

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSTGRADO**

**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**



**Inducción de resistencia sistémica en plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediada por rizobacterias aisladas de suelos áridos**

**TESIS**

**para optar el grado de Maestro en Ciencias con mención en  
Biotecnología Molecular**

**Autor: Bach. Cristian Daniel Asmat Ortega**

**Asesor: Ph. D. Eric Louis Mialhe Mattonier**

**Tumbes, Perú**

**2020**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POSTGRADO

### MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**Inducción de resistencia sistémica en plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediada por rizobacterias aisladas de suelos áridos**

**Tesis aprobada en forma y estilo por:**

**Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete (presidente).....**

**Mg. Milton Valladolid Ramos (secretario).....**

**Ph. D. Emmerik Motte Darricau (vocal).....**

**Tumbes, Perú**

**2020**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POST-GRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**Inducción de resistencia sistémica en plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediada por rizobacterias aisladas de suelos áridos**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su  
contenido y forma:**

**Br. CC.BB Cristian Daniel Asmat Ortega (Autor).....**

**Ph. D. Eric Luis Mialhe Matonnier (Asesor).....**

**Tumbes, Perú**

**2020**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
Licenciada  
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
Tumbes - Perú

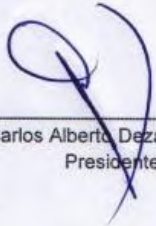
## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS


En Tumbes, a los veintisiete días del mes de febrero del año dos mil veinte, a las 08.00 horas, en EL AULA N° 01 EN LA ESCUELA DE POSGRADO DE LA UNTUMBES, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 041-2019/UNTUMBES-EPG-D; Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete - Presidente; Mg. Milton Valladolid Ramos - Secretario; Ph.D Emmerick Motte Darricau - Vocal y con Resolución Directoral N° 043-2020/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: **Inducción de resistencia sistémica en plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediada por rizobacterias aisladas de suelos áridos**, presentada por el estudiante del Programa de Maestría en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular Cristian Daniel Asmat Ortega, asesorado por el Ph.D. Eric Louis Mialhe Matonnier


Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 09.00 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 27 de febrero de 2020.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Mg. Milton Valladolid Ramos  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Ph.D Emmerick Motte Darricau  
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

## DEDICATORIA

A Victor y Noemi.

«Just never give up 'cause you don't know what can happen»

—Serena Williams en su discurso de la final del  
Abierto de Australia de 2015.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, a Victor y a Noemi.

A mi asesor Ph. D. Eric Mialhe.

A la Dra. Valeria Maia y a su equipo colaborador del CPQBA-Universidad Estadual de Campinas.

Al Dr. Michel Vincentz y a su equipo colaborador del CBMEG-Universidad Estadual de Campinas.

A la Blga. Rosita Chang y a la Q.F. Kirianova Godoy.

A demás familiares, amigos y colegas que colaboraron con esta investigación y a quienes el espacio en esta página no me hace justicia para mencionarlos en su totalidad.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	5
3.1. Aislamiento de rizobacterias de suelos áridos mediante técnicas microbiológicas tradicionales.....	6
3.2. Identificación molecular de los aislados rizobacterianos mediante análisis genómico dirigido al gen 16s ADNr.....	6
3.3. Material vegetal, condiciones de crecimiento e inoculación con aislados rizobacterianos.....	7
3.4. Análisis de expresión de genes de ISR en plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR.....	8
3.5. Identificación de metabolitos de ISR de los aislados rizobacterianos y de plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF MS.....	9
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	9
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	16
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	17
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	18
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Identificación de metabolitos de RSI detectados diferencialmente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF 48 horas después de la germinación en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con los aislados rizobacterianos (piperidina) y plántulas control (Xantosina monofosfato).....	15
--	----



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis filogenético de secuencias parciales de ADNr 16s de los aislados rizobacterianos evaluados.....	11
Figura 2. Análisis de expresión de genes de RSI mediante qRT-PCR a las 12, 24 y 48 horas después de la germinación en plántulas de Arabidopsis tratadas con los aislados rizobacterianos.....	13

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa de la zona de procedencia de las muestras de suelo rizosférico provistas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Trujillo. ....	25
Anexo 2. Descripción morfológica de los aislados rizobacterianos evaluados. Ca8 ( <i>Bacillus</i> sp.), Ca9 ( <i>B. firmus</i> ) y Ca12 ( <i>B. humi</i> ). ....	25
Anexo 3. Morfología celular de los aislados rizobacterianos evaluados. A. Ca8 ( <i>Bacillus</i> sp.), B. Ca9 ( <i>B. firmus</i> ) y C. Ca12 ( <i>B. humi</i> ). ....	26
Anexo 4. Tamaño de secuencia de ADNr 16s de cada aislado rizobacteriano evaluado y porcentaje de similitud con la(s) especie(s) más emparentada(s). ....	26
Anexo 5. Diseño experimental para el análisis transcriptómico mediante qRT-PCR en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con los aislados rizobacterianos a las 12, 24 y 48 h después de la germinación. ....	27
Anexo 6. Fenotipo de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con los aislados rizobacterianos y plántulas control a las 12, 24 y 48 h después de la germinación. ....	27
Anexo 7. Datos originales de diluciones seriadas para calcular la eficiencia del primer MYB72 en el análisis transcriptómico de las plantas tratadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR. $E = -(10^{(-1/Slope)} - 1)$ ....	28
Anexo 8. Gráfico y ecuación de la recta de la prueba de eficiencia del primer MYB72. ....	28
Anexo 9. Electroforesis de ARN extraído de cada muestra de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con los aislados rizobacterianos en gel de 1% de agarosa desnaturalizante conteniendo 37% de formaldehído. ....	29

Anexo 10. Datos originales para calcular niveles de expresión del gen WRK11 con respecto al gen de referencia AT1G13320 en el análisis transcriptómico de las plantas tratadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR.....	29
Anexo 11. Datos para la determinación de la Prueba T de Student para hallar diferencias significativas entre los promedios de cuantificación relativa del gen WRK11 de las plántulas tratadas con los aislados rizobacterianos y las plántulas control.....	30
Anexo 12. Datos originales para calcular niveles de expresión del gen MYB72 con respecto al gen de referencia AT1G13320 en el análisis transcriptómico de las plantas tratadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR.....	30
Anexo 13. Datos para la determinación de la Prueba T de Student para hallar diferencias significativas entre los promedios de cuantificación relativa del gen MYB72 de las plántulas tratadas con los aislados rizobacterianos y las plántulas control.....	31
Anexo 14. Diseño experimental para el análisis metabolómico mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en plántulas de Arabidopsis thaliana tratadas con los aislados rizobacterianos a las 48 h después de la germinación.	31
Anexo 15. Espectros de masas de: A. Piperidina, detectada sólo en muestras de plántulas tratadas con los aislados rizobacterianos y B. Xantosina monofosfato, detectada sólo en plántulas control.....	32

## RESUMEN

La agricultura es una de las principales actividades económicas de la sociedad; sin embargo, la producción de cultivos agrícolas se ve comprometida por la incidencia de patógenos. Una de las estrategias actuales para hacer frente a dicho problema es la utilización de rizobacterias inductoras de resistencia sistémica vegetal. En el presente trabajo se identificó molecularmente aislados rizobacterianos de suelos áridos Ca8, Ca9 y Ca12 mediante análisis genómico dirigido al gen 16s ADNr. Además, se determinó su capacidad para inducir resistencia sistémica al ser aplicados en consorcio en plántulas de *Arabidopsis thaliana* 12, 24 y 48 horas después de la germinación mediante análisis de expresión de los genes WRK11 y MYB72 por qRT-PCR. Adicionalmente, se determinó su capacidad para inducir resistencia sistémica al ser aplicados en consorcio en plántulas de *A. thaliana* 48 horas después de la germinación mediante identificación diferencial de metabolitos de resistencia sistémica por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Se identificó a los aislados Ca8, Ca9 y Ca12 como *Bacillus sp.*, *B. firmus* y *B. humi*. Hubo sobreexpresión de los genes WRK11 y MYB72 en las plántulas tratadas y se detectó la síntesis diferencial de piperidina y xantosina monofosfato en las plántulas tratadas 48 horas después de la germinación. Nosotros evidenciamos que los aislados rizobacterianos identificados indujeron resistencia sistémica a nivel transcriptómico y metabolómico en las plántulas tratadas.

**Palabras clave:** Rizobacterias, resistencia sistémica inducida, 16s ADNr, qRT-PCT, espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

## ABSTRACT

Agriculture is one of the main economic activities in human society; however, agricultural crop production is compromised by the incidence of pathogens. One of the current strategies to address this problem is the use of plant induced-systemic resistance rhizobacteria. In the present research, rhizobacterial isolates from arid soils Ca8, Ca9 and Ca12 were molecularly identified by genomic analysis targeting the 16s rDNA gene. Besides, its ability to induce systemic resistance was determined when applied in consortium in *Arabidopsis thaliana* seedlings 12, 24 and 48 hours after germination by gene expression analysis of the WRK11 and MYB72 genes by qRT-PCR. Additionally, its ability to induce systemic resistance was determined when applied in consortium in seedlings of *A. thaliana* 48 hours after germination by differential identification of systemic resistance metabolites by MALDI-TOF / TOF mass spectrometry. Isolates Ca8, Ca9 and Ca12 were identified as *Bacillus sp.*, *B. firmus* and *B. humi*. There was an overexpression of the WRK11 and MYB72 genes in the treated seedlings and the differential synthesis of piperidine and xanthosine monophosphate was detected in the treated seedlings 48 hours after germination. We show that the identified rhizobacterial isolates induced systemic resistance at a transcriptomic and metabolomic levels in the treated seedlings.

**Keywords:** Rhizobacteria, induced systemic resistance, 16s rDNA, qRT-PCT, MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

## I. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las principales actividades económicas de la sociedad humana. Sobre ésta recae la provisión de alimentos, vestimenta, y generación de materias primas utilizadas como fuente de energía; sin embargo, los cultivos agrícolas son severamente afectados por diversos tipos de estrés ambiental a nivel mundial, los cuales son una de las limitantes más críticas para el rendimiento agrícola. De esta manera, la estabilidad de la producción y seguridad alimentaria para la creciente población mundial se ve comprometida. Además, existe la necesidad de reducir la utilización de pesticidas y otros agroquímicos, cuyo uso continuo contamina el ambiente y disminuye la fertilidad de suelos (Aroca, 2012; Basu et al., 2016; Chavez et al., 2002; Choudhary & Varma, 2016a; Dhananjaya Pratap & Harikesh Bahadur, 2016a; Marasco et al., 2012; Shah & Wu, 2019).

Una de las principales causas de la disminución de la producción y rendimiento en cultivos agrícolas es la incidencia de plagas y enfermedades, las cuales requieren el uso de gran cantidad de agroquímicos para su control efectivo. Frente a este desafío, se está desarrollando tecnologías que promuevan el crecimiento vegetal e induzcan resistencia sistémica presentando riesgos mínimos de contaminación ambiental (Choudhary & Varma, 2016b).

La resistencia sistémica inducida vegetal (ISR) es un estado de inmunidad activado por agentes químicos o biológicos, el cual protege a las plantas frente al ataque de patógenos microbianos o de insectos fitófagos (Pieterse et al., 2014). Muchas especies microbianas principalmente de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma* son idóneas para la inducción de resistencia sistémica a través de la imprimación de semillas. La imprimación de semillas es una técnica que consiste en la inmersión de semillas en agua, en una solución osmótica o en una solución donde se incluyen componentes activos específicos durante un intervalo de tiempo determinado previo a la germinación (Dhananjaya Pratap & Harikesh Bahadur, 2016a). La imprimación de semillas con microorganismos (Bioimprimación), activa los mecanismos de ISR de manera temprana en el desarrollo vegetal, involucrando la síntesis de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). La síntesis de estas fitohormonas es activada por metabolitos inductores orgánicos volátiles o exopolisacáridos (Ryu et al., 2004; Wu et al., 2015) luego regulada por diversos factores de transcripción

(WRK11, WRK 70, MYB72, MYC2, etc.) y por la expresión de genes controlados por estas fitohormonas (Dhananjaya Pratap & Harikesh Bahadur, 2016a; Jiang et al., 2016; Lyons et al., 2013; Van der Ent et al., 2008).

Una de las estrategias más utilizadas para obtener microorganismos, principalmente bacterianos, activadores de la ISR consiste en aislarlos a partir de la rizósfera de un cultivo agrícola de interés. Un cultivo agrícola es considerado no sólo como un organismo sino como una comunidad compleja y bien estructurada, conformada por distintas poblaciones de microorganismos y un vegetal (Backer et al., 2018). Asimismo, los avances en tecnologías de biología molecular han favorecido la identificación de PGPB nativas específicas de determinados cultivos y ecosistemas, así como la evaluación de su interacción con las plantas y su potencial para activar la ISR (Bishnoi, 2015; Choudhary & Varma, 2016a; Dhananjaya Pratap & Harikesh Bahadur, 2016a).

Este efecto de inducción de la ISR por parte de las PGPR ha sido evidenciado en cultivos agrícolas como frijol, clavel, pepino, rabanito, tabaco, tomate y en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Sukweenadhi et al., 2015). *A. thaliana* es considerada como “planta modelo” en biología molecular, genética y fisiología vegetal debido a su pequeño tamaño y fácil manejo, su corto tiempo de desarrollo fenológico, su capacidad de autopolinización y número de semillas producidas (>1000 semillas por planta), su número reducido de cromosomas y su pequeño genoma completamente secuenciado (120 Mb). Todo lo anterior ha permitido que los científicos logren desarrollar numerosas técnicas moleculares, así como la obtención de conocimiento básico en procesos biológicos vegetales, el cual ha sido extrapolado hacia otras especies de interés agrícola (Cuesta & Cires, 2014; Gallardo et al., 2001; Mahalakshmi & Ortiz, 2001). Sin embargo, estudios de evaluación de la resistencia sistémica producida por rizobacterias nativas en etapas tempranas del desarrollo de plántulas de *A. thaliana* aún no son numerosos. El presente trabajo tiene como objetivo identificar aislados rizobacterianos de suelos áridos con capacidad de inducción de resistencia sistémica en la planta *A. thaliana*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

En la actualidad, para hacer frente a problemas de incidencia de patógenos en cultivos agrícolas, se ha priorizado el desarrollo de alternativas biotecnológicas que favorezcan el crecimiento y desarrollo vegetal bajo este tipo de condiciones adversas. Este desarrollo, el cual conduce a un consecuente incremento en la producción de dichos cultivos, se ha logrado debido a los aportes del conocimiento científico obtenido en áreas como biología vegetal, genómica, transcriptómica, metabolómica, entre otras (Dhananjaya Pratap & Harikesh Bahadur, 2016b).

Los patógenos de cultivos agrícolas son organismos que generan alteraciones en el metabolismo vegetal, al secretar enzimas, toxinas, fitoreguladores u otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento. De esta manera, causan enfermedades al crecer y multiplicarse en la planta, bloqueando el transporte sistémico de agua y de nutrientes. Los fitopatógenos pueden ser nemátodos, bacterias, virus, protozoarios, moluscos y hongos (Agrios, 2005).

La imprimación de semillas es una técnica que consiste en la inmersión de semillas en agua, en una solución osmótica o en una solución donde se incluyen componentes activos específicos durante un intervalo de tiempo determinado previo a la emergencia de la radícula (Dhananjaya Pratap & Harikesh Bahadur, 2016b). Las semillas se impriman con el fin de uniformizar, disminuir el tiempo y aumentar el porcentaje de germinación, favorecer la productividad, y reducir la cantidad de patógenos transmitidos por la semilla (Seed Dynamics Incorporated, 2017). La imprimación de semillas con microorganismos benéficos (bioimprimación) como, por ejemplo, rizobacterias, activa los mecanismos de resistencia sistémica capaces de promover el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés biótico, involucrando la síntesis de fitohormonas clave como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) así como los genes WRK11, WRK 70, MYB72, MYC2 (Choudhary & Varma, 2016c; Jiang et al., 2016; Singh et al., 2016).

Por todo ello, actualmente se está utilizando bioinoculantes rizobacterianos como alternativa ecológica que promueva el crecimiento vegetal mediante la reutilización de nutrientes, el control de plagas y patógenos, la reducción del impacto causado



por el estrés abiótico (Umesha et al., 2018). Los inoculantes rizobacterianos se definen como el producto final de una formulación que contiene un material de transporte: sólido, líquido o en gel, el cual debería ser económico y de fácil uso, y un agente rizobacteriano aislado o en consorcio. En otras palabras, el inoculante actúa como medio de transporte, que permite llevar a las bacterias desde el laboratorio o la fábrica hasta el vegetal que se encuentra en el invernadero o el campo (Bashan et al., 2014). Entre las ventajas del uso de estas tecnologías puede mencionarse que: son más inocuos que los agroquímicos debido a que no se acumulan en la cadena alimentaria, no necesitan aplicarse de forma repetida, casi no generan problemas de resistencia en los organismos a los que controlan, pueden integrarse fácilmente a los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades y si son desarrollados y utilizados de manera adecuada no se consideran perjudiciales para las poblaciones de microorganismos del suelo que habitan en la rizosfera (Tilak & Manoharachary, 2016) debido a que actúan regulando el balance hormonal y nutricional, solubilizando nutrientes que permitan su mejor absorción por parte de las plantas, reducen el impacto de las enfermedades mediante mecanismos como la antibiosis, la inducción de resistencia sistémica inducida y la competición por los nutrientes con otros microorganismos potencialmente perjudiciales (Vejan et al., 2016).

Los primeros géneros de rizobacterias reportadas como promotoras del crecimiento vegetal y controladores de enfermedades fueron *Bacillus* y *Pseudomonas*; además de ellos, se ha descubierto otros taxones involucrados, entre los cuales se puede mencionar a: *Acetobacter*, *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pasteuria*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Xanthomonas*, entre otras. En base a todos estos conocimientos, actualmente se están comercializando inoculantes rizobacterianos como: Rhizovital 42 (*Bacillus amyloliquefaciens*), Inoculant PP9 (*Pseudomonas putida*), Bio Shield (*Pseudomonas fluorescens*), Nitro Spira (*Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*), Ballad Plus (*Bacillus pumillus*), CataPult (*Bacillus*), gama XiteBio SoyRhizo (*Bradyrhizobium japonicum*), XiteBio PulseRhizo (*Rhizobium leguminosarum*), XiteBio Yield+ (*Bacillus firmus*), entre otros (Choudhary & Varma, 2016c; Dhananjaya Pratap & Harikesh Bahadur, 2016a).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Aislamiento de rizobacterias de suelos áridos mediante técnicas microbiológicas tradicionales

El aislamiento de tres rizobacterias (Ca 8, Ca9 y Ca 12) se llevó a cabo a partir de muestras de suelo rizosférico árido procedente de la región La Libertad (Ver Anexo 1) provistas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de La Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Las muestras de suelo obtenidas fueron tamizadas, mezcladas y homogenizadas hasta obtener alícuotas de 10 g, cada una de las cuales fue añadida a un matraz que contenía 90 ml de solución salina fisiológica estéril, el cual fue agitado hasta homogeneizar el contenido. Posteriormente, se extrajo una alícuota de 1 ml ( $10^{-1}$ ) que fue colocada en tubos de ensayo que contengan 9 ml de diluyente ( $10^{-2}$ ), este proceso se repitió sucesivamente hasta obtener un factor de dilución de  $10^{-5}$ . Luego, se obtuvo nuevas alícuotas de 0.1 ml (de cada tubo), estas fueron sembradas de manera independiente en placas de Petri con medios de cultivo TSA (Tryptic Soy Agar) y R2A (Reasoner's 2A Agar), las cuales fueron incubadas a 28 °C durante dos días, tiempo en el cual se observó la aparición de colonias bacterianas; luego, se aisló las colonias con diferente morfología hasta obtener cultivos puros corroborados mediante tinción de Gram. Finalmente, dichos cultivos fueron organizados y conservados en un cepario (Valencia Zapata, 2010).

#### 3.2. Identificación molecular de los aislados rizobacterianos mediante análisis genómico dirigido al gen 16s ADNr

Se extrajo ADN genómico a partir de cultivos puros de las cepas bacterianas aisladas utilizando el protocolo establecido por Van Soolingen *et al.*, (1991), posteriormente, el producto de extracción fue visualizado en un fotodocumentador después de realizar electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe en DMSO (Invitrogen) utilizando ADN de fago Lambda como estándar. La amplificación y secuenciación del gen 16s de ADNr a partir de ADN extraído de cada aislado se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Belgini *et al.*, (2014). El montaje de dos secuencias

parciales de dicho gen en una sola secuencia consenso (contig), fue realizado en el programa BioEdit (Hall, 1999). Luego, dichas secuencias consenso fueron comparadas con las secuencias de organismos tipo de la base de datos EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) y RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA <https://rdp.cme.msu.edu/>). Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) y su análisis filogenético fue realizado en el software MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Las distancias evolutivas fueron calculadas en base a las disimilitudes por pares de secuencias según el modelo de sustitución de ADN de Kimura (Kimura, 1980) y la reconstrucción filogenética se realizó en base al algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) con valores bootstrap calculados a partir de 1000 réplicas.

### **3.3. Material vegetal, condiciones de crecimiento e inoculación con aislados rizobacterianos**

Se utilizó plántulas de *Arabidopsis thaliana* de ecotipo Columbia-0 (Col-0) de 12, 24 y 48 horas de edad (tiempo luego de la germinación) obtenidas a partir de semillas inoculadas con los aislados rizobacterianos Ca8, Ca9 y Ca12 en consorcio (bioinprimación) y cultivadas en condiciones *in vitro* a una temperatura ambiente de 20°C y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

Primero, las semillas fueron esterilizadas por inmersión en etanol al 70% v/v durante 1 minuto y en hipoclorito de sodio al 10% v/v. Posteriormente, las semillas fueron estratificadas a 4 °C durante tres días en oscuridad. Luego, las semillas fueron lavadas diez veces con agua destilada estéril y sumergidas durante doce horas a temperatura ambiente en una solución de agua destilada estéril conteniendo el consorcio de los tres aislados rizobacterianos, previamente cultivados en caldo TSB (Tryptic Soy Broth), en una concentración de  $1.8 \times 10^8$  UFC/mL ( $OD_{600} = 0.6$ ). Finalmente, dichas semillas fueron lavadas diez veces con agua destilada estéril, secadas por doce horas en papel filtro y cultivadas en placas de Petri con medio Murashige and Skoog a mitad de concentración (MS/2) conteniendo 0.5 % de agar y 6% de glucosa con un pH de 5.5-6.0.

### **3.4. Análisis de expresión de genes de ISR en plántulas de *A. thaliana* inoculadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR**

Se tomó muestras de tejido vegetal de las plántulas inoculadas de 12, 24 y 48 horas de edad (Ver Anexo 5). Dichas muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta la extracción de ARN. Para la extracción de ARN, las muestras fueron trituradas con nitrógeno líquido en un mortero y pilón; luego, aproximadamente 80 mg por cada muestra fueron transferidos a un microtubo. El ARN total de cada muestra fue extraído siguiendo un protocolo utilizando LiCl (Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008). Luego, cada ARN total fue tratado con ADNasa TURBO DNA-free (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis de cada ADNc se llevó a cabo con el kit ImProm II Reverse Transcriptase (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previamente al análisis de expresión de genes, se diluyó cada muestra de ADNc a una concentración uniforme utilizando un espectrofotómetro NanoVue Plus™ (Biochrom). El análisis de expresión de genes se realizó utilizando el kit iTaq™ universal SYBR® Green (Bio-Rad) en un sistema de PCR en tiempo real CFX384™ (Bio-Rad) y mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2004). Los parámetros de la reacción de PCR fueron los siguientes: etapa inicial de 50 °C por 2 min y 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min (Vitor et al., 2013). Las secuencias de los primers de genes de ISR fueron: WRK11-F (GCATCGCAAGGTTTACAAA), WRK11-R (GCAATGGCACTTTCCGTAG), MYB72-F1 (CCGGGAAGAACTGACAACGA), MYB72-R1 (TGTGTGCATACACTCGCCTT), las cuales fueron seleccionadas a partir de referencias bibliográficas (Jiang et al., 2016; Van der Ent et al., 2008); adicionalmente se realizó una prueba de eficiencia de amplificación para el primer MYB72. En dicha prueba de eficiencia, así como en los análisis de expresión génica, el gen AT1G13320 fue utilizado como gen de referencia (Czechowski et al., 2005). Se utilizó una cantidad uniforme de 500 ng/mL de cada muestra de ARN extraído para el análisis de expresión génica. Las diferencias de expresión génica entre las muestras tratadas y el control fueron consideradas como estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba T de Student ( $t < 0.05$ ).

### **3.5. Identificación de metabolitos de ISR de los aislados rizobacterianos y de plántulas de *A. thaliana* inoculadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF MS**

La identificación de metabolitos producidos por los aislados rizobacterianos y por las plántulas inoculadas de *A. thaliana* de 48 horas de edad fue llevada a cabo en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System).

Primero, se obtuvo extractos metanólicos de cada muestra bacteriana (tres réplicas biológicas), de las plántulas (tres réplicas biológicas) y de las plántulas inoculadas (tres réplicas biológicas). Para ello, se pesó una cantidad 1X g de pellet bacteriano (en una concentración de  $1.8 \times 10^8$  UFC/mL) y de tejido vegetal secado en estufa al vacío a 40° C, luego se trituró cada muestra y se añadió 10X de volúmenes de metanol grado HPLC. Cada muestra fue sonicada durante 30 minutos y, enseguida, filtrada. El líquido filtrado fue concentrado empleando una estufa al vacío a 40° C y almacenada a 4° C.

Posteriormente, se preparó y colocó una alícuota de cada muestra en una placa para LC-MALDI-TOF (Blank opti toff 123 mm x81 mm) de 384 pocillos para su procesamiento en el espectrómetro de masas. Para ello, se mezcló 1 uL de cada muestra con 9 uL de matriz. La matriz, a su vez, constó de una mezcla de ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB) 15 mg/mL y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), ambos contenidos en una solución de metanol/agua grado HPLC en proporción 1:1. Se tomó 1uL de la mezcla muestra-matriz y fue colocada en la placa por triplicado.

Para la obtención de datos de lectura de muestras, se configuró los siguientes parámetros en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF: modo reflectron positivo en un rango de masas de 80-2500 Da, en modo MS con una intensidad de láser de 5900 y tasa de repetición de 412 Hz, asimismo en modo MS<sup>2</sup> empleando reflectron positivo 2KV, con celda de colisión, tasa de repetición de láser de 1010 Hz e intensidad láser de 6500. Para el procesamiento bioinformático, la obtención y procesamiento de espectros de masas se realizó utilizando los programas MALDI TOF/TOF

(<https://sciex.com/Documents/release%20notes/TOFTOF-Imaging-Acquisition-Software-Release-Notes.pdf>). Luego de la adquisición de espectros, estos fueron sometidos a procesos posteriores de suavizado de curva según algoritmo de Savitsky Golay, corrección de base y normalización. Luego, se realizó la eliminación de interferentes; para ello, se convirtió los datos obtenidos en formato T2d a mzml utilizando el software T2d Converter y se les procesó posteriormente con el software mmass (<http://www.mmass.org/>). Finalmente, se identificó los metabolitos empleando el análisis MS/MS y del patrón de fragmentación obtenido mediante el programa MS-FINDER 2.0 (Lai et al., 2018) con una tolerancia de masas de  $\pm 0.05$  Da.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación molecular mediante análisis filogenético de las secuencias parciales del gen 16s ADNr de los aislados rizobacterianos Ca8, Ca9 y Ca12 evaluados, muestra que éstos pertenecen al género *Bacillus*. Todos los aislados presentan una morfología de colonia similar (Ver Anexo 2) y, efectivamente de acuerdo con la descripción de su género, presentan una morfología celular de bacilos grampositivos (Ver Anexo 3). Ca8 corresponde a *Bacillus sp.*, Ca9 fue identificado como *B. firmus* y Ca12, como *B. humi* (Fig. 1). En el caso del aislado rizobacteriano Ca8, el análisis filogenético de secuencias de ADNr 16s no fue suficiente para determinar el taxón a nivel de especie al cual este pertenece. Esto puede deberse a que la región de ADNr 16s de este aislado está muy conservada con respecto a otras especies del género *Bacillus*; por lo tanto es sugerible basarse en otros genes alternativos como por ejemplo el gen Gyr B (Gyrase Subunidad B) para la identificación u análisis taxonómico de miembros del género *Bacillus* (Wang et al., 2007). En el caso de los aislados Ca9 y Ca12, los tamaños de secuencias del ADNr 16s junto con el análisis filogenético llevado a cabo fueron suficientes para identificarlos a nivel de especie (Ver Anexo 4).

Se ha identificado y reportado ampliamente a especies del género *Bacillus* como inductores de resistencia sistémica vegetal tales como: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, and *B. sphaericus* (Kloepper et al., 2004; Naveed et al., 2014; Ryu et al., 2004). Sin embargo, a la fecha, no conocemos acerca de algún reporte específico de *B. firmus* como inductor de resistencia sistémica, pero sí como promotor de crecimiento vegetal actuando como agente biocontrolador principalmente de nemátodos (Mendis et al., 2018). Asimismo, no se conoce de un reporte de *B. humi* como activador de resistencia sistémica pero sí como promotor de crecimiento vegetal aislado de suelos ácidos (Yadav et al., 2011). Es posible que, a nivel nacional, los aislados rizobacterianos identificados en el presente estudio sean los primeros en reportarse como activadores de resistencia sistémica cuando son aplicados en consorcio.

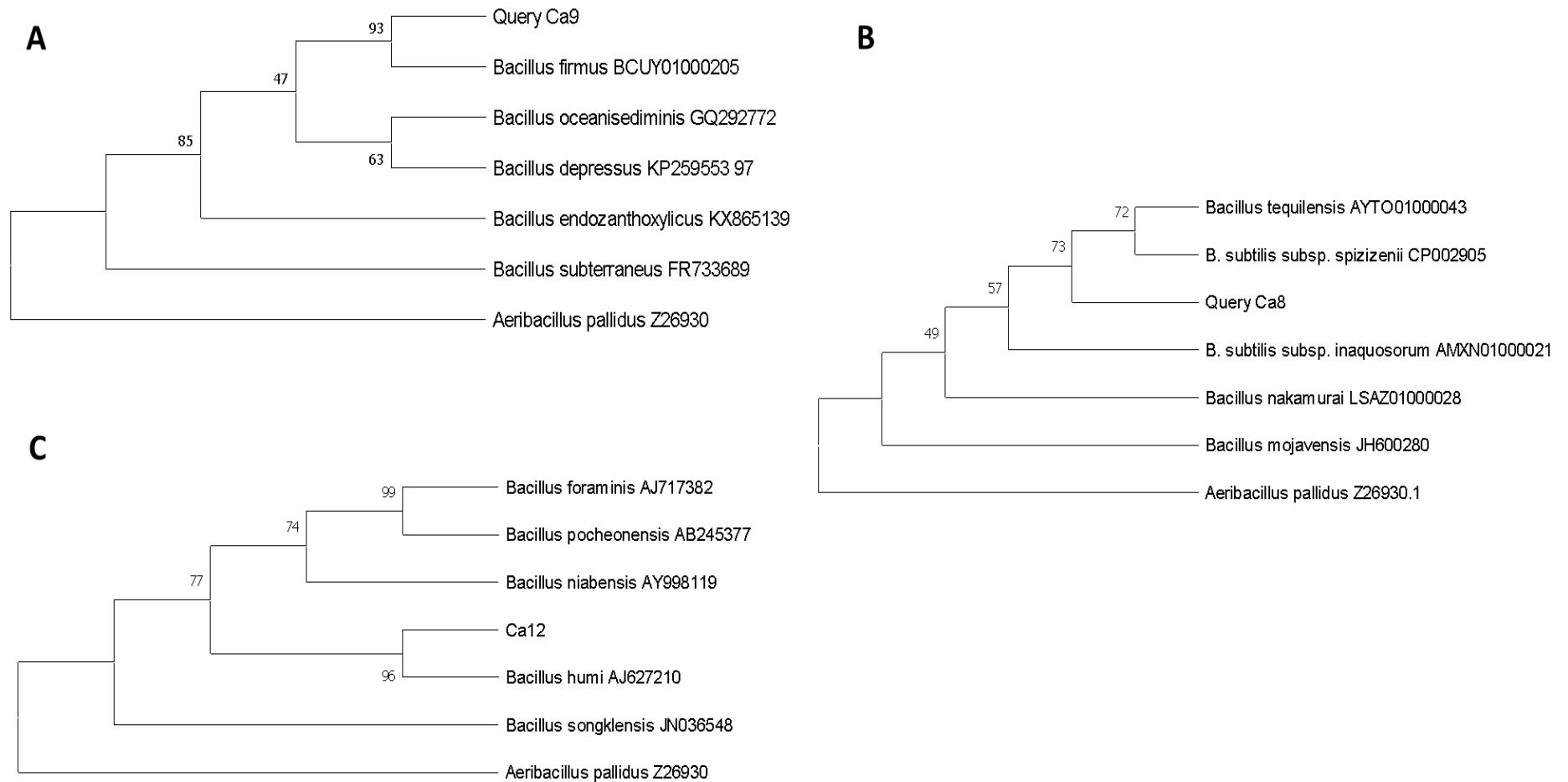


Figura 1. Análisis filogenético de secuencias parciales de ADNr 16s de los aislados rizobacterianos evaluados. (A) El aislado Ca 8 fue identificado como *Bacillus* sp. (B) El aislado Ca 9 fue identificado como *Bacillus firmus*. (C) El aislado Ca 12 fue identificado como *Bacillus humi*. *Aeribacillus pallidus* fue utilizado como grupo externo.



El análisis transcritoómico para la evaluación de expresión de los genes de RSI WRK11 y MYB72 en plántulas tratadas con los aislados rizobacterianos a las 12, 24 y 48 h mostró que existe una sobreexpresión estadísticamente significativa de ambos genes a las 48 horas después de la germinación. La sobreexpresión del gen WRK11 a las 48 horas después de la germinación fue de aproximadamente 60 veces más con respecto al control, y la sobreexpresión del gen MYB72, en las mismas condiciones, fue de aproximadamente 3.5 veces más con respecto al control (Fig. 2). Cabe mencionar que el tratamiento con los aislados rizobacterianos ralentizó, mas no detuvo, el proceso de germinación y se observó que no afecto el posterior desarrollo normal de las plántulas evaluadas. Se observó que a las 12 horas después de la germinación ya se había formado la radícula de aproximadamente 3mm; a las 24 horas, en las plántulas control ya se habían formado las hojas cotiledonarias y, a las 48 horas, tanto en las plántulas control como tratadas se observó la formación de pelos absorbentes (Ver Anexo 6). Esta ralentización en la germinación en las plántulas tratadas puede explicarse el hecho de que la planta destina toda su maquinaria metabólica, principalmente energética, hacia a procesos metabólicos propios de la interacción entre planta microorganismo en mayor medida que hacía procesos de desarrollo y crecimiento vegetal en condiciones normales (Boyd et al., 2013; Imam et al., 2016; Pieterse et al., 2014).

Los genes WRK11 y MYB72 ambos codifican a proteínas que desencadenan el papel de factores de transcripción. Éstas están implicadas en la activación de resistencia sistémica vegetal como producto de la interacción entre planta y microorganismo (Jiang et al., 2016; Van der Ent et al., 2008). WRK11 pertenece a la familia de proteínas WRK, la cual está caracterizada por su sitio de unión al ADN altamente conservado "WRKYGQK", y también por estar implicada en mecanismos de defensa vegetal y respuestas frente a diversos tipos de estrés y a patógenos. Más aún, el perfil transcritoómico de plántas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con ácido salicílico, un activador de resistencia sistémica, revela que, en dichas condiciones, 49 de 72 genes WRK estudiados se expresan diferencialmente . Específicamente, WRK11 actua como un regulador negativo en la elicitación de resistencia sistémica, al activar las vías de señalización del la fitohormona ácido jasmónico (JA) (Jiang et al., 2016). Al ser un regulador negativo, lo resultados de sobreexpresión del gen WRK11 determinados en el presente estudio no están en

concordancia con lo descrito por Jiang et al., 2016. Ello permite inferir que posiblemente, al menos no se está activando la vía de señalización del JA; además, se debe resaltar que los niveles de expresión descritos en la referencia mencionada fueron determinados en plántulas de seis semanas de edad y no en plántulas de desarrollo temprano como en el presente estudio.

El gen MYB72 pertenece a una extensa familia de proteínas, de las cuáles 125 han sido identificadas en *A. thaliana* y de muchas de ellas aún no se conoce su función. No obstante, se ha reportado que el gen MYB72 es esencial para la activación de la resistencia sistémica vegetal en etapas tempranas de desarrollo en plántulas de *A. thaliana* de tres semanas de edad. Es decir, se ha reportado que luego de la colonización de bacterias en raíces, la sobreexpresión de MYB72 está relacionada con la activación de las vías de señalización mediada por JA y etileno (ET) para, consecuentemente, activar un estado de resistencia sistémica frente a un amplio espectro de patógenos (Van der Ent et al., 2008). Todo lo anterior indicaría que, en las plántulas evaluadas en el presente estudio, posiblemente se ha activado la resistencia sistémica con mayor probabilidad mediante la vía del ET que mediante la vía del JA.

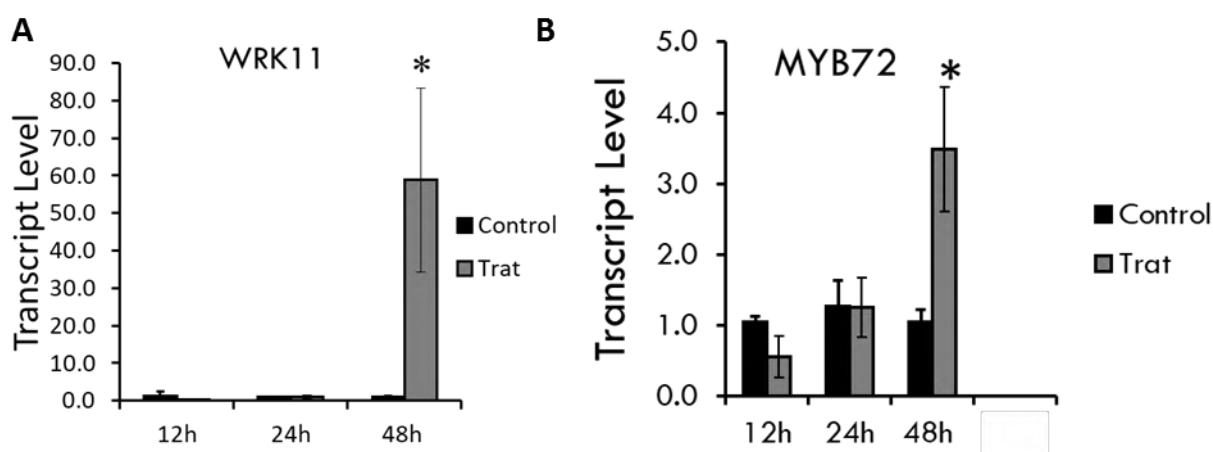


Figura 2. Análisis de expresión de genes de RSI mediante qRT-PCR a las 12, 24 y 48 horas después de la germinación en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con los aislados rizobacterianos. (A) Niveles de expresión del gen WRK11. (B) Niveles de expresión del gen MYB72. El gen AT1G13320 fue utilizado como gen de referencia (\*) Indica diferencia significativa con un valor  $t < 0.05$  de acuerdo con la prueba t de Student.

El análisis metabolómico realizado en plántulas de *A. thaliana* 48 horas de edad, detectó la síntesis diferencial de dos metabolitos implicados en RSI: Piperidina y Xantosina monofosfato. Además, cabe resaltar que, ninguno de los metabolitos

vegetales de RSI fue detectado en las muestras procedentes de los aislados rizobacterianos (Tabla 1). Adicionalmente, se conoce que las rizobacterias activadoras de RSI sintetizan metabolitos característicos como por ejemplo lipopolisacáridos (LPS), ácido salicílico (SA), sideróforos, lipopéptidos cíclicos, N-acil homoserina lactona (AHL, acetoina, 2,3 butanediol, entre otros (Arbona & Gómez-Cadenas, 2016; Choudhary & Varma, 2016a; Kloepper et al., 2004). Sin embargo, en la presente investigación, ningún metabolito bacteriano característico de RSI fue detectado.

Asimismo, una gran diversidad de metabolitos vegetales de RSI se han reportado en *A. thaliana*, como por ejemplo, alcaloides, flavonas, ácido piperólico, aminoácidos, poliaminas, azúcares, e intermediarios del ciclo del ácido cítrico, entre otros (Arbona & Gómez-Cadenas, 2016; Borges & Sandalio, 2015; Brotman et al., 2012; Návarová et al., 2012).

La piperidina es un componente del ácido piperólico (ácido carboxílico 2-piperidina), el cual, en *A. thaliana* aumenta las respuestas frente a enfermedades e induce resistencia sistémica mediante la vía de señalización del SA (Návarová et al., 2012). La detección de piperidina sólo en las plántulas de *A. thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos está en concordancia con lo reportado por Návarová et al., 2012 y sugiere que posiblemente la RSI se ha activado mediante la vía de señalización del SA.

La xantosina monofosfato, es un monofosfato de ribonucleósido, producto del catabolismo de las purinas, y se ha descrito como un metabolito implicado en la activación de mecanismos de defensa vegetal, el cual se acumula luego de la interacción de plántulas de *A. thaliana* de cinco semanas de edad con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* (Pastor et al., 2014). Esto es opuesto a los resultados de la presente investigación y no permitiría atribuir un rol específico en RSI a la ausencia de xantosina monofosfato en las plántulas tratadas con los aislados rizobacterianos en etapas tempranas de desarrollo. Esta discordancia podría deberse a las diferentes condiciones con las que se trabajó: el en el primer caso se utilizó una bacteria tanto de diferente género como patógena en lugar de una rizobacteria benéfica, además del hecho de que se trabajó con plantas de *A. thaliana* de cinco semanas de edad.

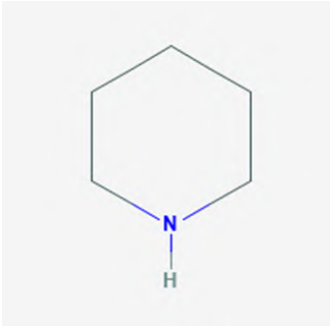
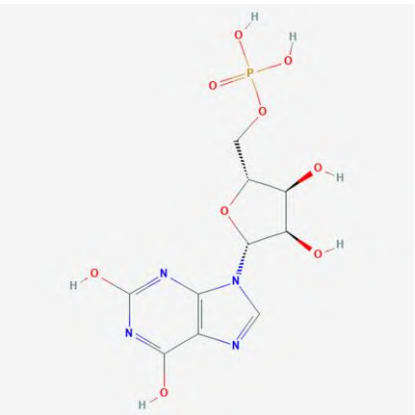
IÓN PARENTAL MONOISOTÓPICO [M+H] <sup>+</sup>	IONES FRAGMENTO	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUCTURA MOLECULAR	InChIKey	NOMBRE DEL COMPUESTO
86.0555	81.194 57.256 43.2165	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N		NQRYJNQNLNOLGT- UHFFFAOYSA-N	Piperidina
365.056	345.1552 203.1463 39.0035	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub>		DCTLYFZHFGENCW- UUOKFMHZSA-N	Xantosina monofosfato

Tabla 1 . Identificación de metabolitos de RSI detectados diferencialmente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF 48 horas después de la germinación en plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos (piperidina) y plántulas control (Xantosina monofosfato). Ninguno de los dos compuestos mencionados fue detectado en las muestras procedentes de bacterias.

## V. CONCLUSIONES

1. Se identificó molecularmente a las rizobacterias Ca8, Ca9 y Ca12 como *Bacillus* sp., *B. firmus* y *B. humi*.
2. Se indujo la activación de resistencia sistémica a nivel transcriptómico en plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos 48 horas después de la germinación.
3. Se indujo la activación de resistencia sistémica a nivel metabolómico en plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos 48 horas después de la germinación.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios complementarios transcriptómicos o metabolómicos en plantas de interés agrícola con los aislados rizobacterianos utilizados para extrapolar los conocimientos obtenidos en la planta modelo *A. thaliana*.
2. Se sugiere el acoplamiento de técnicas complementarias de HPLC masas o CG masas para la detección precisa de metabolitos vegetales de RSI.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. In *Plant Pathology: Fifth Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>
- Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2016). Metabolomics of Disease Resistance in Crops. *Current Issues in Molecular Biology*, 19, 13–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26364233>
- Aroca, R. (2012). *Plant Responses to Drought Stress* (R. Aroca (Ed.)). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bashan, Y., De-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5(0), 1554. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7678.1>
- Belgini, D. R. B., Dias, R. S., Siqueira, V. M., Valadares, L. A. B., Albanese, J. M., Souza, R. S., Torres, A. P. R., Sousa, M. P., Silva, C. C., De Paula, S. O., & Oliveira, V. M. (2014). Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(10), 2689–2700. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1693-1>
- Bishnoi, U. (2015). PGPR Interaction. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 75, pp. 81–113). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.09.006>

- Borges, A. A., & Sandalio, L. M. (2015). Induced resistance for plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00109>
- Boyd, L. A., Ridout, C., O'Sullivan, D. M., Leach, J. E., & Leung, H. (2013). Plant-pathogen interactions: Disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, 29(4), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>
- Brotman, Y., Lisec, J., Méret, M., Chet, I., Willmitzer, L., & Viterbo, A. (2012). Transcript and metabolite analysis of the Trichoderma-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*, 158(1), 139–146. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052621-0>
- Chavez, M. ., Pererira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., Carvalho, I., Faria, T., & Pinheiro, C. (2002). How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany*, 89(7), 907–916. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf105>
- Choudhary, D. K., & Varma, A. (2016a). *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants* (D. K. Choudhary & A. Varma (Eds.)). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2>
- Choudhary, D. K., & Varma, A. (Eds.). (2016b). *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2>
- Choudhary, D. K., & Varma, A. (2016c). *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants* (D. K. Choudhary & A. Varma (Eds.)). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2>
- Cuesta, C., & Cires, E. (2014). *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en Biología. *Boletín de Ciencias Naturales Del R.I.D.E.A*, 52, 175–178.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W.-R. (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>



- Dhananjaya Pratap, S., & Harikesh Bahadur, S. (2016a). *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (D. P. Singh, H. B. Singh, & R. Prabha (Eds.); Vol. 1). Springer India. <http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2647-5>
- Dhananjaya Pratap, S., & Harikesh Bahadur, S. (2016b). *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (D. P. Singh, H. B. Singh, & R. Prabha (Eds.); Vol. 2). Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4>
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., & Job, D. (2001). Proteomic analysis of arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, *126*(2), 835–848. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.835>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95–98. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Imam, J., Singh, P. K., & Shukla, P. (2016). Plant microbe interactions in post genomic era: Perspectives and applications. *Frontiers in Microbiology*, *7*(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01488>
- Jiang, C. H., Huang, Z. Y., Xie, P., Gu, C., Li, K., Wang, D. C., Yu, Y. Y., Fan, Z. H., Wang, C. J., Wang, Y. P., Guo, Y. H., & Guo, J. H. (2016). Transcription factors WRKY70 and WRKY11 served as regulators in rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156-induced systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *67*(1), 157–174. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv445>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, *94*(11), 1259–1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., Ogiwara, A., Meissen, J., Showalter, M., Takeuchi, K., Kind, T., Beal, P., Arita, M., & Fiehn, O. (2018). Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods*, *15*(1), 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Lyons, R., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: A comparative overview. *Plant Cell Reports*, *32*(6), 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1400-y>
- Mahalakshmi, V., & Ortiz, R. (2001). Plant genomics and agriculture: From model organisms to crops, the role of data mining for gene discovery. *Electronic Journal of Biotechnology*, *4*(3). <https://doi.org/10.2225/vol4-issue3-fulltext-5>
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A. F., El-Behairy, U. A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2012). A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS ONE*, *7*(10), e48479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479>
- Mendis, H. C., Thomas, V. P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J.-T., Waidyarathne, P., Kloepper, J., & De La Fuente, L. (2018). Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLOS ONE*, *13*(2), e0193119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193119>
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A.-C., & Zeier, J. (2012). Pipecolic Acid, an Endogenous Mediator of Defense Amplification and Priming, Is a Critical Regulator of Inducible Plant Immunity. *The Plant Cell*, *24*(12), 5123–5141. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103564>
- Naveed, M., Mubeen, S., Khan, S., Ahmed, I., Khalid, N., Suleria, H. A. R., Bano,

- A., & Mumtaz, A. S. (2014). Identification and characterization of rhizospheric microbial diversity by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 985–993. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300031>
- Oñate-Sánchez, L., & Vicente-Carbajosa, J. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-93>
- Pastor, V., Balmer, A., Gamir, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00295>
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In S. A. Bustin (Ed.), *A-Z of quantitative PCR* (pp. 87–112). International University Line (IUL).
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Seed Dynamics Incorporated. (2017). *Techniques: Priming*. Data Sheet. <http://seeddynamics.com/seedtechnology/techniques/priming/>
- Shah, F., & Wu, W. (2019). Soil and Crop Management Strategies to Ensure Higher Crop Productivity within Sustainable Environments. *Sustainability*, 11(5), 1485. <https://doi.org/10.3390/su11051485>
- Singh, D. P., Singh, H. B., & Prabha, R. (Eds.). (2016). *Microbial Inoculants in*

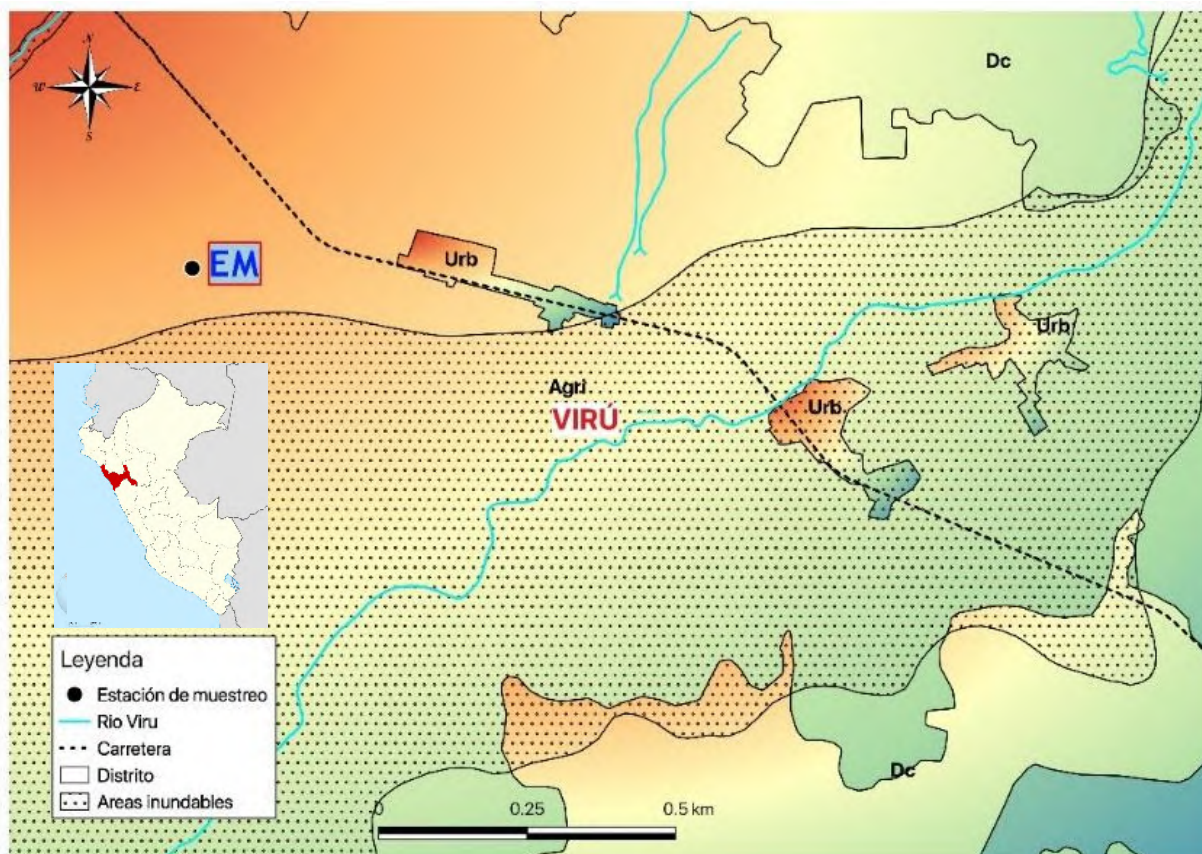
*Sustainable Agricultural Productivity*. Springer India.  
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5>

- Sukweenadhi, J., Kim, Y.-J., Choi, E.-S., Koh, S.-C., Lee, S.-W., Kim, Y.-J., & Yang, D. C. (2015). *Paenibacillus yonginensis* DCY84T induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought, and salt stress. *Microbiological Research*, *172*, 7–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.007>
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *25*(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Tilak, K. V. B. R., & Manoharachary, C. (2016). Eco-friendly Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Crop Improvement. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (pp. 297–309). Springer India.  
[https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_17)
- Umesha, S., K. Singh, P., & P. Singh, R. (2018). Microbial Biotechnology and Sustainable Agriculture. In *Biotechnology for Sustainable Agriculture* (pp. 185–205). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812160-3.00006-4>
- Valencia Zapata, H. (2010). *Manual de prácticas de microbiología del suelo* (Universidad Nacional de Colombia (Ed.)). Universidad Nacional de Colombia.
- Van der Ent, S., Verhagen, B. W. M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M. G., Pel, M. J. C., Joosten, R. G., Proveniers, M. C. G., Van Loon, L. C., Ton, J., & Pieterse, C. M. J. (2008). MYB72 Is Required in Early Signaling Steps of Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *146*(3), 1293–1304. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113829>
- van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R., & van Embden, J. D. (1991). Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*(11), 2578–2586.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685494>

- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, 21(5), 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Vitor, S. C., Duarte, G. T., Saviani, E. E., Vincentz, M. G. A., Oliveira, H. C., & Salgado, I. (2013). Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1906-0>
- Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J., & Kasai, H. (2007). Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 57(8), 1846–1850. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64685-0>
- Wu, L., Wu, H. J., Qiao, J., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>
- Yadav, S., Kaushik, R., Saxena, A. K., & Arora, D. K. (2011). Diversity and phylogeny of plant growth-promoting bacilli from moderately acidic soil. *Journal of Basic Microbiology*, 51(1), 98–106. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000098>

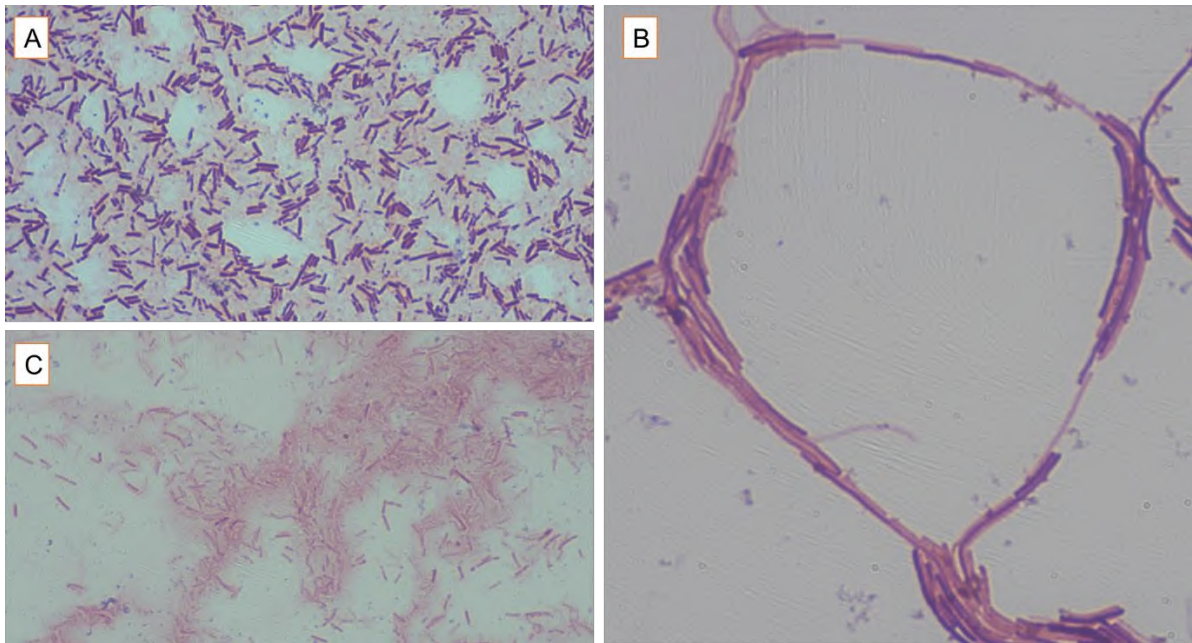
## VIII. ANEXOS



Anexo 1. Mapa de la zona de procedencia de las muestras de suelo rizosférico provistas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Trujillo. El mapa fue realizado en el Software QGIS versión 3.10.2. DC Desierto costero, Urb Zona urbana, Agri Zona agrícola, EM Estación de Muestreo.

<b>Aislado rizobacteriano</b>	<b>Morfología de las colonias</b>	<b>Morfología celular</b>
<b>Ca 8</b>	Blanquecinas y de borde irregular	Bacilos grampositivos
<b>Ca 9</b>	De color crema y de borde irregular	Bacilos grampositivos
<b>Ca 12</b>	Traslúcidas y de borde regular	Bacilos grampositivos

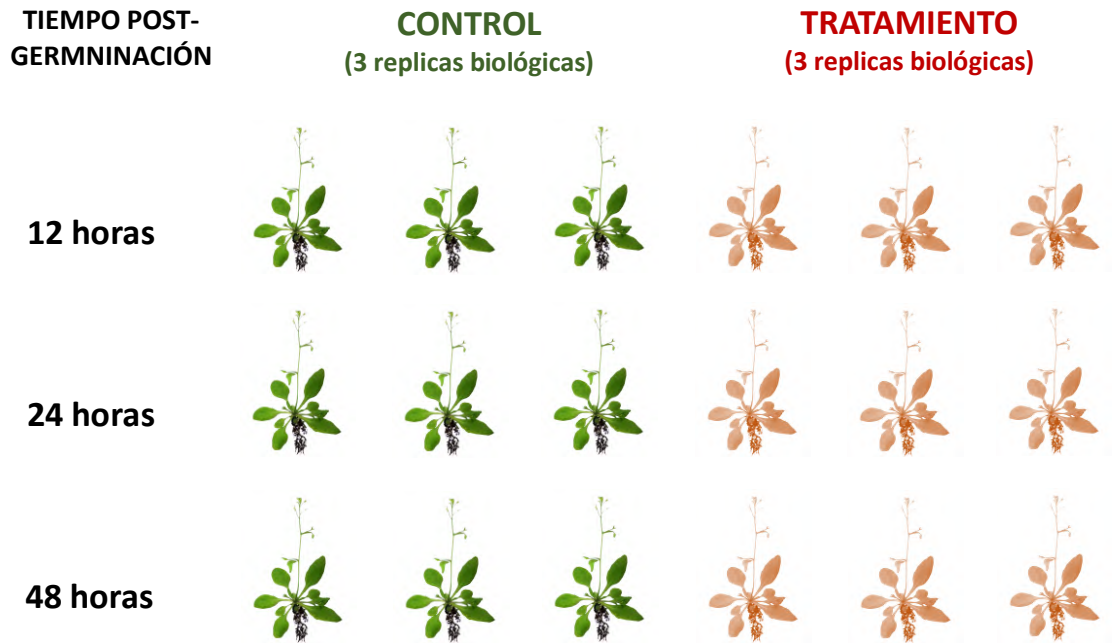
Anexo 2. Descripción morfológica de los aislados rizobacterianos evaluados. Ca8 (*Bacillus* sp.), Ca9 (*B. firmus*) y Ca12 (*B. humi*).



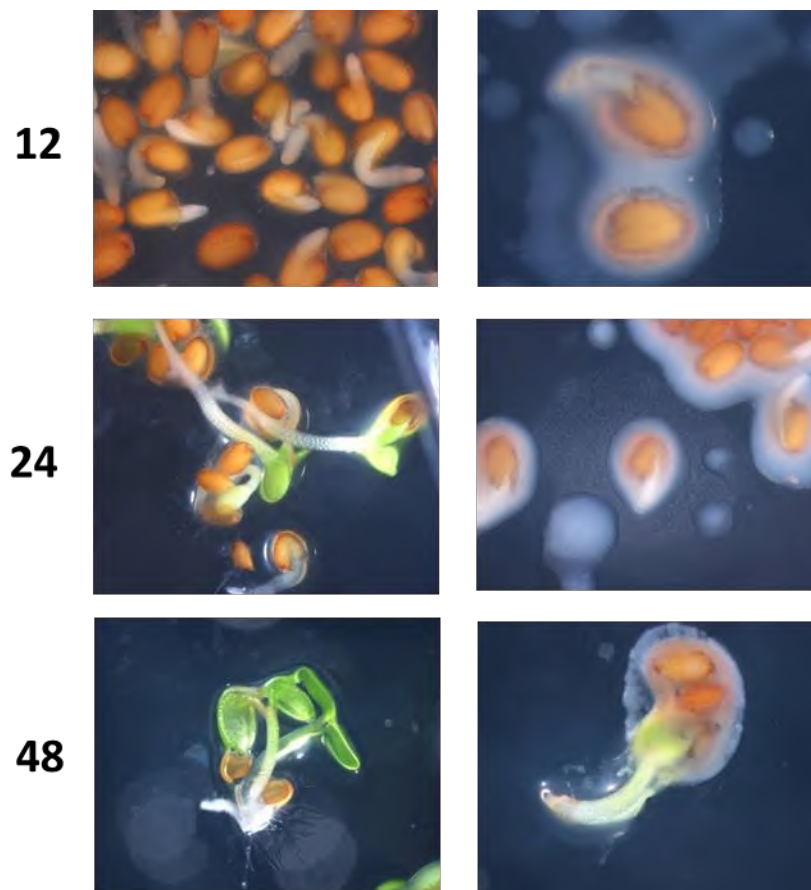
Anexo 3. Morfología celular de los aislados rizobacterianos evaluados. A. Ca8 (*Bacillus* sp.), B. Ca9 (*B. firmus*) y C. Ca12 (*B. humi*).

Aislado rizobacteriano	Tamaño de secuencia ADNr 16s	% de Similitud	con especie más emparentada
Ca 8	831 pb	100	<i>Bacillus subtilis</i> AJ276351.1
		100	<i>B. tequilensis</i> HQ223107.1
Ca 9	800 pb	95.89	<i>B. firmus</i> D16268.1
Ca 12	985 pb	97.15	<i>B. humi</i> AJ726210.1

Anexo 4. Tamaño de secuencia de ADNr 16s de cada aislado rizobacteriano evaluado y porcentaje de similitud con la(s) especie(s) más emparentada(s). Ca8 (*Bacillus* sp.), Ca9 (*B. firmus*) y Ca12 (*B. humi*).



Anexo 5. Diseño experimental para el análisis transcriptómico mediante qRT-PCR en plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos a las 12, 24 y 48 h después de la germinación.

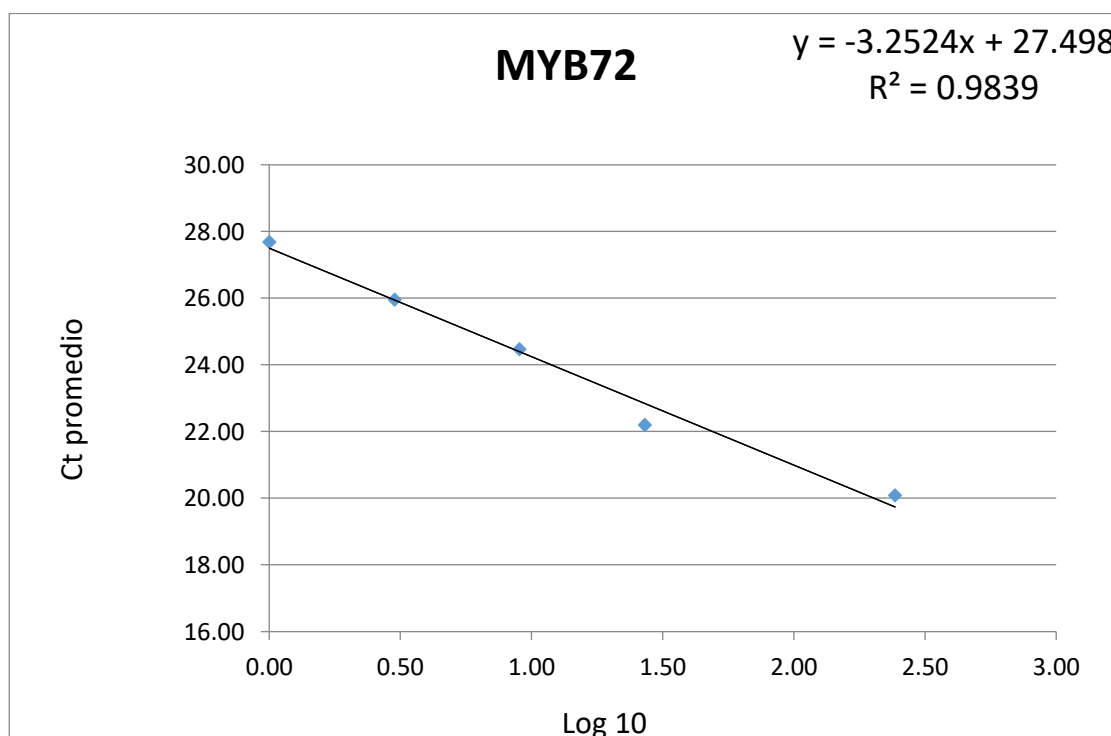


Anexo 6. Fenotipo de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos y plántulas control a las 12, 24 y 48 h después de la germinación.

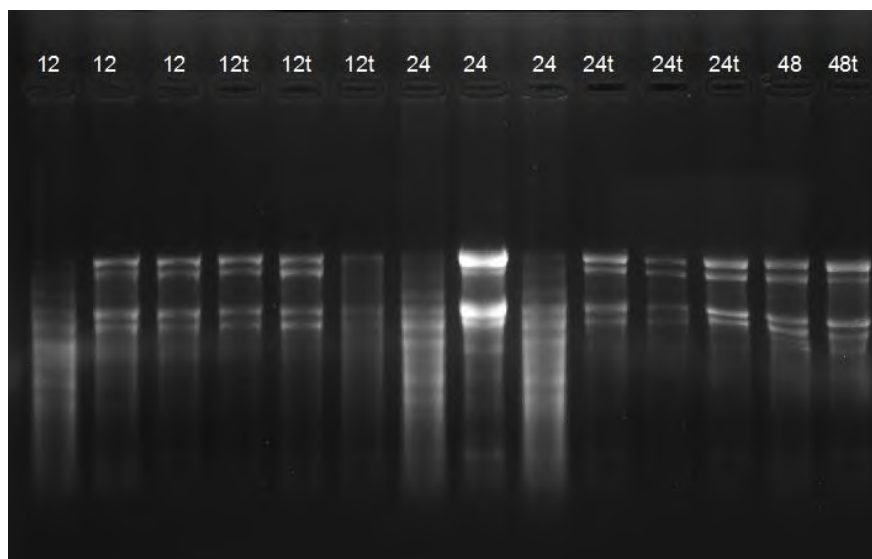


MUESTRA	Ct	Cts Promedio	Log 10	Slope	Eficiencia (%)
Dilución 243	20.13	20.09	2.39		
243	20.05				
Dilución 81	-	-	-		
81	-				
Dilución 27	22.13	22.20	1.43		
27	22.26				
Dilución 9	24.37	24.48	0.95	-3.2524	103
9	24.58				
Dilución 3	26.01	25.96	0.48		
3	25.91				
Dilución 1	27.77	27.69	0.00		
1	27.62				

Anexo 7. Datos originales de diluciones seriadas para calcular la eficiencia del primer MYB72 en el análisis transcriptómico de las plantas tratadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR.  $E = (10^{(-1/Slope)} - 1)$



Anexo 8. Gráfico y ecuación de la recta de la prueba de eficiencia de amplificación del primer MYB72.



Anexo 9. Electroforesis de ARN extraído de cada muestra de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos en gel de 1% de agarosa desnaturalizante conteniendo 37% de formaldehído. 12. Muestra de ARN de plántulas control extraída a las 12h después de la germinación después de la germinación. 12t. Muestra de ARN de plántulas tratadas extraída a las 12h después de la germinación. 24. Muestra de ARN de plántulas control extraída a las 24h después de la germinación. 24t. Muestra de ARN de plántulas tratadas extraída a las 24h después de la germinación. 48. Muestra de ARN de plántulas control extraída a las 48h después de la germinación. 48t. Muestra de ARN de plántulas tratadas extraída a las 48h después de la germinación.

	dCt	Media dCt	ddCt	2 <sup>ddCt</sup> / RQ	Log2		
	AT1G13320	WRK11	WRK11	WRK11	WRK11		
12h 1	22.04	24.32	2.29	1.19	1.10	0.47	-1.10
12h 2							
12h 3	21.40	21.48	0.08		-1.10	2.15	1.10
12hT1	20.16	22.65	2.49		1.30	0.41	-1.30
12hT2	20.69	22.51	1.82		0.64	0.64	-0.64
12hT3	21.70	26.35	4.65		3.46	0.09	-3.46
24h 1	20.48	22.21	1.73	1.94	-0.21	1.16	0.21
24h 2	20.06	22.12	2.07		0.12	0.92	-0.12
24h 3	21.68	23.71	2.02		0.08	0.94	-0.08
24hT1	19.44	22.53	3.10		1.16	0.45	-1.16
24hT2	21.88	23.90	2.02		0.08	0.95	-0.08
24hT3	20.63	21.90	1.27		-0.67	1.59	0.67
48h 1	22.00			8.44			
48h 2	22.55	30.86	8.30		-0.14	1.10	0.14
48h 3	22.69	31.28	8.58		0.14	0.91	-0.14
48hT1	22.61	24.88	2.27		-6.17	72.09	6.17
48hT2	20.79	23.86	3.07		-5.38	41.51	5.38
48hT3	20.70	22.89	2.19		-6.25	76.15	6.25

Anexo 10. Datos originales para calcular niveles de expresión del gen WRK11 con respecto al gen de referencia AT1G13320 en el análisis transcriptómico de las plantas tratadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR.

	<b>Desv. Est.</b>	<b>Cuant. Relat. Promedio CRP</b>	<b>Fold</b>	<b>Prueba T</b>
<b>Muestra</b>	<b>Control</b>	<b>Wrk11</b>	<b>Wrk11</b>	
12h	1.2	1.3	1.3	0.465
12h Trat	0.3	0.4	-2.6	
24h	0.1	1.0	1.0	0.979
24h Trat	0.6	1.0	1.0	
48h	0.1	1.0	1.0	0.029
48h Trat	18.9	63.2	63.2	

Anexo 11. Datos para la determinación de la Prueba T de Student para hallar diferencias significativas entre los promedios de cuantificación relativa del gen WRK11 de las plántulas tratadas con los asilados rizobacterianos y las plántulas control. Fold = CRP si,  $CRP \geq 1.0$ , Fold =  $-1/CRP$  si,  $CRP < 1.0$ . Las diferencias de expresión génica entre las muestras tratadas y el control fueron consideradas como estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba T de Student ( $t < 0.05$ ).

		<b>dCt</b>	<b>Media dCt</b>	<b>ddCt</b>	<b>2<sup>^</sup>ddCt</b>	<b>Log2</b>	
	<b>AT1G13320</b>	<b>MYB72</b>	<b>MYB72</b>	<b>MYB72</b>	<b>MYB72</b>	<b>MYB72</b>	
<b>12h 1</b>	22.04	29.88	7.85	7.68	0.16	0.89	-0.16
<b>12h 2</b>	21.72	28.87	7.15		-0.53	1.45	0.53
<b>12h 3</b>	21.40	29.45	8.06		0.37	0.77	-0.37
<b>12hT1</b>	20.16	28.98	8.81		1.13	0.46	-1.13
<b>12hT2</b>	20.69	28.17	7.48		-0.20	1.15	0.20
<b>12hT3</b>	21.70	33.71	12.01		4.33	0.05	-4.33
<b>24h 1</b>	20.48	31.94	11.46	10.26	1.20	0.44	-1.20
<b>24h 2</b>	20.06	30.39	10.33		0.07	0.95	-0.07
<b>24h 3</b>	25.64	34.63	8.99		-1.27	2.42	1.27
<b>24hT1</b>	19.44	30.91	11.48		1.22	0.43	-1.22
<b>24hT2</b>	21.88	30.94	9.06		-1.20	2.29	1.20
<b>24hT3</b>	20.63	30.86	10.23		-0.03	1.02	0.03
<b>48h 1</b>	22.00	30.31	8.30	7.84	0.47	0.72	-0.47
<b>48h 2</b>	22.55	30.41	7.86		0.02	0.98	-0.02
<b>48h 3</b>	22.69	30.04	7.35		-0.49	1.40	0.49
<b>48hT1</b>	22.61	29.11	6.50		-1.34	2.53	1.34
<b>48hT2</b>	20.79	26.57	5.78		-2.06	4.17	2.06
<b>48hT3</b>	20.70	27.05	6.35		-1.49	2.80	1.49

Anexo 12. Datos originales para calcular niveles de expresión del gen MYB72 con respecto al gen de referencia AT1G13320 en el análisis transcriptómico de las plantas tratadas con los aislados rizobacterianos mediante qRT-PCR

	Desv Est	Cuant. Relat. Promedio CRP	Fold	Prueba T
Muestra	Control	MYB72	MYB72	MYB72
12h	0.1	1.0	1.0	0.285
12h Trat	0.3	0.6	-1.8	
24h	0.4	1.3	1.3	0.981
24h Trat	0.4	1.2	1.2	
48h	0.2	1.0	1.0	0.038
48h Trat	0.9	3.5	3.5	

Anexo 13. Datos para la determinación de la Prueba T de Student para hallar diferencias significativas entre los promedios de cuantificación relativa del gen MYB72 de las plántulas tratadas con los aislados rizobacterianos y las plántulas control. Fold = CRP si,  $CRP \geq 1.0$ , Fold = -1/ CRP si,  $CRP < 1.0$ . Las diferencias de expresión génica entre las muestras tratadas y el control fueron consideradas como estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba T de Student ( $t < 0.05$ ).

TIEMPO POST-GERMINACIÓN

**CONTROL 1**  
(3 replicas biológicas)

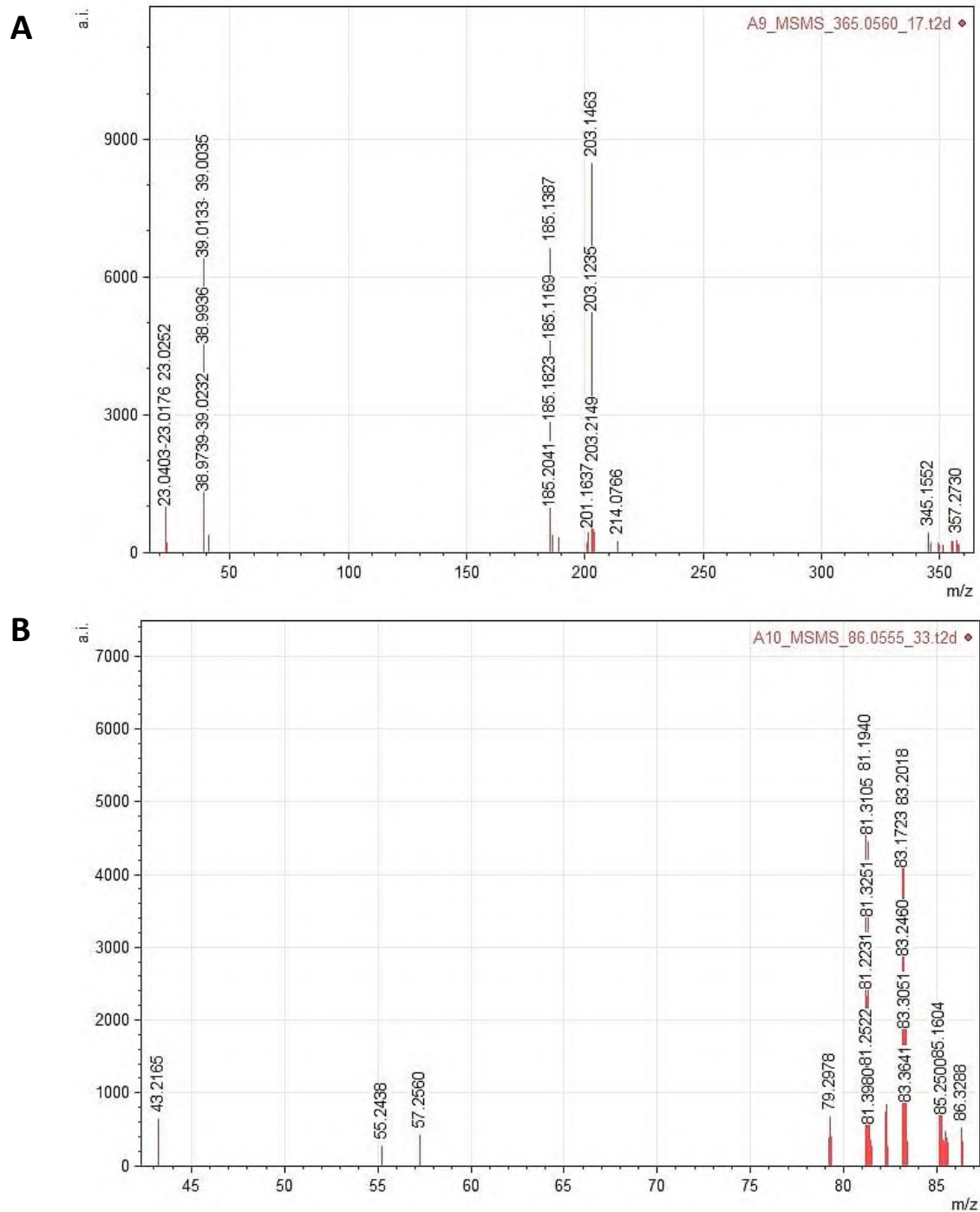
**CONTROL 2**  
(3 replicas biológicas)

**TRATAMIENTO**  
(3 replicas biológicas)

48 horas



Anexo 14. Diseño experimental para el análisis metabolómico mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con los aislados rizobacterianos a las 48 h después de la germinación.



Anexo 15. Espectros de masas de: A. Piperidina, detectada sólo en muestras de plántulas tratadas con los aislados rizobacterianos y B. Xantosina monofosfato, detectada sólo en plántulas control. Los espectros fueron obtenidos utilizando el software mmass a partir de datos en formato t2d obtenidos en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System).