



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS OPCION BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



Efecto de la coinoculación de *Bacillus toyonensis* COPE52 y otras bacterias sobre el crecimiento de arándano (*Vaccinium* spp.) y el biocontrol de hongos fitopatógenos

TESIS

que presenta

M.C. Miguel Contreras Pérez

Como requisito para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental

Director de tesis:

D.C. Gustavo Santoyo Pizano

Co-directora de tesis:

D.C. Ma. del Carmen Rocha Granados

Morelia, Michoacán, octubre de 2019

Agradecimientos

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de este proyecto, bajo el registro de becario 276770.

Al programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental, al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Índice

I. Resumen.....	i
II. Abstract.....	ii
1. Introducción.....	1
2. El problema de los químicos en la agricultura.....	4
3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB).....	5
4. Promoción del crecimiento vegetal del género <i>Bacillus</i>	8
5. Genómica del género <i>Bacillus</i>	10
6. <i>Bacillus toyonensis</i>	12
7. Antecedentes.....	13
8. Planta modelo: arándano.....	18
9. Justificación.....	20
10. Hipótesis.....	21
11. Objetivos.....	22
12. Metodología.....	23
13. Resultados.....	24
13.1 Capítulo 1.....	24
13.2 Capítulo 2.....	30

14. Discusión.....	37
15. Conclusión.....	40
16. Bibliografía.....	40
17. Anexos: publicaciones adicionales.....	51

Índice de figuras

Figura1. Producción nacional anual de arándano.....	18
Figura 2. Pedigree de arándano (<i>Vaccinium</i> spp.) var. Biloxi.....	19

Resumen

El objetivo de esta investigación fue dilucidar el genoma de la cepa promotora del crecimiento vegetal COPE52 y su efecto durante la coinoculación con otras bacterias benéficas para promover el crecimiento de plantas de arándano (*Vaccinium* spp.). Mediante la secuenciación del genoma y herramientas bioinformáticas como BLAST, ANI y GGDC, se identificó al aislado COPE52 como *Bacillus toyonensis*. La cepa COPE52 mostró excelente capacidad para promover el crecimiento de plantas de arándano, variedad Biloxi y selección 811A, aumentando la biomasa total, principalmente en la raíz, comparado con plantas sin inocular. Adicionalmente, se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* para probar la acción de compuestos difusibles y compuestos volátiles, observándose un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea*. También, se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* contra hongos fitopatógenos en coinoculación con otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), detectándose cinco nuevos consorcios con potencial para inhibir en mayor grado el crecimiento de los fitopatógenos. Finalmente, se caracterizó morfológica y molecularmente un aislado fúngico del género *Lasiodiplodia* que infecta plantas de zarzamora, siendo el primer reporte en el Estado de Michoacán, México.

Palabras clave: *Bacillus toyonensis*; Promoción del crecimiento vegetal; arándano; antagonismo, secuenciación.

Abstract

The aim of this research was to elucidate the genome of the plant growth promoting strain COPE52 and its effect during coinoculation with other beneficial bacteria to promote the growth of blueberry plants (*Vaccinium* spp.). Through genome sequencing and bioinformatics tools such as BLAST, ANI and GGDC, the isolate COPE52 was identified as *Bacillus toyonensis*. The strain COPE52 showed excellent ability to promote the growth of blueberry plants of the Biloxi and 811a varieties, increasing the total biomass, mainly at the root, compared to uninoculated plants. Additionally, *in vitro* antagonistic bioassays were performed to test the action of diffusible and volatile compounds, with a greater inhibitory effect on the growth of the mycelium of *Botrytis cinerea*. In addition, *in vitro* tests of antagonism against phytopathogenic fungi were carried out in coinoculation with other plant growth promoting bacteria (PGPB), detecting five new consortia with the potential to inhibit the phytopathogen growth largely. Finally, a fungal isolate of the genus *Lasiodiplodia* that infects blackberry plants was morphologically and molecularly characterized, being the first report in the State of Michoacán, México.

Key words: *Bacillus toyonensis*; Plant growth promotion; blueberry; antagonism.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas durante las diferentes etapas de su desarrollo establecen relaciones con microorganismos como bacterias, hongos, oomicetos, nematodos, protozoarios, algas, virus y artrópodos (Bhattacharya y Jha, 2012; Mendes *et al.*, 2013); dichas interacciones se dan principalmente en la zona del suelo influenciada por los exudados radiculares, conocida como rizosfera. El término rizosfera fue introducido originalmente por Lorenz Hiltner hace más de cien años (1904) y es en este microambiente donde interaccionan los microorganismos del suelo con las plantas, ya que esta es la zona donde son liberados los exudados radiculares, los cuales son utilizados por los microorganismos como nutrientes que les permiten proliferar (Hartmann *et al.*, 2008; Hirsch y Mauchline, 2012).

Existen también interacciones que se dan en otras zonas de las plantas como la filósfera y la endosfera. La filósfera se refiere a la zona exterior de los tejidos vegetales superiores y la endosfera son los tejidos internos de las plantas. Las interacciones planta-microorganismo, sin importar la zona en la que se lleven a cabo, se pueden clasificar en benéficas, perjudiciales o neutras (Raaijmakers *et al.*, 2009); sin embargo, a pesar de la gran importancia que estas interacciones puedan tener, es difícil estudiarlas todas por la complejidad de las mismas, de hecho, se sabe que existen más de 300,000 especies vegetales en el mundo, las cuales pueden interactuar con las comunidades microbianas, lo que supone también que podrían existir el mismo número de interacciones específicas. Algo importante a destacar es que la gran mayoría de estas comunidades microbianas permanecen sin ser caracterizadas, ya que se cree que solo el 7% de las comunidades se han identificado (Hirsch y Mauchline, 2012); sin embargo, se puede predecir que muchos de estos microorganismos sin identificar interactúan con las plantas de forma benéfica o negativa, lo que hace necesario su estudio y mejor conocimiento. Las investigaciones dirigidas a estas comunidades complejas han sido obstaculizadas por el hecho de que el 99% de estos microorganismos no son cultivables, por lo tanto, este gran porcentaje por descubrir sugiere un gran interés ecológico, así como

un gran potencial para diversas aplicaciones en la industria agrícola, la medicina, entre otras (Mora *et al.*, 2011).

A la totalidad de microorganismos que interactúan con las plantas se le conoce como microbioma, y se ha observado que presenta múltiples efectos benéficos hacia las plantas, como lo son conferir tolerancia al estrés abiótico, mejorar la adquisición de nutrientes, protección contra fitopatógenos, activar la respuesta inmune de las plantas, entre otros (Mendes *et al.*, 2013). Derivado de la gran diversidad de efectos que se han observado (del microbioma a las plantas), es de suma importancia su estudio y entendimiento ya que esto puede dilucidar como aumentar la productividad de los cultivos de una manera amigable con el medio ambiente (Finkel *et al.*, 2017; Jansson y Hofmockel, 2018; Schenk *et al.*, 2012).

El microbioma rizosférico es diverso por la gran cantidad de nutrientes que se encuentran disponibles en esta zona del suelo, debido a la interacción con los exudados radiculares, y es aquí donde se efectúan muchas de las interacciones que derivan en la promoción del crecimiento vegetal, ya que los exudados atraen a microorganismos benéficos que contrarrestan los efectos de los patógenos y ayudan a las plantas en la toma de nutrientes, existe una promoción del crecimiento vegetal de manera directa e indirecta (Berendsen *et al.*, 2013; Durán *et al.*, 2018). Existen trabajos en donde se ha visto que el microbioma endófito es un subconjunto del microbioma rizosférico (Márquez-Santacruz *et al.*, 2010), ya que los microorganismos pueden colonizar los tejidos internos de las plantas a partir de la rizosfera por diversos puntos denominados “hot spots” como lo son las lenticelas, los estomas, heridas o rupturas en la raíz (Santoyo *et al.*, 2016) y que este microambiente resulta favorable para los microorganismos endófitos ya que existe una menor disputa por el nicho así como mayor disponibilidad de nutrientes, además de que su efecto en las plantas puede ser mayor (comparado con los rizosféricos) debido a que se encuentran más estrechamente relacionados con las plantas y la concentración de metabolitos que producen, necesaria para tener efecto en el crecimiento de las plantas; es menor, adicionalmente que en la rizosfera pues existen factores bióticos y abióticos que pueden modular negativamente el efecto

de estas metabolitos hacia las plantas (Coutinho *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2008; Santoyo *et al.*, 2017). El microbioma de la filósfera también ofrece beneficios a las plantas, ya que se ha reportado que ayuda al biocontrol de fitopatógenos, así como a la adquisición de nutrientes necesarios para las plantas, con lo que también se promueve el crecimiento vegetal (Compant *et al.*, 2019).

Con anterioridad se ha estudiado como las plantas tienen la capacidad de modular el microbioma mediante los exudados radiculares, ya que estos exudados varían dependiendo del genotipo y estadio de desarrollo de las plantas modificando así su microbioma asociado (Sasse *et al.*, 2018). Lo que resalta la importancia del estudio del microbioma asociado a plantas es el que se encuentra asociado a las raíces, ya que es el más abundante y diverso, por lo que se le atribuyen numerosos efectos en las plantas, y su análisis puede dar una idea más clara sobre las interacciones intra e inter especies y como éstas repercuten en la salud de las plantas (Dini-Andreote y Raaijmakers, 2018; Mauchline y Malone, 2017).

Además de esta modulación del microbioma ejercido por las plantas, también se ha estudiado el efecto que tiene la introducción de bacterias de manera exógena en el microbioma natural de las plantas, se ha visto que al inocular bacterias endófitas o rizosféricas, modifica el microbioma nativo, lo cual, promueve el crecimiento vegetal. La modificación del microbioma asociado a la planta se conoce como ingeniería del microbioma (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018; Vorholt *et al.*, 2017), en el que se busca potencializar el efecto que de promoción de crecimiento vegetal y biocontrol. Un ejemplo de la ingeniería del microbioma es el trabajo realizado por Hernández-León y colaboradores (Hernández-León *et al.*, 2015), en el que se observa que al realizar inoculaciones de plantas con cultivos de una sola cepa, se promueve el crecimiento vegetal comparado con las plantas sin inocular; también se ha observado en trabajos como el de Rojas-Solis y colaboradores (Rojas-Solis *et al.*, 2018) que la adición de consorcios bacterianos, puede tener un efecto aditivo en la promoción del crecimiento vegetal, comparado con plantas control sin inocular y plantas inoculadas con cultivos de una cepa, con esto se busca disminuir el uso de productos químicos y lograr la transformación hacia una agricultura sustentable y

amigable con el medio ambiente, ya que el uso de productos químicos puede tener consecuencias para el medio ambiente.

2. EL PROBLEMA DE LOS QUÍMICOS EN LA AGRICULTURA

La fertilización sirve para aumentar la productividad de los campos agrícolas, en la actualidad, en la mayoría de los cultivos agrícolas se usa y abusa de los fertilizantes y pesticidas, lo cual puede tener un impacto en el medio ambiente debido a la acumulación de los metales pesados con los que son hechos estos productos químicos, convirtiéndose así, en un contaminante. Si bien se dice que cualquier sustancia que se encuentre fuera de lugar o en concentraciones mayores a las normales se puede considerar como un contaminante, los fertilizantes y pesticidas químicos son los que mayormente afectan al medio ambiente y por ende la salud pública (Brusseau y Artiola, 2019).

Los fertilizantes químicos pueden contaminar los mantos acuíferos, principalmente los nitratos (NO_3^-) que son el componente principal de su formulación, las plantas no aprovechan más del 50% de los fertilizantes nitrogenados aplicados, el resto se acumula en el suelo y es lixiviado a los mantos acuíferos, además de nitratos, los contaminantes también se pueden encontrar como nitritos (NO_2^-), nitrógeno molecular (N_2), óxido nitroso (N_2O), nitrógeno orgánico y amonio (NH_4^+), los cuales pueden causar desde problemas digestivos leves hasta intoxicaciones severas en el humano. El uso excesivo de fertilizantes químicos también causa contaminación de los suelos, ya que en su formulación también contienen altos contenidos de sodio (Na^+) y potasio (K^+), que modifican el pH del suelo y aunado a esto, los iones se acumulan en los suelos, lo que aumenta la salinidad del suelo hasta que estos dejan de ser óptimos para el cultivo agrícola. Además de todo esto, los fertilizantes químicos también causan la contaminación del aire, ya que con su aplicación se libera al ambiente diferentes óxidos de nitrógeno como son el óxido nítrico (NO),

óxido nitroso (N₂O) y dióxido de nitrógeno (NO₂) que se encuentran relacionados con el aumento del efecto invernadero, también se puede liberar al ambiente amoníaco (NH₃) que puede ser oxidado y causar la lluvia ácida, ya que la oxidación del amoníaco produce ácido nítrico (HNO₃) y ácido sulfúrico (H₂SO₄), además de causar contaminación de los frutos y follaje al depositarse en el exterior de las mismas. Por estos motivos es que se busca el caminar hacia una agricultura sustentable con el uso de biofertilizantes (Habibzadeh *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2007; Savsi, 2012; Zandvakili *et al.*, 2012).

3. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPB)

Para mitigar el efecto nocivo de los fertilizantes químicos sobre el medio ambiente se buscaron opciones, entre las que destaca el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Bacteria). En este término se engloban las bacterias rizosféricas y las bacterias endófitas con capacidad de promover el crecimiento vegetal. Las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal o PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) se pueden definir como las bacterias que se encuentran en la rizosfera de las plantas y tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal ya sea de manera directa o indirecta (Bhattacharyya y Jha, 2012). Las bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal o PGPEB por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria) se definen como aquellas bacterias que tienen la capacidad de colonizar los tejidos internos de las plantas sin causarle un daño aparente y que promueven su crecimiento (Hardoim *et al.*, 2008; Kandel *et al.*, 2017; Rashid *et al.*, 2012). Los mecanismos con los que cuentan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son muy variados, y de manera general se pueden clasificar en mecanismos directos y mecanismos indirectos (Compant *et al.*, 2010; Etesami y Maheshwari, 2018; Ferreira *et al.*, 2019; Gouda *et al.*, 2018).

Entre los mecanismos de las bacterias para promover el crecimiento vegetal destacan la producción del ácido indol 3-acético (AIA), el cual ya se ha reportado como una fitohormona que estimula el crecimiento vegetal y su producción se encuentra distribuida en diversos géneros bacterianos como lo son los géneros *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter*, por mencionar algunos (Khan *et al.*, 2016); la producción de la enzima ACC desaminasa, la cual disminuye los niveles de etileno en la planta, con lo cual la ayuda a tolerar el estrés causado por sequía, salinidad, metales pesados o ataque de patógenos, el mecanismo de acción de esta enzima es reduciendo la cantidad del precursor de etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), escindiéndolo en α -cetobutirato y amonio, los cuales pueden ser usados por la planta y la bacteria como fuente de energía y nitrógeno (Glick, 2014); la producción de enzimas líticas como quitinasas y glucanasas, las cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Won *et al.*, 2019); la solubilización de fosfatos para que este se encuentre en formas biodisponibles, se puede llevar a cabo por diversos mecanismos bacterianos como lo son la acidificación, quelación, reacciones de intercambio catiónico y la disolución de compuestos minerales (Hanaka *et al.*, 2019); la producción de sideróforos, los cuales quelan el hierro para poder asimilarlo además de limitarlo para los patógenos (Abbamondi *et al.*, 2016); la fijación de nitrógeno atmosférico para la promoción del crecimiento vegetal convirtiéndolo en amonio y nitratos (Garrido-Oter *et al.*, 2018); la producción de biofilm, el cual se encuentra relacionado con la colonización y tolerancia al estrés salino (Sahoo *et al.*, 2018); la activación del sistema de defensa en plantas (ISR) por la vía del jasmonato como sistema de biocontrol (Shameer y Prasad, 2018); la producción de antibióticos de amplio espectro con el 2,4-diacetilfluoroglucinol (2,4-DAPG), el cual tiene efecto en contra de una gran diversidad de fitopatógenos y es producido por bacterias del género *Pseudomonas* (Andreolli *et al.*, 2019; Hernández-León *et al.*, 2015); la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) con la capacidad de promover el crecimiento vegetal, como lo son el 2,3-butanediol y la acetoina (Ryu *et al.*, 2003), así como la producción de algunos otros compuestos orgánicos volátiles con capacidad de antagonizar hongos fitopatógenos, como lo son el dimetil

disulfuro (DMDS) y el ácido cianhídrico (HCN) (Kandel *et al.*, 2017; Rojas-Solis *et al.*, 2018; Vurukonda *et al.*, 2018); conferir resistencia a las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico, como lo es la tolerancia a metales pesados mediante la acumulación o depuración de los metales pesados como el mercurio (Durand *et al.*, 2018), la tolerancia a la sequía mediante la producción de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), ácido giberélico, citocininas y la producción de exopolisacáridos (Vurukonda *et al.*, 2016) y la tolerancia a la salinidad mediante el aumento en la producción de la enzima ACC desaminasa para la disminución de los niveles de etileno en planta, la reducción del estrés oxidativo con el aumento en las enzimas nitrato reductasa, superóxido dismutasa y la actividad nitrogenasa, la regulación de los transportadores de Na⁺ y K⁺, aumento en la producción de prolina, betaína y glicina, reducción de la lipoperoxidación de los lípidos y el aumento en la concentración de trealosa (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2019; Shrivastava y Kumar, 2015).

Además de todas estas actividades con las que cuentan las bacterias para promover el crecimiento vegetal, también se debe considerar el efecto al introducir una bacteria a un microbioma específico, ya que el efecto de promoción del crecimiento, ya sea por mecanismos directos o indirectos, que se pueda observar en ensayos *in vitro*, no será el mismo que se observe en ensayos de invernadero o en ensayos en campo, debido a que el microbioma asociado a las plantas no será el mismo y las interacciones que se den serán muy diferentes, es por eso que se deben considerar los efectos aditivos que se puedan dar entre las bacterias y como modificar apropiadamente el microbioma para una mayor promoción vegetal con el uso de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Hanaka *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2017; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018; Rojas-Solis *et al.*, 2018; Sessitch *et al.*, 2019).

4. PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DEL GÉNERO *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran distribuidas de manera cosmopolita, por lo que se pueden aislar de suelos, agua y asociados a plantas, el tener la capacidad de formar endosporas, les confiere una ventaja ante otros géneros bacterianos, la esporulación se activa cuando la bacteria se encuentra sometida a algún tipo de estrés como un aumento en la densidad poblacional, escases de nutrientes, salinidad, temperatura y pH, por mencionar algunos (Villareal-Delgado *et al.*, 2018). Además de la capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés, las bacterias del género *Bacillus*, se encuentran equipadas con una amplia batería de mecanismos capaces de estimular el crecimiento vegetal y antagonizar fitopatógenos, motivo por el cual en nuestro grupo de trabajo nos interesa trabajar con aislados bacterianos pertenecientes a este género.

Entre los mecanismos presentes en las bacterias del género *Bacillus*, destacan: la capacidad de producir lipopéptidos, como lo son surfactina, iturina, fengicina, bacilibactina, difucidina, butirocina, por mencionar algunos, los cuales tienen actividad antimicrobiana, antifúngica, inmunosupresora, antitumoral y biosurfactante (Chen *et al.*, 2019; Grady *et al.*, 2019); la producción de péptidos ribosomales con diversas modificaciones postraduccionales llamados lanthipéptidos, como la thuricina 4A-4 y la thuricina 4A-4D, de los cuales se ha estudiado su capacidad bactericida (Xin *et al.*, 2015); la capacidad de producir biofilm y exopolisacáridos, que se encuentran relacionados con la colonización bacteriana y de forma indirecta con la promoción del crecimiento vegetal (Ansari y Ahmad, 2019; Martins *et al.*, 2018); la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC) con actividad antagónica en contra de diversos hongos fitopatógenos (Asari *et al.*, 2016); la producción de ácido indol acético (AIA) que promueve el crecimiento vegetal (Akinrinlola *et al.*, 2018); la producción de compuestos orgánicos volátiles del tipo ciclo lipopéptidos, albuterol y 1,3-propanediol, con la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Hossain *et al.*, 2019; Tahir *et al.*, 2017); la capacidad de conferir a las plantas tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico, como salinidad, para promover su crecimiento (Shamer y Prasad, 2018); la producción de diversos

compuestos antibióticos como iturina, bacilisina, baciliomicina, surfactina, subtilina y subtulosina (Vinodkumar *et al.*, 2017).

Como ya se mencionó anteriormente, las diferentes especies del género *Bacillus* pueden interactuar con una amplia gama de plantas, con lo que modula el microbioma y se mejoran las condiciones de crecimiento, algunos ejemplos son: *Bacillus subtilis* FZB37 promueve el crecimiento de plantas de maíz produciendo ácido indolacético (Idris *et al.*, 2004); *Bacillus megaterium* UMCV1 promueve el crecimiento de plantas de frijol mediante la reducción del hierro (López-Bucio *et al.*, 2006); *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a promueven el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* mediante la producción de los compuestos orgánicos volátiles 2-3 butanediol y acetoina (Ryu *et al.*, 2003); *Bacillus cereus* L254, *Bacillus cereus* L266 y *Bacillus* sp. L272a promueven el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles; *Bacillus* sp. UM96 promueve el crecimiento de *Medicago truncatula* antagonizando a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Diaporthe phaseolorum* mediante la producción de proteasas y quitinasas (Rojas-Solis *et al.*, 2013); *Bacillus acidiceler* R228 produce proteasas y ácido indolacético, *Bacillus megaterium* R181 inhibe bacterias y hongos fitopatógenos, produce proteasas, sideróforos, ácido indolacético y solubilización de fosfatos *Bacillus megaterium* R232 produce proteasas, sideróforos, ácido indolacético y solubilización de fosfatos, *Bacillus pumilus* R174 inhibe hongos fitopatógenos, produce proteasas y biosurfactantes, *Bacillus pumilus* R183 inhibe bacterias y hongos fitopatógenos, produce proteasas y biosurfactantes, *Bacillus pumilus* R190 inhibe bacterias y hongos fitopatógenos, produce proteasas, biosurfactantes y sideróforos, *Bacillus safensis* R173 produce proteasas, biosurfactantes, ácido indolacético y solubilización de fosfatos, *Bacillus safensis* R176 produce proteasas, biosurfactantes y ácido indolacético, *Bacillus simplex* R180 produce proteasas y sideróforos, con lo que promueven el crecimiento de plantas de maíz (Akinrinlola *et al.*, 2018).

5. GENÓMICA DEL GÉNERO *Bacillus*

Dentro de todas las especies que existen del género *Bacillus*, es de gran interés un pequeño grupo estrechamente relacionado, conocido como *Bacillus cereus sensu lato*, el cual está conformado por bacterias aerobias Gram positivas, con forma de bastón y formadoras de esporas que se encuentran distribuidas ampliamente en diversos ambientes naturales. Las especies que comprenden este grupo son *Bacillus anthracis* (el agente causal del ántrax), *Bacillus cereus sensu stricto* (se ha reportado como promotora del crecimiento vegetal, pero también capaz de causar intoxicación alimentaria), *Bacillus thuringiensis* (utilizado para controlar plagas de insectos), *Bacillus mycoides* (induce el sistema de resistencia en la planta), *Bacillus pseudomycoides* (sintetiza péptidos antimicrobianos), *Bacillus citotoxicus* (es termotolerante y citotóxica), *Bacillus weihenstephanensis* (es psicotolerante y causal de deterioro en los alimentos), *Bacillus toyonensis* (probiótico en nutrición animal), *Bacillus bigmayongensis* (produce indoles), *Bacillus gamokensis* (produce indoles y tiene la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono) y *Bacillus manliponensis* (putativo bioremediador de suelos contaminados). A lo largo de los años se han utilizado diferentes metodologías fenotípicas y genotípicas para distinguir a estas especies, como lo son la amplificación del gen ribosomal 16S, la presencia o ausencia de plásmidos de virulencia, morfología colonial, temperatura de crecimiento, por mencionar algunos, que no satisfacían puntualmente la necesidad de distinguir entre las especies del grupo, dejando solo la opción de hibridaciones DNA-DNA costosas y laboriosas (Bazinet, 2017; Liu *et al.*, 2015; Okinaka y Keim, 2016). Debido a esto, se desarrollaron técnicas de biología molecular, con las que se busca identificar las especies a las que pertenezcan los aislados con los que se esté trabajando, logrando esto de una manera rápida y lo más confiable, por lo que se desarrollaron técnicas de comparación de genomas completos, el índice de nucleótidos promedio o ANI por sus siglas en inglés, en el cual se realiza una comparación de más de 1000 genes del genoma de interés con el genoma de referencia, presentando una correlación linear con la hibridación experimental DNA-DNA (DDH), determinando que valores de $95 \pm 0.5\%$ de ANI

equivale a valores de 70% en DDH, que es considerado el estándar de oro para asignar una especie de manera fehaciente (Arahal, 2014; Varghese *et al.*, 2015).

Se ha propuesto cambiar el estándar de oro de la hibridación DNA-DNA, por una técnica que sea más económica e igual de útil, la hibridación DNA-DNA *in silico* o dDDH por sus siglas en inglés (display DNA-DNA hybridization), que es una metodología, de manera general, que se basa en la comparación de los nucleótidos que componen el genoma completo problema y el genoma de cepas tipo (T) disponibles en las bases de datos. Con base en esto, Chun y colaboradores (Chun *et al.*, 2018) propusieron una guía para aplicar los datos obtenidos en la secuenciación de genomas con fines taxonómicos y proponen los estándares mínimos de calidad para poder realizar este proceso de manera confiable, esto se refiere a lo que ellos llaman índices relacionados al genoma completo u OGRIS por sus siglas en inglés (Overall Genome Related Index). Los pasos generales a seguir son los siguientes: partiendo de un genoma secuenciado, se identifican las cepas tipo con el gen ribosomal 16S, se calculan los índices ANI y dDDH con lo que se identifica la especie a la que pertenece una cepa o incluso una nueva especie. Existen bases de datos especializadas, en las que se encuentran disponibles las herramientas para lograr la identificación basada en OGRIs, como lo es EzBioCloud, la cual cuenta con herramientas de comparación y bases de datos de genomas tipo, necesarios para este fin (Yoon *et al.*, 2017). Existen ya diversos reportes en los que se sigue esta metodología para lograr identificar aislados hasta nivel de especie de una manera rápida y confiable, como lo es el trabajo de Robles-Montoya y colaboradores (Robles-Montoya *et al.*, 2019), en el que identifican un aislado, TRQ8, como *Bacillus megaterium* siguiendo esta metodología, cuando no se había logrado identificar puntualmente la especie a la que pertenecía TRQ8 por otras metodologías convencionales.

6. *Bacillus toyonensis*

En el año 2013, se realizó la descripción de una nueva especie del grupo de *Bacillus cereus sensu lato* nombrada *Bacillus toyonensis*, que anteriormente era conocida como *Bacillus cereus* var *toyoi*, la cepa tipo BCT-7112^T fue aislada en Japón en 1966 y era empleada para la preparación de TOYOCERIN[®], un aditivo para la alimentación animal, que con el desarrollo de nuevas técnicas de comparación de genomas, como el ANI, y la secuenciación de su genoma (5.03 Mb divididos en un cromosoma de 4.94 Mb y dos plásmidos), se logró determinar que no se trataba de una cepa de *Bacillus cereus*, sino que se trataba de una especie diferente, lo que no se había podido determinar con la comparación del gen ribosomal 16S (Jiménez *et al.*, 2013a; Jiménez *et al.*, 2013b).

Existen relativamente pocos trabajos en los que se ha estudiado las capacidades que tienen las cepas de *Bacillus toyonensis*, ya que su principal uso o explotación que se le ha dado a estas cepas es como probiótico en la alimentación animal (Jiménez *et al.*, 2013a; Kantas *et al.*, 2015; Roos *et al.*, 2018), también se han estudiado sus genes de resistencia a cloranfenicol y tetraciclina, debido a su posible transferencia a otras especies en el intestino de los animales, así como la presencia de β -lactanos en los análisis genómicos, los cuales podrían tener un papel antimicrobiano (Janssens *et al.*, 2017; Glenwright *et al.*, 2016), adicionalmente se ha visto su capacidad de producir una glicoproteína con capacidad biofloculante, que puede ser útil para el tratamiento de aguas contaminadas (Okaiyeto *et al.*, 2015), además, se ha estudiado la capacidad que tiene de antagonizar hongos fitopatógenos (Otsuka-Rocha *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2017; Yanti *et al.*, 2018). Como se puede observar, las cepas de *Bacillus toyonensis* estudiadas hasta el momento presentan diversas actividades, quedando muchas otras posibilidades por ser investigadas, siendo una de ellas su capacidad de promover el crecimiento vegetal.

7. ANTECEDENTES

El uso de bacterias para promover el crecimiento vegetal se ha venido desarrollando con los avances en el estado del arte de este tópico, sobre todo porque se puede determinar con mayor exactitud los mecanismos con los cuales interactúa un microorganismo con otro, tal es el caso del trabajo realizado por Hadieva y colaboradores (Hadieva *et al.*, 2019) en el que se analiza el genoma completo de la cepa *Bacillus thuringiensis* GM5, una bacteria rizosférica con actividad antimicrobiana y puede ser usada como probiótico, tiene un tamaño de genoma de 4,271,280 pb con 4,364 secuencias codificantes, donde se pudieron identificar seis cluster pertenecientes a la familia de péptidos no ribosomales (Bacilibactina reportado como quelante de hierro, Bacilaeno reportado con actividad antimicrobiana, fengicina reportado con actividad antifúngica, surfactina reportado con actividad biosurfactante, plipastatina reportado con actividad biosurfactante y bacilicina reportado con actividad antimicrobiana), los cuales tienen la capacidad de suprimir patógenos de la microflora de pollos, por lo que es un gran prospecto como probiótico animal.

Existen reportes como el de Qin y colaboradores (Qin *et al.*, 2017) en el cual se estudia el efecto de la inoculación de plantas de pepino con *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 en la modulación del microbioma rizosférico, lo que conlleva a una mayor promoción del crecimiento vegetal; la promoción del crecimiento se confirmó midiendo los parámetros de longitud de la parte aérea, el diámetro del tallo, área foliar y el peso fresco de plantas inoculadas con L-S60 y sin inocular, observando que aquellas plantas inoculadas con L-S60 presentan diferencias significativas comparado con las plantas sin inocular; para analizar la modificación del microbioma, se extrajo DNA rizosférico, se amplificó y secuenció la región hipervariable V3-V4 del gen ribosomal 16S, observando modificaciones dependientes del tiempo en que se inoculó L-S60, habiendo mayores modificaciones los primeros 5 días post-inoculación y posteriormente se estabiliza y los cambios son menores, siendo los principales un aumento de proteobacterias y actinobacterias, manteniéndose las firmicutes estables, lo que sugiere una

efectiva colonización rizosférica de L-S60. La promoción del crecimiento vegetal es atribuida a una mayor disponibilidad y toma de nutrientes como nitrógeno, fosforo y potasio.

Se han identificado bacterias que tienen la capacidad de tolerar la salinidad y además promueven el crecimiento vegetal, tal es el caso del trabajo realizado por Sharma y colaboradores (Sharma *et al.*, 2019) en el que identificaron diversas cepas de *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus safensis* y *Bacillus cereus*, las cuales presentaron tolerancia a altas concentraciones de sal (8–10% NaCl) y presentaron antagonismo diferencial en contra de los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solanum*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* siendo los aislados CG18 y CM25 los que mayor antagonismo presentaron, cepas que posteriormente se identificaron como *Bacillus subtilis* con base en su 16S, atribuyendo su capacidad de antagonizar a los hongos fitopatógenos debido a su capacidad de producir enzimas líticas como quitinasas, endoglucanasas y proteasas, aunado a esto presentan la capacidad de producir ácido indolacético, sideróforos, ácido cianhídrico, amonio, ACC desaminasa y solubilizan fosfato, lo que las hace unas candidatas ideales para tolerar condiciones de salinidad, promover el crecimiento vegetal y antagonizar fitopatógenos.

Las bacterias del género *Bacillus* además de la producción de enzimas líticas, también producen biosurfactantes, Sarwar y colaboradores (Sarwar *et al.* 2018) estudiaron la capacidad de seis cepas: *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (control positivo), *Bacillus subtilis* NH-100, *Bacillus* sp. NH-217, *Bacillus atrophaeus* 176s, *Paenibacillus polymyxa* CC125 y *Bacillus subtilis* 168 (control negativo), de producir estos biosurfactantes mediante varias pruebas como la actividad hemolítica, ensayo del colapso de gota, dispersión de aceites, emulsificación y la actividad BATH. En la actividad hemolítica el mayor halo observado fue en las cepas FZB42 y 176s, seguidas por NH-100 y NH-217, la menor hemólisis se dio con la cepa CC125; en el ensayo de colapso de gota, la mayor actividad fue observada en las cepas FZB42

y NH-100, seguida por NH-217; para el ensayo de dispersión de aceite, como era de esperarse, solo las cepas con actividad en el colapso de gota dieron positivo en la dispersión, obteniendo los siguientes resultados de mayor a menor, FZB42, NH-100 y NH-217; para la actividad de emulsificación fue positiva para cuatro cepas, FZB42, NH-100, NH-217 y 176s; para la actividad BATH (habilidad de las células de adherirse al aceite crudo o mezcla de hidrocarburos), los valores máximos obtenidos corresponden a la cepa NH-100, seguido de FZB42, NH-127 y 176s. Posteriormente se analizó su capacidad de antagonizar hongos fitopatógenos, ya que es una actividad que ya ha sido reportada en cepas que producen biosurfactantes, se evaluó la inhibición en dos medios de cultivo (medio LB y medio Landy) de los fitopatógenos *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Trichoderma atroviride*, observándose inhibición con todas las cepas. Para determinar los compuestos responsables de estos efectos, se realizó un ensayo de espectrometría de masas, con lo que se lograron identificar compuestos de la familia surfactina, fengicina e iturina, compuestos que tienen reporte de antagonistas y biosurfactantes, como lo es el trabajo de Toral y colaboradores (Toral *et al.*, 2018), en el que identifican por espectrometría de masas los lipopeptidos surfactina, baciliomicina y fengicina en el sobrenadante de cultivos líquidos de *Bacillus methylotrophicus* XT1 CECT 8661, el cual fue probado en contra del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, observando que provoca un deterioro celular, dañando los organelos y en las hifas del hongo se observaron estructuras de resistencia. La estabilidad de los lipopéptidos a cambios de pH y temperatura fue evaluada, observando que la temperatura no tiene un efecto sobre los lipopeptidos, teniendo un rango óptimo de pH entre 7–9, analizando también el medio de cultivo para la obtención de los lipopéptidos, obteniendo la mayor producción en medio MOLP (10 g.L⁻¹) comparado con un medio comercial (2.13 g.L⁻¹). Otro uso que se le da a los lipopéptidos, es el de tratamiento de aguas residuales, como lo analizan en el trabajo de Zhao y colaboradores (Zhao *et al.*, 2019), en el que se estudia la capacidad que tienen los lipopéptidos obtenidos de *Bacillus subtilis*, de formar nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales tienen la capacidad de degradar el plomo disuelto en las aguas residuales, así como tintes orgánicos. Lo anterior nos

habla de la importancia de los compuestos producidos por las bacterias del género *Bacillus*, así como sus posibles usos.

Otro abordaje de las actividades observadas en las bacterias de la familia *Bacillus* ha sido la activación del sistema de resistencia en las plantas, Guo y colaboradores (Guo *et al.*, 2019) analizaron la capacidad de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 de activar la resistencia sistémica en plantas de tomate infectadas con el virus amarillo de las hojas de tomate (TYLCV); primero evaluaron la capacidad de *B. amyloliquefaciens* Ba13 de atenuar los efectos de la infección por TYLCV, comparando plantas de tomate infectadas con TYLCV y plantas infectadas con TYLCV + Ba13, observando en las plantas en que se inoculó la cepa Ba13 una disminución de los síntomas de la enfermedad por TYLCV de 45% a los 14 días postinfección y de 38% a los 28 días post-infección, se cuantificó la cantidad de virus presente en las plantas de tomate por RT-PCR, observando un decremento de más del 95% en las plantas coinoculadas con el virus y Ba13, comparado con las plantas inoculadas solo con el virus, esto a los 14 días post-infección del virus; también se evaluó la capacidad de *B. amyloliquefaciens* Ba13 de promover el crecimiento de plantas de tomate, observando un aumento significativo en los parámetros de longitud de la parte aérea y raíz, concentración de clorofila, superficie y volumen de la raíz, peso fresco y peso seco de la parte aérea, esto comparado con plantas control sin inocular. Posteriormente, se evaluó como es que se modificaba la resistencia sistémica en las plantas por efecto de *B. amyloliquefaciens* Ba13, evaluando los genes de respuesta a patógenos PR1, PR2 y PR3, observando un incremento significativo en las plantas que fueron inoculadas con Ba13 a partir del tercer día postinfección de TYLCV, comparado con las plantas control inoculadas solo con TYLCV, lo que comprueba que *B. amyloliquefaciens* Ba13 activa la resistencia sistémica en plantas de tomate, lo que ayuda a mitigar los efectos causados por la infección del virus amarillo de las hojas de tomate. Andrees y colaboradores (Andrees *et al.*, 2019) también estudiaron la activación del sistema de resistencia en las plantas, ellos utilizaron un modelo de plantas de algodón inoculadas con *Bacillus subtilis* IAGS-174 y *Bacillus megaterium* ZMR-4 y con un elicitador químico del ISR, benzotiadizol, observando una disminución aproximada del

80% de la severidad de la infección de la pudrición de la raíz y con base a reportes previos del uso de estas bacterias, atribuyen este efecto a la activación de la resistencia en la planta y a las enzimas producidas por estos *Bacillus* (peroxidasa, PAL, polifenol oxidasa entre otras).

Como ya se ha mencionado, existen diversas interacciones entre las bacterias que habitan los diversos nichos ecológicos, Molina-Santiago y colaboradores (Molina-Santiago *et al.*, 2019), analizan la interacción entre *Bacillus subtilis* 3610 (en adelante 3610) y *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 (en adelante PCL1606), ambas bacterias con reportes como promotoras del crecimiento vegetal. Observando en coinoculaciones, que 3610 produce exopolisacáridos conocidos como biofilm, el cual, no permite la colonización de PCL1606, al realizar mutantes de 3610 en la producción de biofilm, observan que PCL1606 penetra la colonia de 3610, ya que las mutaciones modifican la consistencia, haciendo la matriz colonial más fluida y menos hidrofóbica, lo que permite la penetración de PCL1606 así como sus metabolitos (surfactina, sideróforos, etc.), lo que desencadena un segundo nivel de defensa en 3610, aumentando su esporulación, como también se observa en el trabajo de Charron-Lamoureux y Beauregard (Charron-Lamoureux y Beauregard, 2019) en el que se observa que los exudados de *Arabidopsis thaliana*, tienen un efecto directo en la esporulación de *Bacillus subtilis*, lo que se comprobó con ensayos en donde se inocula la cepa silvestre y mutantes en la germinación de esporas ($\Delta gerAB$, $\Delta gerBB$, $\Delta gerKB$, $\Delta kinA$, $\Delta kinB$, $\Delta kinC$, $\Delta kinD$ y $\Delta kinE$), observando una mayor acumulación en las cepas mutadas, comparado con la cepa silvestre. La inducción de la germinación de esporas se le asignó al gen *bak1-4* de *A. thaliana*, que se encuentra involucrado en la respuesta a patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), ya que se colocaron esporas en una planta silvestre y en la mutante en este gen, observando una mayor germinación de esporas en la planta silvestre, con lo que se concluye que las plantas pueden estimular la germinación de esporas de microorganismos benéficos para su desarrollo.

8. PLANTA MODELO: ARÁNDANO

El arándano es un arbusto que pertenece a la familia Ericaceae, siendo los Estados Unidos de América el mayor productor y consumidor a nivel mundial aportando el 48% de la producción mundial, mientras que México aporta solo el 5.3%, siendo el tercer productor de esta frutilla. La producción de arándano en México ha ido aumentando considerablemente en los últimos años debido al alza en la demanda de su consumo pasando de 7,191 toneladas en el año 2012 a 36,700 toneladas en el año 2017 (Figura 1) (SIAP, 2018).

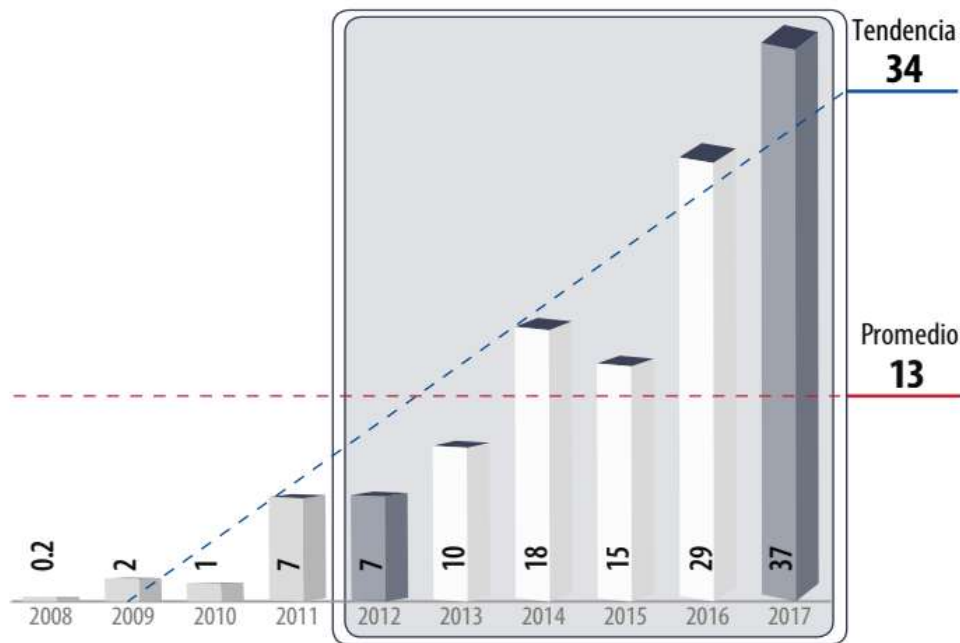


Figura 1. Producción nacional anual de arándano en miles de toneladas (SIAP, 2018).

En Michoacán, se cultiva principalmente el género *Vaccinium* sp. variedad Biloxi, ya que ésta se adaptó muy bien a las condiciones climatológicas de la entidad, el cual es un arbusto alto del sur, tetraploide, desarrollado en el Servicio de Investigación Agrícola (Agricultural Research Service) que es la principal agencia interna de investigación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), la variedad Biloxi se obtuvo de la cruce entre la variedad Sharpeblue y la línea US329 (Spiers and Stringer, 2002).

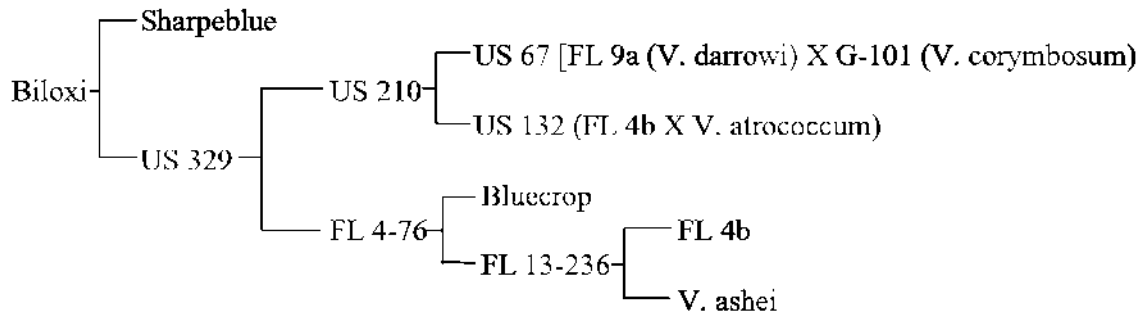


Figura 2. Pedigree de arándano (*Vaccinium* spp.) var. Biloxi

Al igual que muchos cultivos vegetales, el arándano es susceptible al ataque de diversos fitopatógenos, entre los que se encuentran los insectos como el gusano del arándano (*Rhagoletis mendax*), el pulgón del arándano (*Illinoia pepperi*), trips del arándano (*Frankliniella vaccinii*), el escarabajo pulga del arándano (*Altica sylva*), los ácaros (*Aceria vaccinii*, *Typhlodromalus peregrinus*, *Panonychus ulmi*, *Tydeus meyeræ*, *Tarsonemus* sp. y *Hemitarsonemus* sp.), la antracnosis bacteriana (*Pseudomonas syringae*) y los hongos (*Botryosphaeria corticis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora cinnamomi*, *Diaporthe vaccinii*, *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea*) (Bucio-Soto *et al.*, 2016; Fernandez-Pavia *et al.*, 2012; Luby *et al.*, 1991).

Más recientemente se han observado especies pertenecientes al género *Lasiodiplodia* infectando una amplia variedad de plantas leñosas (Cruywagen *et al.*, 2017), teniendo reportes de diferentes enfermedades como la podredumbre de raíz, tallo y fruto, puntilleo en las hojas y la llamada escoba de bruja, entre otras (Alves *et al.*, 2008), por lo que es de suma importancia el encontrar métodos de control para estas enfermedades que sean amigables con el medio ambiente, tales como las PGPBs, como una alternativa en el manejo sustentable de frutillas.

9. JUSTIFICACIÓN

Antecedentes en el Laboratorio de Diversidad Genómica muestran que la bacteria endófito *Bacillus toyonensis* COPE52 tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal; sin embargo, se desconoce el efecto de su inoculación en plantas de arándano (*Vaccinium* spp.). Así mismo, se carece de estudios sobre la coinoculación con otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), y sobre todo, los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados durante la interacción con plantas de arándano. Por lo tanto, analizar su genoma completo nos puede llevar a identificar elementos genéticos de comunicación, promoción del crecimiento vegetal y de biocontrol de fitopatógenos.

10. HIPÓTESIS

La coinoculación de *Bacillus toyonensis* COPE52 con otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) exhibe un mejor efecto de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal que su inoculación individual en plantas de arándano (*Vaccinium* spp.).

11. OBJETIVOS

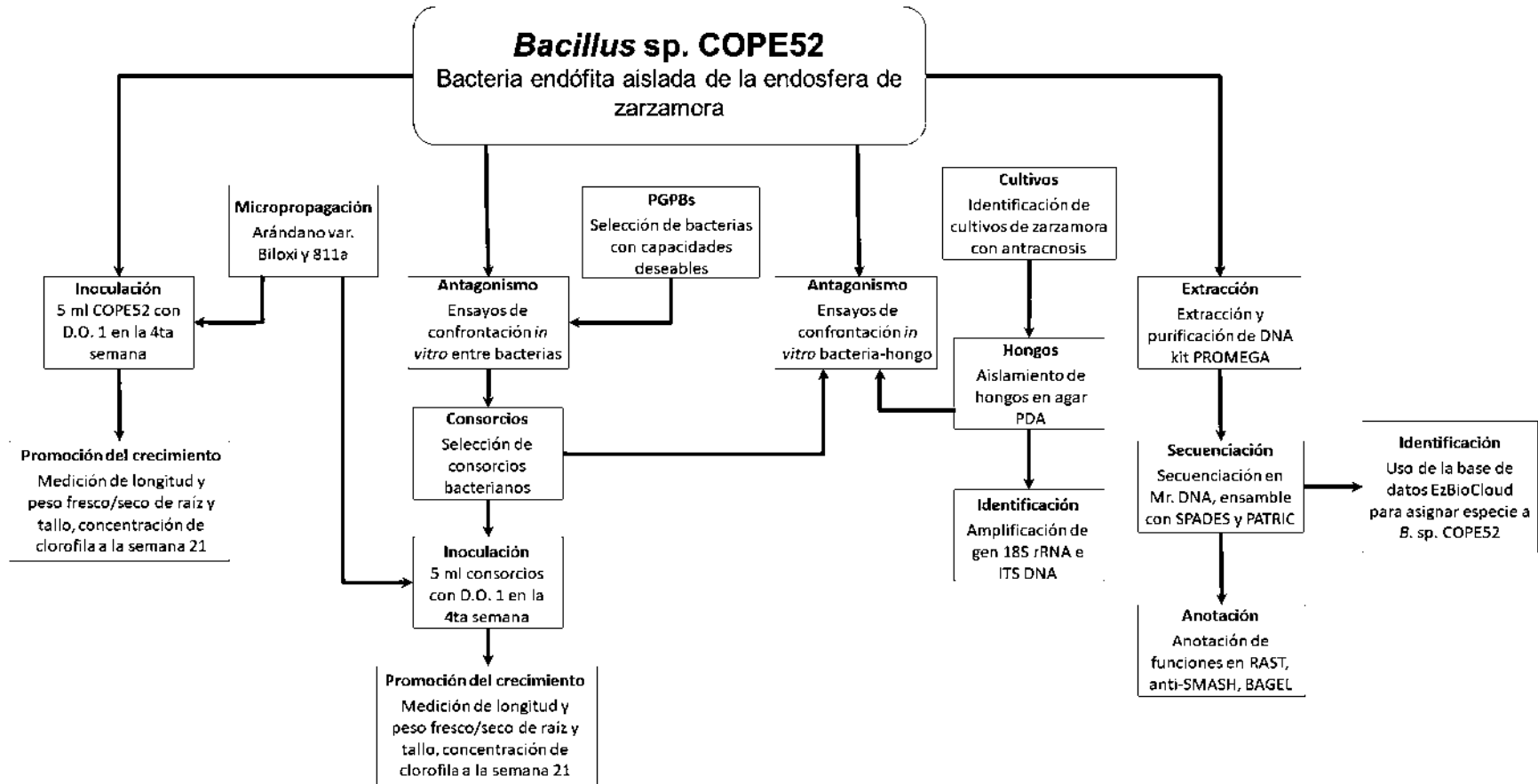
General

Evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus toyonensis* COPE52 y otras PGPB en el crecimiento de arándano (*Vaccinium* spp.), e identificar genes con función relevante en la interacción planta–bacteria, bacteria–bacteria y biocontrol de fitopatógenos.

Específicos

1. Evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus toyonensis* COPE52 en el crecimiento de plantas de arándano (*Vaccinium* spp.) variedad Biloxi y selección 811a.
2. Caracterizar hongos fitopatógenos aislados de cultivos de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el Estado de Michoacán.
3. Analizar el antagonismo de *Bacillus toyonensis* COPE52 y otras PGPB, así como su efecto contra hongos fitopatógenos.
4. Determinar el efecto de la coinoculación de *Bacillus toyonensis* COPE52 y otras PGPB en plantas de arándano (*Vaccinium* spp.) variedad Biloxi.
5. Identificar genes con función relevante en la interacción planta–bacteria, bacteria–bacteria y biocontrol de fitopatógenos en el genoma de *Bacillus toyonensis* COPE52.

12. METODOLOGÍA



13. RESULTADOS

13.1 Capítulo 1

3 Biotech (2019) 9:370
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1911-5>

GENOME REPORTS



Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. Biloxi) growth-promoting bacterium

Miguel Contreras-Pérez¹ · Julie Hernández-Salmerón¹ · Daniel Rojas-Solís¹ · Carmen Rocha-Granados² · Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda² · Fannie I. Parra-Cota³ · Sergio de los Santos-Villalobos⁴ · Gustavo Santoyo¹

Received: 7 June 2019 / Accepted: 19 September 2019
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2019

Abstract

In this work, we report an analysis of the draft genome of the blueberry (*Vaccinium* spp. var. Biloxi) growth-promoting endophyte *Bacillus toyonensis*, strain COPE52. The genome of COPE52 consists of a single 5,806,513 bp replicon, with a 35.1% G + C content. Strain COPE52 was strongly affiliated to *B. toyonensis* species, based on species delimitation cut-off values established for average nucleotide identity (> 95–96%), genome-to genome distance calculator (> 70%) and phylogenomic analysis. The RAST genomic annotation of the COPE52 strain revealed a total of 5979 total genes, including 5631 protein-coding genes, 11 rRNA genes, 5 ncRNAs, 81 tRNA genes, and 251 pseudogenes. To further validate the in silico analysis results, experiments were carried out to detect the production of indoleacetic acid, protease activity, and the emission of volatiles like acetoin, 2,3-butanediol and dimethyl disulphide as potential plant growth-promoting mechanisms. COPE52 also showed antifungal action against the grey mould phytopathogen, *Botrytis cinerea*, during in vitro bioassays. In addition, inoculation with strain COPE52 promoted growth biomass and chlorophyll content in blueberry plants (*Vaccinium* spp. var. Biloxi) under greenhouse conditions. To our knowledge, this is the first study showing genomic and experimental evidence of *B. toyonensis* as plant growth-promoting bacteria (PGPB).

Keywords Plant growth-promoting bacteria · Endophytic bacteria · Antifungal activity · Volatiles · Greenhouse

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1911-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gustavo Santoyo
gsantoyo@umich.mx

- ¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, Mexico
- ² Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Paseo Lázaro Cárdenas s/n Esq. Berlín, Col. Viveros., 60190 Uruapan, Michoacán, Mexico
- ³ Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP, Ciudad Obregón, Mexico
- ⁴ CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818, Sur, Col. Centro, 85000 Ciudad Obregón, Sonora, Mexico

Introduction

Species of the genus *Bacillus* are widely used as biocontrol agents, biofertilizers, and biostimulants in agriculture (Ruzzi and Aroca 2015; Villarreal-Delgado et al. 2018). *B. thuringiensis* was among the first biocides to be used in agricultural crops for its insecticidal properties (Bravo et al. 2011). Likewise, *B. subtilis* is another species that has been characterized as the main agent of commercial biofungicides and biostimulants of plant development (Pérez-García et al. 2011; Xie et al. 2009). The mechanisms of plant protection or stimulation used by the Bacilli can be diverse (direct and indirect), and include the production of bacteriocins, Cry toxins, chitinases, lipases, lipopeptides, siderophores, and other multiple diffusible and volatile compounds (Santoyo et al. 2012; Ryu et al. 2003). Additionally, Bacilli commonly produce the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, which induce plant growth under different types of stress, by reducing ethylene levels (Gamalero and Glick 2015).

Published online: 25 September 2019



Bacillus toyonensis was recently proposed as a new species belonging to the group of *B. cereus*, although it had previously been studied as a probiotic due to its production of toyocerin, which improves intestinal microbiota and nutrition in animals (Jadamus et al. 2002; Jiménez et al. 2013). However, studies on the putative beneficial roles of *B. toyonensis* in plants are few as far as we know. For example, strain BAC3151 (previously characterized as *B. thuringiensis*), isolated from leaves of common bean plants (*Phaseolus vulgaris*), showed antagonistic activity against phytopathogenic bacteria during a pre-screening test (Lopes et al. 2015). Also, in silico analysis of *B. toyonensis* BAC315 revealed genes associated to the synthesis of antimicrobial compounds, including bacteriocins, non-ribosomal peptides, and chitinases, among others (Lopes et al. 2017). In another recent work, bacterial endophytes were isolated from the medicinal plant *Lavandula dentata* L., among which, several strains were identified as *B. cereus* biovar *Toyoi*, which could belong to the *B. toyonensis* species, but this was not corroborated. These strains showed production of siderophores, indoleacetic acid (IAA), NH₃, and hydrocyanic acid (HCN) and lytic activities (Pereira et al. 2016). However, these previous studies only show the potential benefits of the strains and lack experimental evidence of biocontrol and induction of plant growth.

In this work, we present the draft genome of the endophyte *Bacillus toyonensis* strain COPE52, as well as in vitro antifungal bioassays against *Botrytis cinerea* and greenhouse experiments that demonstrate its capacity as a blueberry plant (*Vaccinium* spp., *Var.* Biloxi) growth-promoting bacterium. The COPE 52 strain was previously selected from a screening searching for plant growth-promoting endophytic bacteria isolated from *Rubus fruticosus* roots (Contreras et al. 2016). Additionally, the production of diffusible and volatile compounds was also corroborated experimentally (Santoyo et al. 2019). As far as we know, this is the first work confirming the *B. toyonensis* species as a plant growth-promoting bacterium (PGPB).

A single colony of the strain *B. toyonensis* COPE52 was inoculated on 50 ml of Nutrient Broth (NB), and grown overnight at 28 °C with agitation at 250 rpm. From the culture, the genomic DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit according to the manufacturer's (Promega) instructions. The quality and quantity of the final DNA sample were evaluated via agarose-TAE gel (1.5%) electrophoresis, and using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), respectively. Genomic samples were sequenced, using the Illumina MiSeq platform (Mr. DNA, Texas, USA) with a coverage of 64.0×. The quality control of the reads was conducted with a FastQC analysis version 0.11.5 (Andrews 2010). Trimmomatic version 0.32 (Bolger et al. 2014) was used to remove adapter sequences and low-quality bases. De novo assembly was

performed using SPAdes version 3.10.1 (Bankevich et al. 2012) and the “-careful” parameter for reads error correction. The assembled contigs were aligned by Mauve contig Mover (MCM) (Rissman et al. 2009), using the reference genome *Bacillus toyonensis* BCT-7112 (NCBI project accession: CP006863.1). Additionally, PLACNETw revealed the absence of plasmids in the COPE52 genome (Vielva et al. 2017). The draft genome of COPE52 consists of a single 5,806,513-bp chromosome, with 35.1% G + C content, 5979 total genes, 5631 protein-coding genes, 5 ncRNAs, 11 rRNA genes, 81 tRNA genes, and 251 pseudogenes.

For taxonomic assignment of strain COPE52, its 16S rRNA gene sequence was first used as a blast homology search template in the GenBank databases, revealing high identity with the *B. thuringiensis* strain ATCC 10792 (99.93%), *B. mobilis* AH1271 (99.93%), *B. toyonensis* BCT-7112 (99.86%), and *B. pacificus* EB422 (99.80%), among others. Then, these Bacilli species [based on the cut-off values on species delimitation established for 16S rRNA (> 98.7%) (Chun et al. 2018)] were compared to COPE52 at the genome level by employing the average nucleotide identity (ANI), using the OrthoANI algorithm (Yoon et al. 2017) and the genome-to-genome distance calculator (GGDC) 2.1 via BLAST (Meier et al. 2013). Based on pre-established cut-off values on species delimitation for ANI > 95–96% (Varghese et al. 2015) and GGDC > 70% (Espariz et al. 2016), COPE52 was found to be affiliated to *Bacillus toyonensis* (Table 1).

Table 1 ANI and GGDC values obtained from the comparison of strain COPE52 and closely related Bacilli species (16S rRNA > 98.7%) and genome-to genome distance calculator (> 70%)

<i>Bacillus toyonensis</i> COPE52 vs	Ortho ANI (%)	GGDC (%)
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 ^T	98.55	87.4
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T	91.48	44.6
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	91.41	44.3
<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 ^T	91.18	43.3
<i>Bacillus luti</i> TD41 ^T	90.95	43
<i>Bacillus tropicus</i> N24	90.93	42.7
<i>Bacillus mobilis</i> AH1271	90.92	42.6
<i>Bacillus paranthracis</i> Mn5	90.83	42.2
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	90.81	42.5
<i>Bacillus albus</i> N35-10-2	90.8	42.3
<i>Bacillus pacificus</i> EB422	90.72	41.9
<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42	90.61	40.1
<i>Bacillus nitratireducens</i> 4049	90.41	41.4
<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6462	90.23	40.9
<i>Bacillus paramycoides</i> NH24A2	89.65	38.9
<i>Bacillus gaemokensis</i> KCTC 13318	82.84	26.6
<i>Bacillus bingmayongensis</i> FJAT-13831	82.81	27.3
<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442	82.54	27.2

Phylogenomic analysis of *B. toyonensis* and other Bacilli also corroborated a close relationship within a single clade with *B. toyonensis* BCT-7112^T, *B. toyonensis* Rock1-3, and *B. toyonensis* Rock3-28, which were grouped apart from *B. cereus* ATCC 14579^T, *B. cereus* B4264, *B. thuringiensis* ATCC 10792^T, *B. thuringiensis* BMB171, *B. luti* AFS058404, *B. luti* TD41^T, *B. wiedmannii* BAG30-1, and *B. wiedmannii* FSL W8-0169^T. Genomic sequences were aligned by the reference sequence alignment-based phylogeny builder method, REALPHY (Bertels et al. 2014,) and the genome-based phylogenetic tree was constructed by MEGA 7 (Kumar et al. 2016), using the Neighbor-Joining method, with a bootstrap support of 1000 replications (Fig. 1).

Gene annotation of strain COPE52 was carried out using the Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) server (<http://rast.nmpdr.org>) (Aziz et al. 2008), by the RASTtk pipeline. A total of 5631 protein-coding DNA sequences (CDSs) were assigned to 358 subsystems, the most abundant being Amino Acids and Derivates (434), Carbohydrates (341), Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (198), Protein Metabolism (180), Nucleosides and Nucleotides (124), and Dormancy and Sporulation (110). Among those relevant for antagonism, rhizo- and endospheric colonization, the genes involved in virulence, disease and defence (74), stress response (41), motility and chemotaxis

(7), iron (52), phosphorous (42) and sulphur (7) metabolism are worth mentioning (Fig. 2).

The strain COPE52 was experimentally evaluated to detect direct and indirect (antifungal effects) plant growth-promoting traits (Santoyo et al. 2019). COPE52 was able to produce IAA ($24.08 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$) and protease activity (28.6 ± 1.6 , measured as a halo diameter in skim milk medium), but siderophore production, ACC deaminase activity, and phosphate solubilization were not detected. However, COPE52 restricted mycelial growth of *Botrytis cinerea* by diffusible ($11.49 \pm 0.84\%$ decrease in mycelium diameter) and volatile ($36.41 \pm 2.3\%$ decrease in mycelium diameter) organic compound (VOC) emission (Supplementary Table 1). Since *B. toyonensis* COPE52 exhibited better antagonism through VOCs against the phytopathogen, compared with *B. cinerea*, the VOCs produced by the studied endophyte were analysed using SPME-GC-MS, as previously reported (Hernández-León et al. 2015). Supplementary Table 2 shows the cocktail of VOCs produced by COPE52, highlighting the production of acetoin and 2,3-butanediol, which induce systemic resistance and growth in *Arabidopsis* (Ryu et al. 2003; Rudrappa et al. 2010), and dimethyl disulphide, which has been associated with antifungal action in PGPB (Rojas-Solís et al. 2018). It is relevant to mention that the *B. cinerea* commonly affects berries around

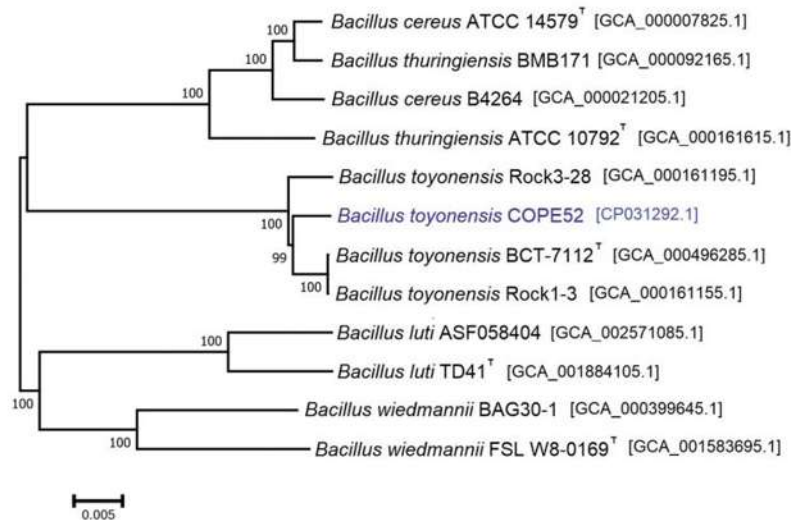


Fig. 1 Phylogenetic relationships among strain COPE52 and its closely related *Bacillus* species: *B. toyonensis* BCT-7112^T (GCA_000496285.1), *B. toyonensis* Rock1-3 (GCA_000161155.1), *B. toyonensis* Rock3-28 (GCA_000161195.1), *B. cereus* ATCC 14579^T (GCA_000007825.1), *B. cereus* B4264 (GCA_000021205.1), *B. thuringiensis* ATCC 10792^T (GCA_000161615.1), *B. thuringiensis* BMB171 (GCA_000092165.1), *B. luti* AFS058404

(GCA_002571085.1), *B. luti* TD41^T (GCA_001884105.1), *B. wiedmannii* BAG30-1 (GCA_000399645.1) and *B. wiedmannii* FSL W8-0169^T (GCA_001583695.1). The *Bacillus* genomic sequences were aligned using REALPHY (Bertels et al. 2014) and the genome-based phylogenetic tree was constructed by MEGA 7 (Kumar et al. 2016), using the Neighbor-Joining method, with bootstrap support of 1000 replications

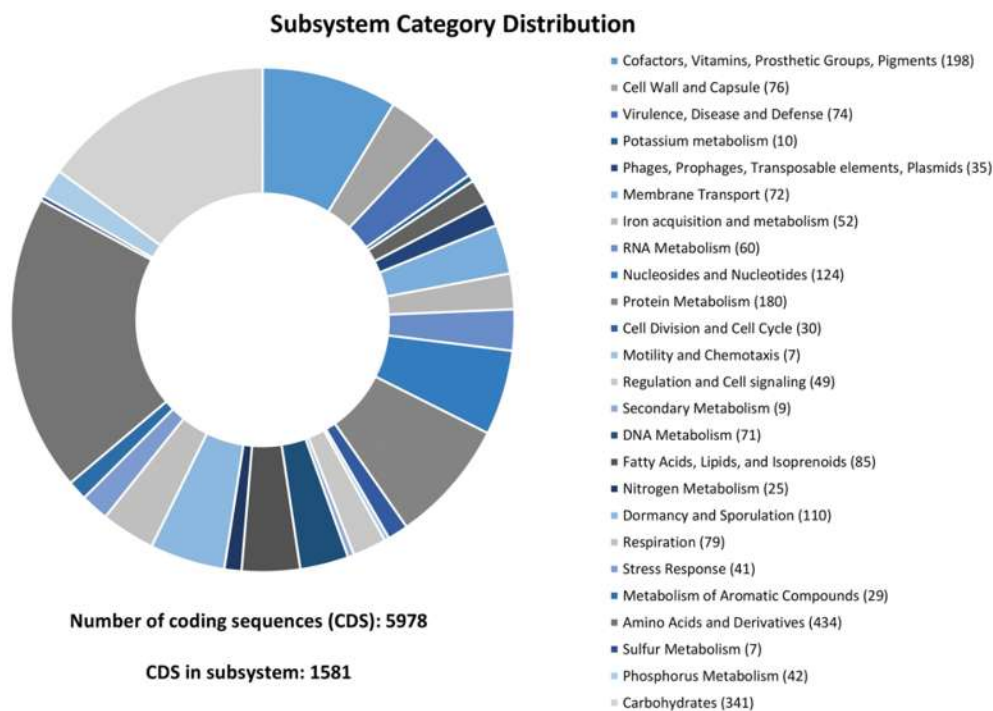


Fig. 2 Subsystem category distribution of CDC from the *Bacillus toyonensis* strain COPE52

the world, including blueberry plants (Rosslenbroich and Stuebler 2000).

To further confirm the role of *B. toyonensis* COPE52 as a PGPB, greenhouse experiments were performed in sterile peat moss to evaluate growth promotion in blueberry (var. Biloxi) plants, exerted by COPE52. The experimental design included two treatments: control ($n = 88$) plants without inoculant and plants inoculated with COPE52 ($n = 88$), with a total of 166 experimental units. The first bacterial inoculum was applied after 1 week of pot transplantation, in total four inoculations were applied to plants. Control plants were irrigated with sterile deionized water. Bacterial inoculum was adjusted to 1×10^8 Colony Forming Units (CFU)/mL. Throughout the experiment, the plants were irrigated every third day with sterile deionized water. The effect of adding COPE52 on the root length, aerial parts, fresh and dry weight, and chlorophyll concentration was evaluated after 20 weeks of plant growth. The chlorophyll concentration was measured in at least three leaves from each plant as previously reported (Rojas-Solís et al. 2018). Thus, the inoculation of *B. toyonensis* COPE52 resulted in a growth stimulation of blueberry plants, compared to un-inoculated plants. Except for the measurement of root length, COPE52 induced a significant ($p = 0.05$) shoot length, fresh and dry weight of shoots and roots, and chlorophyll content (Table 2).

Table 2 Blueberry plants (var. Biloxi) growth promotion by the inoculation of *Bacillus toyonensis* COPE52 in greenhouse assay

Variables	Control	<i>Bacillus toyonensis</i> COPE52
Shoot length (cm)	23.8 ± 0.97	29.4 ± 0.50*
Root length (cm)	12.0 ± 0.52	13.4 ± 0.35
Chlorophyll content (U)	13.3 ± 1.81	26.0 ± 2.21*
Fresh weight of shoot (g)	2.5 ± 0.28	3.8 ± 0.14*
Dry weight of shoot (g)	0.7 ± 0.07	1.1 ± 0.03*
Fresh weight of root (g)	0.3 ± 0.07	2.1 ± 0.18*
Dry weight of root (g)	0.2 ± 0.03	0.5 ± 0.03*

Values shown are the mean of ten independent replicates with ± standard errors values. Asterisks indicate significant differences according to *t* Student test ($p \leq 0.05$)

In conclusion, our results confirm the function of predicted genes in the genome of COPE52, as well as the diverse plant growth-promoting traits exhibited by this strain. To our knowledge, this is the first work that demonstrates genomic and experimental evidences of *Bacillus toyonensis* as antifungal and plant growth-promoting bacterium.

Acknowledgements We thank Dr. Lourdes Macías for her help with the VOCs analysis. We thank to Coordinación de la Investigación

Científica-UMSNH for supporting our research projects (2018–2019) and to CONACYT-México (Project: A1-S-15956). M.C.-P. received a PhD scholarship from CONACYT-México.

Accession numbers This Whole Genome Shotgun sequence project has been deposited to GenBank under the accession number, CP031292.1. The BioSample (SAMN09462204) and BioProject (PRJNA476959) numbers are also available.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Accessed 31 Jan 2019
- Aziz RK, Bartels D, Best A et al (2008) The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom* 9:1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D et al (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, Van Nimwegen E (2014) Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol Biol Evol* 31:1077–1088. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu08>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41:423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Chun J, Oren A, Ventosa A et al (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:461–466. <https://doi.org/10.1099/ijssem.0.002516>
- Contreras M, Loeza PD, Villegas J, Farias R, Santoyo G (2016) A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genet Mol Res* 15:1–10. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038542>
- Espariz M, Zuljan FA, Esteban L, Magni C (2016) Taxonomic identity resolution of highly phylogenetically related strains and selection of phylogenetic markers by using genome-scale methods: the *Bacillus pumilus* group case. *PLoS One* 11:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163098>
- Gamalero E, Glick BR (2015) Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiol* 169:13–22. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00284>
- Hernández-León R, Rojas-Solís D, Contreras-Pérez M, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Macías-Rodríguez LI, Reyes-de la Cruz H, Valencia-Cantero E, Santoyo G (2015) Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol Control* 81:83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Jadamus A, Vahjen W, Schäfer K, Simon O (2002) Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *Anim Physiol Anim Nutr* 86:42–54. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2002.00336.x>
- Jiménez G, Urdiaín M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR, Tamames J, Kämpfer P, Kolstø AB, Ramón D, Martínez JF, Codóñer FM, Rosselló-Móra R (2013) Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst Appl Microbiol* 36:383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lopes RBM, de Oliveira Costa LE, Vanetti MCD, de Araújo EF, de Queiroz MV (2015) Endophytic bacteria isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris*) exhibiting high variability showed antimicrobial activity and quorum sensing inhibition. *Curr Microbiol* 71:509–516. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0879-6>
- Lopes R, Cerdeira L, Tavares GS, Ruiz JC, Blom J, Horácio ECA, Mantovani HC, Queiroz MV (2017) Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 33:185. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2347-x>
- Meier J, Auch A, Klenk H, Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform* 14:1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Pereira SIA, Monteiro C, Vega AL, Castro PM (2016) Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecol Eng* 87:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.033>
- Pérez-García A, Romero D, de Vicente A (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr Opin Biotechnol* 22:187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT (2009) Reordering contigs of draft genomes using the *Mauve aligner*. *Bioinformatics* 25:2071–2073. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp359>
- Rojas-Solís D, Zetter-Salmón E, Contreras-Pérez M, Rocha-Granados M, Macías-Rodríguez L, Santoyo G (2018) *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR22 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocat Agric Biotech* 13:46–52. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.007>
- Rosslénbroich HJ, Stuebler D (2000) *Botrytis cinerea*—history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protect* 19:557–561. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00072-7)
- Rudrappa T, Biedrzycki ML, Kunjeti SG, Donofrio NM, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP (2010) The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Commun Integr Biol* 3:130–138. <https://doi.org/10.4161/cib.3.2.10584>
- Ruzzi M, Aroca R (2015) Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Sci Hortic* 196:124–134. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042>
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepfer JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda MDC, Govindappa M (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocon Sci Technol* 22:855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>

- Santoyo G, Sánchez-Yáñez JM, de los Santos-Villalobos S (2019) Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in rhizobacteria. *Methods in rhizosphere biology research*. Springer, Singapore, pp 133–149. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1_8
- Varghese NJ, Mukherjee S, Ivanova N, Konstantinidis KT, Mavromatis K, Kyrpides NC, Pati A (2015) Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Res* 43:6761–6771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv657>
- Vielva L, de Toro M, Lanza V, de la Cruz F (2017) PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics* 33:3796–3798. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx462>
- Villarreal-Delgado M, Villa E, Cira L, Estrada M, Parra F, de los Santos-Villalobos S (2018) The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Rev Mex Fitopatol* 36:95–130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Xie X, Zhang H, Paré PW (2009) Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). *Plant Signal Behav* 4:948–953. <https://doi.org/10.4161/psb.4.10.9709>
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

13.2 Capítulo 2

First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico

Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacán, México

Miguel Contreras-Pérez, Gustavo Santoyo-Pizano*, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida Universidad S/N, Edificio A1', Morelia, Michoacán, C.P. 58030, México. **Sergio de los Santos-Villalobos**, CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. **Ma. Angélica Gutiérrez-García, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma. del Carmen Rocha-Granados**, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Uruapan, Michoacán, C.P. 60170, México. *Autor para correspondencia: gsantoyo@umich.mx

Recibido: 16 de Mayo, 2019.

Aceptado: 01 de Julio, 2019.

Contreras-Pérez M, Santoyo-Pizano G, de los Santos-Villalobos S, Gutiérrez-García MA, Orozco-Mosqueda MC and Rocha-Granados MC. 2019. First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-4

Primera publicación DOI: 10 de julio, 2019.

First DOI publication: July 10, 2019.

Resumen. En el año 2017 se presentaron diversos brotes de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en cultivos de zarzamora variedad "Tupi" (*Rubus* subgénero *Eubatus*) de la región de Los Reyes-Peribán, Michoacán. De las plantas afectadas se realizaron varios cultivos para el aislamiento y caracterización de hongos fitopatógenos. En este trabajo, se caracterizó la cepa fúngica AB1 morfológica y molecularmente mediante la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 18S y

Abstract. In 2017, there were several outbreaks of diseases caused by phytopathogenic fungi in blackberry of the "Tupi" variety (*Rubus* subgenus *Eubatus*) crops in Los Reyes-Periban region, Michoacán. Of the affected plants, several cultures were carried out for the phytopathogenic fungi isolations. In this work, the pathogen AB1 was morphological and molecularly characterized. Through BLAST homology searches of the 18S rRNA marker and the rDNA internal transcribed spacer region (ITS), the fungi AB1 had a high identity with fungus of *Lasiodiplodia* genus (*Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*), additionally, infection of *Lasiodiplodia* sp. AB1 in blackberry plants was corroborated *in vitro*. This is the first report of the isolation of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia* sp. in blackberry crops.

Key words: Infection, Tupi, Stem rot, Molecular characterization.

la región intergénica (ITS). Los análisis BLAST mostraron que el aislado fúngico AB1 tuvo una alta identidad con hongos del género *Lasiodiplodia* (*Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*), adicionalmente se corroboró *in vitro* la infección de *Lasiodiplodia* sp. AB1 en plántulas de zarzamora. Este es el primer reporte de la presencia de *Lasiodiplodia* sp. en cultivos de zarzamora de la variedad "Tupi".

Palabras clave: Infección, Tupi, Pudrición del tallo, caracterización molecular.

El municipio de Los Reyes, Michoacán, México, es el principal productor de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el país, aportando más del 80% de la producción nacional anual, la cual asciende a más de 260 mil toneladas (SIAP-SAGARPA, 2012-2018). El cultivo de zarzamora es afectado por diversas especies de hongos fitopatógenos, causando pérdidas en la producción y económicas significativas, hasta un 25% equivalente a 2,540 millones de pesos anuales. Entre las principales enfermedades que afectan al cultivo de zarzamora se han reportado el moho gris (*Botrytis cinerea*), la roya anaranjada (*Arthuriomyces peckianus*), la mancha de la hoja (*Cercospora* sp.), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), el mildiú (*Peronospora sparsa*), y la pudrición de la raíz (*Fusarium* sp.) (Fernández-Pavía *et al.*, 2012). Sin embargo, las condiciones cambiantes edafo-climáticas, como consecuencia de las prácticas agrícolas intensivas y el cambio climático, han inducido en la aparición de diversos fitopatógenos emergentes con impactos negativos en la producción de cultivos agrícolas de interés económico, social y cultural. Por lo tanto, la correcta identificación y caracterización de dichos fitopatógenos emergentes es importante para proponer estrategias de control eficientes.

The municipality of Los Reyes, Michoacán, Mexico is the main producer of blackberries (*Rubus* subgénero *Eubatus*) in the country, providing over 80% of the national yearly production, which amounts to over 260 thousand tons (SIAP-SAGARPA, 2012-2018). Blackberry production is affected by several species of fungi, causing losses in production, as well as economic losses of up to 25%, equal to 2,540 million pesos per year. Among the main diseases that impact blackberry crops are the gray mould (*Botrytis cinerea*), orange rust (*Arthuriomyces peckianus*), leaf spot (*Cercospora* sp.), anthracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), mildew (*Peronospora sparsa*), and root rot (*Fusarium* sp.) (Fernández-Pavía *et al.*, 2012). However, soil and weather conditions that are changing as a consequence of the intensive agricultural practices and climate change, have exerted an influence on the appearance of diverse emerging phytopathogens with negative impacts on the production of agricultural crops of economic, social and cultural interest. Therefore, the correct identification and characterization of said emerging phytopathogens is important to propose efficient control strategies.

In 2017, blackberry farms located in the municipalities of Los Reyes and Peribán, Michoacán (19° 32' 3.728" N and 102° 31' 12.503" W) presented plants in a vegetative state, diseases with leaf, branch and stem necrosis (with a basipetal progression), followed by defoliation and the death of the plant (Figure 1A). These symptoms had not been described by causal pathogens normally reported for blackberry crops, therefore affected plant tissue was gathered, mainly necrotic stems from 5 plants. The samples gathered were kept in humid chambers at 4 °C and later transported to the lab for their immediate analysis in order to identify the biological agent that caused such symptoms. For the isolation of the pathogen,

En 2017, predios comerciales de zarzamora ubicados en los municipios de Los Reyes y Peribán, Michoacán (19° 32' 3.728" N y 102° 31' 12.503" O) mostraron plantas en etapa vegetativa, enfermas con necrosis de hojas, ramas y tallos (con una progresión basipétala), seguido por defoliación y muerte de la planta (Figura 1A). Estos síntomas no habían sido descritos por patógenos causales comúnmente reportados en el cultivo de zarzamora, por lo que se procedió a la colecta de tejido vegetal afectado, principalmente tallos necróticos de 5 plantas. Las muestras colectadas fueron preservadas en cámaras húmedas a 4 °C para ser transportadas al laboratorio para su análisis inmediato, con el fin de identificar el agente biológico causal de dichos síntomas. Para el aislamiento del patógeno, las muestras se desinfectaron superficialmente con 3 lavados de cloro al 2% y lavados con agua destilada estéril, posteriormente se trituró el tejido en un mortero estéril. Secciones de 0.5 cm fueron sembradas en cajas de Petri con Agar Dextrosa Papa (PDA), para favorecer el crecimiento de hongos. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a 30 °C en oscuridad durante 48 horas. Las colonias fúngicas observadas fueron sembradas bajo las mismas condiciones de cultivo para la purificación de los aislados. Los aislados mostraron un rápido crecimiento micelial (1.5 cm 6 h⁻¹) de color blanco (24 h) (Figura 1B), posteriormente tornándose color negro (≥48 h) (Figura 1C). Adicionalmente, se realizaron preparaciones, utilizando azul de bromofenol (observadas en un microscopio óptico) para determinar las estructuras de reproducción reportadas para el género *Lasiodiplodia*, tales como: abundante crecimiento micelial conformado por hifas y conidios septados maduros (Figura 1D y 1E), ovoides a elipsoides con contenido granular y ápice redondo (Alves *et al.*, 2008). Un aislado fúngico monospórico, AB1, fue preservado con el código ZPQ1 en la Colección de Microorganismos

the samples were disinfected superficially, washing with 2% chlorine 3 times, and rinsing with sterile distilled water; later, the tissue was grinded in a sterilized mortar. Sections measuring 0.5 cm were planted in Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA) to promote fungal growth. The inoculated Petri dishes were incubated at 30 °C in the dark for 48 hours. The fungal cultures observed were replanted under the same growing conditions in order to purify the isolations, which showed a rapid mycelial growth (1.5 cm 6 h⁻¹), white in color (24 h) (Figure 1B), and later turning black (≥48 h) (Figure 1C). In addition, preparations were carried out, using bromophenol blue (observed under an optic microscope) to determine the reproductive structures reported for the genus *Lasiodiplodia*, such as abundant mycelial growth, composed of mature septated hyphae and conidia (Figure 1D and 1E), ovoidal to elliptical in shape, with a grainy content and a round apex (Alves *et al.*, 2008). A monosporic fungal isolation, AB1, was stored with the code ZPQ1 in the Collection of Native Edaphic and Endophytic Microorganisms-COLMENA (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

The molecular identification of AB1 began with the extraction of the deoxyribonucleic acid (DNA) from the mycelium of the fungus (1 mg), which was placed in 0.2 mL of TES buffer, mixing the suspension vigorously; next, 5 mg mL⁻¹ of K proteinase were added, along with ammonium acetate, and it was washed with ethanol at 70% and isopropanol in ice. Finally, the residual ethanol was evaporated from the tablet and the DNA was resuspended in deionized water. The quality and concentration of the extracted DNA were verified using an agarose-TAE gel at 1 % and a Thermo Scientific NanoDrop 2000c spectrophotometer. The fungal DNA extracted was used for the amplification of the ribosomal RNA 18S gene using the universal oligonucleotides

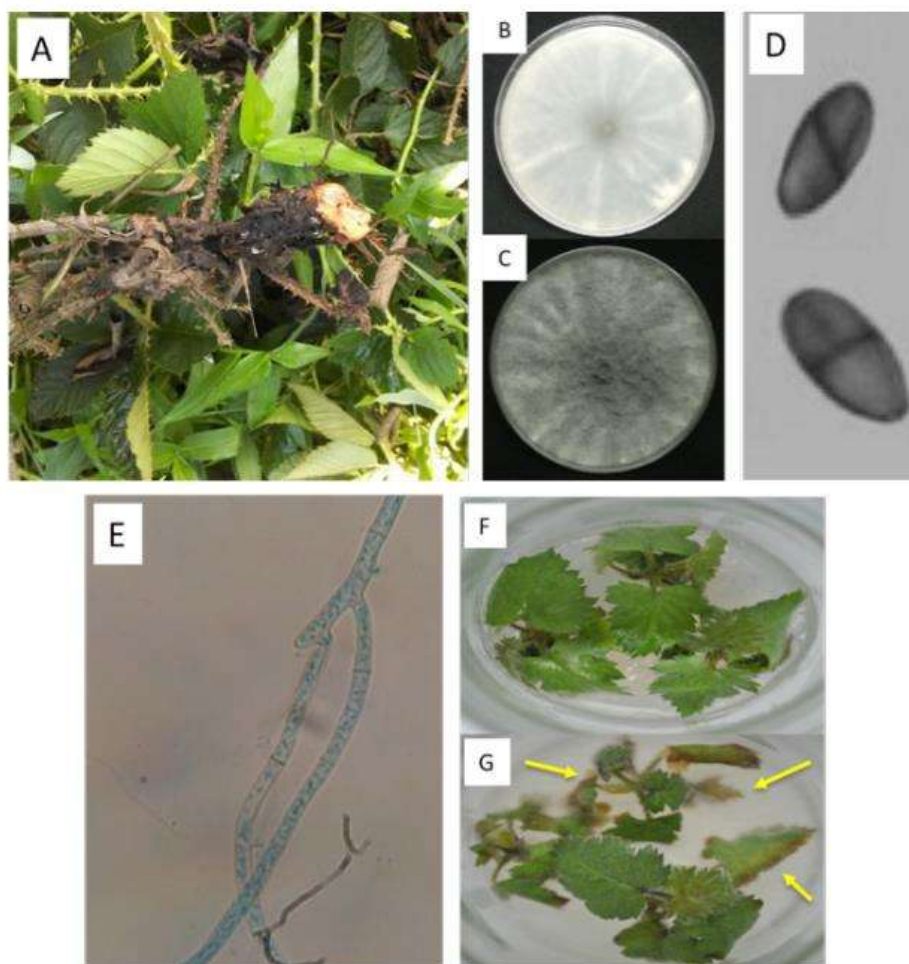


Figura 1. Aislamiento y caracterización morfológica y de infección del fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp. AB1. A) Tejido de zarzamora necrosado, material del que se obtuvo el aislamiento de *Lasiodiplodia* sp. AB1. B) Micelio de *Lasiodiplodia* sp. AB1 a los 5 días de crecimiento. C) Micelio de *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1 a los 10 días de crecimiento. D) Conidios maduros. E) Porción del micelio de *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, teñido con azul de bromofenol. F) Plántula de zarzamora var. 'Tupi' crecida *in vitro*. G) Plántula de zarzamora var. 'Tupi' infectada con *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, las flechas indican zonas necróticas.

Figure 1. Isolation and morphological and infection characterization of the phytopathogen *Lasiodiplodia* sp. AB1. A) Necrotized blackberry tissue, material obtained from the isolation of *Lasiodiplodia* sp. AB1. B) *Lasiodiplodia* sp. AB1 mycelium at 5 days of growth. C) *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 mycelium after 10 days of growth. D) Mature conidia. E) Portion of the *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 mycelium, stained with bromophenol blue. F) Blackberry var. 'Tupi' seedling planted *in vitro*. G) Blackberry var. 'Tupi' seedling infected with *Lasiodiplodia* sp., strain AB1; arrows indicate necrotized areas.

Edáficos y Endófitos Nativos-COLMENA (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Para la identificación molecular de AB1, se partió de la extracción del ácido desoxirribonucleico

NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) and NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA); as well as the intergenic region (ITS) with oligos ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS5

(ADN) a partir del micelio del hongo (1 mg), el cual se colocó en 0.2 mL de buffer TES, mezclando vigorosamente la suspensión; posteriormente se adicionaron 5 mg mL⁻¹ de proteinasa K, acetato de amonio y se realizó el lavado con etanol al 70% e isopropanol en hielo. Finalmente, el etanol residual se evaporó de la pastilla y el ADN se resuspendió en agua desionizada. La calidad y concentración del ADN extraído fue verificada mediante un gel de agarosa-TAE al 1% y un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de la marca Thermo Scientific. El ADN fúngico extraído se utilizó para la amplificación del gen 18S RNA ribosomal usando los oligonucleótidos universales NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) y NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA); así como, la región intergénica (ITS) con los oligos ITS4 (TCGGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS5 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Toju *et al.*, 2012). Los amplicones resultantes fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa-TAE al 1%; posteriormente fueron purificados usando el kit The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, para ser secuenciados por una compañía comercial (Macrogen, Korea). Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para obtener la identidad/afiliación taxonómica del aislado fúngico. La secuencia del gen 18S RNAr del aislado AB1 obtenida fue 1,050 pares de bases (pb) (No. de acceso NCBI: MG757345.1), dicha secuencia mostró una alta cobertura (100%) y similitud (99.52%) con *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*. La secuencia ITS tuvo una longitud de 539 pb (No. de acceso NCBI: MK841036.1), exhibiendo una identidad del 99.81% con múltiples aislados de *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva* (Cuadro 1). *Lasiodiplodia* es un género fúngico que comprende, al menos, 30 especies (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017), las cuales han sido asociadas a

(TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Toju *et al.*, 2012). The resulting amplicons were analyzed by electrophoresis in an agarose-TAE gel at 1% and later purified using the kit The Wizard® SV Gel and Promega PCR Clean-Up System, to then be sequenced by a commercial company (Macrogen, Korea). The DNA sequences obtained were analyzed using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to obtain the taxonomic identity/affiliation of the fungal isolate. The sequence of gene 18S RNAr of the isolation AB1 obtained was 1,050 base pairs (bp) (NCBI Access num.: MG757345.1). This sequence displayed a high coverage (100%) and similarity (99.52%) with *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva*. The ITS sequence has a length of 539 bp (NCBI Access num: MK841036.1), displaying an identity of 99.81% with multiple *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva* isolations (Table 1). *Lasiodiplodia* is a fungal genus that comprises at least 30 species (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017), which have been related to several economically important diseases in agricultural crops, where the causal agent is found as a latent endophyte. Based on the molecular identification of the gene 18S RNAr and the ITS region ADNr, the AB1 isolation has been affiliated to the genus *Lasiodiplodia* sp., until further studies are carried out to classify this isolation at a species level.

In addition, pathogenicity tests were carried out in the isolation AB1 to corroborate its role as a causal agent of the symptoms observed in blackberry plants. To confirm the Koch postulates, an *in vitro* infection test was carried out, in which blackberry seedlings of the "Tupi" variety were micropropagated, placing three plants per jar, which were then inoculated 1x10⁶ spores of the isolation AB1 (control plants were sprayed with sterile distilled water). The plants were incubated for 5 days in a Percival AR66L growth chamber at a

Cuadro 1. Identidad máxima encontrada de las secuencias 18S e ITS de la cepa AB1 en el GenBank.
Table 1. Maximum identity found for sequences 18S and ITS of strain AB1 in the GenBank.

Especie/Cepa	Máxima identidad por 18S (ID GenBank)	Máxima identidad por ITS (ID GenBank)
<i>Lasiodiplodia</i> sp. AB1	99.52% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (NG_062745.1)	99.81% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MK530050.1)
	99.52% <i>Lasiodiplodia parva</i> (GQ469913.1)	99.81% <i>Lasiodiplodia parva</i> (KX227559.1)

diversas enfermedades de cultivos agrícolas de importancia económica, en donde dicho agente causal se encuentra como un endófito latente. Con base en la identificación molecular del gen 18S RNAr y la región ITS ADNr, el aislado AB1 ha sido afiliado al género *Lasiodiplodia* sp., hasta realizar más estudios para clasificar este aislado a nivel de especie.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de patogenicidad del aislado AB1 para corroborar su papel como agente causal de los síntomas observados en las plantas de zarzamora. Para confirmar los postulados de Koch, se realizó un ensayo de infección *in vitro*, en el cual, se micropropagaron plántulas de zarzamora de la variedad “Tupi”, colocando tres plantas por frasco, a las que posteriormente se les inocularon 1×10^6 esporas del aislado AB1 (plantas control fueron asperjadas con agua destilada estéril). Las plantas se incubaron por 5 días en una cámara de crecimiento Percival AR66L, bajo una temperatura constante de 22 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Posterior al tiempo de inoculación del aislado AB1, todas las plantas inoculadas mostraron síntomas similares a los observados en los predios comerciales, clorosis, así como zonas con necrosis en hoja y tallo. Además, la cepa AB1 fue re-aislada y caracterizada de dichas plantas sintomáticas. Lo anterior demuestra

constant temperature of 22 °C and a light period of 16 hours and 8 hours of darkness. After the time of inoculation of isolation AB1, all inoculated plants displayed similar symptoms to those observed in commercial farms, chlorosis, as well as areas with leaf and stem necrosis. Also, strain AB1 was re-isolated and characterized from the symptomatic plants. This shows that *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 has the ability to infect blackberry var. “Tupi” plants, the crop it was isolated from (Figures 1F and 1G). Additional studies are in process to determine the pathogenicity in older plants in greenhouses and its biocontrol with antagonistic bacteria.

In conclusion, based on morphological observations, the molecular characterizations and the compliance with the Koch postulates, it was possible to identify, for the first time in Mexico – as far as we know – according to the revision of technical literature, that the isolation AB1 belongs to the genus *Lasiodiplodia*, and is the causal agent of the symptoms observed in blackberry plants in commercial farms located in the municipality of Los Reyes, Michoacán. This information will provide important information for the integrated management of this disease, in order to avoid possible epidemiological outbreaks in the crop, and economic losses.

que *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, tiene la capacidad de infectar plantas de zarzamora var. "Tupi", cultivo del que fue aislado (Figura 1F y 1G). Estudios adicionales están en proceso para determinar la patogenicidad en plantas de mayor edad en invernadero y su biocontrol con bacterias antagonistas.

En conclusión, con base en observaciones morfológicas, la caracterización molecular y el cumplimiento de los postulados de Koch, se identificó por primera vez en México -hasta donde sabemos-, según la revisión de literatura técnica, que el aislado AB1 perteneciente al género *Lasiodiplodia* es el agente causal de los síntomas observados en plantas de zarzamora en predios comerciales ubicados en el municipio de Los Reyes, Michoacán. Dicha identificación proveerá información de importancia para el manejo integrado de esta enfermedad, con el fin de evitar posibles brotes epidemiológicos en el cultivo y pérdidas económicas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana por el apoyo a nuestros proyectos de investigación (2018-2019).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Coordination of Scientific Research of the Universidad Michoacana for the support provided to our research projects (2018-2019).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

#### LITERATURA CITADA

- Alves A, Crows PW, Correia A and Philips AJL. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity 28:1-13. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragón B y Estrada-Mora JC. 2018. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9: 191-202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado GR, Gómez-Dorantes N, Gregorio-Cipriano MR y Fernández-Pavía YL. 2012. Enfermedades en plantas en el estado de Michoacán. Biológicas, 14(2): 75-89. <https://biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=140&path%5B%5D=139>
- Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW and Alves A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. Fungal Biology. 121:452-465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S and Sato H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. PLoS one 7(7): e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- SIAP-SAGARPA (2012-2018). Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. (Consultado en 2019) [https://mube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://mube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018)

## 14. DISCUSIÓN

La determinación de nuevos agentes bacterianos con potencial para controlar enfermedades fúngicas en diversos cultivos vegetales, incluyendo las de frutillas como el arándano o la zarzamora, es una urgencia en la agricultura. En este sentido, los resultados de este trabajo sugieren que la cepa *Bacillus toyonensis* COPE52 tiene un gran potencial como biofungicida y bioestimulante de cultivos de arándano. De esta manera, los resultados de este trabajo muestran el efecto benéfico de la inoculación de una bacteria endófito aislada de los tejidos internos de la raíz de zarzamora (Contreras-Pérez *et al.*, 2016) *Bacillus toyonensis* COPE52, puede promover el crecimiento y desarrollo de plantas de arándano. Para lograr identificar el o los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas de arándano por efecto de la inoculación de *Bacillus toyonensis* COPE52, en este trabajo se secuenció y determinó el genoma draft, y mediante el uso de herramientas bioinformáticas, lograr la anotación de los genes, con lo que se pueden identificar los posibles mecanismos con los que cuenta la cepa COPE52, además de realizar a la par otros análisis experimentales, algunos de los cuales han sido anteriormente publicados (Rojas-Solís *et al.*, 2018). Esta metodología de estudio *in silico*, complementado con trabajo experimental, se ha utilizado ampliamente para determinar la maquinaria de diversas bacterias promotoras del crecimiento (Compant *et al.*, 2010; Grady *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2015; Okinaka y Keim, 2016; Robles-Montoya *et al.*, 2019;). Así mismo, lograr la identificación hasta especie de un microorganismo es importante en términos de análisis ecológico, ya que, sin el estudio del genoma completo en algunos casos, como lo es el grupo de *Bacillus cereus sensu lato*, que están estrechamente relacionados, se requieren de herramientas especializadas para la diferenciación de las especies que conforman este grupo (Arahal, 2014; Bazinet *et al.*, 2017; Chun *et al.*, 2018; Varghese *et al.*, 2015; Yoon *et al.* 2017). Por lo tanto, la secuenciación del genoma permitió identificar a la cepa COPE52 como *Bacillus toyonensis*, que aunado al hecho intrínseco de saber con qué especie bacteriana se está trabajando, nos proporciona información relevante. Por ejemplo, las bacterias de la especie *B. toyonensis* son usadas principalmente como probióticos en la salud animal (Jiménez *et al.*, 2013a;

Jiménez *et al.*, 2013b; Kantas *et al.*, 2015; Roos *et al.*, 2018) y su posible función como bacteria promotora del crecimiento vegetal solo se sugiere por el análisis del genoma, sin realizar inoculaciones *in vivo* (Lopes *et al.*, 2017; Okaiyeto *et al.*, 2015; Otsuka-Rocha *et al.*, 2017; Yanti *et al.*, 2018); adicionalmente al análisis del genoma de la cepa COPE52, se realizaron pruebas para validar la producción de compuestos que pueden tener un efecto en el crecimiento, tanto compuestos difusibles como compuestos volátiles, entre los que destacó la producción de ácido indolacético (AIA), sideróforos, proteasas, dimetil disulfuro (DMDS), acetoína y 2,3-butanediol principalmente, la producción de estos compuesto se ha visto como capacidades deseables en bacterias rizosféricas y endófitas que se quieran usar para producir bioinoculantes que sirvan para promover el crecimiento vegetal (Andrees *et al.*, 2019; Asari *et al.*, 2016; Bhattacharya y Jha, 2012; Chen *et al.*, 2019; Compant *et al.*, 2010; Etesami y Maheshwari, 2018; Hardoim *et al.*, 2008; Hernández-León *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016; Tahir *et al.*, 2017; Toral *et al.*, 2018; Santoyo *et al.*, 2016; Vinodkumar *et al.*, 2017), además se llevaron a cabo pruebas *in vitro* e *in vivo* para probar la eficacia de la cepa COPE52, entre las cuales se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* con otras bacterias promotoras de nuestro grupo de trabajo (*Pseudomonas fluorescens* UM16, *Pseudomonas fluorescens* UM270, *Bacillus* sp. E25, *Bacillus thuringiensis* RZ212, *Pantoea agglomerans* HZ15) para la elaboración de consorcios bacterianos que promuevan el crecimiento vegetal mejor que las inoculaciones individuales, ya que se ha demostrado que las coinoculaciones potencializan el efecto de las bacterias promotoras, observándose efectos aditivos (Rojas-Solís *et al.*, 2018), aunado a esto, también se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* en contra de diversos hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Phomopsis vaccinii*, *Lasioidiplodia parva*) realizando inoculaciones de la cepa COPE52 de forma individual y en consorcio con las diferentes bacterias promotoras mencionadas anteriormente, que como ya se señaló, el uso de consorcios mejora la capacidad de promover el crecimiento vegetal, pero además de esto, también se ha estudiado el uso de mezclas de bacterias con actividad antagónica a fitopatógenos, observando que el uso de mezclas de bacterias disminuye los niveles

de la enfermedad de plantas en invernadero (Liu *et al.*, 2017), lo que fomenta la búsqueda de diversas coinoculaciones para obtener bioinoculantes cada vez más efectivos, tanto para la promoción del crecimiento vegetal como para el antagonismo de fitopatógenos. En cuanto a los ensayos *in vivo*, se inocularon plantas micropropagadas de arándano de las variedades Biloxi y 811a, evaluando los parámetros de promoción del crecimiento vegetal (longitud de la parte aérea, concentración de clorofila, longitud de la raíz, peso fresco y peso seco de la parte aérea y la raíz), cuyo incremento revela mayor toma de nutrientes o un aumento celular, lo que puede indicar cultivos con mayores capacidades productivas, que es lo que se busca en los cultivos agrícolas y la finalidad de realizar estudios para entender las interacciones planta-microorganismo así como obtener nuevos y mejores bioinoculantes para promover el crecimiento vegetal de cultivos de interés agrícola (Andreolli *et al.*, 2019; Glick, 2014; Gouda *et al.*, 2018; Won *et al.*, 2019). Por otra parte, durante el desarrollo de la investigación, se identificaron cultivos de zarzamora infectados por hongos fitopatógenos, por lo que se realizó el aislamiento e identificación de los mismos, ya que los cambios ambientales producidos por las prácticas intensivas, entre otros factores, han desencadenado la aparición de patógenos emergentes, aislando e identificando como agente causal de los daños observados en los cultivos de zarzamora al hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia parva* AB1 mediante la observación microscópica, la amplificación del gen 18S RNAr, la región ITS ADNr y los postulados de Koch (Alves *et al.*, 2008), siendo este el primer reporte de la infección de este hongo en cultivos de zarzamora, la identificación de patógenos emergentes tiene un impacto para el manejo de la enfermedad y la aplicación de antagonistas efectivos, ya que al no tener identificado al agente causal, se pueden aplicar productos que no sean efectivos para su control.

## 15. CONCLUSIÓN

La bacteria endófito *Bacillus toyonensis* COPE52 tiene un arsenal de genes biosintéticos que pueden ser los responsables de promover el crecimiento de plantas de arándano, así como antagonizar hongos fitopatógenos, sugiriendo su alto potencial para ser empleada en un coinoculación con otras PGPBs, como un bioinoculante efectivo en cultivos de frutillas.

## 16. BIBLIOGRAFÍA

Abbamondi, G.R., Tommonaro, G., Weywns, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorenziz, P., Iodice, C., Rangel, W.M., Nicolaus, B. and Vangronsveld, J. (2016). Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3, 1-10.

Akinrinlola, R.J., Yuen, G.Y., Drijber, R.A. and Adesemoye, A.O. (2018). Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by *in vitro* physiological traits. *International Journal of Microbiology*, 1, 1-11.

Alves, A., Crows, P.W., Correia, A. and Phillips, A.J.L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28, 1-13.

Andreoli, M., Zapparoli, G., Angelini, E., Lucchetta, G., Lampis, S. and Vallini, G. (2019). *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiological Research*, 219, 123-131.

Andrees, H., Haider, M.S., Anjum, T. and Akram, W. (2019). Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. *Crop Protection*, 115, 75-83.

Ansari, F.A. and Ahmad, I. (2019). Fluorescent *Pseudomonas* –FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Scientific Reports*, 9, 1-12.

Arahal D.R. (2014). Whole-genome analyses: Average nucleotide identity. In *Methods in microbiology*, 41, 103-122. Academic Press.

Asari, S., Matzén, S., Petersen, M.A., Bejai, S. and Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: Plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 1-11.

Bazinet A.L. (2017). Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *BMC Evolutionary Biology*, 17(176), 1-16.

Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. and Bakker P.A.H.M. (2013). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486.

Bhattacharya, P.N. and Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.

Brusseau, M.L. and Artiola, J.F. (2019). Chemical Contaminants. *Environmental and Pollution Science*, 1, 175-190.

Bucio-Soto, G., Ayala-Ortega, J.J., Vargas-Sandoval, M., Lara-Chávez, M.B.N., Aguirre-Paleo, S. y Negrete-Rodríguez, O.M. (2016). Acarofauna asociada al cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L. var. *biloxi*) en Ziracuaretiro Michoacán. *Entomología Mexicana*, 3, 120-124.

Charron-Lamoureux, V. and Beauregard, P.B. (2019). *Arabidopsis thaliana* seedlings influence *Bacillus subtilis* spore formation. *Molecular Plant-Microbiome Interactions*, ja, 1-32.

Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D. and Bian, K. (2019). Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiological Research*, 218, 41-48.

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., da Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., Xu, X.W., de Meyer, S. and Trujillo, M.E. (2018). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 461-466.

Compant, S., Clément, C. and Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 669-678.

Compant, S., Samad, A., Faist, H. and Sessitch A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 1, 1-9.

Coutinho, B.G., Licastro, D., Mendonca-Previato, L., Cámara, M. and Venturi, V. (2015). Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Molecular-Plant Microbe Interactions*, 28(1), 10-21.

Dini-Andreote, F. and Raaijmakers, J.M. (2018). Embracing community ecology in plant microbiome research. *Trends in Plant Science*, 23(6), 467-469.

Durán, P., Thiergart, T., Garrido-Oter, R., Agler, M., Kemen, E., Schulze-Lefert, P. and Hacquard, S. (2018). Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival. *Cell*, 175, 973-983.

Durand, A., Maillard, F., Alvarez-Lopez, V., Guinchard, S., Bertheau, C., Valot, B., Blaudez, D. and Chalot, M. (2018). Bacterial diversity associated with poplar trees grown on a Hg-contaminated site: Community characterization and isolation of Hg-resistant plant growth-promoting bacteria. *Science of the Total Environment*, 622-623, 1165-1177.

Etesami, H. and Maheshwari, D.K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225-246.

Fernandez-Pavia, S.P., Rodríguez-Alvarado, G., Gómez-Dorantes, N., Gregorio-Cipriano, R. y Fernández-Pavía, Y.L. (2012). Enfermedades en plantas en el Estado de Michoacán. *Biológicas*, 14(2), 75-89.

Ferreira, C.M.H., Soares, H.M.V.M. and Soares, E.V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of the Total Environment*, 682, 779-799.

Finkel, O.M., Castrillo, D., Herrera-Paredes, S., Salas-González, I. Dangl, J.L. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 155-163.

Garrido-Oter, R., Nakano, R.T., Dombrowski, N., Ma, K.W., McHardy, A.C. and Schulze-Lefert, P. (2018). Modular traits of the rhizobiales root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia. *Cell Host & Microbe*, 24, 155-167.

Glenwright, H., Pohl, S., Navarro, F., Miro, E., Jiménez, G., Blanch, A.R. and Harwood, C.R. (2016). The identification of intrinsic chloramphenicol and tetracycline resistance genes in members of the *Bacillus cereus* group (*sensu lato*). *Frontiers in Microbiology*, 7(2122), 1-15.

Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30-39.

Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S. and Patra, J.K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131-140.

Grady, E.N., McDonald, J., Ho, M.T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Renaud, J. and Yuan, Z.C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19(5), 1-14.

Guo, Q., Li, Y., Lou, Y., Shi, M., Jiang, Y., Zhou, J., Sun, Y., Xue, Q. and Lai, H. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 induces plant systemic resistance and improves rhizosphere microecology against tomato yellow leaf curl virus disease. *Applied Soil Ecology*, 137, 154-166.

Habibzadeh, F., Hazrati, S., Gholamhoseini, M., Khodaei, D. and Habashi, D. (2019). Evaluation of quantitative and qualitative characteristics of strawberry in response to bio- and chemical fertilizers. *Gesunde Pflanzen*, 71, 103-111.

Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Pudova, D.S., Akosah, Y.A., Gogoleva, N.E., Shagimardanova, E.I., Mardanov, A.M. and Sharipova, M.R. (2019). Data on the genome analysis of the probiotic strain *Bacillus subtilis* GM5. *Data in Brief*, 23(103643), 1-6.

Hanaka, A., Ozimek, E., Majewska, M., Rysiak, A. and Jaroszek-Scisel, J. (2019). Physiological diversity of Spitsbergen soil microbial communities suggests their potential as plant growth-promoting bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1-26.

Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S. and van Elsas, J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463-471.

Hartmann, A., Rothballer, M. and Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil*, 312, 7-14.

Hernández-León, R., Rojas-Solis, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M.C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E. and Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81, 83-92.

Hirsch, P.R. and Mauchline, T.H. (2012). Who's who in the plant root microbiome? *Nature Biotechnology*, 30(10), 961-962.

Hossain, M.T., Khan, A., Harun-Or-Rashid, M. and Chung, Y.R. (2019). A volatile producing endophytic *Bacillus siamensis* YC7012 promotes root development independent on auxin or ethylene/jasmonic acid pathway. *Plant Soil*, 1, 1-16.

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

Janssens, T.K.S., de Boer, T.E., Agamennone, V., Zaagman, N., van Straalen, N.M. and Roelofs, D. (2017). Draft genome sequence of *Bacillus toyonensis* VU-DES13, isolated from *Folsomia candida* (Collembola: Entomobryidae). *Genome Announcements*, 5(19), 1-2.

Jansson, J.K. and Hofmockel, K.S. (2018). The soil microbiome – from metagenomics to metaphenomics. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 162-168.

Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolsto, A.B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M. and Roselló-Móra, R. (2013a). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 383-391.

Jiménez G., Blanch, A.R., Tamames, J. and Roselló-Móra, R. (2013b). Complete genome sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112<sup>T</sup>, the active ingredient of the feed additive preparation Toyocerin. *Genome Announcement*, 1(6), 1-2.

Kandel, S.L., Firrincieli, A., Joubert, P.M., Okubara, P.A., Leston, N.D., McGeorge, K.M., Mugnozza, G.S., Harfouche, A., Kim, S.H. and Doty, S.L. (2017). An *in vitro* study of bio-control and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. *Frontiers in Microbiology*, 8(386), 1-16.

Kantas, D., Papatsiros, V.G., Tassis, P.D., Giavassiss, I., Bouki, P. and Tzika, E.D. (2015). A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin<sup>®</sup>) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 727-738.

Khan, A.L., Halo, B.A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A. and Lee, I.J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 58-64.

Liu, J., Duan, C.Q., Zhu, Y.N., Zhang, X.H. and Wang, C.X. (2007). Effect of chemical fertilizers on the fractionation of Cu, Cr and Ni in contaminated soil. *Environmental Geology*, 52, 1601-1606.

Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J.P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L. and Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5(14082), 1-11.

Liu, K., McInroy, J.A., Hu, C.H. and Kloepper, J.W. (2017). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant growth promotion in the presence of pathogens. *Plant disease*, 1, 1-24.

Long, H.H., Schmidt, D.D. and Baldwin, I.T. (2008). Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS ONE*, 3(7), 1-10.

Lopes, R., Cerdeira, L., Tavares, G.S., Ruiz, J.C., Blom, J., Horácio, E.C.A., Mantovani, H.C. and de Queiroz, M.V. (2017). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(185), 1-15.

López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I. and 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.

Luby, J.J., Ballington, J.R., Draper, A.D., Pliszka, K. and Austin, M.E. (1991). Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* 290, 1, 393-456.

Márquez-Santacruz, H.A., Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M.C., Velázquez-Sepulveda, I. and Santoyo, G. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2372-2380.

Martins, S.J., Medeiros, F.H.V., Lakshmanan, V. and Bais, H.P. (2018). Impact of seed exudates on growth and biofilm formation of *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 in common bean. *Frontiers in Microbiology*, 8(2631), 1-9.

Mauchline, T.H. and Malone, J.G. (2017). Life in earth – the root microbiome to the rescue? *Current Opinion in Microbiology*, 37, 23-28.

Mendes, R., Garbeva, P. and Raaijmakers, J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 634-663.

Molina-Santiago, C., Pearson, J.R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M.V., Caraballo-Rodríguez, A.M., Petras, D., García-Martín, M.L., Lamon, G., Haberstein, B., Cazorla, F.M., de Vicente, A., Loquet, A., Dorrestein, P.C. and Romero, D. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*, 10(1919), 1-15.

Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B. and Worm, B. (2011). How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology*, 9(8), 1-8.

Okaiyeto, K., Nwodo, U.U., Mabinya, L.V. and Okoh, A.I. (2015). *Bacillus toyonensis* strain AEMREG6, a bacterium isolated from South African marine environment sediment samples produces a glycoprotein bioflocculant. *Molecules*, 20, 5239-5259.

Okinaka, R.T. and Keim, P. (2016). The phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *Microbiology Spectrum*, 4(1), 1-12.

Orozco-Mosqueda, M.C., Rocha-Granados, M.C., Glick, B.R. and Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*, 208, 25-31.

Orozco-Mosqueda, M.C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B.R. and Santoyo, G. (2019). The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-10.

Otsuka-Rocha, F.Y., Maia-de Oliveira, C., Alves-da Silva, P.R., Varial-de Melo, L.H., Ferreira-do Carmo, M.G. and Ivo-Baldani, J. (2017). Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Applied Soil Ecology*, 120, 8-19.

Qin, Y., Shang, Q., Zhang, Y., Li, P. and Chai, Y. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 reforms the rhizosphere bacterial community and improves growth conditions in cucumber plug seedling. *Frontiers in Microbiology*, 8(2620), 1-12.

Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C. and Moënnelocoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321, 341-361.

Rashid, S., Charles, T.C. and Glick, B.R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217-224.

Robles-Montoya, R.I., Parra-Cota, F.I. and de los Santos-Villalobos, S. (2019). Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech*, 9(201), 1-5.

Rojas-Solis, D., Contreras-Pérez, M. y Santoyo, G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*, 15(2), 36-41.

Rojas-Solis, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M.C., Macías-Rodríguez, L.I. and Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 46-52.

Roos, T.B., de Moraes, C.M., Sturbelle, R. T., Dummer, L.A., Fischer, G. and Leivas-Leite, F.P. (2018). Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Research in Veterinary Science*, 117, 260-265.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W. and Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS*, 100(8), 4927-4932.

Sahoo, B., Ningthoujam, R. and Chaudhuri, S. (2018). Isolation and characterization of a lindane degrading bacteria *Paracoccus* sp. NITDBR1 and evaluation of its plant growth promoting traits. *International Microbiology*, 1, 1-13.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C., Glick, B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.

Santoyo, G., Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J. and Hernández-León, R. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), 1-15.

Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitch, A. and Hafeez, F.Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS ONE*, 13(6), 1-15.

Sasse, J., Martinoia, E. and Northen, T. (2018). Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1), 25-41.

Savsi, S. (2012). An agricultural pollutant: Chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 77-80.

Sessitch, A., Pfaffenbichler, N. and Mitter, B. (2019). Microbiome applications from lab to field: Facing complexity. *Trends in Plant Science*, 24(3), 194-198.

Schenk, P.M., Carvalhais, L.C and Kazan, K. (2012). Unraveling plant–microbe interactions: Can multi-species transcriptomics help? *Trends in Biotechnology*, 30(3), 177-184.

Shameer, S. and Prasad, T.N.V.K.V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84, 603-615.

Sharma, A., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., Bansal, Y.K. and Kaushik, R. (2019). Isolation and characterization of halotolerant bacilli from chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere for plant growth promotion and biocontrol traits. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 787-800.

Shrivastava, P. and Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 123-131.

SIAP, SAGARPA, (2018). Atlas agroalimentario 2018. Consultado en 2019.

Spiers, J.M. and Stringer, S.J. (2002). 'Biloxi' Southern highbush blueberry. *Acta Horticultura*, 574, 153-155.

Tahir, H.A.S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M.V. and Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8(171), 1-11.

Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V. and Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9(1315), 1-12.

Varghese, N.J., Mukherjee, S., Ivanova, N., Konstantinidis, K.T., Mavrommatis, K., Kyrpides, N.C. and Pati, A. (2015). Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6761-6771.

Villareal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I. and de los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopatology*, 36(1), 95-130.

Vinodkumar, S., Nakkeeran, S., Renukadevi, P. and Malathi, V.G. (2017). Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: Multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology*, 8(446), 1-13.

Vorholt, J.A., Vogel, C., Carlström, C.I., and Müller, D.B. (2017). Establishing causality: Opportunities of synthetic communities for plant microbiome research. *Cell Host & Microbe*, 22, 142-155.

Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24.

Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D. and Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(952), 1-26.

Won, S.J., Kwon, J.H., Kim, D.H. and Ahn, Y.S. (2019). The effect of *Bacillus licheniformis* MH48 on control of foliar fungal diseases and growth promotion of *Camellia oleifera* seedlings in the coastal reclaimed land of Korea. *Pathogens*, 8(6), 1-14.

Xin, B., Zheng, J., Xu, Z., Song, X., Ruan, L., Peng, D. and Sun, M. (2015). The *Bacillus cereus* group is an excellent reservoir of novel lanthipeptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1765-1774.

Yanti, Y., Warnita, Reflin and Busniah, M. (2018). Indigenous endophyte bacteria ability to control *Ralstonia* and *Fusarium* wilt disease on chili pepper. *Biodiversitas*, 19(4), 1532-1538.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 1613-1617.

Zandvakili, O.R., Barker, A.V., Hashemi, M., Etemadi, F. and Autio, W.R. (2012). Comparisons of commercial organic and chemical fertilizer solutions on growth and composition of lettuce. *Journal of Plant Nutrition*, 1, 1-11.

Zhao X., Yan, L., Xu, X., Zhao, H., Lu, Y., Wang, Y., Jiang, C., Shao, D., Zhu, J. and Shi, J. (2019). Synthesis of silver nanoparticles and its contribution to the capability of *Bacillus subtilis* to deal with polluted waters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1, 1-14.

## 17. ANEXOS: Publicaciones adicionales



### A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*)

M. Contreras<sup>1</sup>, P.D. Loeza<sup>2</sup>, J. Villegas<sup>1</sup>, R. Farias<sup>1</sup> and G. Santoyo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas,  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán,  
México

<sup>2</sup>Genómica Alimentaria,  
Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Sahuayo,  
Michoacán, México

Corresponding author: R. Farias  
E-mail: rodolfofarias44@yahoo.com.mx

Genet. Mol. Res. 15 (3): gmr.15038542  
Received February 11, 2016  
Accepted April 15, 2016  
Published September 16, 2016  
DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038542>

Copyright © 2016 The Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License.

**ABSTRACT.** The aim of this study was to explore the diversity of culturable bacterial communities residing in blackberry plants (*Rubus fruticosus*). Bacterial endophytes were isolated from plant roots, and their 16S rDNA sequences were amplified and sequenced. Our results show that the roots of *R. fruticosus* exhibit low colony forming units of bacterial endophytes per gram of fresh tissue ( $6 \times 10^2 \pm 0.5 \times 10^2$ ). We identified 41 endophytic bacterial species in *R. fruticosus* by BLAST homology search and a subsequent phylogenetic analysis, belonging to the classes Actinobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, and Gammaproteobacteria. Predominantly, genera belonging the Proteobacteria (*Burkholderia*, 29.4%; *Herbaspirillum*, 10.7%; *Pseudomonas*, 4.9%; and *Dyella*, 3.9%), Firmicutes (*Bacillus*, 42.1%), and Actinobacteria (two isolates showing high identity with

the *Streptomyces* genus, 1.9%) divisions were identified. Fifty percent of the bacterial endophytes produced the phytohormone indole-acetic acid (IAA), eleven of which exhibited higher IAA production (>5.8 µg/mL) compared to the plant growth-promoting strain, *Pseudomonas fluorescens* UM270. Additionally, the endophytic isolates exhibited protease activity (22%), produced siderophores (26.4%), and demonstrated antagonistic action (>50% inhibition of mycelial growth) against the grey mold phytopathogen *Botrytis cinerea* (3.9%). These results suggested that field-grown *R. fruticosus* plants contain bacterial endophytes within their tissues with the potential to promote plant growth and display antagonism towards plant pathogens.

**Key words:** Bacterial endophytes; Diversity; Fungal antagonism; Plant growth-promotion mechanisms

## INTRODUCTION

Endophytic bacteria are bacterial species that live within plant tissues innocuously (Kado, 1992), and can be isolated from surface-disinfested plant tissue or extracted from within plants that have not been visibly harmed by the endophyte (Hallman et al., 1997). Some authors have suggested that the efficiency of interaction of bacterial endophytes with their plant hosts is greater than that of rhizospheric bacteria (Ali et al., 2014). The rhizosphere is inhabited by many potential bacterial endophytes, as this ecosystem closely interacts with plant roots, the main entry pathway into plant tissues; however, seed-endophytes, which are vertically transferred do not inhabit the rhizosphere (Truyens et al., 2015). Primary and lateral root cracks, as well as diverse tissue wounds resulting from plant growth, allow rhizospheric bacteria to penetrate and colonize the internal tissues of plants (Ali et al., 2014; Santoyo et al., 2016). Therefore, the rhizosphere is recognized as a reservoir of potential bacterial endophytes (Márquez-Santacruz et al., 2010).

Several studies have documented the benefits of bacterial endophytic growth within plant tissues (Santoyo et al., 2016). For example, bacterial endophytes promote growth in, and render protection against pathogenic infections to, their host plants. Moreover, bacterial endophytes have been shown to induce resistance mechanisms in plants growing under diverse environmental stress conditions (Sziderics et al., 2007; Doty et al., 2009; Ali et al., 2014; Morais-Braga et al., 2015). Previous studies have documented the various direct and indirect mechanisms employed by bacterial endophytes to promote plant growth (Glick, 2014; Santoyo et al., 2016). Sessitsch et al. (2005) reported that ACC deaminase, secreted by the endophytic bacteria *Burkholderia phytofirmans* PsJN, played a direct role in promoting plant growth. However, mutants with ACC deaminase activity, constructed by Sun et al. (2009), were unable to promote root elongation in canola seedlings. Other well-studied endophytes, such as *Azoarcus* sp or *Gluconacetobacter diazotrophicus*, are also involved in promoting growth in diverse plant species, by fixing nitrogen within the plant tissues (Krause et al., 2006; Lery et al., 2011). Other direct mechanisms of plant growth promotion include the production of indole-acetic acid (IAA), siderophores, hydrogen cyanide, and proteases, and indirect mechanisms include the biocontrol of plant pathogens (Santoyo et al., 2012).

The first step towards documenting the beneficial properties and functions of bacterial endophytes is analyzing its diversity. So far, every plant analyzed around the world has been

shown to contain bacterial endophytes. Proteobacteria belonging to the classes  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , as well as species belonging to the classes Actinobacteria and Firmicutes, are some of the most predominant endophytes. Bacterial species belonging to other classes, such as Acidobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, and Verrucomicrobia are less commonly found in plant tissues. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea*, and *Microbacterium* are among the most abundant and commonly reported genera of plant endophytes (Hallman et al., 1997; Márquez-Santacruz et al., 2010; Friesen et al., 2011; Xiong et al., 2014).

In this study, the diversity of bacterial communities residing in the roots of *Rubus fruticosus* (blackberry) plants from Los Reyes, Michoacán, México was characterized by 16S rDNA sequencing. Los Reyes is a major producer of blackberries (and other berries), exporting 80% of the total produce to countries such as USA, Canada, Spain, and Germany (SAGARPA, 2015). However, *R. fruticosus* plants cultivated in the Los Reyes region are commonly exposed to unfavorable environmental conditions, such as a lack of soil nutrients and pathogen attacks, which can reduce its production and affect the economy. As the use of agrochemicals affects fruit export, there is an urgent need for the development of eco-friendly inoculants to promote plant growth and health, as well as to control the *R. fruticosus* pathogens.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant sampling and bacterial isolation

Endophytic bacteria were isolated from 24 *R. fruticosus* plants grown in an agricultural field in Los Reyes, Michoacán, México (19°59'00"N 102°17'00"O, altitude: 1580 m.a.s.l.); the (approximately) two-month old, randomly-selected plants were donated by the farm owners and transported to the lab for analysis. The roots were washed with sterile distilled water and strongly adhered soil particles were carefully removed manually. Root tissue (1 g) specimens were obtained from each plant and surface sterilized using a method described by Márquez-Santacruz et al. (2010). Briefly, the roots were immersed in 70% ethanol for 30 s, washed with fresh sodium hypochlorite solution (2.5% available Cl) for 5 min, rinsed with 70% ethanol for 30 s, and finally washed five times with sterile distilled water. To further confirm the success of the sterilization process, aliquots of the sterile distilled water used in the final rinse were cultured on plates containing NA medium. The plates were examined for bacterial growth after incubation at 28°C for 4 days. Uncontaminated roots, as detected by a culture-dependent sterility test, were used for the isolation of endophytic bacteria.

### Molecular characterization of isolates

Genomic DNA was isolated from 102 bacterial isolates, and their 16S rDNA submits were subjected to PCR for further DNA sequencing, using the bacterial primers fD1 (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). Previously reported PCR conditions were applied (Márquez-Santacruz et al., 2010). All PCR products were purified and directly sequenced at LANGEBIO (Irapuato, Mexico). The obtained rDNA sequences were subjected to homology searches against sequences uploaded to biological databases using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); the obtained sequences were subsequently deposited to GenBank (accession Nos.: KP634900-KP635001).

### Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignments were generated and the 16S rDNA gene sequences were phylogenetically analyzed using MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). All sequences passed the quality control tests. A confidence value for the aligned sequence dataset was obtained by performing a bootstrap analysis of 1000 replications. A phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood algorithm.

### Identification of fungal antagonism and plant-growth promotion determinants

The isolated strains were analyzed for diverse plant growth-promotion traits. Skim milk agar plates were used to detect protease production (Kumar et al., 2005) and siderophore production was determined by the chrome azurol S assay (Alexander and Zuberer, 1991). Indole-3-acetic acid (IAA) production was analyzed as previously reported by Hernández-León et al. (2015), using gas chromatography-mass spectrometry (Gas Chromatograph 6850 Series II - Mass Spectrometry detector 5973; Agilent, Foster City, CA, USA) analysis. IAA production was confirmed by comparing the retention time in the bacterial extracts against that of pure IAA standard samples (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The IAA amounts produced by the bacterial isolates were estimated using calibration curves.

*In vitro* evaluation for fungal antagonism was evaluated using a method previously reported by Santoyo et al. (2010). Bacterial isolates were simultaneously deposited with pathogenic fungi on either PDA or NA agar plates, with very similar results in both media. Bacteria were streaked on plates in a cross shape, and a 4-mm mycelial plug was deposited at the center of each of the quadrants. The plates were incubated in a biological oxygen demand incubator in the dark at 30°C, and the mycelial growth diameter was measured at day 6. Strains showing >50% mycelial growth were considered as antagonists. All experiments described in this section were performed in triplicate.

## RESULTS

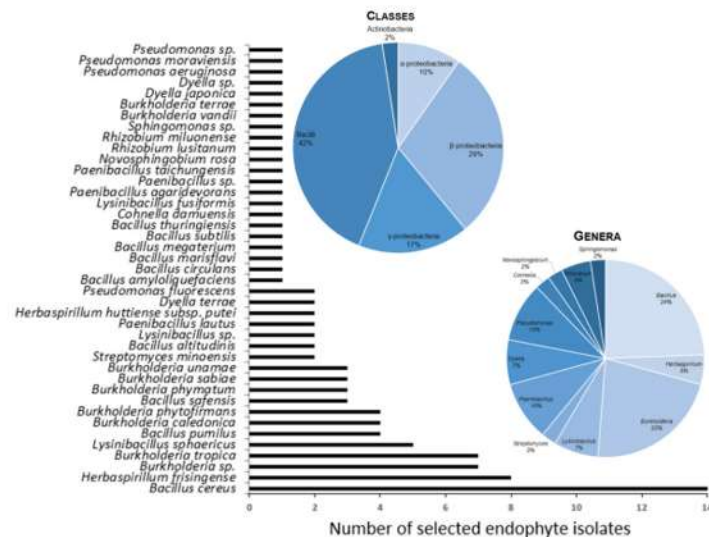
### Abundance of culturable bacterial endophytes

In this study, we followed a culturable method to isolate bacterial endophytes with a potential role in plant protection and growth promotion. Unexpectedly, our analysis revealed that the roots of *R. fruticosus* plants exhibited low colony forming units (CFUs) of endophytic bacteria (low abundance) per gram of tissue ( $6 \times 10^2 \pm 0.5 \times 10^2$ ).

### Diversity and phylogenetic analysis of bacterial endophytes

Bacterial colonies were randomly picked for 16S rDNA sequencing, in order to obtain a representative sample of the culturable diversity of bacterial endophytes inhabiting the roots of *R. fruticosus*. Forty-one different bacterial endophytic species or operational taxonomic units were identified by a BLAST homology search. These bacterial endophytes belonged to 5 classes: Actinobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, and Gammaproteobacteria (Figure 1). The genus *Bacillus* (42.1%), belonging to the Firmicutes division, was the most commonly detected and the most abundant endophyte in the roots of *R. fruticosus* plants. Additionally, we

observed multiple genera belonging to the division Proteobacteria, including *Burkholderia* (29.4%), *Herbaspirillum* (10.7%), *Pseudomonas* (4.9%) and *Dyella* (3.9%). Two isolates showed high 16S rDNA gene identity with the *Streptomyces* genus (1.9%), belonging to the division Actinobacteria. Analysis of the bacterial endophyte diversity at the species and genus level revealed that *Bacillus cereus* was most commonly isolated from *R. fruticosus* roots (Figure 1). *Herbaspirillum frisingense*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Burkholderia* sp, *Bacillus tropica*, *Bacillus phytofirmans*, and *Bacillus caledonica* were also among the most abundant isolates.



**Figure 1.** Diversity of bacterial endophytes isolated from roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). Pie graphs represent the distribution of bacterial classes and genera in percentages.

Figure 2 shows the phylogenetic relationships of bacterial endophytes isolated from *R. fruticosus* roots. The phylogenetic tree includes 102 endophyte isolates that are representative of the 5 classes identified in this study (Actinobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, and Gammaaproteobacteria). All sequenced 16S rDNA samples were closely related to known bacterial species, with identities >97% in sequence alignment analysis.

### Potential mechanisms of plant protection and growth promotion

In this study, the potential mechanisms of plant growth-promotion and phytopathogen inhibition were also explored, in order to assign preliminary functional roles to the plant bacterial endophytes. Figure 3 shows that 50% of the isolated bacterial endophytes produced the phytohormone IAA; however, eleven of these produced higher quantities of IAA (>5.8 µg/mL) than the plant growth-promoting strain, *Pseudomonas fluorescens* UM270. The endophytic isolates also exhibited protease activity (22%), siderophore production (26.4%), and antagonistic action (>50% mycelial growth inhibition) against the grey mold phytopathogen *Botrytis cinerea* (3.9%). In this study, we selected the most promising bacterial endophytes for further analysis of plant growth promotion in greenhouse and field experiments.



## DISCUSSION

Blackberry plants (*R. fruticosus*) belong to the Rosaceae family of shrubs, characterized by woody stems and angular thorns that are tender in youth. This could be responsible for the low degree of colonization by endophytic bacteria living in the rhizosphere (Santoyo et al., 2016), as the number of bacterial endophytes found in this study is low compared to the numbers seen in studies conducted in other plants with a higher percentage of soft tissue. For example, Gennaine et al. (2004) reported the presence of  $10^2$ - $10^4$  CFU endophytes per gram of poplar plant tissue. Studies conducted in other plants with high percentages of soft tissue, such as rice (Gyaneshwar et al., 2001), citrus plants (Araújo et al., 2002), and sugarcane (Mendes et al., 2007), have also reported an abundance of endophyte colonization ( $10^2$ - $10^3$  CFU/g rice tissue,  $10^2$ - $10^4$  CFU/g citrus plant root tissue, and  $10^2$ - $10^6$  CFU/g sugarcane tissue). The abundance of bacterial endophytes within plant tissues is reported to be directly proportional to the biological effect exerted on the host plants. Mendes et al. (2011) reported that the *Pseudomonas* phylotype, a component of the microbial consortia growing in suppressive soils, is an important suppressor of diseases caused by *Rhizoctonia solani* in these soils. This is an interesting hypothesis that must be tested on bacterial endophytes in their plant hosts. Moreover, the abundance of bacterial endophytes inhabiting the internal tissues of plants may be variable and dependent on several factors, such as the species, stage of growth, or type of tissue analyzed (Santoyo et al., 2016). As the rhizosphere is one of the main reservoirs of potential endophytes, it could be hypothesized that soils with poor microbial and bacterial diversity could have a lower capacity and endophyte abundance required to colonize plant roots.

In this study, we analyzed the culturable bacteria inhabiting the internal roots of *R. fruticosus* growing in the field. This analysis provides us with a glimpse of the endophytic diversity and its potential role in promoting antifungal activity and plant growth. A majority of the bacterial species isolated from blackberry roots in this study belong to the *Bacillus* species, followed by the *Burkholderia* species, a close relative of the *Pseudomonas* species. Members of the *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Burkholderia* genera have been widely recognized by their biocontrol and plant growth-promoting activities (Santoyo et al., 2012). These species produce a number of metabolites with a wide range of functions and applications, such as antibiotics, volatile organic compounds, and antifungal, antiviral, and insecticidal compounds (Ryan et al., 2008; Martínez-Absalón et al., 2014). These three genera have also been detected as endophytes in the roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot.) by Márquez-Santacruz et al. (2010), and as regular microbiota in many other plant hosts (Li et al., 2015; Ludwig-Müller, 2015; Sheibani-Tezerji et al., 2015).

Species belonging to the *Herbaspirillum* genus are also abundantly and commonly found as endophytes in *R. fruticosus* plants. Previous reports have identified this genus as a common endophyte of *Oryza sativa* and other gramineous plants (Rothballer et al., 2008). Recently, Zgadżaj et al. (2015) co-inoculated endophytic *Herbaspirillum* strains and the natural symbiont *Mesorhizobium loti* to lotus plants. Interestingly, both species were shown to efficiently colonize the nodules formed by infecting *M. loti* symbionts. Additionally, several bacterial consortia were co-inoculated to test the colonization capacity of *L. japonicus* plant nodules. The results of this revealed complex and interesting host-microbe and microbe-microbe interactions, demonstrating the possibility of expanding the available strategy for improving plant growth using nitrogen-fixing bacteria along with other bacterial endophytes (Zgadżaj et al., 2015). The *Dyella* genus, a previously reported plant endophyte, was not very

abundant in blackberry roots, despite being among the most represented genera in the roots of *Cytisus striatus* (Becerra-Castro et al., 2011). Interestingly, the latter results were obtained in *C. striatus* plants growing at a hexachlorocyclohexane-contaminated site that were analyzed for their bacterial endophyte diversity. Interestingly, *Dyella* strains are capable of producing IAA and biosurfactant products, suggesting their potential role in plant growth-promotion and phytoremediation.

A recent review on plant growth-promoting bacterial endophytes by Santoyo et al. (2016) analyzed the diverse and similar mechanisms employed by plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR), such as the production of phytohormones like auxin, cytokinin, gibberellin, IAA, acetoin, and 2,3-butanediol, iron-chelating compounds such as siderophores, and protease activity. Indirect promotion of plant growth occurs when a PGPR avoids infection with a phytopathogen, such as fungi or bacteria. In this study, both direct and indirect mechanisms were detected in the bacterial endophytes isolated from the *R. fruticosus* root tissues. Therefore, we expect to identify both protective and growth promoting mechanisms in future experiments with the selected endophytes.

The biodiversity of endophytic bacteria has been studied in various host plants of agricultural importance, such as peppers (Marasco et al., 2012), maize (Stamford et al., 2002), potatoes (Andreote et al., 2010), and tomatoes (Márquez-Santacruz et al., 2010). However, their features and functional roles can be diverse. We propose that the search for novel bacterial endophytes may help identify novel mechanisms that benefit plant growth, and reveal interesting interactions between plants and their endophytes, and between endophyte strains within the plant.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (#2014-2015) (G. Santoyo and R. Farias) and CONACYT-México (scholarship to M. Contreras) for the financial support provided.

### REFERENCES

- Alexander DB and Zuberer DA (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12: 39-45. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00369386>
- Ali S, Charles TC and Glick BR (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol. Biochem.* 80: 160-167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.003>
- Andreote FD, da Rocha UN, Araújo WL, Azevedo JL, et al. (2010). Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek* 97: 389-399. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-010-9421-9>
- Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, van Elsas JD, et al. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4906-4914. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.10.4906-4914.2002>
- Becerra-Castro C, Kidd PS, Prieto-Fernández Á, Weyens N, et al. (2011). Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. *Plant Soil* 340: 413-433. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-010-0613-x>

---

Genetics and Molecular Research 15 (3): gmr.15038542

- Doty SL, Oakley B, Xin G, Kang J, et al. (2009). Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* 47: 23-33. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03179967>
- Friesen ML, Porter SS, Stark SC, von Wettberg EJ, et al. (2011). Microbially mediated plant functional traits. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 42: 23-46. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039>
- Germaine K, Keogh E, Garcia-Cabellos G, Borremans B, et al. (2004). Colonization of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 109-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.009>
- Glick BR (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res. (Pavia)* 169: 30-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, et al. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183: 2634-2645. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.8.2634-2645.2001>
- Hallman J, Quadt-Hallman A, Mahaffee WF and Klopper JW (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914. <http://dx.doi.org/10.1139/m97-131>
- Hernández-León R, Rojas-Solis D, Contreras-Pérez M, Orozco-Mosqueda MC, et al. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* 81: 83-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Kado CI (1992). Plant pathogenic bacteria. In: The Prokaryotes (Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, et al., eds.) Springer Science, New York, 659-674.
- Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, et al. (2006). Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.* 24.
- Kumar S, Sharma NS, Saharan MR and Singh R (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem* 40: 1701-1705. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.047>
- Lery LM, Hemery AS, Nogueira EM, von Krüger WM, et al. (2011). Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 562-576. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0178>
- Li H, Dietrich C, Zhu N, Mikaelyan A, et al. (2015). Age polyethism drives community structure of the bacterial gut microbiota in the fungus-cultivating termite *Odontotermes formosanus*. *Environ. Microbiol.*
- Ludwig-Müller J (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol. Lett.* 37: 1325-1334. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-015-1814-4>
- Marasco R, Rolli E, Ettoumi B, Viganì G, et al. (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS One* 7: e48479. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048479>
- Márquez-Santacruz HA, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda MC, Velazquez-Sepulveda I, et al. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genet. Mol. Res.* 9: 2372-2380. <http://dx.doi.org/10.4238/vol9-4gmr921>
- Martínez-Absalón S, Rojas-Solis D, Hernández-León R, Prieto-Barajas C, et al. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Sci. Technol.* 24: 1349-1362. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2014.940846>
- Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL and Raaijmakers JM (2007). Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7259-7267. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01222-07>
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, et al. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332: 1097-1100. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203980>
- Morais-Braga MF, Souza TM, Santos KK, Guedes GM, et al. (2015). Additive effect of *Lygodium venustum* SW. in association with gentamicin. *Nat. Prod. Res.* 1-3. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1074227>
- Rothballer M, Eckert B, Schmid M, Fekete A, et al. (2008). Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 85-95. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00582.x>
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, et al. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (2015). Annual Report. SAGARPA, México.
- Santoyo G, Valencia-Cantero E, Orozco-Mosqueda MC, Peña-Cabrales JJ, et al. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagonista de *Pseudomonas fluorescens* zum80 hacia hongos fitopatógenos [Role of siderophores in antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* zum80 against phytopatogens]. *Terra Latinoam.* 28: 53-60.
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda MC and Govindappa M (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol. Sci. Technol.* 22: 855-872. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>

- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MC and Glick BR (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183: 92-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, et al. (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1187-1192. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>
- Sheibani-Tezerji R, Rattei T, Sessitsch A, Trognitz F, et al. (2015). Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *MBio* 6: e00621-15. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00621-15>
- Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB and Araujo JM (2002). Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresour. Technol.* 83: 105-109. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00206-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00206-1)
- Sun Y, Cheng Z and Glick BR (2009). The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol. Lett.* 296: 131-136. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01625.x>
- Sziderics AH, Rasche F, Trognitz F, Sessitsch A, et al. (2007). Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Can. J. Microbiol.* 53: 1195-1202. <http://dx.doi.org/10.1139/W07-082>
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A and Vangronsveld J (2015). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 7: 40-50. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12181>
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Xiong XQ, Liao HD, Ma JS, Liu XM, et al. (2014). Isolation of a rice endophytic bacterium, *Pantoea* sp. Sd-1, with ligninolytic activity and characterization of its rice straw degradation ability. *Let. Appl. Microbiol.* 58: 123-129. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12163>
- Zgadaj R, James EK, Kelly S, Kawaharada Y, et al. (2015). A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLoS Genet.* 11: e1005280. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005280>

## Pruebas forenses moleculares: del ADN a la identidad de la persona

Miguel Contreras-Pérez y Gustavo Santoyo-Pizano

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, México.  
Contacto: miguel82cp@gmail.com

**Resumen:** El ADN (ácido desoxirribonucleico) se encuentra en cada una de nuestras células y su estudio nos permite conocer la identidad de la persona a la que pertenece el mismo, esto mediante el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), que no es más que la amplificación de fragmentos específicos de ADN. En las pruebas forenses moleculares se amplifican fragmentos de tamaño pequeño repetidos en tándem conocidos como STR (Short Tandem Repeats), así como polimorfismos del cromosoma Y o del ADN mitocondrial y el marcador de sexo de la amelogenina, los cuales pasan rigurosos procesos de validación y estandarización para ser utilizados con fines legales; mediante el uso de estos marcadores se generan perfiles genéticos con los que se nutren bases de datos en las que se comparan las muestras de los vestigios biológicos encontrados en las escenas del crimen; la asignación de un perfil positivo mediante la comparación de estos marcadores moleculares es sumamente confiable, ya que el encontrar una persona con un perfil genético idéntico es de  $7 \times 10^{-18}$ , es decir, uno en cien mil billones, lo cual es prácticamente imposible, por lo que es de suma importancia el fortalecer las bases de datos de perfiles genéticos así como las colaboraciones internacionales para permitir una rápida y confiable identificación de los vestigios biológicos, con lo que se logrará la resolución de crímenes que sin el uso de estas técnicas sería imposible.

**Palabras clave** ADN, PCR, perfil genético.

### Introducción

Los diversos organismos vivos, incluyendo los humanos, contenemos ADN o ácido desoxirribonucleico en cada una de nuestras células. El ADN, por lo tanto, contiene toda la información genética (también conocido como genoma) que nos identifica como individuos únicos; es decir, ahí encontramos una huella molecular que permite diferenciarnos con otras personas; esto, a pesar que nuestro genoma es 99.9% idéntico.

En la actualidad el uso de técnicas moleculares para la identificación de personas en las ciencias forenses permite una precisa identificación a través del análisis de nuestra huella molecular o ADN. A través de las pruebas forenses moleculares también se puede determinar la paternidad, el parentesco entre familiares o resolver algún crimen cometido donde involucre el análisis de muestras celulares que contengan ADN, incluyendo cabello, sangre, esperma, etcétera (Gehrig & Teyssier, 2002).

Para poner un poco de contexto, hasta antes de las pruebas forenses

año 8, no. 13 julio - diciembre del 2018

moleculares, era muy complicado identificar a una persona a la que pertenecían los vestigios biológicos encontrados en algún lugar, debido a que estos se encontraban degradados o en proporciones muy pequeñas. Al profundizar en el estudio del ADN, se crearon técnicas para amplificarlo y de pequeñas muestras se logró obtener una mayor cantidad de material para analizar, logrando así desarrollar una técnica que sea útil para la identificación de personas (Schneider, 2007). Como se había comentado anteriormente, las secuencias de nuestro ADN son muy similares, por lo que es necesario identificar regiones con diferencias específicas que permitan reconocer pequeñas variaciones. En ocasiones se puede analizar desde una sola célula y obtener el material genético completo, o al menos, identificar ciertos marcadores o genes que permitan su análisis. Una de las técnicas utilizadas para la amplificación del ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR, Polimerase Chain Reaction) (Erlich *et al.*, 1991), que es la técnica en la que, mediante el uso de pequeñas secuencias de nucleótidos llamadas primers, se obtienen millones de copias de una región específica del ADN, logrando

con esto aislar diversas regiones del ADN para su análisis e identificación. Existen diversos artículos sobre el tema de la PCR, por lo que se recomienda su lectura para profundizar en el tema (ver Rodríguez Sánchez y Barrera Saldaña, 2004).

### ¿Qué regiones del ADN se amplifican para la identificación forense?

En el ADN existen regiones que son utilizadas para la síntesis de proteínas conocidas como genes (ADN codificante) y debido a que tienen una función esencial en el organismo, por lo general son genes de secuencia poco variables. Por otra parte, las regiones que no son utilizadas para la síntesis de proteínas (ADN no codificante) son segmentos de secuencias altamente variables, por lo que se pueden encontrar diversos tipos de mutaciones, también conocidas como polimorfismos. Los polimorfismos de secuencia (cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN que se conocen como SNP's por sus siglas en inglés) y los polimorfismos de longitud (producidos por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos, los cuales forman el ADN repetitivo en tándem o VNRT por sus siglas en inglés). Es precisamente en este ADN en el que se enfocan las pruebas de genética forense. Los polimorfismos de longitud también se pueden dividir en ADN satélite (de 50 a 500 pares de bases [pb]), ADN minisatélite (7 a 49 pb) y ADN microsatélite (2 a 6 pb), siendo los más usados el ADN minisatélite y el ADN microsatélite (Schlötter, 2000).

Como ya se mencionó, el 99.9% del ADN es similar entre todas las personas, para solucionar este problema, la identificación forense se basa en el uso de las secuencias cortas repetidas en tándem (STR's por sus siglas en inglés), debido a que estas se forman por herencia del padre y de la madre y son diferentes entre la población, excepto en el caso de los gemelos que comparten saco vitelino (Jobling & Gill, 2004).

Las secuencias STR's deben de pasar varios filtros antes de su uso para la identificación de personas, ya que

*Milenaria, Ciencia y Arte 9*

previamente deben ser estandarizados y pasar arduas pruebas de repetitividad y reproducibilidad (Moretti *et al.*, 2001). Se utilizan 15 STR's de 4 a 5 pb en la unidad de repetición y no pasan de las 200 pb en su secuencia total, ya que esto les brinda mayor estabilidad tanto a la degradación como a los artefactos. Los 15 STR's utilizados actualmente (ya que son los que hasta el momento se encuentran validados y autorizados) son D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 y FGA (Ruitberg *et al.*, 2001).

#### STR's ¿La única opción para el análisis de los vestigios biológicos?

Adicional al uso de estos 15 STR's de ADN nuclear, también se usan polimorfismos SNP's de ADN mitocondrial y del cromosoma Y (alosoma o cromosoma sexual), así como el marcador de sexo de la amelogenina (Dos Santos-Rocha *et al.*, 2018). El ADN mitocondrial sirve principalmente para buscar polimorfismos en muestras degradadas, debido a que es más estable y por lo tanto se conserva íntegro durante más tiempo que el ADN nuclear, principalmente se usa para la identificación de personas a partir de restos óseos. Los polimorfismos del cromosoma Y se utilizan principalmente en estudios de paternidad, ya que este se hereda de padre a hijo, y los cambios que pueda tener solo son derivados de mutaciones, aunque también se emplea ampliamente cuando se tienen muestras mezcladas de material genético masculino y femenino. El gen de la amelogenina es usado para determinar el sexo de la persona de la cual provienen los vestigios biológicos. Esto es debido a que este gen se puede encontrar en el cromosoma X (AMELX) obteniendo un amplificado de 106 pb, o también puede estar presente en el cromosoma Y (AMELY) obteniendo un amplificado de 112 pb. Por lo tanto, al realizar electroforesis de una muestra de origen masculino (XY) se observen dos bandas y en las muestras de origen femenino (XX) solo se observe una banda,

permitiendo así discernir el sexo de la persona a partir de una muestra de ADN (Velarde-Félix *et al.*, 2008).

#### Análisis genético forense

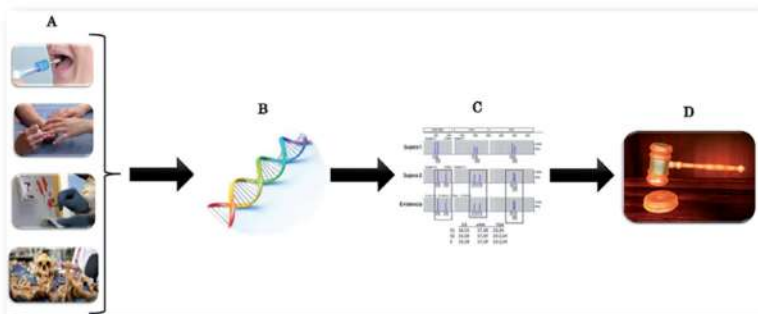
La cantidad e integridad del ADN que se obtiene de los vestigios biológicos recuperados era una limitante mayor a considerar en los años 80's y 90's, ya que al tener que realizar una amplificación y una secuenciación por cada STR a analizar, exigía una gran cantidad de muestra íntegra, y por lo tanto, un costo muy elevado (Urquhart *et al.*, 1994). En la actualidad existen secuenciadores automáticos y PCR multiplex, que son aquellos aparatos que realizan amplificaciones simultáneas de los diferentes STR's a partir de una sola muestra mediante el uso de primers (secuencias cortas de nucleótidos), marcados con fluoróforos (componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente), lo que permite obtener perfiles genéticos con muestras escasas, disminuyendo costos y tiempo de análisis, pudiendo rápidamente comparar los perfiles genéticos (STR's amplificados) de las muestras obtenidas en algún caso de estudio. Los equipos más usados son aquellos que amplifican 9 STR's más el marcador de sexo de la amelogenina y los que amplifican 15 STR's más el marcador del sexo de la amelogenina (Butler, 2015<sup>1</sup>); el proceso general para realizar los análisis genéticos forenses se puede observar en la **Figura 1**.

Al realizar el perfil genético de 15 STR's (de los vestigios biológicos y/o de los presuntos culpables) se incrementa notablemente la capacidad de identificar

la correspondencia a los perfiles genéticos comparados, esto de manera sumamente confiable, ya que la posibilidad de encontrar al azar a una persona con 15 STR's idénticos al de otra persona es de  $7 \times 10^{-18}$ , es decir, uno en cien mil billones, lo cual es prácticamente imposible; ahí radica la importancia de crear bases de datos con perfiles genéticos, para así tener con que comparar los perfiles obtenidos de los vestigios biológicos de las escenas del crimen (Butler, 2015<sup>2</sup>).

Actualmente, en los Estados Unidos de América se realizan bases de datos de todos los reos, para que adicional a tener una base de datos con sus huellas digitales, también tener una base de datos con su huella digital genética, es decir su perfil genético, las cuales se guardan en el Combined DNA Index System (CODIS por sus siglas en inglés) (Baechtel *et al.*, 1991). Existen también bases de datos europeas, siendo la más conocida la United Kingdom National DNA Database (NDNAD por sus siglas en inglés) ya que fue la primer base de datos forense mundial creada en 1995 (Schneider & Martin, 2001), teniendo estas una gran cantidad de perfiles genéticos (**Figura 2**) y existiendo esfuerzos para homologar el contenido de estas bases de datos y lograr así tener una base de datos mundial, lo que conlleva a desarrollar estrategias para el manejo y conservación de esta información (Wallace *et al.*, 2014)

Para que el perfil genético de algún vestigio obtenido de una escena de un crimen, prueba de paternidad o identificación de una persona



**Figura 1.** Análisis molecular de vestigios en medicina forense; A.- Toma de muestra de vestigios a analizar (saliva, células epiteliales, sangre, etcétera); B.- Extracción de ADN; C.- Amplificación y comparación de STR's de las bases de datos o sospechosos en el caso; D.- Dictamen de la procedencia de los vestigios.

Efecto de la coinoculación de *Bacillus toyonensis* COPE52 y otras bacterias sobre el crecimiento de arándano (*Vaccinium* spp.) y el biocontrol de hongos fitopatógenos

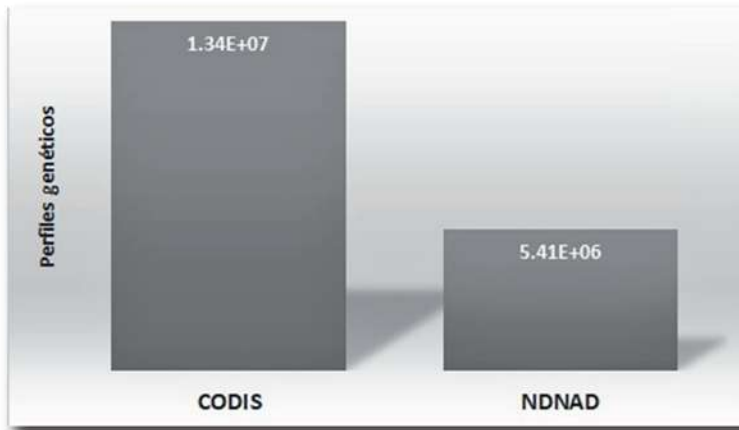


Figura 2. Perfiles genéticos en las bases de datos CODIS y NDNAD (Datos obtenidos de las páginas oficiales <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis/ndis-statistics> y <https://www.gov.uk/government/statistics/national-dna-database-statistics> a Junio de 2018)

desaparecida tenga una aplicación legal, se debe tener especial cuidado en la toma de las muestras y la cadena de custodia de las mismas, todo ello para evitar la contaminación de las mismas (Lee *et al.*, 2013). Una vez en el laboratorio, se debe analizar el máximo de polimorfismos disponibles para obtener un perfil genético completo y comparar los resultados obtenidos con los de él o los sospechosos y finalmente elaborar el informe médico-legal que puede ser utilizado para deslindar responsabilidades en un juicio (Guillén *et al.*, 2000). En la actualidad diversos laboratorios ofrecen este tipo de pruebas, sin embargo, los costos aún siguen siendo relativamente altos, lo que restringe el acceso a estas metodologías para los países subdesarrollados y en menor medida a los países en vías de desarrollo, existiendo también la escasez de personal calificado en las dependencias gubernamentales e instituciones privadas, por lo que en esta área existe un gran número de oportunidades de desarrollo.

**Conclusiones y perspectivas**

En la actualidad las técnicas moleculares en diversos campos, incluida la medicina forense, ha tenido grandes avances en cuanto a la rapidez y precisión con la que se pueden analizar las muestras, ya que como se mencionó, las pruebas forenses moleculares comenzaron analizando 1 STR a la vez y ahora se analizan 15 STR's o más de manera simultánea,

dando mayor fidelidad y confiabilidad de los resultados obtenidos. Sin duda que, en pocos años, las pruebas moleculares forenses no sólo incluirán estos marcadores genéticos, sino que se tendrá la validación de otros marcadores en el genoma. Además, se contará con equipos que analizaran dichas muestras de manera conjunta, utilizando menores cantidades de ADN, así como muestras degradadas, incompletas o mezclas de diferentes personas. Debido a que estas técnicas se encuentran cada vez más al alcance de Universidades y Centros de Investigación en el país, se realizarán aportes importantes a la validación y ampliación de las mismas, logrando tal vez de esta forma, homologar las bases de datos internacionales y tener así una única base de datos de perfiles genéticos globales. Lo anterior es indispensable en un país como México, donde no existe o es limitada la información sobre muestras forenses analizadas en los Estados de la República. Además, de que no existen protocolos de información que estandaricen la información en una sola base de datos para todo el país. Lo anterior ayudaría a determinar de una forma más rápida o eficiente la identificación de personas desaparecidas o el esclarecimiento de crímenes.

**Referencias**

Baechtel F.S., Monson K.L., Forsen G.E., Budowle B., Kearney J.J. (1991) Tracking the

Violent Criminal Offender through DNA Typing Profiles — a National Database System Concept. En: Burke T., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff R. (Eds.) *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications. Experientia Supplementum* (Vol. 58:356-360). Basel, Switzerland: Birkhäuser

Butler, J.M.<sup>1</sup> (2015). Data, Models, Thresholds. En: J.M. Butler (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. (3ª Edición, Vol. 3:25-46). Gaithersburg, Maryland, USA: Academic Press

Butler, J.M.<sup>2</sup> (2015). STR Profiles: Multiplex PCR, Tri-Alleles, Amelogenin, and Partial Profiles. En: J.M. Butler (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. (3ª Edición, Vol. 3:109-127), Gaithersburg, Maryland, USA: Academic Press

Dos Santos-Rocha, A., Salviano-Soares de Amorim, I., De Almeida-Simao, T., De Souza-Da Fonseca, A., Grazioli-Garrido, R. & Luiz-Mencalha, A. (2018). High-Resolution Melting (HRM) of Hypervariable Mitochondrial DNA Regions for Forensic Science. *Journal of Forensic Sciences*, 63(2):536-540.

Erllich, H.A., Gelfand, D. & Sninsky, J.J. (1991). Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252:1643-1651.

Gehrig, C. & Teyssier A. (2002). Forensic DNA Analysis. *Chimia*, 56(3):71-73.

Guillén, M., Lareu, M.V., Pestoni, C., Salas, A. & Carracedo, A. (2000). Ethical-legal problems of DNA databases in criminal investigation. *Journal of Medical Ethics*, 26:266-271.

Jobling, M.A. & Gill, P. (2004). Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. *Nature Reviews | Genetics*, 5:739-751.

Lee, S.B., Crouse, C.A. & Kline M.C. (2013). Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts. En: J.G., Shewale (Ed.), *Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging Technologies*. (1ª Edición, Vol. 1:19-37). Foster City, California, USA: CRC Press.

Moretti, T., Baumstark, A., Defenbaugh, D., Keys, K., Smerick, J. & Budowle, B. (2001). Validation of Short Tandem Repeats (STRs) for Forensic Usage: Performance Testing of Fluorescent Multiple STR Systems and Analysis of Authentic and Simulated Forensic Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 46(3):647-660.

Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).

Ruitberg, C.M., Reeder, D.J. & Butler, J.M. (2001). STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research*, 29(1):320-322.

Schlöterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109:365-371.

Schneider, P.M. & Martin, P.D. (2001). Criminal DNA databases: the European situation. *Forensic Science International*, 119:232-238.

Schneider, P.M. (2007). Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International*, 165:238-243.

Urquhart, A., Kimpton, C.P., Downes, T.J. and Gill, P. (1994). Variation in Short Tandem Repeat sequences — a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine*, 107:13-20.

Velarde-Félix, J.S., Molina-Benitez, C.E., Solórzano-Rosales, S.R., Cázarez-Salazar, S.G., Rendón-Aguilar, H., Murillo-Llanes, J. & Ríos-Tostado, J.J. (2008). Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 55(1):17-20.

Wallace, H.M., Jackson, A.R., Gruber, J. & Thibedeau, A.D. (2014). Forensic DNA databases-Ethical and legal Standards: A global review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 4:57-63.