



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LIPOPÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS  
PRODUCIDOS POR *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1, EN LA INDUCCIÓN DE  
EXPRESIÓN DE GENES DE CRECIMIENTO Y RESISTENCIA DE *Lupinus*  
*mutabilis*

AUTORA

MARYCRUZ KARINA CORRALES TRÁVEZ

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LIPOPÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS  
PRODUCIDOS POR *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1, EN LA INDUCCIÓN DE  
EXPRESIÓN DE GENES DE CRECIMIENTO Y RESISTENCIA DE *Lupinus*  
*mutabilis*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía

PhD. Viviana del Rocío Yáñez-Mendizábal

Autora

Marycruz Karina Corrales Trávez

Año

2018

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido este trabajo, Evaluación del efecto de lipopéptidos antifúngicos producidos por *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1, en la inducción de expresión de genes de crecimiento y resistencia de *Lupinus mutabilis*, a través de reuniones periódicas con la estudiante Marycruz Karina Corrales Trávez, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Viviana del Rocío Yáñez-Mendizábal  
PhD. en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria  
C. I. 1710469782

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación del efecto de lipopéptidos antifúngicos producidos por *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1, en la inducción de expresión de genes de crecimiento y resistencia de *Lupinus mutabilis*, a través de reuniones periódicas con la estudiante, Marycruz Karina Corrales Trávez, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Fabio Marcelo Idrovo Espín  
Doctor en Ciencias Biológicas: Biotecnología  
C. I. 1705952255

## **DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE**

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

---

Marycruz Karina Corrales Trávez

C. I.0503470577

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Américas, Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) y Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT por el apoyo económico y logístico para el desarrollo de esta investigación a través del proyecto “Mejora de la cadena productiva del chocho (*Lupinus mutabilis*) en Ecuador”.

A la Dra. Viviana Yáñez por brindarme la oportunidad y conocimientos para el desarrollo de esta investigación. Al Dr. Fabio Idrovo por guiarme y compartirme sus conocimientos en todo momento. Al Ing. Byron Freire por su soporte académico en la ejecución de la fase experimental.

## DEDICATORIA

A mis padres Hernan Corrales y Marcia Trávez. Gracias por todos los sacrificios, amor y su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mis hermanas Vanessa y Sofía por ser mi apoyo y motivación diaria.

## RESUMEN

El chocho andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa que por su valor nutricional y tradicional es ampliamente utilizado en la industria alimenticia de la región andina con una proyección creciente a nivel internacional. Sin embargo, a pesar de la alta demanda que posee el cultivo de chocho, su rendimiento es afectado por enfermedades, especialmente fungosas. Dentro de los patógenos fungosos que afectan al chocho la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum acutatum* puede reducir de manera significativa la producción causando pérdidas superiores a 90 Kg ha<sup>-1</sup>. Generalmente, estas enfermedades son tratadas con productos químicos en variadas concentraciones, sin embargo, el uso de alternativas amigables con el medio ambiente como el control biológico mediado por microorganismos puede resultar eficiente para el control de la enfermedad. El control biológico de enfermedades agrícolas mediante el uso de bacterias del género *Bacillus* spp. ha demostrado tener potencial para el control de hongos patógenos de cultivos y en poscosecha. Investigaciones específicas para el control de la antracnosis del chocho andino han demostrado que diferentes aislados de *Bacillus subtilis* controla efectivamente infecciones causadas por *C. acutatum* en campo y en semilla durante la poscosecha. Datos preliminares del aislado de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 evidencian su elevada capacidad de producción de lipopéptidos antifúngicos de las familias de surfactina, iturina y fengicina especialmente a las 72 horas de incubación otorgando eficacia para contrarrestar el crecimiento de *C. acutatum*. Otras investigaciones han demostrado que bacterias como *B. subtilis* funcionan como promotores de crecimiento y de defensa de las plantas, involucrándose genes de transporte de auxinas y relacionados con la patogénesis. En la actualidad, no se ha esclarecido la respuesta molecular generada específicamente por *L. mutabilis* mediada por la interacción de *B. subtilis* y sus lipopéptidos. En este contexto el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios inducidos por *Bacillus subtilis* sobre la expresión de genes de crecimiento y resistencia de *Lupinus mutabilis*. En base al análisis preliminar por HPTLC y PCR se determinó la presencia de las familias de surfactina, iturina y especialmente fengicina en el

aislado Ctpx S2-1 confirmando la capacidad de producción de lipopéptidos. La expresión de los genes de crecimiento AUX1, PIN1, PIN3 y resistencia PR-1 fue evaluada por cuantificación génica relativa mediante RT-PCR. La evaluación de cambios en la expresión génica fue estimada mediante tratamientos con una duración de 2.5 horas de suspensión de bacteria de *B. subtilis* Ctpx S2-1 con concentración de  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, extractos de lipopéptidos, y control con PBS. La expresión de genes de crecimiento y defensa resultó positiva especialmente en el tratamiento con la suspensión bacteriana en comparación con el control. De igual manera, se realizó ensayos de efectividad para verificar las respuestas fisiológicas generadas por la planta en presencia de los tratamientos experimentales, donde a excepción de la longitud del tallo los tratamientos no mostraron diferencia significativa en el índice de clorofila, porcentaje de humedad y longitud de la raíz. Los resultados obtenidos sustentan que el potencial de *B. subtilis* Ctpx S2-1 para desencadenar respuestas secundarias favorables de crecimiento y resistencia en *L. mutabilis* a través de la expresión del gen PR-1 está relacionado con la producción de lipopéptidos.

## ABSTRACT

The Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet) is a legume that, due to its nutritional and traditional value, is widely used in food industry in the Andean region with a growing international projection. However, despite of the high demand that it has its performance is affected by diseases, especially fungi. Among the fungal pathogens that affects the lupine, the anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum acutatum* can significantly reduce production, causing losses greater than 90 Kg ha<sup>-1</sup>. Generally, these diseases are treated with chemicals in various concentrations, however, the use of environmentally friendly alternatives such as biological control mediated by microorganisms can be efficient for control of the diseases. The biological control of agricultural diseases through the use of bacteria of the genus *Bacillus* spp. has shown potential for the control of pathogenic fungi of crops and postharvest. Researches about anthracnose control of the Andean lupine demonstrated that different isolates of *Bacillus subtilis* effectively control infections caused by *C. acutatum* in the field and in seed during postharvest. Preliminary data of the isolate of *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 demonstrate that it has a high production capacity of antifungal lipopeptides from the families of surfactin, iturin and fengicin especially at 72 hours of incubation, providing efficacy to counteract the growth of *C. acutatum*. Other studies has shown that bacteria such as *B. subtilis* function as plant growth and defense promoters, involving auxin transport genes and related to pathogenesis. Actually, the molecular response generated specifically by *L. mutabilis* mediated by the interaction of *B. subtilis* and the lipopeptides has not been clarified. In this context, the objective of this study was to evaluate the changes induced by *Bacillus subtilis* on the expression of growth and resistance genes of *Lupinus mutabilis*. Based on the preliminary analysis by HPTLC and PCR, the presence of the families of surfactin, iturin and especially fengicin in the isolate Ctpx S2-1 was confirmed, confirming the production capacity of lipopeptides. The expression of the growth genes AUX1, PIN1, PIN3 and resistance PR-1 was evaluated by relative gene quantification by RT-PCR. The changes were evaluated in gene expression, they were estimated by treatments

with a duration of 2.5 hours of suspension of *B. subtilis* Ctpx S2-1 bacteria with a concentration of  $2 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>, lipopeptide extracts, and control with PBS. The expression of growth and defense genes was positive especially in the treatment with the bacterial suspension compared to the control. Likewise, effectiveness tests were carried out to verify the physiological responses generated by the plant in the presence of experimental treatments, where, with the exception of stem length, treatments showed no significant difference in the chlorophyll index, humidity and length percentage of the root. Our results support that biocontrol potential of *B. subtilis* CTpxS2-1 through lipopeptides production play a major role in expression of growth and defense genes of *L. mutabilis*.

# ÍNDICE

1	Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Antecedentes.....	1
1.2	Planteamiento del problema .....	4
1.3	Objetivo General.....	6
1.4	Objetivos Específicos .....	6
1.5	Justificación de la investigación .....	6
2	Capítulo II. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1	Generalidades de <i>Lupinus mutabilis</i> .....	7
2.1.1	Importancia agroindustrial .....	8
2.1.2	Factores que afectan la producción.....	8
2.2	Enfermedades que afectan a cultivos de <i>L. mutabilis</i> .....	9
2.2.1	Antracnosis.....	9
2.2.1.1	<i>Colletotrichum acutatum</i> .....	10
2.3	Manejo de enfermedades.....	11
2.3.1	Control químico convencional.....	11
2.3.2	Selección genética de variedades de <i>L. mutabilis</i> .....	11
2.4	Control biológico .....	12
2.4.1	Control biológico de patógenos con <i>B. subtilis</i> .....	12
2.5	Generalidades de <i>Bacillus subtilis</i> .....	13
2.5.1	Características de <i>B. subtilis</i> .....	13
2.5.2	Lipopéptidos antifúngicos .....	14
2.5.2.1	Características generales y aplicación de lipopéptidos .....	14

2.5.2.2	Síntesis de lipopéptidos a partir de <i>B. subtilis</i> .....	15
2.5.2.3	Características de las familias de lipopéptidos .....	16
2.5.3	Potencial de <i>B. subtilis</i> como inductor de crecimiento .....	19
2.6	Bases bioquímicas y moleculares de acción de <i>B. subtilis</i> a través de lipopéptidos en el tejido vegetal .....	20
2.6.1	Lipopéptidos antifúngicos como inductores de resistencia en la planta.....	21
2.7	Inducción de genes de crecimiento y resistencia en plantas mediada por <i>B. subtilis</i> .....	22
2.7.1	Genes de resistencia PR involucrados en la respuesta de defensa.....	23
2.7.2	Inducción de genes de crecimiento de plantas.....	24
<b>3</b>	<b>Capítulo III. PROCEDIMIENTOS</b> .....	<b>27</b>
3.1	Población y muestra .....	27
3.2	Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	28
3.2.1	<i>Bacillus subtilis</i> Ctpx S2-1 .....	28
3.2.1.1	Conservación de la cepa <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1.....	28
3.2.1.2	Preparación del inóculo de la bacteria.....	28
3.2.1.3	Suspensión bacteriana de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 .....	29
3.2.2	<i>Colletotrichum acutatum</i> .....	29
3.2.2.1	Calibración del inóculo .....	29
3.2.3	<i>Lupinus mutabilis</i> .....	30
3.2.3.1	Desinfección de semillas <i>L. mutabilis</i> F3.....	30
3.2.3.2	Germinación de semillas <i>L. mutabilis</i> .....	30
3.2.4	Análisis Bioquímico.....	30

3.2.4.1	Extracción de lipopéptidos de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 .....	30
3.2.4.2	Caracterización de lipopéptidos antifúngicos producidos por <i>B. subtilis</i> .....	31
3.2.5	Análisis molecular .....	32
3.2.5.1	Extracción y cuantificación de ADN de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1.....	32
3.2.5.2	Amplificación de genes involucrados en la síntesis de lipopéptidos de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 .....	33
3.2.5.3	Inducción de la expresión de genes de crecimiento y resistencia en plántulas de <i>L. mutabilis</i> .....	35
3.2.6	Prueba de efectividad de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 y lipopéptidos en plántulas de <i>L. mutabilis</i> .....	41
3.2.6.1	Índice de clorofila .....	42
3.2.6.2	Relación raíz-tallo.....	42
3.2.6.3	Análisis de materia seca.....	42
3.3	Evaluación estadística de los resultados .....	43
4	Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
4.1	Síntesis de lipopéptidos antifúngicos de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 contra <i>C. acutatum</i> .....	45
4.2	Actividad antifúngica de lipopéptidos determinada por autobiografía-HPTLC .....	48
4.3	Análisis molecular de la síntesis de lipopéptidos antifúngicos de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 .....	51
4.3.1	Extracción y cuantificación de ADN .....	51
4.3.2	Amplificación de genes involucrados en la síntesis de lipopéptidos por PCR.....	52

4.4	Análisis molecular del efecto de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 en la expresión de genes de crecimiento y resistencia de <i>L. mutabilis</i> .....	55
4.4.1	Extracción y cuantificación de ARN de <i>L. mutabilis</i> .....	55
4.4.2	Evaluación del efecto de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 y lipopéptidos en la expresión relativa de genes involucrados en el crecimiento y resistencia de <i>L. mutabilis</i> .....	56
4.4.2.1	Genes AUX1 .....	57
4.4.2.2	Genes PIN1 .....	60
4.4.2.3	Genes PIN3 .....	63
4.4.2.4	Genes PR-1.....	66
4.5	Efectividad de <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 y lipopéptidos en plántulas de <i>L. mutabilis</i> .....	70
4.5.1	<i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 .....	70
4.5.2	Longitud de tallo y raíz principal .....	71
4.5.3	Porcentaje de humedad.....	74
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	76
5.1	Conclusiones.....	76
5.2	Recomendaciones.....	77
	REFERENCIAS.....	79
	ANEXOS.....	93

## 1 Capítulo I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

*Lupinus mutabilis* Sweet, también conocido como altramuz, tarwi o chocho andino, es una leguminosa con una gran importancia agroindustrial, ambiental y agroecológica en Ecuador y América del Sur debido a sus características de fijación de nitrógeno atmosférico y regulación de erosión del suelo, por medio del sistema radicular (Caicedo y Peralta, 2001). A la par, el chocho andino es un recurso agroalimentario importante para el consumo local y regional; además de la proyección creciente en el mercado industrial debido a que es una fuente importante para la nutrición humana y animal con alto contenido de proteína y aceites vegetales que oscila entre el 40% y 20% respectivamente (Falconí, 2012). En la actualidad, la demanda de consumo de chocho andino en el Ecuador se ha incrementado ya que cerca del 80% de la población rural de la Sierra y el 19% de la población de la Costa consumen chocho, al mismo tiempo la demanda internacional también se ha incrementado debido a la amplia variedad de productos alimenticios elaborados a partir de chocho (Nájera, 2015).

El cultivo de chocho andino presenta problemas de baja producción comparado con otras especies de *Lupinus* spp. (Talhinhas, Sreenivasaprasad, Neves-Martins, y Oliveira, 2002). El bajo rendimiento del chocho andino está influenciado por diferentes factores bióticos y abióticos que disminuyen la producción. Entre los factores bióticos más relevantes que afectan la producción para industrialización y manejo agrícola de producción de semilla se encuentran las enfermedades causadas por hongos, especialmente la antracnosis, causada por *Colletotrichum acutatum* (Falconí, 2012; Falconí y Yáñez–Mendizábal, 2016). La problemática de esta enfermedad consiste en que el patógeno infecta al cultivo en todas las etapas de la producción (Falconí, 2012). Adicionalmente, las infecciones presentes en las semillas junto con las malas prácticas agrícolas de selección incrementan la presencia, transmisión y niveles de contaminación

posterior en el campo y disminuye el porcentaje de producción en la cosecha (Falconí y Yáñez–Mendizábal, 2016).

Debido al impacto de esta enfermedad, las estrategias de control se han centrado en la combinación de resistencia genética (Gond, Bergen, Torres, y White, 2015) y fungicidas convencionales (Peralta et al., 2012). Sin embargo, estos métodos pueden tener limitación para el control de la enfermedad y el rendimiento de semillas de calidad (Popp, Peto, y Nagy, 2013) razón por la cual el uso de métodos alternativos como como calor seco (Falconí y Yáñez–Mendizábal, 2016; Thomas y Adcock, 2004), radiación con UV-C (Falconí y Yáñez–Mendizábal, 2016) y control biológico (Yáñez-Mendizábal, Falconí, Grijalva, Oliva, y Castañeda, 2015; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018) para contrarrestar de manera efectiva la antracnosis causada por *C. acutatum* resultan ser una herramienta viable.

Entre las estrategias de control biológico para la antracnosis del chocho causada por *C. acutatum*, estudios conducidos por nuestro grupo de investigación (Yáñez-Mendizábal et al., 2015; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018) han demostrado que el uso de biomasa activa o microorganismos que se desarrollan en un medio de cultivo específico, y sobrenadantes libres de células que comprenden la eliminación de microorganismos del medio de cultivo en el que se desarrollan, los mismos que provienen de aislados de *Bacillus* spp. son tratamientos eficientes para el control de infecciones en semillas en poscosecha y en plantas de *L. mutabilis* en el campo en diferentes variedades comerciales provenientes de campos experimentales y de producción.

Dentro de la efectividad de *Bacillus* spp. en el control de enfermedades agrícolas, especialmente fungosas, numerosos estudios han demostrado que estas biomoléculas actúan como potentes agentes biocidas que dañan las estructuras del patógeno, y a la vez pueden actuar como mensajeros químicos que promueven la inducción de mecanismos secundarios de defensa frente al ataque de hongos patógenos y crecimiento de la planta (Ongena et al., 2005; Ongena y Jacques, 2008). Las especies del género *Bacillus*, especialmente *B. subtilis* y *B. amyloquefaciens* son muy estudiadas y utilizadas para el control de

enfermedades fúngicas, debido a la capacidad de producción de lipopéptidos antifúngicos especialmente de las familias fengicinas, iturinas y surfactinas (Ongena y Jacques, 2008). La producción de lipopéptidos antifúngicos como fengicinas e iturinas ha sido estudiada ampliamente para el control del desarrollo de hongos que afectan a plantas, como es el caso del control de *Botrytis* spp. en manzana y *Monilinia* spp. en melocotones mediante el uso de lipopéptidos (Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

La resistencia sistémica inducida o ISR está relacionada con la colonización de rizobacterias no patógenas en las raíces de plantas, y a su vez es capaz de incrementar los niveles de defensa frente al ataque de un patógeno (Pieterse et al., 2014). La presencia de rizobacterias puede generar dos tipos de respuestas, una activando la expresión de genes PR que posteriormente desencadenará en la respuesta sistémica adquirida (SAR), o estimulando otros compuestos de defensa que inducen la ISR (Nuez, Pérez de la Vega, y Carrillo, 2004). Las rizobacterias no patógenas como *B. subtilis* son capaces de desencadenar varias respuestas moleculares como la inducción y promoción de resistencia y crecimiento en el tejido vegetal. Las respuestas moleculares incluyen la presencia de proteínas involucradas en el transporte de auxinas, y proteínas PR de sus siglas en inglés *pathogenesis related* o relacionadas con la patogénesis involucrada en la respuesta de defensa de la planta. Las proteínas PR se expresan en la planta huésped generalmente en presencia de patógenos. Los genes de la familia PR-1 se consideran indicadores de activación de la respuesta de defensa de la planta frente a una infección (Ruiz-Lozano, Roussel, Gianinazzi, y Gianinazzi-Pearson, 1999). Por otro lado, la promoción del crecimiento debido a la presencia de rizobacterias en plántulas, se encuentra mediada por la presencia de auxinas (Oliveros-Valenzuela, Reyes, Sánchez-Bravo, Acosta, y Nicolás, 2007). Por lo tanto, los genes que codifican para proteínas transportadoras de auxinas denominadas AUX y PINs están directamente relacionadas con el crecimiento de la planta. Investigaciones realizadas en la especie *Lupinus albus* han demostrado que las proteínas AUX están involucradas en la formación de raíces laterales de plántulas y son necesarias para el transporte acropetal y gravitropismo de la raíz (Marchant et al., 2002).

Del mismo modo, la familia de las proteínas PIN1 y PIN3 están involucrados en el transporte basipetal y lateral en células de la raíz respectivamente (Blakeslee et al., 2007; Friml, Wiśniewska, Benková, Mendgen, y Palme, 2002).

Estudios preliminares conducidos por nuestro grupo de investigación que involucra el uso de *Bacillus subtilis* aislado CptxS2-1 han demostrado que su efectividad para el control de *C. acutatum* está directamente relacionada con la producción de lipopéptidos antifúngicos, especialmente isómeros de las familias fengicina e iturina (Yáñez-Mendizábal, Zeriuoh, et al., 2012). Estos lipopéptidos han demostrado tener una potente actividad biocida para inhibir el crecimiento micelial y la esporulación de *C. acutatum*. Sin embargo, todavía se desconoce las respuestas moleculares generadas en *L. mutabilis* mediadas por la interacción con el aislado Ctpx S2-1.

Con estos antecedentes, el propósito de este estudio es evaluar el efecto producido por lipopéptidos antifúngicos obtenidos a partir *B. subtilis* aislado Ctpx S2-1 en el control de *C. acutatum* en la inducción de la expresión de genes de crecimiento y resistencia de *L. mutabilis*.

## 1.2 Planteamiento del problema

El control de la antracnosis de manera tradicional se realiza mediante el uso de agroquímicos. Sin embargo, estos métodos además de ineficientes a largo plazo tienen impacto negativo para la salud humana, animal y ambiental por lo cual trabajos de investigación para el desarrollo de tratamientos alternativos físico químicos y control biológico son ampliamente considerados (Copping y Menn, 2000; Popp, Peto, y Nagy, 2013).

Entre los métodos de control biológico, el uso de bacterias ha sido considerado como prometedor por su alta eficiencia en la disminución o eliminación de la incidencia de antracnosis del chocho andino (Yáñez-Mendizábal, Zeriuoh, et al., 2012). Los métodos de control biológico específicamente para el tratamiento del

chocho involucran el uso de bacterias como *Bacillus subtilis* capaces de producir lipopéptidos antifúngicos efectivos para reducir o erradicar las estructuras fungosas o actuar como mensajeros químicos que inducen cambios favorables en los mecanismos de crecimiento y defensa en la planta (Falconí, 2012; Yáñez-Mendizábal, Viñas, et al., 2012; Ongena y Jacques, 2008).

Los diferentes estudios con *B. subtilis* han demostrado que la capacidad de biocontrol está directamente relacionada a la antibiosis mediada por la producción de moléculas bioactivas extracelulares como enzimas, biofilms y lipopéptidos. La mayor parte de estos lipopéptidos corresponden a familias de isómeros de surfactinas, iturinas y fengicinas capaces de actuar directamente sobre los patógenos, especialmente fungosos para inhibir su crecimiento (Leclère, Marti, Béchet, Fickers, y Jacques, 2006; Ongena y Jacques, 2008; Raaijmakers, de Bruijn, y de Kock, 2006). La familia de las surfactinas se caracterizan por ser de naturaleza anfifílica lo que quiere decir que son moléculas que poseen un extremo hidrofílico o soluble en agua y otro extremo hidrofóbico que repele el agua, por lo que pueden asociarse a capas de lípidos e interferir con la integridad de la membrana, la familia de las iturinas son capaces de producir perturbación osmótica debido a la formación de poros conductores de iones y la solubilización de la membrana, y la familia de las fengicinas poseen una alta capacidad de alteración de la estructura y permeabilidad de la membrana celular. Todas estas propiedades en conjunto son capaces de expresar una fuerte acción antifúngica (Ongena et al., 2005; Ongena y Jacques, 2008; Romero et al., 2007a).

Como se ha dicho, la efectividad de *Bacillus* spp. mediada por lipopéptidos en el control de *C. acutatum* en chocho andino se relaciona directamente con su capacidad de colonización en la rizósfera de las plantas y la activación de respuestas del crecimiento secundario de las plantas al inducir la expresión de genes de crecimiento y defensa contra patógenos.

Los lipopéptidos son capaces de interactuar con las células de las plantas para inducir el paso de biomoléculas activas en la membrana plasmática que al mismo tiempo puede activar una serie de eventos moleculares que conducen a la

expresión de genes de defensa (Gond, Bergen, Torres, y White, 2015; Ongena y Jacques, 2008). Sin embargo, hasta la actualidad no se ha esclarecido si la interacción de *B. subtilis* y sus lipopéptidos antifúngicos son capaces de inducir la expresión de genes de crecimiento y resistencia como parte de su respuesta molecular y bioquímica en la especie *Lupinus mutabilis*. En este contexto, el propósito de esta investigación es evaluar el efecto de lipopéptidos antifúngicos producidos por *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 y su relación con la expresión de genes de crecimiento y resistencia en plántulas de *L. mutabilis*.

### 1.3 Objetivo General

Evaluar el efecto de lipopéptidos antifúngicos producidos por *Bacillus subtilis* en la inducción de expresión de genes de crecimiento y resistencia de *Lupinus mutabilis*.

### 1.4 Objetivos Específicos

- a) Verificar la síntesis de lipopéptidos generados por *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 mediante análisis bioquímico (HPTLC).
- b) Evaluar la presencia de genes involucrados en la síntesis de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 de las familias de surfactinas, iturinas y fengicinas mediante PCR.
- c) Evaluar el efecto de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 en la expresión de genes de crecimiento AUX1, PIN1, PIN3 y resistencia PR-1, a través de su exposición en plántulas de *Lupinus mutabilis* mediante RT-PCR.

### 1.5 Justificación de la investigación

El desarrollo de métodos alternativos para el control de la antracnosis del chocho andino causada por *C. acutatum* es necesario para mejorar la producción del cultivo y minimizar el uso de productos químicos sintéticos. Entre estos métodos el uso de control biológico microbiano, usando aislados nativos pertenecientes a la especie *B. subtilis* han demostrado ser eficientes mediante la producción de lipopéptidos antifúngicos que disminuyen o erradican el crecimiento de *C. acutatum in vitro* e *in vivo*. Además, la identificación de los diferentes lipopéptidos antifúngicos y su modo de acción puede servir como base para el desarrollo y optimización de procesos de producción y formulación de biopesticidas efectivos en el control de enfermedades.

En definitiva, la identificación de lipopéptidos antifúngicos producidos por *B. subtilis* Ctpx S2-1 y sus mecanismos de acción relacionados con el antagonismo contra *C. acutatum* en chocho andino es necesaria para conocer las respuestas moleculares generadas por la interacción hospedero-patógeno en procesos de control biológico relacionados con la inducción de la expresión de genes de crecimiento y defensa en la planta. Al mismo tiempo, se conoce que *B. subtilis* muestra una capacidad de promoción de crecimiento en plantas, lo que es necesario demostrar mediante técnicas moleculares para verificar la eficacia de los lipopéptidos y así esclarecer el efecto que genera las bacterias endofíticas en tejidos vegetales. De esta manera, mediante el correcto control de enfermedades fungosas se podrá garantizar un mayor rendimiento en la cosecha de chocho con elevados estándares de calidad e inocuidad.

## **2 Capítulo II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Generalidades de *Lupinus mutabilis***

El chocho andino o *Lupinus mutabilis* es una leguminosa originaria de la región andina de Perú, Bolivia y Ecuador. Se caracteriza por la presencia de un elevado

número de nódulos nitrificantes, que da como resultado la fijación de nitrógeno atmosférico aproximado de 100 Kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en el suelo (Jacobsen, Mujica, Jacobsen, y Mujica, 2006).

Es importante mencionar los aspectos que destacan del chocho andino como la importancia agroindustrial, factores que afectan a la producción, y los controles utilizados en los cultivos.

### **2.1.1 Importancia agroindustrial**

El alto contenido de proteína, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas y minerales de *L. mutabilis* lo ha convertido en uno de los recursos de mayor importancia agroalimentaria incluida en la dieta de la población (Peralta et al., 2012).

El elevado interés en el chocho andino se debe a su capacidad de adaptación a climas fríos, siendo un cultivo que puede llegar a reemplazar a la soya de climas subtropicales que en la actualidad es requerida para importación. En la actualidad, a nivel industrial a partir del chocho andino se producen harinas empleadas en la panificación mejorando el valor proteico y calórico de los productos. Además, los alcaloides presentes en el chocho andino como la esparteína, tetrahidrorombifolina, y la lupanina son utilizados por los agricultores como biocida en el control de plagas de plantas (Caicedo y Peralta, 2001).

### **2.1.2 Factores que afectan la producción**

La región Sierra del Ecuador posee un sistema de producción que involucra principalmente cultivos leguminosos y gramíneos. Sin embargo, la presencia de enfermedades y el manejo fitosanitario inadecuado específicamente en leguminosas como *L. mutabilis* disminuyen en gran cantidad los niveles de producción de este cultivo. Según el Censo Nacional Agropecuario (2003), en

los últimos años solo se ha logrado el 66% del rendimiento de cultivos en buenas condiciones, esto debido al estrés biótico y abiótico a las que son sometidos los cultivos de chocho andino. En Ecuador, la capacidad de producción del chocho andino generalmente alcanza los 130 Kg ha<sup>-1</sup>, siendo la óptima de 220 Kg ha<sup>-1</sup> (Caicedo y Peralta, 2001).

El uso de semillas genéticamente seleccionadas como la variedad de nombre "INIAP 450 Andino", otorgadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) son actualmente utilizadas por la mayoría de los agricultores debido a las favorables características agronómicas que presenta como el tamaño y vigor, pero no posee resistencia a enfermedades comunes que afectan al chocho como la antracnosis.

## **2.2 Enfermedades que afectan a cultivos de *L. mutabilis***

Las enfermedades fungosas que afectan a *L. mutabilis* se encuentran dentro de los problemas fitosanitarios como las plagas, patógenos virales y bacterianos, y enemigos naturales (Peralta et al., 2012). Las principales enfermedades fungosas foliares son la Antracnosis, Mancha anular, Ascoquita y la presencia de infecciones causadas por *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Caicedo y Peralta, 2001).

### **2.2.1 Antracnosis**

El estrés biótico causado por la antracnosis es una de las enfermedades principales que afectan al chocho andino. Se caracteriza por afectar las hojas, vainas y semillas causando la torsión del tallo, pecíolos y formar lesiones oscuras que no permiten la producción de vainas ni flores (Caicedo y Peralta, 2001).

Las masas de conidias del hongo se destacan por presentarse como manchas en las vainas de aproximadamente uno a tres centímetros de diámetro, las

mismas que se encuentran cubiertas con una capa anaranjada. Las semillas también son severamente afectadas, como resultado se puede reconocer fácilmente a los granos con un aspecto deshidratado. Adicionalmente, es importante mencionar que las plantas que llegan a nacer de semillas infectadas presentan síntomas en tallos y cotiledones, y en algunas ocasiones llegan a matar a la planta (Tapia, 2015).

El agente causal de la antracnosis es la presencia de hongos patógenos que forman parte de *Colletotrichum* spp. (Peralta et al., 2012). La diferenciación morfológica de esporas en combinación con técnicas moleculares, han permitido identificar al patógeno *Colletotrichum acutatum* como el causante de altos niveles de pérdidas económicas en una gran variedad de cultivos dentro de los cuales se encuentra el chocho andino (Falconí, 2012).

#### **2.2.1.1 *Colletotrichum acutatum***

El hongo patógeno *C. acutatum* se caracteriza por su capacidad de formación de acérvulos con setas gruesas y rígidas; las conidias son de forma ligeramente ovoide. En un medio de cultivo apto para el crecimiento es capaz de formar colonias de color gris en conjunto con acumulación de conidias color anaranjado (Caicedo y Peralta, 2001). *C. acutatum* se disemina por medio de la semilla, en el cultivo factores como herramientas agrícolas, lluvia, insectos y viento ayudan a esparcir las esporas del patógeno aumentando la probabilidad de infección.

El patógeno se encuentra en los residuos de las cosechas como saprofito, su crecimiento es favorecido en presencia de alta humedad y temperatura. La combinación de infecciones severas y alta humedad puede dar como resultado la muerte de la planta. En la actualidad, la antracnosis causada por *C. acutatum* ha afectado de manera general a los cultivos de chocho andino en las provincias de Pichincha, Imbabura, Chimborazo y Cotopaxi (Caicedo y Peralta, 2001; Falconí, 2012; Peralta et al., 2012).

## **2.3 Manejo de enfermedades**

La mayoría de cultivos de leguminosas, principalmente el chocho andino se encuentra expuesta a plagas y enfermedades que son controlados con el uso de sustancias orgánicas y químicas, que en ocasiones conlleva a la presencia de consecuencias negativas en la salud de los agricultores y medio ambiente.

### **2.3.1 Control químico convencional**

El control de enfermedades fungosas que afectan al chocho andino se realiza de manera convencional con el uso de productos de síntesis química. Los productos de uso común son aquellos que poseen ingredientes activos como benomil, carbendazim, clorotalonil, difenoconazol y propineb que tienen una gran capacidad de eliminación del patógeno, pero al mismo tiempo pueden deteriorar el suelo y contribuir a la posible resistencia del patógeno con el uso prolongado del producto. Es recomendable según el INIAP utilizar productos químicos que tengan un bajo nivel de toxicidad o colocar una mezcla de plaguicidas en dosis pequeñas en los cultivos; al mismo tiempo es importante mencionar que el uso de productos químicos se debe realizar en presencia del patógeno en conjunto con un análisis técnico de manera oportuna (Peralta et al., 2012).

### **2.3.2 Selección genética de variedades de *L. mutabilis***

La susceptibilidad del chocho a plagas y enfermedades ocasiona un bajo nivel de rendimiento en su producción; por lo que desde hace algunos años el INIAP ha ido desarrollando varias investigaciones que involucran el desarrollo de una variedad con una mejor calidad y rendimiento para los agricultores (Peralta et al., 2012).

La variedad denominada “INIAP 450 ANDINO” es originaria de la selección de germoplasma de Perú en el año 1992. Después de su selección fue cultivada y formó parte del Banco de Germoplasma del INIAP identificada como ECU-2959. La variedad seleccionada posee características de estabilidad y adaptabilidad a una variedad de climas presentes en la Región Sierra.

## **2.4 Control biológico**

Se puede definir al control biológico como el uso de organismos vivos o sus derivados, para contrarrestar los daños producidos por organismos perjudiciales (Sharma, Singh, y Singh, 2009).

Los microorganismos capaces de ejercer control biológico utilizan mecanismos como la producción de antibióticos que conllevan a contrarrestar ciertos patógenos, la inducción de resistencia en la planta, y la competencia por alimento con microorganismos en el mismo microambiente (Romero et al., 2007).

En el contexto del control biológico de ciertas enfermedades de las plantas, varias investigaciones como las reportadas por Gutiérrez-Mañero et al., (2001); Tran, Ficke, Asiimwe, Höfte, y Raaijmakers, (2007) y Yáñez-Mendizábal et al., (2011) han dado como resultado benéfico el uso de bacterias de género *Bacillus*, como *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloquefaciens* por su alta actividad antagónica para una gran variedad de fitopatógenos potenciales como bacterias, hongos y oomicetos (Ongena y Jacques, 2008). En la actualidad, investigaciones realizadas por Dunlap, Schisler, Bowman, y Rooney, (2015); Falconí, (2012); Gond et al., (2015) y Yáñez-Mendizábal y Falconí, (2018) que involucran el uso de *B. subtilis* han demostrado tener elevado potencial en la disminución del desarrollo de conidios de organismos como *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., y *Phytophthora* spp.

### **2.4.1 Control biológico de patógenos con *B. subtilis***

Las principales enfermedades que afectan al chocho andino son las que afectan directamente a las raíces, hojas y flores de la planta. Las enfermedades presentadas en la etapa de floración son las más comunes, y debido a su rápido desarrollo es difícil contrarrestar el avance de la enfermedad con productos de síntesis química. Por ello, una alternativa prometedora es el uso de *B. subtilis* para la producción de bioplaguicidas, que además de contrarrestar el desarrollo de patógenos no perjudica el suelo ni medio ambiente (Copping y Menn, 2000).

## **2.5 Generalidades de *Bacillus subtilis***

*B. subtilis* es una bacteria Gram positiva que se encuentra en el suelo, y posee características de resistencia a condiciones extremas por la producción de endosporas. Posee forma bacilar, y se puede observar en forma individual, en pares o en cadenas de bacilos, cuando se encuentra en esporulación se presenta en forma ovalada. Además, son capaces de producir varios tipos de enzimas hidrolíticas como glucanasas, amilasas, quitinasas y proteasas.

### **2.5.1 Características de *B. subtilis***

*B. subtilis* es uno de los organismos más utilizados y estudiados, es característico por su amplia síntesis de moléculas bioactivas estructuralmente diversas (Stein, 2005). Las principales características morfológicas de *B. subtilis* incluyen la producción de esporas y la capacidad de formar biofilms, considerado con alto interés industrial (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Las esporas producidas por *B. subtilis* tienen un alto nivel de resistencia, por lo cual permite incrementar su nivel de supervivencia en la rizosfera vegetal. Por lo tanto, la capacidad de *B. subtilis* en la de producción de sustancias biocontroladoras capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, en conjunto

con la producción de esporas lo hace un fuerte candidato para la formulación de biopesticidas (Ongena y Jacques, 2008).

## **2.5.2 Lipopéptidos antifúngicos**

Los lipopéptidos son moléculas bioactivas producidas por *B. subtilis* con un alto potencial de aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica debido a sus propiedades tensoactivas. La síntesis de lipopéptidos de tipo antimicrobiano se realiza de forma no ribosomal mediada por complejos multienzimáticos como péptidos sintetasas, lo que conlleva a la presencia de heterogeneidad en la secuencia de residuos de aminoácidos, ciclación de péptidos y ramificación de la cadena de ácidos grasos en los lipopéptidos, por lo cual se divide en familias de lipopéptidos como surfactinas, iturinas y fengicinas (Romero, et al., 2007b; Touré, Ongena, Jacques, Guiro, y Thonart, 2004).

### **2.5.2.1 Características generales y aplicación de lipopéptidos**

Las moléculas de tipo tensoactivas sintetizadas por organismos como bacterias, hongos y levaduras poseen ventajas en comparación con los surfactantes comerciales por su especificidad a alta temperatura, alcalinidad, pH, biodegradabilidad y afinidad ambiental.

La importancia de los surfactantes de origen microbiano ha ido incrementándose en la industria especialmente para el proceso de estabilización y formación de espuma en detergentes, separación de fases en cosméticos y textiles, formulación de agroquímicos, y en la remoción de contaminantes insolubles en agua. *B. subtilis* tiene la capacidad de producción de tensoactivos compuestos por ocho péptidos con aproximadamente 13 a 16 átomos de carbono que forman parte del sistema de ciclación. Las familias de lipopéptidos pueden otorgar una ventaja especial a *B. subtilis* que las produce, de este modo iturinas y fengicinas

poseen una elevada actividad antifúngica que permite la inhibición del desarrollo de varios patógenos presentes en plantas. Al mismo tiempo, la presencia de surfactinas a pesar de no poseer características antifúngicas, en combinación con la iturina A tiene un efecto sinérgico en la capacidad antifúngica de la misma (Ongena y Jacques, 2008; Touré et al., 2004).

### **2.5.2.2 Síntesis de lipopéptidos a partir de *B. subtilis***

*B. subtilis* posee una elevada capacidad para la producción de una gran variedad de metabolitos antifúngicos, se han caracterizado las familias de los lipopéptidos, dividiéndolas en surfactinas, iturinas y fengicinas (Ongena et al., 2005). La clasificación en familias de los lipopéptidos se debe a la heterogeneidad presentada en relación a la secuencia y longitud de residuos de aminoácidos, ácidos grasos y la ciclación de péptidos (Ongena y Jacques, 2008; Yáñez-Mendizábal, Zerriouh, et al., 2012).

Una de las diferencias entre las familias de los lipopéptidos es la presencia de las cadenas de  $\alpha$ -aminoácidos unido a un ácido graso  $\beta$ -amino en la familia de las iturinas, al contrario en el caso de las familias de surfactinas y fengicinas la unión se establece a un ácido graso  $\beta$ -hidroxi (Touré et al., 2004).

La longitud de la cadena de  $\alpha$ -aminoácidos de las familias de las iturinas y surfactinas se estima en un aproximado de siete aminoácidos, y para las fengicinas en diez aminoácidos. En relación a los ácidos grasos, la longitud puede variar en el caso de las surfactinas de C13 a C16, en las iturinas de C14 a C17, y en las fengicinas de C14 a C18 (Ongena y Jacques, 2008; Romero et al., 2007a; Touré et al., 2004).

La variabilidad de las familias de los lipopéptidos en relación a su estructura y propiedades fisicoquímicas de estas moléculas de naturaleza anfifílica han demostrado ser efectivas actuando de manera antagónica frente patógenos fúngicos, lo que podría explicar su influencia en los mecanismos que se han ido

desarrollando por las bacterias para su acción como control biológico frente a fitopatógenos que afectan a las plantas.

### 2.5.2.3 Características de las familias de lipopéptidos

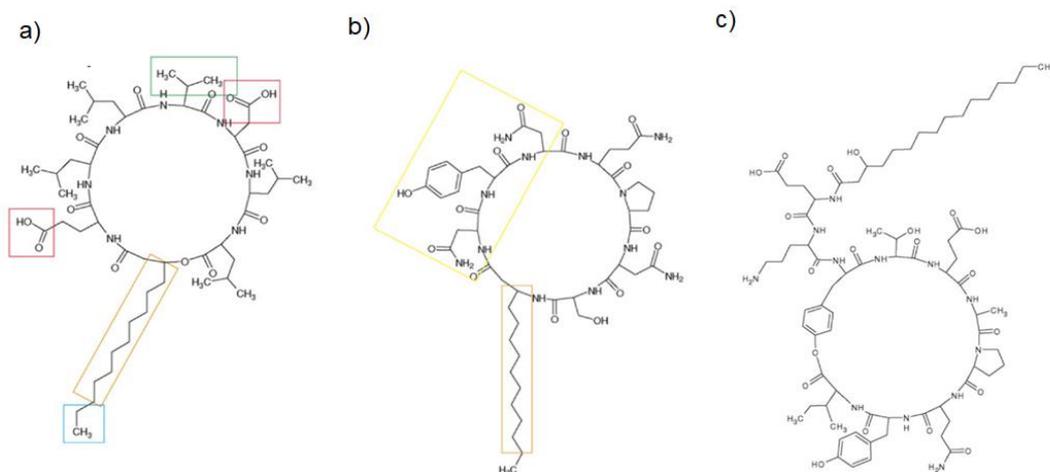
La diferencia estructural en los lipopéptidos ha permitido dividir a los mismos en familias agrupadas por sus características y mecanismos de acción sobre los patógenos (Tabla 1). Las fengicinas, surfactinas e iturinas son familias de lipopéptidos que se caracterizan por ser homólogos, y se encuentran compuestos por un péptido caracterizado por poseer aminoácidos con una secuencia específica (Romero et al., 2007a).

Tabla 1.

#### *Resumen de diferencias principales entre familias de lipopéptidos*

Familia de lipopéptidos	Número de carbonos	Característica principal	Referencia
Surfactinas	13-16	Actúan como biosurfactantes, antibacterianos y ayudan a la colonización de bacterias.	Romero et al., (2007) y Ongena y Jacques, (2008).
Iturinas	14-17	Actividad sinérgica antifúngica en combinación con surfactinas.	Ongena y Jacques, (2008) y Touré et al., (2004).
Fengicinas	14-18	Potente actividad antifúngica.	Ongena y Jacques, (2008) y Romero et al., (2007).

En relación a la estructura, se diferencian por ser moléculas anfipáticas que pueden presentar características hidrofóbicas cuando se presentan restos de una cadena de carbono, o hidrofílicas cuando se presentan restos variables iónicos (Pereira et al., 2013) como se muestra en la figura 1. Adicionalmente, la presencia de un péptido cíclico en las familias de los lipopéptidos potencia su estabilidad y bioactividad como agentes antifúngicos contra fitopatógenos (Ongena et al., 2005).



**Figura 1.** Estructura de las principales familias de lipopéptidos.

Tomado de (Ongena y Jacques, 2008).

- a) Familia de Surfactinas.
- b) Familia de Iturinas.
- c) Familia de Fengicinas.

Los lipopéptidos de las familias surfactinas, iturinas y fengicinas tienen diversas aplicaciones industriales debido a sus propiedades tensoactivas. La presencia de varias familias de lipopéptidos confieren una ventaja a las cepas productoras de *Bacillus* spp. en nichos ecológicos específicos. La producción de iturinas se encuentra presente en *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Las surfactinas se han identificado en aislados de *B. coagulans*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*. Y la

presencia de fengicinas en *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* (Ongena et al., 2005; Touré et al., 2004; Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

Además, algunos lipopéptidos sintetizados por *B. subtilis* tienen la capacidad de actuar de manera sinérgica como el caso de surfactinas e iturinas, surfactinas y fengicinas, e iturinas y fengicinas, en donde según estudios realizados por Maget-Dana, Thimon, Peypoux, y Ptak, (1992); Ongena et al., (2007); Romero et al., (2007a) se ha demostrado que la presencia de surfactinas no tiene efecto antagónico frente a patógenos. Sin embargo, la presencia de iturinas en combinación con surfactinas aumenta en gran medida la capacidad de interferencia en la membrana biológica de posibles patógenos.

#### **2.5.2.3.1 Surfactinas**

La familia de las surfactinas son heptapéptidos conectados con un ácido graso de tipo  $\beta$ -hidroxi que permite la formación de un anillo cíclico de lactona (Romero et al., 2007). Son de naturaleza anfifílica por lo que pueden actuar como biosurfactantes, las surfactinas también poseen la capacidad de asociarse a capas lipídicas e interferir en la integridad de la membrana biológica de fitopatógenos. La interferencia en la membrana biológica es dependiente de la dosis, es decir, a una baja concentración produce una perturbación limitada en la membrana, a concentración intermedia una permeabilización transitoria permitiendo reestabilizar la membrana, y a concentraciones altas se produce la formación de poros irreversibles que conduce a la interrupción completa y la solubilización de la bicapa lipídica con la formación de micelas. El proceso de interferencia en la bicapa lipídica se lleva a cabo debido a la estructura tridimensional de las moléculas surfactinas con cadenas laterales cargadas afines a la fase acuosa, y la presencia de restos apolares capaces de penetrar en el núcleo hidrofóbico de la membrana. La efectividad también es dependiente del contenido de esteroides presentes en las membranas de los organismos diana, por lo que posee actividades antivirales y antibacterianas (Ongena y Jacques, 2008).

### 2.5.2.3.2 Iturinas

La familia de las iturinas y sus variantes son heptapéptidos interconectados con una cadena de ácido graso  $\beta$ -amino con una longitud de 14 a 17 átomos de carbono. Posee una fuerte actividad biológica como antifúngico contra una gran variedad de hongos y levaduras, pero limitadas actividades antivirales y antibacterianas. La fuerte capacidad fungitóxica de la familia de las iturinas, se basa en sus características estructurales que influyen en la perturbación osmótica por la formación de poros conductores de iones permitiendo la permeabilización de la membrana (Ongena y Jacques, 2008).

### 2.5.2.3.3 Fengicinas

La familia de las fengicinas también llamadas plipastatinas son moléculas que poseen un anillo de lactona interno unido a un resto péptidico en conjunto con una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi con una longitud de 14 a 18 carbonos que puede estar saturada o insaturada. Además, las fengicinas poseen una elevada actividad fungitóxica específicamente contra hongos filamentosos. Las fengicinas son una de las moléculas con mayor complejidad producida por *B. subtilis*. El mecanismo de acción de las fengicinas también se basa en la capacidad de alteración de la estructura y permeabilidad de la membrana de manera dependiente a la dosis (Ongena y Jacques, 2008; Romero et al., 2007).

## 2.5.3 Potencial de *B. subtilis* como inductor de crecimiento

Los microorganismos endófitos residen en los tejidos de las plantas sin producir efectos negativos en el huésped. Generalmente, bacterias como *B. subtilis* benefician a las plantas al incrementar la tolerancia al estrés biótico y abiótico.

Al mismo tiempo, *B. subtilis* tiene la capacidad de producir biomoléculas activas que actúan como antiplagas contra patógenos e insectos. La presencia de bacterias endófitas posee una alta capacidad de promoción del crecimiento vegetal mediante procesos como la producción de sustancias orgánicas, consideradas como producto del metabolismo secundario de las bacterias que a su vez son capaces de influir en las respuestas fisiológicas de células vegetales. En el caso de *B. subtilis*, se ha demostrado la producción de fitohormonas que activan repuestas moleculares, bioquímicas, fisiológicas y morfológicas en la rizosfera de plantas. Las auxinas son las principales hormonas secretadas por bacterias de la rizosfera y se encuentra vinculada a la patogenicidad debido a que algunos fitopatógenos pueden causar respuestas hipersensibles en el huésped y de esta manera lograr una infección exitosa (Camelo, Vera, y Bonilla, 2011; Tejera-hernández y Heydrich-pérez, 2011).

## **2.6 Bases bioquímicas y moleculares de acción de *B. subtilis* a través de lipopéptidos en el tejido vegetal**

Las plantas son capaces de crear un entorno nutricional y fisicoquímico específico para los microorganismos que se desarrollan en la rizósfera y son capaces de producir una gran variedad de compuestos de bajo peso molecular en sus raíces. Ciertas moléculas producidas por bacterias como *Bacillus* spp. pueden desencadenar señales químicas para colonizar la superficie de la raíz. Las cepas que actúan como control biológico en la rizósfera pueden usar las biomoléculas activas para activar la resistencia y el crecimiento en el tejido vegetal (Ongena y Jacques, 2008).

La colonización de rizobacterias se realiza en forma de biofilms en las superficies de la raíz y suelo. La familia de las surfactinas producidas por *B. subtilis* se encuentra directamente relacionada con la formación de biofilms, debido a su capacidad de adhesión celular gracias a su estructura tridimensional. Las colonias bacterianas que se encuentran sobre las raíces se dispersan por las mismas con el fin de alcanzar más nutrientes a través de flagelos, lo que conlleva

a que las bacterias se extiendan como una biopelícula sobre la superficie de la raíz (Stein, 2005).

Los aislados de *Bacillus* spp. pueden desplegar sus biomoléculas activas una vez establecidos en la fitosfera. Los lipopéptidos de las familias de surfactinas, iturinas y fengicinas están involucrados en el antagonismo de fitopatógenos. Las surfactinas no son solo esenciales para la colonización en la raíz sino también para la reducción de infecciones causadas por el patógeno *Pseudomonas syringae* en plantas como *Arabidopsis*. Las iturinas y fengicinas han demostrado ser eficaces en el control de enfermedades de fitosfera (superficie de la hoja de la planta) al mostrar un elevado efecto inhibitorio en las conidias del patógeno (Gond et al., 2015; Touré et al., 2004).

### **2.6.1 Lipopéptidos antifúngicos como inductores de resistencia en la planta**

Los lipopéptidos de las familias de fengicinas y surfactinas pueden interactuar con las células de las plantas para activar respuestas bioquímicas y moleculares a través de la estimulación de la resistencia sistémica inducida o ISR por sus siglas en inglés *Induced Systemic Resistance*. De este modo, la reducción de enfermedades fungosas está relacionada con la serie de cambios metabólicos asociados con las respuestas de defensa de las plantas (Pieterse et al., 2014).

En investigaciones realizadas con fengicinas purificadas en plantas de tomate y tubérculo de papa, se demostró la acumulación de fenoles vegetales implicados en la producción de proteínas de defensa de las plantas. Sin embargo, extractos de lipopéptidos de *Bacillus* spp. enriquecidos en surfactinas, iturinas y fengicinas no lograron activar la respuesta de resistencia en las plantas antes mencionadas (Tran, Ficke, Asiimwe, Höfte, y Raaijmakers, 2007).

La actividad biológica de los lipopéptidos está relacionada con su efecto en la parte lipídica de la membrana biológica de fitopatógenos. De este modo, la presencia de lipopéptidos no está involucrada en ningún posible efecto adverso

sobre la integridad y potencial crecimiento de las células vegetales. Por lo cual, la interacción de las moléculas se presenta sin crear una formación irreversible de poros, pero son capaces de inducir perturbaciones transitorias en la membrana plasmática que a su vez pueden activar una serie de cascadas bioquímicas que conducen a la presencia de respuestas de defensa (Kim et al., 2007).

La falta de efecto de los lipopéptidos sobre algunas células vegetales se podría explicar por la composición variada de fitoesteroles en la membrana del patógeno, ya que la membrana de algunas especies de hongos están compuestas por sitosterol, estigmasterol y campesterol, y en otras especies principalmente por colesterol, lo que conduce a debilitar la posibilidad de disrupción de membrana en todas las especies (Ongena y Jacques, 2008).

## **2.7 Inducción de genes de crecimiento y resistencia en plantas mediada por *B. subtilis***

La presencia de rizobacterias como *B. subtilis* productoras de biomoléculas activas en la raíz de plantas está directamente involucrado con la activación de respuestas moleculares relacionadas con la resistencia y la promoción del crecimiento vegetal.

Las plantas poseen varios mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos. La SAR (Resistencia Sistémica Adquirida) se induce por el ataque de algunas plagas o por inoculación de un patógeno hemibiótrofo, y se caracteriza por un aumento temprano de síntesis endógena de SA (ácido salicílico) y la producción de proteínas PR. La inducción de la expresión de genes de la ruta de SAR de microorganismos endofíticos los diferencian de algunas rizobacterias que generalmente desembocan la respuesta ISR (Resistencia Sistémica Inducida) y que a su vez es independiente de la acumulación de SA y no tiene vinculación con la expresión de genes PR (Nuez et al., 2004; Pieterse et al., 2014).

La presencia de rizobacterias endófitas no patógenas como *B. subtilis* en el tejido vegetal induce la activación del mecanismo de defensa ISR en plantas, por lo que el huésped aumenta su resistencia frente al ataque de patógenos. Investigaciones realizadas por Gond et al., (2015) involucran a la bacteria endofítica *B. subtilis* productora de compuestos antifúngicos capaz de inducir la expresión de genes de defensa PR del huésped con el fin de prevenir o reducir el crecimiento de patógenos fúngicos. Al mismo tiempo, las rizobacterias endófitas pueden producir moléculas activas relacionadas con la hormona vegetal auxina por lo que es capaz de inducir un mayor crecimiento en tejidos vegetales.

### **2.7.1 Genes de resistencia PR involucrados en la respuesta de defensa**

Los genes PR son familias de genes que codifican para proteínas llamadas PR (Pathogenesis-related), las mismas que desempeñan un papel importante en la resistencia de las plantas contra una gran variedad de patógenos. La presencia de las proteínas PR codificadas por la planta se presentan generalmente en presencia de patógenos (Edreva, 2005). La variedad de las proteínas PR en diferentes sistemas de interacción planta-patógeno ha proporcionado la agrupación de estas proteínas en familias dependientes de las funciones que cumplen, y las secuencias nucleotídicas. Actualmente, se ha clasificado en 17 grupos de proteínas PR, en función a sus propiedades o actividades (Nuez et al., 2004).

Las proteínas PR-1 son las más abundantes de todos los grupos, ya que se acumulan en mayor proporción en respuesta a una infección. Así, se considera a la familia PR-1 como indicadores de la activación de la respuesta SAR de la planta. Su expresión es detectable a nivel local, en torno al punto de infección, y también a nivel sistémico asociada generalmente a la respuesta SAR activada por la presencia de patógenos que producen necrosis del tejido en el que infectan (Van Loon y Van Strien, 1999).

La activación de la respuesta SAR es fundamental para la óptima defensa contra el ataque de patógenos. La expresión de estos genes se encuentra estrechamente relacionada con la presencia de patógenos como virus, hongos y bacterias en el tejido vegetal. La activación del SAR se debe a la acumulación de ácido salicílico (SA) el mismo que induce la expresión de genes PR-1. Los mecanismos por los cuales el SA induce la expresión de genes PR-1 se relaciona con el reconocimiento de determinantes de avirulencia o moléculas efectoras como la flagelina o quitina encontradas en los patógenos, que posteriormente serán reconocidos por la planta por proteínas de resistencia también llamadas proteínas R (Silva et al., 2018). También, la expresión de genes PR puede estar relacionado con una proteína afín al SA con función catalasa capaz de incrementar los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y al mismo tiempo actuar como mensajero secundario del SA en la señalización de la respuesta SAR (Mori, Pinontoan, Kawano, y Muto, 2001). Otro posible mecanismo de la expresión de genes PR-1 se relaciona con su capacidad de activar el transporte de sacarosa en la planta y de este modo alterar los niveles de fotoasimilados, de esta manera la sacarosa podría actuar como una molécula señalizadora capaz de regular la expresión génica concretamente de genes PR (Nuez et al., 2004).

En definitiva, el ataque por patógenos modifica los procesos fisiológicos de una planta en el que se encuentran involucrados varias vías de señalización mediadas por hormonas, las mismas que están estrechamente relacionadas con algunos procesos fisiológicos de desarrollo de la planta, por lo que adquieren nuevas funciones con el propósito de proporcionar a la planta una defensa efectiva y rápida (Nuez et al., 2004; Ruiz-Lozano et al., 1999).

### **2.7.2 Inducción de genes de crecimiento de plantas**

Las rizobacterias promotoras del crecimiento como *B. subtilis* son capaces de desencadenar una serie de reacciones que involucran sustancias que influyen el crecimiento de tejidos vegetales. Las auxinas son hormonas vegetales involucradas en los procesos de crecimiento, diferenciación vascular, respuestas

trópicas, formación de raíces laterales y adventicias (Mathesius, 2008). Estas hormonas se sintetizan especialmente en los tejidos más jóvenes de la planta, puede ser dependiente o independiente de concentraciones de triptófano o sus precursores (Garay-Arroyo, de la Paz Sánchez, García-Ponce, Álvarez-Buylla, y Gutiérrez, 2014). La auxina es capaz de transportarse de una célula vegetal a otra en forma basipetal hacia las raíces en un proceso llamado transporte polar de auxinas o PAT por sus siglas en inglés *Polar Auxin Transport*. La expresión de genes involucrados con el transporte de auxinas puede indicar la estimulación del crecimiento por factores externos. La regulación de las vías de síntesis de auxinas dependen también de la influencia de estímulos externos como la luz, la temperatura y los nutrientes, y de factores internos como la presencia de otras hormonas (Ljung, 2013; Woodward y Bartel, 2005). Además, los niveles intracelulares de auxinas son también regulados por la conjugación de auxinas con péptidos, aminoácidos y azúcares.

La auxina es considerada como un ácido débil, sin embargo, cuando se encuentra presente en el entono ácido de la pared celular toma forma protonada y por ende es capaz de entrar en las células por difusión (Mathesius, 2008). Al mismo tiempo, las auxinas pueden ingresar a las células vegetales por proteínas transportadoras como AUX1, LAX y PGP4. El transporte de auxinas puede ser rápido y de larga distancia llevado a cabo por difusión en el floema que transporta auxinas a los órganos jóvenes de la parte aérea al resto de la planta, y otro transporte de auxinas puede ser lento y de corta distancia que es llevado a cabo por transportadores de membrana por difusión. El transporte de auxinas a larga distancia es fundamental para el óptimo desarrollo de raíces laterales y tallo; en cambio el transporte de auxinas de corta distancia influye en el desarrollo del tejido vascular, formación del eje embrionario, respuesta a tropismos, y morfogénesis de flores, frutos y raíces (Garay-Arroyo et al., 2014).

Existen varias familias de proteínas transportadoras involucradas en el PAT, entre estas se destacan proteínas de influjo como AUX y LAX, y proteínas de eflujo como PIN (PIN-FORMED) y ABCB (ATP-BINDING-CASSETTE B) (Vanneste y Friml, 2009).

Las proteínas AUX y LAX se localizan en el tejido vascular de las raíces de plantas y pueden actuar como simportadores de auxinas debido a la presencia de un gradiente de protones, y de este modo puede proporcionar direccionalidad al flujo de auxinas y a la vez participar en el crecimiento de raíces laterales, gravitropismo y fototropismo (Swarup y Péret, 2012). Además, se ha demostrado la expresión de genes AUX1 en células del protofloema y por lo tanto su participación en la descarga de auxinas del floema y en el transporte PAT (Mathesius, 2008; Swarup y Péret, 2012).

Por otro lado, el pH en el interior de las células vegetales es elevado, por lo que la auxina desprotonada no podrá difundirse y requiere de proteínas (PINs) que exporten la hormona (Billou et al., 2005; Blakeslee et al., 2007).

La familia de las proteínas PIN que permiten el eflujo de las auxinas, están constituidas por ocho miembros dependiendo de su ubicación que posteriormente determinará el flujo y dirección de las auxinas. De este modo, las proteínas PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7 se encuentran en la membrana plasmática por lo que intervienen en la dirección del transporte de auxinas hacia el resto de tejido vegetal; las proteínas PIN5, PIN6 y PIN8 se encuentran en el retículo endoplasmático y por ende participa en la homeostasis de la auxina (Garay-Arroyo et al., 2014).

Estudios realizados por Noh, Bandyopadhyay, Peer, Spalding, y Murphy, (2003) han demostrado que las proteínas PIN1 se localizan en las células del parénquima en el brote y en células protofloema de la raíz, por lo que influyen directamente en el transporte acropetal y basipetal. Además, las proteínas PIN3 se han relacionado con el transporte lateral de la fitohormona auxina y por lo tanto se encuentra asociado a respuestas fisiológicas que involucran la orientación y crecimiento de la raíz (Friml et al., 2002).

La expresión de genes que codifican para proteínas PIN1 y PIN3 y su influencia en el transporte y acumulación de auxinas específicamente en la especie *Lupinus albus* en relación a la variación del PAT depende de los tejidos y la influencia del medio ambiente en el que se encuentre (Oliveros-Valenzuela et al., 2007). Por lo tanto, la presencia normal de proteínas AUX1, PIN1 y PIN3 es

primordial para el crecimiento y desarrollo normal de los tejidos vegetales. Por ende, la sobreexpresión de genes relacionados con el transporte de auxina podría confirmar la estimulación del crecimiento vegetal inducido por la colonización de bacterias endofíticas en las raíces de plantas (Blakeslee, J., Peer, W y Murphy, A., 2005; Vanneste y Friml, 2009).

Cabe destacar que la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas PIN puede afectar positivamente a la transcripción. Por otro lado, también puede verse afectado de manera negativa debido a la acumulación y presencia de altas concentraciones de proteínas PIN. Por lo tanto, la regulación positiva o negativa en la transcripción de proteínas transportadoras de auxinas puede influenciar en el transporte óptimo de auxinas hacia los tejidos vegetales (Garay-Arroyo et al., 2014).

### **3 Capítulo III. PROCEDIMIENTOS**

#### **3.1 Población y muestra**

Se utilizó el aislado de *B. subtilis* Ctpx S2-1 que demostró ser efectivo para el control de la antracnosis del chocho andino causada por *C. acutatum* (Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018). Este aislado fue originalmente obtenido de zonas productoras de chocho de la provincia de Cotopaxi, a partir de la filósfera y rizosfera de plantas. La identificación a nivel de especie se determinó a partir de amplificación con primers específicos y secuenciación mediante el reconocimiento del ARN ribosomal 16-18S (Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018).

Cepas de *C. acutatum* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Este patógeno se aisló originalmente de vainas y semillas con síntomas de antracnosis en cultivos de chocho andino de la provincia de Cotopaxi (Falconí, 2012).

Se utilizó semillas de *L. mutabilis* que pertenecen a la variedad “INIAP 450 Andino”, genotipos F3 (ECU-2658XECU8415), y fueron proporcionadas por el laboratorio de Fitopatología del IASA de la Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE.

## **3.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos**

### **3.2.1 *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1**

#### **3.2.1.1 Conservación de la cepa *B. subtilis* Ctpx S2-1**

El aislado *B. subtilis* Ctpx S2-1 se conservó a largos períodos mediante el uso de criobolas (bolas o cuentas de material sintético usadas para impregnar la solución celular a preservar) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se almacenó los cultivos en medio NYDA (caldo nutritivo  $8\text{ g L}^{-1}$ , extracto de levadura  $4\text{ g L}^{-1}$ , dextrosa  $10\text{ g L}^{-1}$ , agar  $20\text{ g L}^{-1}$ ) se inoculó en criobolas y se mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Rutinariamente, se replicó cultivos puros de la bacteria en medio NYDA (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Se realizó triple estría y se dejó en una incubadora (*High Performance Shaking Incubator Labnet International* 311DS) a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

#### **3.2.1.2 Preparación del inóculo de la bacteria**

Para los diferentes experimentos, el inóculo de *B. subtilis* Ctpx S2-1 se obtuvo a partir de los cultivos frescos en medio NYDA de 24 horas de incubación a  $30^{\circ}\text{C}$ , para lo cual se tomó de cinco a seis colonias y se resuspendió en 5 mL de solución tampón fosfato salino estéril (PBS,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20 M 70 mL,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.20 M 30 mL y agua desionizada 300 mL, v/v/v, pH 6.5) en un tubo para centrifuga y se homogenizó durante 10 segundos por vórtex (*Fisher Scientific® AnaLog Vortex Mixer* 20V). La concentración se determinó mediante la medición de la

densidad óptica (absorbancia) a 600 nm. La concentración celular del inóculo inicial se ajustó a  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.1.3 Suspensión bacteriana de *B. subtilis* Ctpx S2-1

Para el crecimiento de *B. subtilis* y sus lipopéptidos se tomó 100 µL del inóculo y se colocó en 200 mL de medio estéril de cultivo líquido MOLP Medio Optimizado para la producción de lipopéptidos: peptona 30 g L<sup>-1</sup>, sacarosa 20 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 7 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 g L<sup>-1</sup>, CuSO<sub>4</sub> 0.0001 mg L<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0005 mg L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.004 mg L<sup>-1</sup>, KI 0.0002 mg L<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.6 mg L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0.45 g L<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.14 mg L<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 mg L<sup>-1</sup>, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>, pH 7 (Jacques et al., 1999). Se incubó a 30°C ± 5°C a 150 rpm durante 24 horas.

La concentración bacteriana se determinó por densidad óptica como se describió anteriormente y se ajustó a  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, para los ensayos moleculares y de efectividad con raíces de plántulas de *L. mutabilis*.

## 3.2.2 *Colletotrichum acutatum*

### 3.2.2.1 Calibración del inóculo

El aislado de *C. acutatum* se obtuvo mediante criocultivos y se replicó en agar papa dextrosa agar comercial o PDA (23.7 g L<sup>-1</sup>) o a partir de semillas con síntomas de antracnosis siguiendo el protocolo descrito por (Yáñez-Mendizábal et al., 2011) para la activación de patógenos de plantas a partir de material infectado. El patógeno se cultivó en PDA y se incubó a 20 ± 5°C durante cinco días. Posteriormente, para los ensayos de HPTLC-autobiografía se recolectó conidios frescos a partir de cultivos en PDA y se transfirió a tubos con 5 mL de

agua estéril más Tween 80 (Sigma) 0.05% y la concentración se determinó y ajustó a  $5 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  en cámara de Neubauer.

### **3.2.3 *Lupinus mutabilis***

#### **3.2.3.1 Desinfección de semillas *L. mutabilis* F3**

Se colocó en un frasco de vidrio de 200 mL agua desionizada estéril y las semillas a desinfectar, y se dejó en constante agitación a 180 rpm por cinco minutos. Posteriormente, se descartó el agua desionizada y se sumergió en una solución de 100 mL al 10% de cloro y agua desionizada estéril por cinco minutos a 180 rpm. Por último, se descartó la solución utilizada anteriormente y se añadió agua desionizada estéril con el mismo rango de tiempo y agitación descrito anteriormente.

#### **3.2.3.2 Germinación de semillas *L. mutabilis***

Para cada ensayo, se tomó 30 semillas desinfectadas con anterioridad y se colocó en medio Agar-Agar (bacto agar 23 g  $\text{L}^{-1}$ ). En cada caja se sembró 10 semillas en condiciones estériles en una cámara de bioseguridad (*ESCO Class II BSC AC2-459*) y se colocó en una cámara de germinación (*Thermo Scientific 3759*) durante 7 días con 10 horas de luz y 14 de oscuridad a 21°C con una humedad del 70%.

### **3.2.4 Análisis Bioquímico**

#### **3.2.4.1 Extracción de lipopéptidos de *B. subtilis* Ctpx S2-1**

La extracción de lipopéptidos antifúngicos se realizó siguiendo el protocolo establecido por Yáñez-Mendizábal et al., (2012). Los extractos de lipopéptidos se obtuvieron a partir de un cultivo de la bacteria de 72 horas de crecimiento como se describió anteriormente. Se dispensaron alícuotas de 40 mL del cultivo en diferentes tubos para centrífuga, y posteriormente se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 5000 rpm (3 veces) en una centrifugadora Eppendorf (*Centrifuge 5804 R eppendorf*). De cada alícuota se separó la biomasa del sobrenadante libre de células (SLC) y se colocó en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad. Los SLC fueron mezclados con n-butanol en relación 1:1 y se agitó a 200 rpm en un agitador orbital (*Boeco Universal Orbital Shaker PSU-10i*) dentro de una cámara extractora de gases (*BIOBASE FH 1500*) durante tres horas para extraer los lipopéptidos. Posteriormente, las muestras se transfirieron en tubos para centrífuga nuevos y se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Los extractos butanólicos (fase orgánica lipoproteínas + n-butanol) se separaron de la fracción acuosa y se colocaron en cajas Petri de vidrio en agitación a 80 rpm hasta que se evapore el n-butanol. Una vez evaporado el n-butanol, los extractos de lipopéptidos fueron resuspendidos en metanol absoluto calidad HPLC o agua estéril en relación 1:10 y almacenados a 4°C para su posterior análisis mediante HPTLC, bioautobiografía y actividad antifúngica.

#### **3.2.4.2 Caracterización de lipopéptidos antifúngicos producidos por *B. subtilis***

El análisis bioquímico se llevó a cabo a partir de extractos metanólicos de lipopéptidos antifúngicos de *B. subtilis* Ctpx S2-1 obtenidos a partir de cultivos de 72 horas en MOLP. La presencia de las familias de lipopéptidos y su actividad antifúngica se analizó mediante HPTLC y HPTLC-autobiografía respectivamente, según el protocolo establecido por Yáñez-Mendizábal et al., (2012). Se utilizó placas de sílica gel (*Sigma Aldrich® TLC plates Z193291-1PAK Sigma gel matrix LXW 20X20*) en donde se inoculó 100 µL de extracto de lipopéptidos (fase estacionaria). Se utilizó una mezcla de cloroformo, metanol y

agua (65:25:4 mL v/v/v) como fase móvil y se dejó correr por dos horas. Posterior a este tiempo, se extrajo, se dejó secar y se evaluó el factor de retención (Rf) bajo luz UV.

$$Rf = \frac{D_s}{D_d} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde,  $D_s$  es la medida de la distancia recorrida por la muestra, y  $D_d$  representa la medida de la distancia recorrida por el disolvente (Sharma et al., 2009).

Después de la determinación del factor de retención, se dejó secar la placa de sílica y se colocó en una caja Petri de dimensiones iguales a la placa. Se preparó 150 mL de medio PDA y se colocó 100  $\mu$ L del inoculó de *C. acutatum* descrito anteriormente. Se dejó incubar a 25°C por siete días. Por último, se observó las zonas de inhibición del hongo en relación a los lipopéptidos identificados en la placa de sílica.

### 3.2.5 Análisis molecular

#### 3.2.5.1 Extracción y cuantificación de ADN de *B. subtilis* Ctpx S2-1

Para el análisis molecular, la extracción de ADN se realizó a partir de cultivos frescos de *B. subtilis* Ctpx S2-1 de 24 horas en MOLP. La biomasa de las muestras fue recolectada luego de un período de incubación en MOLP y el ADN genómico fue extraído mediante el kit *PureLink® Genomic DNA Mini kit* (Catálogo número K182002), siguiendo las especificaciones del fabricante Invitrogen, (2013).

Se tomó muestras del cultivo y se colocó en tubos para centrífuga estériles de 50 mL. Se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se colocó la biomasa en tubos de 1,5 mL estériles y fue resuspendida en 180  $\mu$ L de buffer de lisozima (Tris-HCL 10 mM pH 7,5; EDTA 1mM; NaCl 100 mM; *Ready-Lyse™ Lysozyme Solution* al 1,5% 1  $\mu$ L), y se mezcló bien por vórtex. Se incubó en un termobloque (*Labnet Accublock Digital*

*Dry Bath D12000*) a 37°C por 30 minutos. Se añadió 20 µL de *Proteinasa Ky* y se mezcló por vórtex. Posteriormente, se colocó 200 µL de *Genomic lysis/Binding buffer* y se mezcló vigorosamente por vórtex. Se incubó en un termobloque a 55°C por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió 200 µL de etanol absoluto (96-100%) y se mezcló por vórtex durante 5 segundos. Se transfirió el lisado a una columna con tubo colector y se centrifugó (*Centrifuge 5424 eppendorf*) a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector, se colocó uno nuevo y se añadió 500 µL de *Wash Buffer I*. Se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo de recolección, se colocó uno nuevo y se añadió 500 µL de *Wash Buffer II*. Se centrifugó a 15000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector y se colocó en un tubo para microcentrífuga de 1,5 mL estéril. Se colocó 100 µL de *Elution Buffer* dentro de la columna y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 15000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó la columna y se cuantificó el ADN extraído a 260 nm (*Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer*); usando como blanco *Elution Buffer*. Los tubos con ADN se almacenaron a -20°C para su análisis posterior.

### **3.2.5.2 Amplificación de genes involucrados en la síntesis de lipopéptidos de *B. subtilis* Ctpx S2-1**

La amplificación de genes de síntesis de lipopéptidos producidos por *B. subtilis* Ctpx S2-1 se realizó por reacción en cadena de polimerasa (PCR) de punto final mediante *Platinum Taq DNA Polymerase* (Catálogo número 10966018) siguiendo el protocolo modificado de Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018). Los primers utilizados para cada familia de lipopéptidos fueron diseñados en base a las especificaciones descritas por Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018), Gond et al., (2015) y secuencias de isómeros de las familias de lipopéptidos en NCBI para especies del género *Bacillus* que codifican para síntesis de lipopéptidos como se muestra en la tabla 2.

La reacción de PCR se llevó a cabo a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Cada reacción contiene 2.5  $\mu\text{L}$  de 10X PCR Buffer, 1  $\mu\text{L}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{L}$  de 10 mM dNTPs (Solución 100  $\mu\text{M}$  Invitrogen), 0.75  $\mu\text{L}$  de 5U/  $\mu\text{L}$  de *Platinum® Taq DNA Polymerase*, 0.5  $\mu\text{L}$  de 10  $\mu\text{M}$  de cada primer *Forward* y *Reverse*, 17.25  $\mu\text{L}$  de agua tipo Milli-Q, y 2  $\mu\text{L}$  de ADN con concentración de 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . En las reacciones de controles negativos o *No Template Control* (NTC) se colocó 2  $\mu\text{L}$  de agua tipo Milli-Q en lugar de ADN.

Tabla 2.

*Primers para amplificación de genes de lipopéptidos de B. subtilis Ctpx S2-1*

Gen objetivo	Primers	Secuencias (5'–3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño del amplicón
Surfactina B	<i>SrfB-F</i>	GCGCTCTATTTTGAGCCTGC	60	234
	<i>SrfB-R</i>	GATGCGTCAAATCCGAAGCC		
Fengicina E	<i>FenE-F</i>	ACAAAACGGGTGATTTGGCG	55-60	678
	<i>FenE-R</i>	CATACATCCGCTTTTGGGCG		
Iturina B	<i>ItuB-F</i>	CAGCGGATAAAGCGTCGTTG	60	952
	<i>ItuB-R</i>	TCAGGATCCAGGGGCACATA		

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (*Eppendorf Vapo-Protect LB 22331 Hamburg 6321*) según el protocolo establecido por Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por un minuto, 60°C por un minuto y 72°C por un minuto. Por último, la extensión final se realizó a 72°C por 8 minutos.

Posteriormente los productos PCR fueron documentados por electroforesis en gel de agarosa (*Ultra Pure Agarose, Invitrogen*) al 2% de concentración. Para la visualización de los amplificados se usó 2  $\mu\text{L}$  de SYBR Safe (*SYBR Safe DNA gel stain 10000X, Invitrogen*) y las muestras fueron cargadas añadiendo 2  $\mu\text{L}$  de Blue juice 10X (*Blue juice 10X Gel Loading Buffer*). Se utilizó marcador de peso

molecular de 100 bp (*TrackIt 100bp DNA Ladder*) (Anexo 1). Se dejó correr el gel en una cámara de electroforesis (*BioRad EC300XL Thermo Scientific*) a 100 V por 40 minutos. Se observó los resultados en un Transiluminador (*Bio-Rad Chemidoc MP Imaging System*).

### **3.2.5.3 Inducción de la expresión de genes de crecimiento y resistencia en plántulas de *L. mutabilis***

Para cuantificar el efecto de *B. subtilis* Ctpx S2-1 en la expresión de genes de resistencia y crecimiento se siguió el protocolo diseñado por Gond et al., (2015) con modificaciones que consiste en:

#### **3.2.5.3.1 Extracción y cuantificación de ARN de *L. mutabilis***

Se utilizaron plántulas de *L. mutabilis* F3 de siete días germinación en condiciones descritas anteriormente (Apartado 3.2.3.2) para dos tratamientos experimentales, que incluyen la incubación por 2.5 horas con una suspensión de *B. subtilis* Ctpx S2-1 y con extractos de lipopéptidos en agua estéril del mismo aislado. La extracción de ARN se realizó de las raíces de plántulas después de haber transcurrido el tiempo de incubación para los dos tratamientos. Como control de los dos tratamientos se utilizó una muestra de raíces sumergidas por el mismo tiempo en PBS. Para cada tratamiento se extrajo ARN de cinco muestras de raíces de plántulas de *L. mutabilis* utilizando el kit *PureLink® RNA Mini kit* (Catálogo número 12183018A), y se siguió el protocolo establecido por el fabricante Invitrogen, (2010).

Se utilizó en total cinco plántulas de *L. mutabilis* para cada tratamiento. Las raíces de chocho recolectadas se cortaron en pedazos de aproximadamente 2 cm y se molieron con nitrógeno líquido en un mortero estéril. Se transfirió aproximadamente 0.1 g de raíces molidas de manera inmediata a un tubo para

microcentrífuga de 1.5 mL estéril y se sumergió en nitrógeno líquido. Se colocó 1000  $\mu$ L de *Lysis Buffer* activada con 10  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente para luego centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un nuevo tubo de 1.5 mL estéril. Se añadió 500  $\mu$ L de etanol absoluto (96-100%) y se mezcló por vórtex a velocidad máxima por 15 segundos. Se transfirió 750  $\mu$ L del sobrenadante incluyendo el precipitado a un *spin cartridge*, estos cartuchos fueron centrifugados a 13000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente descartando el sobrenadante. Se añadió 700  $\mu$ L de *Wash Buffer I* a cada cartucho con muestra y se centrifugó a 13000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo. Se colocó 500  $\mu$ L de *Wash Buffer II* a cada *spin cartridge* para después ser centrifugados a 13000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente, y se descartó el líquido del tubo colector. Se repitió el último paso para asegurar que el ARN esté limpio. Se centrifugó los cartuchos a 13000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente para secar la membrana. Se descartó los tubos colectores y se colocó un tubo de 1.5 mL estéril en cada cartucho. Por último, se añadió 40  $\mu$ L de *RNAse-free Water* al centro de cada cartucho y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Los cartuchos fueron centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente para recuperar el ARN de cada muestra. La calidad de ARN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

La cuantificación del ARN extraído se realizó a 260 nm (*Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer*); se utilizó como blanco *RNAse-free Water*. Los tubos con ARN se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### **3.2.5.3.2 Tratamiento del ARN de *L. mutabilis* con DNase**

Las muestras de ARN de los diferentes tratamientos fueron tratadas con la enzima DNase para eliminar la posible contaminación por ADN en la muestra. Se utilizó el kit *TURBO DNA-free™ Kit* (Catálogo número AM1907) y se siguió el protocolo establecido por el fabricante Technologies, (2012).

Las concentraciones de ARN de cada muestra fueron igualadas a  $200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  a un volumen final  $26 \text{ } \mu\text{L}$  y fueron colocadas en tubos de  $0.2 \text{ mL}$ . Se añadió  $3 \text{ } \mu\text{L}$  de *10X TURBO DNase Buffer* y  $1 \text{ } \mu\text{L}$  de *TURBO DNase* a cada muestra. Se mezcló por inversión 5 veces y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos en un termociclador (*Labnet TC-020-24 Multigene MWI*). Se añadió  $3 \text{ } \mu\text{L}$  de *DNase Inactivation Reagent* y se mezcló por vórtex por 2 segundos. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se mezcló cada minuto por inversión durante este tiempo. Se centrifugó (*Centrifuge 5424 eppendorf*) a  $10000 \text{ rpm}$  por 90 segundos. Finalmente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de  $0.2 \text{ mL}$  estéril y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$ .

La calidad del ARN resultante fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% siguiendo la metodología anteriormente descrita.

### **3.2.5.3.3 Diseño de primers de *L. mutabilis* para el análisis de crecimiento y resistencia**

El diseño de los primers de *L. mutabilis* para genes involucrados en el crecimiento y resistencia se basó en secuencias de especies del género *Lupinus*, encontradas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para el gen PR-1, las secuencias descritas para el mismo gen en *Arabidopsis* fueron comparadas en *Lupinus* spp. mediante el algoritmo en línea *BLAST*. Se realizó un alineamiento de las secuencias escogidas de *Lupinus angustifolius* en el programa *MEGA7* y se escogió los primers en regiones no conservadas tomando en cuenta las condiciones requeridas para el diseño de primers.

Las secuencias utilizadas para los genes de crecimiento fueron de la especie *Lupinus albus*, y los primers fueron diseñados en el programa en línea *Primer designing tool* de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). De la misma manera, se analizó y comprobó la especificidad *in silico* de los primers por *BLAST*. Para el gen de control 18S rRNA de *L. mutabilis* se utilizó primers

diseñados y otorgados por el Centro de Investigación UDLA. Los primers y las características de las secuencias utilizadas se detallan en la tabla 3.

Tabla 3.

Primers utilizados para el estudio de expresión de genes de crecimiento y resistencia de *L. mutabilis* por RT-PCR.

Nombre del gen	No. Accesoión	Definición	Primers	Secuencias (5'-3')	Tamaño del amplicón
18S			18S-F 18S-R	ATGATAACTCGACGGATCGC CTTGGATGTGGTAGCCGTTT	180
PR-1	XM_019 563118.1	<i>Pathogenesis-related protein 1</i>	PR1-F6 PR1-R6	TTACTTGAGCATTGAGGTGGTG CATGCTCACTGCATCAACC	211
AUX1	AM23538 7.2	<i>Auxin influx carrier (AUX1 gene)</i>	AUX1-F F2 AUX1-R2	AATTGCCCTGTGCCAGTAACATTTAT TGGTTGGCCCTGAGTGTGTC	229
PIN3	AM40740 5.1	<i>Auxin efflux carrier (PIN3 gene)</i>	PIN3-F PIN3-R	TGGCCAAAATCCTCATGATTCAA CCTGGTTTCTCCTGCCATG	113
PIN1	AM23538 8.2	<i>Auxin efflux carrier (PIN1 gene)</i>	PIN1-F1 PIN1-R1	TGTCATGACTGCAATGGTGC TCCAAATGGCTAGAACAACC	242

#### **3.2.5.3.4 Amplificación de genes de crecimiento y resistencia de *L. mutabilis* por Reacción en Cadena de Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR)**

Para verificar la expresión de genes de crecimiento y resistencia por amplificación en punto final con los primers especificados anteriormente se siguió el protocolo establecido por Invitrogen, (2001) a partir de la síntesis de cDNA mediante el uso de *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase*.

La reacción se llevó optimizó a un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Cada reacción contiene 5.7  $\mu\text{L}$  de agua tipo Milli-Q, 7.5  $\mu\text{L}$  de *2X Reaction Mix*, 0.6  $\mu\text{L}$  de *SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix*, 0.3  $\mu\text{L}$  de concentración 10  $\mu\text{M}$  de cada primer *Forward* y *Reverse*, y 0.6  $\mu\text{L}$  de ARN tratado con DNasa de concentración aproximada de 140  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador (*Eppendorf Vapo-Protect LB 22331 Hamburg 6321*) a 55°C por 25 minutos para la síntesis de cDNA, 94°C por 2 minutos para la denaturación, seguido de 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 68°C por 30 segundos. Por último, la extensión final se realizó a 68°C por 5 minutos.

La visualización y cuantificación de las muestras se realizó en gel de agarosa (*Ultra Pure Agarose, Invitrogen*) con concentración del 2%. Se añadió 2  $\mu\text{L}$  de SYBR Safe (*SYBR Safe DNA gel stain 10000X, Invitrogen*). Las muestras se cargaron con 2  $\mu\text{L}$  de Blue juice 10x (*Blue juice 10X Gel Loading Buffer*). Se utilizó un marcador molecular de 100 bp (*TrackIt 100bp DNA Ladder*). Se corrió el gel en una cámara de electroforesis (*BioRad EC300XL Thermo Scientific*) por 35 minutos a 100 V. Por último, para observar los resultados se utilizó un Transiluminador (*Bio-Rad Chemidoc MP Imaging System*). Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

### 3.2.5.3.5 Cuantificación de expresión génica relativa por RT-PCR

La cuantificación relativa de la expresión de genes PR-1, AUX1, PIN1 y PIN3 se realizó mediante el uso de fotodocumentador (*Bio-Rad Chemidoc MP Imaging System*) en la herramienta de cuantificación del mismo programa, para la cuantificación de cada tratamiento se utilizó como referencia la banda de amplificación del gen 18S.

### 3.2.6 Prueba de efectividad de *B. subtilis* Ctpx S2-1 y lipopéptidos en plántulas de *L. mutabilis*

Los ensayos de efectividad *in vivo* se realizaron tratando las semillas de chocho andino (*L. mutabilis*) variedad INIAP 450 Andino F3 utilizadas en esta investigación. Para cada ensayo, las semillas se desinfectaron, sembraron y germinaron como se describió anteriormente. Los tratamientos consistieron en *B. subtilis* Ctpx S2-1 de concentración  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, extractos acuosos de lipopéptidos de concentración 1X, y un control negativo de PBS. Para cada tratamiento, las raíces de 25 plántulas de siete días de germinación fueron sumergidas en los tratamientos antes descritos durante 2.5 horas al igual que se describió anteriormente para la extracción de ARN. A continuación, las plántulas de cada tratamiento fueron sembradas en sustrato estéril en semilleros durante 24 días (Anexo 6) en una cámara de germinación (*BIOBASE BJPX-A250*) en condiciones homogéneas con una temperatura de 21°C, 73% de humedad, con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Cada ensayo se realizó por triplicado y se tomaron datos de índice de clorofila, relación raíz-tallo y peso seco.

### 3.2.6.1 Índice de clorofila

Se midió el índice de clorofila de 15 plántulas de *L. mutabilis* de tratamiento con bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS. Las lecturas de clorofila se realizaron de una hoja de cada plántula mediante el medidor de clorofila *CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Sciences)*. Se midió la clorofila de tres repeticiones de cada tratamiento.

### 3.2.6.2 Relación raíz-tallo

Se midió la longitud en centímetros del tallo y raíz principal de 15 plántulas de *L. mutabilis* de cada tratamiento. Se tomó en cuenta las tres repeticiones de cada tratamiento para la medición.

### 3.2.6.3 Análisis de materia seca

En primer lugar, se retiraron las plantas de los semilleros y se limpió toda la tierra posible de cada una de las plantas. El análisis de materia seca total se realizó de cinco plántulas de *L. mutabilis* de cada tratamiento con tres repeticiones cada uno. Posteriormente, se limpiaron y secaron las bandejas de aluminio y se colocaron en una estufa (*BIOBASE BJPX-Summer*) a 80°C por 24 h. Después se enumeraron y pesaron las bandejas de aluminio en una balanza analítica (*AS 220.R2 RADWAG*), después se colocó una planta de cada tratamiento en cada bandeja y se pesó de nuevo para de esta manera obtener el peso fresco de cada planta. Se colocaron las bandejas con las plantas en una estufa a 80°C durante 24 h. Posteriormente, se traspasaron a un desecador por 24 h. Por último, se pesó cada una de las bandejas con las muestras para determinar el peso seco de cada tratamiento.

La relación de peso fresco y peso seco se determinó por el porcentaje de humedad en base húmeda (Ecuación 2) de las plántulas de cada tratamiento.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde  $P_i$  es el peso inicial o peso fresco de la plántula y  $P_f$  es el peso final o peso seco de la misma.

### 3.3 Evaluación estadística de los resultados

Los experimentos de cuantificación génica relativa se repitieron cinco veces para cada tratamiento, las pruebas de efectividad de *B. subtilis* Ctpx S2-1 en plántulas de *L. mutabilis* se repitieron tres veces, y los datos se recolectaron para los análisis. Los datos obtenidos fueron analizados usando el software estadístico R Commander (*R version 3.5.1*). Se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación LSD (*Least Significant Difference*) entre medias utilizando el procedimiento ANOVA del software *R Commander* con un valor  $P < 0.05$ . Los datos se representaron en figuras de diagramas de cajas para la diferenciación entre tratamientos mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

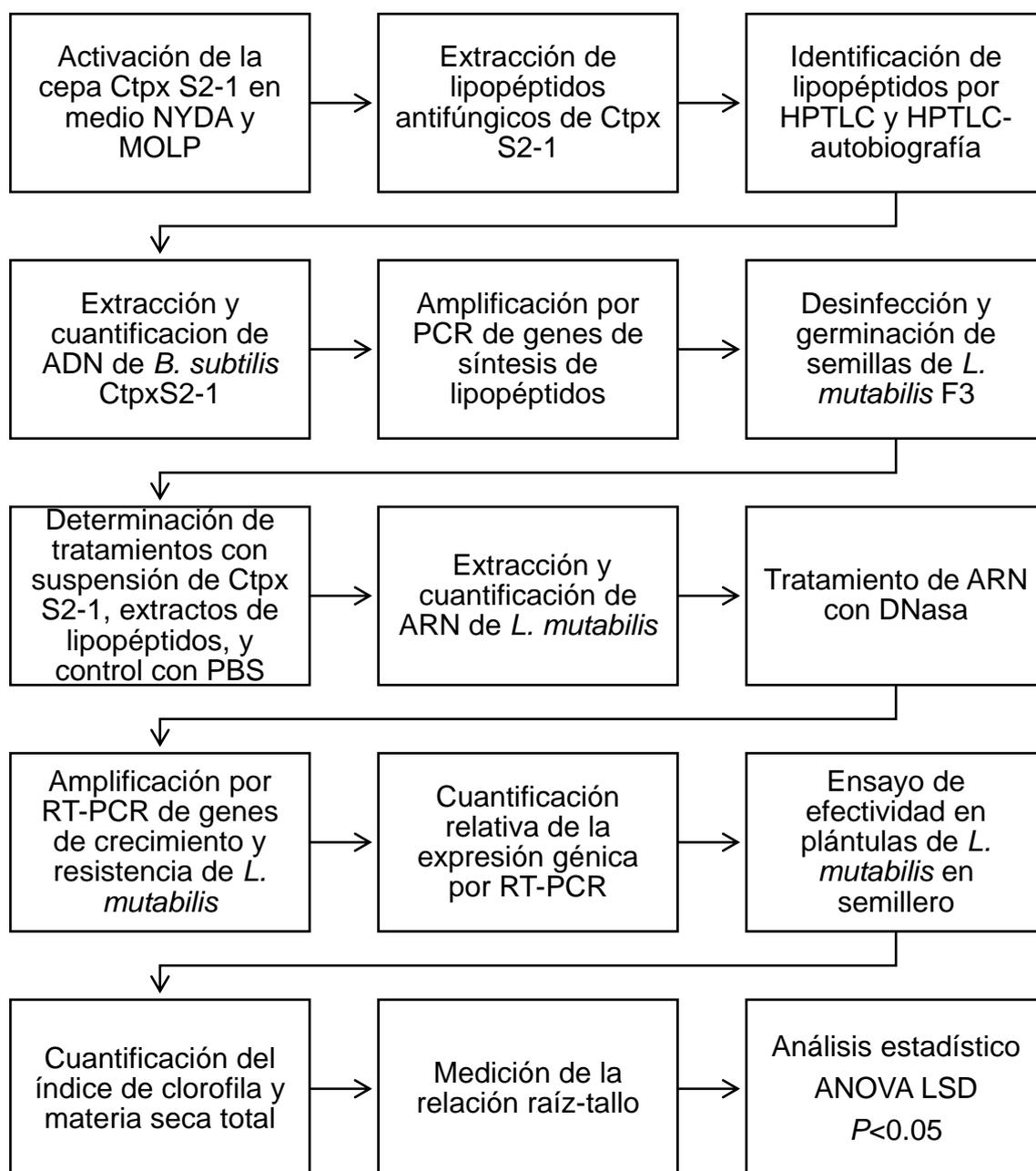


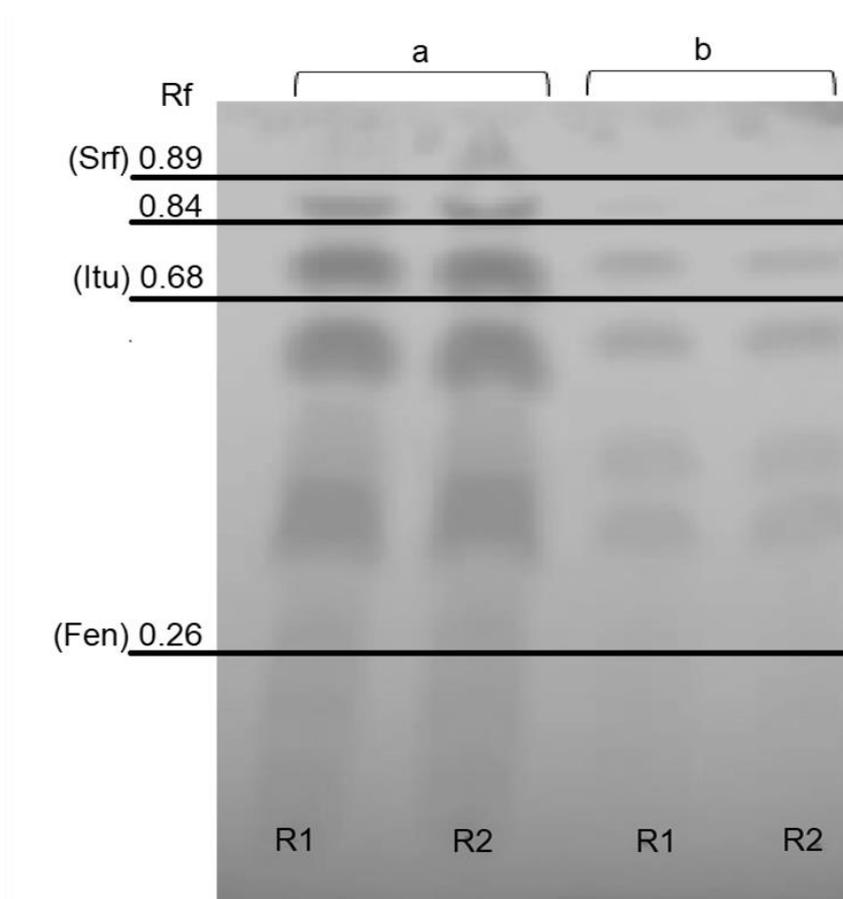
Figura 2. Diagrama de flujo de los procedimientos experimentales realizados durante la fase experimental de la investigación.

## 4 Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Síntesis de lipopéptidos antifúngicos de *B. subtilis* Ctpx S2-1 contra *C. acutatum*

La presencia de lipopéptidos pertenecientes a las familias fengicinas, iturinas y surfactinas producidos por *B. subtilis* Ctpx S2-1 a las 72 horas en MOLP fueron identificados en los cromatogramas de capa fina (HPTLC).

Como se observa en la figura 3 las bandas identificadas en la placa de sílice corresponden a las familias de fengicinas, iturinas y surfactinas con sus correspondientes Rf que demuestran la presencia de las tres familias de lipopéptidos producidas a las 72 horas de crecimiento de la bacteria en MOLP. Al comparar estos Rf de las de las fracciones producidas por la bacteria con los producidos por otros aislados de la misma especie (Romero et al., 2007b; Yáñez-Mendizábal et al., 2012; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018), se evidencia la presencia de la familia de fengicinas con un Rf alrededor de 0.26, 0.68 para iturinas, y entre 0.84 a 0.89 para surfactinas. Las diferencias entre los valores de Rf se deben a la variabilidad del contenido de cadenas de carbono entre familias de lipopéptidos. Las fengicinas poseen cadenas de carbono largas que pueden variar entre 14 y 18 carbonos por lo que presentan un mayor peso y menor capacidad de retención en el análisis cromatográfico. En el caso de la familia de iturinas posee de 14 a 17 carbonos aproximadamente, por lo que su peso será menor al de la familia de fengicinas. Por último, la familia de surfactinas presenta de 13 a 15 carbonos que a su vez le proporciona un menor peso y por lo tanto una mayor capacidad de retención.



*Figura 3.* Análisis por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de extractos metanólicos de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1.

a) Concentración 10X.

b) Concentración 1X.

Las bandas en cada columna representan las fracciones de lipopéptidos fengicinas (Fen), iturinas (Itu) y surfactinas (Srf) y sus correspondientes factores de retención. Se realizó dos repeticiones (R1-R2).

En este caso, se evaluó la presencia de familias de lipopéptidos provenientes de extractos metanólicos de *B. subtilis* en dos concentraciones (1X y 10X) para obtener una mejor definición y visualización de cada una de las bandas correspondientes a cada familia de lipopéptidos en el análisis por HPTLC. En

efecto, los extractos de lipopéptidos de concentración 10X se distinguen de mejor manera en comparación con los de concentración 1X debido a su elevado contenido de lipopéptidos antifúngicos en metanol. A pesar de esto, en los extractos de concentración 1X se logra distinguir también a la familia de fengicinas, iturinas y surfactinas en la misma distancia que los extractos de concentración 10X.

La producción de lipopéptidos antifúngicos de *B. subtilis* ha sido estudiada a fondo para su implementación en la posible formulación de biopesticidas para el control de patógenos fúngicos. Investigaciones realizadas por Yáñez-Mendizábal, Viñas, et al., (2012) y Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) específicamente en aislados de *B. subtilis* demuestran que la producción de lipopéptidos antifúngicos a mayor concentración se encuentra a las 72 horas de incubación en medio MOLP y que los mismos poseen un alto potencial antagónico contra *C. acutatum* ya que son metabolitos secundarios que van acumulándose en el medio de manera progresiva.

Estudios que involucran el uso de espectrometría de masas que permite la caracterización de las familias de lipopéptidos de *B. subtilis* mediante la técnica MALDI-TOF por sus siglas en inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* ha demostrado la presencia de 15 a 17 carbonos para fengicinas, 16 a 19 carbonos para iturinas, y de 13 a 15 carbonos para surfactinas, por lo que se ha permitido clasificar a las familias de lipopéptidos de acuerdo a la cantidad de carbonos en sus cadenas en conjunto con otras características (Vater et al., 2002). Al mismo tiempo, investigaciones similares realizadas por Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) enfocadas en el control biológico específicamente de *C. acutatum* en *L. mutabilis* por medio de lipopéptidos producidos por *B. subtilis* Ctpx S2-1 involucran el análisis por TLC de extractos de lipopéptidos que muestran la presencia de tres familias de lipopéptidos con un Rf de 0.1 para fengicinas, 0.4 para iturinas y 0.7 para surfactinas. Por lo que se puede decir que los valores del factor de retención para cada familia de lipopéptidos en esta investigación son semejantes a los descritos anteriormente, ya que ambos análisis se realizaron a partir de extractos de lipopéptidos de aislados de *B. subtilis* de plantas vulnerables a enfermedades fúngicas. Cabe

recalcar que la diferenciación de la familia de fengicinas en el cromatograma no es completamente clara como en el caso de las iturinas y fengicinas, a pesar de esto se logró comprobar la presencia de las mismas mediante autobiografía-HPTLC que involucra la inhibición del crecimiento del hongo *C. acutatum*.

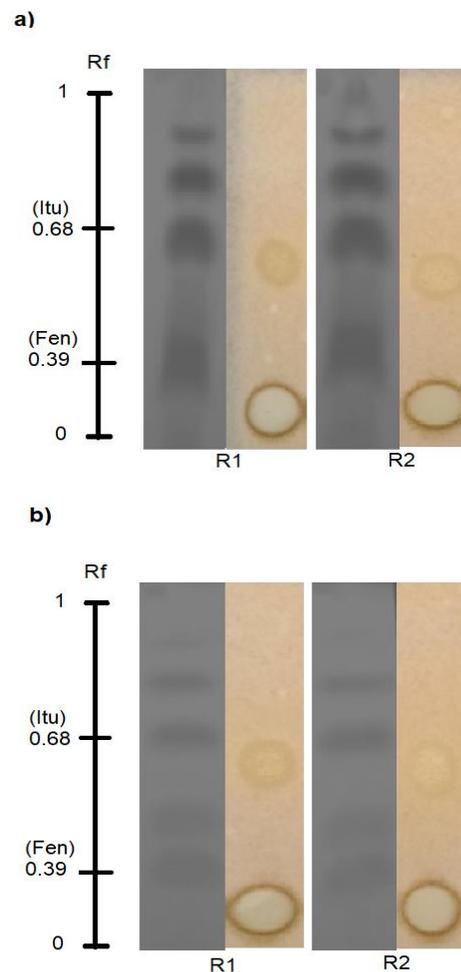
Considerando que existe una diferencia de aproximadamente 0.2 en los valores de Rf reportados por Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) comparados con esta investigación, esta diferencia podría estar influenciado por el tiempo de incubación, modificaciones en el protocolo de extracción de lipopéptidos y concentración del inóculo del patógeno, se pudo diferenciar claramente la presencia de familias de lipopéptidos mediante los valores de factor de retención relacionados directamente con la cantidad de carbonos de cada una de ellas. Lo que refuerza que la bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1 produce lipopéptidos antifúngicos capaces de contrarrestar el crecimiento del patógeno *C. acutatum*.

#### **4.2 Actividad antifúngica de lipopéptidos determinada por autobiografía-HPTLC**

La actividad biológica de los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* Ctpx S2-1 contra *Colletotrichum acutatum* se determinó mediante autobiografía-HPTLC que permite la detección de la capacidad de inhibición del crecimiento micelial del hongo.

Los cromatogramas de capa fina (HPTLC) de extractos de lipopéptidos de 72 horas de incubación en medio MOLP del aislado Ctpx S2-1 de concentración 10X y 1X como se mostró en la figura 3, fueron utilizados para la determinación de la actividad antifúngica de las familias de lipopéptidos. Se evidenció el potencial antagónico de las familias de iturinas y fengicinas mediante la identificación de la inhibición del hongo y el Rf en la autobiografía-HPTLC, por lo tanto al presentar un Rf aproximado de 0.26 y 0.68 para la familia de fengicinas e iturinas respectivamente, se comprobó la capacidad de inhibición del crecimiento micelial del hongo *C. acutatum* con un mayor potencial en la familia

de fengicinas en comparación con la familia de iturinas como se observa en la figura 4.



**Figura 4.** Análisis por autobiografía-HPTLC de extractos de lipopéptidos de *B. subtilis* Ctpx S2-1 y su actividad antifúngica contra *C. acutatum*.

a) Concentración 10X

b) Concentración 1X

Los cromatogramas utilizados para la autobiografía-HPTLC están representados en color gris y el resultado de la autobiografía-HPTLC en color amarillo en donde se puede observar halos de inhibición en forma de círculos. La inhibición del crecimiento se presenta en los extractos de lipopéptidos en las zonas de las

familias de lipopéptidos fengicinas (Fen) e iturinas (Itu) con Rf de 0.39 y 0.68 respectivamente. Cada ensayo se realizó con dos repeticiones (R1-R2).

Las zonas en donde se presentó una elevada inhibición fueron en las familias de fengicinas e iturinas como se mostró en la figura 4, confirmando que la familia de lipopéptidos de mayor actividad antifúngica son las fengicinas, al igual que resultados reportados por Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) y Romero et al., (2007a) en donde se comprobó que la familia de fengicinas presenta capacidad antifúngica por sí sola. Por otro lado, se ha demostrado que la familia de iturinas, especialmente la iturina A, también posee propiedades antifúngicas aunque en menor proporción como se evidencia en resultados reportados por Romero et al., (2007) y Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018), en donde se demostró que existe inhibición de las fracciones de iturinas al presentar halos de inhibición pequeños, sin embargo al combinar las mismas con las demás familias de lipopéptidos incrementaron su longitud de inhibición de manera considerable evidenciando el efecto sinérgico entre lipopéptidos.

Las familias de lipopéptidos iturinas y fengicinas poseen actividad antifúngica comprobada por autobiografía-HPTLC, sin embargo, la familia de surfactinas no presenta capacidad antagónica contra el hongo *C. acutatum* debido a que las surfactinas poseen propiedades antibacterianas y antivirales más no antifúngicas ya que en la bicapa de fosfolípidos presenta colesterol, que disminuye la capacidad de desestabilización en la membrana del patógeno. Sin embargo, las surfactinas pueden potenciar la acción antifúngica de iturinas cuando se encuentran en combinación en una mezcla (Ongena et al., 2005; Touré et al., 2004). Además, se confirmó la capacidad antifúngica de lipopéptidos especialmente de la familia de fengicinas antifúngicas comparable con lo reportado previamente y brinda una base para pasar al análisis molecular de interacciones que involucran agentes de biocontrol-planta.

Además, el uso de extractos de lipopéptidos de 72 h de incubación está directamente relacionado con la capacidad de formación de endosporas de *B. subtilis*, ya que una mayor producción de endosporas está relacionado con una

mayor síntesis de lipopéptidos antifúngicos lo que a su vez ratifica lo concluido por Yáñez-Mendizábal, Viñas, et al., (2012) y Jacques et al., (1999).

El uso de bacterias endofíticas con capacidad antagónica contra algunos patógenos fúngicos se considera como una alternativa para el control de plagas que afectan a cultivos. La capacidad antagónica de las sustancias antifúngicas producidas por *B. subtilis* en concentraciones adecuadas afectan el desarrollo y crecimiento de los conidios de hongos principalmente en la fase de germinación de la enfermedad por lo que puede ser utilizado para la posible formulación de biopesticidas (Ongena y Jacques, 2008).

### 4.3 Análisis molecular de la síntesis de lipopéptidos antifúngicos de *B. subtilis* Ctpx S2-1

#### 4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN de *B. subtilis* Ctpx S2-1 de 24 h de incubación en medio MOLP se estandarizó y optimizó para la obtención de muestras de ADN de una mejor calidad y concentración (Tabla 4).

Tabla 4.

*Concentraciones de ADN y pureza de B. subtilis Ctpx S2-1. Se realizaron tres repeticiones (R1-R3).*

Muestra	Concentración (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280
Ctpx S2-1_R1	250.7	1.82
Ctpx S2-1_R2	278.5	1.78
Ctpx S2-1_R3	259.4	1.85

Los resultados obtenidos para el aislado Ctpx S2-1 fueron óptimos, ya que en las tres repeticiones la concentración de ADN fue elevada con un nivel de pureza

de 260/280 aceptable aproximado a 1.8 lo que descarta la posible contaminación con proteínas o compuestos orgánicos. De manera general, se sabe que una buena calidad de ADN es esencial para la obtención de resultados óptimos en análisis de PCR tal y como se ha confirmado en estudios realizados por Mosquera, (2005).

Es importante mencionar que posteriormente todas las concentraciones de ADN fueron igualadas a  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para pruebas PCR.

Adicionalmente, la extracción de ADN se realizó a las 24 h cuando la bacteria alcanzó su máximo crecimiento exponencial alrededor de  $9.5 \text{ log UFC mL}^{-1}$  concordando con los resultados reportados por Yáñez-Mendizábal, Viñas, et al., (2012) demostrando ser eficiente por la mayor concentración de ADN obtenido.

#### **4.3.2 Amplificación de genes involucrados en la síntesis de lipopéptidos por PCR**

La amplificación de genes de síntesis de lipopéptidos antifúngicos se realizó específicamente en los isómeros de la familia de surfactina B (Srf-B), fengicina E (Fen-E) e iturina B (Itu-B) mediante los primers diseñados anteriormente. En estudios realizados por Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) y Gond et al., (2015) en bacterias *Bacillus* spp. se identificaron varios isómeros de genes de lipopéptidos incluidos Srf-B, Fen-E, Itu-B involucrados en su síntesis y que poseen un alto potencial antagónico para patógenos fúngicos.

De manera general, la familia de surfactinas, iturinas y fengicinas poseen una estructura de un péptido cíclico de siete aminoácidos para surfactinas e iturinas y 10 aminoácidos para fengicinas unidos a una cadena de ácido graso que pueden variar de C-13 a C-16 para surfactinas, de C-14 a C-17 para iturinas, y desde C-14 a C-18 para fengicinas, lo que resulta en la presencia de isómeros para cada familia de lipopéptidos (Kowall et al., 1998; Ongena et al., 2005). Los isómeros de surfactinas, iturinas y fengicinas son sintetizados con frecuencia principalmente en medio optimizado para la producción de lipopéptidos, en el

que se ha logrado caracterizar isómeros principalmente de C-15, C-16 y C-17 en la ramificación del ácido graso de las familias de surfactinas, iturinas y fengicinas respectivamente (Akpa et al., 2001; Ongena y Jacques, 2008).

En el caso de la familia de surfactinas se pudo identificar claramente la presencia específicamente del isómero Srf-B con un amplicón de 234 pb en *B. subtilis* Ctpx S2-1 como se muestra en la figura 5 (carril 2), lo que confirma la síntesis de surfactina, que fue corroborado también en el análisis bioquímico mostrado en la figura 3. La presencia de la familia de surfactinas en los lipopéptidos antifúngicos es esencial, ya que se distinguen por su potente comportamiento tensoactivo debido a la presencia de fuertes interacciones con los componentes de la membrana de fosfolípido del patógeno y al mismo tiempo contribuyen en la colonización de la rizosfera y el mantenimiento de una relación estable con la superficie de la planta (Kim et al., 2007; Pereira et al., 2013). Además, es importante mencionar que la producción de varios surfactantes se presenta de manera general en la fase exponencial y estacionaria en *Bacillus* spp. según datos reportados por Lawrence et al., (2014).

Para la familia de fengicinas se logró identificar de igual manera la presencia del isómero Fen-E con un amplicón aproximado de 678 pb en el aislado Ctpx S2-1 como se muestra en la figura 5 (carril 4), lo que evidencia la presencia de genes involucrados en la síntesis de fengicina E diferenciada por poseer C-17 en la ramificación del ácido graso de su estructura según investigaciones realizadas por Akpa et al., (2001) y Yáñez-Mendizábal y Falconí, (2018). Los lipopéptidos poseen características antifúngicas principalmente debido a la presencia de fengicinas, las mismas que poseen una elevada actividad fungitóxica especialmente contra hongos filamentosos (Ongena y Jacques, 2008; Romero et al., 2007b). Generalmente, la síntesis de fengicinas es óptima en la fase logarítmica y estacionaria del crecimiento bacteriano a las 72 h, sin embargo, la amplificación del gen de síntesis de fengicinas se realizó con ADN de 24 h de incubación del aislado Ctpx S2-1, razón por la cual en este caso se visualiza la presencia de la banda de producto de PCR con menor intensidad para Fen-E al igual que resultados de investigaciones reportadas por Rangarajan, Dhanarajan, y Sen, (2015).

Por último, se evidenció la familia de iturina B con un amplicón resultante aproximado de 952 pb como se muestra en la figura 5 (carril 5), por lo que se demostró la presencia de genes específicamente para Itu-B, caracterizado por poseer C-16 en el ácido graso que forma parte de su estructura, para la síntesis de iturinas que forman parte de los lipopéptidos (Akpa et al., 2001). La familia de iturinas se destaca por antimicótica contra levaduras y hongos, sin embargo al estar en conjunto con la familia de surfactinas potencia la actividad antifúngica para contrarrestar el crecimiento micelial de hongos filamentosos (Maget-Dana et al., 1992; Ongena y Jacques, 2008; Yáñez-Mendizábal, Zerrouh, et al., 2012; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018).

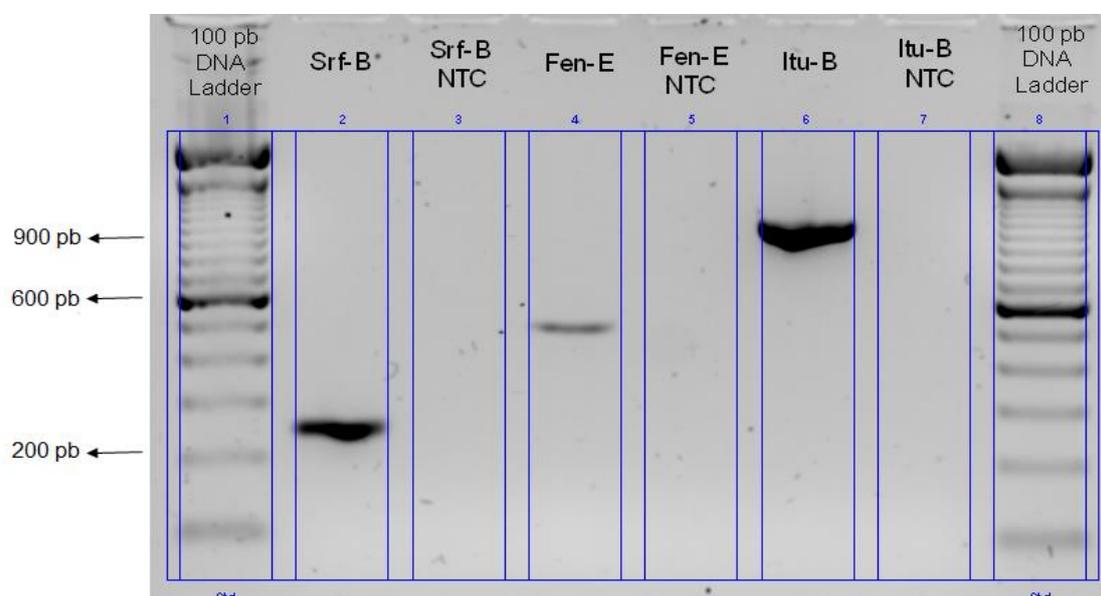


Figura 5. Amplificación a partir de ADN de *B. subtilis* Ctpx S2-1.

La amplificación muestra genes que codifican para la síntesis de lipopéptidos de las familias surfactina B (Srf-B), fengicina E (Fen-E) e iturina B (Itu-B). El control negativo de cada gen se muestra como NTC. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb que se encuentra en los carriles 1 y 8.

La síntesis de las tres familias de lipopéptidos por *B. subtilis* es fundamental, ya que en conjunto poseen propiedades que les permiten interactuar con las capas lipídicas y al mismo tiempo desestabilizar la integridad de la membrana celular de posibles patógenos dependiente a la dosis de lipopéptidos, lo que ayuda al

control del desarrollo de patógenos fúngos (Lawrance et al., 2014; Ongena y Jacques, 2008; Tran et al., 2007). En este caso se logró demostrar la presencia de genes involucrados en la síntesis de las familias de lipopéptidos de las tres familias principales de lipopéptidos surfactinas, iturinas y fengicinas. Además, tomando en cuenta los resultados presentados por HPTLC en conjunto con las pruebas PCR para la confirmación de síntesis de lipopéptidos, se puede afirmar que *B. subtilis* Ctpx S2-1 es capaz de sintetizar lipopéptidos antifúngicos, por lo que podrá ser empleado para su uso como control biológico específicamente contra el hongo *C. acutatum* que afecta la gran mayoría de cultivos de *L. mutabilis*.

#### 4.4 Análisis molecular del efecto de *B. subtilis* Ctpx S2-1 en la expresión de genes de crecimiento y resistencia de *L. mutabilis*

##### 4.4.1 Extracción y cuantificación de ARN de *L. mutabilis*

La extracción de ARN total de raíces de *L. mutabilis* se realizó de los tratamientos descritos anteriormente, donde se obtuvo ARN de buena calidad (Tabla 5) en donde se detalla la concentración de ARN de cada tratamiento experimental. Cabe recalcar que las concentraciones mostradas y posteriormente utilizadas para RT-PCR fueron previamente tratadas con DNasa.

Tabla 5.

*Concentraciones de ARN y pureza de L. mutabilis con tratamiento de bacteria, lipopéptido y PBS como control.*

Repetición	Tratamiento	Concentración (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280
	Bacteria	95	2.02
R1	Lipopéptido	189.5	1.99
	PBS	95.1	2.05

R2	Bacteria	173.9	2.09
	Lipopéptido	157.5	2.03
	PBS	120.3	2.01
R3	Bacteria	188.6	2.10
	Lipopéptido	132.1	2.04
	PBS	99.2	2.01
R4	Bacteria	211.8	1.99
	Lipopéptido	172.5	2.08
	PBS	107.5	2.04
R5	Bacteria	160.5	2.03
	Lipopéptido	176.4	2.01
	PBS	154.5	2.07

Los resultados que se obtuvieron para *L. mutabilis* fueron óptimos, debido a que en la mayoría de las cinco repeticiones de cada tratamiento la concentración de ARN fue mayor a  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , además se evidenció un alto nivel de pureza reflejado por el valor 260/280 aproximado a 2 que descarta contaminación con compuestos orgánicos o proteínas tal y como se reportó en investigaciones realizadas por Burleigh, (2001).

#### **4.4.2 Evaluación del efecto de *B. subtilis* Ctpx S2-1 y lipopéptidos en la expresión relativa de genes involucrados en el crecimiento y resistencia de *L. mutabilis***

La cuantificación de expresión génica relativa por RT-PCR se considera como una técnica rápida y sensible, sin embargo, puede presentar problemas ya que existen fuentes de variación como la concentración y la eficiencia de amplificación que pueden afectar a los resultados. El uso de un gen de control apropiado es esencial para la obtención de datos verídicos, ya que el mismo se usará para la comparación con el gen a estudiar (Dean, Goodwin, y Hsiang, 2002).

En esta investigación se usó al gen 18S rRNA como control, ya que ha sido utilizado con éxito en RT-PCR como control interno para medir la expresión génica en raíces de *Medicago truncatula* en investigaciones realizadas por Burleigh, (2001), el gen de control fue escogido ya que presenta cambios mínimos en el transcurso de los experimentos. En esta investigación se utilizó el gen 18S ya que se mantuvo constante en todos los tratamientos y ensayos realizados, es decir, este gen sirvió como control en todas las condiciones experimentales de los tratamientos.

#### 4.4.2.1 Genes AUX1

La expresión del gen que codifica para las proteínas AUX1 se observó en el tratamiento con la suspensión de *B. subtilis* Ctpx S2-1 con un amplicón aproximado de 229 pb como se muestra en la figura 6. Además, a pesar de que la banda resultante en el tratamiento de bacterias a raíces de *L. mutabilis* no tiene una alta definición solo es apreciable cuando se somete a dicho tratamiento, es decir, el gen AUX1 solo se expresa en el mismo.

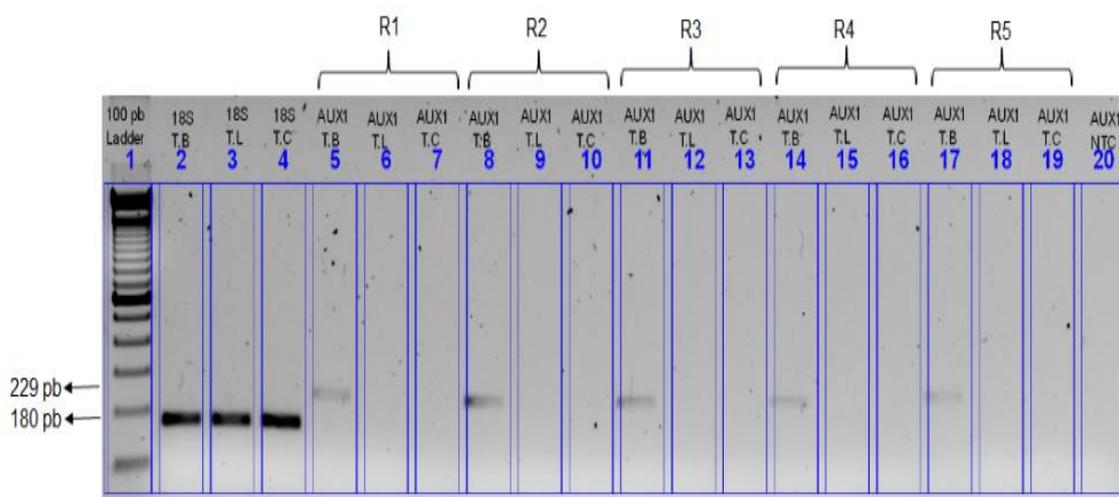


Figura 6. Amplificación del gen AUX1 de tratamiento con bacteria (T.B), lipopéptidos (T.L), y control sin tratar de PBS (T.C).

El gen 18S para cada tratamiento se encuentra en los carriles 2, 3, 4 y se utilizaron como controles internos para comparar la inducción en la expresión de AUX1. Todos los tratamientos y controles fueron comparados con el marcador de peso molecular de 100 pb. El control negativo se representa como NTC en el carril 20. Se realizó cinco repeticiones (R1-R5) de cada tratamiento.

Al analizar los resultados entre el tratamiento con bacteria y el control sin tratar usando como control interno el gen 18S (Figura 7) se determinaron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) para el gen AUX1. Sin embargo, en el caso del tratamiento con extractos de lipopéptidos y control con PBS no se detectaron diferencias (Anexo 2).

El transportador de auxinas AUX1 es considerado como uno de los portadores de afluencia principales debido a su alta afinidad por la hormona. La auxina desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la raíz, mantenimiento del meristemo apical (Billou et al., 2005), células vegetales (Grieneisen, Xu, Marée, Hogeweg, y Scheres, 2007; Sabatini et al., 1999) y crecimiento de raíces laterales (Petrasek y Friml, 2009). A pesar de la importancia que poseen las proteínas AUX1 en el desarrollo de raíces, según investigaciones realizadas por Jones et al., (2009) los genes AUX1 se expresan en los tricomas de la parte aérea y no en las células de la raíz, sin embargo AUX1 tiene elevada influencia en el desarrollo de la raíz ya que los mutantes defectivos del mismo estudio poseían considerables reducciones en la longitud de las raíces. Por esta razón, las bandas de un amplicón resultante no se muestran en tratamientos con lipopéptidos y control de PBS como se mostró en la figura 6, es decir, no se expresa el gen AUX1 en estos tratamientos, ya que las amplificaciones de este gen fueron a partir de tejido radicular. Sin embargo, existe amplificación para el mismo gen a partir del mismo tejido en el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 que podría deberse a la presencia de sustancias precursoras como triptófano involucradas con la hormona de crecimiento auxina.

En el tratamiento con biomasa activa de la bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1 se demostró que se puede inducir la expresión de AUX1 (Figura 7), este resultado

podría estar correlacionado con la influencia de los lipopéptidos *in vitro* e *in situ* de la bacteria con las raíces de planta, además de las interacciones bióticas con los genes AUX-LAX. La mayoría de las bacterias que se encuentran asociadas a las plantas son capaces de sintetizar auxinas, por lo que desembocan varios resultados que van desde la estimulación del crecimiento hasta la promoción de interacciones simbióticas (Spaepen, Vanderleyden, y Remans, 2007). La síntesis de auxinas mediada por bacterias se da principalmente por la estimulación por medio de exudados de raíces como el triptófano el mismo que puede ser usado más adelante como precursor para la síntesis de esta hormona según resultados reportados por Kefford, Brockwell, y Zwar, (1960). Al mismo tiempo se ha logrado la secuenciación de varios genomas bacterianos que revelaron la presencia de varias vías de síntesis de auxinas que poseen una alta similitud con las vías de síntesis de las plantas (Spaepen et al., 2007).

Adicionalmente, resultados reportados por Grebe et al., (2002) confirman que las proteínas AUX1 son necesarias para mantener elevados niveles de auxina principalmente en la zona de diferenciación para facilitar el crecimiento de la raíz, así como también en el mantenimiento de la polaridad en células de raíces.

Es importante mencionar que las proteínas AUX1 que se encuentran en las raíces de las plántulas podrían estar asociado a la formación de nódulos, ya que la interacción simbiótica con bacterias benéficas puede cambiar la forma de absorción de auxinas generando nódulos para la fijación de nitrógeno según investigaciones realizadas por Peret et al., (2007). Sin embargo, en este caso no se observó nódulos debido a que las plántulas fueron utilizadas para la extracción de ARN después del período de incubación con el aislado Ctpx S2-1. Por lo que, existe la posibilidad de generación de nódulos como parte de la respuesta a la interacción con la bacteria y en conjunto con la posible síntesis de

precursores de auxinas podrían estar relacionadas con la expresión de genes AUX1 en raíces de *L. mutabilis*.

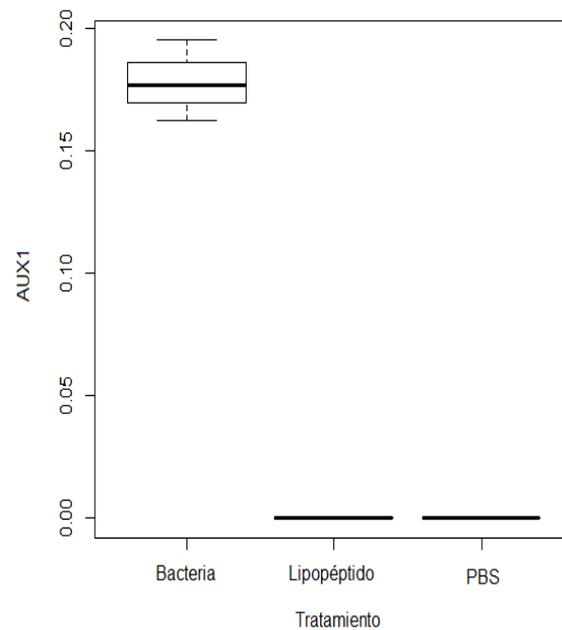
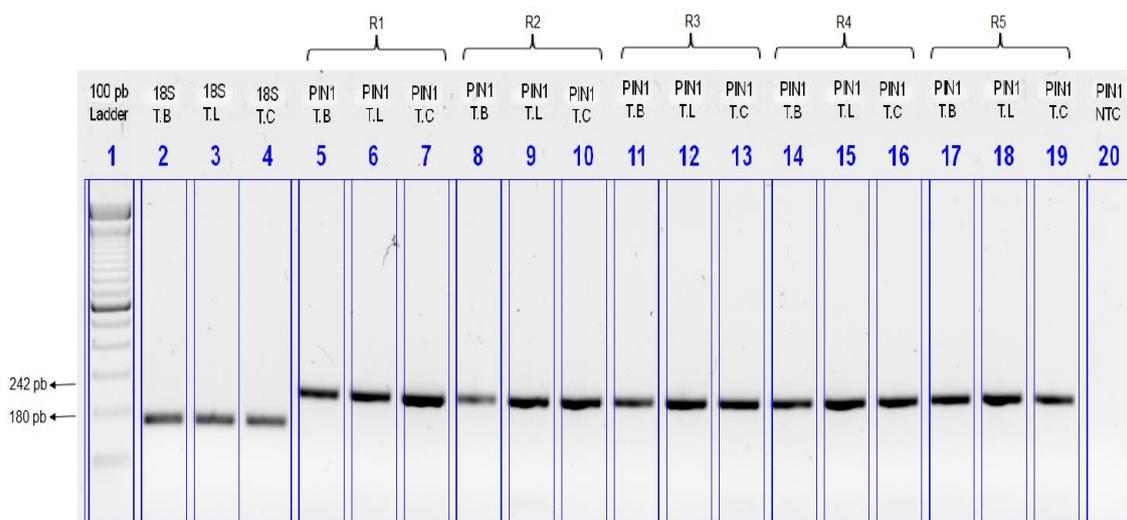


Figura 7. Diagrama de cajas que muestra la variación de expresión génica relativa del gen AUX1 de *L. mutabilis* de los tratamientos con bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS.

#### 4.4.2.2 Genes PIN1

Como se muestra en la figura 8 para el gen que codifica para proteínas PIN1 se observó que todos los tratamientos con suspensión de bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS indujeron la expresión con un amplicón resultante de 242 pb.



*Figura 8.* Amplificación del gen PIN1 de tratamiento con bacteria (T.B), lipopéptidos (T.L), y control sin tratar de PBS (T.C).

El gen 18S para cada tratamiento se encuentra en los carriles 2, 3, 4 y se utilizaron como controles internos para comparar la inducción en la expresión de PIN1. Todos los tratamientos y controles fueron comparados con el marcador de peso molecular de 100 pb. El control negativo se representa como NTC en el carril 20. Se realizó cinco repeticiones (R1-R5) de cada tratamiento.

En estudios realizados por Oliveros-Valenzuela et al., (2007) y Vanneste y Friml, (2009) la expresión de las proteínas PIN1 se localiza específicamente en las células vasculares en la raíz que forman parte de la zona apical y está involucrada con la regulación del flujo acropetal de la auxina. La falta de estas proteínas de la familia PIN puede provocar cambios en la acumulación de auxinas y el desarrollo de las plantas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación para el gen PIN1 son consistentes con resultados reportados.

La expresión del gen PIN1 en esta investigación se detectó en los tres tratamientos, ya que la presencia de la familia de las proteínas PIN se considera como el paso limitante en el transporte polar de auxinas y por ende debe estar presente en los tejidos vegetales tal y como se reportó en investigaciones realizadas por Swarup y Péret, (2012).

La cuantificación de expresión génica relativa (Figura 9) reveló que existe una mayor expresión del gen PIN1 en el tratamiento con extractos de lipopéptidos y una disminución de expresión en el tratamiento con la bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1 (Anexo 2).

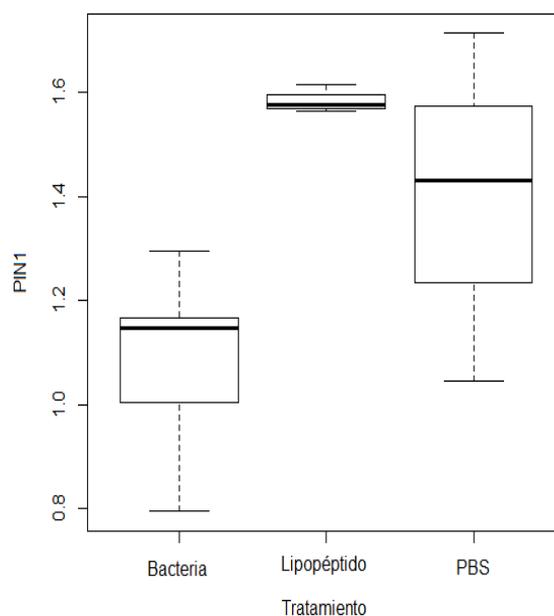


Figura 9. Diagrama de cajas que muestra la variación de expresión génica relativa del gen PIN1 de *L. mutabilis* de los tratamientos con bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS.

Además, se puede especular que la variabilidad de expresión génica podría estar relacionada con el transporte, acumulación y localización de auxinas. Paralelamente, también puede existir una reducción en la expresión de los genes PIN1 en condiciones de estrés biótico como en el tratamiento con bacteria endófitas, ya que la presencia de la misma puede desembocar en principios del posible ingreso y acumulación de auxina en las raíces de *L. mutabilis*. En casos de interacciones con bacterias promotoras del crecimiento en intervalos cortos de tiempo existe una mayor acumulación de auxina debido a la expresión de genes AUX1, por lo que la exportación de las mismas no se realiza con efectividad como se reportó en investigaciones realizadas por Oliveros-Valenzuela et al., (2007). En contraste con los tratamientos con extractos de

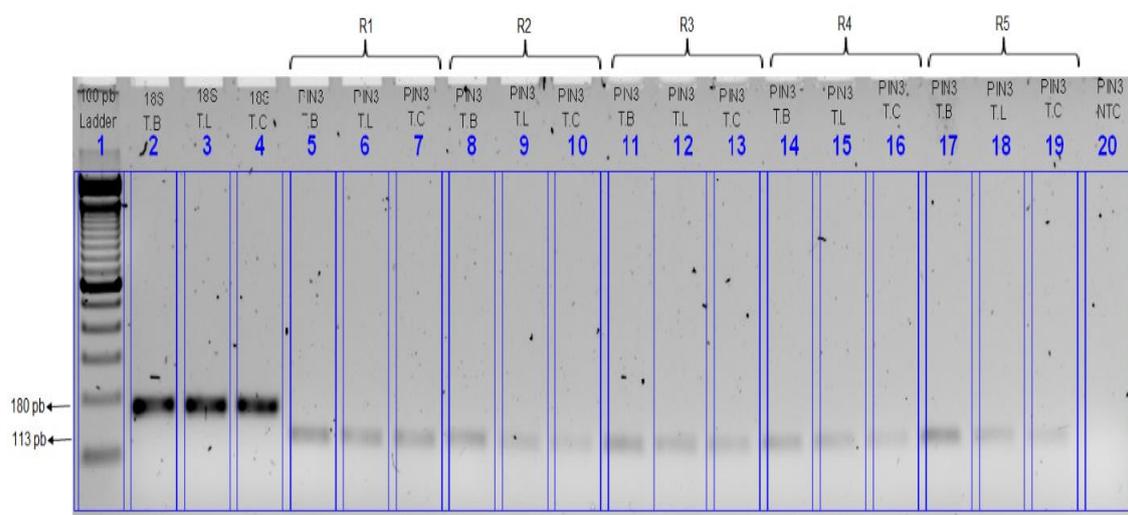
lipopéptidos y control con PBS en donde no existe una acumulación de auxina se podría decir que la expresión de genes PIN1 es mayor, posiblemente debido a la exportación de auxina endógena es realizada de manera normal.

La variación de expresión génica de PIN1 (Figura 9) entre tratamientos puede estar influenciado por los niveles de concentración auxina así como también por su localización de las proteínas PIN1, estas proteínas están principalmente involucradas en el mantenimiento de gradientes de auxinas mediante un flujo direccional intercelular de esta hormona (Vanneste y Friml, 2009). También, es probable que la variación de expresión génica en esta investigación difiera por el transporte óptimo de auxinas debido al incremento de concentración de la hormona en presencia de la bacteria endofítica, así como también en la regulación dependiente del proteasoma y la polaridad en diferentes tipos de células al igual como se reportó en estudios realizados por Sieberer et al., (2000) y Vieten et al., (2005).

Además, se considera que la expresión de genes PIN es variable, ya que la distribución de auxinas permite la integración de señales ambientales y de desarrollo para cambiar los patrones de acumulación de auxina involucrado en el proceso adaptativo de la planta. De esta manera, se podría explicar la baja expresión del gen PIN1 en el tratamiento con *B. subtilis* en comparación con los tratamientos con extractos de lipopéptidos y PBS en esta investigación. Además, la regulación y degradación de proteínas PIN se han considerado como posibles puntos de control que interfieren en los gradientes dinámicos de auxina como se confirmó en investigaciones realizadas por (Vieten et al., 2005). Por lo tanto, se puede decir que la expresión de proteínas PIN1 y su localización están influenciados por la hormona auxina, y es independiente de las interacciones de los lipopéptidos producidos por la bacteria.

#### **4.4.2.3 Genes PIN3**

El gen que codifica para proteínas PIN3 en raíces de *L. mutabilis* se expresa en los tratamientos con suspensión de bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, tratamiento con extractos de lipopéptidos y en el tratamiento control con PBS. De la misma manera, en los tres tratamientos se evidencia la presencia del amplicón resultante con un aproximado de 113 pb como se muestra en la figura 10. En este caso se puede apreciar que la intensidad de la banda es casi la misma para los tres tratamientos.



*Figura 10.* Amplificación del gen PIN3 de tratamiento con bacteria (T.B), lipopéptidos (T.L), y control sin tratar de PBS (T.C).

El gen 18S para cada tratamiento se encuentra en los carriles 2, 3, 4 y se utilizaron como controles internos para comparar la inducción en la expresión de PIN3. Todos los tratamientos y controles fueron comparados con el marcador de peso molecular de 100 pb. El control negativo se representa como NTC en el carril 20. Se realizó cinco repeticiones (R1-R5) de cada tratamiento.

Las proteínas PIN3 están involucradas en el gravitropismo, y se encuentran localizadas de forma asimétrica en la cara lateral de la raíz para de esta manera poder facilitar el movimiento diferencial de la auxina entre la cara superior e inferior de las raíces (Friml et al., 2002). La expresión de genes PIN3 está directamente relacionado con la presencia de auxina en la célula vegetal, ya que está encargada de redistribuir la auxina hacia las células de las raíces laterales

cercanas para luego localizarse en las membranas celulares inferiores aumentando de este modo los flujos de auxina (Blakeslee et al., 2005; Friml et al., 2002).

La cuantificación de expresión génica relativa (Figura 11) demostró que existe una mayor expresión del gen PIN3 en el tratamiento con la bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1 en comparación con los tratamientos con extractos de lipopéptidos y control con PBS (Anexo 2).

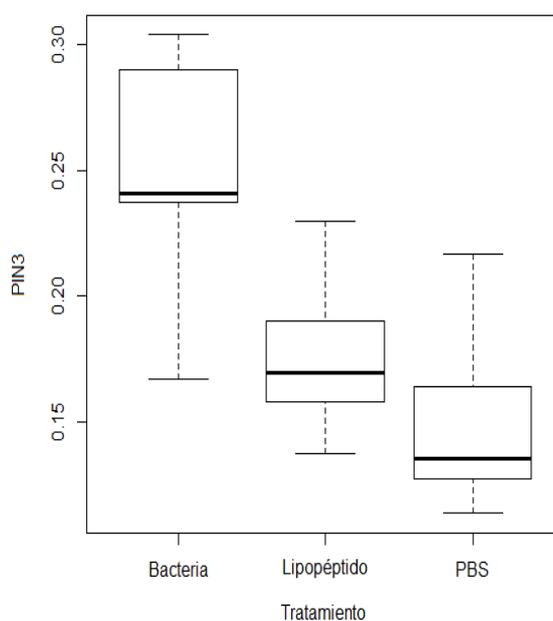


Figura 11. Diagrama de cajas que muestra la variación de expresión génica relativa del gen PIN3 de *L. mutabilis* de los tratamientos con bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS.

Según resultados reportados por Chen et al., (2015) la acumulación local de auxinas es fundamental en el desencadenamiento de varios cambios transcripcionales asociados en el desarrollo durante la organogénesis de plantas. Por lo tanto, se confirmó que el transporte de auxinas cuando se encuentra en concentraciones elevadas es mediado por PIN3, por lo que existe agotamiento de auxina celular por debajo de los niveles que inicialmente era necesario para activar la transcripción de PIN3 y para el almacenamiento temporal de auxinas. De este modo, se explica el comportamiento elevado de la

expresión génica de PIN3 en el tratamiento con bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1 (Figura 11) en raíces de *L. mutabilis*, ya que a diferencia de la auxina endógena que existe en las células vegetales, la producción de una mayor cantidad auxina por parte de la bacteria estimula la expresión de proteínas PIN3.

Además, la expresión de genes PIN3 puede ser modulada eficazmente por señales ambientales como la gravedad, distribuyendo asimétricamente la auxina para finalmente presentar flexión gravitrópica (Friml et al., 2002)

El aumento de niveles de auxina está relacionado con varios procesos de desarrollo como formación de raíces laterales, hojas, flores, órganos florales, diferenciación del tejido vascular, respuestas de crecimiento direccional y la regulación de la actividad del meristema radicular (Sabatini et al., 1999; Vanneste y Friml, 2009). Así como también podría ser el resultado de la inhibición de la exportación de auxina en el sitio de inoculación de la bacteria, lo que podría causar que la auxina se acumule en las raíces (Mathesius, 2008). Del mismo modo, se puede decir que en las leguminosas que forman nódulos incluido *Lupinus* spp. la auxina se puede acumular en las células en fase de división temprana y así estimular la actividad del ciclo celular (Roudier et al., 2003). Por lo tanto, todos los factores antes mencionados pueden influenciar en la expresión de genes de crecimiento incluyendo a AUX1, PIN1 y PIN3.

En particular las proteínas PIN1 y PIN3 son los principales facilitadores de transporte polar de auxinas desde el brote hasta la punta de la raíz (Blakeslee et al., 2007; Friml et al., 2002). Investigaciones realizadas por Billou et al., (2005) y Omelyanchuk et al., (2016) revelaron una alta expresión de genes PIN1 y PIN3 en la raíz, por lo que determina el tamaño del meristemo y por ende la tasa de crecimiento de la raíz primaria. A la par, se puede decir que el control positivo de la transcripción de genes PIN implica a la vez la actividad de proteínas AUX según investigaciones realizadas por Vieten et al., (2005), que se corroboró en esta investigación ya que hubo expresión de los genes antes mencionados.

#### **4.4.2.4 Genes PR-1**

El gen PR-1 que codifica para proteínas relacionadas con la patogénesis en raíces de *L. mutabilis* se observa específicamente en el tratamiento con suspensión de bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1 con un amplicón resultante aproximado de 211 pb como se muestra en la figura 12. En este caso, se puede apreciar que la presencia de la banda para este gen solo se da cuando se somete al tratamiento con bacteria, es decir, el gen PR-1 solo se expresa cuando las raíces se encuentran en contacto con *B. subtilis* Ctpx S2-1.

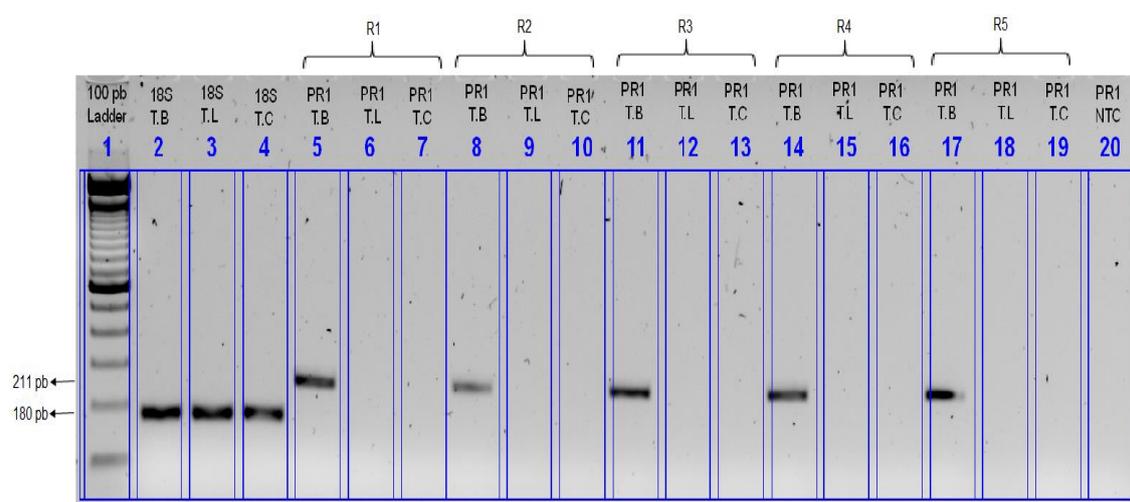
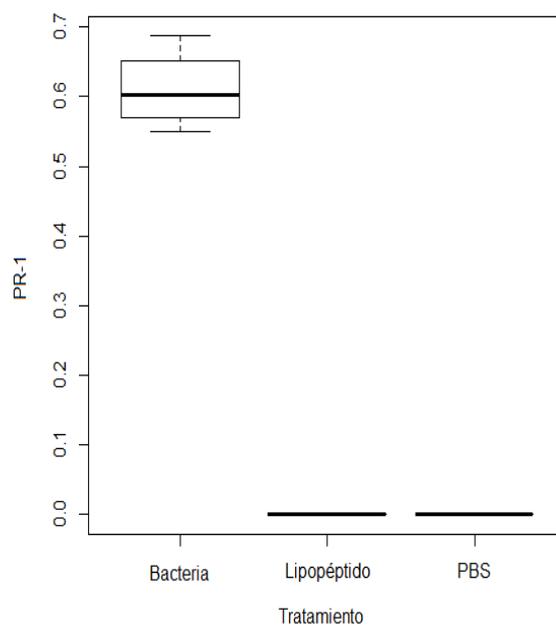


Figura 12. Amplificación del gen PR-1 de tratamiento con bacteria (T.B), lipopéptidos (T.L), y control sin tratar de PBS (T.C).

El gen 18S para cada tratamiento se encuentra en los carriles 2, 3, 4 y se utilizaron como controles internos para comparar la inducción en la expresión de PR-1. Todos los tratamientos y controles fueron comparados con el marcador de peso molecular de 100 pb. El control negativo se representa como NTC en el carril 20. Se realizó cinco repeticiones (R1-R5) de cada tratamiento.

Las proteínas PR o relacionadas con la patogénesis están involucradas en la respuesta de defensa de la planta por estímulos de estrés como contacto con patógenos o adaptación al medio (Edreva, 2005). En particular, las proteínas PR-1 son las más abundantes ya que representan del 1 al 2% de las proteínas totales de la hoja de plantas. Además, los genes de la familia PR-1 se han considerado

como indicadores de la activación de la respuesta de defensa de la planta, ya que su expresión puede ser detectada a nivel local, durante la infección, y a nivel sistémico relacionado con la respuesta SAR (Nuez et al., 2004). Generalmente, las bacterias endofíticas son capaces de producir biomoléculas activas con potencial para proteger a la planta huésped de posibles plagas. Sin embargo, los posibles efectos que se desencadenan de la interacción con microorganismos beneficiosos sobre la fisiología de las plantas que está relacionado con el gen NPR1 y responde a dos tipos de señalización hormonal que genera dos respuestas diferentes, la SAR que se activa en presencia de patógenos, y la ISR activada en presencia de rizobacterias (Ahn, Lee, & Suh, 2007). Es importante mencionar que la respuesta ISR no activa genes PR-1. En esta investigación se demostró la expresión del gen relacionado con la patogénesis PR-1 en raíces de *L. mutabilis* tratados con *B. subtilis* Ctpx S2-1 después de 2.5 h de tratamiento (Anexo 2). Por lo tanto, al igual que en resultados reportados por Gond et al., (2015) se confirma que los endófitos bacterianos son capaces de inducir a las plantas a producir estas proteínas con el fin de evitar una infección por hongos. Además, se determinó que la aplicación de lipopéptidos al igual que el control a las plantas no desencadenó una regulación positiva de los genes de defensa (Figura 13), lo que puede indicar que los extractos de lipopéptidos no están involucrados en la respuesta de defensa.



*Figura 13.* Diagrama de cajas que muestra la variación de expresión génica relativa del gen PR-1 de *L. mutabilis* de los tratamientos con bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS.

La inducción de la expresión del gen PR-1 también se reportó en *A. thaliana* por la cepa endofítica *Streptomyces* spp. según investigaciones realizadas por Conn, Walker, y Franco, (2008), es importante mencionar que la inducción de proteínas PR está relacionada con la vía SAR, por lo que también se ha demostrado que es capaz de activar las vías de ácido jasmónico (JA) o etileno (ET). Las respuestas moleculares por medio de la inducción de genes de las rutas SAR, JA y ET por bacterias endofíticas las diferencian de las rizobacterias que tienden a desencadenar la respuesta ISR (Ongena et al., 2005; Van Loon y Van Strien, 1999). En otro estudio, en donde se analizó a las rizobacterias *Pseudomonas* spp. consideradas como promotoras del crecimiento, se comprobó que no existe la inducción de genes de las vías SAR, JA y ET (Ahn, Lee, y Suh, 2007).

## **4.5 Efectividad de *B. subtilis* Ctpx S2-1 y lipopéptidos en plántulas de *L. mutabilis***

### **4.5.1 *B. subtilis* Ctpx S2-1**

En esta investigación se determinó que el tratamiento de semillas germinadas de *L. mutabilis* con bacteria y extractos de lipopéptidos no afectaron de manera significativa ( $F=4.68$ ,  $Df=2$ ,  $P<0.05$ ) el índice de clorofila de plántulas comparado con el control sin tratar (Figura 14) (Anexo 3). Sin embargo, tomando en cuenta los promedios (Anexo 4), el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 tuvo un menor índice de clorofila en comparación con los tratamientos con extractos de lipopéptidos y PBS. Este resultado puede deberse a una respuesta ante el estrés biótico los valores de clorofila tienen tendencia a disminuir en comparación con el control (Vidal, 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que en condiciones de estrés las reducciones en el contenido de clorofila están asociadas con un aumento en la disipación no fotoquímica (López-Climent, Arbona, Pérez-Clemente, y Gómez-Cadenas, 2008), lo que podría deberse a una posible disipación de exceso de energía. Por lo tanto, la presencia de proteínas PR-1 como parte de la respuesta de defensa de la planta para evitar una infección por hongos afecta en niveles mínimos el contenido de clorofila.

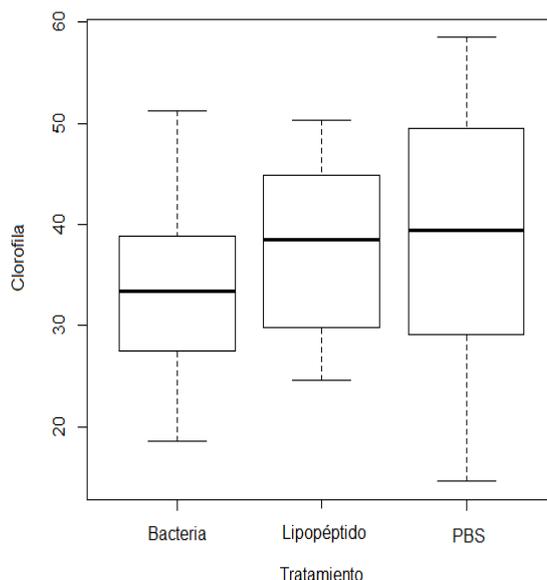
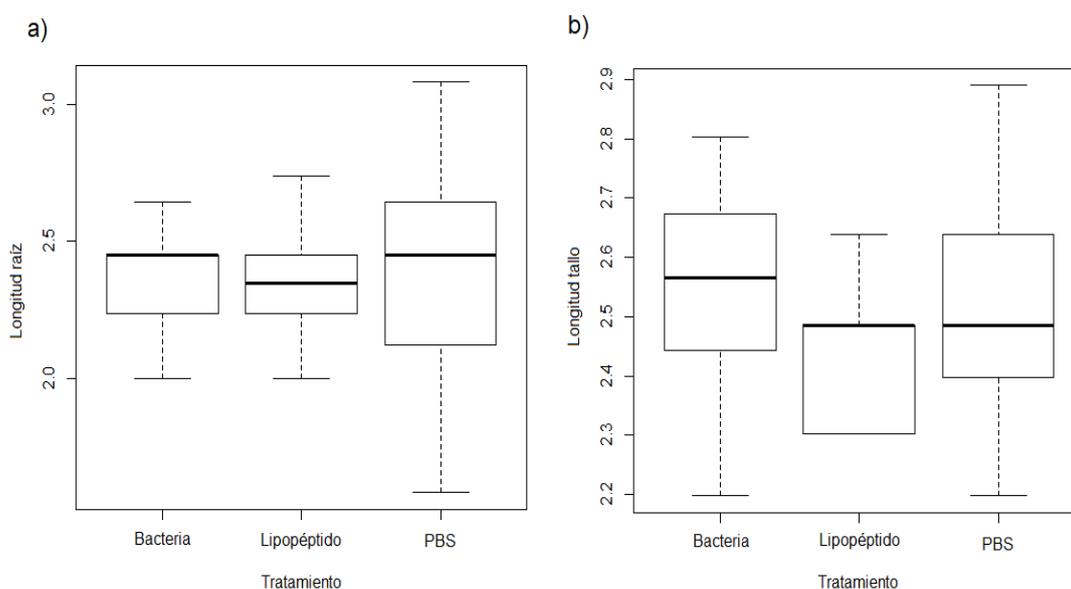


Figura 14. Diagrama de cajas de la respuesta del índice de clorofila en tratamientos con *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS en plántulas de *L. mutabilis* de 24 días de edad.

La variación en el contenido de clorofila también ha sido asociado a diferentes causas de estrés en las plantas. Se ha sugerido que las alteraciones en el contenido de clorofila por condiciones de estrés pueden resultar en bajas concentraciones de clorofila debido a la alteración metabólica (Salazar et al., 2011).

#### 4.5.2 Longitud de tallo y raíz principal

De igual forma, la longitud del tallo y la raíz principal fue evaluada en los tratamientos con bacteria, lipopéptidos y control en plántulas de *L. mutabilis* de 24 días de edad. En el caso de las raíces (Figura 15), no se observó alguna diferencia estadística significativa para la longitud de la raíz principal ( $F=1.259$ ,  $Df=2$ ,  $P<0.01$ ) entre tratamientos (Anexo 3).



**Figura 15.** Diagrama de cajas de la respuesta de a) longitud de raíz y b) longitud de tallo en tratamientos con *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS en plántulas de *L. mutabilis* de 24 días de edad.

A pesar de que en varios estudios se ha comprobado que los microorganismos endofíticos capaces de producir auxinas están involucradas en la estimulación del crecimiento de la raíz primaria en plántulas (Li, Ovakim, Charles, y Glick, 2000), la promoción del crecimiento de la raíz está directamente relacionado con el tiempo de inoculación de bacterias (Patten y Glick, 2002). El limitante para observar diferencias en la longitud de raíces primarias puede ser el tiempo de inoculación, ya que en esta investigación se trabajó con un tiempo de inoculación específico de 2.5 h de *B. subtilis* Ctpx S2-1. En estudios realizados por Grichko y Glick, (2001) se comprobó que el tiempo de inoculación para apreciar diferencias en la longitud de la raíz por interacciones con bacterias promotoras del crecimiento es de 12 a 17 horas.

Además, la similitud entre longitudes de las raíces primarias entre los tratamientos se podría explicar debido a que los niveles moderados de auxina estimulan la elongación de la raíz primaria; mientras que los niveles altos de auxina bacteriana estimulan la formación de raíces laterales y adventicias

(Barbieri y Galli, 1993; Patten y Glick, 2002). Lo que concuerda con el análisis molecular de genes AUX1, PIN1 y PIN3 involucrados principalmente en el crecimiento de raíces laterales en el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 como se muestra en la figura 16.

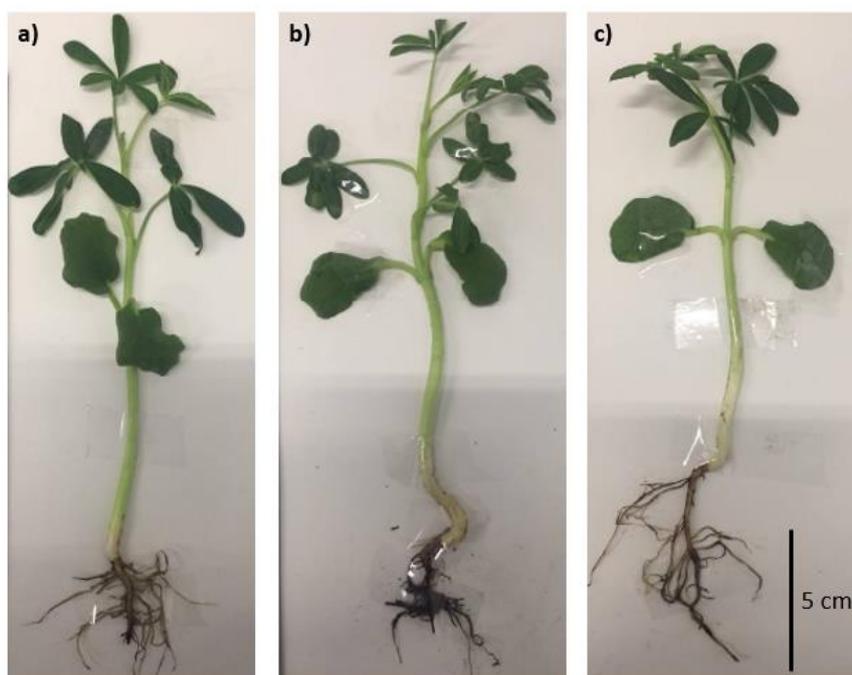


Figura 16. Longitud de raíz y tallo de plántulas promedio de *L. mutabilis* de 24 días de edad con tratamientos.

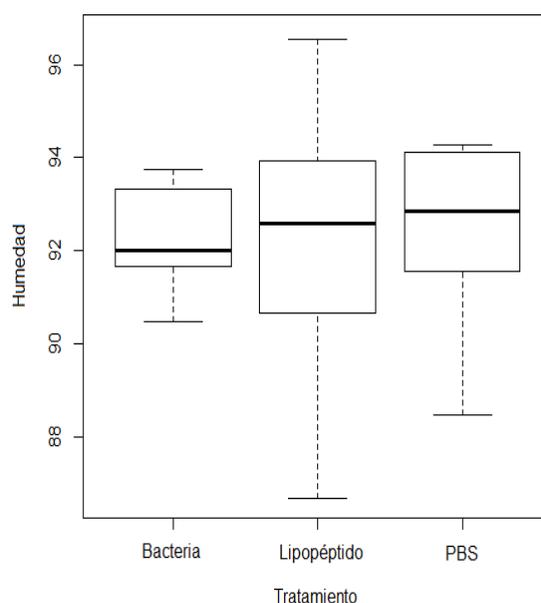
- a) Tratamiento con suspensión de *B. subtilis* Ctpx S2-1.
- b) Tratamiento con extractos de lipopéptidos.
- c) Control con PBS.

Las plántulas promedio mostradas de cada tratamiento poseen un de longitud de raíz y tallo es de 5.6 cm y 12.94 cm, 5.4 cm y 11.48 cm, 5.8 cm y 12.36 cm para el tratamiento con bacteria, extracto de lipopéptidos y control con PBS respectivamente.

Por otro lado, en el caso de la longitud del tallo de *L. mutabilis* en función con los tratamientos experimentales se determinó que existe una diferencia significativa ( $F=6.815$ ,  $Df=2$ ,  $P<0.01$ ) en el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 (Figura 15 b), en donde se presentaron tallos de mayor longitud en comparación con los tratamientos con extractos de lipopéptidos y control con PBS (Figura 16). La capacidad de promoción del crecimiento de bacterias capaces de producir auxina también se refleja en la elongación del tallo de plantas como se reportó en investigaciones realizadas por Rademacher, (1991) y Gutiérrez-Mañero et al., (2001) en donde la inoculación de bacterias se realizó en el ápice y se obtuvo como resultado un 30% de incremento en la longitud de tallos en comparación con el control. Cabe recalcar que la concentración del inóculo de las bacterias promotoras del crecimiento influye en gran cantidad en la elongación del tallo (Gutiérrez-Mañero et al., 2001). En esta investigación, con una concentración de  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de *B. subtilis* Ctpx S2-1 se presentó una mayor longitud del tallo con una diferencia de aproximadamente 1.5 cm en comparación al control y tratamiento con lipopéptidos (Anexo 3). En resultados reportados por Gutiérrez-Mañero et al., (2001) se demostró que a una mayor concentración de bacteria de *Bacillus pumilus* mayor longitud del tallo, considerando como óptimo  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> para la obtención de diferencias de 3 cm de longitud en el tallo.

#### 4.5.3 Porcentaje de humedad

Se determinó el porcentaje de humedad de las plántulas de *L. mutabilis* con los tratamientos con bacteria, lipopéptidos y control con PBS. Los resultados obtenidos no mostraron una diferencia significativa entre tratamientos. Sin embargo, se realizó la comparación entre promedios (Anexo 4) de los tratamientos experimentales y se puede decir que existe una mínima disminución del porcentaje de humedad en el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 (Figura 17).



*Figura 17.* Diagrama de cajas de la respuesta del porcentaje de humedad en tratamientos con *B. subtilis* Ctpx S2-1, extractos de lipopéptidos y control con PBS en plántulas de *L. mutabilis* de 24 días de edad.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se encuentran involucradas en la protección de efectos nocivos de algún tipo de estrés ambiental incluyendo los metales pesados, inundaciones, salinidad y presencia de fitopatógenos (Grichko y Glick, 2001; Mayak, Tirosh, y Glick, 2004). La mayor resistencia del estrés hídrico en plantas tratadas con bacterias promotoras del crecimiento se asocia a la reducción de etileno para la mejora de la respuesta del estrés. Según investigaciones realizadas por Mayak et al., (2004) en donde involucra comparaciones de peso fresco y peso seco para la determinación de humedad, se concluyó que las plántulas sometidas a estrés hídrico posee un mayor acumulación de biomasa vegetal a comparación de las tratadas con bacterias promotoras del crecimiento. En esta investigación, no se realizó tratamientos con estrés hídrico a las plántulas de *L. mutabilis*, sin embargo, se puede apreciar una mínima diferencia en el porcentaje de humedad que relaciona el peso seco y peso fresco que puede estar influenciada por las reducciones de etileno (Grichko

y Glick, 2001) debido a la presencia de bacterias promotoras del crecimiento consideradas como efectivas para aliviar el efecto de un posible estrés hídrico.

## 5 Capítulo V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Los resultados de la actividad antifúngica del aislado Ctpx S2-1 contra *C. acutatum* en ensayos de antagonismo *in vitro* por cromatografía en capa fina (HPTLC) y autobiografía-HPTLC, demostraron que la bacteria produce lipopéptidos antifúngicos; y la mayor parte de la actividad se debe a las fracciones correspondientes a fengicinas e iturinas.

Los ensayos moleculares en conjunto con los análisis de autobiografía-HPTLC, mostraron que las familias de lipopéptidos fengicinas producidas específicamente por el aislado de *B. subtilis* Ctpx S2-1, son los mayores responsables de la actividad antagónica contra el patógeno *C. acutatum* que afecta gran parte de los cultivos de chocho andino.

Se demostró que la bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1 posee genes involucrados en la síntesis de lipopéptidos antifúngicos, los isómeros Srf-B, Fen-E e Itu-B de las tres principales familias de lipopéptidos surfactinas, fengicinas e iturinas fueron identificados por PCR.

La respuesta molecular desencadenada por la interacción de la bacteria endofítica *B. subtilis* Ctpx S2-1 en raíces de *L. mutabilis* involucra la expresión de genes de crecimiento y resistencia en la planta. La expresión de genes involucrados en el crecimiento AUX1, PIN1 y PIN3 fue mayor en el tratamiento con la bacteria, demostrando que el aislado *B. subtilis* Ctpx S2-1 es una bacteria promotora del crecimiento. La expresión de genes involucrados en la resistencia o respuesta de defensa de la planta PR-1 solo se evidenció en el tratamiento con

*B. subtilis* Ctpx S2-1, demostrando que la bacteria simbiótica aislada del chocho andino es capaz de proporcionar una inhibición directa de potenciales patógenos a través de la producción de lipopéptidos, pero también induce la expresión del gen de defensa de la planta huésped para prevenir la presencia de patógenos fúngicos en tejidos vegetales.

En los ensayos *in vivo* a plántulas de *L. mutabilis* de 24 días de edad con los tratamientos experimentales, se demostró una diferencia mínima en el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 en los análisis de índice de clorofila, longitud de la raíz principal y porcentaje de humedad. La mínima diferencia en los resultados obtenidos en el tratamiento con el aislado Ctpx S2-1 se debe a las múltiples respuestas moleculares que genera la interacción con la bacteria endofítica, ya que además de estar involucrada en el crecimiento y resistencia de la planta puede estar relacionada con la respuesta ante estrés abiótico. Por otro lado, en la longitud del tallo de *L. mutabilis* si hubo una diferencia significativa entre tratamientos (Anexo 4), siendo el tratamiento con Ctpx S2-1 el que generó una mayor elongación del tallo, demostrando la capacidad de promoción del crecimiento de la bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1.

## 5.2 Recomendaciones

Profundizar en la investigación para la cuantificación relativa de expresión de genes de crecimiento y resistencia AUX1, PIN1, PIN3, PR-1 en tejidos vegetales diferentes.

Llevar a cabo más ensayos experimentales con variaciones en la concentración de suspensión de *B. subtilis* Ctpx S2-1 y extractos de lipopéptidos para determinar las condiciones óptimas que generen una respuesta positiva en la planta.

Continuar en la investigación con enfoque en interacciones de la planta con el patógeno *C. acutatum* para determinar el comportamiento de los genes de crecimiento y resistencia.

Enfatizar en la investigación del incremento de resistencia de plantas ante estrés ambiental por interacciones con bacterias promotoras del crecimiento.

Profundizar en el estudio molecular de la estimulación de nódulos en raíces de *L. mutabilis* por interacciones con bacterias promotoras del crecimiento y la relación con la expresión de genes de crecimiento y resistencia.

Continuar con ensayos de efectividad con inoculaciones de *B. subtilis* Ctpx S2-1 en conjunto con el patógeno *C. acutatum* en plantas de chocho andino para determinar las respuestas fisiológicas que se desemboca en las plantas.

Llevar a cabo más ensayos experimentales que permitan el conocimiento de la respuesta molecular generada por *L. mutabilis* mediada por la interacción con la bacteria *B. subtilis* Ctpx S2-1, para potenciar el control biológico mediante la elaboración de productos de uso agrícola amigables con el medio ambiente.

## REFERENCIAS

- Ahn, I.-P., Lee, S.-W., & Suh, S.-C. (2007). *Rhizobacteria-Induced Priming in Arabidopsis Is Dependent on Ethylene, Jasmonic Acid, and NPR1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 759-768. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0759>
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., & Thonart, P. (2001). *Influence of culture conditions on lipopeptide production by Bacillus subtilis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 91-93, 551-561. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551>
- Barbieri, P., & Galli, E. (1993). *Effect on wheat root development of inoculation with an Azospirillum brasilense mutant with altered indole-3-acetic acid production*. *Research in Microbiology*, 144(1), 69-75. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90216-O](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90216-O)
- Billou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Frimi, J., ... Scheres, B. (2005). *The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots*. *Nature*, 433(7021), 39-44. <https://doi.org/10.1038/nature03184>
- Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Lee, O. R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., ... Murphy, A. S. (2007). *Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein Auxin Transporters in Arabidopsis*. *the Plant Cell Online*, 19(1), 131-147. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040782>
- Blakeslee, J., Peer, W., & Murphy, A. (2005). *Auxin transport*. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 494-500. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.014>
- Burleigh, S. H. (2001). *Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas*. *Plant Science*, 160(5), 899-904. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00460-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00460-X)
- Caicedo, C., & Peralta, E. (2001). INIAP - Estación Experimental Santa Catalina.

Recuperado el 28 de diciembre de 2017 de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/444>

Camelo, M., Vera, S., & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista CORPOICA. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol12\\_num2\\_art:227](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:227)

Censo Nacional Agropecuario. (2003). El cultivo del chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario. Recuperado el 28 de diciembre de 2017 de [http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com\\_content&view=article&id=111&Itemid=126&TB\\_iframe=true&height=800&width=1745](http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=111&Itemid=126&TB_iframe=true&height=800&width=1745)

Chen, Q., Liu, Y., Maere, S., Lee, E., Van Isterdael, G., Xie, Z., ... Vanneste, S. (2015). A coherent transcriptional feed-forward motif model for mediating auxin-sensitive PIN3 expression during lateral root development. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9821>

Conn, Walker, R., & Franco, C. M. M. (2008). *Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21(2), 208-218. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0208>

Copping, L. G., & Menn, J. J. (2000). Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56(8), 651-676. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U)

Dean, J. D., Goodwin, P. H., & Hsiang, T. (2002). Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(4), 347-356. <https://doi.org/10.1007/BF02772122>

Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Bowman, M. J., & Rooney, A. P. (2015). *Genomic*

*analysis of Bacillus subtilis OH 131.1 and co-culturing with Cryptococcus flavescens for control of Fusarium head blight. Plant Gene*, 2, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.002>

Edreva, A. (2005). *Pathogenesis-Related Proteins : Research Progress in the Last 15 Years*. En *Gen. Appl. Plant Physiology*. <https://doi.org/citeulike-article-id:3441103>

Falconí, C. (2012). *Lupinus mutabilis in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance. Lupinus mutabilis in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance*. Wageningen University. Recuperado el 20 de Noviembre de 2017 de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=20123175902&lang=es&site=ehost-live>

Falconí, C., & Yáñez–Mendizábal, V. (2016). *Dry heat treatment of Andean lupin seed to reduce anthracnose infection. Crop Protection*, 89, 178-183. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.021>

Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., & Palme, K. (2002). *Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. Nature*, 415(6873), 806-809. <https://doi.org/10.1038/415806a>

Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22. Recuperado el 1 de Diciembre de 2017 de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952014000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Gond, S. K., Bergen, M. S., Torres, M. S., & White, J. F. (2015). *Endophytic Bacillus spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. Microbiological Research*, 172, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>

- Grebe, M., Friml, J., Swarup, R., Sandberg, G., Terlou, M., Palme, K., ... Scheres, B. (2002). *Cell polarity signaling in Arabidopsis involves a BFA-sensitive auxin influx pathway*. *Current Biology*, 12(4), 329-334. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00654-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00654-1)
- Grichko, V. P., & Glick, B. R. (2001). *Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(1), 11-17. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01212-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01212-2)
- Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F. M., Hogeweg, P., & Scheres, B. (2007). *Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth*. *Nature*, 449(7165), 1008-1013. <https://doi.org/10.1038/nature06215>
- Grijalva, C. (2015). Evaluación de *Bacillus sibtillis* spp. y sus metabolitos en el control biológico de *Ovularia* y *Fusarium en chocho* (*lupinus mutabilis* sweet). Recuperado el 25 de Noviembre de 2017 de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/4801>
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., & Talon, M. (2001). *The plant-growth-promoting rhizobacteria Bacillus pumilus and Bacillus licheniformis produce high amounts of physiologically active gibberellins*. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>
- Invitrogen. (2001). *SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*. Recuperado el 27 de diciembre de 2017 de [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscriptIII\\_onestepRTPCR\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscriptIII_onestepRTPCR_man.pdf)
- Invitrogen. (2010). *PureLink™ RNA Mini Kit*. Recuperado el 26 de diciembre de 2017 de [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink\\_rna\\_mini\\_kit\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf)
- Invitrogen. (2013). *PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic*

DNA. Recuperado el 26 de diciembre de 2017 de [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf)

Jacobsen, S. E., Mujica, A., Jacobsen, S.-E., & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botanica economica de los andes centrales- Universidad mayor de San Andrés*, 458-482.

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., & Thonart, P. (1999). *Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from Bacillus subtilis S499 by Plackett-Burman Design. Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77(1-3), 223-234. <https://doi.org/10.1385/ABAB:77:1-3:223>

Jones, A. R., Kramer, E. M., Knox, K., Swarup, R., Bennett, M. J., Lazarus, C. M., ... Grierson, C. S. (2009). *Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. Nature Cell Biology*, 11(1), 78-84. <https://doi.org/10.1038/ncb1815>

Kefford, N. P., Brockwell, J., & Zwar, J. A. (1960). *The symbiotic synthesis of auxin by legume and nodule bacteria and role in nodule development. Australian Journal of Biological Sciences*, 13(4), 456-467.

Kim, S. young, Kim, J. Y., Kim, S. H., Bae, H. J., Yi, H., Yoon, S. H., ... Hong, S. (2007). *Surfactin from Bacillus subtilis displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. FEBS Letters*, 581(5), 865-871. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.059>

Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T., Franke, P., & Ziessow, D. (1998). *Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by Bacillus subtilis OKB 105. Journal of Colloid and Interface Science*, 204(1), 1-8. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5558>

Lawrance, A., Balakrishnan, M., Joseph, T. C., Palaiya Sukumaran, D., Nambali Valsalan, V., Gopal, D., & Ramalingam, K. (2014). *Functional and*

*molecular characterization of a lipopeptide surfactant from the marine sponge-associated eubacteria Bacillus licheniformis NIOT-AMKV06 of Andaman and Nicobar Islands, India. Marine Pollution Bulletin, 82(1-2), 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.018>*

Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., & Jacques, P. (2006). *The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of Bacillus subtilis strains by their surface-active properties. Archives of Microbiology, 186(6), 475-483. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0163-z>*

Li, J., Ovakim, D. H., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2000). *An ACC Deaminase Minus Mutant of Enterobacter cloacae UW4 No Longer Promotes Root Elongation. Current Microbiology, 41(2), 101-105. <https://doi.org/10.1007/s002840010101>*

Ljung, K. (2013). *Auxin metabolism and homeostasis during plant development. Development, 140(5), 943-950. <https://doi.org/10.1242/dev.086363>*

López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2008). *Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. Environmental and Experimental Botany, 62(2), 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.08.002>*

Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., & Ptak, M. (1992). *Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. Biochimie, 74(12), 1047-1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V)*

Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). *AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. The Plant cell, 14(3), 589-97. <https://doi.org/10.1105/tpc.010354>*

Mathesius, U. (2008). *Goldacre paper: Auxin: At the root of nodule development*

*Functional Plant Biology*, 35(8), 651-668.  
<https://doi.org/10.1071/FP08177>

Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). *Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-572.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>

Mori, I. C., Pinontoan, R., Kawano, T., & Muto, S. (2001). *Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in Vicia faba. Plant Cell Physiol*, 42(12), 1383-1388.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pce176>

Mosquera Velasco, R. (2005). Marcadores Moleculares Y la Extracción de ADN Molecular. *Facultad de Ciencias Agropecuarias. Unicauca*, 3(1), 14-18.

Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W. A., Spalding, E. P., & Murphy, A. S. (2003). *Enhanced gravi- and phototropism in plant mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. Nature*, 423(June), 999-1002.  
<https://doi.org/10.1038/nature01696.1>

Nuez, F., Pérez de la Vega, M., & Carrillo, J. (2004). *Resistencia Genética a Patógenos Vegetales*. (Editorial de la UPV, Ed.). Valencia, España.

Oliveros-Valenzuela, M. R., Reyes, D., Sánchez-Bravo, J., Acosta, M., & Nicolás, C. (2007). *The expression of genes coding for auxin carriers in different tissues and along the organ can explain variations in auxin transport and the growth pattern in etiolated lupin hypocotyls. Planta*, 227(1), 133-142. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0601-4>

Omelyanchuk, N. A., Kovrizhnykh, V. V., Oshchepkova, E. A., Pasternak, T., Palme, K., & Mironova, V. V. (2016). *A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in Arabidopsis thaliana root. BMC Plant Biology*, 16(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0685-0>

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides: versatile weapons for*

plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). *Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1), 29-38. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1940-3>

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007). *Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants*. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084-1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>

Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). *Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system*. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795>

Peralta, E., Mazón, N., Murillo, Á., Rivera, M., Rodríguez, D., Lomas, L., & Monar, C. (2012). *Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinua, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción*. Miscelánea (Vol. 69). Quito. Recuperado el 10 de Noviembre de <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/833>

Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., & Rodrigues, L. R. (2013). *Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications*. *Fuel*, 111, 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>

Peret, B., Swarup, R., Jansen, L., Devos, G., Auguy, F., Collin, M., ... Laplaze, L. (2007). *Auxin Influx Activity Is Associated with Frankia Infection during Actinorhizal Nodule Formation in Casuarina glauca*. *Plant Physiology*, 144(4), 1852-1862.

<https://doi.org/10.1104/pp.107.101337>

- Petrasek, J., & Friml, J. (2009). *Auxin transport routes in plant development*. *Development*, 136(16), 2675-2688. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>
- 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>
- Popp, J., Peto, K., & Nagy, J. (2013). *Pesticide productivity and food security*. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(1), 243-255. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0105-x>
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., & de Kock, M. J. D. (2006). *Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated Pseudomonas spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 699-710. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0699>
- Rangarajan, V., Dhanarajan, G., & Sen, R. (2015). *Bioprocess design for selective enhancement of fengycin production by a marine isolate Bacillus megaterium*. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.016>
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R., Dufour, S., Veening, J.-W., Arrebola, E., ... Pérez-García, A. (2007a). *The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of Bacillus subtilis Toward Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., ... Pérez-García, A. (2007b). *The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of Bacillus subtilis Toward Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>

- Romero, D., De Vicente, A., Zeriouh, H., Cazorla, F. M., Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., & Pérez-García, A. (2007). *Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. Plant Pathology*, 56(6), 976-986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01684.x>
- Roudier, F., Fedorova, E., Lebris, M., Lecomte, P., Györgyey, J., Vaubert, D., ... Kondorosi, E. (2003). *The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. Plant physiology*, 131(3), 1091-1103. <https://doi.org/10.1104/pp.102.011122>
- Ruiz-Lozano, J. M., Roussel, H., Gianinazzi, S., & Gianinazzi-Pearson, V. (1999). *Defense Genes Are Differentially Induced by a Mycorrhizal Fungus and Rhizobium sp. in Wild-Type and Symbiosis-Defective Pea Genotypes. Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(11), 976-984. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.976>
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., ... Scheres, B. (1999). *An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. Cell*, 99(5), 463-472. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81535-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81535-4)
- Salazar, R., Guadalupe, J., Chávez, T., Sáenz, M., Villa, S., García, S., ... Vaquera, H. (2011). *Vegetation Index to Estimate the Growth of Tomato Plants (Lycopersicon esculentum Mill.) Stressed by Water and Nitrogen Deficiencies. Terra Latinoamericana*, 29 (1), 47-56.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control*, 50(3), 205-221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>
- Sieberer, T., Seifert, G. J., Hauser, M. T., Grisafi, P., Fink, G. R., & Luschnig, C. (2000). *Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux*

carrier EIR1 requires AXR1. *Current Biology*, 10(24), 1595-1598.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00861-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00861-7)

- Silva, M. S., Arraes, F. B. M., Campos, M. de A., Grossi-de-Sa, M., Fernandez, D., Cândido, E. de S., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2018). *Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops*. *Plant Science*, 270, 72-84. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.013>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis antibiotics: Structures, syntheses and specific functions*. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Swarup, R., & Péret, B. (2012). *AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview*. *Frontiers in Plant Science*, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00225>
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., & Oliveira, H. (2002). *Genetic and Morphological Characterization of Colletotrichum acutatum Causing Anthracnose of Lupins*. *Phytopathology*, 92(9), 986-996. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.986>
- Tapia, M. E. (2015). El Tarwi, Lupino Andino, 108. Recuperado el 10 de Diciembre de 2017 de <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=341a995b-093a-afcf-4ec5-87e47cab95ec&documentId=48cf100e-bcd7-3aed-9516-21e72b444150>
- Technologies, A. B. L. (2012). *TURBO DNA-free 3™ Kit User Guide*. User guide, (1907), 1-10.
- Tejera-hernández, B., & Heydrich-pérez, M. M. R. M. (2011). Potencialidades del

género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138. Recuperado el 1 de Noviembre de 2017 de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>

- Thomas, G. J., & Adcock, K. G. (2004). *Exposure to dry heat reduces anthracnose infection of lupin seed. Australasian Plant Pathology*, 33(4), 537-540. <https://doi.org/10.1071/AP04057>
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). *Role of lipopeptides produced by Bacillus subtilis GA1 in the reduction of grey mould disease caused by Botrytis cinerea on apple. Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1151-1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., & Raaijmakers, J. M. (2007). *Role of the cyclic lipopeptide massetolide a in biological control of Phytophthora infestans and in colonization of tomato plants by Pseudomonas fluorescens. New Phytologist*, 175(4), 731-742. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02138.x>
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85-97. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213>
- Vanneste, S., & Friml, J. (2009). *Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. Cell*, 136(6), 1005-1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Vater, J., Wilde, C., Franke, P., & Mehta, N. (2002). *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of Bacillus subtilis C-1 Isolated from Petroleum Sludge Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of F. https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210*

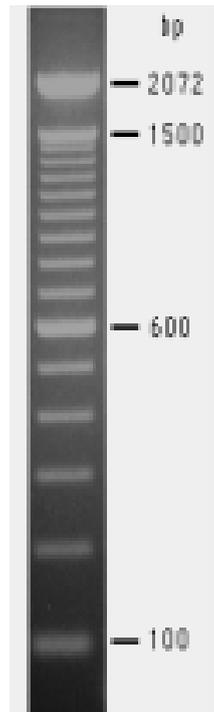
- Vidal, a M. (2010). Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*, 213. Recuperado el 10 de Diciembre de 2017 de <http://repositori.uji.es/xmlui/handle/10234/29723>
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benkova, E., Benjamins, R., Beeckman, T., ... Friml, J. (2005). *Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. Development*, 132(20), 4521-4531. <https://doi.org/10.1242/dev.02027>
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). *Auxin: Regulation, action, and interaction. Annals of Botany*, 95(5), 707-735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- Yáñez-Mendizábal, V., & Falconí, C. E. (2018). *Efficacy of Bacillus spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. Biological Control*, 122, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.004>
- Yáñez-Mendizábal, V., Falconí, C., Grijalva, C., Oliva, C., & Castañeda, A. (2015). Potencial de *Bacillus* spp. para control de enfermedades poscosecha de chocho. En A. Leon-Reyes (Ed.), *Resúmenes del Segundo Simposio de Fitopatología, Control Biològico e Interacciones Planta-Patogeno* (p. 42). Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito USFQ. Recuperado el 30 de Octubre de 2017 de [http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/archivosacademicos/Documentos/archivos\\_academicos\\_004.pdf](http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/archivosacademicos/Documentos/archivos_academicos_004.pdf)
- Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., & Teixidó, N. (2011). *Potential of a new strain of Bacillus subtilis CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. Biocontrol Science and Technology*, 21(4), 409-426. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). *Production of the postharvest biocontrol agent Bacillus subtilis*

*CPA-8 using low cost commercial products and by-products. Biological Control, 60(3), 280-289.*  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>

Yáñez-Mendizábal, V., Zeriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., ... Teixidó, N. (2012). *Biological control of peach brown rot (Monilinia spp.) by Bacillus subtilis CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. European Journal of Plant Pathology, 132(4), 609-619.*  
<https://doi.org/10.1007/s10658-011-9905-0>

## **Anexos**

**Anexo 1: Marcador molecular Trackit DNA Ladder.**



**Anexo 2: Análisis estadístico ANOVA de expresión génica relativa de genes AUX1, PIN, PIN3 y PR-1 por R Commander**

Response:	Sum	Sq	Df	F value	Pr (>F)
<b>AUX1</b>					
Trat	0.0732	11	2	689.79	1.93e <sup>-11</sup>
Residuals	0.0005	31	10		

$P < 0.001$

<b>Response:</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>Df</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>PIN1</b>					
Trat	0.5227	0.26133	2	6.299	0.0195
Residuals	0.3734	0.04149	9		

$P < 0.05$

<b>Response:</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>Df</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>PIN3</b>					
Trat	0.02497	0.012483	2	6.442	0.0126
Residuals	0.02325	0.001938	12		

$P < 0.05$

<b>Response:</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Df</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>PR-1</b>				
Trat	1.06601	2	591.8	$6.352e^{-12}$
Residuals	0.00991	11		

$P < 0.001$

**Anexo 3: Análisis estadístico ANOVA y promedio de índice de clorofila, longitud de raíz y tallo, porcentaje de humedad de *L. mutabilis***

<b>Response:</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>Df</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>Clorofila</b>					
Trat	890	445.0	2	4.68	0.0109
Residuals	12550	95.1	132		

$P < 0.05$

<b>Response:</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>Df</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>Raíz</b>					
Trat	0.161	0.08036	2	1.259	0.287
Residuals	8.423	0.06381	132		

<b>Response:</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>Df</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>Tallo</b>					
Trat	0.2876	0.1438	2	6.815	0.00153
Residuals	2.7857	0.0211	132		

$P < 0.01$

<b>Response:</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Df</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>Humedad</b>				
Trat	2.43	2	0.2517	0.7787
Residuals	193.14	40		

**Anexo 4: Promedios de índice de clorofila, longitud de raíz y tallo, porcentaje de humedad**

Tratamiento	Clorofila	Raíz (cm)	Tallo (cm)	Humedad (%)
<i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1	33.43	5.6	12.94	92.35
Lipopéptidos	38.45	5.4	11.48	92.0
Control PBS	39.22	5.87	12.36	92.57

**Anexo 5: *L. mutabilis* F3 de 7 días de edad**



**Anexo 6: Plántulas con tratamiento de bacteria, lipopéptidos y control en semilleros**



