



Efectividad biológica de consorcios microbianos e inductores de resistencia contra *Botrytis cinerea* en fresa

Biological Effectiveness of Microbial Consortia and Resistance Inducers Against *Botrytis cinerea* in Strawberry

Luis Antonio Guapo Mora¹ <https://orcid.org/0009-0009-1592-2255> antonio.guapo@gmail.com

Gil Virgen Calleros¹ <https://orcid.org/0000-0003-4172-8885> gvirgen36@yahoo.com.mx

Carla Vanessa Sánchez Hernández¹ <https://orcid.org/0000-0001-7528-6398>
carla.shernandez@academicos.udg.mx

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán² <https://orcid.org/0000-0003-1949-1922>
bermudez.manuel@inifap.gob.mx

Ricardo Ramírez Romero¹ <https://orcid.org/0000-0003-1310-0484> rramirez@cucba.udg.mx

Paola Andrea Palmeros Suárez^{*1} <https://orcid.org/0000-0002-5629-5990>

¹Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan 45200, México.

²Campo Experimental Tecomán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecomán, Colima, México.

*Autor de correspondencia: paola.palmeros@academicos.udg.mx

Recibido: 15 de mayo de 2024

Aceptado: 28 de julio de 2024

Publicado: 04 de septiembre de 2024

Resumen

Objetivo. Evaluar la efectividad biológica de dos consorcios microbianos e inductores de resistencia en el cultivo de fresa para el control de *B. cinerea* y determinar los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa en frutos bajo condiciones controladas.

Métodos. La severidad de la enfermedad y la efectividad de los tratamientos utilizados se

Abstract

Objective. To evaluate the biological effectiveness of two microbial consortia and resistance inducers in a strawberry crop for the control of *B. cinerea* and to determine the expression levels of genes related to the defense response in fruits under controlled conditions. **Methods.** Disease severity and effectiveness of the treatments used were evaluated in strawberry

evaluaron en plantas de fresa en macro túnel en el municipio de Tapalpa, Jalisco, México, en dos años de producción (2019 y 2020). Los tratamientos estuvieron conformados por dos consorcios, tres inductores de defensa y un fungicida. Los genes evaluados fueron *FLS*, *PG*, β -*Glu*, *Chi3* y *PR1*. **Resultados.** El análisis de la severidad mostró que hubo diferencias significativas entre los años evaluados ($P=0.003$), siendo mayor en el año 2020, aunque no hubo diferencias entre los tratamientos utilizados; sí hubo menos severidad cuando se utilizaron los tratamientos con respecto al control ($P=0.045$). El gen con mayor expresión fue *1,3 Glu*, seguido de *FLS* y *Chi3*. En el tratamiento del consorcio 1 se expresaron cuatro de los cinco genes evaluados a las 24 horas, seguido del consorcio 2, con tres genes. **Conclusión.** Se demuestran que los inductores de resistencia utilizados representan una alternativa viable para el control de la enfermedad del moho gris en el cultivo de fresa.

Palabras clave:

Fragaria spp., moho gris, control biológico, genes de defensa.

plants in macro tunnel in the municipality of Tapalpa, Jalisco, Mexico in two production years (2019 and 2020). The treatments consisted of two consortia, three defense inducers and a fungicide. The genes evaluated were *FLS*, *PG*, β -*Glu*, *Chi3* and *PR1*. **Results.** The severity analysis showed that there were significant differences between the years evaluated ($P=0.003$), being higher in 2020, although there were no differences between the treatments used; there was less severity when the treatments were used with respect to the control ($P=0.045$). The gene with the highest expression was *1,3 Glu*, followed by *FLS* and *Chi3*. In the consortium 1 treatment, four of the five genes evaluated were expressed at 24 hours, followed by consortium 2, with three genes. **Conclusion.** It is demonstrated that the resistance inducers used represent a viable alternative for the control of gray mold disease in strawberry.

Keywords

Fragaria spp., gray mold, defense genes, biological control.

Introducción

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duchesne) es un fruto de gran valor nutricional con olor y sabor agradable, rico en antioxidantes y compuestos bioactivos, por lo que tiene gran demanda en los mercados de productos frescos y alimentos industrializados (Guapo-Mora, 2023; Newerli-Guz *et al.*, 2023; Pukalskienė *et al.*, 2021). El cultivo de fresa es afectado por diversos microorganismos, principalmente por hongos fitopatógenos que ocasionan la problemática fitosanitaria con mayor impacto económico, debido a que pueden causar daños severos e incluso la muerte de la planta (Garrido *et al.*, 2016). Un ejemplo de estos hongos es *Botrytis cinerea*, causante de la enfermedad conocida como moho gris, el cual ocasiona pérdidas significativas debido a que se reproduce en el fruto, hojas, peciolos, raíces y flores (Rupp *et al.*, 2017; Petrasch *et al.*, 2019). Asimismo, *B. cinerea* es considerado un patógeno de alto riesgo al tener la capacidad de infectar hasta 1 000 especies vegetales distintas debido a su diversidad genética, ciclo de vida corto y una estrategia de reproducción prolífica (Boddy, 2016; Cheung *et al.*, 2020).

El incremento en la demanda de producción de fresa ha favorecido el aumento en la intensidad de las aplicaciones de fungicida para control del moho gris, el cual normalmente se

lleva a cabo mediante la aplicación de fungicidas de síntesis química, generando la aparición de cepas resistentes a estos compuestos (Weber y Petridis, 2023). Debido a ello, en la actualidad se emplean métodos de control biorracional, como el uso de microorganismos antagonistas, los cuales no generen residuos tóxicos y no causan resistencia en los patógenos (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2016). Los hongos del género *Trichoderma spp.* y las bacterias del género *Bacillus spp.* son los microorganismos más utilizados como antagonistas (Cano y Zarazúa, 2018; Ruíz-Cisneros *et al.*, 2018). Otra alternativa para el control de fitopatógenos es el uso de inductores de resistencia, que fortalecen las paredes celulares del ataque de patógenos, almacenando silicatos y lignina en los tejidos de las plantas, induciendo así la síntesis de fitoalexinas y sensibilizando a la planta para futuros ataques, activando los sistemas de defensa (Reglinski *et al.*, 2023; Vieira *et al.*, 2024).

El objetivo de la investigación fue evaluar la efectividad biológica de consorcios microbianos e inductores de resistencia sistémica para el control biológico de *B. cinerea* en plantas de fresa en condiciones de macro túnel; así como determinar los niveles de expresión de genes de defensa en frutos de fresa asperjados con los diferentes inductores en condiciones controladas.

Materiales y métodos

El experimento en campo se desarrolló en un lote comercial de fresa variedad “El Dorado” bajo túnel ubicado en el municipio de Tapalpa, estado de Jalisco, durante el mes de octubre de los años 2019 y 2020, cuando las condiciones climáticas (humedad relativa >80% y temperatura promedio de 22 °C) favorecieron el desarrollo de la enfermedad.

Se establecieron siete tratamientos y un testigo (cuadro 1) con cuatro repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental consistió de un surco de 4 m de largo, 1.2 m de ancho (4.8 m²) y de 26 plantas por repetición, se realizaron cuatro aplicaciones con un intervalo de siete días entre cada una, empleando una aspersora de motor a cuatro tiempos de la marca HYUNDAI®, de doble varilla con boquillas de cono hueco cubriendo toda la superficie de la planta y frutos.

Por cada tratamiento y repetición se cosecharon cinco frutos de tamaño uniforme, en madurez fisiológica, dando un total de 20 frutos por tratamiento. Los frutos colectados se colocaron en cajas de plástico, mismas que se incubaron en una cámara húmeda por cinco días en condiciones de humedad y temperatura controladas (28 ± 2 °C y 80% H.R.). Posteriormente se registraron los porcentajes de frutos dañados por *B. cinerea* (el cual se aisló de los frutos dañados y se caracterizaron sus parámetros morfológicos macro y microscópicos mediante la observación de esporas y micelio), se utilizó la escala de Nigro *et al.* (2000), la cual considera nueve valores de 0 a 8 donde; 0 = fruta sana; 1 = menos del 10% de la superficie del fruto con pudrición; 2 = 11-20%; 3 = 21-30%; 4 = 31-40%; 5 = 41-50%; 6 = 51-65%; 7 = 66-80%; 8 = más del 80% de la superficie del fruto con síntomas de pudrición.

Cuadro 1

Tratamientos utilizados para el control de *B. cinerea* en el cultivo de fresa bajo túnel en el municipio de Tapalpa, Jalisco

Tratamientos	Composición	Dosis por hectárea	Dosis aplicada
T1	<i>B. subtilis</i> rv + <i>B. subtilis</i> rv3 + <i>B. amyloliquefaciens</i>	1.5 L	0.78 mL
T2	<i>B. subtilis</i> rv + <i>B. subtilis</i> rv3 + <i>B. amyloliquefaciens</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1.5 L	0.78 mL
T3	<i>Trichoderma harzianum</i>	2.5 L	1.3 mL
T4	Vacciplant (Laminarina)	2 L	1.04 mL
T5	Triviant (fosetil aluminio)	1 kg	0.52 mg
T6	Ecoswing (extracto de <i>Swinglea glutinosa</i>)	2 L	1.04 mL
T7	Kenja (Isofetamid)	1.24 L	0.65 mL
T8	Testigo	N/A	N/A

Para los experimentos en campo se realizaron evaluaciones de la severidad en fruto, una vez que se determinaron los niveles de afectación, a los datos generados se les aplicó la fórmula de Townsend y Heuberger (1943):

$$SP = (\sum (n^*v) / (i^*N)) * 100$$

SP = Media ponderada de severidad

n = número de plantas por cada clase en la muestra

v = valor numérico de cada clase

i = valor de la categoría más alta

N = número total de plantas en la muestra.

Para determinar la media ponderada de severidad. Los porcentajes de efectividad de los tratamientos en los experimentos fueron comparados con la severidad de la enfermedad presentada en cada tratamiento, para lo cual se calculó la efectividad del control mediante la fórmula de Abott (1925), tomando en cuenta el avance de la enfermedad en porcentaje de una evaluación a otra (figura 1).

$$\text{Eficacia} = \text{Ca} - \text{Ta} (100) / \text{Ca}$$

Ca = Porcentaje de daño en el testigo después de la aplicación

Ta = Porcentaje de daño en el tratamiento después de la aplicación).

En el análisis estadístico las variables de respuesta de severidad y efectividad se analizaron mediante ANOVA anidados (Zar, 1998), con el año como factor principal (dos niveles: 2019 y 2020) y el tratamiento como factor anidado. Para cada experimento se realizaron los análisis estadísticos por separado. Los supuestos de normalidad y

homocedasticidad se verificaron previa observación. Todos los análisis se realizaron con el Software estadístico R 4.0.1 (Team, 2014).

Figura 1

- A)** Distribución de los tratamientos en macro túnel. **B)** Fruto de fresa con 20% de hombro blanco que muestra signos característicos de *Botrytis spp.* y tejido necrótico en 25% del fruto **C)** Fruto de fresa infectado al 75%, y sépalos infectados con micelio y esporas



Para la determinación de los niveles de expresión de los genes de defensa se siguió el procedimiento realizado por Landi *et al.* (2014), donde se seleccionaron frutos uniformes en tamaño y con un 20% de hombro blanco, los cuales fueron sumergidos durante 30 s en 1 L de agua con las concentraciones de cada uno de los tratamientos seleccionados (cuadro 2). Posteriormente las fresas se secaron al aire libre durante 30 minutos, para luego subdividirse en dos grupos que fueron almacenados a 20 °C y 95-98% de humedad relativa, tomando el primer grupo de ellos a las 24 horas después de haber estado en contacto con los consorcios microbianos e inductores de resistencia y el segundo grupo se colectó a las 48 horas de haber estado en contacto con los tratamientos. Posteriormente, los frutos se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C, hasta la extracción de RNA.

Para la expresión de los genes se realizó una extracción de RNA total de acuerdo con el método descrito por Aristya *et al.* (2020). Se pesaron 500 mg de tejido congelado pulverizando el fruto de fresa de cada uno de los tratamientos con un mortero y pistilo y se colocaron en microtubos de 1.5 mL se adicionando 700 μ L de buffer de extracción. El tejido se mezcló con el buffer empleando vórtex y se incubó durante 10 minutos a 65 °C en baño maría. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se colocó el sobrenadante en un microtubo nuevo y se adicionó un volumen de cloroformo, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, la fase acuosa se transfirió a un microtubo de 1.5 mL nuevo y se adicionó un volumen de LiCl 4 M, permitiendo

la precipitación del RNA durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 12 000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 100 μ L de etanol al 75% y se centrifugó a 12 000 rpm por cinco minutos a 4 °C, se eliminó el etanol y se repitió el procedimiento anterior. Finalmente, la pastilla que contenía el RNA se dejó secar a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la evaporación del etanol y se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas.

Cuadro 2

Tratamientos utilizados para la determinación de los niveles de expresión de genes de defensa en frutos de fresa

Tratamiento	Composición	Abreviatura	Dosis aplicada por litro
1	<i>B. subtilis rv</i> + <i>B. subtilis rv3</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i>	Con 1	0.609 mL
2	<i>B. subtilis rv</i> + <i>B. subtilis rv3</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	Con 2	0.609 mL
3	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tch	1.015 mL
4	Vacciplant (Laminarina)	Vacc	0.812 mL
5	Kenja (Isofetamid)	Ken	0.507 mL
6	Testigo	Test	N/A

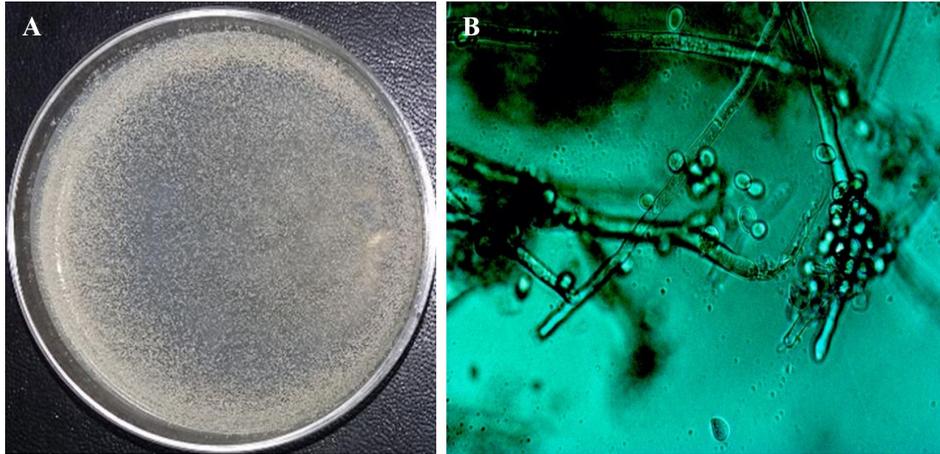
La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 μ g de RNA, empleando el oligonucleótido dT20 y 200 unidades de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). El cDNA obtenido se diluyó cinco veces con agua desionizada para realizar el análisis de expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La amplificación se llevó a cabo empleando placas de 96 pozos en un termociclador para tiempo real marca Applied Biosystem y los resultados se obtuvieron mediante la cuantificación de la fluorescencia con SYBRTM Green master mix. Las reacciones se llevaron a cabo conteniendo 50 ng de cDNA, 2 μ M de cada oligonucleótido de los genes de fresa *FLS*, *PG*, *Chi3*, *1,3 B-Glu* y *PR1* (las secuencias fueron obtenidas de Landi *et al.*, 2014), empleando como genes de referencia *actina* y *18s*, y la cantidad de SYBRTM Green master mix necesaria para llevar la reacción a un volumen final de 13 μ L. Se consideró como gen inducido valores ≥ 1.5 . Para el análisis estadístico de comparación de medias se realizó una prueba de Tuckey ($P \leq 0.05$) para cada tiempo evaluado.

Resultados

Una vez que se realizó el muestreo de frutos de fresa en campo, se observó que aproximadamente en el 20% del cultivo se presentaban síntomas de moho gris, al identificar síntomas de pudrición blanda de color marrón en el fruto, micelio en tejido foliar y fruto de color gris y la presencia de conidióforos y conidios que fueron observados en el microscopio (figura 2).

Figura 2

Morfología colonial y microscópica de *Botrytis cinerea* aislado de fruto de fresa. **A)** crecimiento del micelio en medio PDA. **B)** conidióforos y conidios observados en microscopio óptico a 40X



Análisis de severidad y efectividad en campo

En el análisis de la severidad en campo se observó que hubo diferencias significativas entre los años ($F_{1,48} = 9.481$; $P = 0.003$) y entre los tratamientos ($F_{14,48} = 1.937$; $P = 0.045$). Se encontró que la severidad fue significativamente mayor en el año 2020 respecto a 2019 y que en ambos años el tratamiento control fue el que mayor severidad presentó respecto a los demás tratamientos (88.75 y 91.87%, respectivamente) (figura 3). En el ciclo productivo 2020 el tratamiento con mayor severidad (excluyendo al testigo) fue el tratamiento 15 (con 70.5%).

Como resultado del análisis de efectividad, se observó que no hubo diferencias significativas entre los años ($F_{1,42} = 0.068$; $P = 0.795$), ni al seno de cada año entre los tratamientos ($F_{12,42} = 0.590$; $P = 0.838$).

Determinación de los niveles de expresión de genes de defensa en frutos de fresa

En el análisis de expresión se obtuvieron los niveles de inducción de cinco genes en frutos de fresa a las 24 y 48 horas después de haber estado en contacto con los tratamientos empleados (cuadro 3), observándose que su expresión fue mayor a las 24 h y posteriormente disminuyó a las 48 h.

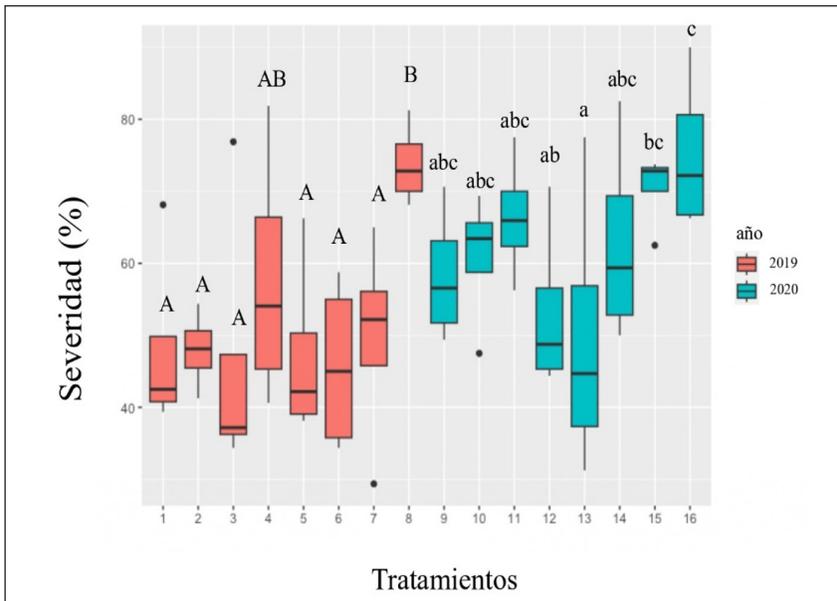
El gen que tuvo una mayor inducción fue *1,3 Glu*, el cual se indujo en todos los tratamientos probados a las 24 horas, y manteniéndose con mayor expresión en tres de los cinco tratamientos utilizados después de las 48 h. Por otra parte, el gen que tuvo menor expresión fue *PG* en los dos tiempos probados, excepto en el tratamiento del consorcio 1 a las 24 horas. De igual forma se identificó que el gen *PR1* se mantuvo reprimido en todos los tratamientos en los dos tiempos evaluados. Finalmente, los genes *Chi3* y *FLS*

se indujeron en el primer tiempo evaluado en los tratamientos 1 y 2, disminuyendo al segundo tiempo de evaluación.

El tratamiento correspondiente al consorcio microbiano 1, fue el que tuvo cuatro de los cinco genes inducidos a las 24 horas, seguido del consorcio 2 con tres genes inducidos en ese mismo tiempo y el resto de los tratamientos con sólo un gen inducido de los cinco evaluados. En el segundo tiempo de evaluación ninguno de los genes se mantuvo inducido.

Figura 3

Box plot que indica el resultado del análisis de la severidad de *B. cinerea* en campo de los años 2019 y 2020



Los tratamientos evaluados del 1-16 corresponden a: 1 y 9 consorcio 1; 2 y 10 consorcio 2; 3 y 11 *T. harzianum*; 4 y 12 Vacciplant; 5 y 13 Triviant; 6 y 14 Ecoswing; 7 y 15 Kenja; 8 y 16 tratamiento control. Letras diferentes indican valores significativamente diferentes.

Cuadro 3

Valores de expresión relativa \pm la desviación estándar (SD) de genes de defensa empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ en frutos de fresa después del tratamiento con cinco diferentes inductores de defensa

	<i>PG</i>	<i>1,3 Glu</i>	<i>Chi3</i>	<i>PR1</i>	<i>FLS</i>
24 hr					
Con 1	1.50 \pm 0.06 ^a	1.81 \pm 0.06 ^b	1.52 \pm 0.08 ^a	0.72 \pm 0.04 ^a	1.68 \pm 0.04 ^a
Con 2	0.27 \pm 0.08 ^b	1.69 \pm 0.19 ^b	1.52 \pm 0.18 ^a	0.73 \pm 0.02 ^a	1.83 \pm 0.03 ^a
Ken	0.11 \pm 0.10 ^b	1.67 \pm 0.04 ^b	1.41 \pm 0.03 ^b	0.61 \pm 0.08 ^a	1.40 \pm 0.20 ^a
<i>Tch</i>	0.47 \pm 0.10 ^b	2.60 \pm 0.11 ^a	1.03 \pm 0.04 ^b	0.72 \pm 0.19 ^a	1.39 \pm 0.16 ^a
Vacc	0.24 \pm 0.02 ^b	2.60 \pm 0.21 ^a	1.33 \pm 0.09 ^b	0.65 \pm 0.13 ^a	1.32 \pm 0.13 ^a
48 hr					
Con 1	0.10 \pm 0.02 ^c	1.39 \pm 0.12 ^{ab}	0.88 \pm 0.05 ^a	0.84 \pm 0.04 ^a	0.67 \pm 0.03 ^{ab}
Con 2	0.18 \pm 0.04 ^b	0.90 \pm 0.15 ^c	0.41 \pm 0.01 ^b	0.40 \pm 0.2 ^a	0.29 \pm 0.20 ^b
Ken	0.02 \pm 0.11 ^d	1.38 \pm 0.03 ^{abd}	0.89 \pm 0.20 ^a	0.82 \pm 0.2 ^a	1.03 \pm 0.05 ^a
<i>Tch</i>	0.48 \pm 0.06 ^a	0.95 \pm 0.02 ^{bdc}	0.85 \pm 0.09 ^{ab}	0.81 \pm 0.2 ^a	0.71 \pm 0.12 ^{ac}
Vacc	0.11 \pm 0.12 ^{bc}	1.47 \pm 0.20 ^a	0.59 \pm 0.06 ^b	0.50 \pm 0.2 ^a	0.57 \pm 0.19 ^{bc}

Se muestra en negrita los valores de los genes inducidos (>1.5) con respecto al control. Valores con la misma letra no presentaron diferencia estadística significativa, de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Con 1: consorcio 1; Con 2: consorcio 2; Ken: Kenja; *Tch.*: *T. harzianum*; Vacc: Vacciplant.

Discusión

Las evaluaciones realizadas en campo mostraron que el empleo de consorcios microbianos puede ser una alternativa para el manejo de *B. cinerea*, debido a que no hubo diferencias con otros tratamientos utilizados, entre ellos el empleo de un fungicida químico, donde se pudo observar que pudiera haber una resistencia al grupo del fungicida probado al no mostrar la efectividad esperada.

Se sabe que *Trichoderma* spp. presenta distintos mecanismos responsables de una actividad biocontroladora, destacando la competencia por espacio, nutrientes, el microparasitismo, la producción de compuestos inhibidores y la secreción de enzimas hidrolíticas (quitinasa y β -1,3-endoglucanasa) que degradan la pared celular de *B. cinerea* y otros patógenos como *Ralstonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Yang *et al.*, 2009). Lo anterior permite suponer que estos compuestos se están produciendo en los tratamientos utilizados para evaluar el manejo de este patógeno en campo, de acuerdo con los resultados obtenidos.

Es importante destacar la producción de algunos metabolitos sintetizados por las cepas que conforman los consorcios microbianos, entre los cuales destacan los lipopéptidos cíclicos no ribosomales, los cuales interactúan con la membrana citoplasmática de las células fúngicas. Se ha reportado que los lipopéptidos presentes en extractos de *B. subtilis* al

inocularse en conjunto con *B. cinerea* producen fengicinas e iturinas en concentraciones inhibitorias, demostrando su actividad *in-situ* (Touré *et al.*, 2004; Meena y Kanwar, 2015). Adicionalmente, un estudio desarrollado en campo bajo túneles de producción de fresa utilizando *Trichoderma* spp. y *B. subtilis* demostró el control de *B. cinerea* pero en menor proporción que los fungicidas químicos; sin embargo, estos microorganismos reducen su uso y pueden ser aplicados de forma alterna, siendo parte de un manejo integrado de enfermedades (Pertot *et al.*, 2008). Si bien, los resultados no mostraron diferencias significativas de la severidad entre los tratamientos utilizados, sin embargo, se observó que para ambos años la severidad fue significativamente mayor en el grupo control comparado con los otros tratamientos.

Adicionalmente, se encontró que la severidad fue significativamente mayor en el año 2020 respecto al año 2019, lo cual apunta a que dicho parámetro puede variar significativamente de año en año, probablemente como resultado de las diferentes condiciones climáticas. Finalmente, la efectividad no varió con la aplicación de los consorcios ni los compuestos probados, ni con el año analizado. Lo anterior sugiere que este parámetro se vería menos afectado por el uso de consorcios o por las condiciones climáticas de cada año.

La invasión por patógenos o sus elicitores desencadenan las respuestas de defensa de las plantas, lo que resulta en una reprogramación transcripcional extensiva, por lo que, en el presente estudio, se realizó el análisis de expresión de genes de defensa en frutos de fresa expuestos a diferentes inductores, con la finalidad de identificar el efecto de cada uno de ellos a nivel molecular. Entre estas respuestas, se inducen genes que codifican para proteínas relacionadas a patógenos, mejor conocidas como proteínas PR, consideradas como biomarcadores de la respuesta de defensa contra patógenos en plantas (Agrios, 2011). Algunas de las más estudiadas son las proteínas PR1 (proteínas antifúngicas), PR2 (β -1,3-glucanasas) y PR8 (quitinasa clase III). Las proteínas PR1 han sido caracterizadas como marcadores de la inducción de la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) en plantas. Estudios previos indican que la transcripción y la traducción de estas proteínas se incrementa en diferentes plantas cuando son sometidas al ataque de hongos fitopatógenos, sugiriéndose que puede desempeñar un papel en la prevención de la propagación del patógeno mediante el refuerzo de las paredes celulares del huésped. Se ha reportado que PR1 induce una respuesta de defensa en plantas de tomate y tabaco a *B. cinerea* (Yang *et al.*, 2018; Frías *et al.*, 2016), aunque en los resultados obtenidos no se identificó que este gen se haya inducido en ninguno de los tiempos probados en el fruto de fresa. Por otra parte, la enzima β -1,3-glucanasa (proteína PR2), también se acumula ante un ataque por hongos fitopatógenos al intervenir directamente en la defensa de las plantas hidrolizando las paredes celulares de los hongos (Aggarwal *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que el gen que codifica para esta enzima mostró mayor inducción en todos los tratamientos probados a las 24 hr. Existen varios reportes que demuestran que las enzimas β -1,3-glucanasas actúan en combinación con quitinasas, y que intervienen directamente en la defensa de las plantas hidrolizando las paredes celulares de hongos fitopatógenos (Confortin *et al.*, 2019).

Los dos genes restantes (*PG* y *FLS*) también aumentaron su expresión en el tratamiento que corresponde al consorcio constituido por bacterias del género *Bacillus* spp. El gen *PG* codifica para una proteína poligalacturonasa, involucrada en el metabolismo de la pectina en la producción de oligogalacturónidos, que pueden funcionar como elicitores en las diferentes respuestas celulares durante la interacción planta-patógeno (Osorio *et al.*, 2011).

El quinto gen analizado codifica para la enzima flavonol sintasa, la cual participa en la ruta de síntesis de flavonoides, quienes desempeñan un papel importante en la resistencia poscosecha de frutos. Las altas concentraciones de estos compuestos suelen coincidir con una baja incidencia de patógenos, por lo que se han descrito algunos métodos industriales de resistencia inducida para enfermedades poscosecha que están enfocados en incrementar su concentración (Treutter, 2006). Por otro lado, Cotoras *et al.* (2001), demostraron que extractos de diferentes especies de *Pseudognaphalium* spp. que contenían altas concentraciones de flavonoides inhibieron el crecimiento micelial de *B. cinerea*; adicionalmente, Wang *et al.* (2023), emplearon flavonoides de *Sedum aizoon* L. con la finalidad de inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, identificando que el mecanismo de acción es la disrupción de la membrana celular del patógeno.

Como se observó en los resultados, el empleo de los consorcios microbianos que incluyen las bacterias *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, además del hongo *Trichoderma harzianum*, permitió la inducción de un mayor número de genes comparado con los otros tratamientos a las 24 horas post inducción, muy probablemente debido al efecto en conjunto que tuvo más de un microorganismo al estar en contacto con los frutos. De manera interesante, un estudio realizado por Morales *et al.* (2022) en el cual determinó la respuesta a nivel genético de plantas de tomate tratadas con *B. velezensis* BBC047 antes y después de una infección por *B. cinerea*, reveló que el orden en que fueron colocados los microorganismos en la planta genera una respuesta de defensa contrastante; observándose que al aplicar primero la bacteria se genera una etapa de pre-acondicionamiento que facilita la respuesta sistémica inducida cuando *B. cinerea* coloniza los tejidos de la planta.

Por lo anterior, podemos destacar que en este estudio los frutos de fresa estuvieron en contacto con diferentes elicitores que indujeron la respuesta de defensa de manera diferente de acuerdo al tipo de molécula que los constituyen y que algunos contienen más de una que está relacionada con los mecanismos de defensa, y esto pudiera estar asociado con diferentes señales de inmunidad innata que involucran diversos eventos de señalización (Landi *et al.* 2014).

Conclusiones

Se demuestra que los inductores de resistencia utilizados representan una alternativa viable para el control de la enfermedad del moho gris causada por *Botrytis cinerea* en el cultivo de fresa. Los consorcios microbianos que incluyen bacterias del género *Bacillus*, como *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* resultan especialmente efectivos, ya que favorecen la expresión temprana de genes de resistencia en las plantas de fresa. Por otra parte, los altos niveles de expresión de genes de defensa observados en frutos de fresa asperjados con los diferentes inductores bajo condiciones controladas refuerzan la viabilidad de su uso para el control del moho gris.

Literatura citada

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18(2): 265-267.
- Agrios, G.N. (2011). Fitopatología. Editorial Limusa, Ciudad de México, México. 838 p.
- Aggarwal, R.; Purwar, S.; Kharbikar, L. y Gupta, S. (2011). Induction of a wheat β -1, 3-glucanase gene during the defense response to *Bipolaris sorokiniana*. *Acta Phytopathol Entomol Hung.* 46(1): 39-47.
- Aristya, G.R.; Masyhuri, H.; Kasiamdari, R.S.; Prabowo, H. y Husna, N. (2020). Screening and characterization of molecular markers for sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) resistance to shoot borer pest. In *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* IOP Publishing. 468(1): 012018.
- Boddy, L. (2016). Chapter 8—*Pathogens of Autotrophs*. S. C. Watkinson, L. Boddy; N. P. Money (Eds.). The Fungi (Third Edition) Academic Press. Massachusetts, USA. Pp. 245-292.
- Castañeda-Ramírez, J.; Laurel-Ángeles, V.; Espinoza-Zamora, J.; Salcedo-Hernández, R.; López-Ramírez, M. y De la Fuente-Salcido, N. (2016). Efecto del quitosano para el control de hongos fitopatógenos identificados molecularmente de frutas y hortalizas. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1: 207-2013.
- Cheung, N.; Tian, L.; Liu, X. y Li, X. (2020). The destructive fungal pathogen *Botrytis cinerea*—Insights from genes studied with mutant analysis. *Pathog.* 9(11): 923.
- Confortin, T.C.; Spannemberg, S.S.; Todero, I.; Luft, L.; Brun, T.; Alves, E.A. y Mazutti, M.A. (2019). Microbial enzymes as control agents of diseases and pests in organic agriculture. Gupta, V.K., Pandey, A., Eds.; In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*. Ed. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. Pp. 321-332.
- Cotoras, M.; García, C.; Lagos, C.; Folch, C. y Mendoza, L. (2001). Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 46(4): 433-440.
- Frías, M.; González, M.; González, C.Y. y Brito, N. (2016). BcIEB1, a *Botrytis cinerea* secreted protein, elicits a defense response in plants. *Plant Sci.* 250: 115-124.
- Garrido, C.; González-Rodríguez, V.E.; Carbú, M.; Husaini, A.M. y Cantoral, J.M. (2016). Fungal diseases of strawberry and their diagnosis. Strawberry: growth, development and diseases, CABI. Vancouver, British Columbia, Canadá. Pp. 157-195.
- Guapo-Mora, L.A. (2023). Efectividad biológica de dos consorcios microbianos e inductores de resistencia para el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). Universidad de Guadalajara. Tesis de Maestría en Agricultura Protegida. México. 87p.
- Landi, L.; Feliziani, E. y Romanazzi, G. (2014). Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *J. Agric. Food Chem.* 62: 3047-3056.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25: 402-408.
- Meena, K. y Kanwar, S.S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Res. Int.* 473050: 1-9.
- Morales, P.; González, M.; Salvatierra-Martínez, R.; Araya, M.; Ostria-Gallardo, E. y Stoll, A. (2022). New insights into *Bacillus*-Primed plant responses to a necrotrophic pathogen derived from the tomato-*Botrytis* pathosystem. *Microorganisms.* 10(8): 1547.
- Newerli-Guz, J.; Śmiechowska, M.; Drzewiecka, A. y Tylingo, R. (2023). Bioactive ingredients with health-promoting properties of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne). *Mol.* 28(6): 2711.
- Nigro, F.; Ippolito, A.; Lattanzio, V.; Di Venere, D. y Salerno, M. (2000). Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. *J. Plant Pathol.* 82(1): 29-37.
- Osorio, S.; Bombarely, A.; Giavalisco, P.; Usadel, B.; Stephens, C.; Aragüez, I. y Valpuesta, V. (2011). Demethylation of oligogalacturonides by FaPE1 in the fruits of the wild strawberry *Fragaria vesca* triggers metabolic and transcriptional changes associated with defense and development of the fruit. *J. Exp. Bot.* 62(8): 2855-2873.

- Pertot, I.; Zasso, R.; Amsalem, L.; Baldessari, M.; Angeli, G. y Elad, Y. (2008). Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. *Crop Prot.* 27(3-5): 622-631.
- Petrasch, S.; Knapp, S.J.; van Kan, J.A.L. y Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 20(6): 877-892.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Reglinski, T.; Havis, N.; Rees, H.J. y de Jong, H. (2023). The practical role of induced resistance for crop protection. *Phytopathology.* 113(4): 719-731.
- Rupp, S.; Plesken, C.; Rumsey, S.; Dowling, M.; Schnabel, G.; Weber, R.W.S. y Hahna, M. (2017). *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on Strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-Based fungicide resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(9): 1-16.
- Touré, Y.; Ongena, M.; Jacques, P.; Guiro, A. y Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96:1151-1160.
- Towsend, G.R. y Heuberger, J.V. (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.* 27(17): 340-343.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4(3):147-157.
- Vieira, M.E.O.; Nunes, V.V.; Calazans, C.C. y Silva-Mann, R. (2024). Unlocking plant defenses: Harnessing the power of beneficial microorganisms for induced systemic resistance in vegetables—A systematic review. *Biol. Control.* 188: 105428.
- Wang, K.; Ge, Q.; Shao, X.; Wei, Y.; Zhang, X.; Xu, F. y Wang, H. (2023). Influences of flavonoids from *Sedum aizoon* L. on the cell membrane of *Botrytis cinerea*. *Food Biosci.* 52:102386.
- Weber, R.W.S. y Petridis, A. (2023). Fungicide resistance in *Botrytis spp.* and regional strategies for its management in northern European strawberry production. *BioTech.* 12(4): 64.
- Yang, C.; Liang, Y.; Qiu, D.; Zeng, H.; Yuan, J. y Yang, X. (2018). Lignin metabolism involves *Botrytis cinerea* BcGsl-induced defense response in tomato. *BMC Plant Biol.* 18: 1-15.
- Yang, H.H.; Yang, S.L.; Peng, K.C.; Lo, C.T. y Liu, S.Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 113(9): 924-932.
- Zar, J.H. (1998). *Biostatistical Analysis*. fourth Edition. Ed. Prentice Hall. New Jersey, USA, 255 p.