



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE *Arthrobacter agilis* UMCV2 Y SU COMPUESTO
VOLÁTIL DIMETILHEXADECILAMINA EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN
DE FRESA**

TESIS QUE PRESENTA:

Biól. CHRISTIAN HERNÁNDEZ SOBERANO

Como requisito para obtener el Título

Profesional de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

Director de tesis:

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas EDUARDO VALENCIA CANTERO

Morelia, Michoacán, Diciembre 2016



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. EDUARDO VALENCIA CANTERO Y CON LA BECA 331455 OTORGADA POR EL CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al D.C. Eduardo Valencia Cantero, por darme la oportunidad de volver a integrarme a su grupo de trabajo, su disponibilidad, su comprensión y su gran calidad humana, por ser guía de mi formación profesional.

A mi comité sinodal, los Doctores José López Bucio, Ernesto García Pineda, Rafael Salgado Garciglia, Lourdes I. Macías Rodríguez, por sus observaciones y revisión de mi proyecto de investigación.

A mi familia: mis mamás Gricelda y Ma. Esther, por siempre estar conmigo en todo momento, sin ustedes dos nada hubiera sido posible; a mi papá, Atanacio, por las lecciones de vida; a mis tíos, Héctor, Noé, Jaime, Sergio, Hilda por su apoyo en todo sentido; a mis primos Noé y Fernando, por los momentos gratos compartidos; a mis hermanas, Karla y Ximena, por ser fuente de inspiración para seguir superándome; y al esposo de mi mamá, Carlos, por todo su apoyo durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos: de generación, Marco y Gustavo; de laboratorio, Ramiro, Erasto, Idolina, Vicente, Ernesto, Elizabeth, Pedro, Daniel, Cristina, Benjamín, Julie, Rocío, Miguel; de vida, Raúl, David, Pablo, Pedro, Ana, Maritza, Alfonso y Ulises, por compartir conmigo malos y buenos momentos, por su comprensión, su amistad, por hacer grato mi viaje a través de la vida, por permitirme ser parte de todos ustedes.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
2	ANTECEDENTES.....	5
2.1	La fresa	5
2.1.1	Características generales	5
2.1.2	Importancia económica	7
2.1.3	Proceso de producción de fresa.....	9
3	El microbioma de las plantas	11
3.1	Importancia de las PGPRs en la producción de fresa.....	12
3.1.1	<i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2	13
4	JUSTIFICACIÓN.....	16
5	HIPÓTESIS.....	17
6	OBJETIVOS.....	18
6.1	Objetivo general:	18
6.1.1	Objetivos particulares:.....	18
7	MATERIALES Y MÉTODOS	19
7.1	Plantas de fresa.....	19
7.2	Bacterias	20
7.3	Dimetilhexadecilamina.....	20
7.4	Efecto de los compuestos orgánicos difusibles y volátiles producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa.....	21
7.5	Efecto de la dimetilhexadecilamina sobre la germinación de semillas de fresa	22
7.6	Efecto de los VOCs producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	23

7.7	Efecto de la inoculación de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	24
7.8	Efecto de la exposición continua a la dimetilhexadecilamina sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	24
7.9	Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la DMHDA en el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	25
7.10	Efecto de la inoculación del consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496 sobre el rendimiento de la producción y la calidad del fruto en plantas de fresa en condiciones de invernadero.....	25
7.11	Determinación de la colonización y persistencia del consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496 en plantas de fresa en condiciones de invernadero.....	27
7.12	Análisis estadístico.....	27
8	RESULTADOS.....	28
8.1	Efecto de los compuestos difusibles de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa	28
8.2	Efecto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa.....	29
8.3	Efecto de la dimetilhexadecilamina sobre la germinación de semillas de fresa	30
8.4	Efecto de los VOCs producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	31
8.5	Efecto de la inoculación de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	33
8.6	Efecto de la exposición continua a la dimetilhexadecilamina sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	34
8.7	Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la dimetilhexadecilamina sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	40

8.8	Efecto de la inoculación del consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496 sobre el rendimiento de la producción de plantas de fresa en condiciones de invernadero	43
8.9	Efecto de la inoculación del consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496 sobre la calidad del fruto de plantas de fresa en condiciones de invernadero	44
8.10	Colonización y persistencia del consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496 en plantas de fresa en condiciones de invernadero.....	47
9	RESULTADOS ADICIONALES	51
9.1	Efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre la infección por <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	51
10	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	54
11	RESUMEN DE RESULTADOS	64
12	PERSPECTIVAS	65
13	BIBLIOGRAFÍA.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Importancia económica de la fresa a nivel mundial	7
Figura 2. Representación esquemática del proceso de producción de fresa.....	10
Figura 3. Plantas de fresa.....	19
Figura 4. Cultivos bacterianos	20
Figura 5. Sistema utilizado para observar el efecto sobre la germinación de semillas de fresa de los compuestos volátiles y difusibles de la cepa UMCV2.....	22
Figura 6. Sistema utilizado para observar el efecto de los VOCs producidos por la cepa UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa <i>in vitro</i>	23
Figura 7. Efecto de los compuestos difusibles de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa	28
Figura 8. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa	29
Figura 9. Efecto del volátil bacteriano dimetilhexadecilamina sobre la germinación de semillas de fresa	31
Figura 10. Imágenes representativas del efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa	35
Figura 11. Efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	36
Figura 12. Formación de raíces ectópicas en plantas de fresa expuestas de manera continua a la DMHDA	37
Figura 13. Efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre la morfogénesis de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	38
Figura 14. Generación de plantas hijas y modificación de la corona en plantas de fresa expuestas de manera continua a la DMHDA	39
Figura 15. Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones <i>in vitro</i>	41
Figura 16. Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa.....	42
Figura 17. Incremento del rendimiento de plantas de fresa inoculadas con el consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496	44

Figura 18. Efecto de la inoculación del consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496 sobre la calidad de frutos de fresa	46
Figura 19. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de cultivos puros de las cepas UMCV2 y M496	48
Figura 20. Corte transversal de un foliolo de hoja de fresa	48
Figura 21. Colonización y persistencia del consorcio <i>A. agilis</i> UMCV2- <i>Bacillus</i> sp. M496 en plantas de fresa	49
Figura 22. Continuación de la figura 21	50
Figura 23. Incremento en la resistencia de plantas de fresa a la infección por <i>B. cinerea</i> generada por la exposición continua a la DMHDA	52
Figura 24. Porcentaje de supervivencia de plantas de fresa tratadas con DMHDA infectadas con <i>B. cinerea</i>	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la fresa.....	5
Tabla 2. Importancia económica de la fresa en México.....	8
Tabla 3. Efecto de los VOCs producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre plantas de fresa.....	32
Tabla 4. Efecto de la inoculación de <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre plantas de fresa.....	34

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 y su compuesto volátil dimetilhexadecilamina (DMHDA) sobre el proceso de producción de fresa, en sus diferentes etapas. Los resultados mostraron que *A. agilis* UMCV2 fue capaz de incrementar el porcentaje de germinación de semillas de fresa vía compuestos orgánicos volátiles (VOCs), así como promover el crecimiento de plantas de fresa mediante su inoculación directa en la raíz. Por otro lado, el VOC bacteriano DMHDA logró incrementar el porcentaje de germinación de semillas, promover el crecimiento e incrementar la resistencia al hongo fitopatógeno *B. cinerea* de plantas de fresa en condiciones *in vitro*. En el caso de la producción de las plantas, el consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 incrementó de manera significativa (40%) el rendimiento de la producción de fruto en plantas de fresa en condiciones de invernadero, sin afectar la calidad de los frutos producidos. Además, mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se demostró que las bacterias *A. agilis* UMCV2 y *Bacillus* sp. M496 colonizan y persisten en los tejidos internos de plantas de fresa en condiciones de invernadero. En conclusión, la bacteria *A. agilis* UMCV2 y su compuesto volátil DMHDA mejoraron diferentes estadios del proceso de producción de fresa.

Palabras clave: *A. agilis* UMCV2, DMHDA, fresa, rendimiento.

ABSTRACT

In the present work the capacity of the rhizobacteria *A. agilis* UMCV2 and its volatile dimethylhexadecylamine compound (DMHDA) was evaluated on strawberry production process, in its different stages. The results showed that *A. agilis* UMCV2 was able to increase the percentage of germination of strawberry seeds via volatile organic compounds (VOCs), as well as to promote the growth of strawberry plants by direct inoculation in the root. On the other hand, the bacterial VOC DMHDA was able to increase the percentage of seed germination, promote growth and increase resistance to phytopathogenic fungus *B. cinerea* of strawberry plants under *in vitro* conditions. In the case of plant production, the consortium *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 significantly increased (40%) fruit yield in strawberry plants under greenhouse conditions, without affecting the quality of the fruit produced. In addition, using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique, it was demonstrated that *A. agilis* UMCV2 and *Bacillus* sp. M496 bacteria colonize and persist in the internal tissues of strawberry plants under greenhouse conditions. In conclusion, the bacterium *A. agilis* UMCV2 and its volatile compound DMHDA improved different stages of the strawberry production process.

Keywords: *A. agilis* UMCV2, DMHDA, strawberry, yield.

1 INTRODUCCIÓN

En el suelo se forman relaciones complejas entre las diferentes poblaciones bacterianas, otros microorganismos y las raíces de las plantas, originando gran diversidad de ecosistemas. Las poblaciones de las comunidades bacterianas se relacionan de varios modos y tales interacciones pueden ser benéficas, perjudiciales o neutras para el desarrollo vegetal (Cambel y Graves, 1990).

La distribución de los organismos en el suelo no es homogénea, la rizósfera es la parte del suelo que está directamente influenciada por las raíces y se extiende alrededor de 1 a 3 mm de la superficie de la raíz hacia el suelo (Mengel y Kirkby, 2001). Las funciones de los microorganismos como pueden ser hongos y bacterias en dicha rizósfera son altamente influenciadas por la raíz de la planta y tienen un alto impacto sobre el crecimiento vegetal. Las especies vegetales que crecen en ambientes con escasos nutrientes, emplean sus exudados radiculares para asociarse con microorganismos que les resultan benéficos (Berendsen *et al.*, 2012). A los organismos que benefician a la planta promoviendo su crecimiento se les denomina, bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Estas pueden promover el crecimiento vegetal por varias vías: 1) Poniendo nutrientes a su disposición, que de otro modo serían inaccesibles, 2) debido al contacto íntimo planta-bacteria, excretando fitohormonas en el interior de las plantas o en su superficie, 3) las bacterias también pueden proteger a las plantas contra algunos patógenos y así promover su crecimiento de forma indirecta (Raya-González *et al.*, 2016a). Existe otro nicho donde se llevan a cabo interacciones planta-bacteria además de la rizósfera, denominado el nicho endofítico. Los microorganismos endófitos comprenden a los hongos y bacterias que viven sin causar daño en el interior de las células o tejidos de plantas superiores (Gaiero *et al.*,

2013). Las bacterias endófitas son encontradas en raíces, hojas, semillas, frutas óvulos y por supuesto dentro de los nódulos de leguminosas (Hallmann *et al.*, 1997; Sturtz *et al.*, 1997; Benhizia *et al.*, 2004). Estudios nos indican que las bacterias endófitas interactúan con patógenos, promueven el crecimiento en las plantas, aumentan la resistencia a enfermedades, contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno, brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios y son importantes para la biorremediación. Algunos ejemplos de géneros con estas características son *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella* y *Arthrobacter* (Pérez *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2010).

En nuestro grupo de trabajo se han descrito a *Arthrobacter agilis* UMCV2 y *Bacillus sp.* M496, como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). Ambas promueven el crecimiento de plantas modelo en sistemas *in vitro* (Velazquez-Becerra *et al.*, 2011; Pérez-Flores, 2013;) donde se controla cuidadosamente la interacción entre planta y bacteria. En el presente trabajo se caracteriza el efecto de ambas bacterias en una planta de interés agrícola (fresa) primero en diversos sistemas *in vitro* y después en condiciones reales de producción a nivel invernadero.

2 ANTECEDENTES

2.1 La fresa

2.1.1 Características generales

Las plantas del género *Fragaria* (tabla 1), son herbáceas de comportamiento perenne, que producen raíces, hojas, estolones, flores y un tallo muy reducido llamado corona. Las plantas de fresa pueden tener entre 25 y 100 raíces primarias, con cientos de raíces laterales pequeñas alrededor de las raíces primarias (Frairé-Cordero *et al.*, 2003).

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

Dominio	Eukarya
Reino	Plantae
Phylum	Spermatophyta
Subphylum	Angiospermae
Clase	Dicotyledonae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Fragaria</i>
Especie	<i>F. ananassa</i>

Las raíces secundarias tienen una vida corta, mientras que las primarias pueden ser funcionales por un año. Nuevas raíces primarias nacen arriba de las raíces viejas sobre la corona.

Las hojas de fresa son trifoliadas, consisten de tres folíolos que se unen al peciolo principal de la hoja. Las hojas individuales pueden vivir de 1 a 3 meses y varían en tamaño, forma y densidad estomatal y características fisiológicas (Frairé-Cordero *et al.*, 2003).

Los estolones son rastreros, se originan de las yemas axilares sobre la corona. Una planta vigorosa puede producir de 10 a 15 estolones y cada estolón produce su propia raíz, la cual le ayuda a establecerse al lado de la planta madre. Las plantas producidas por los estolones son genéticamente iguales a la planta madre.

Las inflorescencias se producen siempre en la parte terminal o apical de las coronas. Las inflorescencias generalmente cuentan con una flor primaria, dos secundarias, cuatro terciarias y ocho cuaternarias.

Las flores de la fresa son hermafroditas. Contienen un receptáculo compuesto de cientos de ovarios. El receptáculo está rodeado por un anillo de estambres, seguido por un anillo de cinco pétalos blancos, después cinco sépalos. Las plantas de fresa son auto-fértiles y la polinización ocurre a través del viento, gravedad o insectos. La maduración del fruto toma cerca de 30 días después de la polinización. El receptáculo es la parte comestible de la fresa, mientras las semillas (aquenios) son los frutos verdaderos sobre la superficie (Frairé-Cordero *et al.*, 2003).

2.1.2 Importancia económica

En 2013 se obtuvo una producción mundial de 7, 739, 622 toneladas de fresa. El mayor productor de esta frutilla en el ámbito mundial es China, con una producción de 2, 997, 504 ton que corresponde al 38.72%. En segundo lugar está los Estados Unidos de América, con una producción de 1, 360, 869 ton que corresponde al 17.58%. En tercer lugar está México con 379,464 ton que representa el 4.90% de la producción mundial anual (Fig. 1; FAO, 2014).

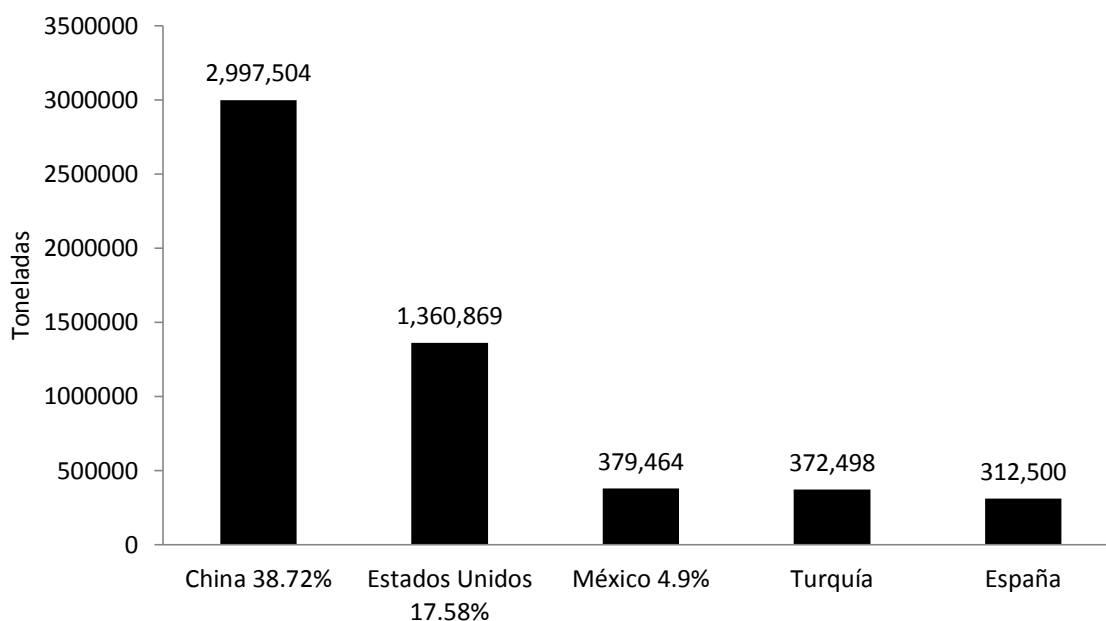


Figura 1. Importancia económica de la fresa a nivel mundial (FAO, 2014). Datos de totales de producción de fruto fresco, correspondientes al periodo 2013-2014. La información es proporcionada por organizaciones de gobierno nacionales de agricultura a la FAO.

En México tres estados lideran la lista de producción de fresa (Michoacán, Guanajuato y Baja California), donde Michoacán ocupa el primer lugar con 259, 190 ton, le sigue Baja California con 145, 768.62 ton y finalmente Guanajuato con 28, 568.20 ton. (Tabla 2). Sin embargo, a pesar de que Michoacán tiene una mayor producción, el rendimiento del cultivo no es el más alto. Baja California lidera la lista con un rendimiento en la producción de 64.12 ton/ha, le sigue Michoacán con 43.96 ton/ha y finalmente Guanajuato con 32.14 ton/ha (SIAP, 2014). Lo que deja de manifiesto que en nuestro estado el rendimiento es bajo y muestra la necesidad de aumentar dicho rendimiento.

Tabla 2. Importancia económica de la fresa en México (SIAP, 2014).				
Ubicación	Sup. sembrada	Producción	Rendimiento	Valor producción
	(Ha)	(Ton)	(Ton/ha)	(Miles de pesos)
Michoacán	5, 896.00	259, 190.00	43.96	2, 299, 440.27
Baja California	2, 273.30	145, 768.62	64.12	2, 714, 029.70
Guanajuato	888.80	28, 568.20	32.14	123, 585.61

2.1.3 Proceso de producción de fresa

El proceso de producción de fresa puede dividirse en varias etapas que van desde la generación de plantas a partir de la germinación de semillas hasta la plantación y cosecha en campo (Fig. 2). A continuación se describe de manera breve cada una de las etapas que conllevan al proceso de producción de fresa.

Generación de plantas a partir de semillas: la germinación *in vitro* de aquenios de plantas de fresa constituye una etapa para la producción de plántulas libres de patógenos para cualquier proceso biotecnológico así como de mejoramiento genético. Sin embargo la germinación de aquenios es muy baja (50% en más de 7 semanas) además que la emergencia de las plántulas puede llevar más de 7 semanas. Por lo tanto es importante reducir el tiempo e incrementar el porcentaje de germinación para obtener una producción masiva de plántulas de la misma edad (Miller *et al.*, 1992; Hamdouni *et al.*, 2001).

Selección de plántulas: una vez que se obtienen las plántulas, estas son seleccionadas de acuerdo a las características que se desean mejorar (resistencia a patógenos, tamaño de fruto etc.), para realizar cruza entre ellas, hasta obtener una variedad con las características deseadas (Trejo-Téllez y Gómez-Merino, 2014).

Propagación de la variedad nueva: Una vez generada la variedad deseada, se procede a la propagación masiva de las plantas por medio de micropropagación, ya que mediante esta técnica se generan clones de las plantas de donde fueron originadas, conservando las características propias de la variedad, estas están libres de patógenos y se producen un gran número de plantas. Una desventaja de esta técnica es que se generan plantas sin

microorganismos benéficos, esto puede traer consigo susceptibilidad a patógenos así como al estrés abiótico (Vestberg *et al.*, 2004).

Aclimatación *post vitro*: después de la propagación *in vitro*, las plantas son aclimatadas en invernaderos para cumplir con características que garanticen su supervivencia al momento del trasplante (coronas grandes y buen desarrollo de la raíz). Se recomienda evitar en lo posible plantar plantas con coronas delgadas y con poco desarrollo radicular (Pimentel-Equihua y Velázquez-Machuca, 2010).

Plantación en campo: una vez que las plantas han sido aclimatadas y presentan buena madurez (coronas grandes y buen desarrollo de la raíz), estas son trasplantadas al campo para la producción de frutos (Pimentel-Equihua y Velázquez-Machuca 2010).

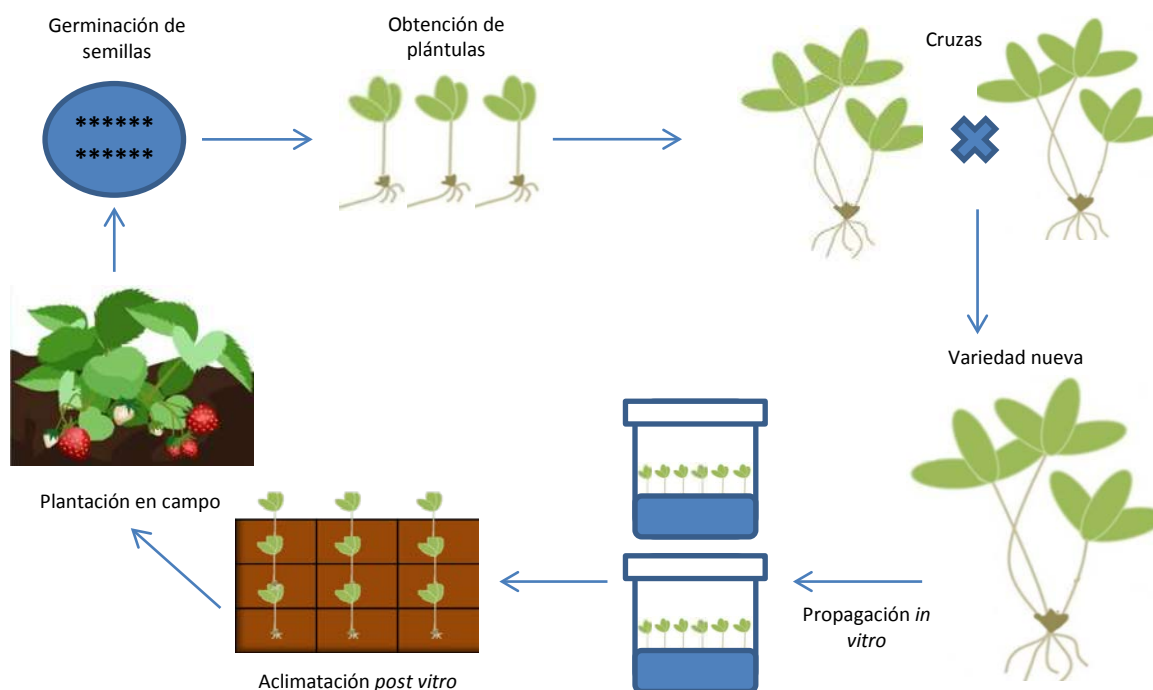


Figura 2. Representación esquemática del proceso de producción de fresa. Elaborado con información de Miller *et al.*, 1992; Hamdouni *et al.*, 2001; Vestberg *et al.*, 2004; Pimentel-Equihua y Velázquez-Machuca 2010; Trejo-Téllez y Gómez-Merino, 2014.

Una de las alternativas para mejorar el proceso de producción de fresa, en sus diferentes etapas, es mediante la modificación de los microorganismos que se asocian con la planta, es decir, mediante la modificación del microbioma de la planta (Chaparro *et al.*, 2012), sección que se discutirá con más detalle en el siguiente apartado.

3 El microbioma de las plantas

Se define como microbioma a el conjunto de microorganismos que habitan un ambiente específico, en este caso, al referirnos al microbioma de las plantas, serán los microorganismos que estén asociados a las plantas los que estén formando parte de este conjunto (Turner *et al.*, 2013).

Las relaciones entre planta-microbioma son variadas y dependen del tipo de microorganismo con el que se establezcan. De acuerdo a esto, existen microorganismos comensales, estos no afectan a la planta y a los patógenos de manera directa, pero pueden competir por el espacio de colonización. Otros habitantes de este ambiente son los microorganismos patógenos, los cuales causan daño a la planta a través de la infección y producción de compuestos fitotóxicos, además compiten con otros microorganismos por espacio y nutrientes. También existen microorganismos benéficos que promueven el crecimiento de la planta de manera directa (producción de reguladores del crecimiento vegetal) o inhibiendo microorganismos patógenos mediante la activación de la resistencia sistémica inducida de la planta (ISR) (Berendsen *et al.*, 2012). De igual manera, la planta influencia de manera selectiva al microbioma, a través de la producción de exudados radiculares, inhibiendo a microorganismos patógenos y estimulando microorganismos benéficos en la rizósfera (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015).

Dentro de los microorganismos benéficos que conforman el microbioma de las plantas, se encuentran las PGPRs, las cuales son bacterias que tienen la capacidad de promover de manera directa o indirecta el crecimiento de las plantas. Dentro de los mecanismos de promoción directa, se encuentran: fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes (fósforo, hierro) y la producción de reguladores del crecimiento vegetal (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno); y en el caso de los mecanismos de promoción indirecta se encuentra el biocontrol, ya sea por la producción de compuestos antimicrobianos (diacetilfloroglucinol, dimetilhexadecilamina) o por relaciones antagónicas (producción de enzimas líticas) (Turner *et al.*, 2013; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Raya-González *et al.*, 2016a).

La manipulación del microbioma de las plantas tiene el potencial de reducir la incidencia de enfermedades vegetales, incremento de la producción, reducir el uso de agroquímicos y la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero, resultando en prácticas más sustentables de agricultura (Chaparro *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2015).

3.1 Importancia de las PGPRs en la producción de fresa

En el 2008, Pirlak y Köse reportaron que la inoculación con bacterias que presentaron características de promoción del crecimiento (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y biocontrol) incrementaron el rendimiento de plantas de fresa en campo. Utilizaron las cepas de *Bacillus* M-3 (fija nitrógeno y solubiliza fosfato), *Bacillus* OSU-142 (fija nitrógeno) y *Pseudomonas* BA-8 (antagoniza hongos fitopatógenos), inoculándolas en la raíz y vía foliar, y una combinación de ambos tratamientos (aplicación en raíz e inoculación foliar, simultáneamente). Encontrando que el tratamiento de inoculación

simultanea (raíz-foliar) incrementó de manera significativa el rendimiento de las plantas (25.7%) con respecto de las plantas sin inocular.

Otro trabajo realizado por Pešaković *et al.* (2013), mostró la capacidad de PGPRs de aumentar el rendimiento de plantas de fresa en condiciones de invernadero. Usaron dos biofertilizantes designados como PGPR1 (*Klebsiella planticola*, fijadora de nitrógeno), PGPR2 (*Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandi*, *Derxia* sp., *Bacillus megatherium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo). Encontrando que, ambos biofertilizantes lograron incrementar significativamente el rendimiento de plantas de fresa (PGPR1= 0.52 kg/planta y PGPR2= 0.49 kg/planta) con respecto del control (sin inocular, 0.41 kg/planta).

3.1.1 *Arthrobacter agilis* UMCV2

Arthrobacter agilis UMCV2 es una actinobacteria aislada de la rizósfera de plantas de maíz (Valencia-Cantero *et al.*, 2007), posee características promotoras del crecimiento vegetal. La bacteria estimula el crecimiento de plantas de frijol en condiciones *in vitro* e incrementa el contenido de Fe respecto a las plantas sin inocular (Valencia-Cantero *et al.*, 2007).

Velázquez *et al.* (2011), encontraron que la inoculación de *A. agilis* UMCV2 promovió un aumento en la longitud del tallo, de la raíz y de la biomasa de las plantas de alfalfa con respecto a las plantas que no fueron inoculadas, vía la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, de siglas en inglés) producidos por esta bacteria. El análisis de los VOCs producidos por *A. agilis* identificó a la dimetilhexadecilamina, un aminolípido relacionado estructuralmente a las señales bacterianas de “*Quorum-Sensing*” (moléculas producidas por bacterias las cuales regulan la densidad poblacional, la formación de biofilm, la patogénesis

etc.), que modulan el crecimiento de *A. agilis* UMCV2 y el desarrollo de las plantas de manera dosis dependiente.

Orozco-Mosqueda *et al.* (2013), observaron que la exposición de plantas de *Medicago truncatula* a los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 o al compuesto dimetilhexadecilamina incrementaron la acidificación de la rizósfera, la actividad férrico reductasa de la planta, indujeron una mayor producción de biomasa y elevaron el contenido de Fe y clorofila.

Otras investigaciones demostraron que la bacteria *A. agilis* UMCV2 produce VOCs que inhiben *in vitro* el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, observando que la dimetilhexadecilamina producida por esta bacteria puede inhibir el crecimiento de los organismos fitopatógenos *B. cinerea* y *Phytophthora cinnamomi* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013).

También se ha reportado que *A. agilis* UMCV2 fue capaz de reducir la infección por el hongo fitopatógeno *B. cinerea* en plantas de fresa, vía VOCs, tanto exponiendo las plantas a la dimetilhexadecilamina como inoculando la bacteria directamente en la raíz de la planta (Hernández-Soberano, 2013).

Algunas bacterias PGPRs son capaces de penetrar los tejidos de plantas y vivir como endófitas, siendo este otro mecanismo por el cual promueven el crecimiento de las plantas que colonizan. Se observó a *A. agilis* UMCV2 como endófito de leguminosas, fue capaz de colonizar los tejidos internos de raíces, tallos y hojas de las plantas, además de persistir en ellos (Aviles-Garcia *et al.*, 2016).

La posible vía de señalización por la cual actúa la dimetilhexadecilamina fue mostrada en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana jar1* (resistentes al ácido jasmónico) y Col-0 (silvestres), sometiéndolas a diferentes concentraciones de dimetilhexadecilamina en orden micromolar. Se observó que las plantas de *A. thaliana jar1* en presencia de la dimetilhexadecilamina mostraron resistencia al incremento de la longitud de la raíz primaria. No así en las plantas control Col-0, donde 1.5 μ M de la amina incrementó la longitud de la raíz un 20%. Sin embargo, al aumentar la concentración de la amina las plantas Col-0 disminuyeron notablemente la longitud de la raíz primaria, mientras que las mutantes *jar1* presentan cierta resistencia a la dimetilhexadecilamina (Raya-González *et al.*, 2016b).

Estos antecedentes sugieren que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen gran potencial para su uso como biofertilizantes en el cultivo de fresa, mejorando el rendimiento del cultivo tanto en invernadero como en campo. Por lo tanto, es de importancia explorar el potencial que tienen otras bacterias con estas características (PGPRs) y sus metabolitos sobre el crecimiento y rendimiento del cultivo en sus diferentes etapas de producción.

4 JUSTIFICACIÓN

La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y su compuesto volátil dimetilhexadecilamina han mostrado capacidad de promoción de crecimiento vegetal en plantas modelo, sin embargo en ningún caso se ha demostrado un efecto a nivel de producción en plantas de interés agrícola. La fresa es uno de los cultivos de alto valor agregado de mayor importancia en el estado de Michoacán, sin embargo su rendimiento es subóptimo, por lo que se presenta como un modelo adecuado para estudiar la capacidad de *Arthrobacter agilis* UMCV2 y su compuesto volátil dimetilhexadecilamina a lo largo de un esquema de producción completo.

5 HIPÓTESIS

Arthrobacter agilis UMCV2 y su compuesto volátil DMHDA mejoran el proceso de producción de fresa en sus diferentes etapas.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Analizar el efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 y su compuesto volátil DMHDA en el proceso de producción de fresa.

6.1.1 Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 y su compuesto volátil DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa *in vitro*.
- Determinar las propiedades de estimulación de la producción de *A. agilis* UMCV2 en consorcio con otra bacteria bioestimulante en plantas de fresa en condiciones de invernadero.
- Analizar la capacidad de colonización y persistencia de *A. agilis* UMCV2 en plantas de fresa *in vitro* e invernadero.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Plantas de fresa

Se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) obtenidas por medio de micropropagación (fig. 3, panel a), mantenidas en frascos de vidrio cerrados herméticamente, en medio MS (1x, 3% de sacarosa, 0.6% de fitoagar, pH: 5.7), en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz-8 h oscuridad, esto para el caso de condiciones *in vitro*. Para el caso de invernadero, se usaron plantas de fresa adquiridas de manera comercial (Black Venture Farm), colocadas en macetas de 1L de capacidad con sustrato (Pro-mix[®], previamente esterilizado), regadas con solución Hoagland 0.2 × tres veces por semana, las cuales se colocaron en un invernadero (Fig. 3, panel b).

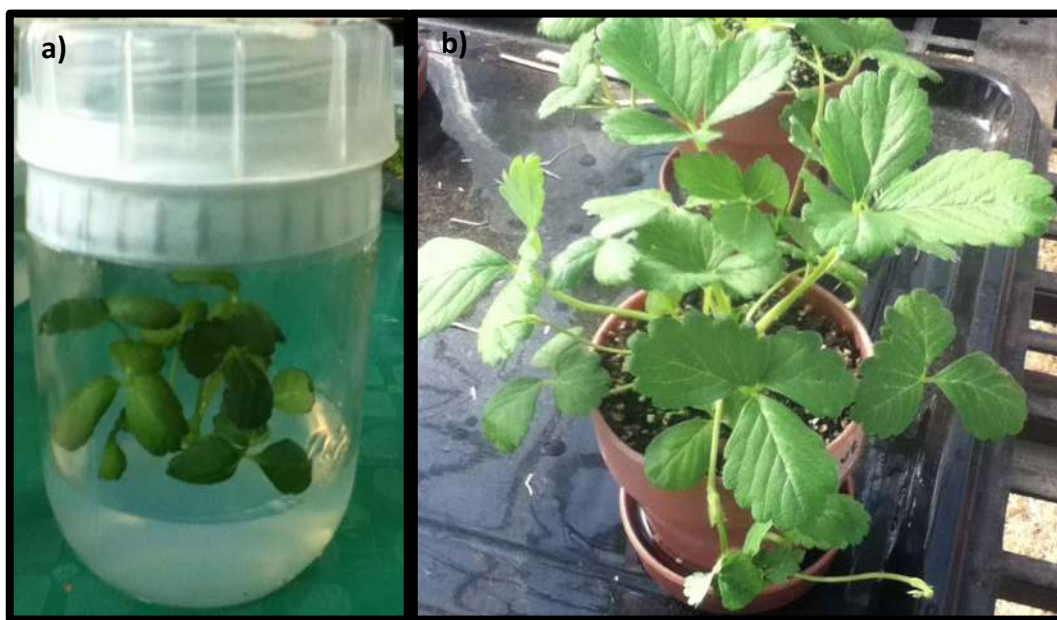


Figura 3. Plantas de fresa. a) Plantas de fresa *in vitro*, mantenidas en frascos herméticamente sellados, en medio de cultivo MS (1x, 3% sacarosa, 0.6% fitoagar, pH 5.7); b) Plantas de fresa en condiciones de invernadero, plantadas en macetas de plástico (1 L de capacidad), en sustrato perlita-peatmoss (Pro-mix[®]).

7.2 Bacterias

Se utilizaron las rizobacterias *Arthrobacter agilis* UMCV2 (Fig. 4, panel a), Valencia-Cantero *et al.*, 2007) y *Bacillus* sp. M496 (Fig. 4, panel b), Pérez-Flores, 2013), las cuales se mantuvieron en agar nutritivo (AN), resemebradas por estriado e incubadas a 25°C en la oscuridad.

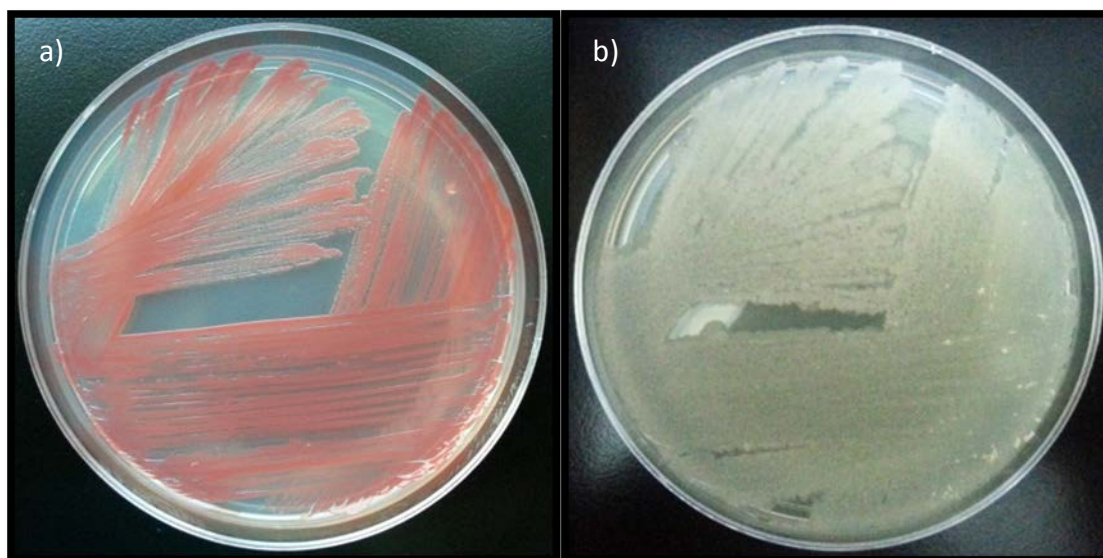


Figura 4. Cultivos bacterianos. a) *A. agilis* UMCV2, cultivo de 72 h, nótese la coloración salmón de las colonias; b) *Bacillus* sp. M496, cultivo de 24 h, nótese la coloración beige de las colonias. Ambas bacterias fueron crecidas en placas agar nutritivo a 25°C.

7.3 Dimetilhexadecilamina

Se usó el compuesto dimetilhexadecilamina adquirido de manera comercial (Sigma Aldrich®), usando como solvente etanol absoluto para obtener las diferentes concentraciones a evaluar.

7.4 Efecto de los compuestos orgánicos difusibles y volátiles producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa

Para el caso de la evaluación de los compuestos orgánicos difusibles se inocularon 100 μ L de una solución 0.5 Abs₅₉₅ de *A. agilis* UMCV2 (100 μ L agua desionizada estéril para la condición control) en el centro de la caja petri (medio MS 0.2 $\times$, 0.6% sacarosa, 1% de fitoagar, 10% AN, pH 7) y las semillas (las cuales fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 70% durante 5 min e hipoclorito de sodio durante 7 min, enjuagando las semillas entre ambas soluciones y al final 4 veces con agua desionizada estéril, se llevaron a vernalización 15 días a 4°C) fueron sembradas alrededor de la zona de inoculación (Fig. 5, panel a).

Para el caso de los compuestos orgánicos volátiles se colocó un recipiente plástico conteniendo agar nutritivo en el centro de la caja petri (medio MS 0.2 $\times$, 0.6% sacarosa, 1% de fitoagar, pH 7) donde se inoculó 100 μ L 0.5 Abs₅₉₅ de *A. agilis* UMCV2 (100 μ L de agua desionizada estéril para el control) esto con el fin de evitar la difusión de los compuestos orgánicos y que solo los compuestos orgánicos volátiles fueran los responsables del efecto esperado (Fig. 5, panel b). Las semillas (previamente esterilizadas) se sembraron alrededor del recipiente. Para ambas condiciones las semillas se colocaron en cámara de crecimiento y se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas 15 días posteriores a la siembra.

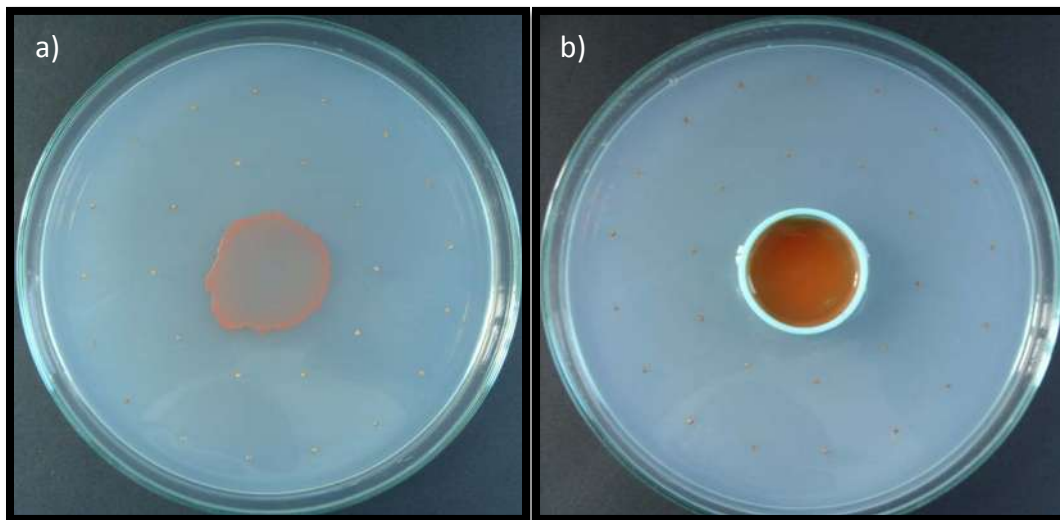


Figura 5. Sistema utilizado para observar el efecto sobre la germinación de semillas de fresa de los compuestos volátiles y difusibles de la cepa UMCV2. a) Sistema de compuestos difusibles, fueron inoculados en el centro de la placa 100 μ L de una suspensión bacteriana de 100 μ L 0.5 abs₅₉₅ y alrededor se sembraron semillas de fresa; b) sistema de compuestos volátiles, en el centro de la placa fue colocado un recipiente conteniendo agar nutritivo en el cual se inoculó la bacteria (100 μ L 0.5 abs₅₉₅) con el fin de evitar la difusión de los compuestos producidos por la bacteria al medio de germinación, permitiendo así observar sólo el efecto de los compuestos volátiles bacterianos, alrededor del recipiente se sembraron semillas de fresa.

7.5 Efecto de la dimetilhexadecilamina sobre la germinación de semillas de fresa

Para evaluar el efecto de la dimetilhexadecilamina sobre la germinación de semillas de fresa, esta se adicionó al medio de cultivo (MS 0.2 $\times$, 0.6% sacarosa, 1% fitoagar, pH 7) para obtener una concentración final de 2, 4, 6, 8, 16, 32 y 64 μ M, el cual fue vaciado a cajas Petri para la posterior siembra de las semillas de fresa (previamente esterilizadas), se colocaron en cámara de crecimiento y se evaluó el porcentaje de germinación 15 días posteriores a la siembra.

7.6 Efecto de los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

Para la evaluación del efecto de los VOCs producidos por *A. agilis* sobre el crecimiento de plantas de fresa se utilizaron frascos de vidrio de 170 mL de capacidad con 30 mL de medio MS (1x, 3% sacarosa, 0.6% fitoagar, pH 5.7) dentro de este se colocó un vial de 4 mL el cual conteniendo 2 mL de AN. Después se colocaron las plantas. Dentro del vial se inoculó a *A. agilis* UMCV2 (100 μ L 0.5 Abs₅₉₅) y se agregaron 100 μ L de H₂O desionizada estéril para la condición control, con el fin de que solo los compuestos volátiles tuvieran efecto sobre la planta (Fig. 6). Se colocaron en cámara de crecimiento (condiciones estándar) y se evaluó el efecto (clorofila, peso de los brotes y raíz, altura de las plantas y longitud de la raíz) aprox. 30 días posteriores a la inoculación.



Figura 6. Sistema utilizado para observar el efecto de los VOCs producidos por la cepa UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa *in vitro*. Las plantas fueron plantadas en medio MS (1x, 3% sacarosa, 0.6% fitoagar, pH 5.7), dentro del frasco fue colocado un vial conteniendo agar nutritivo donde se inoculó a la bacteria (100 μ L 0.5 abs₅₉₅), con el fin de evitar el contacto físico entre la bacteria y la planta, y sólo observar el efecto de los compuestos volátiles bacterianos sobre las plantas.

7.7 Efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

Para determinar el efecto promotor del crecimiento de *A. agilis* UMCV2, se utilizaron plantas de fresa a las cuales se les inoculó 100 μ L 0.5 Abs₅₉₅ de la cepa UMCV2 y 100 μ L de agua desionizada estéril como control directamente en la raíz. Se colocaron en cámara de crecimiento (condiciones estándar) y se evaluó el efecto (clorofila, peso de los brotes y raíz, altura de las plantas y longitud de la raíz) aprox. 30 días posteriores a la inoculación.

7.8 Efecto de la exposición continua a la dimetilhexadecilamina sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

Para este ensayo se usaron plantas de fresa las cuales se mantuvieron en frascos con medio MS (1x, 3% sacarosa, 0.6% fitoagar, pH 5.7) suplementado con dimetilhexadecilamina 16, 32, 64, 128 μ M y etanol para la condición control, durante 2.5 meses. Después de 2.5 meses se evaluaron los parámetros relacionados al crecimiento (clorofila, peso de los brotes y raíz, altura de las plantas y longitud de la raíz).

7.9 Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la DMHDA en el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

Para este ensayo, se germinaron semillas de fresa (previamente esterilizadas) en cajas Petri con medio de cultivo MS (0.2 ×, 0.6% sacarosa, 1% fitoagar, pH 7) adicionado con diferentes concentraciones de dimetilhexadecilamina (16, 32 y 64 μM) durante aprox. 15 días, una vez obtenidas las plántulas fueron trasplantadas a frascos de vidrio (170 mL de capacidad con 30 mL de medio MS 1x, 3% sacarosa, 0.6% fitoagar, pH 5.7) y puestas en cámara de crecimiento, donde se mantuvieron 2.5 meses aprox. para el análisis de los parámetros relacionados al crecimiento (clorofila, peso de brotes y raíz, altura de las plantas y longitud de la raíz).

7.10 Efecto de la inoculación del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 sobre el rendimiento de la producción y la calidad del fruto en plantas de fresa en condiciones de invernadero

Para determinar el efecto del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 sobre la producción y calidad del fruto en plantas de fresa en condiciones de invernadero, las raíces de las plantas de fresa fueron sumergidas en una suspensión de cada bacteria 1 Abs₅₉₅/mL o en agua desionizada estéril como control, durante una noche, posteriormente fueron trasplantadas en sustrato previamente esterilizado (Pro-mix[®],) y se colocaron en condiciones de invernadero hasta la obtención de frutos. A los 30 días después del trasplante, las plantas fueron reinoculadas con 1 mL de una suspensión de 1 Abs₅₉₅/mL de cada bacteria. Las plantas fueron regadas con solución Hoagland 0.2 ×, tres veces por semana. Para evaluar dicho efecto se determinó la producción total de frutos (peso de fruto/planta). Paralelamente se analizó la capacidad endofítica de ambas bacterias mediante la técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente).

Para el caso de la determinación del efecto sobre la calidad del fruto de plantas de fresa inoculadas con dichas bacterias, se siguió lo establecido por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2016) para la categoría de máxima calidad “US No.1”, para lo cual se evaluaron los siguientes parámetros:

Tamaño del fruto: el diámetro ecuatorial y diámetro polar del fruto, se midió con un vernier digital.

Acidez titulable: para las mediciones de acidez titulable se colocaron 1 mL de jugo de fresas molidas aforado a 50 mL de agua desionizada y se le adicionaron 2 gotas de fenolftaleína como indicador. Posteriormente se tituló con NaOH 0.1N hasta obtener el primer vire de color a rosa en la muestra. Se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en % de ácido cítrico utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ácido cítrico} = \frac{(V_{\text{NaOH gastado}})(N_{\text{NaOH}})(\text{meq}_{\text{ac. cítrico}})(100)}{V_{\text{muestra}}}$$

El miliequivalente del ácido cítrico es 0.064.

pH del fruto: se midió directamente en el jugo de fresas molidas con un potenciómetro.

Sólidos solubles: se determinaron de manera directa con un refractómetro de mano para medidas de sacarosa y porcentaje de sólidos disueltos de 0 a 32%, aplicándole una gota de jugo de fresas molidas a temperatura ambiente.

7.11 Determinación de la colonización y persistencia del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 en plantas de fresa en condiciones de invernadero

Una parte de las plantas de los experimentos anteriores se utilizó para determinar la colonización y persistencia del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496. Se colectaron hojas al azar de los diferentes experimentos y se procedió con la técnica de FISH reportada por Lo Piccolo *et al.* (2010). Las sondas que se utilizaron son las siguientes: Actinobacterias 5' Verde de rodaminaTM-X (NHS Ester) TAT AGT TAC CAC CGC CGT (Roller *et al.*, 1994), la cual hibrida con el ARN ribosomal 23S de *A. agilis* y cuya fluorescencia es verde (longitud de onda de excitación y emisión: 502 y 527 nm, respectivamente); Firmicutes 5' rojo de rodaminaTM-X (NHS Ester) CGG AAG ATT CCC TAC TGC (Meier *et al.*, 1999), la cual hibrida con el ARN ribosomal 16S de *Bacillus* sp. M496, cuya fluorescencia es roja (longitud de onda de excitación y emisión: 570 y 590 nm, respectivamente). Ambas sondas fueron sintetizadas por IDT[®]. Las preparaciones de las hojas fueron observadas bajo un microscopio confocal (FV1200, Olympus Corporation, Tokio, Japón).

7.12 Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron de forma independiente tres veces y tuvieron 10 réplicas por tratamiento cada vez. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico STATISTICA 10 mediante una prueba de ANOVA y una separación de medias por prueba de Duncan para comparaciones múltiples ($p < 0.05$). Para el caso del análisis de porcentajes se usó una prueba de χ^2 seguido de un análisis de proporciones ($p < 0.05$).

8 RESULTADOS

8.1 Efecto de los compuestos difusibles de *A. agilis* UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa

Se conoce que diversas PGPRs tienen la capacidad de incrementar la germinación de semillas mediante la producción de fitohormonas difusibles en el medio (Baca y Elmerich, 2003), con la intención de conocer si *A. agilis* UMCV2 tiene esta capacidad semillas de fresa fueron crecidas en cajas Petri inoculadas con la bacteria. De acuerdo con la gráfica de los resultados (Fig. 7), se observa que el tratamiento con la cepa UMCV2 no presenta diferencia significativa con respecto al control (24.6 y 17.2%, respectivamente), sin embargo se observa una tendencia al incremento de un 7.4 %.

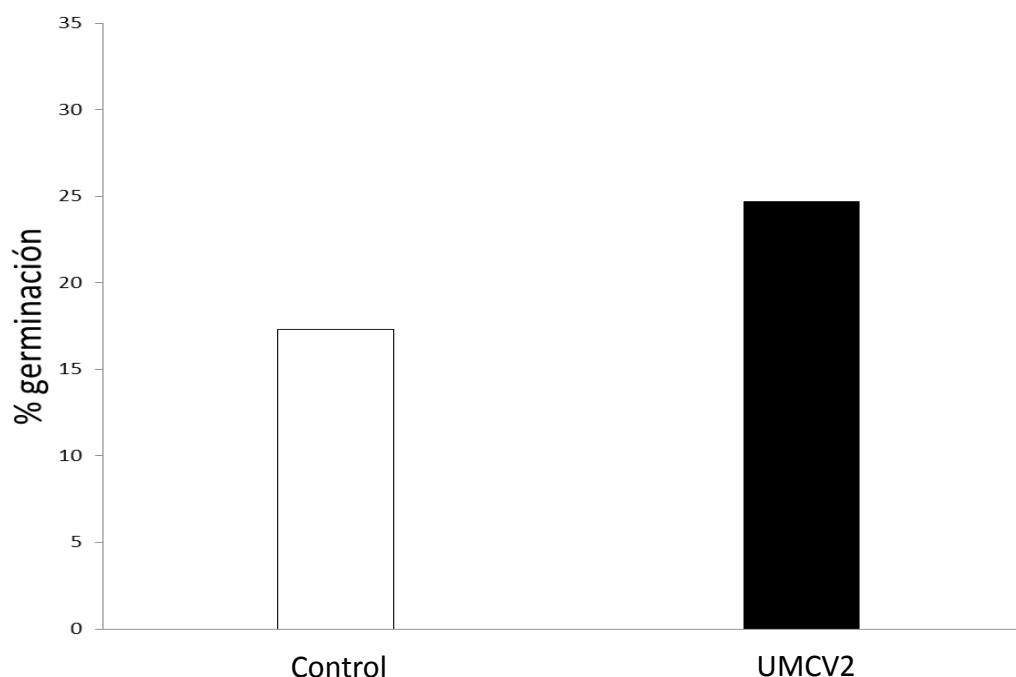


Figura 7. Efecto de los compuestos difusibles de *A. agilis* UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa. Se adicionaron 100 μ L de inóculo bacteriano de 0.5 Abs₅₉₅ en el centro de la placa, las semillas fueron sembradas alrededor de la zona de inoculación. Los % de germinación se calcularon 15 días posteriores a la siembra de las semillas. n= 81, * indican diferencia significativa respecto del control, según una prueba de X^2 seguida de un análisis de proporciones ($p \leq 0.05$).

8.2 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa

Una vez que se observó el efecto de los compuestos difusibles sobre la germinación de semillas de fresa, se procedió a evaluar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles de la cepa UMCV2.

Se encontró que bajo este sistema (Fig. 8), el tratamiento con los volátiles de la bacteria UMCV2 duplicó el porcentaje de germinación con respecto del tratamiento control (37 y 18.5%, respectivamente) lo que constituyó una diferencia estadísticamente significativa según un análisis de proporciones de X^2 por lo que se concluyó que los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 estimulan la germinación de semillas de fresa.

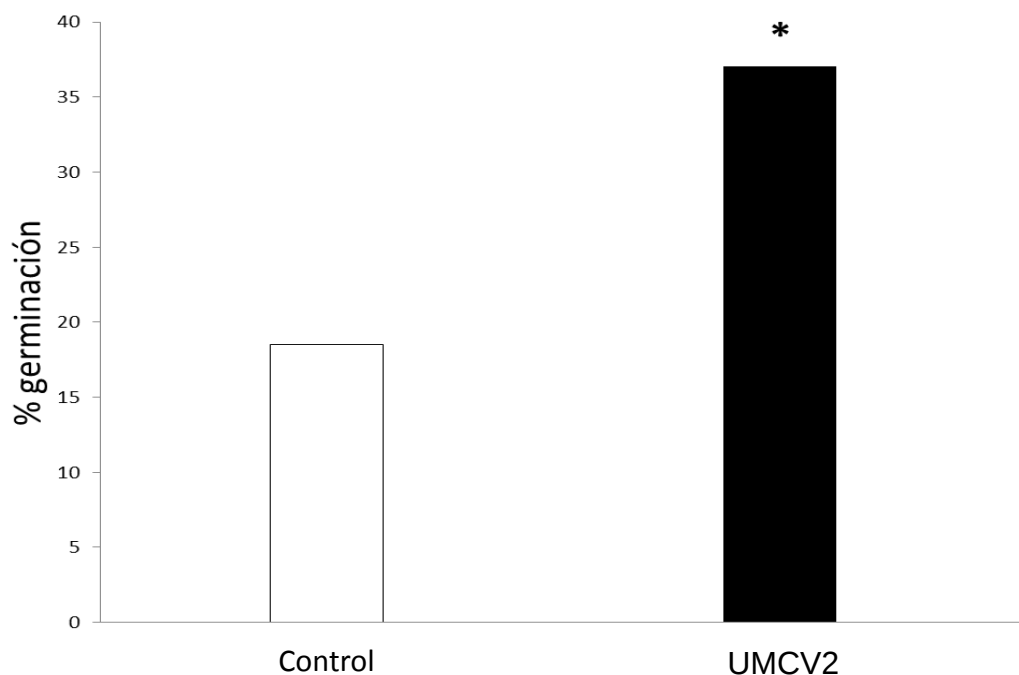


Figura 8. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de *A. agilis* UMCV2 sobre la germinación de semillas de fresa. Se utilizó un sistema de compartimentos separados, evitando el contacto físico entre la bacteria y las semillas, para atribuir el efecto sobre la germinación sólo a los compuestos orgánicos volátiles. Los % de germinación se calcularon 15 días posteriores a la siembra de las semillas. n= 54, * indican diferencia significativa respecto del control, según una prueba de X^2 seguida de un análisis de proporciones ($p \leq 0.05$).

8.3 Efecto de la dimetilhexadecilamina sobre la germinación de semillas de fresa

Como ya se había reportado en trabajos anteriores, la bacteria UMCV2 produce el compuesto orgánico volátil dimetilhexadecilamina, al cual se le atribuyen las propiedades de promoción de crecimiento de dicha bacteria. Por tal motivo se decidió probar su efecto a diferentes concentraciones en la germinación de semillas de fresa. El resultado obtenido fue que a partir de 4 μM la dimetilhexadecilamina es capaz de incrementar el porcentaje de germinación de semillas de fresa de manera estadísticamente significativa con respecto de la condición control. En las concentraciones de 4, 8, 16, 64 μM de DMHDA se obtuvieron porcentajes de germinación de 28.5, 32.9, 37.5, y 40%, respectivamente, y 12.9% para la condición control, en el caso de la concentración de 2 se presentó un 16.6 % de germinación de las semillas, pero dicho incremento no fue diferente estadísticamente con respecto de la condición control (Fig. 9).

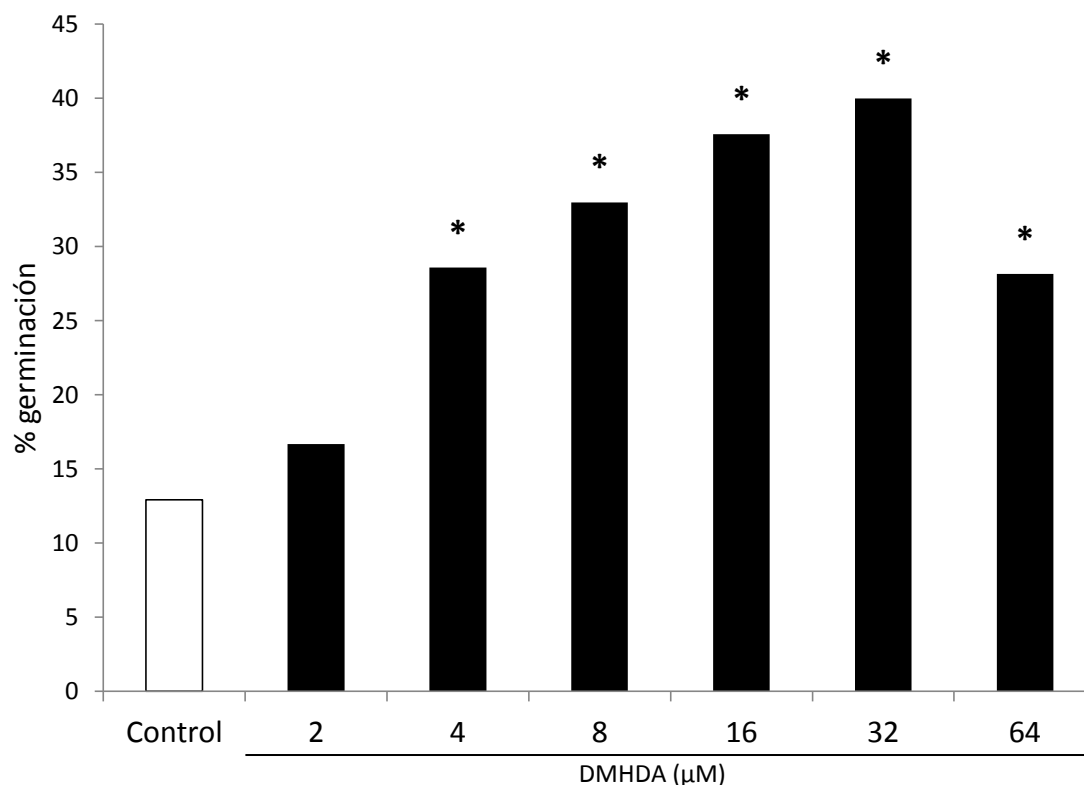


Figura 9. Efecto del volátil bacteriano dimetilhexadecilamina sobre la germinación de semillas de fresa. La dimetilhexadecilamina fue adicionada al medio de cultivo en diferentes concentraciones, usando como solvente etanol absoluto. Los % de germinación se calcularon 15 días posteriores a la siembra de las semillas. n= 70, * indican diferencia significativa respecto del control, según una prueba de X^2 seguida de un análisis de proporciones ($p \leq 0.05$).

8.4 Efecto de los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

Las plantas sometidas a los volátiles de *A. agilis* UMCV2 presentaron un incremento del crecimiento, aunque no en todos los parámetros medidos. Como se muestra en la tabla (Tabla 3), se observó que la inoculación de las plantas con la cepa UMCV2 incrementó significativamente el peso de los brotes con respecto de las plantas no inoculadas (0.076 y 0.057 g, respectivamente); para el caso de la longitud de los brotes y el peso de la raíz no hubo diferencia significativa en ambos tratamientos, sin embargo se observó una tendencia

al incremento en las plantas que fueron inoculadas con la bacteria; la longitud de la raíz no presentó diferencia significativa en ambos tratamientos y para la concentración de clorofila se observó un incremento significativo en las plantas de la condición control.

Tabla 3. Efecto de los VOCs producidos por <i>A. agilis</i> UMCV2 sobre plantas de fresa.		
Parámetro	Tratamiento	
	CONTROL	UMCV2
Clorofila (U.A.)	17.83 *	12.41
Longitud raíz (mm)	20.65	19.34
Longitud brotes (mm)	15.24	16.68
Peso raíz (g)	0.021	0.019
Peso brotes (g)	0.057	0.076 *
Se inocularon 100 µL de una solución de 1 Abs ₅₉₅ de la cepa UMCV2 en un compartimiento independiente y 100 µL de agua desionizada estéril como control. Los parámetros de crecimiento fueron medidos 30 días después de la exposición a los VOCs bacterianos. n= 14, * indican diferencia significativa según una prueba de t student ($p \leq 0.05$).		

8.5 Efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

La inoculación de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 obtuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, aunque no sobre todos los parámetros cuantificados. La cepa UMCV2 no tuvo un efecto estadísticamente significativo con respecto de la condición control sobre el contenido de clorofila en las plantas, sin embargo se observa una tendencia al incremento en las plantas inoculadas con dicha bacteria. En el peso de los brotes de las plantas, se registró una ligera disminución, sin diferencia estadística significativa con respecto de la condición control. Para el caso del peso de la raíz, en las plantas inoculadas con la rizobacteria UMCV2 se observó un incremento estadísticamente significativo, con respecto de la condición control. Las plantas inoculadas con la cepa UMCV2 presentaron un incremento en la altura de manera significativa con respecto de aquellas que no fueron inoculadas con dicha bacteria. La longitud de la raíz de las plantas inoculadas con la cepa UMCV2, no presentaron un incremento significativo con respecto de las plantas de la condición control, sin embargo se observó una tendencia al incremento en las plantas del tratamiento con la bacteria UMCV2 (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 sobre plantas de fresa.

Tratamiento		
Parámetro	CONTROL	UMCV2
Clorofila (U.A.)	15	16.86
Longitud raíz (mm)	20.07	23.57
Longitud Brotes (mm)	17.76	20.40 *
Peso raíz (g)	0.019	0.031 *
Peso brotes (g)	0.097	0.081
Se inocularon 100 µL de una solución de 1 Abs ₅₉₅ de la cepa UMCV2 en la base del hipocotilo y 100 µL de agua desionizada estéril como control. Los parámetros del crecimiento se midieron 30 días después de la inoculación bacteriana. n= 16, * indican diferencia significativa según una prueba de t student ($p \leq 0.05$).		

8.6 Efecto de la exposición continua a la dimetilhexadecilamina sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

La exposición continua durante 75 días de las plantas de fresa a la dimetilhexadecilamina tuvo efectos inhibitorios sobre el en todas las concentraciones utilizadas (Fig. 10). Interesantemente, todas las plantas (100%) expuestas a la dimetilhexadecilamina generaron plantas hijas alrededor de la corona, lo cual no ocurrió en las plantas que no fueron tratadas (Fig. 13, panel c) y 14). Algo particularmente sorprendente e inesperado fue la generación

de raíces en los peciolos de las plantas expuestas a la dimetilhexadecilamina (Fig. 12 y 13, panel a). La concentración de clorofila, el peso de los brotes, el peso de la raíz, la altura, la longitud de la raíz de las plantas expuestas a la dimetilhexadecilamina disminuyó de manera significativa (hasta más del 50%, Fig. 10 y 11) con respecto de las plantas no tratadas. Las plantas tratadas con dimetilhexadecilamina generaron coronas con hasta el triple de peso de las coronas de las plantas control (Fig. 13, panel b) y 14), además generaron estructuras semejantes a callos el 100% de las plantas tratadas con DMHDA (Fig. 13, panel d) y 14).

Estos resultado muestran un efecto inhibitorio de la DMHDA cuando se aplica de forma continua (75 días) y especialmente en dosis altas, y que en estas condiciones la molécula genera la formación de órganos ectópicos en la planta.

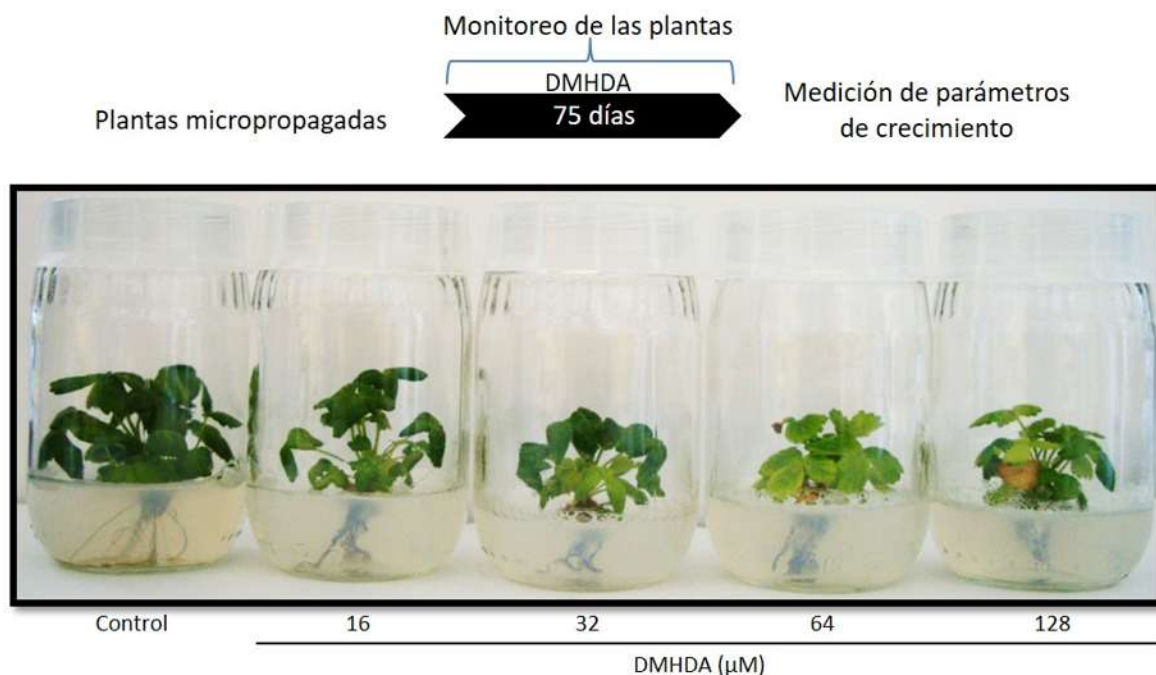


Figura 10. Imágenes representativas del efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa. Se utilizaron plantas de fresa micropropagadas, la dimetilhexadecilamina se adicionó al medio de cultivo y se utilizó etanol absoluto como solvente. Los parámetros del crecimiento se midieron transcurridos 75 días de tratamiento.

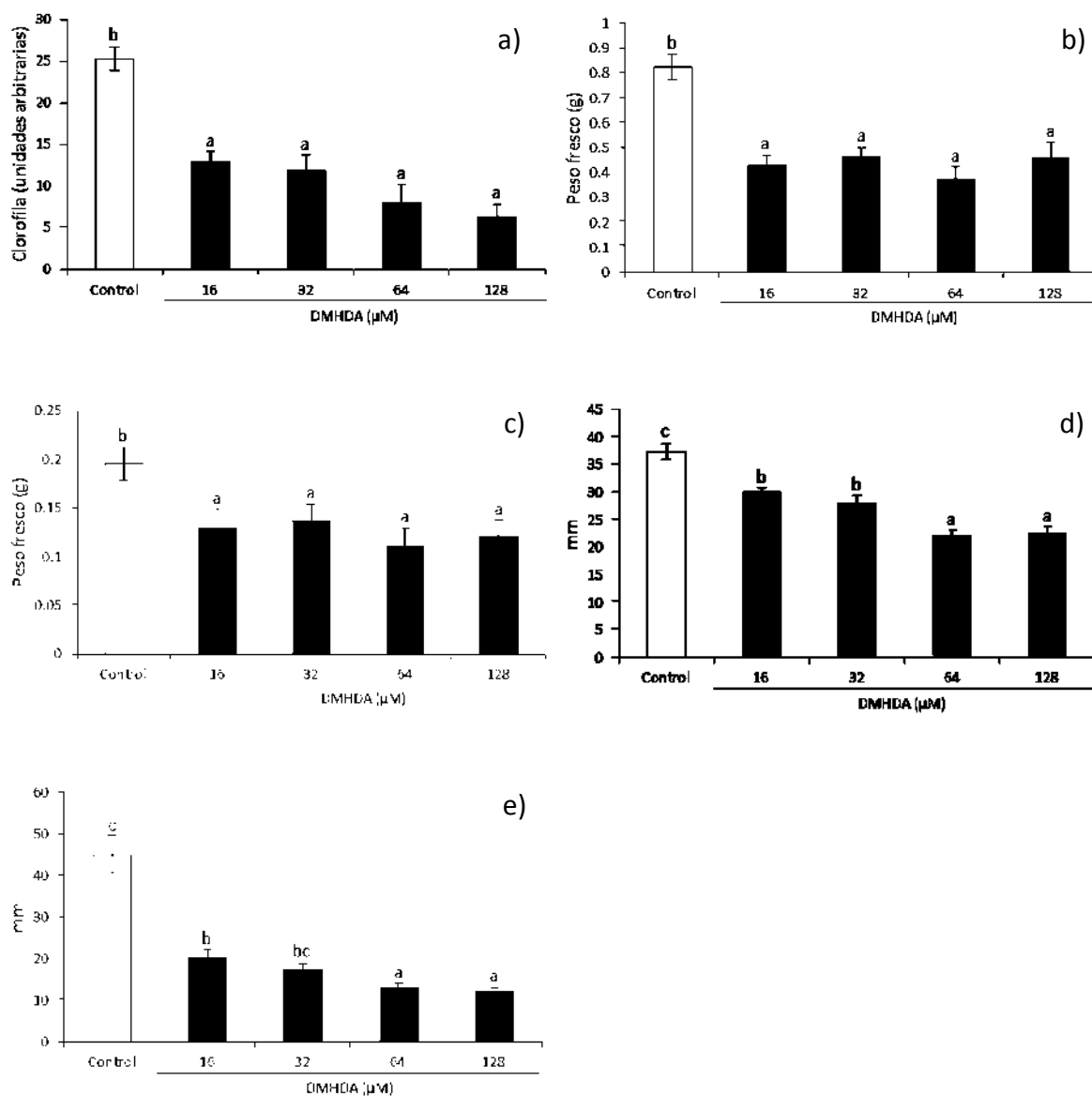


Figura 11. Efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*. Análisis cuantitativo de la figura 10. a) Concentración de clorofila; b) Peso de los brotes; c) Peso de la raíz; d) Altura de las plantas; e) Longitud de la raíz. n= 8, las letras sobre las barras de error indican diferencia significativa según una prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

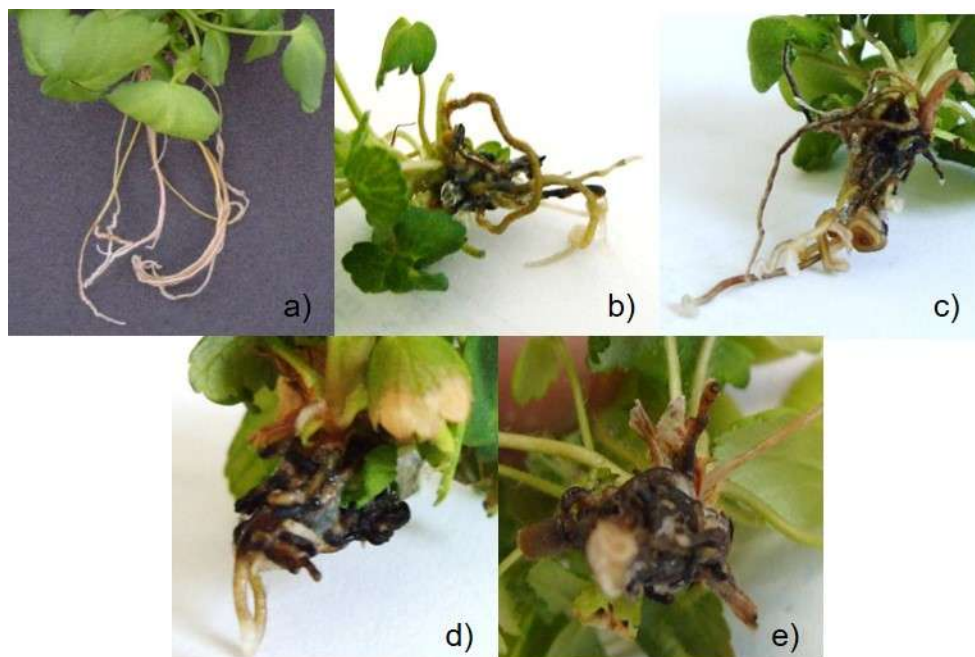


Figura 12. Formación de raíces ectópicas en plantas de fresa expuestas de manera continua a la DMHDA. Las plantas de fresa utilizadas provienen de micropropagación, la DMHDA fue adicionada al medio de cultivo en concentraciones en el orden μM y se utilizó etanol como solvente. a) Plantas control (sin DMHDA), b) $16 \mu\text{M}$, c) $32 \mu\text{M}$, d) $64 \mu\text{M}$ y e) $128 \mu\text{M}$. Fotografías representativas de cada uno de los tratamientos.

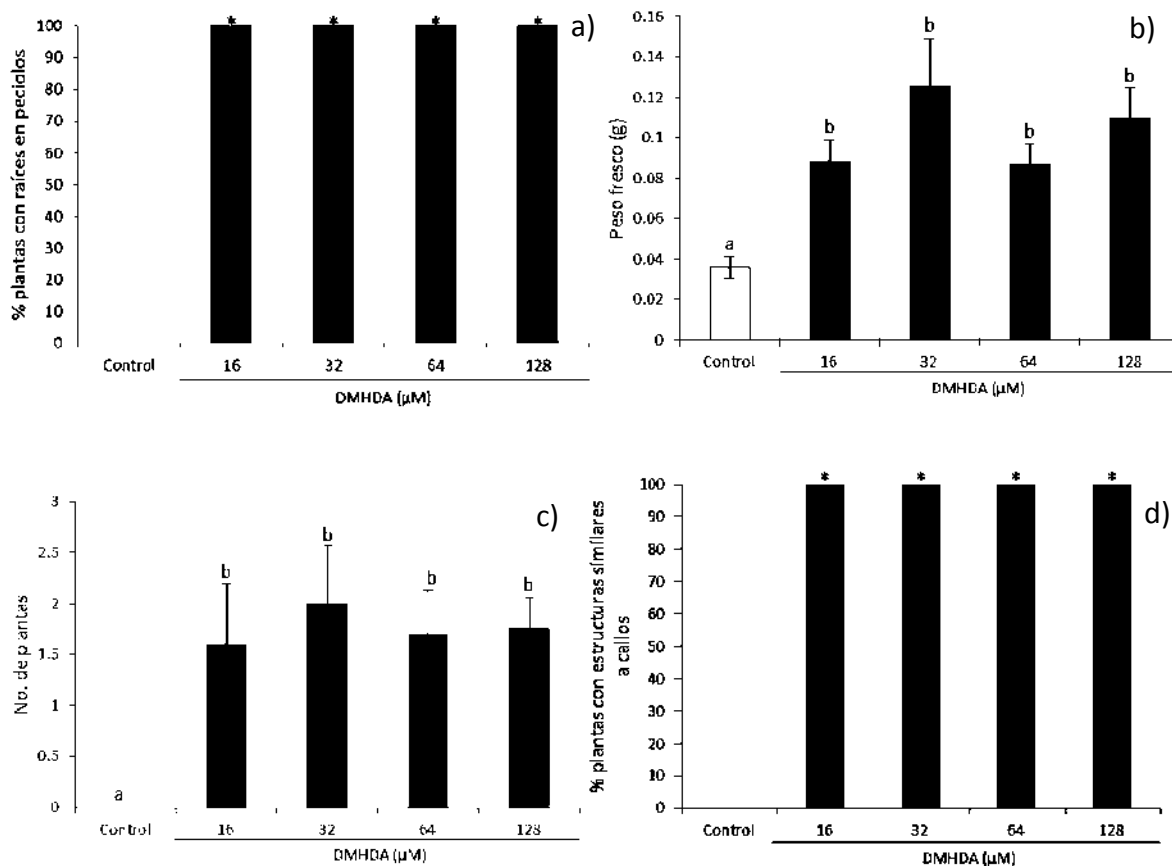


Figura 13. Efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre la morfogénesis de plantas de fresa en condiciones *in vitro*. Análisis cuantitativo de la figura 12. a) Porcentaje de plantas con raíces en peciolo, las raíces fueron generadas en la base de los peciolo de las hojas; b) Peso de la corona; c) Plantas hijas; d) Porcentaje de plantas con estructuras similares a callos. $n = 8$, * indican diferencia significativa respecto del control, según una prueba de χ^2 , seguido de un análisis de proporciones ($p \leq 0.05$), las letras sobre las barras de error indican diferencia significativa según una prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

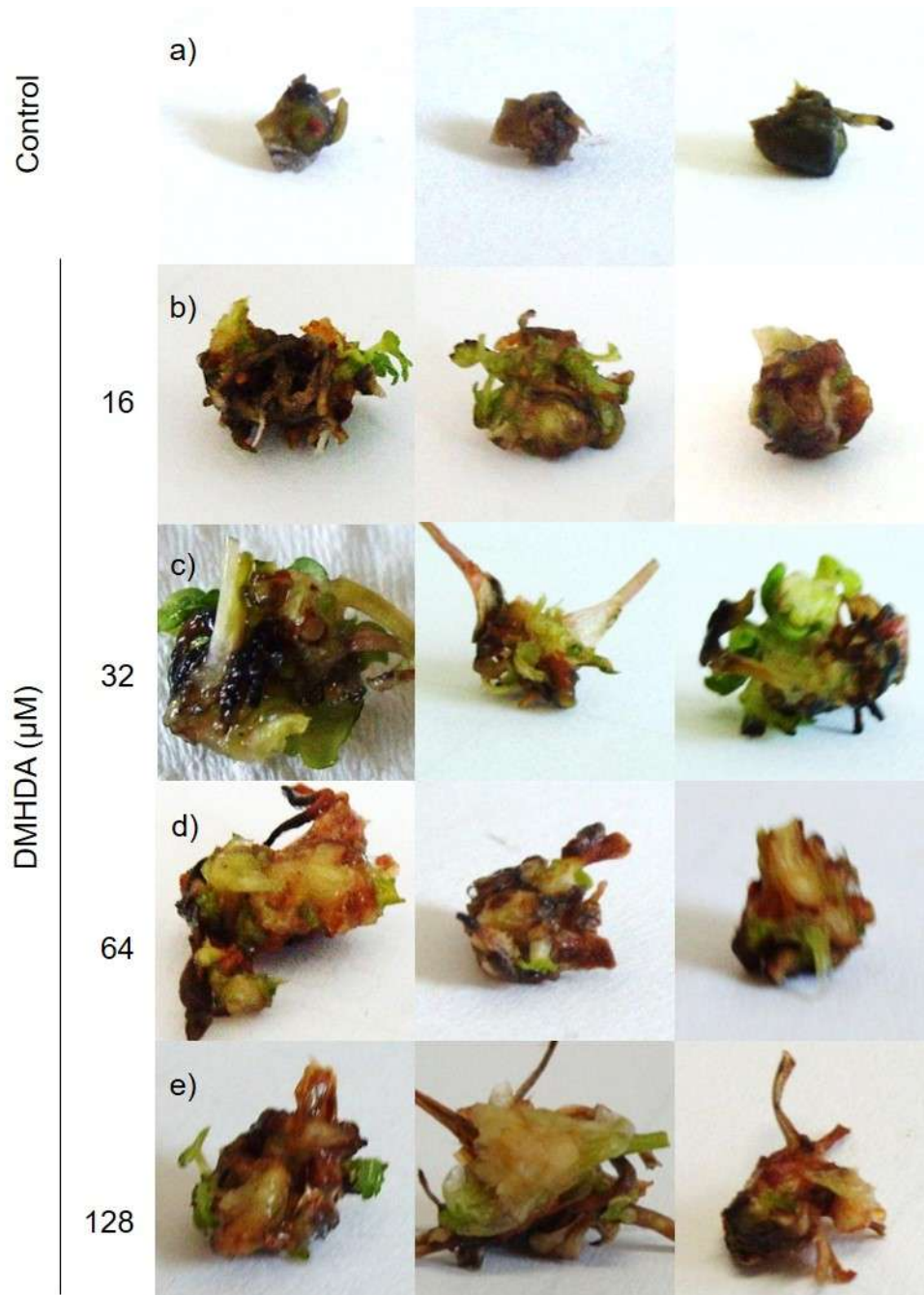


Figura 14. Generación de plantas hijas y modificación de la corona en plantas de fresa expuestas de manera continua a la DMHDA. Nótese que las plantas hijas fueron generadas alrededor de la corona, y se observaron estructuras similares a callos en las coronas de las plantas expuestas a la DMHDA. Además se observó un incremento general en el tamaño de las coronas de las plantas de fresa expuestas a la DMHDA. a) Plantas control (sin DMHDA), b) 16 μM , c) 32 μM , d) 64 μM y e) 128 μM de DMHDA. Fotografías representativas de los diferentes tratamientos.

8.7 Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la dimetilhexadecilamina sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*

El efecto de la dimetilhexadecilamina logró persistir en las plantas aún después de 90 días, teniendo un efecto promotor del crecimiento vegetal muy claro como se observa en la figura 15. Para el caso de la concentración de clorofila, sólo se observó diferencia significativa para el tratamiento de 64 μM de dimetilhexadecilamina (Fig. 16, panel a). Para el peso fresco de los brotes se observó diferencias significativas a partir de 32 μM , en donde la concentración de 64 μM de dimetilhexadecilamina se obtuvieron los valores más altos (Fig. 16, panel b). En el caso del peso de la raíz, sólo se obtuvo diferencia significativa en el tratamiento de 64 μM de dimetilhexadecilamina (Fig. 16, panel c). La altura de las plantas mostró una respuesta similar a la del peso de los brotes, teniendo diferencias significativas a partir de la concentración de 32 μM de dimetilhexadecilamina, mostrando los valores más altos en la concentración de 64 μM (Fig. 16, panel d). En el caso de la longitud de la raíz, se obtuvo diferencia significativa únicamente en el tratamiento con 64 μM de dimetilhexadecilamina (Fig. 16, panel e), respuesta similar a la del peso de la raíz. Los resultados de los experimentos de exposición transitoria (15 días) a la DMHDA muestran un efecto opuesto al obtenido con la exposición continua a la molécula, siendo claramente promotora a concentraciones de 64 μM .

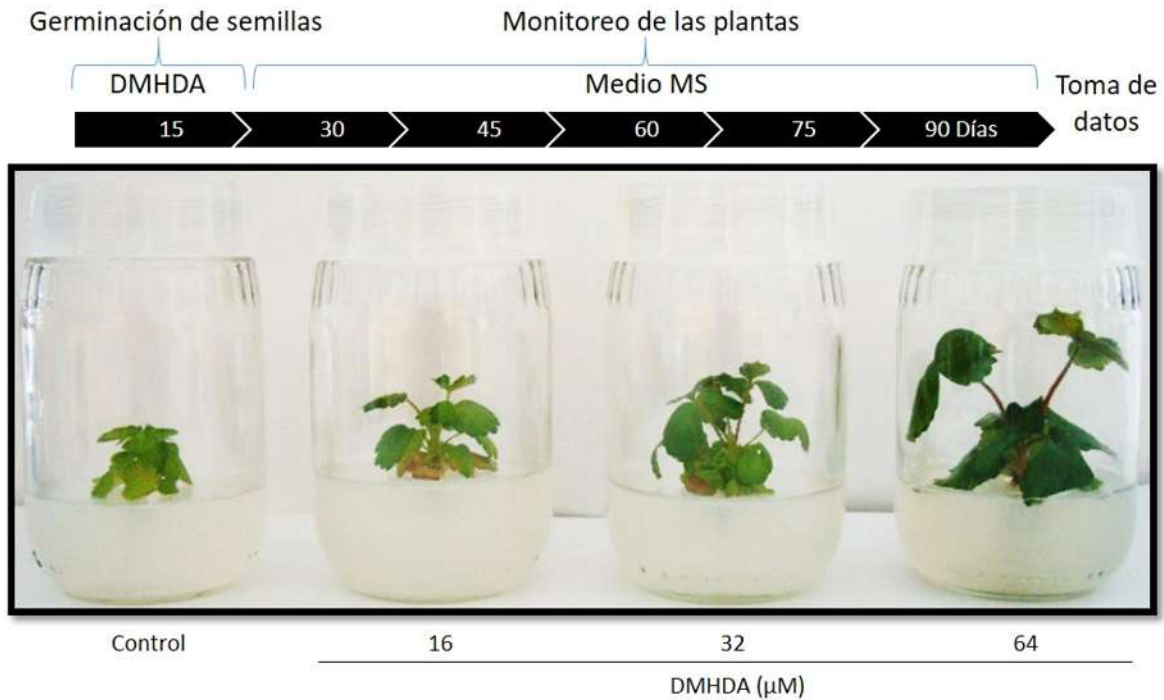


Figura 15. Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa en condiciones *in vitro*. La dimetilhexadecilamina fue adicionada al medio de cultivo donde se germinaron las semillas. Una vez obtenidas las plántulas fueron transferidas a medio sin DMHDA y así observar la persistencia del efecto. Fotografías representativas de cada uno de los tratamientos.

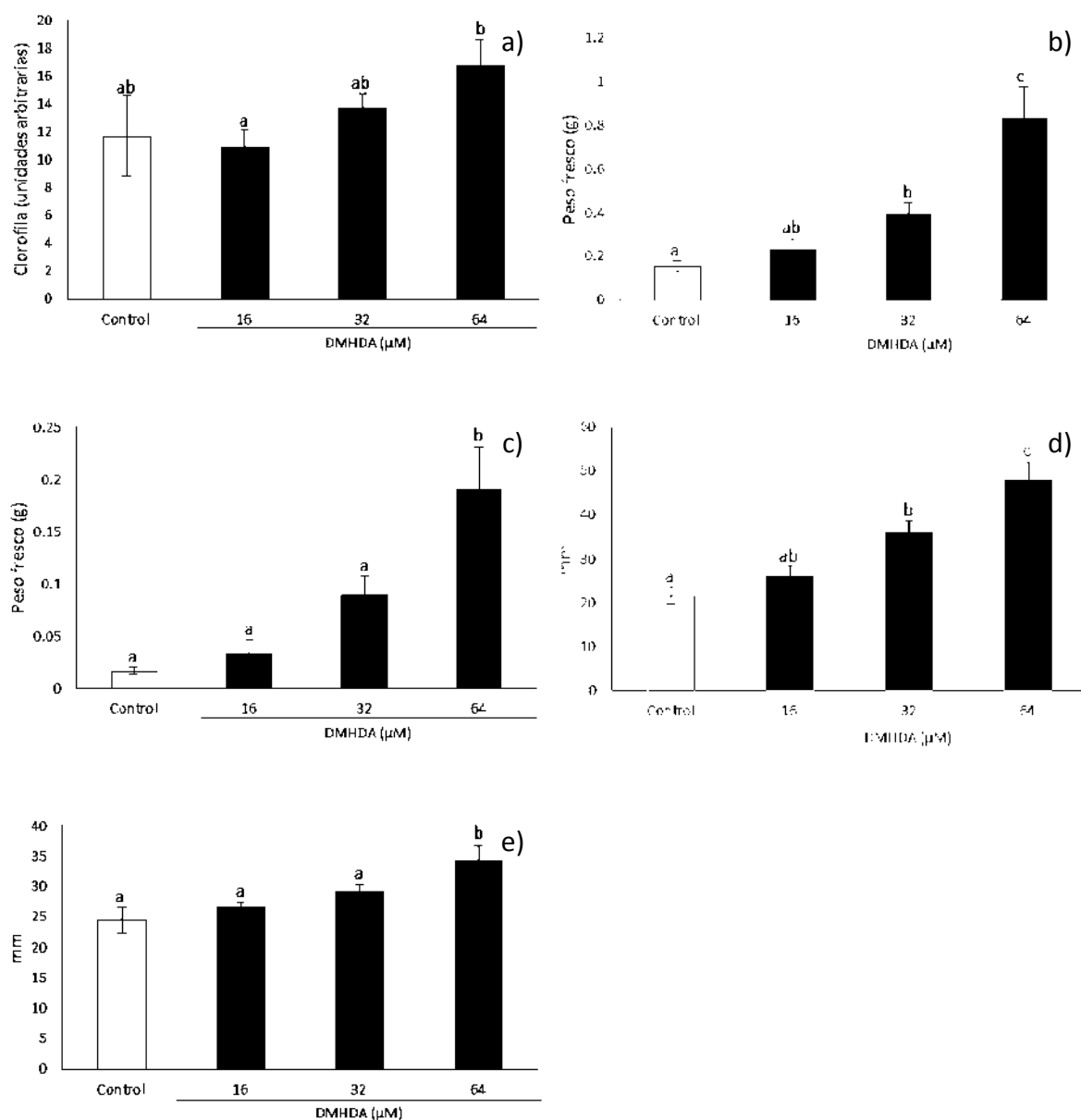


Figura 16. Persistencia del efecto de la exposición transitoria a la DMHDA sobre el crecimiento de plantas de fresa. Análisis cuantitativo de la figura 15. a) Concentración de clorofila; b) Peso de los brotes; c) Peso de la raíz; d) Altura de las plantas; e) Longitud de la raíz. $n=5$, las letras sobre las barras de error indican diferencia significativa según una prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

8.8 Efecto de la inoculación del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 sobre el rendimiento de la producción de plantas de fresa en condiciones de invernadero

Una vez probados los efectos de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 sobre parámetros del crecimiento vegetativo de plantas de fresa en condiciones *in vitro*, se decidió probar el efecto de la bacteria sobre el rendimiento de fruto en plantas de fresa en condiciones de invernadero. Debido a reportes antes mencionados (Esitken *et al.* 2010, Pesakovic *et al.* 2013) donde los autores señalan que la inoculación de consorcios bacterianos puede mejorar el rendimiento del cultivo de fresa, se decidió usar bacteria *Bacillus* sp. M496 (promotora del crecimiento vegetal, reportado por Perez-Flores en el 2013) en conjunto y de manera independiente con *A. agilis* UMCV2, para poder observar un posible efecto sinérgico de este consorcio bacteriano.

Como se muestra en la gráfica de resultados (Fig. 17), el rendimiento de las plantas inoculadas de manera independiente con cada una de las cepas bacterianas no presentó un incremento estadísticamente significativo con respecto de las plantas no inoculadas. El incremento del rendimiento fue de 21% para el caso de las plantas inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y de 25% para aquellas plantas inoculadas con la bacteria *Bacillus* sp. M496. En el caso de las plantas inoculadas con el consorcio bacteriano (*A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496), hubo un incremento estadísticamente significativo (después del quinto mes contado a partir de la cosecha del primer fruto) en el rendimiento acumulado, cuyo incremento fue del 43% con respecto a las plantas no inoculadas. Los resultados muestran una tendencia positiva con la inoculación de ambas bacterias por separado, que se vuelve aditiva (y significativa) cuando se combinan los dos inóculos.

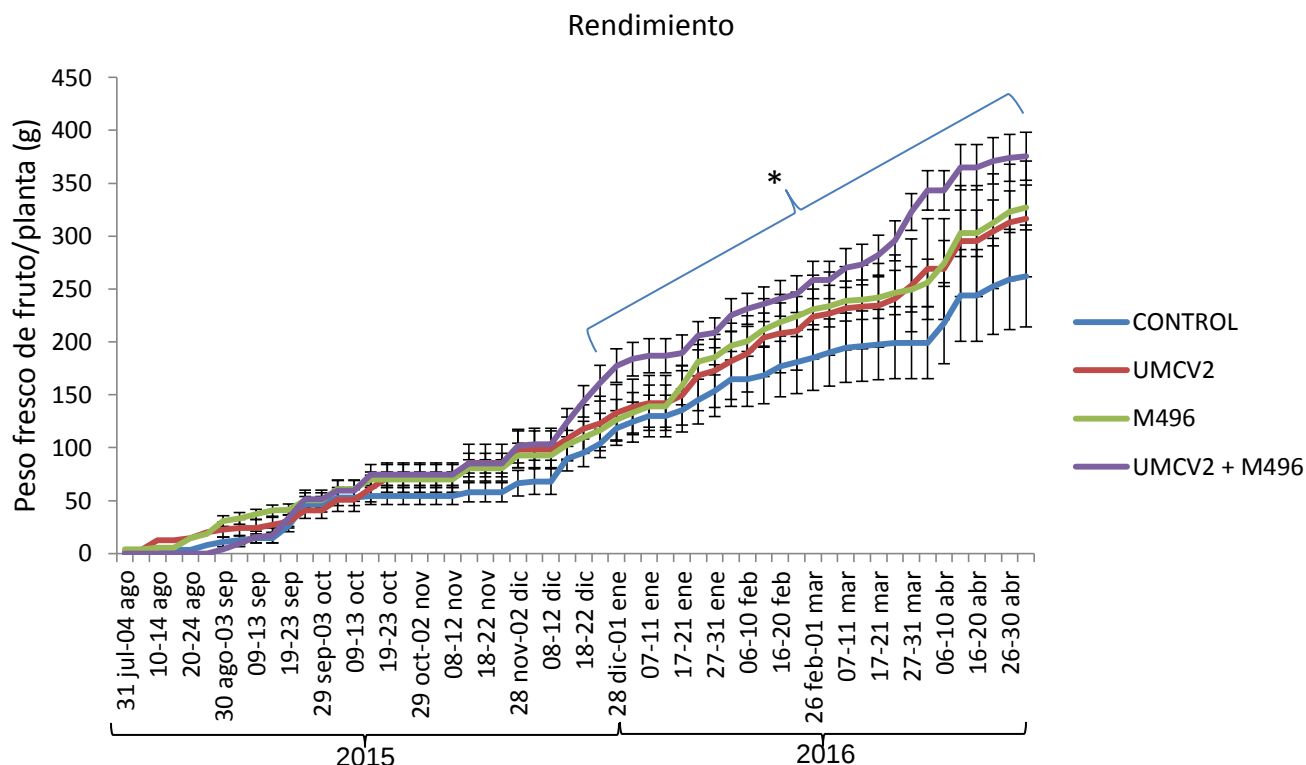


Figura 17. Incremento del rendimiento de plantas de fresa inoculadas con el consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496. Las plantas fueron adquiridas de manera comercial y fueron mantenidas en condiciones de invernadero, se regaron con solución Hoagland 0.2x tres veces por semana. En el eje de las ordenadas se indican las fechas de colecta de los frutos. n=8, los * sobre las barras de error indican diferencia significativa según una prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

8.9 Efecto de la inoculación del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 sobre la calidad del fruto de plantas de fresa en condiciones de invernadero

Una vez que se probó que la inoculación del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 incrementó en rendimiento de las plantas de fresa, se decidió analizar el efecto de dicho consorcio sobre la calidad de los frutos producidos bajo este sistema. Encontrando que la calidad de los frutos producidos no fue afectada, ya que todos los frutos cumplen con las características de máxima calidad establecidos en la categoría “US No.1” de acuerdo con el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) (Fig. 18). Para el caso de la acidez titulable hubo una tendencia a la mejora en los frutos provenientes de

las plantas inoculadas con la cepa UMCV2 de manera aislada y con el consorcio bacteriano (Fig. 18, panel a). Para los grados Brix (considerados como % de sacarosa), los frutos de las plantas inoculadas con la cepa UMCV2 y el consorcio tuvieron los valores mínimos permitidos en la categoría (7%) y los de la cepa M496 tuvieron valores ligeramente bajos, siendo aún menores para el caso de los frutos de las plantas control (Fig. 18, panel b). Para el caso del pH, la categoría establece acidez de 3.5 como máximo, donde se observó que los frutos de las plantas inoculadas con el consorcio mostraron pH ligeramente más ácidos que lo establecido, pero fueron estadísticamente menos ácidos que los de los del tratamiento control, para los aislados individuales los valores fueron más ácidos que los del consorcio y menos ácidos que los de la condición control, aunque no de manera estadísticamente diferente (Fig. 18, panel c). El tamaño mínimo aceptable para la categoría es de 19 mm de diámetro polar, encontrando que para los cuatro tratamientos se encuentran arriba de lo establecido y no mostraron diferencias estadísticas entre ellos (Fig. 18, panel d).

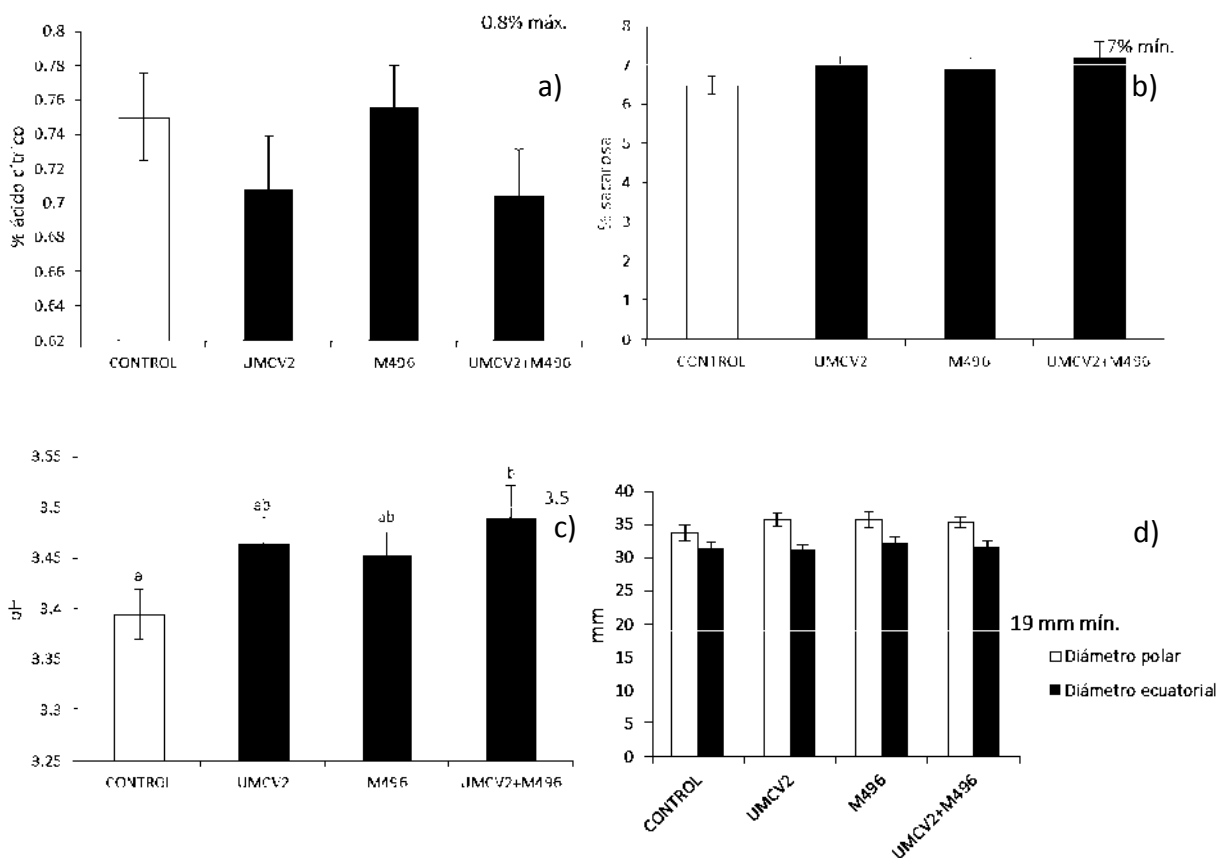


Figura 18. Efecto de la inoculación del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 sobre la calidad de frutos de fresa. a) Acidez titulable, las determinaciones se hicieron mediante titulaciones con NaOH (0.1 N) usando fenolftaleína como indicador. Los valores están expresados en % de ácido cítrico; b) °Brix, las mediciones se hicieron de jugo de fruto con un refractómetro manual (0-32% sacarosa); c) pH, las mediciones se hicieron de jugo del fruto con un potenciómetro; d) Tamaño del fruto, El tamaño se determinó midiendo el diámetro polar y ecuatorial con un vernier digital. n= 33, las letras sobre las barras de error indican diferencia significativa según una prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

8.10 Colonización y persistencia del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 en plantas de fresa en condiciones de invernadero

Para el análisis de la colonización y persistencia de las cepas bacterianas de manera independiente y en consorcio se empleó la técnica de FISH. Para revisar la especificidad de las sondas usadas se hicieron hibridaciones cruzadas (es decir, la sonda que tiene como blanco a la cepa UMCV2 fue puesta a hibridar con la cepa M496, y viceversa), observando que efectivamente las sondas usadas son específicas para cada cepa bacteriana, ya que no presentaron hibridación cruzada (Fig. 19). Una vez probada la especificidad de las sondas, se procedió a analizar muestras de hojas de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos empleando microscopía confocal. Las hojas presentaron un grosor de aproximadamente 120 μm , por lo tanto las observaciones se hicieron a aproximadamente 60 μm (aprox. la mitad de la hoja) que corresponde a la ubicación del mesófilo en empalizada (Fig. 20), esto para sólo observar las bacterias dentro del tejido de las hojas.

Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal muestran que, para las plantas de la condición control (no inoculadas), no muestran ninguna señal en los canales de fluorescencia correspondientes para cada sonda (fluorescente verde y roja, para la cepa UMCV2 y M496 respectivamente) lo que nos indica la ausencia de ambas bacterias en dicha condición (Fig. 21, paneles a), b) y c). Para el caso de la inoculación del consorcio bacteriano *A. agilis* UMCV2- *Bacillus* sp. M496, se observó la presencia de ambas bacterias en los dos canales de fluorescencia, así como donde se encuentran activos los tres canales (fluorescente verde y roja, así como luz visible) indicando su co-localización la colonización por ambas bacterias en las plantas de fresa (Fig. 21, paneles d), e), f), g), h), i). Las plantas que fueron inoculadas con ambas bacterias de manera independiente, presentaron las señales fluorescentes características para cada cepa hibridada con su

respectiva sonda, indicando colonización tanto de la cepa UMCV2 (Fig. 22, paneles l), m), p) y q) como la cepa M496 (Fig. 22, paneles j), k), n) y o) de manera independiente en las plantas inoculadas. En cuanto a la ubicación en los tejidos de las hojas, las bacterias en todos los casos se encuentran colonizando espacios intercelulares, lo cual se aprecia con más claridad en los acercamientos en las imágenes.

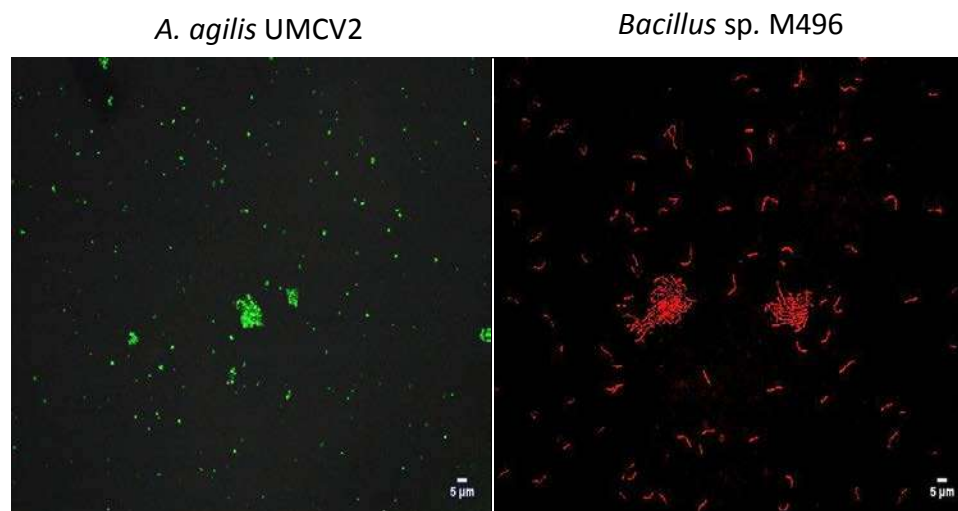


Figura 19. Hibridación *in situ* fluorescente de cultivos puros de las cepas UMCV2 y M496. Notese la forma cocoide de *A. agilis* UMCV2 flouresciendo en color verde y la forma de bacilo de *Bacillus* sp. M496 flouresciendo en color rojo. Fotografías obtenidas por microscopía confocal.

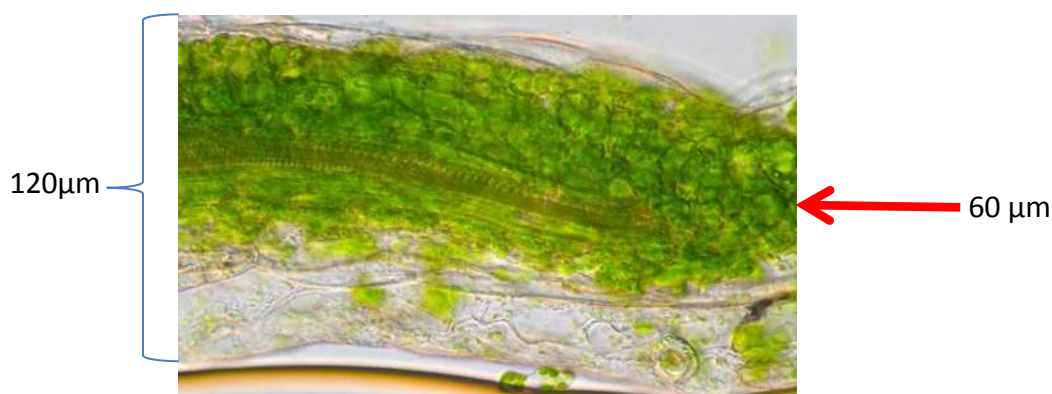


Figura 20. Corte transversal de un foliolo de hoja de fresa. El grosor de las hojas es de aprox. 120 µm, la flecha roja indica la profundidad a la que se analizaron las muestras tomadas de las hojas de plantas de fresa. Fotografía obtenida por microscopía de Nomarski.

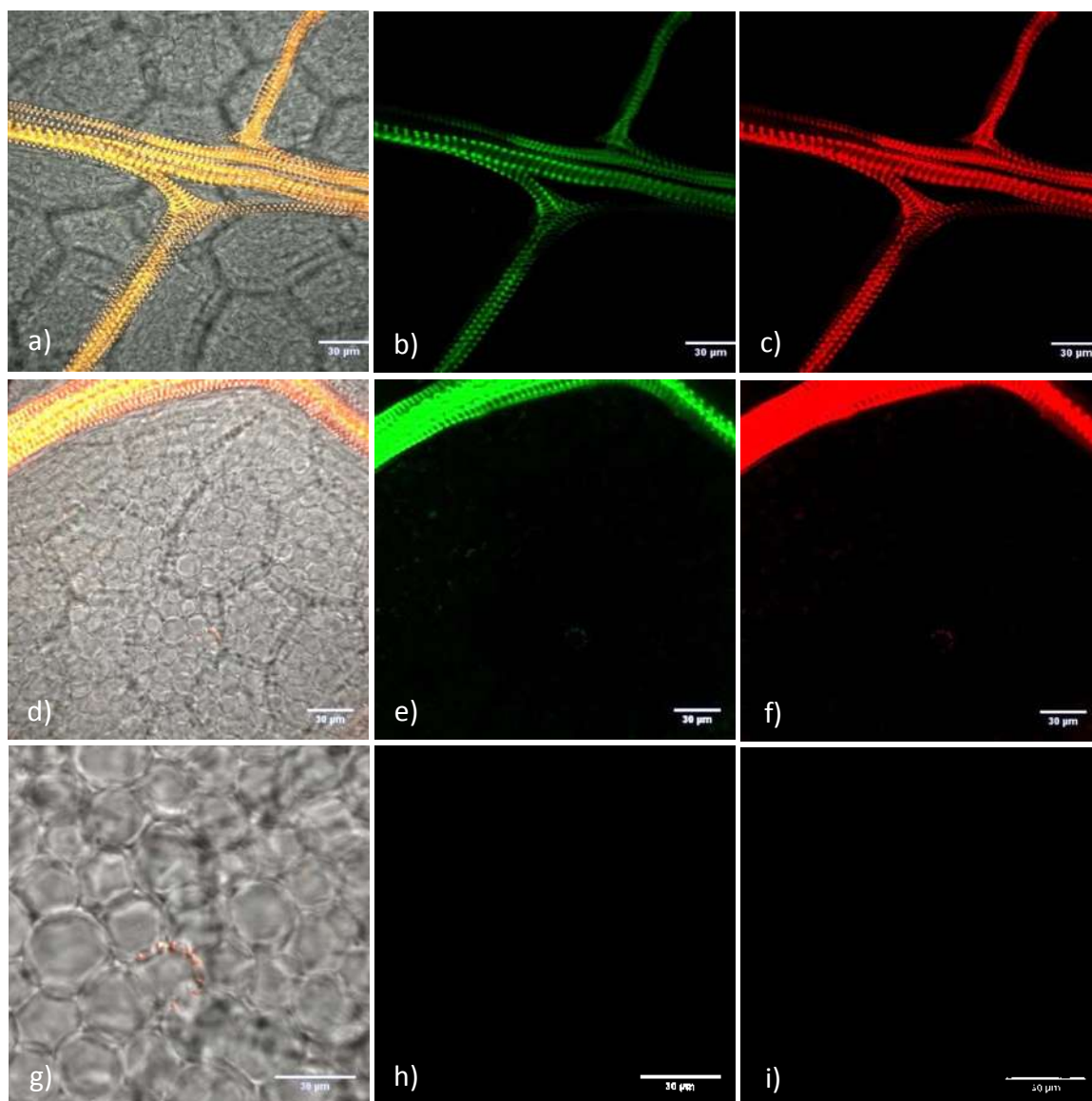


Figura 21. Colonización y persistencia del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 en plantas de fresa. Muestras de hojas tomadas al azar de las plantas donde se cosecharon los frutos, analizadas 5 meses después de la última inoculación. a) Control (sin inocular), vistas con luz visible, fluorescente verde y roja; b) Control, vistas con luz fluorescente verde; c) Control, vistas con luz fluorescente roja; d) UMCV2-M496 (inoculadas con el consorcio), vistas con luz visible, fluorescente verde y roja; e) UMCV2-M496, vistas con luz fluorescente verde; f) UMCV2-M496, vistas con luz fluorescente roja; g), h) e i) son acercamientos 2x de los paneles d), e) y f), respectivamente. Las barras blancas del lado inferior derecho de cada panel indican 30 µm.

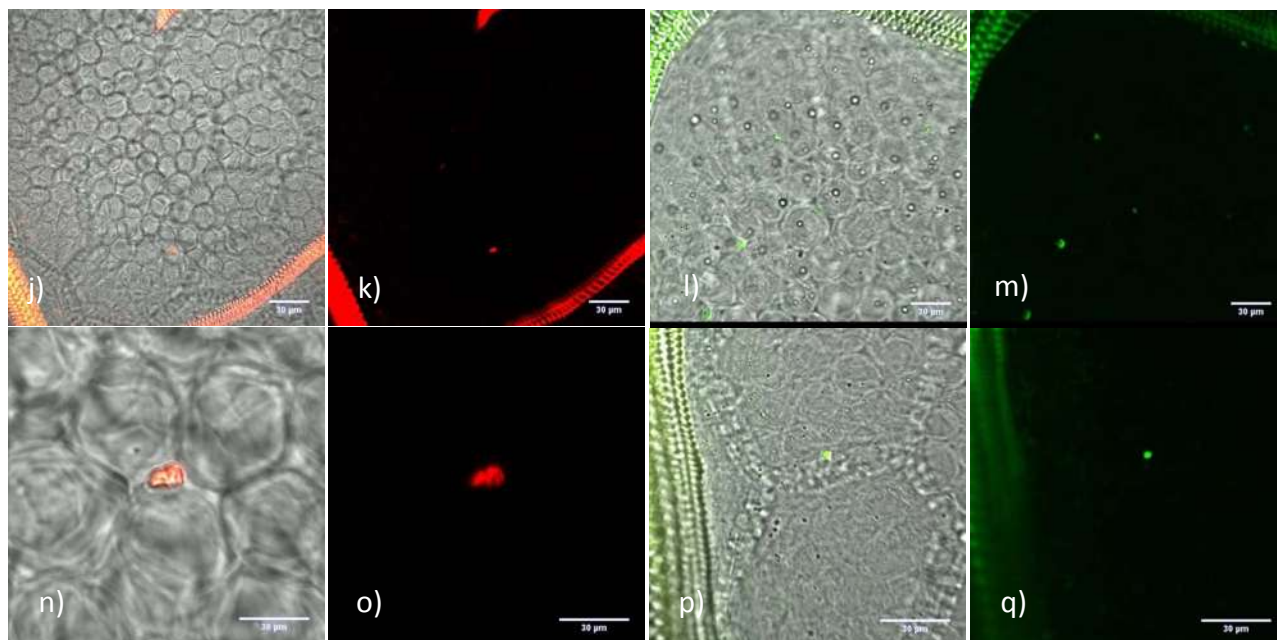


Figura 22. Continuación de la figura 21. j) M496, vistas con luz visible, fluorescente verde y roja; k) M496, vistas con luz fluorescente roja; l) UMCV2, vistas con luz visible, fluorescente verde y roja; m) UMCV2, vistas con luz fluorescente verde; n), o), p) y q) son acercamientos 2x de j), k), l) y m) respectivamente. Las barras blancas del lado inferior derecho de cada panel indican 30 μm .

9 RESULTADOS ADICIONALES

9.1 Efecto de la exposición continua a la DMHDA sobre la infección por *Botrytis cinerea* en plantas de fresa en condiciones *in vitro*

Las plantas tratadas con las diferentes concentraciones de dimetilhexadecilamina lograron sobrevivir a la infección con el hongo fitopatógeno *B. cinerea* (Fig. 23), teniendo porcentajes de supervivencia de hasta 75%. Transcurridos 10 días posinfección, las plantas control (sin dimetilhexadecilamina) no fueron capaces de sobrevivir al ataque del fitopatógeno, mientras que para las plantas tratadas con 16, 32, 64, 128 μM de dimetilhexadecilamina presentaron porcentajes de supervivencia de 40, 50, 50 y 75%, respectivamente (Fig. 24). A los 20 días posinfección, los porcentajes de supervivencia disminuyeron a 30, 30, 30 y 50% (16, 32, 64, 128 μM de dimetilhexadecilamina, respectivamente, Fig. 24). Después de transcurridos 30 días de la infección con el hongo, los porcentajes de supervivencia de las plantas fueron de 30, 30, 30 y 50% (16, 32, 64, 128 μM de dimetilhexadecilamina, respectivamente, Fig. 24).

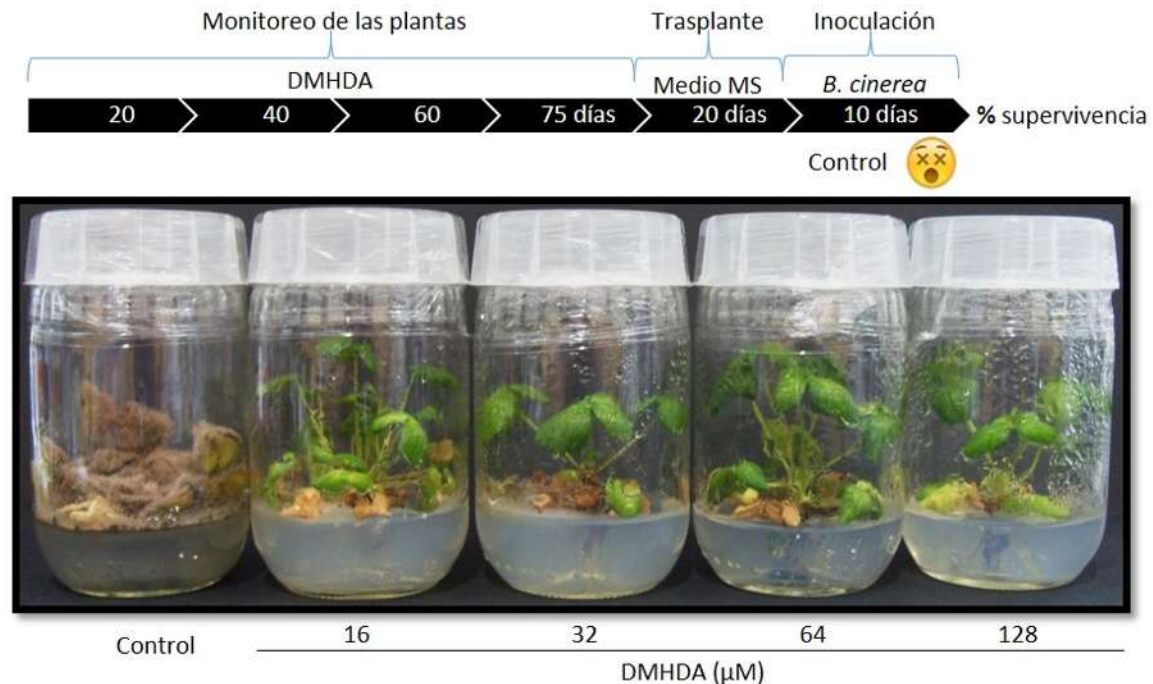


Figura 23. Incremento en la resistencia de plantas de fresa a la infección por *B. cinerea* generada por la exposición continua a la DMHDA. La DMHDA fue adicionada al medio de cultivo, se usó etanol absoluto como solvente. Después de 75 días de tratamiento, las plantas se transfirieron a medio sin DMHDA, 20 días después de la transferencia, las plantas fueron inoculadas con 5 μ L de una solución de 1×10^5 UFC/mL en cada foliolo. El porcentaje de supervivencia se calculó una vez que todas las plantas control murieron a causa de la infección por el hongo. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos (10 días después de la inoculación con el hongo).

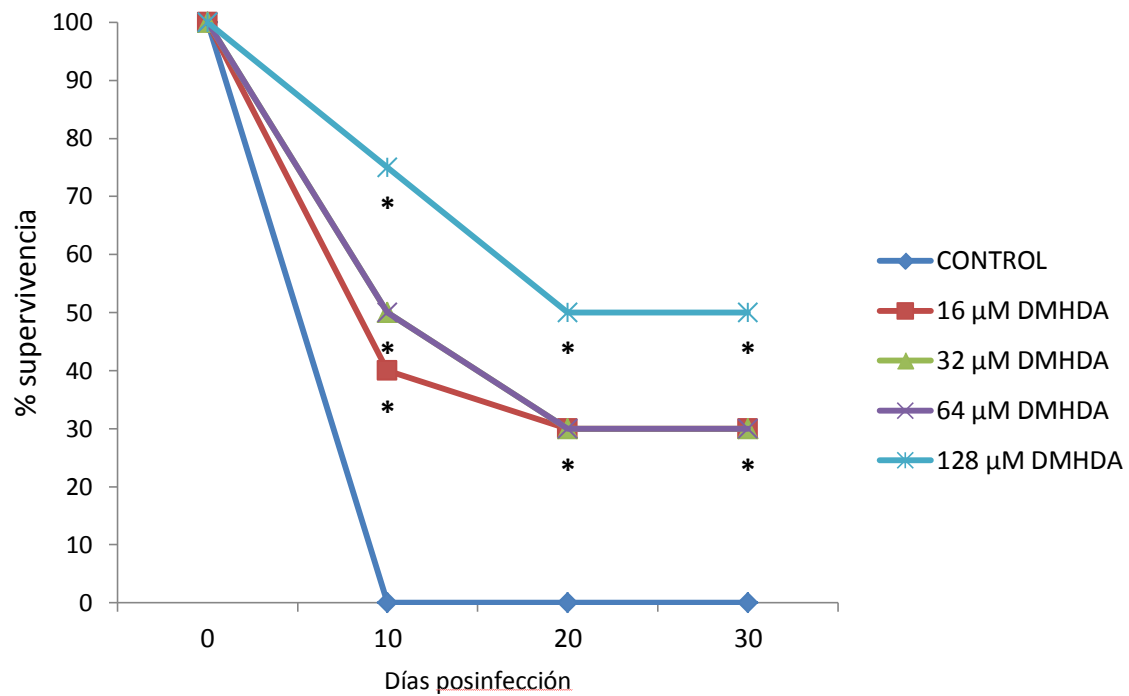


Figura 24. Porcentaje de supervivencia de plantas de fresa tratadas con DMHDA infectadas con *B. cinerea*. Análisis cuantitativo de la figura 26, los cálculos de los porcentajes de supervivencia se hicieron a los 10, 20 y 30 días posinfección con el hongo. n= 8, * indican diferencia significativa respecto del control, según una prueba de X^2 seguida de un análisis de proporciones ($p \leq 0.05$).

10 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las primeras etapas en el proceso de producción de fresa, es la obtención de plantas a partir de semillas para los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, los porcentajes de germinación son muy bajos (12%) y la emergencia de las plántulas puede llevar hasta 7 semanas (Miller *et al.*, 1992; Hamdouni *et al.*, 2001). Por lo tanto, se decidió probar el efecto de los compuestos difusibles y volátiles producidos por la bacteria *A. agilis* UMCV2 sobre el porcentaje de germinación. Se observó que en el caso de los compuestos difusibles no hubo un incremento estadísticamente significativo con respecto de la condición control (24.6 y 17.2% respectivamente), sin embargo, cuando las semillas fueron expuestas a los volátiles de la bacteria, se incrementó de manera significativa el porcentaje de germinación con respecto de la condición control (37 y 18.5% respectivamente), estos porcentajes fueron obtenidos en 2 semanas. Como se ha mencionado en los antecedentes, el compuesto al cual se le atribuye la actividad de promoción del crecimiento de *A. agilis* UMCV2 (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011, Hernández-Soberano, 2013; Castulo-Rubio *et al.*, 2015) es la dimetilhexadecilamina, la cual es un compuesto volátil de naturaleza aminolípida producido por la cepa UMCV2 (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011), por esta razón se decidió utilizar al compuesto puro adicionado al medio de germinación y observar su efecto en el porcentaje de germinación de semillas de fresa. Observando que a partir de la concentración de 4 μ M de DMHDA hay un incremento significativo en el porcentaje de germinación, siendo la concentración de 32 μ M donde se alcanzó el incremento mayor (40%) en el porcentaje de germinación de semillas expuestas al compuesto volátil, en un periodo de 15 días. Hamdouni *et al.* (2001), trataron con H₂SO₄ (36 N, durante 5 min., a manera de escarificación química) semillas de fresa, logrando incrementar hasta en 63% la germinación, pero esto en un periodo de 8 semanas. En otro trabajo, semillas de fresa

fueron sembradas en medio adicionado con GA₃ (ácido giberélico, el cual promueve la germinación de semillas de diferentes plantas) logrando un 53% de germinación en un periodo de 2 meses (Miller *et al.*, 1992). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se pueden generar dos conclusiones: 1) la bacteria *A. agilis* UMCV2 promueve la germinación de semillas a través de la emisión de VOCs, específicamente refiriéndose a la DMHDA como el principal responsable de dicho efecto; 2) El compuesto volátil DMHDA a pesar que no superó los porcentajes de germinación reportados en otros trabajos, redujo el tiempo de germinación de semillas de fresa expuestas al compuesto. Es posible que realizando evaluaciones a 3 y 4 semanas de exposición al compuesto los porcentajes incrementen gradualmente.

Una vez que se evaluó el efecto de la bacteria y sus VOCs sobre la germinación, se decidió probar los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 en otra de las etapas del proceso de producción de fresa, en este caso correspondería a la propagación *in vitro*. Algunas de las ventajas de la propagación *in vitro* son que se producen muchas plantas a partir de un explante (generalmente de hoja) y éstas son clones de la planta de donde se extrajo el explante, por lo tanto conservan todas sus características, además las plantas que se producen están libres de patógenos. Una de las desventajas de este método de propagación, tanto como se eliminan los microorganismos patógenos, también se eliminan a los microorganismos benéficos. Cordier *et al.* (2000), proponen la creación de un “rizósfera benéfica” para las plantas de fresa que tienen como origen la propagación *in vitro*, esto con el fin de proveer a las plantas de microorganismos benéficos para asegurar crecimiento óptimo y protección contra microorganismos patógenos cuando estas sean plantadas en el campo. Para esto, plantas de fresa fueron sometidas a los VOCs producidos por la bacteria

A. agilis UMCV2 e inoculándola directamente en la raíz. Encontrando que, para el caso de las plantas expuestas a los volátiles bacterianos sólo hubo incremento estadísticamente significativo en el peso de los brotes y una reducción en el contenido de clorofila, esto puede deberse a que el tiempo de exposición fue demasiado corto (en este caso 30 días) o a que el sistema, específicamente hablando del vial donde se creció la bacteria no permitió llegar al crecimiento bacteriano necesario para tener un efecto promotor en las plantas (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011). A este respecto es posible que las plantas de fresa tengan una resistencia particular a la DMHDA. Velázquez-Becerra *et al.* (2013) reportaron que trifolios de fresa fueron sometidos a concentraciones de 100 μ M de DMHDA sin que causaran efectos de necrosamiento o marchitamiento, mientras que concentraciones de 64 μ M ejerce una potente inhibición en el crecimiento de *M. sativa* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011) y un efecto semejante es causado por una concentración de 6 μ M en *Arabidopsis* (Raya-González *et al.*, 2016b).

En el caso de donde se inoculó la bacteria en la raíz, se obtuvieron incrementos estadísticamente significativos en la longitud de brotes y peso de raíz respecto del control (sin inocular), un valor ligeramente menor que el control en el peso de los brotes y una tendencia al incremento en la longitud de la raíz y la concentración de clorofila, esto podría deberse a que el periodo de interacción no fue suficiente para que la bacteria se estableciera y colonizara tanto la rizósfera como los tejidos internos de la planta y así ejercer de mejor manera su efecto promotor como ya se había mencionado en los antecedentes.

Los ensayos anteriormente discutidos (efecto de VOCs e inoculación directa) también ponen de manifiesto la incertidumbre de si la cantidad de DMHDA producida en ambas condiciones fue la suficiente para ejercer el efecto promotor reportado con anterioridad en

otras plantas (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2012; Castulo-Rubio *et al.*, 2015; Raya-González *et al.*, 2016b); por esta razón, se probó el efecto directo del compuesto puro DMHDA (Sigma Adrich®) adicionado al medio de cultivo en el crecimiento de plantas de fresa *in vitro*. Observándose que las plantas expuestas a las diferentes concentraciones de DMHDA presentaron una inhibición del crecimiento en general. Esto pudo ocurrir debido a que como se sabe las plantas son capaces de desviar su metabolismo dependiendo del tipo de estrés que reciban, es decir si las condiciones son favorables para el crecimiento, las plantas emplean la mayoría del producto del metabolismo en el crecimiento, en cambio cuando son atacadas por un agente patógeno, las plantas desencadenan una respuesta de defensa a expensas del crecimiento (Huot *et al.*, 2014). Otra molécula que ha mostrado un patrón similar de acción es el ácido beta amino butírico (BABA), el cual al igual que la DMHDA al ser aplicado a plantas de *Arabidopsis thaliana*, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento (Luna *et al.*, 2014). Para demostrar que el efecto de la reducción del crecimiento de las plantas de *Arabidopsis* fue debido al desvío metabólico hacia la defensa, las plantas tratadas con el BABA fueron inoculadas con los fitopatógenos *Hyaloperonospora arabidopsidis* (hongo fitopatógeno) y *Pseudomonas syringae* (bacteria patógena), observando una disminución en el porcentaje de infección por parte de ambos microorganismos patógenos; además hicieron análisis de la expresión de genes de las rutas de defensa (SAR e ISR) observando que ambas rutas están siendo activadas por el BABA, con esto corroboraron que esta molécula es capaz de activar la defensa de plantas de *Arabidopsis* a expensas del crecimiento (Luna *et al.*, 2014). Para corroborar si la DMHDA, tiene un modo de acción similar al BABA (activar la resistencia a patógenos a expensas del crecimiento) se decidió inocular a plantas tratadas con diferentes concentraciones de DMHDA con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

(resultados adicionales, Fig. 23 y 24), observando resistencia a la infección en las plantas tratadas con la DMHDA al hongo fitopatógeno hasta 30 días posteriores a la inoculación. Con estos resultados obtenidos podemos concluir que la DMHDA activa la defensa de plantas de fresa a expensas del crecimiento, sin embargo se necesita realizar un análisis de la expresión de genes marcadores de las vías de SAR e ISR para determinar si es una o ambas las que se están activando por acción de la DMHDA. Raya-González *et al.* (2016b) reportaron que la DMHDA activa la ruta de señalización del ácido jasmónico en plantas de *Arabidopsis*, lo cual abre la posibilidad de que en plantas de fresa tenga el mismo efecto, explicando de cierta manera la resistencia al hongo patógeno de plantas de fresa tratadas con DMHDA, sin embargo son necesarios más análisis para poder corroborar dicho efecto.

Un resultado interesante observado, fue la generación de raíces ectópicas en plantas de fresa expuestas a la DMHDA de manera continua (Fig. 12 y 13, panel a). Estas estructuras fueron observadas en el 100% de las plantas expuestas a la DMHDA (Fig. 13, panel a) independientemente de la concentración. También se encontró que las plantas con tratamiento de DMHDA produjeron plantas hijas (Fig. 13, panel c), y 14) e incrementaron el peso de sus coronas hasta 3 veces más que la condición control (Fig. 13, panel b), fue de particular interés la generación de estructuras similares a callos en las coronas de las plantas expuestas al aminolípido (Fig. 13, panel d) y 14). López-Bucio *et al.* (2007), reportaron la bioactividad en plantas *Arabidopsis* de una molécula estructuralmente similar a la DMHDA, la N-isobutildecanamida. Observando una reducción del crecimiento de la raíz primaria, la aparición de estructuras similares a callos en hojas y raíces, de manera dosis dependiente. Para resolver los posibles mecanismos de acción de la N-isobutildecanamida, utilizaron plantas transgenicas *CycB1:uidA* (marcador de proliferación celular), observando

una reducción de la expresión del marcador en el meristemo radicular y un aumento de expresión en el meristemo apical, mostrando que las células no salieron del ciclo celular con una sincronización del desarrollo normal, resultando en divisiones celulares ectópicas; además observaron que en las estructuras similares a callos se pudieron observar grupos de células expresando GUS, indicando actividad mitótica en estos tejidos. A este respecto Méndez-Bravo *et al.* (2010), reportaron que plantas de *Arabidopsis* tratadas con la N-isobutildecanamida confirieron resistencia contra los hongos fitopatógenos *Alternaria brassicola* y *Botrytis cinerea*, similar a lo que ocurre con plantas de fresa tratadas con la DMHDA. Con estos antecedentes reportados, se puede sugerir un modo de acción similar para la DMHDA, ya que en primera instancia son moléculas similares estructuralmente, producen fenotipos similares en el crecimiento de plantas expuestas a ambos compuestos y generan resistencia al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Adicionalmente se conoce que la DMHDA también modifica los programas de división celular en *Arabidopsis* (Raya González *et al.*, 2016b) sin embargo faltan análisis para determinar cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación de la respuesta de plantas de fresa a este compuesto bacteriano.

Una vez que se observó el efecto de la DMHDA en periodos de exposición prolongados, se procedió a realizar el análisis de la exposición al compuesto sólo durante la germinación de las semillas de fresa, con el fin de analizar su efecto adicionándola en una etapa temprana del desarrollo y observar su persistencia retirando el estímulo. Una vez obtenidas las plántulas de fresa bajo diferentes concentraciones de DMHDA, fueron transferidas a frascos con medio MS sin DMHDA. Observando que las plantas germinadas en las diferentes concentraciones de DMHDA presentaron un incremento en el crecimiento de

manera dosis dependiente (Fig. 15 y 16). Como ya se ha mencionado en los antecedentes, la DMHDA también ha mostrado la capacidad de promover el crecimiento de diferentes plantas (*Medicago truncatula* y *Sorghum bicolor*, Orozco-Mosqueda *et al.*, 2012; Castulo-Rubio *et al.*, 2015) esto atribuido a la capacidad de esta molécula de activar los mecanismos de toma de hierro por las plantas, lo cual sugiere que dicho efecto promotor sea activado de igual manera en plantas de fresa, además de existir un posible cruce de señales de otras hormonas con el ácido jasmónico, ruta de señalización activada por la DMHDA (Raya-González *et al.*, 2016b). Sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares responsables del efecto promotor de dicho compuesto en plantas de fresa, por lo que es necesario realizar análisis detallados de las diferentes rutas de señalización hormonal que pueden estar activando o reprimiendo este volátil bacteriano. Sin embargo un aspecto que llama poderosamente la atención es que el estímulo producido por la DMHDA durante 15 días sobre las semillas germinantes de fresa tuviera un efecto que se prolongó 75 días posteriores a la suspensión del estímulo, lo que sugiere una modificación profunda de los programas de desarrollo en la planta que podrían incluir modificaciones epigenéticas. A este respecto Luna *et al.* (2014), observaron que en plantas de *Arabidopsis*, el ácido beta amino butírico (BABA, con efecto similar a la DMHDA en plantas) tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y genera resistencia sistémica contra los fitopatógenos *Hyaloperonospora arabidopsidis* y *Pseudomonas syringae*, además de activar genes de respuesta a las rutas del ácido salicílico y jasmónico. Este compuesto regula vía mecanismos epigenéticos las respuestas de defensa, sin afectar la acetilación de la histona H3K9, pero bloquea la actividad de la metiltransferasa KYP, sugiriendo que la activación de la defensa por acción del BABA depende de la hipometilación de dicha histona. Por lo tanto, debido a que las dos moléculas generan fenotipos compartidos en plantas, esto

sugiere una regulación epigenética de la respuesta de la planta a la DMHDA, similar a la dada por el BABA.

Un último paso en el proceso de producción de fresa, es el rendimiento de las plantas en la producción de fruto. Para analizar la capacidad de incrementar el rendimiento de plantas de fresa por efecto de la cepa UMCV2, fue inoculada de manera independiente y en consorcio con otra bacteria bioestimulante, *Bacillus* sp. M496 (bacteria con capacidades de promoción del crecimiento, Pérez-Flores, 2013), esto debido a que trabajos anteriores han reportado mejores rendimientos en el cultivo de fresa inoculando consorcios bacterianos (Pirlak *et al.*, 2009; Pešaković *et al.*, 2013). Observando qué, para el caso donde se inoculó de manera independiente la cepa UMCV2 hubo un incremento en el rendimiento de un 21%, en las plantas inoculadas con la cepa M496 se incrementó en un 25% el rendimiento, para el caso donde se inoculó el consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 se observó un 40% de incremento en el rendimiento en la producción de fruto de plantas de fresa (Fig. 17). Trabajos anteriores han reportado incrementos en el rendimiento de la producción de fruto de fresa, inoculando consorcios de PGPRs logrando incrementos del 19.5 y 26% (Pešaković *et al.*, 2013) y un 26.7% (Pirlak *et al.*, 2009), lo cual deja de manifiesto la efectividad del empleo del consorcio bacteriano *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 en el cultivo de fresa. El efecto sinérgico producido por el consorcio bacteriano sobre el rendimiento, podría deberse a que aparentemente cada una de las bacterias tiene mecanismos de estimulación diferentes y no antagónicos. Para el caso de *A. agilis* UMCV2, mediante la emisión del volátil DMHDA ha mostrado la activación de la ruta de señalización del ácido jasmónico (Raya-González *et al.* 2016b), mientras que *Bacillus* sp. M496 ha mostrado capacidad de activar la ruta de señalización auxínica y el contenido de

ácido indolacético en plantas de *Arabidopsis* (Pérez-Flores, 2013), lo que sugiere que probablemente haya una interacción entre ambas rutas de señalización, mediadas por cada una de las bacterias inoculadas, sin embargo es necesario realizar análisis adicionales como la cuantificación de ácido jasmónico e indolacético, la expresión de genes marcadores de ambas rutas, para generar una teoría más robusta del mecanismo de acción de ambas bacterias sobre el rendimiento en la producción de fruto de plantas de fresa.

Una vez que se analizó el rendimiento en la producción de plantas de fresa por efecto de las bacterias, se decidió analizar la calidad de los frutos producidos, esto con la finalidad de observar si el incremento en el rendimiento por efecto de la inoculación de las bacterias no afecta la calidad de los frutos. La determinación de la calidad de los frutos fue realizada con base en los requerimientos de la categoría “US No.1” de máxima calidad, establecida por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2016), la cual establece lo siguiente: a) tamaño, como mínimo 19 mm de diámetro polar; b) acidez titulable, 0.8% como máximo; c) °brix, 0.7% como mínimo; d) pH, 3.5 como máximo. Observando que todos los requerimientos establecidos para la categoría de máxima calidad no fueron afectados, por lo tanto podemos concluir que el consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 incrementa el rendimiento en la producción de fruto sin afectar la calidad en plantas de fresa en condiciones de invernadero, demostrando así el potencial del consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 como bioinoculante para la mejora del rendimiento del cultivo de fresa.

Para poder atribuir el efecto del incremento del rendimiento en la producción de fruto en plantas de fresa a la inoculación bacteriana, es necesario asegurarse que las bacterias tuvieron la capacidad de colonizar y persistir en las plantas, para lo cual se analizaron

muestras de hojas de los diferentes tratamientos (control, UMCV2, M496 y UMCV2-M496) tomadas al azar, empleando la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, Lo Piccolo *et al.*, 2010), usando las sondas fluorescentes indicadas en la metodología. Las muestras fueron tomadas 5 meses después de la última inoculación con las bacterias. Observando que efectivamente las bacterias inoculadas de manera independiente y en consorcio fueron capaces de establecerse y persistir dentro de los tejidos de las plantas de fresa inoculadas, de esta manera, podemos atribuir que el incremento en el rendimiento fue debido a la presencia de las bacterias en las plantas de fresa.

11 RESUMEN DE RESULTADOS

- La bacteria *A. agilis* UMCV2 es capaz de incrementar la germinación de semillas de fresa vía VOCs, y promueve el crecimiento mediante la inoculación directa en la raíz de plantas de fresa en condiciones *in vitro*.
- El VOC producido por *A. agilis* UMCV2 dimetilhexadecilamina aumenta el porcentaje de germinación de semillas de fresa y el crecimiento vegetativo de plantas de fresa en condiciones *in vitro*.
- El consorcio *A. agilis* UMCV2-*Bacillus* sp. M496 potencia el rendimiento de la producción de fruto de plantas de fresa en condiciones de invernadero.
- La calidad de los frutos cosechados de todos los tratamientos cumplieron los estándares establecidos por USDA, estando dentro de la categoría máxima de calidad “US No.1”, con una tendencia a la mejora en los frutos provenientes de plantas inoculadas con las bacterias.
- Las bacterias *A. agilis* UMCV2 y *Bacillus* sp. M496 son capaces de colonizar endofíticamente y persistir en plantas de fresa en condiciones de invernadero.

12 PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la DMHDA en la producción de fresa.
- Analizar el efecto transgeneracional de la DMHDA en el crecimiento y resistencia a patógenos en plantas de fresa.
- Analizar el efecto de *A. agilis* UMCV2 y la DMHDA sobre las rutas de señalización del ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno en plantas de fresa.

13 BIBLIOGRAFÍA

Aviles-Garcia M.E., Flores-Cortez I., Hernández-Soberano C., Santoyo G., Valencia-Cantero E. (2016) La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. Revista Argentina de Microbiología (Doi: 10.1016/j.ram.2016.07.004).

Baca B.E., Elmerich C. (2003) Microbial production of plant hormones. Ed. Newton, Assositive and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacteria Associations. Kluwer Academic publishers. Netherlands. 31 pp.

Benhizia Y., Benhizia H., Benguedovar A., Muresu R., Giacomini M., Squartini A. (2004) Gamaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Systematic and Applied Microbiology 27:462-468.

Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M. (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science 17: 478-486.

Cambel R., Graves M. (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. P. 11-32. En: Lynch J. (Ed). The Rizosphere. Wiley Interscience Plublication. England. 458 pp.

Castulo-Rubio D.Y., Alejandro-Ramírez N.A., Orozco-Mosqueda M.C., Santoyo G., Macías-Rodríguez L.I., Valencia-Cantero E. (2015). Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (startegy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. Journal of Plant Growth Regulation 34:611-623.

Chaparro J.M., Sheflin A.M., Manter D.K., Vivanco J.M. (2012) Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fertil Soils* 48:489-499.

Cordier C., Lemoine M.C., Lemanceau P., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (2000) The beneficial rhizosphere: a necessary strategy for microplant production. *Acta Horticulturae* 530:259-268.

Esitken A., Yildiz H.E., Ercilsi S., Donmez M.F., Turan M., Gunes A. (2010) Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae* 124:62-66.

FAO. Food and Agricultural Organization. (2013) <http://www.fao.org>. (accesado en Julio de 2016).

Frairé-Cordero M.L., Yañez-Morales M.J., Meto-Angel D., Velázquez-Galvez G. (2003) Hongos parásitos en el fruto de fresa (*Fragaria x ananassa*) en postcosecha y algunos aspectos fisiológicos del fruto en anaquel. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:285-291.

Gaiero J.R., McCall C.A., Thompson K.A., Day N.J., Best A.S., Dunfield K.E. (2013) Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100:1738-1750

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* 43:895-914.

Hamdouni E.M., Lamarti A., Badoc A. (2001) *In vitro* germination of the achenes of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cvs Chandler and Tudla. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* 140:31-42.

Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60:579-598.

Hernández-Soberano C. (2013) Uso potencial de *Arthrobacter agilis* UMCV2 como agente de biocontrol de *Botrytis cinerea* en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 40 pp.

Huot B., Yao J., Montgomery B.L., Yang-He S. (2014) Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* 7:1267-1287.

Lo Piccolo S., Ferraro V., Alfonzo A., Settanni L., Ercolini D., Burruano S., Moschetti G. (2010) Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinífera* leaves by fluorescence *in situ* hybridization. *Annals of Microbiology* 60:161-167.

López-Bucio J., Millán-Godínez M., Méndez-Bravo A., Morquecho-Contreras A., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Pérez-Torres J., Pérez-Torres A., Higuchi M., Kakimoto T., Herrera-Estrella L. (2007) Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145:1703-1713.

Luna E., López A., Kooiman J., Ton J. (2014) Role of NPR1 and KYP in long-lasting induced resistance by β -aminobutyric acid. *Frontiers in Plant Science* 5:1-8.

Meier H., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.H. (1999) Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Systematic and Applied Microbiology* 22:186-196.

Méndez-Bravo A., Calderón-Vázquez C., Ibarra-LaClette E., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Herrera-Estrella L., López-Bucio J. (2010) La alcanida N-isobutil decanamida regula la expresión de genes de defensa en *Arabidopsis thaliana* y confiere resistencia contra hongos necrótofos a través de la ruta de señalización del ácido jasmónico. Ciencia Nicolaita Número Especial 1-10.

Mengel K., Kirkby E. (2001) Principles of plant nutrition. Fifth edition. Klumer Academic Press. Netherlands. 84-88 pp.

Miller A., Scheereus J., Erb P., Chandler C. (1992) Enhanced strawberry seed germination through *in vitro* culture of cut achenes. Journal of the American Society for Horticultural Science 117:313-316.

Orozco-Mosqueda M.C., Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L.I., Santoyo G., Flores-Cortez I., Alfaro-Cuevas R., Valencia-Cantero E. (2013) *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) *in vitro* via dimethylhexadecylamine emission. Plant Soil 362:51-66.

Pérez C.A., Rojas S.J., Helson V.M. (2009) Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. Revista Colombiana de Ciencia Animal 2:286-301.

Pérez-Flores X.P. (2013) Efecto de los compuestos volátiles de *Bacillus subtilis* M496 en la estimulación del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo dependiente de la vía auxínica. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, Mexico. 104 pp.

Pešaković M., Karaklajić-Stajić Ž., Milenković S., Mitrović O. (2013) Biofertilizer affecting yield related characteristics of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and soil micro-organisms. *Scientia Horticulturae* 150:238-243.

Pimentel-Equihua J.L., Velázquez-Machuca M.A. (2010) Manual técnico del cultivo de la fresa en el valle de Zamora-Jacona y Tangancícuaro, Michoacán. Primera ed. Consejo Nacional de la Fresa A.C., Instituto Politécnico Nacional. 69 pp.

Pirlak L., Köse M. (2009) Effects of plant growth promoting rizobacteria on yield and some fruit properties of strawberry. *Journal of Plant Nutrition* 32:1173-1184.

Raya-González J., Hernández-Abreu E., Valencia-Cantero E., López-Bucio J. (2016a) Microbial resources for improved crop productivity. En: Gupta V.K., Sharma G.D., Tuohy M.G., Gaur R. (Eds) *The Handbook of Microbial Bioresources*. CABI, Oxfordshire GB, 1-13pp.

Raya-González J., Velázquez-Becerra C., Barrera-Ortiz S., López-Bucio J., Valencia-Cantero E. (2016b) *N,N*-dimethyl hexadecylamine and related amines regulate root morphogenesis via jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* En prensa (Doi: 10.1007/s00709-016-1031-6).

Reinhold-Hurek B., Büniger W., Burbano C.S., Sabale M., Hurek T. (2015) Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annual Reviews Phytopathology* 53:403-424

Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.H. (1994) In situ probing of Grampositive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140:2849-2858

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2014) <http://www.gob.mx/siap/> (accesado en Julio de 2016).

Sturtz A.V., Chistine B.R., Matheson B.G., Novak J. (1997) Biodiversity of endophytic bacterial wich colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence of host growth. *Biology and Fertility of Soils* 25:13-19.

Trejo-Téllez L.I., Gómez-Merino F.C. (2014) Nutrient management in strawbewrry: effects on yield, quality and plant health. En: Malone N. (Ed) *Strawberries*. Nova Science Publishers Inc. 239-267 pp.

Turner T., James E., Poole P. (2013) The plant microbiome. *Genome Biology* 14:209.

USDA. United States Departament of Agriculture. (2016) www.usda.gov (accesado en Julio de 2016).

Valencia-Cantero E., Hernández-Calderón E., Velázquez-Becerra C., López-Meza J.E., Alfaro-Cuevas R., López-Bucio J. (2007) Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil* 291:263-273.

Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L.I., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Flores-Cortez I., Valencia-Cantero E. (2011) A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino containing lipid

modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. Plant Soil 339:329-340.

Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L.I., López-Bucio J., Flores-Cortez I., Santoyo G., Hernández-Soberano C., Valencia-Cantero E. (2013) The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. Protoplasma 250:1251-1262.

Vestberg M., Kukkonen S., Saari K., Parikka P., Huttunen J., Tainio L., Devos N., Weekers F., Kevers C., Thonart P., Lemoine M.C., Cordier C., Alabouvette C., Gianinazzi S. (2004) Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. Applied Soil Ecology 27:243-258.

Xue C., Penton R., Shen Z., Zhang R., Huang Q., Li R., Ruan Y., Shen Q. (2015) Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. Scientific Reports 5:11124.