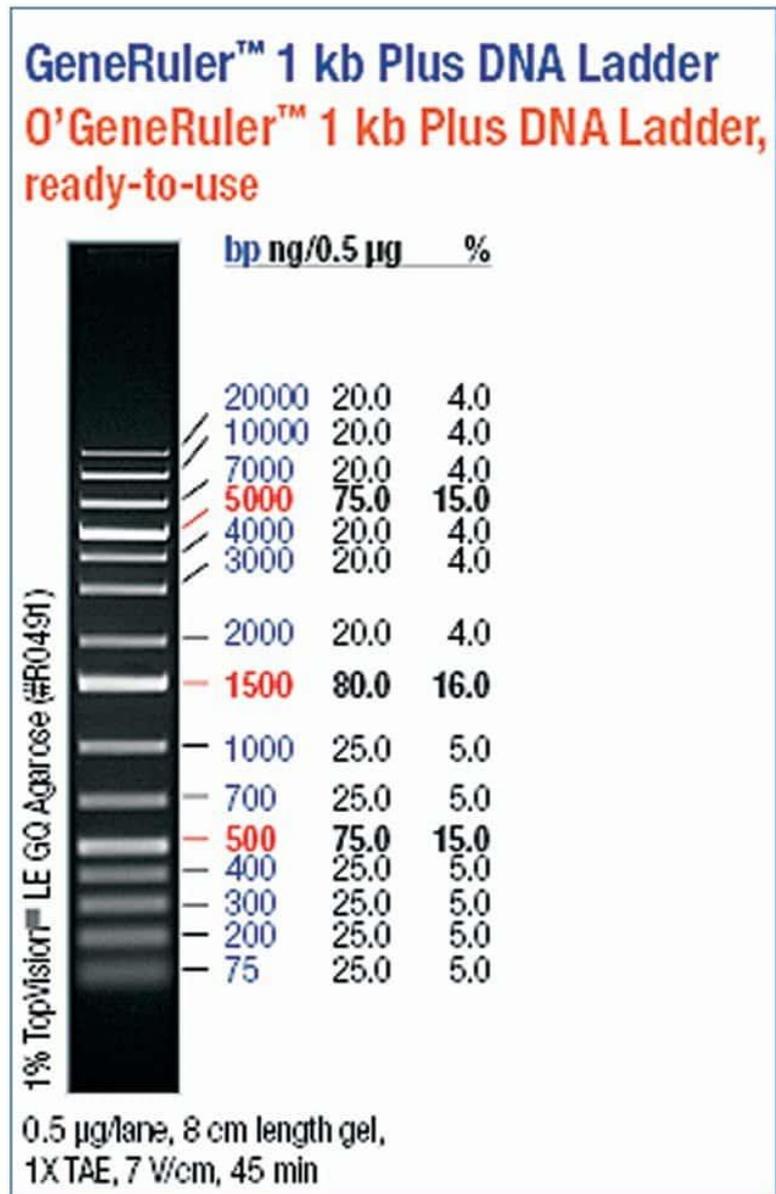
1. Agregar 50  $\mu$ L de LiCl (2M) y dejar precipitar el RNA durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Centrifugar a 12'500 rpm durante 10 min a  $8^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo, desechar el sobrenadante.
3. Se agrega 500  $\mu$ L de alcohol etílico (70%) frío y mezclar gentilmente con las manos.
4. Centrifugar a 12'500 rpm durante 15 min.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender en 50  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC.

**Anexo 4.** Efecto fitoestimulante en plantas de *A. thaliana* bajo condiciones de invernadero

Tratamiento 1 Control	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
<i>A. thaliana</i> con infiltración foliar de MgCl <sub>2</sub>	<i>A. thaliana</i> + cepa de interés	<i>A. thaliana</i> + <i>P. syringae</i>	<i>A. thaliana</i> + cepa de interés + <i>P. syringae</i>

Cada tratamiento tendrá 35 plantas de *A. thaliana*

Anexo 5. Marcador 1Kb Plus Thermo Scientific™



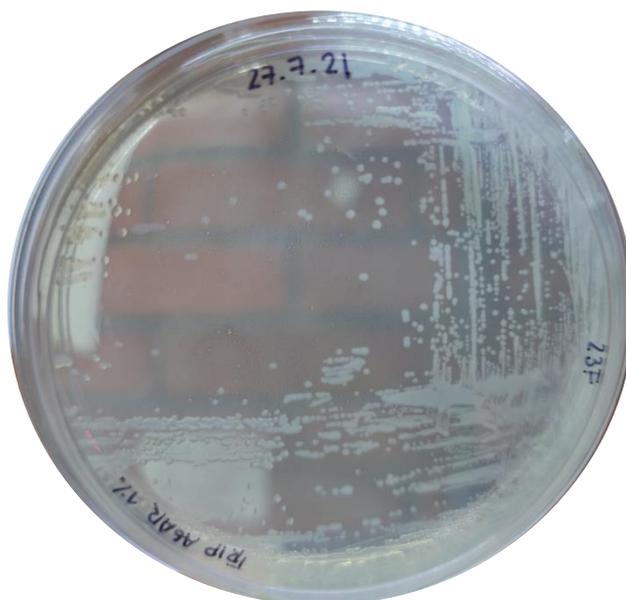
**Anexo 6.** Nomenclatura de los genes a analizar

<b>Nombre de gen</b>	<b>ID Oligo/Nombre</b>	<b>Observación</b>	<b>Secuencia de cebadores</b>	<b>Referencia</b>
<i>ACTIN</i>	AT4G26410 –fw	Control endógeno qRT-PCR. Gen de referencia estable	GAG GTG AAG TGG CTT CCA TGA C	(Czechowski <i>et al.</i> , 2005)
	AT4G26410 –rv		GGT CCG ACA TAC CCA TGA TCC	
<i>CF150</i>	AT1G72150-fw	Control endógeno qRT-PCR	CCG ACA AGG AGA AGC TTA ACA AGT T	(Serrano y Guzmán, 2004)
	AT1G72150-rv		CGG CAG ATT TGG ATG GAC CAG CAA G	
<i>PRI</i>	AT2G14610-fw	Genes de defensa-Ac. Salicílico	TTC TTC CCT CGA AAG CTC AA	(Hael-Conrad <i>et al.</i> , 2015)
	AT2G14610-rv		AAG GCC CAC CAG AGT GTA TG	
<i>PR4</i>	AT3G04720-fw	Genes de defensa-Etileno	GTA CCA CCG CGG ACT ACT GT	(Hael-Conrad <i>et al.</i> , 2015)
	AT3G04720-rv		TGG AGC AAT AAG CAG TCA CG	
<i>PDF1.2</i>	AT5G44420-fw	Genes de defensa-Jasmonato	CCA AGT GGG ACA TGG TCA G	(Hael-Conrad <i>et al.</i> , 2015)
	AT5G44420-rv		ACT TGT GTG CTG GGA AGA C	
<i>ZAT12</i>	AT5G59820-fw	Genes de defensa-ROS	ATC AAG TCG ACG GTG GAT GT	(Rizhsky <i>et al.</i> , 2004)
	AT2G59820-rv		ACA AAG CGT CGT TGT TAG GC	
<i>IAA1</i>	AT1G04250-fw	Gen para Auxina	TGT TGG TCG GTG ATG TTC CA	(Hu <i>et al.</i> , 2012)
	AT1G04250-rv		TGC CTC GAC CAA AAG GTG TT	
<i>SAUR9</i>	AT4G36110-fw	Gen para Auxina	GAA GAC GGA AGC AAA TGG CG	PGFE-UNAM
	AT4G36110-rv		CCT CTC AAG AAC CAA CGG TCA	

**Anexo 7.** Fotos del desarrollo de la investigación



Medio LB agar con rifampicina (izquierda) y medio LB líquido (derecha)



Cultivo de la cepa C23F en medio Triptona 1%



Germinación de plántulas de *A. thaliana*  
después de 7 días en medio MS 0.2X



Plantas de *A. thaliana* de aproximadamente 28  
días



Inoculación de la cepa C23F en la rizósfera de plantas de *A. thaliana*



Hoja de *A. thaliana* infiltrada por el envés con *P. syringae*

**Anexo 8.** Estadística de la qRT-PCR de los genes analizados

Table Analyzed	PR1
Column B	C23F
vs.	vs.
Column A	CTRL
<b>Unpaired t test</b>	
P value	0.3959
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.072, df=2
<b>How big is the difference?</b>	
Mean of column A	0.0002348
Mean of column B	2.581
Difference between means (B - A) ± SEM	2.581 ± 2.407
95% confidence interval	-7.777 to 12.94
R squared (eta squared)	0.3650

Gen PR1 (respuesta a ácido salicílico)

Table Analyzed	PR4
Column B	C23F
vs.	vs.
Column A	CTRL
<b>Unpaired t test</b>	
P value	0.0530
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.168, df=2
<b>How big is the difference?</b>	
Mean of column A	0.1352
Mean of column B	5.579
Difference between means (B - A) ± SEM	5.444 ± 1.306
95% confidence interval	-0.1757 to 11.06
R squared (eta squared)	0.8968

Gen PR4 (respuesta a etileno)

Table Analyzed	Jasmonato
Column B	C23F
vs.	vs.
Column A	CTRL
<b>Unpaired t test</b>	
P value	0.3079
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.356, df=2
<b>How big is the difference?</b>	
Mean of column A	0.002181
Mean of column B	0.5462
Difference between means (B - A) ± SEM	0.5440 ± 0.4012
95% confidence interval	-1.182 to 2.270
R squared (eta squared)	0.4790

Gen PDF 1.2 (respuesta a ácido jasmónico)

Table Analyzed	AUX IAA1
Column B	C23F
vs.	vs.
Column A	CTRL
<b>Unpaired t test</b>	
P value	0.0410
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.449, df=3
<b>How big is the difference?</b>	
Mean of column A	0.03355
Mean of column B	0.8741
Difference between means (B - A) ± SEM	0.8406 ± 0.2437
95% confidence interval	0.06507 to 1.616
R squared (eta squared)	0.7986

Gen IAA1 (respuesta a auxina)

Table Analyzed	AUX SAUR
Column B	C23F
vs.	vs.
Column A	CTRL
<b>Unpaired t test</b>	
P value	0.0882
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.493, df=3
<b>How big is the difference?</b>	
Mean of column A	0.006848
Mean of column B	0.2235
Difference between means (B - A) ± SEM	0.2167 ± 0.08691
95% confidence interval	-0.05989 to 0.4933
R squared (eta squared)	0.6745

Gen SAUR9 (respuesta a ácido abscísico, brasinoesteroides y auxinas)

Table Analyzed	ROS
Column B	C23F
vs.	vs.
Column A	CTRL
<b>Unpaired t test</b>	
P value	0.0077
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=11.35, df=2
<b>How big is the difference?</b>	
Mean of column A	0.09583
Mean of column B	0.7973
Difference between means (B - A) ± SEM	0.7015 ± 0.06182
95% confidence interval	0.4355 to 0.9675
R squared (eta squared)	0.9847

Gen ZAR12 (respuesta a especies reactivas de oxígeno)