



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



experimentales

Aplicación de cepas de *Microbacterium* spp. productoras de compuestos orgánicos volátiles (COVs) como agentes biopesticidas y fitoestimulantes en semilleros de lechuga



Trabajo Fin de Grado

Departamento de Biología y Geología. Área de Microbiología.
Grado en Biotecnología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Almería.
Curso 2019-2020

Autora: Laura Arbeloa Gómez
Director: Joaquín Moreno Casco
Codirectora: Francisca Suárez Estrella

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a todo el área de Microbiología de la Universidad de Almería por acogerme y darme la oportunidad de realizar este trabajo y permitirme aprender con ellos cómo trabajar en un laboratorio y desarrollar un proyecto como este. Ha sido una gran experiencia poder trabajar en tan buena compañía, y no habría sido posible terminar este trabajo sin todos ellos.

Especial agradecimiento a mi tutor, Joaquín Moreno Casco, por enseñarme un sinfín de cosas y transmitirme su pasión por el conocimiento. Desde que comencé el grado de Biotecnología mostró gran interés e implicación en llegar a cada alumno y ayudar en lo máximo posible, la puerta de su despacho siempre estaba abierta en caso de necesitar apoyo o consejo.

A mi cotutora, Paqui Suárez Estrella, por todo el esfuerzo dedicado, sacando tiempo cuando no lo tenía, siempre dispuesta a resolverme cualquier duda. Por la orientación e implicación incluso durante la pandemia, gracias por hacerme sentir acompañada telemáticamente.

Por último, pero no por ello menos importante, gracias a mi familia, a mis padres y hermana, por el apoyo económico y, sobre todo, personal. Gracias por creer en mí e insistir siempre en que estudiara lo que quisiera, sin importar que hubiera tenido que irme a la otra punta del mundo o quedarme al lado de casa.

Mil gracias a todos vosotros.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 5 |
| Abstract | 6 |
| I. Introducción..... | 7 |
| I.1. Control biológico y sostenibilidad | 7 |
| I.1.1. Mecanismos de control biológico por parte de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPMs): mecanismos directos e indirectos | 7 |
| I.1.2. El Género <i>Microbacterium</i> en el control biológico de enfermedades vegetales: producción de sustancias bioactivas | 10 |
| I.2. Problemas sanitarios provocados por el hongo <i>Botrytis cinerea</i> (moho gris) | 11 |
| I.3. Control preventivo de <i>Botrytis cinerea</i> | 15 |
| I.3.1. Control ambiental y nutricional..... | 15 |
| I.3.2. Control químico | 16 |
| I.3.3. Control biológico | 18 |
| II. Objetivos..... | 20 |
| III. Materiales y Métodos | 21 |
| III.1. Colección de cepas de <i>Microbacterium</i> | 21 |
| III.2. Agente fitopatógeno | 22 |
| III.3. Medios de cultivo y reactivos | 22 |
| III.4. Diseño Experimental..... | 23 |
| III.5. Ensayo de antagonismo <i>in vitro</i> frente al crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> mediante la producción de COVs: método <i>sandwich</i> | 24 |
| III.6. Efecto estimulante/fitotóxico <i>in vitro</i> de la producción de COVs sobre la germinación de semillas de lechuga | 26 |
| III.7. Efecto <i>biopriming</i> de cepas de <i>Microbacterium</i> productoras de COVs frente al desarrollo de los síntomas provocados por <i>Botrytis cinerea</i> así como sobre el efecto promotor del crecimiento en plántulas de lechuga..... | 27 |
| III.9. Análisis estadístico | 29 |

| | |
|---|----|
| IV. Resultados y Discusión | 30 |
| IV.1. Búsqueda de agentes microbianos antagonistas frente al crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> | 30 |
| IV.2 Búsqueda de cepas de <i>Microbacterium</i> con capacidad para promover la germinación en lechuga | 34 |
| IV.3 Ensayo <i>in vivo</i> de protección frente a <i>Botrytis cinerea</i> mediante producción de COVs .. | 36 |
| V. Conclusiones..... | 40 |
| VI. Bibliografía..... | 41 |

Resumen

El uso abusivo de fitosanitarios de naturaleza química para el control de enfermedades vegetales ha ocasionado la pérdida de biodiversidad en el suelo, tanto por los daños sanitarios y ambientales que ocasionan, como por la aparición de resistencias a estos plaguicidas. Todo esto ha derivado en una importante demanda de medidas sustitutivas o complementarias, ambientalmente sostenibles, que sean capaces de controlar de forma eficiente y segura los patógenos vegetales. En este sentido, durante las últimas décadas, el control biológico y la búsqueda de nuevos agentes bioplaguicidas han supuesto un campo de estudio de especial interés dentro de la Agrobiotecnología.

En este estudio, se trabajó con una colección de 29 cepas identificadas como *Microbacterium* spp., que pertenecían a la colección privada del grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería. El objetivo del trabajo fue determinar si, mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs), estos organismos podrían actuar como agentes antagonistas del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (moho gris) y, al mismo tiempo, como promotores del crecimiento en plántulas de lechuga tras ser aplicadas mediante la técnica de *priming*. Aquellas cepas que mostraron resultados prometedores *in vitro*, con respecto a la capacidad antagonista así como fitoestimulante, se seleccionaron para la realización de ensayos posteriores *in vivo* en los que ambos aspectos fueron evaluados.

A partir de un ensayo preliminar de antagonismo *in vitro*, se seleccionaron 5 cepas de *Microbacterium* spp., capaces de inhibir en más de un 30% el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Sólo 3 de estas 5 cepas mostraron resultados positivos en el ensayo de promoción de la germinación *in vitro*, obteniendo datos de incremento del peso radicular en torno al 45%, con respecto a los controles no tratados mediante *priming*. Por último, estas tres cepas fueron ensayadas *in vivo*, provocando efectos beneficiosos con respecto al desarrollo aéreo y radicular de plántulas de lechuga, así como paliando los daños provocados por *Botrytis cinerea*.

Abstract

The abusive use of chemical pesticides for the control of plant diseases has led to the loss of soil biodiversity, both due to the sanitary and environmental damage they cause, as well as the appearance of resistance by pathogens. This effect has resulted in a significant demand for other environmentally sustainable alternatives that serve to control plant pathogens safely and efficiently. In this sense, during the last decades, the search for new biopesticides has been a field of special interest within Agrobiotechnology.

In this research work, a collection of 29 strains included in the genus *Microbacterium* belonging to the private collection of the research group BIO-175 of the University of Almería, was studied. The objective of this work was to determine if the production of volatile organic compounds (VOCs) could act antagonistically against the fungus *Botrytis cinerea*, which causes gray mold disease and, at the same time, promote the development of growth in lettuce seedlings. Strains showing positive results *in vitro*, both for the biopesticide effect and for growth promotion, were selected for *in vivo* tests, in which both effects were evaluated simultaneously.

In the first trial, 5 strains were selected, which were able to inhibit the growth of the fungus to a degree greater than 30%. Only 3 of these 5 strains showed positive results in the *in vitro* germination promotion test, increasing root weight around 45%. Finally, these 3 strains were tested *in vivo*, showing a palliative effect of *Botrytis cinerea* and promoting the development of lettuce seedlings at aerial and root levels.

I. Introducción

I.1. Control biológico y sostenibilidad

Los microorganismos del suelo son la base de los ciclos biogeoquímicos y, por tanto, su función es fundamental para el buen funcionamiento y equilibrio de los ecosistemas (Beltrán-Pineda, 2015). Son una parte importante de la rizosfera, tanto en forma de vida libre como en asociación con la raíz vegetal (Ahmad et al., 2008). La interacción microorganismo-planta a nivel de la rizosfera, puede verse influenciada por una serie de factores bióticos, como son la competencia con otros microorganismos o el reconocimiento microorganismo-planta mediante exudados de la raíz, así como por factores abióticos como son las características fisicoquímicas del suelo o la climatología (González y Fuentes, 2017). Sin embargo, a pesar de que el suelo puede considerarse, en general, un hábitat que presenta una gran diversidad microbiana, el uso continuado e indiscriminado de fitosanitarios de naturaleza química para el tratamiento de los cultivos ha dado lugar a la pérdida considerable de diversidad, y al incremento de resistencias frente a este tipo de productos, sin olvidar los efectos perjudiciales que dichos productos ejercen a nivel ambiental y sanitario. Por tanto, en consonancia con el actual concepto de sostenibilidad y economía circular, resulta imprescindible buscar alternativas al uso de agroquímicos, que resulten más respetuosas con el ambiente y la salud (González y Fuentes, 2017).

I.1.1. Mecanismos de control biológico por parte de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPMs): mecanismos directos e indirectos

Los microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPMs – Plant Growth Promoting Microorganisms), son un grupo muy heterogéneo de diferentes especies con potencial para influir positivamente sobre parámetros del crecimiento y rendimiento vegetal (de-Bashan et al., 2012). Los principales géneros bacterianos estudiados por su capacidad para mejorar el crecimiento de las plantas son *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* (Ahmad et al., 2008). Pueden actuar a dos niveles diferentes: mecanismos de acción directos o indirectos (Figura 1). A continuación, se explican los aspectos generales de ambos tipos de mecanismos.

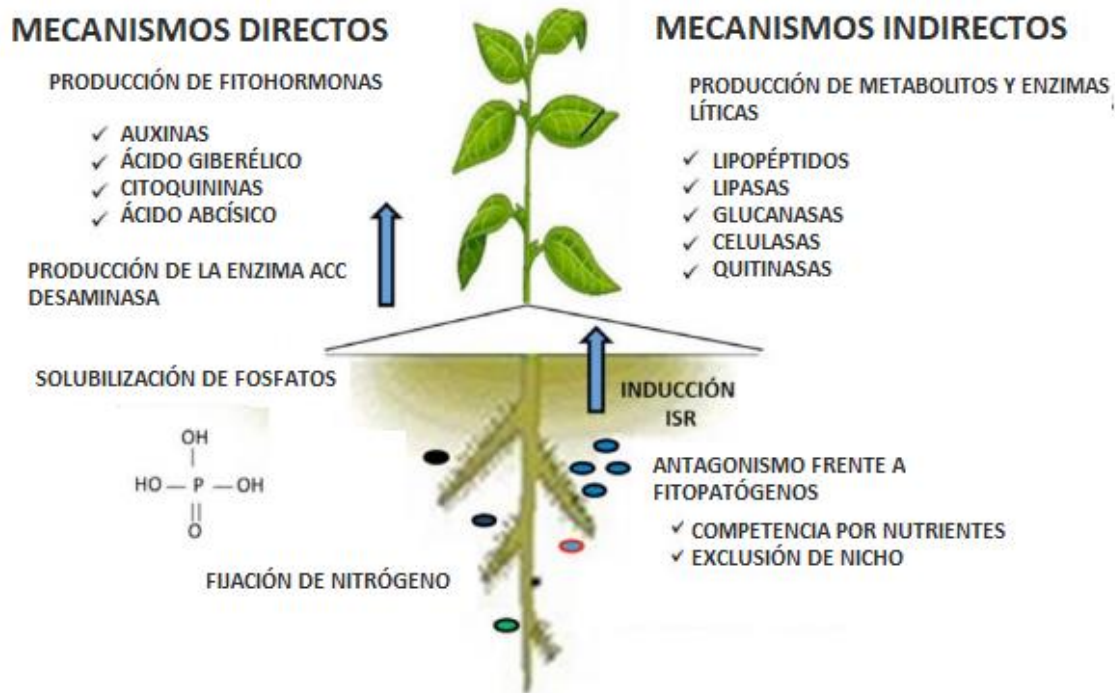


Figura 1: Mecanismos de acción directos (izquierda) e indirectos (derecha) de estimulación del crecimiento por parte de PGPMs (Rojas-Solís et al., 2013).

Mecanismos directos: el microorganismo produce alguna sustancia que estimula el crecimiento vegetal de forma directa, o bien facilitando la absorción de nutrientes desde el suelo a la planta (Ahmad et al., 2008). Las principales características metabólicas que hacen que un microorganismo tenga capacidad para promover el crecimiento vegetal son las siguientes:

- **Fijación de nitrógeno:** El nitrógeno es esencial para el crecimiento de las plantas. Aunque la atmósfera está constituida aproximadamente de un 78% de N_2 , no está disponible para que lo asimilen las plantas, por eso es necesaria la fijación biológica de nitrógeno a amoníaco por parte de microorganismos fijadores de nitrógeno, los cuales utilizan un complejo y exclusivo sistema enzimático conocido como nitrogenasa (Ahemad y Kibret, 2014). Algunos PGPMs fijadores de nitrógeno pueden suplir las deficiencias en nitrógeno de algunos suelos bien mediante el establecimiento de asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas o bien en forma de vida libre (Ahmad et al., 2008).
- **Solubilización de fosfato:** la mayor parte del reservorio de fósforo presente en el suelo no está disponible para las plantas, debido a que se encuentra en forma insoluble (Ahemad y Kibret, 2014). Los microorganismos solubilizadores de fosfato provocan la transformación de estas formas insolubles a otras más solubles y asimilables por parte de las plantas. Para esto utilizan diferentes mecanismos, entre ellos, la producción de ácidos orgánicos. Los fosfatos solubilizados de este modo son absorbidos por la planta, lo que mejora su crecimiento y productividad, a la vez que permite ahorrar respecto a la aplicación de fertilizantes químicos (Beltrán-Pineda, 2015) que, por otra parte, resultan ambientalmente insostenibles (Ahemad y Kibret, 2014).

- **Producción de fitohormonas:** algunos PGPMs producen fundamentalmente fitohormonas de tipo auxinas, por ejemplo, ácido indolacético (AIA), aunque también son capaces de producir ácido giberélico (GA3), citoquininas y ácido abscísico (ABA) (González y Fuentes, 2017).
- **Producción de la enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminasa:** la producción de esta enzima por parte de algunos PGPMs reduce el nivel de etileno ante situaciones de estrés (González y Fuentes, 2017).

Mecanismos indirectos: Ocurre cuando estos microorganismos disminuyen o previenen los efectos nocivos que pueda ocasionar algún fitopatógeno (Ahmad et al., 2008). La aplicación de microorganismos para controlar enfermedades es una forma de control biológico (Ahemad y Kibret, 2014) que promueve el crecimiento de la planta al inhibir o matar a los agentes potencialmente fitopatógenos de su entorno (González y Fuentes, 2017). En general ocurre por competencia por los nutrientes, exclusión de nicho, inducción de resistencia sistémica inducida y producción de metabolitos antifúngicos como HCN, fenazinas, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pioluteorina, viscosinamida y tensina (Ahemad y Kibret, 2014).

- **Producción de lipopéptidos y enzimas líticas:** Bacterias del género *Bacillus* son capaces de producir lipopéptidos con capacidad antagónica frente a ciertos fitopatógenos. Se trata de sustancias antibióticas de la familia de las iturinas, fengicinas y surfactinas. Por otra parte, la producción de enzimas microbianas de tipo celulasa, lipasa, glucanasa y quitinasa puede resultar muy efectiva frente al desarrollo de hongos fitopatógenos. Para el control de *B. cinerea* en plantas de *Medicago truncatula* se han realizado ensayos de biocontrol con cepas del género *Bacillus* que han sido muy prometedores (Rojas-Solís et al., 2013).
- **Inducción de la Respuesta Sistémica Inducida en plantas (ISR – Induced Systemic Resistance):** algunas bacterias son capaces de activar los sistemas de defensa de la planta. Esto ocasiona la protección de la planta frente a futuros ataques por patógenos como hongos, bacterias, virus y nemátodos. Por ejemplo, la acetoina (3-hidroxi-2-butanona), un compuesto orgánico volátil (COV) producido por cepas de *Bacillus subtilis*, es capaz de inducir esta respuesta sistémica en *Arabidopsis thaliana*. En este caso, se trata de vías de señalización dependientes de etileno y ácido jasmónico, e independientes de ácido salicílico (Rojas-Solís et al., 2013).

El uso de PGPMs a nivel agronómico exige que estas cepas sean especialmente competentes, es decir, capaces de sobrevivir y colonizar el suelo en el que se aplican. Sin embargo, en muchas ocasiones, las relaciones que se establecen entre las plantas y estos PGPMs son inestables, de manera que los resultados obtenidos en experimentos *in vitro* no son reproducibles, posteriormente, bajo condiciones de campo. Esto puede ser debido a factores ambientales como el clima, las características del suelo o la competencia entre la microbiota autóctona que en él se encuentre. Por lo tanto, es necesario desarrollar cepas bien adaptadas al entorno donde

se las pretende inocular, de manera que resulten eficientes y aporten buenos resultados en lo que se refiere a productividad y/o prevención frente a patógenos vegetales (Ahmad et al., 2008).

I.1.2. El Género *Microbacterium* en el control biológico de enfermedades vegetales: producción de sustancias bioactivas

Como se ha indicado anteriormente, el control biológico supone un reto para las actuales prácticas agrícolas, las cuales se dirigen hacia un concepto de agricultura más sostenible, aprovechando la actividad de numerosos microorganismos autóctonos.

Microbacterium (Phylum Actinobacteria) es un género bacteriano que habita tanto en la rizosfera como en los tejidos de las plantas. Los miembros de este género son generalmente conocidos por su capacidad de producir exopolisacáridos, que ayudan a la formación de agregados del suelo (Rincón-Molina et al., 2020)

La utilización de *Microbacterium* spp. como PGPM se basa en la producción de fitohormonas (auxinas y citoquininas), en su capacidad para solubilizar el fosfato y hacerlo más disponible para las plantas, o bien en la gran variedad de metabolitos que producen. Entre estos últimos se incluyen diversos compuestos orgánicos volátiles (COVs), moléculas de bajo peso molecular que son capaces de dispersarse a través de la matriz del suelo e interactuar con la planta sin establecer contacto directo con ella (Cordovez et al., 2018). En ensayos con diferentes especies vegetales, se ha visto un efecto positivo de *Microbacterium* spp. sobre la germinación, el desarrollo de la raíz y el número de hojas (González y Fuentes, 2017) gracias a la producción de este tipo de compuestos.

Por otra parte, diversos trabajos apoyan la aplicación de *Microbacterium* spp. como agente de biocontrol frente a enfermedades, lo que convierte a este grupo microbiano en una interesante alternativa al control químico de enfermedades vegetales (Sumer y Yesim, 2018). Así, se ha comprobado recientemente que diferentes especies de *Microbacterium* son capaces de controlar la enfermedad causada por la bacteria *Acidovorax citrulli* en cucurbitáceas (Sumer y Yesim, 2018), la fusariosis provocada por *Fusarium* spp. en maíz (Gerber, 2010), o los problemas derivados en suelos infestados por nematodos, como *Heterodera glycines* (Zhao et al., 2019). *Microbacterium maritopicum*, especie aislada en Sudáfrica, se ha utilizado para el control con éxito a nivel comercial de la enfermedad bacteriana provocada por *Pectobacterium* spp. en patata. Sin embargo, el conocimiento de *Microbacterium* spp. como agente de control biológico no está tan ampliamente afianzado como podría ser el caso de otros géneros microbianos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Trichoderma* (Gerber, 2010).

El efecto de los COVs producidos por microorganismos sobre hongos patógenos presentes en el suelo se estudia desde mediados del siglo XX. Sin embargo, su influencia en la promoción del crecimiento vegetal ha sido tomada más en consideración en la última década (Cordovez et al., 2018). Las bacterias emiten una gran cantidad de COVs antifúngicos, lo cual podría ser considerado como una alternativa futura a los fungicidas químicos más tradicionales. Algunos de los COVs producidos por microorganismos son, por ejemplo, mono- y sesquiterpenos,

trimetilamina, 1-octen-3-ol, ácido nonanoico y sulfuro de dimetilo, producidos por los géneros bacterianos *Bacillus* y *Pseudomonas*. La composición, así como los niveles de COVs producidos por microorganismos en el suelo, variarán dependiendo de la propia naturaleza físico-química de éste, así como de la diversidad microbiana y de su estado fisiológico (Insam y Seewald, 2010).

En cuanto a estudios sobre algunas cepas del género *Microbacterium* productoras de COVs, se ha podido comprobar su capacidad para producir gran cantidad de compuestos azufrados, como dimetil-sulfuro y dimetil-trisulfuro, producidos también por otros géneros bacterianos. Sin embargo, otros COVs más exclusivos de *Microbacterium* spp. son el S-metil-2-metilpropanotioato, S-metilpentanotioato y otros derivados cetónicos. Debido a los mecanismos por los cuáles actúan estos compuestos, no parece necesaria una exposición prolongada para el mantenimiento del efecto promotor del crecimiento vegetal, sino que, en este sentido, la simple exposición durante las etapas más tempranas de la germinación podría ser efectiva. Estos compuestos intervienen en la regulación y asimilación de azufre y nitrógeno, fundamentales para la síntesis de cisteína, componente estructural y funcional de las proteínas. Igualmente, actúan a nivel de los receptores de auxina TIR1, que participan en la formación de raíces laterales y del alargamiento celular (Cordovez et al., 2018).

I.2. Problemas sanitarios provocados por el hongo *Botrytis cinerea* (moho gris)

Botrytis cinerea es un hongo patógeno de plantas con un estilo de vida necrotrófico, que afecta a más de 200 cultivos en todo el mundo (Ahemad y Kibret, 2014). Posee gran plasticidad genómica, que puede ser debida a elementos móviles de su genoma, como transposones, o a la presencia de *inteínas* (Fillinger y Elad, 2016). Éstas son segmentos de proteínas que pueden escindirse después de la traducción, para dar lugar a la proteína madura; se encuentran en una amplia gama de patógenos fúngicos de los géneros *Aspergillus*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* (Liu y Yang, 2004).

B. cinerea presenta un micelio grisáceo y espeso, compuesto por conidióforos largos y ramificados (Figura 2), con células apicales redondeadas en las que se localizan los conidios unicelulares en forma de racimo de uva (Agrios, 2005). Puede infectar varias partes del hospedador en diferentes etapas de desarrollo del cultivo, sin embargo, los tejidos maduros y senescentes son los más susceptibles (Abbey et al., 2018). También es capaz de causar *damping off* sobre todo en condiciones de frío y humedad alta (Agrios, 2005). Existe también evidencia de que en algunas especies puede estar presente de manera endófito (asintomático), pudiendo desarrollar síntomas en etapas posteriores de la vida de la planta, o ser transferido por la propagación de sus semillas, lo que complicaría el control de la enfermedad.

Debido a la gran variabilidad de rasgos fenotípicos que presenta *B. cinerea*, se emplea como modelo para el estudio de hongos filamentosos (Fillinger y Elad, 2016). Aunque existe una amplia gama de fungicidas comerciales destinados a su control, muchos comienzan a ser inefectivos debido a la plasticidad genética que presenta (Ahemad y Kibret, 2014). Tanto es así,

que se ha convertido en un modelo importante para el estudio del control de enfermedades fúngicas debido a la amplia gama de hospedadores que muestra (Abbey et al., 2018).

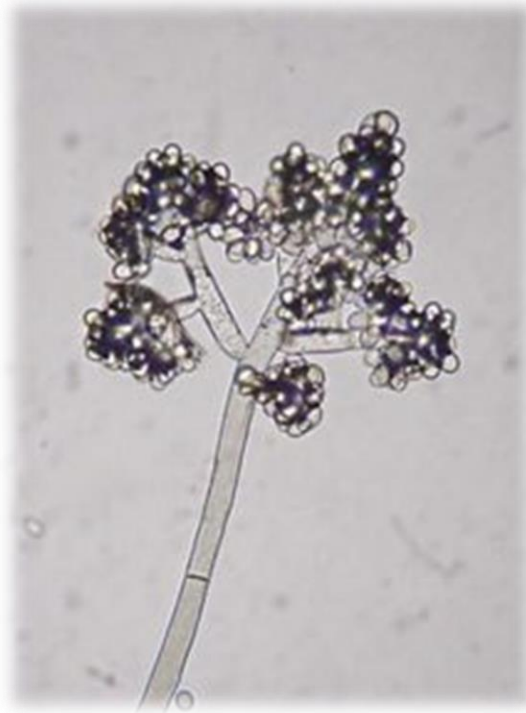


Figura 2. Micelio, conidióforo y esporas típicas de *B. cinerea*, vistos a microscopio óptico (40X)
(<https://www.inia.cl/sanidadvegetal/2016/11/04/pudricion-gris-botrytis-cinerea-2/>).

El mecanismo más común de dispersión de este hongo es la transmisión de sus conidios en el aire, de manera que la aerobiología tiene gran importancia en su estudio epidemiológico. No obstante, insectos y maquinaria agrícola también son importantes transmisores. *B. cinerea* penetra en el huésped mediante la secreción de enzimas líticas en tejidos no dañados o, directamente, a través de aberturas naturales. Por ejemplo, en las hojas de frijol y ciruelo entran a través de los estomas, más fácilmente en hojas viejas que jóvenes (Fillinger y Elad, 2016). Ante esto, la planta acumula especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que le produce un estrés oxidativo que lleva a la célula vegetal a la muerte. El hongo rompe la pared celular de las células del huésped secretando pectinasas, celulasas y hemicelulasas, de manera que se las considera importantes factores de patogenicidad. Otras enzimas potencialmente involucradas son de tipo proteasas y lacasas. *B. cinerea* también produce *botrydial*, un metabolito fitotóxico, que mata a las células del huésped (AbuQamar et al., 2017).

El control de la enfermedad producida por *B. cinerea* es complejo, ya que presenta una gran variedad de modos de ataque, diversos huéspedes, y puede sobrevivir durante períodos prolongados en forma de estructuras muy resistentes denominadas esclerocios (Ahemad y Kibret, 2014). Además, tiene la capacidad de sobrevivir saprotróficamente en huéspedes muertos, y de formar estructuras de hibernación que quedan latentes, hasta que las condiciones climáticas sean favorables para iniciar una nueva infección (Abbey et al., 2018).

B. cinerea es responsable de una amplia gama de síntomas que no pueden generalizarse fácilmente entre diferentes especies de plantas, órganos y tejidos. Podredumbres suaves, acompañadas de colapso y encharcamiento de los tejidos del parénquima, seguido de una rápida aparición de masas grises de conidios, son quizás los síntomas más típicos en hojas y frutos blandos (Ahemad y Kibret, 2014).

En fresa, infecta a hojas jóvenes, permanece latente y va colonizando la planta en la medida en la que estas se secan y mueren, hasta alcanzar el fruto (Figura 3) (Fillinger y Elad, 2016). Al principio el hongo infecta las hojas sin mostrar síntomas, permaneciendo latente, y al madurar determinadas partes de la planta, se activa y produce una cubierta grisácea de conidios que causan pudrición. Los pétalos y los pedúnculos florales adquieren un color marrón y luego mueren. El fruto, al comienzo de la infección, sufre lesiones de color gris debido a la gran cantidad de conidios que se acumulan en él. Finalmente, se forma una capa de conidios que lo recubren por completo y lo deforman y marchitan (Koike y Bolda, 2016).



Figura 3. Moho gris en fruto de fresa (<https://www.fertilab.com.mx/blog/311-biocontrol-de-botritis-en-fresa/>).

B. cinerea también causa la pudrición del fruto en el cultivo de tomate. En etapas tempranas de su desarrollo, cuando aún está inmaduro, es resistente al moho gris, sin embargo, se vuelve cada vez más susceptible conforme avance su maduración (Figura 4) (Fillinger y Elad, 2016). Este hecho es importante, sobre todo en el control poscosecha, puesto que el hongo puede desarrollarse a la temperatura óptima para el almacenamiento de los frutos (12-15 °C). Infecta principalmente a hojas y frutos, aunque puede expandirse a otros tejidos, como los tallos (Elad et al., 2004).



Figura 4. Pudrición de tomate causada por *B. cinerea* a lo largo de su maduración (Fillinger y Elad, 2016).

El moho gris causa también grandes pérdidas comerciales en el cultivo de lechuga. Entre sus síntomas se incluyen numerosas lesiones necróticas, también causa pudrición de la planta, lo que conduce a la destrucción completa del cultivo (Fiddaman et al., 2000). Estas lesiones necróticas se localizan sobre todo en el tallo, cerca de la superficie del suelo, y en las hojas inferiores (Figura 5). La infección progresa hacia arriba de manera que las plantas afectadas se marchitan, colapsan, y pueden llegar a morir en poco tiempo (Gullino et al., 1999).



Figura 5. Lesiones y esporulación de *B. cinerea* en lechuga (<http://www.inia.cl/sanidadvegetal/2016/11/04/pudricion-gris-botrytis-cinerea-2/>).

Existen estudios que muestran que *Botrytis cinerea* a menudo está presente en las plantas de lechuga sin mostrar síntomas aparentes, de forma endófito, pudiendo dar lugar a una transmisión “silenciosa” mediante semillas. Las infecciones endófitas son extremadamente comunes y funcionalmente importantes. Al igual que *B. cinerea*, otros muchos hongos pueden

considerarse como saprotrofos, sin embargo, la infección por *B. cinerea*, en la mayoría de los casos, causa la mortalidad de las plántulas (Sowley et al., 2009).

I.3. Control preventivo de *Botrytis cinerea*

Para el control de enfermedades fúngicas en plantas, se las considera a éstas, más como poblaciones que como individuos. Debido a la regularidad con la que se dan este tipo de problemas, sumado a su rápida diseminación y a la dificultad de curación una vez que se empiezan a desarrollar, casi todos los métodos de control utilizados son de carácter preventivo. Tales métodos pueden ser clasificados, en términos generales, como reguladores, culturales, biológicos, físicos o químicos (Agrios, 2005).

I.3.1. Control ambiental y nutricional

Los programas de control de *Botrytis cinerea* que se llevan a cabo en la práctica involucran técnicas culturales para el control de las condiciones ambientales, fundamentalmente la ventilación, la temperatura y la humedad, y la aplicación de fungicidas sintéticos. También el saneamiento y la eliminación de tejidos senescentes, así como la manipulación del microclima de los invernaderos, ayudan a reducir las infecciones causadas por el hongo (Abbey et al., 2018). También es conveniente la desinfección de semillas, pues pueden llevar en su interior al hongo de forma endófito (Sowley et al., 2009).

En cuanto al control de las condiciones ambientales, es posible ejercerlo sobre varios parámetros, los principales se indican a continuación.

- **Temperatura ambiente:** Se ha determinado que el rango de temperatura para el desarrollo del moho gris en los cultivos es de 12-30 °C, teniendo su óptimo entre 15-20 °C, de manera que caldear el ambiente en los invernaderos disminuye los niveles de la enfermedad. Las temperaturas por encima de 25 °C se consiguen cerrando las paredes laterales de los invernaderos. Es posible que el tratamiento térmico induzca resistencia en la planta huésped de manera que, de ser infectada, desarrollará infecciones menos graves que las plantas que no hayan recibido tratamiento. Sin embargo, hay que cuidar que dicho tratamiento no tenga un efecto perjudicial sobre la fructificación o sobre las interacciones con otros patógenos (Fillinger y Elad, 2016).
- **Humedad relativa:** Para el desarrollo del moho gris son necesarias condiciones de humedad relativa ambiental, como mínimo, en torno al 75-80 %. Para disminuir la incidencia de la enfermedad se ha de controlar el ambiente de manera que la humedad relativa sea menor de dichos niveles, pero dentro del margen que favorezca el crecimiento de la planta (Fillinger y Elad, 2016).
- **Ventilación:** No solo ha de mantenerse un ambiente relativamente cálido, sino que el control del moho gris requiere además de una adecuada ventilación. La ventilación

disminuye la cantidad de tiempo que se mantienen húmedas las partes más susceptibles de la planta. En ensayos realizados en invernaderos con cultivo de tomate se encontró una mayor tasa de enfermedad a 16 °C sin ventilación, que a 13 °C con ventilación (Fillinger y Elad, 2016).

- **Densidad de los cultivos:** Cuanto mayor sea la densidad del cultivo más difícil será asegurar una correcta ventilación, de manera que cultivos más densos serán más vulnerables al moho gris. En estudios realizados con cultivo de pepino se encontró un mayor daño por moho gris en cultivos con dos tallos por planta, que en aquellos con un solo tallo por planta (Fillinger y Elad, 2016).
- **Radiación UV:** En general, la luz UV aumenta la tasa de esporulación de *B. cinérea*, aunque se han descrito cepas de *B. cinerea* capaces de producir conidios en oscuridad (Fillinger y Elad, 2016). En estudios realizados en cultivos de fresa y tomate recubiertos con polietileno, el cual bloquea este tipo de radiación, el nivel de infección disminuyó considerablemente. Se consiguió un efecto similar en cultivos de pepino recubiertos con cloruro de polivinilo. Este hecho puede ser debido a que las condiciones de calidad de luz inducen resistencia en la planta.
- **Control nutricional:** La cantidad de nutrientes de la que dispone la planta también puede afectar a su susceptibilidad, pues son necesarios para su crecimiento y desarrollo. El calcio aumenta la resistencia al moho gris debido a que reduce la emisión de etileno, retrasando la senescencia, y disminuye la susceptibilidad de las membranas a enzimas hidrolíticas producidas por patógenos; adicionalmente, se liberan menos sustancias que el hongo puede utilizar como nutrientes. Sin embargo, algunos experimentos en los que se ha intentado sustituir fungicidas convencionales por CaCl_2 , no han dado buenos resultados (Fillinger y Elad, 2016). Otro nutriente importante a tener en cuenta es el nitrógeno. Un óptimo aporte de nitrógeno mejora el crecimiento de las plantas y la densidad foliar; sin embargo, puede afectar negativamente a la ventilación, aumentando así la susceptibilidad ante *B. cinerea* (Fillinger y Elad, 2016).

1.3.2. Control químico

El control químico, basado en la aplicación de fungicidas principalmente sintéticos, es la forma más fácil y rápida de controlar la infección por *B. cinerea* en gran variedad de cultivos. El uso de fungicidas sintéticos, aunque en ocasiones es la única opción viable, presenta diversas problemáticas, puesto que sus residuos pueden contaminar tanto la planta como el fruto o el suelo, lo que repercutiría negativamente en el ambiente y en la salud del consumidor. Por todo ello, estos productos están sujetos a importantes restricciones legales (Abbey et al., 2018). La actividad de estos productos es fundamentalmente fungicida o fungistática de carácter preventivo, sólo unos pocos de ellos son capaces de curar la enfermedad una vez desarrollada. Según el modo de actuación, estos productos pueden clasificarse en fungicidas *multisitio*, si interfieren con más de una función celular, o *unisitio*, si interfieren con una función celular

específica. Diversos productos comerciales actúan sobre los microtúbulos del citoesqueleto, la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, la biosíntesis de ergosterol (principal esteroide constituyente de las membranas celulares) o la transducción de señales celulares (Tabla 1) (Fillinger y Elad, 2016).

| Modo de acción | Familia química | Fungicida |
|--|--|--|
| Multisitio | Cloronitrilos | Clorotalonil |
| | Ftalimidas | Captan y folpet |
| | Sulfamidas | Diclofluanida y tolifluanida |
| | Ditiocarbamatos | Thiram, mancozeb y maneb |
| Microtúbulos del citoesqueleto | Tiofanatos benzimidazoles | Metil tiofanato y carbedazim |
| | N-pentil-carbamatos | Dietofencarb |
| Respiración y síntesis de ATP | Piridinaminas | Fluazinam |
| | Complejo II: piridina carboxamidas y piridinil-etil-benzamidas | Boscalida y fluopyram |
| | Complejo III: Estrobirulinas | Azoxistrobina y piraclostrobina |
| Biosíntesis de aminoácidos (metionina) | Anilino pirimidinas | Ciprodinil, pirimatánil y mepanipirim |
| Biosíntesis de ergosterol | Hidroxianilinas | Fenhexamida y fenpirazamina |
| Transducción de señal (osmótica) | Dicarboximidas y fenilpirroles | Iprodiona, procimidona, vinclozolina y fludioxonil |

Tabla 1. Modo de acción de los principales fungicidas sintéticos utilizados para el control de *B. cinerea* (Fillinger y Elad, 2016).

Asimismo, el hongo puede llegar a desarrollar resistencia frente a los agentes de control químicos. Hay evidencias de que, tras un uso abusivo, una misma cepa de *B. cinerea* puede desarrollar resistencias frente a las anilino pirimidinas, benzamidas, hidroxianilinas y dicarboximidas. Todo lo indicado anteriormente, sumado al daño ambiental generado por el uso excesivo de fitosanitarios químicos, ha derivado en la demanda urgente de alternativas que puedan controlar de manera eficiente y segura la enfermedad ocasionada por *B. cinerea* (Sarven et al. 2020).

I.3.3. Control biológico

Dentro de la Agrobiotecnología, el control biológico y la búsqueda de nuevos bioplaguicidas suponen un interesante campo de estudio e investigación desde hace varias décadas. Aunque se ha demostrado la eficacia de muchos bioplaguicidas a escala de laboratorio, en ocasiones, determinados agentes de control biológico no se consideran viables para ser aplicados en campo debido a su vulnerabilidad ante las condiciones ambientales, o a la variable sensibilidad del patógeno respecto a ellos (Fillinger y Elad, 2016).

Se han descrito varios extractos vegetales que pueden ser utilizados como biofungicidas frente a *B. cinerea*, entre ellos se encuentran el extracto del árbol de té, *Melaleuca alternifolia*, que actúa contra diversas etapas del proceso de infección e inhibe la germinación del conidio y el crecimiento del micelio del hongo. El extracto vegetal procedente de *Reynoutria sachalinensis*, ha dado también buenos resultados contra *B. cinerea* en tomate, uva, pimiento, cucurbitáceas, fresa y nuez. También se han identificado otros compuestos como la emodina y la parietina que inducen resistencia sistémica inducida (ISR) en el huésped (Fillinger y Elad, 2016).

Los agentes microbianos de control biológico descritos comúnmente frente al moho gris son hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma spp.*, *Coniothyrium spp.*, *Gliocladium spp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium spp.* y *Verticillium spp.* (Aparicio-Salmerón y Torres-Gil, 1995). Éstos establecen una interacción con el huésped que ayuda en la defensa frente a *B. cinerea*. Por ejemplo, *Clonostachys rosea* al competir con *B. cinerea* por espacio y nutrientes, coloniza todos los tejidos vegetales de manera que consigue acabar con la infección 48 h después de la inoculación (Borges et al., 2015). También se han descrito cepas bacterianas que pueden servir como agentes de biocontrol frente a *B. cinerea*. *Bacillus subtilis*, en este sentido, actúa mediante competencia por nutrientes y espacio, produciendo sustancias antifúngicas e induciendo resistencia sistémica (SAR) en la planta huésped (Fillinger y Elad, 2016).

Por otra parte, una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles (COVs) resultan de interés para la investigación agrícola, debido a su potencial para inhibir el desarrollo de determinadas enfermedades fúngicas (Bolívar-Anillo et al., 2019). Por ejemplo, los COVs producidos por *Bacillus velezensis* mostraron índices de inhibición de hasta el 92% frente a *B. cinerea* (Gao et al., 2017). Los COVs son capaces de difundir a través de los espacios aéreos del suelo alcanzando largas distancias en función de las propiedades físico-químicas del mismo. Mediante esta estrategia, no es necesario un contacto directo entre agente de control y fitopatógeno. Estos compuestos ejercen su acción preparando a la planta ante el futuro ataque de patógenos, por ejemplo, induciendo una respuesta de defensa (Morath et al., 2012). También se han evaluado los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo *Metarhizium anisopliae* contra *B. cinerea* en el cultivo de tomate, los cuales redujeron la severidad de la enfermedad en torno a un 41% en poscosecha (Sarven et al., 2020).

Además de los efectos inhibitorios directos sobre organismos fitopatógenos, otro beneficio mostrado por los microorganismos productores de COVs es la capacidad para promover el crecimiento vegetal. Sin embargo, la respuesta de la planta a estos compuestos puede ser muy

variable o incluso en algunos casos perjudicial (Morath et al., 2012). Dependiendo del entorno en el que se desarrolle la bacteria, ésta puede producir mezclas de volátiles diferentes que tendrán distintos efectos sobre las plantas (Bailly y Weisskopf, 2012). Esto hecho fue comprobado por Blom et al. (2011), quienes expusieron a *Arabidopsis thaliana* a los volátiles producidos por una colección de cepas rizosféricas, principalmente constituida por especies del género *Burkholderia*, en diferentes condiciones de cultivo. El impacto de los COVs producidos por las bacterias crecidas en medios más pobres en nutrientes fue menor, aunque se observó un notable efecto en la promoción del crecimiento vegetal. Sin embargo, cuando las bacterias crecieron en medios más ricos en nutrientes, se observó un efecto negativo sobre el desarrollo de las plantas, llegando incluso a producir la muerte. Por tanto, la naturaleza del suelo donde se desarrollen las bacterias productoras de COVs influirá significativamente sobre el efecto bioplaguicida o fitoestimulante que estos compuestos puedan ejercer en el cultivo vegetal. Algunos autores sugieren, además, que el estadio fenológico en el que se lleva a cabo la aplicación de los volátiles influye en la respuesta de la planta, estando algunos compuestos como el cianuro de hidrógeno, dimetilsulfuro y el NH_3 , directamente implicados con determinados efectos negativos (Bailly y Weisskopf, 2012).

II. Objetivos

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado fue evaluar el efecto de una colección de cepas pertenecientes al género *Microbacterium* frente a la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en el cultivo de lechuga, mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs). Este objetivo general se desglosó en los siguientes objetivos específicos:

1. Detección de cepas de *Microbacterium* con capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* mediante la producción de COVs.
2. Identificación de las cepas de *Microbacterium* capaces de producir una mayor estimulación de la germinación de las semillas de lechuga mediante la producción de COVs.
3. Evaluación *in vivo* de las mejores cepas en cuanto a su capacidad para promover el crecimiento vegetal en plántulas de lechuga, así como su utilidad como agentes de control biológico frente al hongo *Botrytis cinerea*.

III. Materiales y Métodos

III.1. Colección de cepas de *Microbacterium*

Para la realización de este Trabajo Fin de Grado se utilizaron 29 cepas identificadas como *Microbacterium* spp., procedentes de la colección privada del grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería (Tabla 2). Dichas cepas se recuperaron en placas con medio de cultivo estándar APHA para el crecimiento bacteriano (Ref. 413799, Panreac Applichem, España), a partir de crioviales conservados a -80 °C. Las placas se incubaron a 30 °C en oscuridad durante 48-72 horas y se mantuvieron a 4 °C, previamente a su utilización.

| Identificador | Cepa |
|---------------|---------------------------------------|
| M1 | <i>Microbacterium ginsengiterrae</i> |
| M7 | <i>Microbacterium halotolerans</i> |
| M47 | <i>Microbacterium gubbeenense</i> |
| M54 | <i>Microbacterium amylolyticum</i> |
| M55 | <i>Microbacterium aerolatum</i> |
| M81 | <i>Microbacterium amylolyticum</i> |
| M83 | <i>Microbacterium indicum</i> |
| M92 | <i>Microbacterium indicum</i> |
| M94 | <i>Microbacterium gubbeenense</i> |
| M95 | <i>Microbacterium sediminis</i> |
| M99 | <i>Microbacterium indicum</i> |
| M106 | <i>Microbacterium indicum</i> |
| M116 | <i>Microbacterium indicum</i> |
| M118 | <i>Microbacterium barkeri</i> |
| M172 | <i>Microbacterium esteraromaticum</i> |
| M173 | <i>Microbacterium indicum</i> |
| M192 | <i>Microbacterium aerolatum</i> |
| M219 | <i>Microbacterium foliorum</i> |
| M245 | <i>Microbacterium foliorum</i> |
| M258 | <i>Microbacterium amylolyticum</i> |
| M283 | <i>Microbacterium gubbeenense</i> |
| M367 | <i>Microbacterium profundum</i> |
| M454 | <i>Microbacterium oxydans</i> |
| M463 | <i>Microbacterium foliorum</i> |
| M536 | <i>Microbacterium paraoxydans</i> |
| M544 | <i>Microbacterium yannicii</i> |
| M634 | <i>Microbacterium esteraromaticum</i> |
| M653 | <i>Microbacterium ginsengiterrae</i> |
| M707 | <i>Microbacterium profundum</i> |

Tabla 2: Colección de cepas utilizadas en el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado

III.2. Agente fitopatológico

La cepa del hongo fitopatológico utilizada para el desarrollo de los distintos bloques experimentales procedió de la Colección Española de Cultivos Tipo (*Botrytis cinerea* CECT 20973). La cepa fue proporcionada en formato liofilizado, de modo que se recuperó en placas con medio agar patata dextrosado (PDA, Ref. 413758, PanReac AppliChem, España), siguiendo las recomendaciones especificadas por la CECT.

Botrytis cinerea es un hongo con un amplio espectro de hospedadores cuya clasificación taxonómica se muestra a continuación en función de lo indicado en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2020):

- Dominio: Eucariota
- Reino: Fungi
- Superfilo: Dikaria
- Filo: Ascomycota
- Subfilo: Pezizomycotina
- Clase: Leotiomycetes
- Orden: Helotiales
- Familia: *Sclerotinaceae*
- Género: *Botrytis*
- Especie: *Botrytis cinerea*

III.3. Medios de cultivo y reactivos

Para la realización de este Trabajo de Fin de Grado se utilizaron diferentes medios de cultivo, cuya composición y preparación se describe a continuación.

Medio estándar para recuento bacteriano (APHA)

Componentes del medio:

- Medio deshidratado 23,5 g
- Agar bacteriológico 5 g
- Agua destilada 1000 mL

Para preparar este medio de cultivo se utilizaron 23,5 g de un preparado comercial de medio deshidratado (AppliChem Panreac. Ref 413799). El producto se pesó y se mezcló en un matraz con 1 litro de agua destilada. El preparado se esterilizó durante 20 minutos en autoclave. Una vez esterilizado, el medio se repartió en placas Petri estériles de 90 mm o de 45 mm de diámetro,

según los requerimientos del experimento. Las placas fueron conservadas en cámara fría a 4 °C y en oscuridad hasta el momento de su utilización.

Agar Patata Dextrosado (PDA)

- Medio deshidratado 39 g
- Agua destilada 1000 mL

Este medio de cultivo se elaboró añadiendo 39 g de un preparado comercial (AppliChem Panreac, Ref. 413758) a un matraz con 1 L de agua destilada. La mezcla se esterilizó en autoclave durante 20 minutos. Al igual que el medio anterior, se dejó enfriar fuera del autoclave de forma previa a su reparto en placas Petri estériles de 90 mm de diámetro. Las placas fueron conservadas en cámara fría a 4 °C y en oscuridad hasta el momento de su utilización.

Solución salina de NaCl al 0,9 %

- Cloruro sódico (NaCl) 0,9 g
- Agua destilada 100 mL

Para elaborar esta solución se disolvieron 0,9 g de cloruro sódico en 100 mL de agua destilada y se distribuyó en tubos de ensayo a razón de 9 mL por tubo. Los tubos fueron finalmente esterilizados en autoclave bajo las mismas condiciones que los medios anteriores y posteriormente conservados en cámara fría a 4 °C y oscuridad. hasta el momento de su utilización.

III.4. Diseño Experimental

Con el fin de alcanzar el objetivo principal del trabajo, se realizaron 3 ensayos, dos de ellos *in vitro* con objeto de seleccionar las mejores cepas antagonistas y promotoras del crecimiento vegetal y, un tercero *in vivo*, para determinar su posible aplicación en semilleros de lechuga. Para la determinación del efecto *in vitro* de las cepas sobre el crecimiento de *B. cinerea*, o sobre la germinación de las semillas, se diseñaron experimentos en los que la bacteria no estuviera en contacto directo ni con el hongo ni con la semilla, respectivamente, de modo que el efecto observado se debiera exclusivamente a los volátiles producidos por la bacteria. En función del grado de inhibición del crecimiento del patógeno, así como de su capacidad para promover la germinación, se seleccionaron las mejores cepas, las cuales fueron posteriormente evaluadas *in vivo*. En este último ensayo, se evaluó tanto la capacidad de los COVs bacterianos para promover el crecimiento vegetal en fases posteriores a la germinación, como su capacidad para paliar los daños causados por *B. cinerea* en plántulas de lechuga. En la Figura 6, se muestra el plan de trabajo diseñado para la consecución de los objetivos de este trabajo.

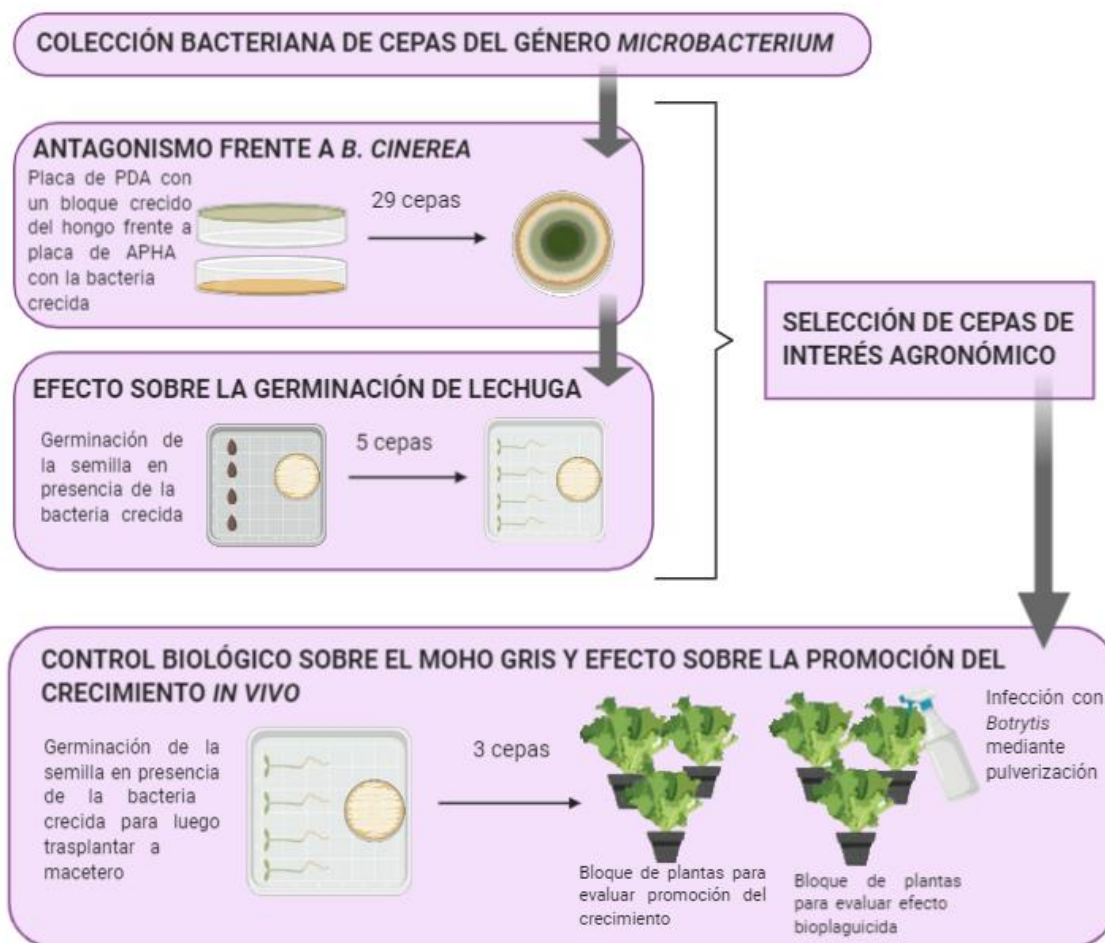


Figura 6: Diseño experimental

III.5. Ensayo de antagonismo *in vitro* frente al crecimiento de *Botrytis cinerea* mediante la producción de COVs: método *sandwich*

Para determinar el efecto inhibitor de los compuestos volátiles producidos por las diferentes cepas de *Microbacterium* frente a *B. cinerea* se utilizó la técnica de cultivo dual en *sandwich* descrita por Raza et al. (2015) y Boukaew et al. (2017).

A partir de cultivos frescos de cada una de las cepas crecidas en medio APHA, se realizó una siembra en masa de las mismas en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio APHA, las cuales fueron cuidadosamente selladas con Parafilm M™. Tras 72 horas de incubación a 30 °C, las placas crecidas se colocaron formando un *sandwich* con otra mitad de una placa de PDA, en la que se había colocado centralmente un bloque del hongo fitopatógeno, previamente crecido en PDA durante una semana (Figura 7). Ambas placas se sellaron con Parafilm M™ para obtener el cultivo dual tipo *sandwich*, y se cultivaron en cámara a 25 °C durante 7 días, realizando una medida del diámetro de crecimiento del hongo a los 4 (T4) y 7 días de incubación (T7).

Los ensayos llevados a cabo con cada cepa bacteriana se realizaron por duplicado, de forma que se tomaron dos medidas de diámetro de crecimiento a partir de cada réplica. Como control de crecimiento del patógeno, se utilizó una placa de medio APHA vacía, enfrentada a otra de PDA inoculada con un bloque crecido del hongo.

Ensayo de antagonismo de *Microbacterium* frente a *B. cinerea* (producción de COVs)

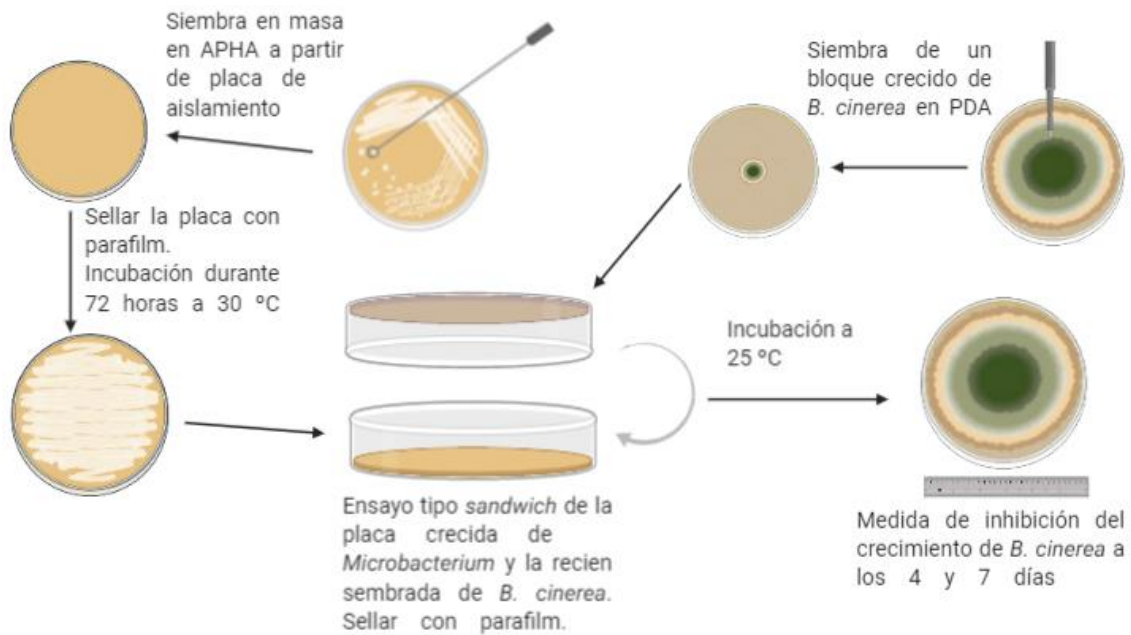


Figura 7: Ensayo de antagonismo de las cepas de *Microbacterium* spp. frente a *B. cinerea* mediante la producción de COVs (método sandwich)

Transcurrido el tiempo de incubación se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo en presencia de cada cepa de la colección. Para ello se tuvo en cuenta el diámetro máximo alcanzado por el micelio del hongo en las placas control, considerando un 0% de inhibición cuando el hongo en presencia de la bacteria creció de manera similar a lo observado en las placas control. A continuación, se indica la fórmula empleada para el cálculo de los índices de inhibición:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left(\frac{D_{cr} \text{ (mm)}}{D_c \text{ (mm)}} \times 100 \right)$$

D_{cr}: Diámetro de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria (mm)

D_c: Diámetro de crecimiento del hongo en la placa control (mm)

III.6. Efecto estimulante/fitotóxico *in vitro* de la producción de COVs sobre la germinación de semillas de lechuga

Para determinar el efecto de los COVs producidos por las diferentes cepas de *Microbacterium* sobre la germinación de semillas de lechuga se empleó el método descrito por Cordovez et al. (2018). A partir de cultivos frescos de cada una de las cepas en medio APHA, se realizó la siembra en masa en placas Petri de 45 mm con este mismo medio de cultivo, y se sellaron cuidadosamente con Parafilm M™. Las placas se incubaron durante 72 horas a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó un cuadrado de papel de filtro humectado con 4 mL de agua destilada estéril, en la base de placas cuadradas de 120 x 120 mm (Figura 8).

Ensayo de germinación con semillas de lechuga en presencia de cultivo de *Microbacterium* (producción de COVs)

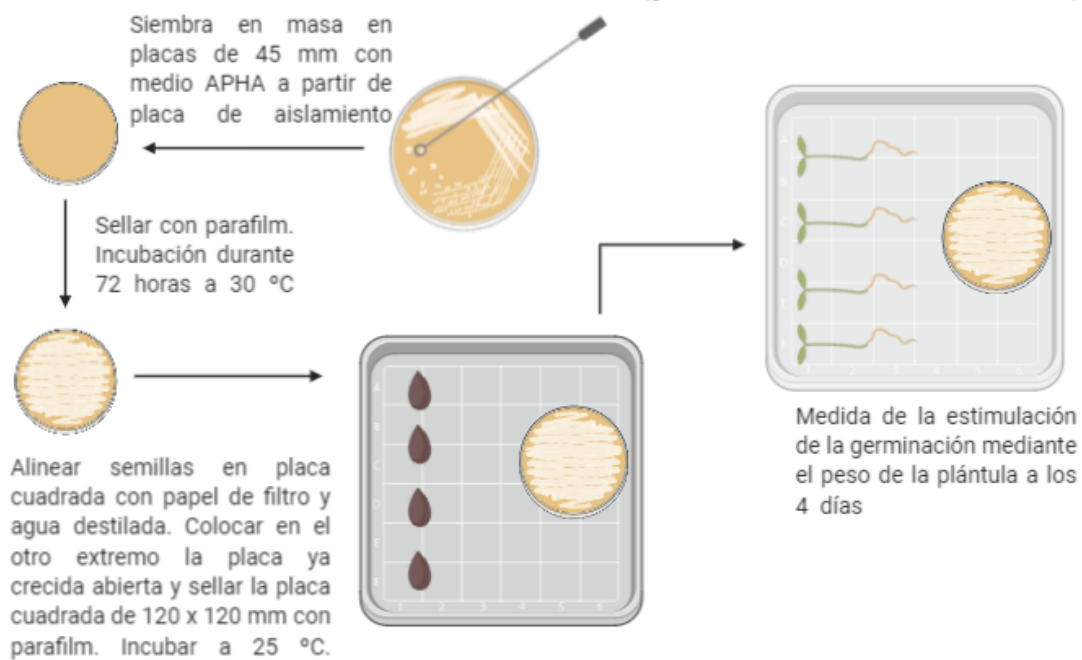


Figura 8: Ensayo para visualizar el efecto de las cepas de *Microbacterium* spp. sobre la germinación de lechuga mediante la producción de COVs.

En un extremo de la placa se dispusieron en línea 25 semillas de lechuga (*Lactuca sativa*, variedad Romana) y en el extremo opuesto, la placa Petri de 45 mm previamente crecida con cada una de las cepas de la colección, y abierta para favorecer la difusión de los COVs (Figuras 8 y 9). Las placas Petri de 120 x 120 mm se cerraron y sellaron con Parafilm M™ y se incubaron durante 4 días a 25 °C. Como control del ensayo, se utilizaron placas de 120 x 120 mm en las que se incluyeron placas Petri de 45 mm con medio APHA sin inocular, frente a las 25 semillas de lechuga alineadas.

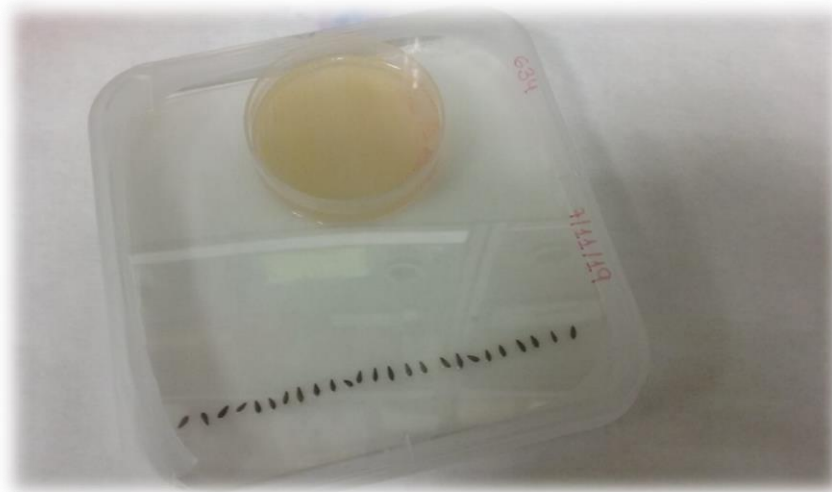


Figura 9: Ensayo para visualizar el efecto de las cepas de *Microbacterium* spp. sobre la germinación de lechuga mediante producción de COVs. Un papel de filtro humectado con agua destilada recubre todo el fondo de una placa cuadrada de 120 x 120 mm. En una mitad de la placa cuadrada, se dispone una placa abierta de 45 mm con la bacteria crecida en medio APHA. Frente al cultivo bacteriano, se alinean 25 semillas de lechuga. La placa cuadrada se encuentra cerrada y sellada con Parafilm.

Para cada cepa bacteriana se realizaron cuatro réplicas del ensayo, con 25 semillas cada una. Transcurrido el tiempo de incubación (4 días), se cuantificó el efecto sobre la germinación mediante el incremento de la medida del peso total de las semillas germinadas para cada cepa, en función a lo observado en las placas control.

III.7. Efecto *biopriming* de cepas de *Microbacterium* spp. productoras de COVs frente al desarrollo de los síntomas provocados por *Botrytis cinerea* así como sobre el efecto promotor del crecimiento en plántulas de lechuga

Con el objeto de evaluar el efecto *biopriming* de los COVs producidos por las mejores cepas de *Microbacterium*, en relación tanto a su capacidad para promover el crecimiento vegetal como para suprimir los daños causados por *Botrytis cinerea*, se realizó un ensayo *in vivo* en plántulas de lechuga.

Una vez seleccionadas las mejores cepas de *Microbacterium*, se repitió el protocolo de activación de semillas de lechuga siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.6. A partir de las semillas germinadas y activadas en presencia de COVs, los brotes se pasaron a maceteros de 300 mL de capacidad, con una mezcla de sustrato:vermiculita en proporción 3:1 (v:v) (Figura 10).



Figura 10: Fotografía de una semilla germinada recién trasplantada a macetero (la semilla fue previamente germinada en una placa sellada expuesta a los volátiles producidos por un cultivo bacteriano, pero sin contacto directo con él).

Transcurridas 2 semanas después del trasplante, las plántulas fueron pulverizadas con una suspensión de esporas de *B. cinerea* preparada a partir de un cultivo fresco del hongo en medio PDA, crecido durante 7-10 días. Dicha suspensión se obtuvo recogiendo las esporas presentes en dicho cultivo, en 10 mL de solución salina estéril, con ayuda de un escobillón. Tras eliminar la parte correspondiente al micelio fúngico mediante filtración con tela de muselina estéril, se obtuvo una suspensión de esporas que fue cuantificada en cámara de Neubauer, y posteriormente ajustada con agua del grifo a una densidad de inóculo en torno a 10^6 esporas/mL. La suspensión diluida de esporas se introdujo en un asperjador y, finalmente, se procedió a la infección de las plantas vía foliar, aplicando tres pulverizaciones por planta (Figura 11). Para favorecer el proceso de infección, las plantas se mantuvieron durante 3 días en el interior de una cámara húmeda, a 25 °C y una humedad ambiental superior al 60%.

Ensayo *in vivo* de protección frente a *B. cinerea* mediante producción de COVs



Figura 11: Ensayo *in vivo* del efecto de las cepas de *Microbacterium* spp. para detectar promoción del crecimiento vegetal y/o protección frente a *B. cinerea* mediante la activación previa con microorganismos productores de COVs.

El ensayo completo se llevó a cabo por duplicado, de forma que pudiera evaluarse el efecto del *biopriming* en plantas no infectadas con el hongo fitopatógeno. Transcurridas 3 semanas desde

el momento en el que se llevó a cabo la infección con *B. cinerea* se evaluaron los posibles daños ocasionados por el hongo fitopatógeno. Para ello, se consideró la utilización de una escala de daño estableciéndose el valor de 1 para las plantas más sanas, 2 para las plantas afectadas y 3 para las plantas muertas. En el set de plantas no sometidas al efecto del patógeno, se analizó el efecto del *biopriming* sobre el Número y Longitud de Hojas, Área Foliar y Longitud de la Radícula.

Adicionalmente, dos bloques de plantas control fueron previamente germinadas en ausencia de microorganismos. Uno de ellos se consideró el bloque control positivo, el cual fue infectado con *B. cinerea*, mientras que el segundo de ellos sirvió como bloque control negativo, el cual no fue sometido a ningún tipo de tratamiento.

III.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos como resultado de los diferentes ensayos realizados utilizando el paquete estadístico Statgraphics 18 (Statistical Technologies, Inc.). Para ello se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial a un intervalo de confianza del 95%, así como el Test de Mínima diferencia Significativa de Fisher (LSD), gracias al cual se evaluó qué niveles dentro de cada factor mostraban diferencias significativas entre sí. Adicionalmente, se han utilizado los gráficos de Interacciones para evaluar la influencia de la interacción entre los distintos factores analizados.

IV. Resultados y Discusión

En función del plan de trabajo indicado en el apartado III.4 de Materiales y Métodos, se describirán a continuación los resultados obtenidos a partir de cada bloque experimental. La descripción y discusión de dichos resultados se agrupará en tres apartados bien diferenciados. En primer lugar, (i) se mostrarán los resultados relacionados con el ensayo de inhibición *in vitro*, mediante producción de COVs, entre el hongo *Botrytis cinerea* y la colección de cepas de *Microbacterium* spp. En segundo lugar, (ii) se indicarán los resultados relativos al bioensayo de estimulación de la germinación de semillas de lechuga *in vitro* y, finalmente (iii) aquellos derivados de la aplicación de las mejores cepas seleccionadas en plántulas de lechuga.

IV.1. Búsqueda de agentes microbianos antagonistas frente al crecimiento de *Botrytis cinerea*

El objetivo de este bloque experimental fue determinar qué cepas de la colección de *Microbacterium* spp. (Tabla 2) ejercían un mayor efecto inhibitorio frente a *B. cinerea* gracias a la producción de COVs. Para ello, tal y como se describe en el apartado III.5 de Materiales y Métodos, se prepararon bioensayos de tipo *sandwich*, con objeto de determinar la inhibición del hongo fitopatógeno debida a la producción de COVs por parte de las cepas de *Microbacterium* spp. La inhibición del crecimiento del hongo se determinó mediante la comparación del diámetro de crecimiento del mismo, respecto a una placa control en ausencia de cepa antagonista. En la Figura 12 se puede apreciar un ejemplo del carácter antagónico de los COVs producidos por la cepa M1 frente al crecimiento de *B. cinerea*, en comparación con otra cepa (M81) que no mostró efecto antagonista.

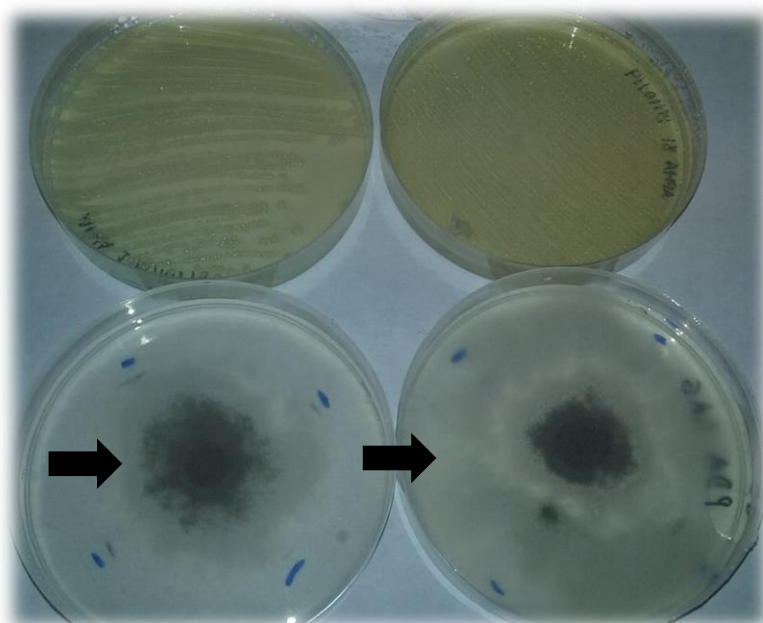
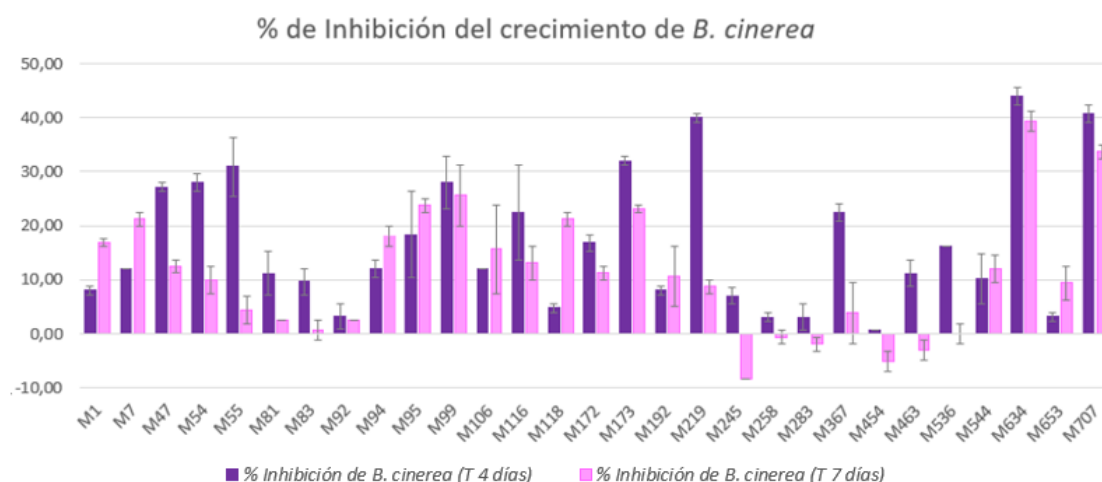


Figura 12: Efecto antagónico derivado de los COVs producidos por la cepa M1 (arriba-izquierda) frente a *B. cinerea* (abajo-izquierda). Efecto no antagónico producido por la cepa M81 (arriba derecha) frente a *B. cinerea* (abajo-derecha). La flecha negra indica el límite de crecimiento del micelio del hongo fitopatógeno.

Los datos relativos al porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo en función de cada una de las cepas analizadas se muestran en la Figura 13, donde se representa dicho porcentaje, transcurridos 4 y 7 días desde el inicio del experimento.



13: Representación gráfica del porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio del hongo debido a la producción de COVs por parte de las cepas de la colección.

Como se puede observar en la Figura 13, todas las cepas mostraron, en mayor o menor grado, resultados positivos en la medida de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* realizada a los 4 días. Algunas de ellas, como es el caso de la M55, M173, M219, M634 y M707, mostraron porcentajes de inhibición superiores al 30% de media. Hay que indicar que, transcurridos 7 días desde el inicio del ensayo, el efecto inhibitorio de algunas cepas se vio reducido, llegando incluso a mostrar un efecto estimulador del crecimiento fúngico (M245, M258, M283, M454, y M463). No obstante, las diferencias establecidas en función de los días de incubación, parecieron ser dependientes de la cepa ensayada, ya que se observó un comportamiento diferente en cada caso (Figura 13).

En cuanto al análisis estadístico de los resultados de inhibición de *B. cinerea in vitro*, se realizó un análisis ANOVA multifactorial que mostró la influencia significativa ($P < 0,05$) del factor Cepa (Figura 14). Así mismo, la interacción entre los factores Cepa x Tiempo, también fue estadísticamente significativa (Figura 15). A la vista de lo observado en la Figura 14, destacaron globalmente como más efectivas (independientemente del tiempo de medida), las cepas M634 y M707 (rodeadas en color verde), seguidas por las cepas M173, M219 y M99 (rodeadas en color

naranja). Por otra parte, se consideraron como cepas neutras o inefectivas desde un punto de vista estadístico, las cepas M245, M258, M283 y M454 (Figura 14).

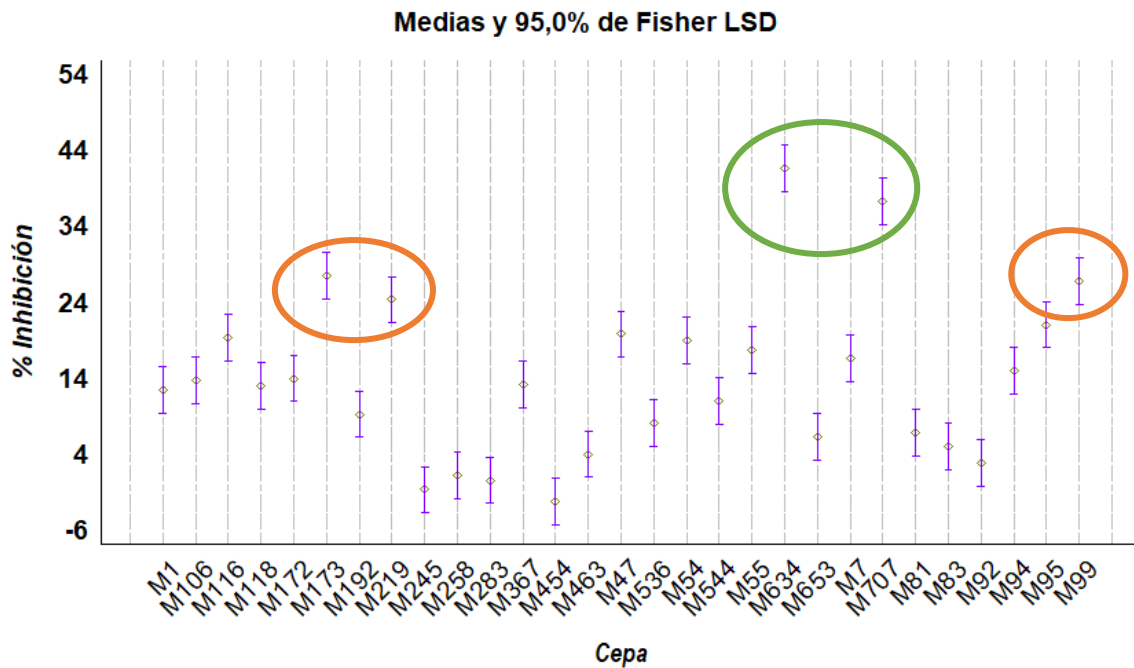


Figura 14: Influencia de las diferentes cepas de la colección sobre la inhibición del crecimiento in vitro del hongo *B. cinerea* (Test de Mínima Diferencia Significativa a un intervalo de confianza del 95 %).

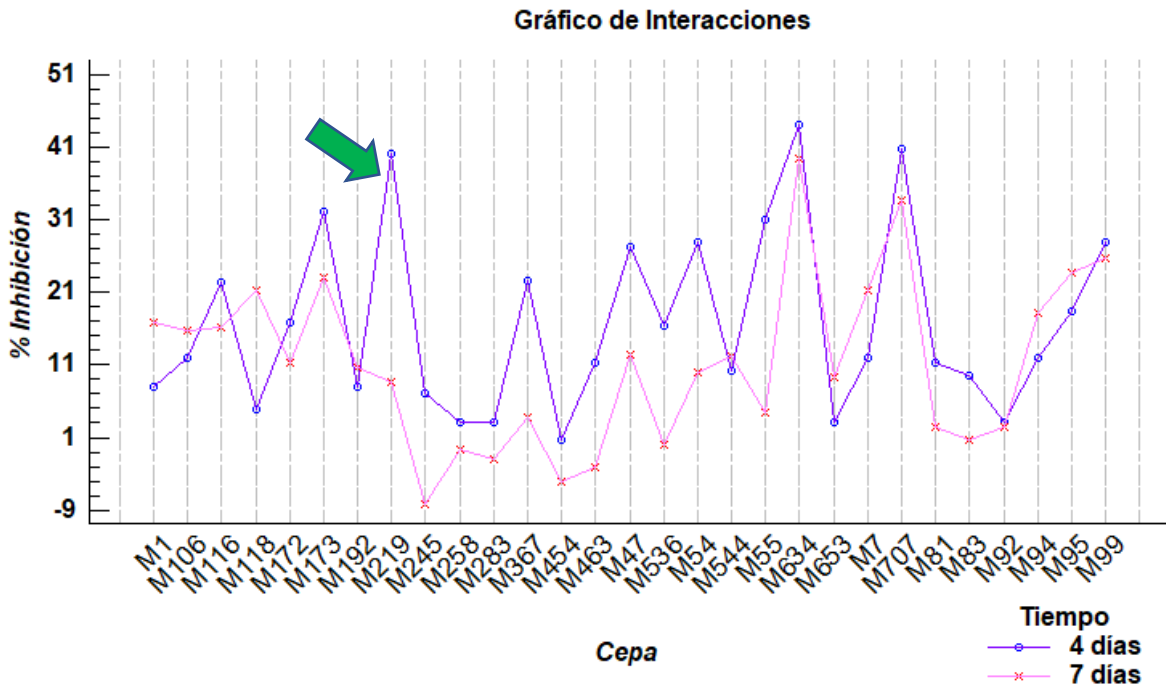


Figura 15: Gráfico de Interacciones entre los factores Cepa x Tiempo: efecto sobre la inhibición del crecimiento in vitro del hongo *B. cinerea*.

El gráfico de interacciones mostrado en la Figura 15 revela, en términos generales, un mejor efecto inhibitorio cuando se realizó la medida del crecimiento de *B. cinerea* después de 4 días de incubación, lo que pudo deberse a que la concentración de COVs después de 4 días comenzara a disminuir en el interior de las placas. Un claro ejemplo de esto se observó en el caso de la cepa M219 (Figura 15, flecha verde), ya que la inhibición del crecimiento del hongo fue notable a los 4 días de incubación, mientras que se redujo significativamente a los 7 días. Sin embargo, un efecto opuesto fue detectado en el caso de las cepas M118, M653, M7, M94 y M95, ya que el efecto inhibitorio fue algo mayor transcurridos 7 días desde el inicio del ensayo. Este hecho puede revelar un efecto diferente de las cepas de *Microbacterium* en cada caso, ya que algunas ejercieron un efecto antagonista más inmediato, mientras que otras lo hicieron de forma más retardada. Aun así, el porcentaje de inhibición se mantuvo constante en el caso de las cepas M634 y M707 (Figura 15).

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron aquellas cepas que mostraron un grado de inhibición frente al crecimiento de *B. cinerea* superior al 30%, transcurridos 4 días desde el inicio del ensayo. Bajo este criterio, las cepas seleccionadas para la realización del siguiente bloque experimental fueron M55 (*M. aerolatum*), M173 (*M. indicum*), M219 (*M. foliorum*), M634 (*M. esteraromaticum*) y M707 (*M. profundum*).

B. cinerea se encuentra entre los 10 principales patógenos fúngicos que afectan a la parte aérea de cultivos vegetales muy diversos (Sarven et al., 2020). Hasta el momento, el uso de fungicidas químicos ha sido el método más comúnmente utilizado para su control. Sin embargo, tales prácticas conllevan un importante riesgo ambiental y de desarrollo de resistencias frente a fitosanitarios. Debido a esto, cada vez más se apuesta por alternativas ecológicas, más respetuosas con el medio ambiente y la salud (Sarven et al., 2020). Concretamente, tales alternativas se vuelcan más hacia el uso de cepas bacterianas ya que tanto la manipulación genética y bioquímica, así como su producción en masa, resulta más fácil que en el caso de hongos (Shoda, 2000). Los principales géneros bacterianos identificados como agentes de control biológico son *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia*, aunque se han descrito muchos otros que poseen esta capacidad (Ahmad et al., 2008).

Algunos autores han descrito la capacidad de determinadas rizobacterias para producir compuestos orgánicos volátiles (COVs), capaces de difundir a través de los espacios (poros) del suelo, lo que resulta una estrategia interesante para su aplicación potencial como agentes de control biológico (Morath et al., 2012). Sin embargo, es lógico pensar que la actividad antifúngica de cada cepa dependerá de la composición de COVs que sea capaz de generar, pues las propiedades químicas de estos compuestos, tales como la longitud de cadena carbonada, la posición y el número de dobles enlaces, las porciones hidrofóbicas o la estructura química general, pueden ser muy diversos (Ye et al., 2020).

Algunos trabajos *in vitro* previos, relacionados con antagonismo derivado de COVs producidos por diferentes especies bacterianas frente a hongos, han confirmado el efecto inhibitorio de estos compuestos frente al crecimiento de hongos fitopatógenos. Así, Gao et al. (2017),

obtuvieron índices de inhibición frente a *B. cinerea* de hasta el 92%, a partir de una cepa de *Bacillus velezensis* productora de COVs.

Los valores máximos de inhibición obtenidos en este trabajo del crecimiento de *B. cinerea* se encuentran en torno al 40%. Resultados similares fueron obtenidos por Sarven et al. (2020), quienes obtuvieron índices de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* de alrededor del 43,9%, por parte del hongo de suelo *Metarhizium anisopliae*. De igual modo, Boukaew et al. (2017) describieron índices similares a partir de cepas de *Streptomyces* spp. productoras de COVs.

IV.2 Búsqueda de cepas de *Microbacterium* con capacidad para promover la germinación en lechuga

Para evaluar el efecto de la producción de COVs sobre la germinación *in vitro*, se dispusieron semillas de lechuga sobre papel de filtro estéril y humectado con agua, tal y como se describe en el apartado III.6. de Material y Métodos. En este bloque experimental se utilizaron cultivos frescos de las cepas seleccionadas previamente (M55, M173, M219, M634 y M707), crecidos en agar APHA. Ya que los cultivos microbianos no establecieron contacto en ningún momento con las semillas de lechuga, el efecto de las cepas fue adjudicado exclusivamente a la producción de COVs. En la Figura 16 se muestra el efecto de la producción de COVs por parte de las cepas seleccionadas, expresado como porcentaje de incremento del peso radicular, en comparación con el control de semillas en ausencia de cultivo microbiano.

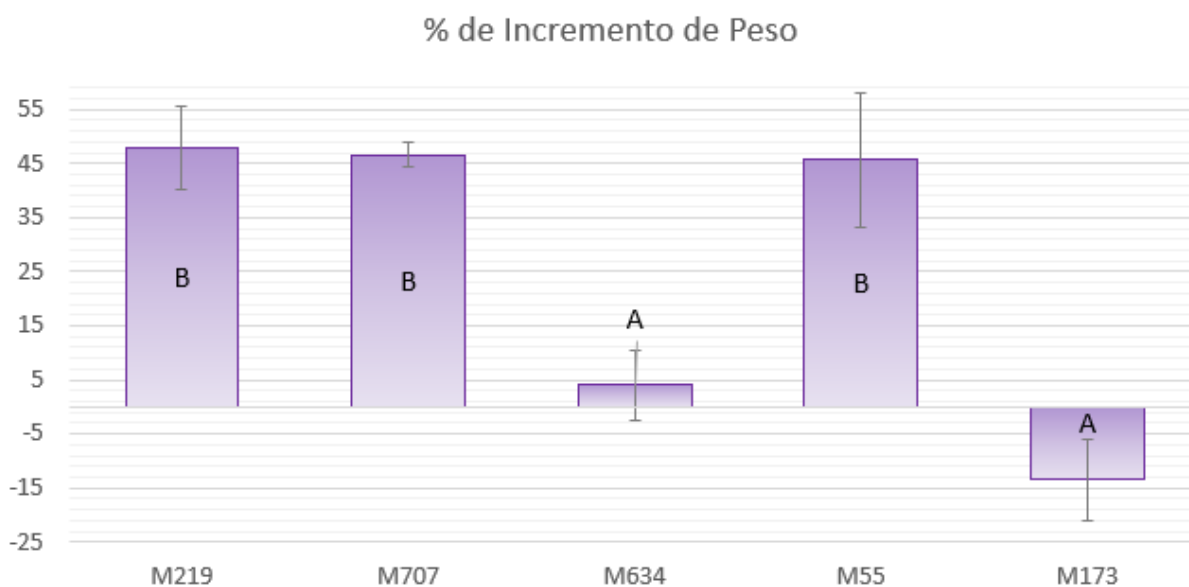


Figura 16: Representación gráfica del porcentaje de incremento de peso radicular producido por las cepas seleccionadas productoras de COVs. Letras diferentes hacen referencia a grupos de homogeneidad diferentes según el Test de Mínima Diferencia Significativa ($P < 0,05$).

Tres de las cepas ensayadas, en concreto la M219, M707 y M55, produjeron un efecto muy positivo en lo que se refiere al incremento del peso radicular, alcanzando valores significativamente superiores a los detectados en los ensayos control, en ausencia de cepas

(Figura 16). Al contrario, las cepas M634 y M173 apenas generaron incremento de peso con respecto a los controles, o incluso en el caso de la cepa M173, el efecto fue perjudicial para la germinación y desarrollo radicular de las semillas de lechuga. Estadísticamente las 5 cepas ensayadas pudieron clasificarse en dos grupos de homogeneidad. Las cepas M634 y M173, se clasificaron como grupo A, caracterizadas por su fitotoxicidad, mientras que las otras tres cepas se clasificaron como grupo B, mostrando un importante efecto fitoestimulador. Dicho efecto fue atribuido en su mayoría a la producción bacteriana de COVs, o incluso también a compuestos inorgánicos que se concentran en el interior de las placas, tal y como describen Cordovez et al., (2018). Estas tres últimas cepas, M219, la M707 y M55, fueron las seleccionadas para pasar al ensayo *in vivo*, (bloque experimental III), ya que resultaron ser buenas antagonistas frente al crecimiento del hongo *B. cinerea* y, además, mostraron un marcado carácter estimulador de la germinación.

A pesar de que el género *Microbacterium* se encuentra en diversos hábitats naturales, su potencial para actuar como PGPMs a través de la producción de COVs no ha sido estudiado en profundidad. En este bloque experimental, las semillas de lechuga se expusieron a la producción de COVs bacterianos durante 4 días, mediante una estrategia comúnmente conocida como *priming* (Cordovez et al., 2018), la cual permite a la planta mantener los efectos de la promoción del crecimiento, una vez incluso concluida la exposición.

Algunos autores defienden que la respuesta de la semilla y, en general, de la planta a la presencia de volátiles microbianos puede ser muy variable y dependiente de la composición de los mismos (Cordovez et al., 2018). Este hecho sugiere que la síntesis de COVs bioactivos es un carácter específico de cada cepa. Por otra parte, en función del medio de crecimiento utilizado para los ensayos de *priming*, el perfil de emisión de COVs será diferente (Insam y Seewald, 2010). En el bloque experimental descrito en este apartado del trabajo, se utilizó APHA, un medio general para el cultivo bacteriano rico en nutrientes, en el que todas las cepas pudieron crecer de forma óptima.

Entre las diferentes mezclas de compuestos volátiles de origen microbiano, se han descrito algunas que pueden ser perjudiciales para el crecimiento vegetal. Este hecho se puso de manifiesto por Blom et al. (2010), quienes utilizaron cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Serratia* y *Chromobacterium* para evaluar su efecto sobre la promoción vegetal en *Arabidopsis thaliana*. Concluyeron que el efecto negativo podría deberse a la elevada concentración de HCN que incluía la mezcla de volátiles, lo que podría resultar tóxico para la planta. Cabe plantear, si el efecto observado a partir de la aplicación de la cepa M173, podría estar relacionado con una elevada concentración de este compuesto.

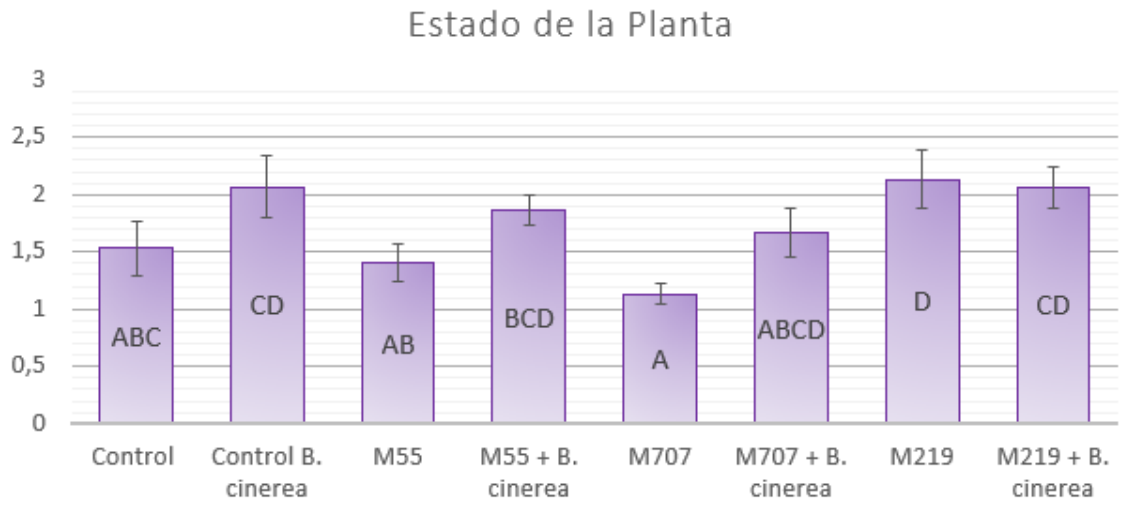
Hasta hoy, la mayoría de los estudios sobre la promoción del crecimiento vegetal por parte de bacterias productoras de COVs han tratado sobre los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. En un ensayo realizado por Raza et al. (2016), a partir de diferentes cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus*, se obtuvieron resultados de promoción del crecimiento en *Arabidopsis thaliana* que oscilaron entre 80 y 190% sobre el control. Otros trabajos más cercanos al que aquí se plantea, realizados con cepas del género *Microbacterium*, revelaron un

incremento de la biomasa de brotes de lechuga de hasta el 178%, con respecto a lo observado en los controles no tratados (Cordovez et al., 2018), mientras que sólo fue del 44% cuando se aplicó en semillas de tomate.

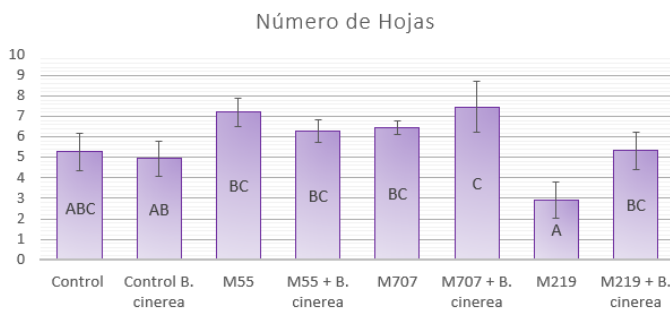
IV.3 Ensayo *in vivo* de protección frente a *Botrytis cinerea* mediante producción de COVs

Con objeto de aplicar *in vivo* aquellas cepas de *Microbacterium* spp. que habían mostrado los mejores resultados de promoción de la germinación y de inhibición de *B. cinerea*, de nuevo se germinaron semillas de lechuga *in vitro* en presencia de las cepas bacterianas seleccionadas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.6. de Material y Métodos. Con ello se pretendió provocar el efecto *priming* de las semillas gracias a la producción de los COVs por parte de las cepas. Una vez germinadas, se trasplantaron a macetero y se procedió con el desarrollo experimental descrito en el apartado III.7. de Material y Métodos. Sólo una parte de las plántulas de lechuga fueron infectadas con una suspensión de esporas de *B. cinerea* mediante pulverización. La otra mitad de las plantas su mantuvo como control de tratamiento de las distintas cepas aplicadas mediante *priming*. Transcurridas tres semanas desde la infección con el agente fitopatógeno, se llevó a cabo la evaluación del estado de salud general de las plántulas, estableciéndose un criterio numérico del 1 al 3 (1: planta en buen estado, 2: planta afectada / con síntomas, 3: planta muerta). Los resultados relativos a la salud general de la planta se muestran en la Figura 17a. En general, el estado de salud de las plántulas fue peor en aquellas que habían sido infectadas con *B. cinerea*, con respecto a aquellas consideradas como controles sanos. Sin embargo, teniendo en cuenta solo aquellas plantas infectadas con el hongo, el efecto fue ligeramente menor cuando habían sido previamente “primadas” con las cepas M55 y M707, en la fase previa de germinación. Por otro lado, los bloques de plantas tratadas con estas cepas pero que no fueron infectados con *B. cinerea* mostraron un aspecto más saludable que incluso los controles sanos, lo que podría revelar un importante efecto fitoestimulador de dichas cepas. De forma opuesta a lo indicado anteriormente, cabe destacar que las plántulas “primadas” con la cepa M219 se vieron afectadas negativamente incluso, sin haber sido infectadas con el hongo fitopatógeno (Figura 17a).

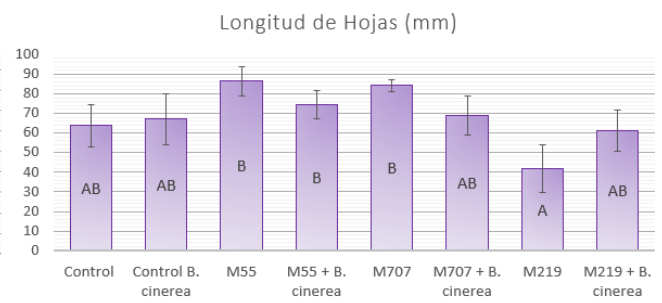
(a)



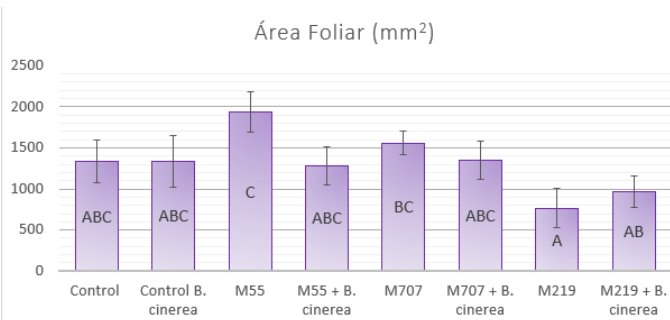
(b)



(c)



(d)



(e)

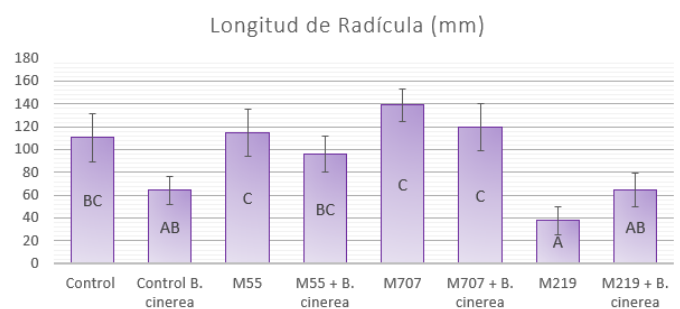


Figura 17: Representación gráfica de la influencia de cada uno de los tratamientos aplicados a las plantas de lechuga sobre diferentes parámetros vegetales y sobre el control de los síntomas producidos por *B. cinerea*. (a) El estado general de la planta, calificado de 1 a 3 (1: sana, 2: síntomas aparentes, 3: muerta); (b) Número de hojas promedio por plántula; (c) Longitud promedio alcanzada por las dos hojas de mayor tamaño; (d) Área folia promedio; (e) Longitud promedio de la radícula. Las letras indicadas en cada bloque experimental se corresponden con los grupos de homogeneidad según el Test de Mínima Diferencia Significativa (LSD) a un intervalo de confianza del 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas en distintos bloques experimentales.

Con respecto al resto de parámetros vegetales analizados, hay que indicar que a pesar de que no se establecieron claras diferencias significativas con respecto a los tratamientos empleados, se observó un efecto beneficioso de la aplicación de las cepas M55 y M707 en relación al número promedio de hojas y longitud promedio de hojas (Figuras 17b y 17c). De hecho, el efecto de la infección con *B. cinerea* en plantas previamente “primadas” con estas cepas se vio claramente amortiguado con respecto a estos parámetros.

Aunque la infección con *B. cinerea* mediante pulverización no influyó significativamente sobre la medida de área foliar (Figura 17d), si se pudo observar, especialmente en aquellas plántulas previamente “primadas” con la cepa M55, un incremento estadísticamente significativo de este parámetro (Figura 17d). Algo más discreto fue el efecto provocado por la cepa M707.

Con respecto a la medida de longitud de la radícula, pudo observarse un incremento notable de este parámetro, especialmente en aquellas plantas previamente “primadas” con la cepa M707 (Figura 17e). Dicho efecto pudo detectarse tanto en plantas infectadas o no con *B. cinerea* lo que significa que la cepa M707 pudo de algún modo amortiguar los daños provocados por el hongo fitopatógeno. Por otra parte, el tratamiento con la cepa M55, aunque de forma menos llamativa, también derivó en una tendencia al incremento de la longitud radicular, tanto en plantas infectadas o no con *B. cinerea* (Figura 17e).

De forma contraria a lo observado para aquellos bloques tratados con las cepas M55 y M707, la previa “primación” de las semillas con la cepa M219 afectó negativamente a todos los parámetros de crecimiento vegetal analizados y no consiguió paliar los daños provocados por la infección con *B. cinerea*, por lo que fue descartada como potencial agente de control en semilleros de lechuga.

Algunos autores han descrito que la detección de compuestos volátiles en el entorno de la planta puede afectar a la regulación del crecimiento vegetal y al desencadenamiento de una respuesta sistémica inducida, lo cual podría prevenir de posibles ataques futuros por patógenos (Tahir et al., 2017). De igual modo, Cordovez et al. (2018) afirman que el tratamiento con volátiles derivados de cepas de *Microbacterium* spp. mediante exposiciones breves, puede ejercer un efecto promotor del crecimiento vegetal sin necesidad de contacto entre los dos organismos. Dicha alternativa podría ser de gran utilidad de forma que pudiera ser aplicada de forma previa al momento del trasplante, sin necesidad de añadir el microorganismo al sustrato de cultivo o al suelo.

El análisis de los datos obtenidos en este trabajo ha revelado un efecto promotor del crecimiento vegetal en plántulas de lechuga previamente “primadas” con las cepas M55 y M707. Dicha mejora se ha puesto de manifiesto en relación a parámetros de básicos como son el número y la longitud de las hojas, el área foliar o la longitud de la raíz. Dicho efecto fue también observado de forma significativa en el trabajo realizado por Tahir et al. (2017), quienes describieron el efecto de los COVs producidos por *Bacillus subtilis* sobre la promoción del crecimiento de plantas de tomate. Estos autores observaron que las medidas de peso fresco y seco, longitud de los brotes, área foliar y longitud de la raíz, se duplicaron con respecto a los controles no tratados.

En cuanto a los grupos de plantas tratadas con las cepas M55 y M707, también se detectó cierta capacidad para contrarrestar los daños provocados por el *B. cinerea*. Estudios similares llevados a cabo frente al efecto de la fusariosis en el cultivo de sandía, mostraron que algunas cepas de *Bacillus subtilis* productoras de COVs fueron capaces de reducir los efectos del patógeno en un 51,1% (Zhu et al., 2020). Por su parte, Russi et al. (2020), investigaron acerca de la posibilidad de combatir los efectos de la enfermedad del pie negro de la vid, causada por patógenos fúngicos de diferentes géneros como *Cylindrocarpon*, *Campylocarpon*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria*, *Cylindrocladiella* y *Thelonectria*. Así, analizaron un conjunto de parámetros vegetales morfofisiológicos tras ser tratadas previamente con *Bacillus subtilis* e infectadas con los distintos patógenos. Estos autores encontraron importantes beneficios a nivel del número de hojas, longitud de los brotes y el peso seco de la raíz.

Por tanto, los resultados derivados de este trabajo revelan que la aplicación de determinadas cepas de *Microbacterium* spp., productoras de COVs, provoca un notable efecto promotor del crecimiento así como la amortiguación del efecto provocado por *Botrytis cinerea* en plántulas de lechuga. Con vistas a la aplicación de futuras estrategias Agrobiotecnológicas, se seleccionaron las cepas M707 (*M. profundum*) y M55 (*M. aerolatum*) como las más efectivas, y, por tanto, las de mayor interés agronómico. Ambas cepas mostraron un grado de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea in vitro* superior al 30%, fueron capaces de estimular significativamente la germinación *in vitro* de semillas, provocando incrementos de peso radicular en torno al 45% y, por último, la aplicación de ambas cepas mediante *priming* en semillas reveló cierto efecto promotor del crecimiento de plántulas así como la supresión de los efectos perjudiciales del moho gris en plantas de lechuga.

V. Conclusiones

1. La puesta a punto de bioensayos en formato “sandwich” ha permitido la identificación de cepas de *Microbacterium* spp. productoras de COVs capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*.
2. La técnica de “primación” o *priming* de semillas *in vitro* ha puesto de manifiesto el efecto beneficioso de la aplicación de cepas de *Microbacterium* spp. productoras de COVs sobre el incremento del peso radicular en brotes de lechuga.
3. La “primación” o *priming* de semillas de lechuga en fases tempranas de crecimiento, con las cepas M707 (*M. profundum*) y M55 (*M. aerolatum*) ha amortiguado los daños posteriores provocados por *B. cinerea*, además de promover el desarrollo aéreo y radicular de las plántulas de lechuga previamente tratadas.
4. El efecto provocado por las cepas de *Microbacterium* spp. productoras de COVs ha resultado ser muy diverso y dependiente de cada cepa en particular. Por tanto, no es posible generalizar con respecto a los efectos agronómicos de dichos compuestos, sino que es imprescindible evaluar cada caso de forma independiente.

VI. Bibliografía

- Abbey, J., Percival, D., Abbey, L., Asiedu, S., Prithiviraj, B., y Schilder, A. (2018). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology*, 29(3), 207-228. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>
- AbuQamar, S., Moustafa, K., y Tran, L. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 262-274. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1271767>
- Agrios, G. (2005). Plant pathology [electronic resource] (5nd ed. 952 p.). New York: Academic Press.
- Ahemad, M., y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan, M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Aparicio-Salmerón, V. y Torres-Gil, M. (1995). Plagas y enfermedades de los principales cultivos hortícolas de la provincia de Almería. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- Bailly A., y Weisskopf L. (2012). The modulating effect of bacterial volátiles on plant growth *Plant Signaling and Behavior*, 7 (1), 79-85. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18418>
- Beltrán-Pineda, M. (2015). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101. https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401
- Blom, D., Fabbri, C., Connor, E., Schiestl, F., Klausner, D., Boller, T., Eberl, L., y Weisskopf, L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Envirometal Microbiology*, 13(11), 3047-3058. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x>
- Blom, D., Fabbri C., Eberl, L., y Weisskopf, L. (2010). Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1000-1008. <https://doi.org/10.1128/aem.01968-10>
- Bolívar-Anillo, H., Garrido, C., y Collado, I. (2019). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>
- Borges, Á., Saraiva, R., y Maffia, L. (2015). Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology*, 40(2), 71-76. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0010-3>

- Boukaew, S., Prasertsan, P., Troulet, C., y Bardin, M. (2017). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* by using *Streptomyces* spp. *Biocontrol*, 62(6), 793-803. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9825-9>
- Cordovez, V., Schop, S., Hordijk, K., Dupré de Boulois, H., Coppens, F., Hanssen, I., Raaijmakers, J., y Carrion, V. (2018). Priming of plant growth promotion by volatiles of root-associated *Microbacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22). <https://doi.org/10.1128/aem.01865-18>
- de-Bashan, L., Hernandez, J., y Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61, 171-189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (2004). *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer. (1st ed. 428 p.) <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>
- Fiddaman, P., O'Neill, T., y Rossall, S. (2000). Screening of bacteria for the suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce (*Lactuca sativa*) using leaf disc bioassays. *Annals of Applied Biology*, 137(3), 223-235. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00063.x>
- Fillinger, S., y Elad, Y. (2016). *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems [electronic resource]*. (1st ed. 489 p.). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., y Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105, 27-39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>
- Gerber, B.J. (2010). Yield response of *Fusarium* infected maize seed treated with biological control agent formulations. Thesis of Master of Science, University of South Africa, Pretoria.
- González, H. y Fuentes, N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista De Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17-31. <https://doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
- Gullino, M. L., Albajes, R., van Lenteren, J. C., y Elad, Y. (Eds.). (1999). Integrated pest and disease management in greenhouse crops. *Kluwer academic publishers*. (1st ed. 545 p.).
- Insam, H., y Seewald, M. (2010). Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility Of Soils*, 46(3), 199-213. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0442-3>
- Koike, S., y Bolda, M. (2016). El moho gris, o pudrición de fresa. *UC Cooperative Extension*. Santa Cruz. Recuperado de: <https://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>.
- Liu, X., y Yang, J. (2004). Prp8 intein in fungal pathogens: target for potential antifungal drugs. *FEBS Letters*, 572(1-3), 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.016>

- Morath, S., Hung, R., y Bennett, J. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- National Center for Biotechnology Information. (2020). Taxonomy browser (*Botrytis cinerea*). Ncbi.nlm.nih.gov. Retrieved 5 May 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=40559>
- Raza, W., Yousaf, S., y Rajer, F.U. (2016). Plant growth promoting activity of volatile organic compounds produced by biocontrol strains. *Science Letters*, 4(1):40-43.
- Raza, W., Yuan, J., Ling, N., Huang, Q., y Shen, Q. (2015). Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. *Biological Control*, 80, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.004>
- Rincón-Molina, C., Martínez-Romero, E., Ruiz-Valdiviezo, V., Velázquez, E., Ruiz-Lau, N., Rogel-Hernández, M., Villalobos-Maldonado, J., y Rincón-Rosales, R. (2020). Plant growth-promoting potential of bacteria associated to pioneer plants from an active volcanic site of Chiapas (Mexico). *Applied Soil Ecology*, 146, 103390. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103390>
- Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M. y Santoyo, G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biological Journal of the Biological science Michoacana University of San Nicolas of Hidalgo*, 15(2), 36-41.
- Russi, A., Almança, M., Grohs, D., y Schwambach, J. (2020). Biocontrol of black foot disease on grapevine rootstocks using *Bacillus subtilis* strain F62. *Tropical Plant Pathology*, 45(2), 103-111. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00319-7>
- Sarven, M., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y. y Xiao, X. (2020). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis Cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Pathogens*, 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>
- Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 515-521. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)80049-3](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)80049-3)
- Sowley, E., Dewey, F., y Shaw, M. (2009). Persistent, symptomless, systemic, and seed-borne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 126(1), 61-71. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9524-1>
- Sumer, H., y Yesim, A. (2018). Biological control of watermelon seedling blight caused by *Acidovorax citrulli* using antagonistic bacteria from the genera *Curtobacterium*, *Microbacterium* and *Pseudomonas*. *Plant Protection Science*, 54 (No.3), 138-146. <https://doi.org/10.17221/168/2016-pps>
- Tahir, H., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M., y Gao X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers In Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>

Ye, X., Chen, Y., Ma, S., Yuan, T., Wu, Y., Li, Y., Zhao, Y., Chen, S., Zhang, Y., Li, L., Li, Z., Huang, Y., Cao, H., Cui, Z. (2020) Biocidal effects of volatile organic compounds produced by the myxobacterium *Corrallococcus* sp. EGB against fungal phytopathogens, *Food Microbiology*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103502>

Zhao, J., Liu, D., Wang, Y., Zhu, X., Xuan, Y., Liu, X., Fan, H., Chen, L., y Duan, Y. (2019). Biocontrol potential of *Microbacterium maritopicum* Sneb159 against *Heterodera glycines*. *Pest Management Science*, 75(12), 3381-3391. <https://doi.org/10.1002/ps.5546>

Zhu, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C., Li, Z., Cheng, Y. Chen, J., Guo, L., Sun, X., Yan, Z., Li, J., y Zeng, L. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), 433-441. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00457-6>