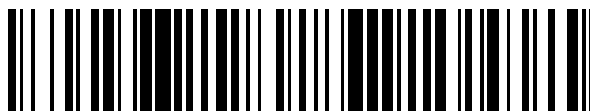


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 098**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2011** **PCT/US2011/064403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012** **WO12079073**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2011** **E 11799586 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020** **EP 2648521**

54 Título: **Inoculantes que incluyen bacterias Bacillus para la inducción de la producción de compuestos orgánicos volátiles en plantas**

30 Prioridad:

10.12.2010 US 421979 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.07.2020

73 Titular/es:

AUBURN UNIVERSITY (100.0%)
570 Devall Drive, Suite 102
Auburn, AL 36832, US

72 Inventor/es:

KLOEPPER, JOSEPH, W.;
FADAMIRO, HENRY, Y.;
NGUMBI, ESTHER, N. y
NANGLE, KATE, W.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 773 098 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inoculantes que incluyen bacterias *Bacillus* para la inducción de la producción de compuestos orgánicos volátiles en plantas

Campo

La presente materia objeto se refiere al campo de las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR). En particular, la presente materia objeto se refiere a las PGPR que inducen la producción de compuestos orgánicos volátiles por plantas que se han tratado con las bacterias.

Antecedentes

La inducción de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en las plantas se ha mantenido virtualmente sin examinar, a pesar de la evidencia de que la inducción de volátiles de las plantas depende de las interacciones de factores bióticos, tal como las hormonas vegetales (de Bruxelles y Roberts, 2001; Ament et al., 2004), desencadenantes derivados de herbívoros (Spiteller y Boland 2003), y microorganismos asociados incluyendo los patógenos (Preston et al., 1999; Cardoza et al., 2002), así como factores abióticos, tales como heridas (Mithofer et al., 2005), metales pesados (Mithofer et al., 2004), y luz y temperatura (Takabayashi et al., 1994). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) representan un amplio intervalo de bacterias colonizadoras de las raíces cuya aplicación se asocia a menudo con un aumento de la velocidad de crecimiento de las plantas (Kloepper, 1992; Zehnder et al., 1997), supresión de patógenos en el suelo (Schippers et al., 1987), e inducción de resistencia sistémica contra plagas de insectos (Kloepper et al., 1999; Ryu et al., 2004). La falta de investigación sobre la inducción de VOC en plantas y si las PGPR pueden influenciar en la producción de los VOC en las plantas es sorprendente dado que las PGPR se están aplicando cada vez más en la producción de varios cultivos en algunas partes del mundo (Backman et al., 1997; Cleyet-Marcel et al., 2001). Backman et al. (1997) publicó que del 60-75 % de los cultivos de algodón en EE. UU. se tratan con el producto Kodiak® con PGPR, un producto con *Bacillus subtilis* que se utiliza para la supresión de los patógenos del suelo *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Aquí, se estudiaron los efectos potenciales de las PGPR sobre la inducción de volátiles del algodón y las consecuencias sobre la atracción de herbívoros del algodón y sus parasitoides. Sorprendentemente, se observó que las PGPR desencadenaban cambios en los VOC de las plantas con importantes ramificaciones. El conocimiento de los efectos de las PGPR sobre la inducción de volátiles en las plantas y las interacciones planta-insecto probablemente contribuirá al aumento de la adopción de productos de PGPR y el desarrollo de mejores productos y también mitigará el impacto potencialmente negativo de estos productos.

Sumario

La presente invención se define en las reivindicaciones. Se desvelan rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) aisladas e inoculantes de las mismas que inducen la producción de uno o más compuestos orgánicos volátiles (VOC) por una planta que se ha tratado con la PGPR, donde las bacterias aisladas se seleccionan de entre un grupo que consiste en *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-136, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 2 de diciembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50614; *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-188, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 2 de diciembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50615; *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-218, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 2 de diciembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50618; *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-219, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 2 de diciembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50619; y *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-295, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 2 de diciembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50620); *Bacillus mojavensis*, cepa AP-209, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 2 de diciembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50616); *Bacillus solisalsi*, cepa AP-217, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 2 de diciembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50617); *Bacillus simplex*, cepa ABU 288, depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 18 de febrero de 2010, con el N.º de registro NRRL B-50340); y *Bacillus subtilis*, cepa MBI 600 depositada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos el 14 de noviembre de 2011, con el N.º de registro NRRL B-50595).

Los VOC producidos por las plantas pueden incluir, pero no se limitan a, compuestos seleccionados de entre alfa-pineno, beta-pineno, beta-mirceno, acetato de cis-3-hexenilo, limoneno, beta-ocimeno, linalool, (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, salicilato de metilo, decanal, cis-jasmono, cariofileno, alfa-humuleno, beta-farneseno, y mezclas de los mismos. Los VOC producidos por las plantas tratadas con PGPR modifican preferentemente el comportamiento de los insectos expuestos a los VOC. En algunas realizaciones, el insecto es un herbívoro y los VOC reducen la puesta de huevos o la alimentación del insecto en la planta. En realizaciones adicionales, el insecto es un predador o parasitoide y los VOC atraen al predador o parasitoide a la planta.

Las PGPR pueden ser una única cepa, especie, o género de bacterias o pueden comprender una mezcla de cepas, especies o géneros bacterianos.

Las bacterias *Bacillus* pueden comprender una secuencia de ácido nucleico de un ADNr 16S que comprenda las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4 o puede comprender una secuencia de ácido nucleico de un ADNr 16S que tenga al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con una o más de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5.

También se desvelan inoculantes que incluyen las PGPR desveladas actualmente y un vehículo. Los inoculantes pueden comprender principios activos adicionales tales como fitohormonas (por ejemplo, acetoina, 2,3-butanodiol, e indol-ácido acético) y compuestos antimicrobianos (por ejemplo, feniletanol y 4-hidroxibenzoato).

Las PGPR desveladas y los inoculantes de las mismas se pueden utilizar en métodos para la modificación del comportamiento de los insectos hacia una planta, comprendiendo los métodos la administración de un inoculante que comprende las PGPR a una planta, a las semillas de la planta o al suelo que rodea la planta, induciendo el inoculante la producción de uno o más VOC por la planta que se ha tratado con el inoculante. El método puede dar como resultado la reducción de la puesta de huevos o la alimentación de un herbívoro en la planta y/o puede dar como resultado la atracción de predadores y parasitoides a la planta. Las plantas adecuadas para los métodos pueden incluir, pero no se limitan a, alfalfa, arroz, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, patata, batata, alubias, guisantes, lentejas, achicoria, lechuga, endivia, repollo, coles de Bruselas, remolacha, chirivía, nabo, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinacas, cebollas, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabacita, calabaza, calabacín, pepino, manzana, pera, melón, cítricos, fresas, uvas, frambuesa, piña, soja, canola, colza oleaginosa, trigo de primavera, trigo de invierno, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Perfiles cromatográficos de volátiles en el espacio frontal en plantas de algodón sin tratar (control) vs. plantas de algodón tratadas con la PGPR, cepa INR-7, la mezcla 8 de PGPR, o la mezcla 9 de PGPR. Compuestos identificados: (1) α -pineno; (2) β -pineno; (3) β -mirceno; (4) acetato de *cis*-3-hexenilo; (5) Limoneno; (6) β -ocimeno; (7) linalool; (8) desconocido; (9) cariofileno; (10) α -humuleno; (11) β -farneseno

Figura 2. Perfiles cromatográficos de los volátiles del espacio frontal recolectados de plantas de algodón sin tratar (control 1) no infestadas con orugas, plantas de algodón sin tratar (control 2) infestadas con orugas, plantas de algodón tratadas con la mezcla 9 de PGPR no infestadas con orugas, y plantas de algodón tratadas con la mezcla 9 de PGPR infestadas con orugas. Compuestos identificados: (1) *cis*-3-hexenal; (2) *trans*-2-hexenal; (3) *cis*-3-hexen-1-ol; (4) *trans*-2-hexen-1-ol; (5) α -pineno; (6) β -pineno; (7) mirceno; (8) *cis*-3-hexenil acetato; (9) *trans*-2-hexenil acetato; (10) limoneno; (11) β -ocimeno; (12) linalool; (13) desconocido; (14) (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno; (15) *cis*-3-hexenil butirato; (16) *trans*-2-hexenil butirato; (17) *n*-decanal (18) *cis*-3-hexenil-2-metil butirato; (19) *trans*-2-hexenil-2-metil butirato; (20) indol; (21) tiglato de isobutilo; (22) tiglato de (*E*)-2-hexenil; (23) *cis*-jasmono; (24) cariofileno; (25) α -*trans* bergamoteno; (26) α -farneseno; (27) α -humuleno; (28) β -farneseno.

Figura 3. Área de superficie de la raíz (cm²) en plantas de algodón sin tratar (control) vs. plantas de algodón tratadas con la PGPR, cepa INR-7, la mezcla 8 de PGPR, o la mezcla 9 de PGPR. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes (P<0,05, ANOVA, Ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer, n = 8).

Figura 4. Volumen de la raíz (cm³) en plantas de algodón sin tratar (control) vs. plantas de algodón tratadas con la PGPR, cepa INR-7, la mezcla 8 de PGPR, o la mezcla 9 de PGPR. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes (P<0,05, ANOVA, Ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer, n = 8).

Figura 5. Peso seco de la raíz (g) en plantas de algodón sin tratar (control) vs. plantas de algodón tratadas con la PGPR, cepa INR-7, la mezcla 8 de PGPR, o la mezcla 9 de PGPR. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes (P<0,05, ANOVA, Ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer, n = 8).

Figura 6. Respuesta de una hembra intacta de *M. croceipes* en un olfatómetro de cuatro elecciones para las plantas de algodón sin tratar (control) vs. las plantas de algodón tratadas con PGPR, cepa INR-7, la mezcla 9 de PGPR, o un control blanco (cámara vacía). Se ensayaron treinta y dos parasitoides al día y se repitió cinco veces. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes (P<0,05, ANOVA, Ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer, n = 5).

Figura 7. Respuesta de una hembra intacta de *M. croceipes* en un olfatómetro de cuatro elecciones para las plantas de algodón sin tratar (control) vs. las plantas de algodón tratadas con la mezcla 9 de PGPR infestadas, mezcla 9 de PGPR no infestadas, o un control blanco (cámara vacía). Se infestaron las plantas con 30 orugas de *H. virescens*. Se ensayaron treinta y dos parasitoides al día y se repitió cuatro veces. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes (P<0,05, ANOVA, Ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer, n = 4).

Figura 8. Respuesta de una hembra intacta de *M. croceipes* en un olfatómetro de cuatro elecciones para las plantas de algodón sin tratar (control) vs. las plantas de algodón tratadas con la mezcla 9 de PGPR infestadas, mezcla 9 de PGPR no infestadas, o un control blanco (cámara vacía). Se infestaron las plantas con dos orugas de *H. virescens*. Se ensayaron treinta y dos parasitoides al día y se repitió cuatro veces. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$, ANOVA, Ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer, $n = 4$).

Figura 9. Efecto de las PGPR sobre el número de puestas de huevos depositadas (A); y número total de huevos depositados (B).

Figura 10. Perfiles cromatográficos de volátiles en el espacio frontal en plantas de algodón sin tratar (control) vs. plantas de algodón tratadas con la PGPR, cepa MBI 600, o la PGPR cepa ABU 288. Las flechas señalan los picos de volátiles detectados en las plantas tratadas con las PGPR, pero no en las plantas sin tratar (control).

Descripción detallada

La materia objeto desvelada se describe adicionalmente a continuación.

A menos de que se especifique o indique otra cosa por el contexto, los términos "un", "una" y "el" significan "uno o más". Por ejemplo, "un péptido" se debería interpretar como que significa "uno o más péptidos" a menos de que se especifique o se indique otra cosa por el contexto.

Como se utilizan en el presente documento, "aproximadamente", "de manera aproximada", "sustancialmente" y "significativamente" se entenderán por los expertos habituados en la técnica y variarán hasta cierto punto según el contexto en el que se utilicen. Si existen usos del término que no esté claro para los expertos habituados en la técnica dado el contexto en la que se utilicen, "aproximadamente" y "de manera aproximada" significarán más o menos $\leq 10\%$ del término particular y "sustancialmente" y "significativamente" significarán más o menos $> 10\%$ del término particular.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "incluyen" y "que incluyen" tienen el mismo significado que los términos "comprenden" y "que comprenden".

El término "planta" como se utiliza en el presente documento se debería interpretar ampliamente y puede incluir angiospermas y gimnospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas, y árboles. Ejemplos de dicotiledóneas angiospermas pueden incluir, pero no se limitan al tomate, algodón, colza, alubias cultivadas, soja, pimientos, lechuga, guisantes, alfalfa, trébol, repollo, brócoli, coliflor, coles de Bruselas, rábano, zanahoria, remolacha, berenjena, espinacas, pepino, calabaza, melones, cantalupo, y girasoles. Ejemplos de monocotiledóneas angiospermas pueden incluir, pero no se limitan a espárragos, maíz cultivado y dulce, cebada, trigo, arroz, sorgo, cebolla, sorgo perlado, centeno, avena, y caña de azúcar. Las plantas leñosas pueden incluir, pero no se limitan a, árboles frutales, acacias, aliso, álamo temblón, haya, abedul, liquidámbar, sicomoro, chopo, sauce, abeto, pino, picea, alerce, cedro, y tuya.

La expresión "rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas" o "PGPR" se refiere a un grupo de bacterias que colonizan las raíces de las plantas, y al hacerlo, promueven el crecimiento de las plantas y/o reducen la enfermedad o los daños por predadores. Las bacterias que son PGPR pueden pertenecer a géneros que incluyen, pero no se limitan a *Actinobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, y *Lysinibacillus*.

La expresión "compuesto orgánico volátil" o "VOC" se refiere a un compuesto orgánico que normalmente es gaseoso en condiciones ambientales. Como se utiliza en el presente documento, los VOC pueden incluir, pero no se limitan a, alfa-pineno, beta-pineno, beta-mirceno, acetato de cis-3-hexenilo, limoneno, beta-ocimeno, linalool, (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, salicilato de metilo, decanal, cis-jasmono, cariofileno, alfa-humuleno, beta-farneseno, y mezclas de los mismos. Como se desvela en el presente documento, se han identificado PGPR que inducen a las plantas a que produzcan VOC.

Las PGPR desveladas actualmente se pueden formular como un inoculante para una planta. El término "inoculante" significa una preparación que incluye un cultivo aislado de una PGPR y opcionalmente un vehículo, que puede incluir un medio biológicamente aceptable.

Las PGPR desveladas actualmente pueden estar aisladas o sustancialmente purificadas. Las expresiones "aisladas" o "sustancialmente purificadas" se refiere a las PGPR que se han retirado de su entorno natural y se han aislado o separado, y están al menos un 60 % libres, preferentemente al menos un 75 % libres, y más preferentemente al menos un 90 % libres, más preferentemente incluso al menos un 95 % libres, y más preferentemente al menos el 100 % libres de otros componentes con los que se asocian naturalmente. Un "cultivo aislado" se refiere a un cultivo de la PGPR que no incluye cantidades significativas de otros materiales tales como otros materiales que se encuentran normalmente en el suelo en el que crece la PGPR y/o del que se puede obtener normalmente la PGPR.

Un "cultivo aislado" puede ser un cultivo que no incluya ninguna otra especie biológica, microorganismo y/o bacteria en cantidades suficientes para interferir la replicación del "cultivo aislado". Los cultivos de PGPR aislados se pueden combinar para preparar un cultivo mezclado de PGPR.

5 El género *Bacillus* como se utiliza en el presente documento es un género de bacterias Grampositivas, con forma de bastón que son miembros de la división Firmicutes. En condiciones ambientales estresantes, las bacterias *Bacillus* producen endosporas ovals que pueden estar dormidas durante periodos extensos. Las bacterias *Bacillus* se pueden caracterizar e identificar basándose en la secuencia de nucleótidos de su ARNr 16S o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de aproximadamente 1000 nt, 1100 nt, 1200 nt, 1300 nt, 1400 nt, o 1500 nt de la
10 secuencia de nucleótidos del ARNr o ADNr 16S). Las bacterias *Bacillus* pueden incluir pero no se limitan a *B. acidiceler*, *B. acidicola*, *B. acidiproducens*, *B. aeolius*, *B. aerius*, *B. aerophilus*, *B. agaradhaerens*, *B. ainingensis*, *B. akibai*, *B. alcalophilus*, *B. algicola*, *B. alkalinitrilicus*, *B. alkalisediminis*, *B. alkalitelluris*, *B. altitudinis*, *B. alveayuensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. aquimaris*, *B. arsenicus*, *B. aryabhatai*, *B. asahii*, *B. atrophaeus*, *B. aurantiacus*, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. barbaricus*, *B. bataviensis*, *B. beijingensis*, *B. benzoovorans*, *B. beveridgei*, *B. bogoriensis*, *B. boroniphilus*, *B. butanolivorans*, *B. canaveralius*, *B. carboniphilus*, *B. cecembensis*, *B. cellulossilyticus*, *B. cereus*, *B. chagannorensis*, *B. chungangensis*, *B. cibi*, *B. circulans*, *B. clarkii*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. coahuilensis*, *B. cohnii*, *B. decisifrondis*, *B. decolorationis*, *B. drenthensis*, *B. farraginis*, *B. fastidiosus*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. foraminis*, *B. fordii*, *B. fortis*, *B. fumarioli*, *B. funiculus*, *B. galactosidilyticus*, *B. galliciensis*, *B. gelatini*, *B. gibsonii*, *B. ginsengi*, *B. ginsengihumi*, *B. graminis*, *B. halmapalus*, *B. halochares*, *B. halodurans*, *B. hemicellulosilyticus*, *B. herbertsteinensis*, *B. horikoshi*, *B. horneckiae*, *B. horti*, *B. humi*, *B. hwajinpoensis*, *B. idriensis*, *B. indicus*, *B. infantis*, *B. infernus*, *B. isabellae*, *B. isronensis*, *B. jeotgali*, *B. koreensis*, *B. korlensis*, *B. kribbensis*, *B. krulwichiae*, *B. lehensis*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. litoralis*, *B. locisalis*, *B. luciferensis*, *B. luteolus*, *B. macauensis*, *B. macyae*, *B. mannanilyticus*, *B. marisflavi*, *B. marmarensis*, *B. massiliensis*, *B. megaterium*, *B. methanolicus*, *B. methylotrophicus*, *B. mojavensis*, *B. muralis*, *B. murimartini*, *B. mycoides*, *B. nanhaiensis*, *B. nanhaiisediminis*, *B. nealsonii*, *B. neizhouensis*, *B. niabensis*, *B. niacini*, *B. novalis*, *B. oceanisediminis*, *B. odysseyi*, *B. okhensis*, *B. okuhidensis*, *B. oleronius*, *B. oshimensis*, *B. panaciterrae*, *B. patagoniensis*, *B. persepolensis*, *B. plakortidis*, *B. pocheonensis*, *B. polygoni*, *B. pseudoalcaliphilus*, *B. pseudofirmus*, *B. pseudomy-coides*, *B. psychrosaccharolyticus*, *B. pumilus*, *B. qingdaonensis*, *B. rigui*, *B. ruris*, *B. safensis*, *B. salarius*, *B. saliphilus*, *B. schlegelii*, *B. selenatarsenatis*, *B. selenitireducens*, *B. seohaeanensis*, *B. shackletonii*, *B. siamensis*, *B. simplex*, *B. siralis*, *B. smithii*, *B. soli*, *B. solisalsi*, *B. sonorensis*, *B. sporothermodurans*, *B. stratosphericus*, *B. subterraneus*, *B. subtilis*, *B. taeansis*, *B. tequilensis*, *B. thermantarcticus*, *B. thermoamylovorans*, *B. thermocloacae*, *B. thermolactis*, *B. thioparans*, *B. thuringiensis*, *B. tripoxylicola*, *B. tusciae*, *B. vallismortis*, *B. vedderi*, *B. vietnamensis*, *B. vireti*, *B. wakoensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. xiaoxiensis*, y mezclas de las mismas.

35 Las PGPR y los inoculantes de las mismas que se desvelan en el presente documento pueden incluir al *B. amyloliquefaciens* o una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada con el *B. amyloliquefaciens*. La secuencia parcial del ADNr ribosómico 16S de *B. amyloliquefaciens*, cepa Chilli-1 (N.º de registro en el GenBank HQ021420.1) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 1. Se puede definir una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada con *B. amyloliquefaciens* como una especie que tiene una secuencia
40 de ADNr 16S que comprenda la SEQ ID NO: 1 o que comprenda secuencias de ADNr 16S que tengan al menos aproximadamente un 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

Las PGPR y los inoculantes de las mismas desvelados en el presente documento pueden incluir al *B. mojavensis* o una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionado con el *B. mojavensis*. La secuencia parcial del ADNr ribosómico 16S del *B. mojavensis*, cepa NBSL51 (N.º de registro en el GenBank JN624928.1) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 2. Se puede definir una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada con *B. mojavensis* como una especie que tiene una secuencia de ADNr 16S que comprenda la SEQ ID NO: 2 o que comprenda secuencias de ADNr 16S que tengan al menos aproximadamente un 98 % o 99 % de
50 identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

Las PGPR y los inoculantes de las mismas desvelados en el presente documento pueden incluir al *B. solisalsi* o una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionado con el *B. solisalsi*. La secuencia parcial del ADNr ribosómico 16S del *B. solisalsi*, cepa YC1 (N.º de registro en el GenBank NR_044387) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 3. Se puede definir una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada
55 con *B. solisalsi* como una especie que tiene una secuencia de ADNr 16S que comprenda la SEQ ID NO: 3 o que comprenda una secuencia de ADNr 16S que tenga al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

Las PGPR y los inoculantes de las mismas desvelados en el presente documento pueden incluir al *B. pumilus* o una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionado con el *B. pumilus*. La secuencia parcial del ADNr ribosómico 16S del *B. pumilus*, cepa TUB1 (N.º de registro en el GenBank HE613653.1) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 4. Se puede definir una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada con *B. pumilus* como una especie que tiene una secuencia de ADNr 16S que comprenda la SEQ ID NO: 4 o que comprenda secuencias de ADNr 16S que tengan al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %
65 de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

Las PGPR y los inoculantes de las mismas desvelados en el presente documento pueden incluir al *B. simplex* o una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionado con el *B. simplex*. La secuencia parcial del ADN ribosómico 16S del *B. simplex*, cepa NH.259 (N.º de registro en el GenBank EU627171.1) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 5. Se puede definir una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada con *B. simplex* como una especie que tiene una secuencia de ADN 16S que comprenda la SEQ ID NO: 5 o que comprenda una secuencia de ADN 16S que tenga al menos un 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

Las PGPR y los inoculantes de las mismas desvelados en el presente documento pueden incluir al *B. subtilis* o una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionado con el *B. subtilis*. La secuencia parcial del ADN ribosómico 16S del *B. subtilis*, cepa NH.259 (N.º de registro en el GenBank EU627171.1) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 6. Se puede definir una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada con *B. subtilis* como una especie que tiene una secuencia de ADN 16S que comprenda la SEQ ID NO: 6 o que comprenda una secuencia de ADN 16S que tenga al menos aproximadamente un 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En algunos de los inoculantes desvelados en el presente documento que comprenden bacterias *Bacillus*, la especie de *Bacillus* no es *B. subtilis* y no es una especie de *Bacillus* que esté estrechamente relacionada con el *B. subtilis*. Una especie de *Bacillus* que no está estrechamente relacionada con el *B. subtilis* se puede definir como una especie que tenga una secuencia de ADN 16S que no tenga más de un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, o 91 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

El "porcentaje de identidad de secuencia" se puede determinar mediante el alineamiento de dos secuencias de longitud equivalente utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) disponible en el sitio de internet del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (es decir, "bl2seq" como se describe en Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein y nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250). Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre la SEQ ID NO: 1, y la SEQ ID NO: 5 se puede determinar alineando estas dos secuencias utilizando el software BLAST en línea proporcionado en el sitio de internet del NCBI.

El "porcentaje de identidad de secuencia" entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos también se puede determinar utilizando el modelo de distancia de 2 parámetros de Kimura que corrige múltiples máximos, teniendo en cuenta las tasas de sustitución transicional y transversional, mientras que asume que las frecuencias de cuatro nucleótidos son las mismas y que las tasas de sustitución no varían entre los sitios (Nei y Kumar, 2000) como se implementa en el MEGA 4 (Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599), preferentemente la versión 4.0.2 o posterior. Las penalizaciones de apertura de huecos y de extensión se fijan en 15 y 6,66, respectivamente. Los huecos en los extremos no se penalizan. El retraso del cambio de secuencias divergentes se fija en 30. La puntuación de transición de peso es de 35 fijado a 0,5 como equilibrio entre una falta de coincidencia completa y una puntuación de coincidencia de pares. La matriz de peso del ADN que se utiliza es la puntuación de matriz IUB en la que las x y las n son coincidencias con cualquier símbolo de ambigüedad de IUB, y todas las puntuaciones de coincidencia son 1,9, y todas las puntuaciones de falta de coincidencia son 0.

Como se utiliza en el presente documento, "Mezcla 8" se refiere a una mezcla de bacterias *Bacillus* que incluye el *Bacillus amyloliquefaciens* cepa AP-188, *Bacillus mojavensis* cepa AP-209, *Bacillus solisalsi* cepa AP-217, y el *Bacillus amyloliquefaciens* cepa AP-218. (Véase la Tabla 1). Como se utiliza en el presente documento, "Mezcla 9" se refiere a una mezcla de bacterias *Bacillus* que incluye el *Bacillus amyloliquefaciens* cepa AP-136, *Bacillus mojavensis* cepa AP-188, *Bacillus solisalsi* cepa AP-219, y el *Bacillus amyloliquefaciens* cepa AP-295.

La PGPR desvelada actualmente se puede utilizar para tratar plantas e inducir la producción de VOC en las plantas tratadas. Por ejemplo, las PGPR desveladas actualmente se pueden formular como un inoculante para tratar plantas. Los métodos de tratamiento contemplado en el presente documento pueden incluir el tratamiento de una planta directamente incluyendo el tratamiento de las hojas, tallos, o raíces de la planta directamente. Los métodos de tratamiento contemplados en el presente documento incluyen el tratamiento de las semillas de la planta, por ejemplo, antes de que las semillas se planten para producir una planta tratada. Los métodos contemplados en el presente documento pueden incluir el tratamiento de una planta indirectamente, por ejemplo, tratando el suelo o el entorno que rodea la planta (por ejemplo, aplicaciones con líquido o gránulos en los surcos). Los métodos de tratamiento adecuados pueden incluir la aplicación de un inoculante que incluye la PGPR mediante pulverización a alta y baja presión, inundación y/o inyección. Las semillas de las plantas se pueden tratar aplicando una pulverización a alta o baja presión, revestimiento, inmersión, y/o inyección. Después de que las semillas de la planta se han tratado de esta manera, las semillas se pueden sembrar y cultivarse para producir plantas. Las plantas propagadas a partir de dichas semillas se pueden tratar adicionalmente con una o más aplicaciones. Las concentraciones de aplicación adecuadas se pueden determinar empíricamente. En algunas realizaciones donde las PGPR se aplican en pulverizador a las plantas, las concentraciones de aplicación adecuadas pueden incluir la pulverización de 10^6 - 10^{18} unidades formadoras de colonias (ufc) por hectárea de plantas, más comúnmente de 10^7 - 10^{15} ufc por hectárea. Para las semillas revestidas, en algunas realizaciones, las concentraciones de aplicación adecuadas pueden estar

entre 10^2 - 10^8 ufc por semilla, preferentemente 10^4 - 10^7 ufc por semilla. En otras realizaciones, las PGPR se pueden aplicar como inmersión de las raíces de la plántula o como una inundación del suelo a una concentración de aproximadamente 10^2 - 10^{12} ufc/ml, 10^4 - 10^{10} ufc/ml, o aproximadamente 10^6 - 10^8 ufc/ml.

Las PGPR se pueden aplicar junto con un vehículo adecuado en una composición (por ejemplo, como un inóculo). Los vehículos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, agua u otras soluciones acuosas, lechadas, sólidos (por ejemplo, turba, trigo, salvado, vermiculita, y suelo pasteurizado) o polvos secos. En algunas realizaciones, la composición incluye 0^2 - 10^{12} ufc por ml de vehículo, o 10^4 - 10^{10} ufc por ml de vehículo, o 10^6 - 10^8 ufc por ml de vehículo. La composición puede incluir aditivos adicionales que incluyen agentes tampón, tensioactivos, o agentes de revestimiento.

Los métodos desvelados actualmente se pueden llevar a cabo con el fin de modificar el comportamiento de los insectos hacia la planta tratada. Como se utiliza en el presente documento, "modificación" del comportamiento de los insectos pueden incluir la reducción o prevención del comportamiento negativo del insecto y/o al aumento del comportamiento positivo del insecto. La reducción o prevención del comportamiento negativo del insecto puede incluir la reducción o prevención del daño por insectos. Por ejemplo, los métodos pueden practicarse para reducir o prevenir la alimentación de insectos herbívoros en la planta tratada. Preferentemente, los métodos reducen la alimentación en una planta tratada frente a una planta no tratada al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 %. La reducción de la alimentación puede medirse comparando la masa corporal de las larvas que se alimentan en las plantas tratadas frente a las plantas no tratadas durante un periodo de tiempo. La reducción de la alimentación se puede medir comparando la masa perdida por la planta debido a la alimentación de los insectos en un tiempo. Los métodos también pueden practicarse para reducir o prevenir la puesta de huevos de insectos herbívoros en la planta tratada. Preferentemente, los métodos reducen la puesta de huevos (es decir, la oviposición) en una planta tratada frente a una planta no tratada al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 %. La reducción de la puesta de huevos se puede medir comparando la puesta de huevos por insecto (por ejemplo, el número total de huevos y el número total de puestas de huevos) en una planta tratada frente a una planta sin tratar. Los insectos herbívoros cuyo comportamiento se puede modificar por los métodos desvelados actualmente pueden incluir, pero no se limitan a *Spodoptera exigua* y *Pieris rapae*. Los métodos se pueden practicar también para atraer enemigos naturales de los insectos a las plantas tratadas, incluyendo, pero sin limitarse a insectos predadores o insectos parasitoides. Los insectos predadores pueden incluir, pero no se limitan a, mariquitas (es decir, *Coccinellidae*), chinches asesinos (es decir, *Reduviidae*), chinches de ojos saltones (es decir, *Geocoridae*), chinche pirata diminuto (es decir, *Antrocoridae*), damisela (es decir, *Nabidae*), crisopas (es decir, *Neuroptera*), y ácaros predadores (es decir, *Phytoseiidae*). Los parasitoides de insectos pueden incluir, pero no se limitan a avispas Brancónidas (por ejemplo, *Cotesia marginiventris*, *Microplitis croceipes*, *Cotesia rubecula*, y *Aphidius colemani*), avispas ichneumoníidas, avispas Chalcidas (por ejemplo, *Eretmocerus spp.*, y *Encarsia formosa*), y moscas Tachínidas.

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la materia objeto reivindicada.

Ejemplo 1 - Efectos de las Rizobacterias promotoras del crecimiento sobre la inducción de volátiles en plantas de algodón y atracción de parasitoides

Resumen

Se sabe que las avispas parásitas (parasitoides) utilizan como pistas para la localización del huésped distintos tipos de señales volátiles relacionadas con el huésped. Estas señales volátiles podrían estar basadas en las plantas, originarse a partir del huésped herbívoro, o producirse por la interacción entre los herbívoros y su planta huésped. El éxito de los parasitoides para la supresión de las poblaciones de plagas depende de su capacidad para localizar los huéspedes en un entorno olfatorio y visual complejo. A pesar del intenso interés en las interacciones huésped-parasitoide, no se entienden bien ciertos aspectos de la comunicación olfatoria en este grupo de insectos.

Aquí, se llevaron a cabo estudios para evaluar el potencial de las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) sobre la inducción de volátiles en el algodón y las consecuencias en la respuesta de los parasitoides. Se evaluaron tres tratamientos con PGPR: i) *Bacillus pumilis* cepa INR-7 y dos mezclas de bacterias *Bacillus*. También se ensayó un control sin tratar (con agua). Había diferencias cuantitativas y cualitativas en los volátiles del espacio frontal recolectados de las plantas de algodón tratadas con PGPR y sin tratar. Se detectó un total de once picos que representaban los VOC en el espacio frontal de plantas de algodón tratadas con PGPR, pero solo se detectaron tres picos en las plantas de algodón sin tratar. Se registraron las diferencias en el crecimiento de las raíces entre las plantas tratadas con PGPR frente a las sin tratar.

Introducción

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) representan un amplio intervalo de bacterias colonizadoras de las raíces cuya aplicación se asocia a menudo con un aumento de las tasas de crecimiento de las

plantas (Kloepper 1992, Zehnder et al. 1997, Kloepper et al. 2004), supresión de los patógenos del suelo (Schippers et al. 1987, Burkett-Cadena et al. 2008), y la inducción de resistencia sistémica contra insectos de plagas (van Loon et al. 1998, Kloepper et al. 1999, Ramamoorthy et al. 2001, Zehnder et al. 2001, Zehnder et al. 2004, Ji et al. 2006). Los inoculantes basados en PGPR incluyen formulaciones que contienen una única cepa, una mezcla de dos cepas, o mezclas complejas de *Bacillus spp.* (Lucy et al. 2004, Kloepper y Ryu, 2006). Los efectos de la aplicación de las PGPR sobre la inducción de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en plantas tratadas están prácticamente sin examinar, a pesar de la evidencia de que la inducción de los volátiles de las plantas depende de muchos factores. La interacción de los factores bióticos que incluyen las hormonas vegetales (de Bruxelles y Roberts, 2001, Thaler et al. 2002, Farmer et al. 2003, Ament et al. 2004), desencadenantes derivados de herbívoros (Mattiacci et al. 1995, Alborn et al. 1997, Spiteller y Boland, 2003), y microorganismos asociados incluyendo los patógenos (Preston et al. 1999, Cardoza et al. 2002), así como factores abióticos que incluyen las heridas (Mithöfer et al. 2005), metales pesados (Mithöfer et al. 2004) y la temperatura y la luz (Takabayashi et al. 1994, Gouinguene y Turlings 2002). La falta de investigación relativa a los efectos de las PGPR sobre la inducción de los volátiles de las plantas es sorprendente dado que las PGPR se han aplicado cada vez más para la producción de varios campos de cultivo que incluyen algodón (*Gossypium hirsutum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), y mijo perlado (*Pennisetum glaucum*) en los EE. UU. O la India (Glick 1995, Backman et al. 1997, Cleyet-Marcel et al. 2001, Kokalis-Burelle et al. 2003, Niranjan Raj et al. 2003, Burkett-Cadena et al. 2008). En 1997, Backman et al. publicaron que del 60-75 % de los cultivos de algodón en EE. UU. se habían tratado con el producto Kodiak® con PGPR, un producto con *Bacillus subtilis* que se utiliza para la supresión de los patógenos del suelo *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Las PGPR se habían utilizado anteriormente para tratar los cultivos agrícolas a gran escala.

Como los herbívoros que utilizan los VOC en su búsqueda de plantas huésped adecuadas (Dicke et al. 2000), también se sabe que los insectos parásitos utilizan mezclas de VOC para buscar alimento y la localización de sus huéspedes herbívoros (Turlings et al. 1990, McCall et al. 1993, De Moraes et al. 1998). Estos VOC pueden originarse de las plantas, los herbívoros huéspedes, o ser el resultado de una interacción entre los herbívoros y la planta (McCall et al., 1994, Cortesero et al. 1997). Los VOC basados en las plantas se han categorizado adicionalmente en volátiles de hoja verde (GLV), que se liberan inmediatamente en respuesta al daño mecánico o el inicio de la alimentación de los herbívoros, y los volátiles de las plantas inducidos por herbívoros (HIPV), que se emiten como una respuesta retardada al daño por la alimentación de los herbívoros. Estas mezclas de VOC, que son altamente atractivos para los parasitoides de los herbívoros del algodón que incluyen *Microplitis croceipes* (Cresson) y *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: *Braconidae*), se liberan en respuesta a la alimentación de las orugas (De Moraes et al. 1998, Chen y Fadamiro 2007, Ngumbi et al. 2009, 2010). Es posible que las PGPR puedan afectar la producción de VOC en el algodón con consecuencias importantes en la búsqueda de alimento de los parasitoides y otras interacciones tri-tróficas e insecto-planta mediadas químicamente.

Aquí, se ensayó la hipótesis de que las PGPR puedan desencadenar cambios en los VOC de la planta de algodón y alterar el crecimiento de las raíces del algodón. Adicionalmente, se hizo la hipótesis de que los parasitoides de los herbívoros del algodón mostrarían una atracción mayor para las plantas de algodón tratadas con las PGPR en comparación con las plantas de algodón sin tratar mediante cambios en la emisión de VOC. Las plantas de algodón tratadas con PGPR y no tratadas se cultivaron en condiciones de invernadero y se recolectaron los volátiles del espacio frontal a las 4-6 semanas tras la plantación. Se utilizaron una cromatografía de gases- espectrometría de masas acopladas (GC-MS) para identificar y analizar los volátiles del espacio frontal de las plantas de algodón tratadas con las PGPR y no tratadas. Se utilizó un olfatómetro de cuatro elecciones para estudiar el comportamiento de *M. croceipes* cuando se presentaba con plantas tratadas con PGPR y plantas sin tratar. Hasta donde saben los inventores, este es el primer informe de que las PGPR afecten la producción de VOC por las plantas de algodón.

Materiales y métodos

Cepas de PGPR. Como se muestra en la Tabla 1 se utilizó un total de ocho cepas de *Bacillus spp.* (De la Universidad Auburn) para desarrollar los tres tratamientos de PGPR estudiados: i) *Bacillus pumilus*, cepa INR-7 (AP 18), ii) Mezcla 8, que contenía cuatro cepas de *Bacillus spp.* (AP 188, 209, 217 218), y iii) Mezcla 9, que contenía cuatro cepas de *Bacillus spp.* (AP 136, 188, 219, 295).

Tabla 1. Preparaciones de PGPR

Preparación de PGPR	Identificación
Mezcla 8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa AP-188 <i>Bacillus mojavensis</i> cepa AP-209 <i>Bacillus solisalsi</i> cepa AP-217 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa AP-218
Mezcla 9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa AP-136 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa AP-188 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa AP-219 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa AP-295
INR-7	<i>Bacillus pumilus</i> cepa AP-18

Plantas. Se cultivaron semillas de algodón Max-9 de la variedad convencional (*G. hirsutum*) (All-Tex Seed, Inc.) individualmente en tiestos redondos de plástico (9 cm de alto, 11 cm de diámetro) cargado con una mezcla de mantillo/vermiculita/turba de musgo. Las semillas se cultivaron en tiestos individuales (9 cm de alto, 11 cm de diámetro) en un invernadero (Instalaciones de Auburn University Plant Science Greenhouse) a $25^{\circ}\text{C} \pm 10$, un fotoperiodo de 15:9 h, (L/O), y un 50 ± 10 % de humedad relativa. Los tratamientos con las PGPR se aplicaron en la siembra (1 ml/semilla) como suspensiones de esporas acuosas (1×10^7 esporas/ml). Semanalmente, las plantas tratadas con PGPR recibían 1 ml adicional de los tratamientos como una suspensión bacteriana acuosa (1×10^9 ufc/ml). Las plantas utilizadas para las recolecciones de volátiles en el espacio frontal tenían 4 a 6 semanas de edad desde el día de la plantación.

Insectos. Los cultivos parentales de *M. croceipes* fueron proporcionados por el USDA-ARS, Insect Biology and Population Management Research Laboratory (Tifton, Georgia). Se criaron las *Microplitis croceipes* sobre orugas de *Heliothis virescens* (Fab.) Lepidoptera: Noctuidae, su huésped preferido (Stadelbacher et al. 1984, King et al. 1985), utilizando un procedimiento similar al de Lewis y Burton (1970). Se utilizaron los huevos adquiridos en Benzene Research (Carlisle, PA, USA) para iniciar una colonia de laboratorio de *H. virescens* criadas con una dieta de judía pinto-preparada en laboratorio (Shorey y Hale 1965). Todas las colonias se mantuvieron a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un 75 ± 5 % de HR y con un fotoperiodo de L14:O10. Los adultos de *M. croceipes* recién emergidos se recolectaron antes del emparejamiento, se sexaron y colocaron en pares de individuos de sexo opuesto (individuos emparejados) en una placa de Petri de plástico de 6 cm suplementada con agua y fuentes de azúcar. El agua se proporcionó cargando un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml con agua destilada y enhebrando una tira de algodón a través de un agujero en la tapa del tubo. Se manchó el interior de la cubierta de la placa de Petri con 5 gotas (2 μl por gota) de una solución de azúcar al 10 % con un aplicador con punta de algodón. Se utilizaron los parasitoides intactos (con una edad de 3-5 días) para los bioensayos.

Recolección y Análisis GC de los volátiles del espacio frontal. La metodología y protocolos utilizados para la recolección de volátiles era similar a los publicados por Gouinguéné et al. (2005), pero con algunas modificaciones. Se recolectaron los volátiles del espacio frontal tanto de las plantas de algodón tratadas con PGPR como sin tratar, así como las plantas de algodón dañadas por orugas tratadas con PGPR y sin tratar. Con el fin de detectar los volátiles de las plantas inducidos por herbívoros (HIPV) de plantas tratadas con PGPR y sin tratar, se dejó que 30 orugas de 2º estadio de *Heliothis virescens* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) se alimentaran en una planta de algodón en un tiesto durante 12 h antes de la recolección de volátiles. El tiesto con la tierra del tiesto se envolvió con papel de aluminio para minimizar la evaporación del agua y los volátiles del suelo. La planta se colocó entonces en una cámara de recolección de volátiles (Analytical Research Systems, Inc., Gainesville, FL) que consiste en una jarra de cristal de 5 l. Se pasó una corriente de aire purificado (utilizando carbón activado) de 500 ml/min a través de la jarra a temperatura ambiente durante 24 h. Los volátiles del espacio frontal se recolectaron utilizando una trampa que contenía 50 mg de Super-Q (Alltech Associates, Deerfield, IL) y se eluyeron con 200 μl de cloruro de metileno. Las eluciones (200 μl) se almacenaron en un congelador (a -20°C) hasta su uso. Se utilizó otro tiesto con tierra de tiesto, pero sin planta para comprobar la miscelánea de impurezas y el ruido de fondo. Se inyectó un μl de cada extracto volátil del espacio frontal en un Shimadzu GC-17A equipado con un detector de ionización de llama (FID). Las dimensiones de la columna capilar utilizada eran las siguientes: Rtx-1 MS, 0,25 mm, I.D., 0,25 μm de grosor de película (Restek, Bellefonte, PA). Se utilizó helio como vehículo gaseoso con un caudal de 1 ml/min. Se programó el horno GC de la siguiente manera: inyección a 40°C , mantenimiento a 40°C durante 2 minutos, y luego aumento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 200°C durante un total de 40 minutos. Las temperaturas de la inyección y el detector se fijaron a 200°C . Se llevaron a cabo cinco repeticiones.

Análisis de GC-MS. Los perfiles de la GC de cada tratamiento de las plantas se identificaron posteriormente mediante GC-MS utilizando un GC Agilent 7890A acoplado a un detector selectivo de masas 5975C, con una columna capilar HP-5 ms (30 m x 0,25 μm I.D., 0,25 mm de grosor de película). Se inyectó un μl de cada extracto frontal en el GC en modo sin división, utilizando las condiciones de GC descritas anteriormente. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un impacto de electrones (EI 70 eV). Se hizo la identificación de picos utilizando la biblioteca NIST 98 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland) y la comparación con los perfiles de GC publicados de los volátiles del espacio frontal de algodón (Thompson et al. 1971, Loughrin et al. 1994, McCall et al. 1994). Las estructuras de los compuestos identificados se confirmaron utilizando referencias sintéticas disponibles en el mercado con una pureza de >97 % (como se indica en la etiqueta) obtenidas en Sigma® Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

Análisis del crecimiento de raíces de algodón. Se llevó a cabo un experimento diferente para determinar si el tratamiento del algodón con las PGPR daría lugar a diferencias en el crecimiento de las raíces del algodón. Se aplicó un ml de PGPR (INR-7, Mezcla 8, y mezcla 9) con concentraciones de esporas de 10^7 a la semilla de algodón. Las semillas tratadas con PGPR se cultivaron entonces en tiestos individuales (15 cm de alto, 21 cm de diámetro) en un invernadero (Instalaciones de Auburn University Plant Science Greenhouse) a $25^{\circ}\text{C} \pm 10$, un fotoperiodo de 15:9 h, (L/O), y un 50 ± 10 % de humedad relativa. Las semillas se plantaron en una mezcla de mantillo/vermiculita/turba de musgo. Adicionalmente, cada semana, se aplicó 1 ml de suspensión bacteriana acuosa (10^9) unidades formadoras de colonias (ufc/ml). Las plantas utilizadas para el análisis de crecimiento de raíces de algodón tenían dos semanas de edad. Tras lavar las raíces, se hizo un análisis de la arquitectura de las raíces en cada sistema radicular de la

planta utilizando el sistema de Regent Instruments, Inc. (Sainte-Foy, Quebec), que consiste en un modelo de escáner LA 1600+ y el software WinRhizo (versión 2004a). Los datos del análisis resultante se recolectaron para dos parámetros de las raíces: área de superficie de la raíz y volumen de la raíz (0-0,5 y 0,5-1,0 mm). También se recolectaron los datos del peso seco de la raíz. Se hicieron ocho repeticiones.

Bioensayos olfatométricos de cuatro elecciones con parasitoides. Se evaluó la atracción de *M. croceipes* a los olores de las plantas tratadas con PGPR frente a las no tratadas, así como a las plantas dañadas por orugas tratadas con PGPR y las no dañadas, en bioensayos olfatométricos de cuatro elecciones (Analytical Research Systems, Gainesville, FL). El aparato era similar al sistema descrito por Pettersson (1970) y Kalule y Wright (2004). Consiste en una cámara central con orificios en las cuatro esquinas a través del cual se introduce aire humidificado y purificado, creando cuatro campos de olor potenciales, y un orificio central donde se produce la mezcla del flujo de los brazos. Se mantuvo un flujo de aire constante de 500 ml/min a través de cada uno de los cuatro orificios de las esquinas del olfatómetro. Las mezclas de aire de los brazos de control y los olores volátiles de los brazos de tratamiento se extrajeron del olfatómetro mediante el orificio central, con un flujo de aire constante de 2,5 l/min. Los olores volátiles emanaban de las plantas que tenían 4-6 semanas de edad tras la plantación. El tiesto con la tierra del tiesto se envolvió con papel de aluminio para minimizar la evaporación del agua y los volátiles. Las plantas se colocaron entonces en las cámaras de recolección de volátiles (Analytical Research Systems, Inc., Gainesville, FL USA) que consistían en una jarra de cristal de 5 l (32 cm de alto, 14,5 cm de diámetro), y se pasó aire purificado (500 ml/min) a través de las cámaras en cada uno de los 4 orificios de las esquinas del olfatómetro.

Se utilizaron en todos los experimentos *M. croceipes* hembra intactas de tres a cinco días de edad. Se retiró una avispa de la jaula con un aspirador y se introdujo individualmente en un tubo de cristal (1,5 cm). El tubo de cristal se conectó con el orificio central del olfatómetro para exponer a la avispa a las mezclas de olores volátiles/aire. Una vez en la cámara, se dieron 15 min al parasitoide para hacer una elección entre los cuatro campos de aire. Si el parasitoide no hacía una elección durante este tiempo, se retiraba, se desechaba y no se incluía en los análisis. Con el fin de eliminar cualquier tendencia direccional en la cámara, el olfatómetro y la posición de las plantas se rotaba después de ensayar ocho parasitoides. Se ensayaron un total de 32 parasitoides al día (8 parasitoides por rotación). Se llevaron a cabo tres conjuntos de experimentos con el olfatómetro de cuatro elecciones para ensayar si las hembras de *M. croceipes* respondían de manera diferente a las plantas de algodón no infestadas frente a las infestadas y las plantas de algodón tratadas con PGPR frente a las no tratadas. En el primer experimento, se compararon los siguientes dos tratamientos y dos controles: (1) planta tratada con PGPR INR7, (2) planta tratada con la Mezcla 9 de PGPR, (3) planta sin tratar (control), (4) control blanco (cámara vacía). Basándose en los resultados del primer experimento, que mostraba una atracción significativa del parasitoide por las plantas tratadas con la Mezcla 9 de PGPR en comparación con las plantas sin tratar (control) (Fig. 6), se llevó a cabo un segundo experimento para determinar si el tratamiento con las PGPR era tan eficaz como el daño/infestación con orugas en la atracción de parasitoides a las plantas. Para este experimento, el tratamiento con PGPR (Mezcla 9) se seleccionó basándose en los resultados del experimento anterior, y se compararon los olores volátiles de los siguientes: (1) planta infestada tratada con la Mezcla 9 de PGPR, (2) planta no infestada tratada con la Mezcla 9 de PGPR, (3) planta infestada sin tratar (de control), y (4) control (cámara vacía). Se infestaron las plantas con 30 orugas de *H. virescens*. Se llevó a cabo un tercer experimento basándose en los resultados del segundo experimento, que demostraba que las plantas sin tratar (de control) infestadas con 30 orugas eran tan atractivas para los parasitoides como las plantas tratadas con la Mezcla 9 de PGPR infestadas con 30 orugas. Esto sugiere que el tratamiento con PGPR puede señalar un nivel de daño por orugas menor que el nivel ensayado en el segundo experimento. Para ensayar esta hipótesis y determinar si el tratamiento con PGPR es tan bueno a un nivel bajo de daño por orugas en la atracción de los parasitoides hacia las plantas, los mismos tratamientos y controles que se ensayaron en el experimento 2 se compararon, pero cada planta infestada se infestó con dos orugas de *H. virescens*.

Se llevaron a cabo los bioensayos olfatométricos de cuatro elecciones entre las 10:00 y las 18:00 h cada día a 25 ± 1 °C, con un 60 ± 5 % h.r. y 250 lux. El primer experimento se repitió cinco veces, mientras que los experimentos 2 y 3 se repitieron cuatro veces. Para cada repetición, se utilizó un nuevo conjunto de plantas.

Análisis estadístico. Los datos cumplían los supuestos clave del Análisis de Varianza y por lo tanto no se transformaron antes del análisis. Se establecieron diferencias significativas en las cantidades de cada volátil emitido por las plantas tratadas con PGPR (*Bacillus pumilis*, cepa INR-7, Mezcla 8 y Mezcla 9) y no tratadas utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) seguido por un ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer ($P < 0,05$, JMP 7.0.1, SAS Institute 2007). Se establecieron diferencias significativas en el crecimiento de las raíces del algodón mediante ANOVA seguido por un ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer ($P < 0,05$, JMP 7.0.1, SAS Institute 2007). Los datos del olfatómetro de cuatro elecciones se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido por un ensayo de comparación múltiple HSD de Tukey-Kramer ($P < 0,05$, JMP 7.0.1, SAS Institute 2007).

Resultados

Análisis de GC y GC-MS de los volátiles del espacio frontal. Los perfiles de la CG de los extractos volátiles del espacio frontal de las plantas de algodón tratadas con PGPR y sin tratar se muestran en la Fig. 1. Se detectó un total de 11 picos (componentes volátiles) en el espacio frontal de las plantas de algodón tratadas con PGPR (INR-7, Mezcla 8, y Mezcla 9) (Fig. 1). Estos picos según se identificaron mediante GC-MS, incluían α -pineno, β -pineno, β -

mirreno, acetato de *cis*-3-hexenilo, limoneno, (β)-ocimeno, linalool, cariofileno, α -humuleno, y β -farneseno. La mayoría de estos picos no se detectaban o se detectaban en cantidades insignificantes en el espacio frontal de las plantas de algodón sin tratar (Fig. 1). Solo tres picos (componentes) eran detectables en las plantas de algodón sin tratar y se identificaron mediante GC-MS como α -pineno, acetato de *cis*-3-hexenilo, y cariofileno. Sin embargo, los tres componentes se detectaron en cantidades mucho más grandes en el espacio frontal de las plantas tratadas con PGPR. De manera adicional, se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con PGPR. (Véase la Tabla 2).

Tabla 2. Composición de volátiles emitidos por las plantas de algodón sin tratar (control) vs. plantas de algodón tratadas con la cepa INR-7, la Mezcla 8, o la Mezcla 9

ID	Compuesto ⁵	Plantas de algodón sin tratar (control)	Plantas de algodón tratadas con la PGPR cepa INR-7	Plantas de algodón tratadas con la Mezcla 8 de PGPR	Plantas de algodón tratadas con la Mezcla 9 de PGPR
1	α -pineno	58 $\pm$ 12 ^d	12.960 $\pm$ 2288 ^a	9.766 $\pm$ 1011 ^b	5.714 $\pm$ 519 ^c
2	β -pineno	0 ^d	2.739 $\pm$ 1782 ^a	2.298 $\pm$ 280 ^b	786 $\pm$ 132 ^c
3	β -mirreno	0 ^d	4.084 $\pm$ 105 ^a	3.044 $\pm$ 94 ^b	864 $\pm$ 148 ^c
4	<i>cis</i> -3-hexenil acetato	62 $\pm$ 5 ^d	3.730 $\pm$ 79 ^a	1.884 $\pm$ 107 ^b	700 $\pm$ 143 ^c
5	limoneno	0 ^b	2.266 $\pm$ 146 ^a	2.230 $\pm$ 122 ^a	2.188 $\pm$ 137 ^a
6	β -ocimeno	0 ^c	4.000 $\pm$ 79 ^a	3.036 $\pm$ 116 ^b	0 ^c
7	linalool	0 ^c	456 $\pm$ 59 ^b	2.050 $\pm$ 73 ^a	1.964 $\pm$ 94 ^a
8	desconocido	0 ^c	2.962 $\pm$ 123 ^a	2.352 $\pm$ 210 ^b	2.962 $\pm$ 45 ^a
9	cariofileno	75 $\pm$ 10 ^d	6.928 $\pm$ 787 ^b	8.380 $\pm$ 842 ^a	3.182 $\pm$ 200 ^c
10	α -humuleno	0 ^c	1.844 $\pm$ 136 ^a	1.811 $\pm$ 120 ^a	288 $\pm$ 42 ^b
11	β -farneseno	0 ^c	1.836 $\pm$ 96 ^a	1.830 $\pm$ 52 ^a	284 $\pm$ 56 ^b

Nota: Los volátiles se recolectaron durante 24 h

^a Con el fin de elución durante la cromatografía de gases

^b Los valores (cantidad emitida) son la cantidad media en ng $\pm$ SE de cinco repeticiones

Las medias a lo largo de la misma fila seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes (P < 0,05, ANOVA)

Las plantas tratadas con las PGPR cepa INR-7 liberaban significativamente más α -pineno, β -pineno, β -mirreno, acetato de *cis*-3-hexenilo y β -ocimeno que las plantas tratadas con la Mezcla 8 o la Mezcla 9 (Tabla 2, Fig. 1). Adicionalmente, el β -ocimeno no se detectó en la Mezcla 9 (Tabla 2, Fig. 1). La Figura 2 muestra los perfiles de GC de los volátiles del espacio frontal emitidos por los siguientes cuatro tratamientos: plantas no infestadas sin tratar (de control), plantas infestadas con *H. virescens* no tratadas (de control), plantas no infestadas tratadas con las PGPR Mezcla 9, y plantas infestadas con *H. virescens* tratadas con las PGPR Mezcla 9.

Se detectaron picos idénticos (28) en los extractos de las plantas infestadas con *H. virescens* sin tratar (de control) y las plantas infestadas con *H. virescens* tratadas con las PGPR Mezcla 9 (Tabla 3, Fig. 2). Sin embargo, se detectaron 10 picos (componentes) en las plantas no infestadas tratadas con las PGPR Mezcla 9 en comparación con solo 3 picos detectados en las plantas no infestadas sin tratar (de control) (Fig. 2).

Tabla 3. Composición de los volátiles del espacio frontal emitidos por las plantas no infestadas sin tratar (de control) vs. las plantas infestadas con *H. virescens* no tratadas (de control), las plantas no infestadas tratadas con las PGPR Mezcla 9, o plantas infestadas con *H. virescens* tratadas con las PGPR Mezcla 9

ID	Compuesto	Plantas de algodón no infestadas sin tratar (control)	Plantas infestadas con <i>H. virescens</i> sin tratar (control)	Plantas no infestadas tratadas con PGPR Mezcla 9	Plantas infestadas con <i>H. virescens</i> tratadas con PGPR Mezcla 9
1	<i>cis</i> -3-hexenal	0	39.740 $\pm$ 2985 ^a	0	38.844 $\pm$ 3397 ^a
2	<i>trans</i> -2-hexenal	0	63.131 $\pm$ 2653 ^a	0	63.020 $\pm$ 2527 ^a
3	<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	0	15.720 $\pm$ 916 ^a	0	15.340 $\pm$ 1262 ^a
4	<i>trans</i> -2-hexen-1-ol	0	68.602 $\pm$ 2774 ^a	0	68.802 $\pm$ 2451
5	α -pineno	58 $\pm$ 12 ^c	93.110 $\pm$ 1345 ^a	5.714 $\pm$ 519 ^b	95.110 $\pm$ 1081 ^a
6	β -pineno	0	58.039 $\pm$ 4522 ^a	786 $\pm$ 132 ^b	57.839 $\pm$ 1606 ^a
7	mirreno	0	120.239 $\pm$ 6930 ^a	864 $\pm$ 148 ^b	119.979 $\pm$ 6500 ^a
8	<i>cis</i> -3-hexenil acetato	0	161.450 $\pm$ 5000 ^a	700 $\pm$ 143 ^b	163.510 $\pm$ 4300 ^a
9	<i>trans</i> -2-hexenil acetato	0	98.814 $\pm$ 1892 ^a	0	99.270 $\pm$ 1504 ^a
10	limoneno	0	110.272 $\pm$ 3614 ^a	2.188 $\pm$ 137 ^b	110.059 $\pm$ 3460 ^a
11	β -ocimeno	0	120.177 $\pm$ 3147 ^a	0	120.466 $\pm$ 4200 ^a
12	linalool	62 $\pm$ 16 ^c	18.343 $\pm$ 1704 ^a	1.964 $\pm$ 94 ^b	18.863 $\pm$ 1660 ^a
13	desconocido	0	57.320 $\pm$ 2531 ^a	2.962 $\pm$ 45 ^b	60.720 $\pm$ 2100 ^a

(continuación)

ID	Compuesto	Plantas de algodón no infestadas sin tratar (control)	Plantas infestadas con <i>H. virescens</i> sin tratar (control)	Plantas no infestadas tratadas con PGPR Mezcla 9	Plantas infestadas con <i>H. virescens</i> tratadas con PGPR Mezcla 9
14	4.8-dimetil-1.3.7-nonatrieno	0	20.920 ± 2166 ^a	0	20.736 ± 2109 ^a
15	<i>cis</i> -3-hexenil butirato	0	106.285 ± 2136 ^a	0	108.725 ± 4628 ^a
16	<i>trans</i> -2-hexenil butirato	0	88.170 ± 2420 ^a	0	90.730 ± 3256 ^a
17	n-decanal	0	4.700 ± 541 ^a	0	4.900 ± 877 ^a
18	<i>cis</i> -3-hexenil-2-metil butirato	0	135.100 ± 6607 ^a	0	135.695 ± 6779 ^a
19	<i>trans</i> -2-hexenil-2-metil butirato	0	128.350 ± 5055 ^a	0	126.950 ± 6136 ^a
20	indol	0	58.430 ± 2051 ^a	0	68.430 ± 1934 ^a
21	tiglato de isobutilo	0	15.700 ± 1139 ^a	0	15.500 ± 1028 ^a
22	2-hexenil tiglato	0	6.700 ± 190 ^a	0	6.620 ± 97 ^a
23	<i>cis</i> -jasmono	0	55.811 ± 928 ^a	0	69.200 ± 1484 ^a
24	cariofileno	75 ± 10	172.500 ± 6461 ^a	3.182 ± 200 ^c	186.500 ± 6825 ^b
25	α - <i>trans</i> bergamoteno	0	15.778 ± 832 ^b	0	17.578 ± 817 ^a
26	α -farneseno	0	38.145 ± 1754 ^a	288 ± 42 ^b	39.345 ± 1500 ^a
27	α -humuleno	0	32.400 ± 1023 ^a	0	34.800 ± 994 ^a
28	β -farneseno	0	47.979 ± 870 ^a	0	52.439 ± 1072 ^a

Nota: Los volátiles se recolectaron durante 24 h

^a Con el fin de elución durante la cromatografía de gases^b Los valores (cantidad emitida) son la cantidad media en ng ± SE de cinco repeticionesLas medias a lo largo de la misma fila seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$, ANOVA)

Análisis del crecimiento de raíces de algodón. La promoción del crecimiento de las raíces resultante después del tratamiento con las PGPR se muestra en las Fig. 2, 3, y 4. La inoculación de las semillas de algodón con la PGPR cepa INR-7, la Mezcla 8 y la Mezcla 9, promovía significativamente el crecimiento en comparación con los controles sin tratar. Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos en el área de superficie ($F_{3,7} = 74,78$, $P < 0,0001$; Fig. 3), volumen de las raíces ($F_{3,7} = 50,42$, $P < 0,0001$; Fig. 4), y peso seco de las raíces ($F_{3,7} = 28,07$, $P < 0,0001$; Fig. 5). En todos los casos, las plantas tratadas con la Mezcla 9 tenían el área de superficie, volumen de la raíz y peso seco de la raíz mayores. Las plantas tratadas con INR-7 y la Mezcla 8 también tenían parámetros de crecimiento de las raíces significativamente mayores que las plantas no tratadas (Fig. 3, 4, y 5).

Bioensayos olfatométricos de cuatro elecciones con parasitoides. En el primer experimento, se registraron diferencias significativas en la respuesta de la hembra de *M. croceipes* a los dos tratamientos y dos controles. Los parasitoides eran más atraídos significativamente ($F_{3,16} = 106,64$, $P < 0,0001$) a las plantas tratadas con la Mezcla 9 (un 69 %) en comparación con las plantas tratadas con INR-7 (un 29 %), plantas (de control) sin tratar (un 0 %) o el control blanco (cámara vacía) (un 0 %) (Fig. 6). También se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{3,12} = 35,92$, $P < 0,0001$) en el experimento 2, que se diseñaron para determinar si el tratamiento con PGPR era tan eficaz como el daño/infestación por orugas (30 orugas de *H. virescens*) en la atracción de parasitoides hacia las plantas. Como se esperaba, las plantas tratadas con la Mezcla 9 de PGPR infestadas con 30 orugas (un 46 %) y las plantas sin tratar (de control) infestadas con 30 orugas (un 41 %) eran altamente atractivas para los parasitoides. Sin embargo, los parasitoides eran más atraídos hacia las plantas sin tratar (control) infestadas con 30 orugas (un 41 %) que a las plantas sin infestar tratadas con la Mezcla 9 de PGPR (un 13 %) (Fig. 7), sugiriendo que el tratamiento con PGPR no era tan potente como la infestación con 30 orugas en la atracción de los parasitoides. Los resultados del tercer experimento, en el que se ensayó un nivel más bajo de infestación (2 orugas de *H. virescens* por planta), también mostraba diferencias significativas entre los tratamientos y los controles ($F_{3,12} = 7,12$, $P = 0,0053$). El tratamiento más atractivo eran las plantas tratadas con la Mezcla 9 del PGPR infestadas con dos orugas (un 58 %). Sin embargo, se atrajeron significativamente más parasitoides a la planta tratada con la Mezcla 9 de PGPR no infestada (un 25 %) en comparación con las plantas no tratadas (control) infestadas con dos orugas (un 15 %) (Fig. 8). Estos resultados muestran que el tratamiento con PGPR era al menos tan eficaz a bajos niveles de daño por orugas en la atracción de parasitoides a las plantas.

Conclusión

Estos resultados demuestran que las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) alteran la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en las plantas de algodón. El descubrimiento de que las PGPR alteran la producción de los VOC en el algodón constituye un mecanismo no publicado para el desencadenamiento

de la producción de volátiles de las plantas por las rizobacterias. Todos los tratamientos con PGPR ensayados (INR7, Mezcla 8 y Mezcla 9) desencadenaban la emisión de VOC que no se detectaban en las plantas de algodón sin tratar. Se detectaron once componentes en el espacio frontal de las plantas tratadas con PGPR. En el espacio frontal de las plantas sin tratar, la mayoría de estos compuestos no se detectaban o se detectaron en cantidades insignificantes (solo se detectaron tres). Además de alterar la producción de VOC, los tratamientos con PGPR también dan lugar a la promoción del crecimiento de las raíces de la planta de algodón, presentando la Mezcla 9 la mayor promoción de crecimiento de las raíces. Se había publicado previamente que las PGPR promovían el crecimiento de las plantas (incluyendo las raíces) en varias especies vegetales. Lo más curioso es que los resultados de los experimentos olfatométricos de cuatro elecciones muestra que los parasitoides eran capaces de distinguir entre las plantas tratadas con PGPR y las no tratadas, prefiriendo las primeras sobre las últimas.

Los componentes principales detectados en las recolecciones del espacio frontal de plantas tratadas con PGPR eran α -pineno, β -pineno, β -mirceno, acetato de *cis*-3-hexenilo, limoneno, β -ocimeno, linalool, cariofileno, α -humuleno, y β -farneseno (Tabla 2, Figura 1). Se había publicado antes que estos compuestos eran constituyentes de mezclas de VOC emitidas por las plantas de algodón dañadas por orugas (Loughrin et al. 1994, De Moraes et al. 1998, Ngumbi et al. 2009). Sin embargo, a diferencia de los informes previos, la mezcla de VOC inducida por las PGPR es cualitativamente diferente de los VOC emitidos por las plantas dañadas por orugas (Tabla 3, Figura 2). Las diferencias en la calidad de la mezcla de los VOC se definen como diferencias en la presencia de compuestos específicos en la mezcla y/o la proporción de los componentes. Estos resultados sugieren que algunos VOC, tal como α -pineno, β -pineno, β -mirceno, acetato de *cis*-3-hexenilo, limoneno, β -ocimeno, linalool, cariofileno, α -humuleno, y β -farneseno pueden desencadenarse por las PGPR. Los estudios previos habían publicado que la producción de VOC en las plantas se podía desencadenar por hormonas vegetales (de Bruxelles y Roberts, 2001, Thaler et al. 2002, Farmer et al. 2003, Ament et al. 2004), desencadenantes derivados de herbívoros (Mattiacci et al. 1995, Alborn et al. 1997, Spiteller y Boland, 2003), patógenos (Cardoza et al. 2002), heridas (Mithöfer et al. 2005), y metales pesados (Mithöfer et al. 2004). Estos hallazgos demuestran que las PGPR desencadenan la inducción de los VOC y están garantizados los estudios adicionales para entender los mecanismos por los que el tratamiento de plantas de algodón con las PGPR da lugar a la liberación de VOC que son diferentes de las plantas sin tratar.

Estos datos del análisis de las raíces del algodón sugieren que el tratamiento con PGPR aumenta el crecimiento de las raíces del algodón. El aumento del peso de crecimiento de las raíces como resultado del tratamiento con PGPR se ha registrado en otros cultivos, incluyendo, albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Kloepper 1992, Zehnder et al. 1997, Kloepper et al. 2004, Burkett-Cadena et al. 2008, Banchio et al. 2009, Humberto et al. 2010). Las PGPR se han aplicado a diferentes cultivos con fines de aumentar el crecimiento y otros efectos positivos en las plantas, tales como el brote de semillas, tolerancia a la sequía, y aumento del peso de los brotes y raíces de las plantas (Glick 1995, Kloepper et al. 2004, Kokalis-Burelle et al. 2006, Yildirim et al. 2006; van Loon, 2007). Humberto et al. (2010) demostraron que la inoculación de plantas de tomate con el promotor del crecimiento *Bacillus subtilis* daba lugar a la promoción del crecimiento de las raíces del tomate y esto era evidente 3 semanas después de la inoculación. Estos hallazgos corroboran estos resultados en los que la promoción del crecimiento de las raíces de algodón era evidente a las 2 semanas después de la inoculación. Además de la promoción del crecimiento de las raíces, las plantas tratadas con PGPR aumentan la capacidad de la planta para defenderse por sí misma de los insectos y los patógenos desencadenando respuestas defensivas, también conocido como resistencia sistémica inducida (ISR) (Kloepper et al. 2004) o por antibiosis (Zehnder et al. 2001). Algunos de los ejemplos publicados incluyen los insectos herbívoros en el pepino *Cucumis sativa* (L.) (Zehnder et al. 1997) y la resistencia a la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hanafi et al. 2007).

Los resultados de los experimentos comportamentales muestran claramente la capacidad de la avispa parásita especialista, *M. croceipes*, para detectar, distinguir y aprovechar las diferencias entre las plantas tratadas con PGPR frente a las no tratadas. Específicamente, las plantas tratadas con PGPR eran altamente atractivas para los parasitoides, siendo las plantas tratadas con la Mezcla 9 las más atractivas. Una evaluación adicional demostraba que las plantas tratadas con la Mezcla 9 pero no infestadas eran incluso más atractivas para los parasitoides que las plantas sin tratar con bajos niveles de infestación por orugas (2 orugas de *H. virescens* por planta). Los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos sistémicamente por las plantas pueden actuar como pistas de la localización de un huésped para la búsqueda de comida de los parasitoides (Röse et al. 1998, De Moraes et al. 1998, Ngumbi et al. 2009). Estos resultados demostraban que las plantas tratadas con PGPR eran altamente atractivas para los parasitoides en comparación con las plantas sin tratar. Estos hallazgos se podrían atribuir a la mezcla de VOC que se producen por las plantas tratadas con la PGPR que está ausente en el espacio frontal de las plantas sin tratar. Estos compuestos inducidos por la PGPR se han implicado en la atracción de enemigos mediante los estudios comportamentales y los estudios de antena electrofisiológica (Röse et al. 1998, Chen y Fadamiro 2007, Ngumbi et al. 2009). Estos datos demostraban claramente la capacidad de la avispa parásita especialista, *M. croceipes*, para detectar, distinguir y aprovechar las diferencias entre las plantas tratadas con PGPR frente a las no tratadas.

Entre los tratamientos de PGPR, las plantas tratadas con la Mezcla 9 eran las más atractivas para los parasitoides. De manera interesante, las plantas tratadas con la Mezcla 9 no liberaba β -ocimeno de manera consistente. Por lo tanto, la ausencia de β -ocimeno en la mezcla de VOC emitida por las plantas tratadas con la Mezcla 9 de PGPR puede ser responsable del aumento de atracción de *M. croceipes* a las plantas tratadas con la Mezcla 9 de PGPR. Los estudios previos han publicado que los parasitoides como la *M. croceipes* pueden detectar y aprovechar

diferencias cualitativas y cuantitativas de las mezclas de VOC cuando buscan sus herbívoros huésped (De Moraes et al. 1998). En un estudio relacionado que investiga el impacto de las PGPR sobre los enemigos naturales del *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), Boutard-Hunt et al. (2009) publicaba que las densidades de enemigos naturales eran significativamente más altas en parcelas tratadas con PGR en comparación de parcelas no tratadas.

- 5 Proporcionando señales químicas específicas y fiables, las plantas pueden adquirir una ventaja competitiva en el reclutamiento de los enemigos naturales de los herbívoros.

En resumen, estos resultados muestran que el tratamiento de las plantas de algodón con cepas únicas o mezclas de varias cepas de PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas) desencadena cambios en los VOC de la planta de algodón con importantes consecuencias para la búsqueda de comida de los parasitoides. En conjunto, los resultados sugieren que el tratamiento con PGPR podría señalar bajos niveles de daños por orugas necesarios para la atracción de parasitoides a las plantas, más probablemente mediante el aumento de emisión de HIPV. Estos hallazgos establecen una nueva función para las PGPR en la mediación de las interacciones insecto-planta y tritróficas.

15 Son necesarios estudios adicionales para investigar si el aumento de la emisión e inducción de los VOC por las PGPR es un fenómeno común en múltiples cultivos en diferentes condiciones ecológicas. Son necesarios estudios adicionales para ensayar si las especies enemigas naturales clave en otros sistemas de cultivo presentan una respuesta similar hacia las plantas tratadas con PGPR. Si se confirman, los resultados de dichos estudios demostrarán que el tratamiento de las plantas con PGPR puede ser un componente viable del manejo de plagas integrado de las plagas en muchos agro-ecosistemas.

Ejemplo 2- Efectos de las PGPR sobre el comportamiento de deposición de huevos de *Spodoptera exigua*

25 Resumen

Se ha demostrado que el tratamiento de los cultivos con rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) aumenta el crecimiento de las plantas y aumenta la salud de las plantas en una variedad de formas. Anteriormente, estas bacterias se estudiaron en modelos utilizando solo una a dos cepas de las PGPR, limitando el entendimiento de cómo pueden actuar las diferentes cepas. Además, se sabe poco acerca de los efectos potenciales de las PGPR sobre las interacciones planta-insectos. Para determinar los efectos de las PGPR sobre el comportamiento de oviposición de *Spodoptera exigua* en las plantas de algodón tratadas con PGPR, se llevó a cabo un estudio de elección de puesta de huevos. Se registró el número total de huevos y de puestas de huevos depositadas en plantas tratadas con PGPR frente a plantas de algodón sin tratar. Aquí, la *Spodoptera exigua* presentaba una preferencia de puesta de huevos en las plantas de algodón sin tratar frente a las plantas de algodón tratadas con PGPR. No se registraron huevos sobre ninguno de los tratamientos con PGPR ensayados que comprendían *Bacillus amyloliquefaciens*.

40 Materiales y Resultados

Se llevaron a cabo dos experimentos para ensayar las distintas mezclas/cepas de PGPR. En el experimento 1, las semillas de las plantas de algodón se trataron con 1 ml de tres preparaciones de simbra de esporas acuosas (Mezcla 8, Mezcla 9, e INR-7, véase el Ejemplo 1), a una concentración de 10^7 ufc/ml. En el Experimento 2, se ensayaron las cepas ABU 288 (*Bacillus simplex*) y MBI 600 (*Bacillus subtilis*) de PGPR. Se incluyó un control sin tratar en ambos Experimentos.

Se permitió que se cruzaran el macho y la hembra de *Spodoptera exigua*. Los machos se marcaron para su separación posterior y se separaron treinta hembras cruzadas de los machos. Para cada una de las 8 repeticiones, se colocaron en jaulas 30 hembras cruzadas de *Spodoptera exigua* durante una noche durante un periodo de 14 horas. La jaula (de 1 m x 1 m x 0,8 m de alta) se colocó en una sala oscura y cada una de las cuatro esquinas tenía una planta de algodón (de 4-5 semanas de edad) de cada uno de los cuatro tratamientos, respectivamente. Los tallos de las plantas se colocaron separados 80 cm y las plantas se rotaron entre las repeticiones. Después de 14 horas, se hizo el recuento del número de masas de huevos y el número total de huevos por planta. Los resultados se presentan en la Tabla 4 y la Figura 9 para el Experimento 1, y en la Tabla 5 para el Experimento 2.

Tabla 4. Puesta de huevos de *Spodoptera exigua* sobre plantas de algodón tratadas con PGPR (INR7, Mezcla 8 y Mezcla 9) frente a no tratadas

Tratamiento	Número total de huevos depositados	Número total de puestas de huevos depositadas	Número de repeticiones durante las que la planta en tratamiento tenía huevos depositados en ella (de 8)
Control	491	32	8
INR-7	151	7	4
Mezcla 8	341	22	6
Mezcla 9	0	0	0

Tabla 5. Puesta de huevos de *Spodoptera exigua* sobre plantas de algodón tratadas con PGPR (cepas MBI 600 o ABU 288) frente a no tratadas

Tratamiento	Número total de huevos depositados	Número total de puestas de huevos depositadas
Control	105	3
MBI 600	0	0
ABU 288	0	0

Los resultados de ambos experimentos ilustran una tendencia por la que la *Spodoptera exigua* prefería depositar sus huevos en plantas de algodón sin tratar frente a las plantas de algodón tratadas con PGPR. No se depositaron huevos sobre la Mezcla 9 de PGPR (Experimento 1) y las cepas MBI 600 y ABU 288 (Experimento 2).

Los volátiles del espacio frontal se recolectaron de las plantas del Experimento 2. Como en las plantas tratadas con la Mezcla 8, la Mezcla 9 e INR-7 (véase el Ejemplo 1, Figura 1), se observó la inducción de los VOC por las plantas tratadas con las cepas MBI 600 y ABU 288 frente a las plantas de control (Figura 10). Se observaron las diferencias cuantitativas y cualitativas en los volátiles del espacio frontal recolectados del algodón tratado con cualquier cepa en comparación con las plantas de algodón sin tratar. Los picos inducidos por las cepas MBI 600 y ABU 288 frente al control son compuestos terpenoides de bajo peso molecular tales como monoterpenos y sesquiterpenos.

Referencias

Alborn, H. T., T. C. J. Turlings, T. H. Jones, G. Stenhagen, J. H. Loughrin, y J. H. Tumlinson. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*. 276: 945-949.

Ament, K., M. R. Kant, M. W. Sabelis, M. A. Haring, y R. C. Schuurink. 2004. Jasmonic acid is a key regulator of spider-mite induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiol*. 135: 2025-2037.

Backman, P. A., M. Wilson, y J. F. Murphy. 1997. Bacteria for biological control of plant diseases. En: N. A. Rechcigl y J. E. Rechcigl (eds.), pp. 95-109. *Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

Banchio, E., X. Xie, H. Zhang, y P. W. Pare. 2009. Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emission in sweet basil. *J. Agric. Food Chem*. 57: 653-657.

Boutard-Hunt, C., C. D. Smart, J. Thaler, y B. A. Nault. 2009. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria and natural enemies of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) infestations in pepper. *J. Econ. Entomol*. 102: 2183-2191.

Burkett-Cadena, M., N. Kokalis-Burelle, K. S. Lawrence, E. van Santen, y J. W. Kloepper. 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biol. Cont*. 47: 55-59.

Cardoza, Y. J., H. T. Alborn, y J. H. Tumlinson. 2002. *In vivo* volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *J. Chem. Ecol*. 28: 161-174.

Chen, L., y H. Y. Fadamiro. 2007. Differential electroantennogram response of females and males of two parasitoid species to host-related green leaf volatiles and inducible compounds. *Bull. Entomol. Res*. 97: 515-522.

Cleyet-Marcel, J. C., M. Larcher, H. Bertrand, S. Rapior, y X. Pinochet. 2001. Plant growth enhancement by rhizobacteria. En: J. F. Morot-Gaudry (ed.), pp. 185-197. *Nitrogen Assimilation by Plants. Physiological, Biochemical and Molecular aspects*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH.

De Bruxelles, G. L., y M. R. Roberts. 2001. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit. Rev. Plant Sci*. 20: 487-521.

De Moraes, C. M., W. J. Lewis, P.W. Pare, H. T. Alborn, y J. H. Tumlinson. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature (London)*. 393: 570-573.

Farmer, E. E., E. Almeras, y V. Krishnamurthy. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol*. 6: 372-378.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol*. 41: 109-117.

Gouinguéné, S. P., y T. C. J. Turlings. 2002. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol*. 129: 1296-1307.

- Gouinguéné, S. P., J. A. Pickett, L. J. Wadhams, M. A. Birkett, y T. C. J. Turlings. 2005. Antennal electrophysiological responses of three parasitic wasps to caterpillar-induced volatiles from maize (*Zea mays*), cotton, (*Gossypium herbaceum*), and cowpea (*Vigna unguiculata*). *J. Chem. Ecol.* 31: 1023-1038.
- 5 Hanafi, A., M. Traore, W. H. Schnitzler, y M. Voitke. 2007. Induced resistance of tomato to whiteflies and *Phytium* with the PGPR *Bacillus subtilis* in a soilless crop grown under greenhouse conditions. En: A. Hanafi, y W. H. Schnitzler (eds.), pp. 315-322. Proceedings of VIIIth IS on protected cultivation in mild winter climates. *Acta Horticult.*
- 10 Humberto, J., V. Soto, M. G. Estrada-Hernández, E. Ibarra-Lacelette, y J. P. Délano-Frier. 2010. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. *Planta*. 231: 397-410.
- 15 Jalali S. K., S. P. Singh, y C. R. Ballal. 1987. Studies on host age preference and biology of exotic parasite, *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). *Entomon.* 12: 59-62.
- Ji, P., H. Campbell, J.W. Kloepper, J. Jones, T. Suslow, y M. Wilson. 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control*. 36: 358-367.
- 20 King, E. G., J. E. Powell, y R. J. Coleman. 1985. A high incidence of parasitism of *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in cotton in southeastern Arkansas. *Entomophaga*. 30: 419-426.
- 25 Kloepper, J. W. 1992. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: F. B. Metting Jr. (ed.), pp. 255-274. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kloepper, J. W., R. Rodriguez-Kabana, G. W. Zehnder, J. Murphy, E. Sikora, y C. Fernandez. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Aust. J. Plant Pathol.* 28: 27-33.
- 30 Kloepper, J. W., C. M. Ryu, y S. A. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathol.* 94: 1259-1266.
- 35 Kloepper, J.W. y C. M. Ryu. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. En: B. Schulz, B. Boyle, y T. Sieber (eds.) *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 33-51.
- Kokalis-Burelle, N., C.S. Vavrina, M.S. Reddy, y J.W. Kloepper. 2003. Amendment of muskmelon and watermelon transplant media with plant growth-promoting rhizobacteria: effects on disease and nematode resistance. *HortTechnology*. 13: 476-482.
- 40 Kokalis-Burelle, N., J. W. Kloepper, y M. S. Reddy. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Appl. Soil Ecol.* 31: 91-100.
- 45 Lewis, W. J., y R. L. Burton. 1970. Rearing *Microplitis croceipes* in the laboratory with *Heliothis zea* as host. *J. Econ. Entomol.* 63: 656-658.
- Loughrin, J. H., A. Manukian, R. R. Heath, y J. H. Tumlinson. 1994. Diurnal cycle emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 11836-11840.
- 50 Lucy, M., E. Reed, y B. R. Glick. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 1-25.
- Mattiacci L., M. Dicke, y M. A. Posthumus. 1995. β -Glucosidase: An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 2036-2040.
- 55 Mithöfer, A., B. Schulze, y W. Boland. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*. 566: 1-5.
- Mithöfer, A., G. Wanner, y W. Boland. 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiol.* 137: 1160-1168.
- 60 Ngumbi, E. N., L. Chen, y H. Y. Fadamiro. 2009. Comparative GC-EAD responses of a specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to cotton volatiles induced by two caterpillar species. *J. Chem. Ecol.* 35: 1009-1020.
- 65

Niranjan Raj, S., S. A. Deepak, P. Basavaraju, H. S. Shetty, M. S. Reddy, y J. W. Kloepper. 2003. Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Protect.* 22: 579-588.

Pieterse, C. M. J., S. C. M. Van Wees, E. Hoffland, J. A. Van Pelt, y L. C. Van Loon. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell.* 8: 1225-1237.

Preston, C. A., C. A. Lewandowski, J. Enyedi, y I. T. Baldwin. 1999. Tobacco mosaic virus inoculation inhibits wound-induced jasmonic acid mediated responses within but not between plants. *Planta.* 209: 87-95.

Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, y R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20: 1-11.

Röse, U. S. R., W. J. Lewis, y J. H. Tumlinson. 1998. Specificity of systemically released cotton volatiles as attractants for specialist and generalist parasitic wasps. *J. Chem. Ecol.* 24: 303-319.

Ryu, C., M. A. Farag, C. Hu, M. S. Reddy, J. W. Kloepper, y P. W. Pare. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1017-1026.

SAS Institute. 2007. JMP® 7.0.1. Cary, N.C., USA.

Schippers, G., A. W. Baker, y P. A. H. M. Bakker. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect on cropping practices. *Annu. Review Phytopathol.* 25: 339-358.

Shorey, H. H., y R. L. Hale. 1965. Mass rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 58: 55-68.

Stadelbacher, E. A., J. E. Powell, y E.H. King. 1984. Parasitism of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in wild and cultivated host plants in the Delta of Mississippi. *Environ. Entomol.* 13: 1167-1172.

Takabayashi, J., M. Dicke, y M. A. Posthumus. 1994. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions, variation caused by biotic and abiotic factors. *J. Chem. Ecol.* 20: 1329-1354.

Thaler, J. S., R. Karban, D. E. Ullman, K. Boege, y R. M. Bostock. 2002. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia.* 131: 227-235.

Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, y C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.

Yildirim, E., A. G. Taylor, y T. D. Spittler. 2006. Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. *Scientia Horticult.* 111: 1-6.

Zehnder, G. W., J. W. Kloepper, T. Tuzun, C. Yao, G. Wei, O. Chambliss, y R. Shelby. 1997. Insect feeding on cucumber mediated rhizobacteria-induced plant resistance. *Entomol. Exp. Appl.* 83: 81-85.

Zehnder, G. W., J. F. Murphy, E. J. Sikora, y J. W. Kloepper. 2001. Application of Rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 39-50.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Auburn University
Kloepper, Joseph W.
Fadamiro, Henry Y.
Ngumbi, Esther N.
Nangle, Kate W.

<120> INOCULANTES QUE INCLUYEN BACTERIAS BACILLUS PARA LA INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN PLANTAS

<130> 5171-00303

<150> US 61/421.979

<151> 10-12-2010

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 1577

<212> ADN

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 1

10

gatcctggct caggacgaac gctggggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcggacaga	60
tgggagcttg ctccctgatg ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg taacctgcct	120
gtaagactgg gataactccg ggaaaccggg gctaataccg gatggtgtc tgaaccgcac	180
ggttcagaca taaaagggtg cttcggctac cacttacaga tggaccgcg ggcattagc	240
tagttggtga ggtaacggc caccaaggcg acgatgcga gccgacctga gagggtgatc	300
ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt agggaatctt	360
ccgcaatgga cgaaagtctg acggagcaac gccgcgtgag tgatgaagggt ttccggatcg	420
taaagctctg ttgttaggga agaacaagtg ccgttcaaat agggcggcac cttgacggta	480
cctaaccaga aagccacggc taactaogtg ccagagccgc ggtaataacg taggtggcaa	540
gcgttggtccg gaattattgg gcgtaaaggg ctcgcaagcg tttcttaag tctgatgtga	600
aacccccggg ctcaaccggg gagggtcatt ggaaaccgag gaacttgagt gcagaagagg	660
agagtggaat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaac accagtggcg	720
aaggcgactc tctgttctgt aactgacgct gagagagcga agcgtgggga gcgaacagaa	780
ttagataccc tggtagtcca cgcgttaaao gatgagtgt aagtgttagg gggtttcgc	840
cccttagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacggc cgcaagactg	900
aaactcaaag gaattgacgg gggcccgccac aagcgggtgga gcatgtgggt taattcgaag	960
caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcccttgaca atccatagaga taggacgtcc	1020
ccttcggggg cagagtgaca ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgct gtgagatgtt	1080
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccagcattc agttgggcac	1140
tctaagggtga ctgccggtga caaacgggag gaagggtggg atgacgtcaa atcatcatgc	1200
cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacaga acaaagggca gcgaaaccgc	1260
gaggttaagc caatcccaca aatctgttct cagttcggat cgcagtctgc aactogactg	1320
cgtgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccg	1380
ccttgtagac accgcccgtc acaccaogag agtttgtaac accgaagtc ggtgaggtaa	1440
cctttatgga gccagccgcc gaagggtggga cagatgattg ggtgaagtc gtaacaaggt	1500
agccgtatcg gaagggtcgg ctggatcacc tcctttctaa ggattttaac ggaatataag	1560
accttgggtc ttataac	1577

<210> 2

<211> 1485

<212> ADN

<213> *Bacillus mojavensis*

<400> 2

cggttacgtc ttctagtttg atcctggctc agtgoggctg ggtagcttgc tcctgatgt	60
tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt aacctgcctg taagactggg ataactccgg	120
gaaaccgggg ctaataccgg atggttggtt gaaccgcatg gttcaaacaat aaaaggtggc	180
ttcggctacc acttacagat ggaccccgcg cgcattagct agttggtgag gtaacggctc	240
accaaggcaa cgatgcgtag ccgacctgag aggggtgatcg gccacactgg gactgagaca	300
cggcccagac tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga	360
cggagcaacg ccgcgtgagt gatgaagggt ttoggatcgt aaagctctgt tgtagggaa	420
gaacaagtac cgttogaata gggcggtagc ttgacggtac ctaaccagaa agccccggct	480
aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttggtccgg aattattggg	540
cgtaaagggc tcgcacgcgg tttcttaaata ctgatgtgaa agccccggc tcaaccgggg	600
agggtcattg gaaactgggg aacttgagtg cagaaaagga gagtgggaatt ccacgtgtag	660
cggtgaaatg cgtagagatg tggaggaaca ccagtggcga aggcgactct ctggtctgta	720
actgacactg aggagcgaga gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagttccc	780
cccgtaaacg atgagtggta agtggttaggg gggttcccc ccttagtggt gcaggtaacg	840
cattaagcac tccccctggg gagtacggtc gcaaggctga aactcaaagg aattgacggg	900
ggcccgacc agcggtgag catgtggtt aatttgaagc aacgcgaaga acctaccag	960
gtcttgacat cctctgacaa tcctagagat aggacgtccc ctttgggggc agagtacag	1020
gtggtgcatg gttgtgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc	1080
gcaacccttg atcttagttg ccagcattta gttgggcaact ttaaggtgac tgccggtgac	1140
aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc cttatgacc tgggctacac	1200
acgtgctaca atggacagaa caaagggcag cgaaaccgcg aggttaagcc aatcccacaa	1260
atctgttctc agttcggatc gcagtctgca actcgactgc gtgaagctgg aatcgctagt	1320
aatcgcgat cagcatgccg cgggtgaatac gttccccggc cttgtacaca ccgcccgtca	1380
caccacgaga gtttgtaaca cccgaagtog gtgaggtaac cttttaggag ccagccgccc	1440
aaggtgggac agatgattgg gggaagacct aactagagga gtgcc	1485

<210> 3
 <211> 1424
 <212> ADN
 <213> *Bacillus solisalsi*
 <400> 3

tacatgcaag tcgagcggac agatgaggag cttgctcctc tgatgttagc ggcggacggg	60
tgagtaacac gtgggcaacc tacctgtaag acggggataa ctccgggaaa ccggagctaa	120
taccggataa taaagagaaa cgctgtttc ttttttgaaa gtcggtttcg gctgacactt	180
acagatgggc ccgcggcgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcgaogat	240
gcgtagccga cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct	300
acgggaggca gcagtaggga atcttcggca atggacgaaa gtctgaccga gcaacgccgc	360
gtgagcgatg aaggccttcg ggtcgtaaag ctctgttgct agggagaagc aagtaccgga	420
gtaactgccg gtaccttgac ggtacctgac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca	480
gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggaatta ttgggcgtaa agcgcgcgca	540
ggcggttcct taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt cattggaaac	600
tggggaactt gagtgcagga gagaaaagtg gaattccacg tgtagcggtg aaatgcgtag	660
agatggggag gaaccccagt ggcgaaggcg gctttttggc ctgtaactga cgctgaggcg	720
cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag	780
tgctaggtgt ttgggggggt ccacctcag tgctgacgtt aacacattaa gcaactccgc	840
tggggagtag gggccgcaag gctgaaactc aaaaggaatt gacggggggc cgcacaagca	900
gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc	960
tgaccacttg agagatcaag ctttccctt cgggggacag agtgacaggt ggtgcatggt	1020
tgctgctcag tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtccg caacgagcgc aaccttgac	1080
cttagttgcc agcattcagt tgggcaactc aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa	1140
ggtggggatg acgtcaaac atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat	1200
gggtggtaca aagggttgcg aagccgcgag gccgagccaa tccccaaaag ccactctcag	1260
ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat gaagccggaa ttgctagtaa tcgcggatca	1320
gcatgccgcg gtgaatacgt tccggggcct tgtacacacc gccggtcaca ccacgagagt	1380
ttgtaacacc cgaagtcggt ggggtaaccg ttggagccag ccgc	1424

<210> 4
 <211> 1346
 <212> ADN
 <213> *Bacillus pumilus*
 <400> 4

tacatgcaag tcgagtggac agaagggagc ttgctcccgg atgttagcgg cggacgggtg	60
agtaacacgt gggtaacctg cctgtaagac tgggataact ccgggaaacc ggagctaata	120
ccggatagtt ccttgaaccg catggttcaa ggatgaaaga cggtttcggc tgtcacttac	180
agatggaccc gcggcgcat agctagttgg tggggtaatg gctcaccaag gcgacaatgc	240
gtagccaacc tgagaggggtg atcggccaca ctgggactga aacacggccc aaactcctac	300
gggaggcacc agtagggaat ctccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgcgcgt	360
gagtgatgaa ggttttcgga togtaaagct ctgttgtag ggatgaacaa gtgcgagagt	420
aactgctcgc accttgacgg taacctacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcacc	480
cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgtc cgggaattatt gggcgtaaag ggctcgcagg	540
cggtttctta agtctgatgt gaaagccccc ggctcaaccg gggaggggtca ttggaaaactg	600
ggaaaacttga gtgcagaaga ggagagtggc attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagag	660
atgtggagga acaccagtgg cgaaggcgac tctctggtct gtaactgacg ctgaggagcg	720
aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg	780
ctaagtgtta gggggtttcc gcccttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct	840
ggggagtacg gtcgcaagac tgaaactcaa aggaattgac gggggccccg acaagcggtg	900
gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggcttga catcctctga	960
caaccctaga gatagggctt tcccttcggg gacagagtga cagggtggtg atggttgctg	1020
tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tctcgcaacg agcgcaacct ttgatcttag	1080
ttgccagcat tcagttgggc actotaaggt gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg	1140
ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtgct acaatggaca	1200
gaacaaagtg ctgcgagacc gcaaggttta gccaatccca taaatctggt ctcagttcgg	1260
atcgagctct gcaactcgac tgogtgaagc tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg	1320
ccgcggtgaa tacgttcccg ggccct	1346

<210> 5
 <211> 1529
 <212> ADN
 <213> *Bacillus simplex*

<400> 5

cgggatccga gtttgatcct ggtcagaacg aacgctggcg gogtgcctaa tacatgcaag	60
tcgagcgaat cgatgggagc ttgctccctg agattagcgg cggacgggtg agtaacacgt	120
gggcaacctg cctataagac tgggataact tcgggaaacc ggggctaata ccggatacgt	180
tcttttctcg catgagagaa gatggaaaga cggtttacgc tgtcacttat agatgggccc	240
gcggcgcatc agctagtgtg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatgc gtagccgacc	300
tgaggggggtg atcgggcaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc	360
agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gaacgaagaa	420
ggccttcggg tcgtaaagtt ctgttggttag ggaagaacaa gtaccagagt aactgctggt	480
accttgacgg tacctaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata	540
cgtaggtggc aagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag cgcgcgcagg tggttcctta	600
agtctgatgt gaaagccac ggctcaaccg tggagggtca ttggaaactg gggaacttga	660
gtgcagaaga ggaaagtga attccaagtg tagcggtgaa atgcgtagag atttgaggga	720
acaccagtgg cgaaggcgac tttctggtct gtaactgaca ctgaggcgcg aaagcgtggg	780
gagcaaacag gattagatac cctggtagtc caccgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta	840
gagggtttcc gccctttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtacg	900
gccgcaaggc tgaactcaa aggaattgac gggggccgcg acaagcgggtg gagcatgtgg	960
tttaattcga agcaacgca agaaccttac caggctttga catcctctga caacctaga	1020
gatagggtct tccccttcgg gggacagagt gacagggtgt gcatggttgt cgtcagctcg	1080
tgctcgtgaga tgttggttga agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgatctt agttgccagc	1140
attcagttgg gcactctaag gtgactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg	1200
tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtaaaaag	1260
ggctgcaaac ctgcgaaggt aagcgaatcc cataaagcca ttctcagttc ggattgcagg	1320
ctgcaactcg cctgcatgaa gccggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcgggtg	1380
aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgagagtttg taacaccoga	1440
agtcggtgag gtaaccttca tggagccagc cgcctaaggt gggacagatg attggggtga	1500
agtcgtaaca aggtagccgt aggatcccg	1529

<210> 6
 <211> 1124
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 6

tgctatacat gcaagtcgag cggacagatg ggagcttgct ccctgatgtt agcggcggac	60
gggtgagtaa cacgtgggta acctgcctgt aagactggga taactccggg aaaccggggc	120
taataccgga tggttgtttg aaccgcatgg ttcagacata aaaggtggct tcggctacca	180
cttacagatg gacccgcggc gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac	240
gatgcgtagc cgacctgaga gggatgatcg ccacactggg actgagacac ggcccagact	300
cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc	360
cgcgtgagtg atgaaggttt tcggatcgta aagctctgtt gttagggaag aacaagtgcc	420
gttcaaatag ggcggcacct tgacggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc	480
agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggct	540
cgcaggcggg ttcttaagtc tgatgtgaaa gccccgggct caaccgggga gggtcattgg	600
aaactgggga acttgagtgc agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc	660
gtagagatgt ggaggaacac cagtggcgaa ggcgactctc tggctctgtaa ctgacgctga	720
ggagcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga	780
tgagtgcata gtgttagggg gtttccgccc cttagtgtcg cagctaacgc attaagcact	840
ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa	900
gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgagaa cttaccaggt cttgacatcc	960
tctgacatcc tagagatagg acgtcccctt cgggggcaga gtgacagtgg tgcattggtg	1020
tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggta agtcccgcac gagcgacccc ttgatcttag	1080
ttgccagcat tcagttggca ctctaagggtg actgcccgtg acga	1124

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria aislada seleccionada de entre un grupo que consiste en *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-136 (N.º de registro NRRL B-50614), *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-188 (N.º de registro NRRL B-50615), *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-218 (N.º de registro NRRL B-50618), *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-219 (N.º de registro NRRL B-50619), y *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa AP-295 (N.º de registro NRRL B-50620), *Bacillus mojaviensis*, cepa AP-209 (N.º de registro NRRL B-50616), *Bacillus solisalsi*, cepa AP-217 (N.º de registro NRRL B-50617), *Bacillus simplex*, cepa ABU 288 (N.º de registro NRRL B-50340), y *Bacillus subtilis*, cepa MBI 600 (N.º de registro NRRL B-50595).
2. Un inoculante que comprende la bacteria aislada de la reivindicación 1 y un vehículo.
3. Un inoculante de acuerdo con la reivindicación 2, donde el inoculante comprende adicionalmente una fitohormona, un compuesto antimicrobiano, o ambos.
4. El uso de un inoculante de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para la inducción de la producción de uno o más compuestos orgánicos volátiles (VOC) por una planta que se ha tratado con el inoculante.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el uno o más VOC comprenden uno o más de los compuestos seleccionados de entre un grupo que consiste en alfa-pineno, beta-pineno, beta-mirceno, acetato de *cis*-3-hexenilo, limoneno, beta-ocimeno, linalool, (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, salicilato de metilo, decanal, *cis*-jasmono, cariofileno, alfa-humuleno, beta-farneseno, y mezclas de los mismos.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde el uno o más VOC modifican el comportamiento de un insecto expuesto al uno o más VOC.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el insecto es un herbívoro y el uno o más VOC reducen la puesta de huevos del insecto sobre la planta y/o la alimentación del insecto sobre la planta.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el insecto es un predador o un parasitoide y el uno o más VOC atraen al predador o el parasitoide hacia la planta.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde las bacterias tienen una secuencia de ácido nucleico del ADN_r 16S que es al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos un 91 % idéntica a la SEQ ID NO: 3, al menos un 96 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, al menos un 93 % idéntica a la SEQ ID NO: 5, o al menos un 93 % idéntica a la SEQ ID NO: 6.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, donde la fitohormona se selecciona de entre un grupo que consiste en acetofina, 2,3-butanodiol, e indol-ácido acético y el compuesto antimicrobiano se selecciona de entre un grupo que consiste en feniletanol y 4-hidroxibenzoato.
11. Un método para la modificación del comportamiento de los insectos hacia una planta, comprendiendo el método la administración de un inoculante que se define en la reivindicación 2 a la planta, a las semillas de la planta o al suelo que rodea la planta, induciendo el inoculante la producción de uno o más VOC por la planta que se ha tratado con el inoculante.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde el insecto es:
 - (a) un herbívoro y el método reduce la puesta de huevos del insecto en la planta y/o la alimentación del insecto sobre la planta
 - (b) un predador o parasitoide y el método atrae al predador o parasitoide hacia la planta.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, donde la planta se selecciona de entre un grupo que consiste en alfalfa, arroz, cebada, centeno, algodón, girasol, maní, maíz, patata, batata, alubias, guisantes, lentejas, achicoria, lechuga, endivia, repollo, coles de Bruselas, remolacha, chirivía, nabo, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinacas, cebollas, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabacita, calabaza, calabacín, pepino, manzana, pera, melón, cítricos, fresas, uvas, frambuesa, piña, soja, canola, colza oleaginosa, trigo de primavera, trigo de invierno, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

Figura 1

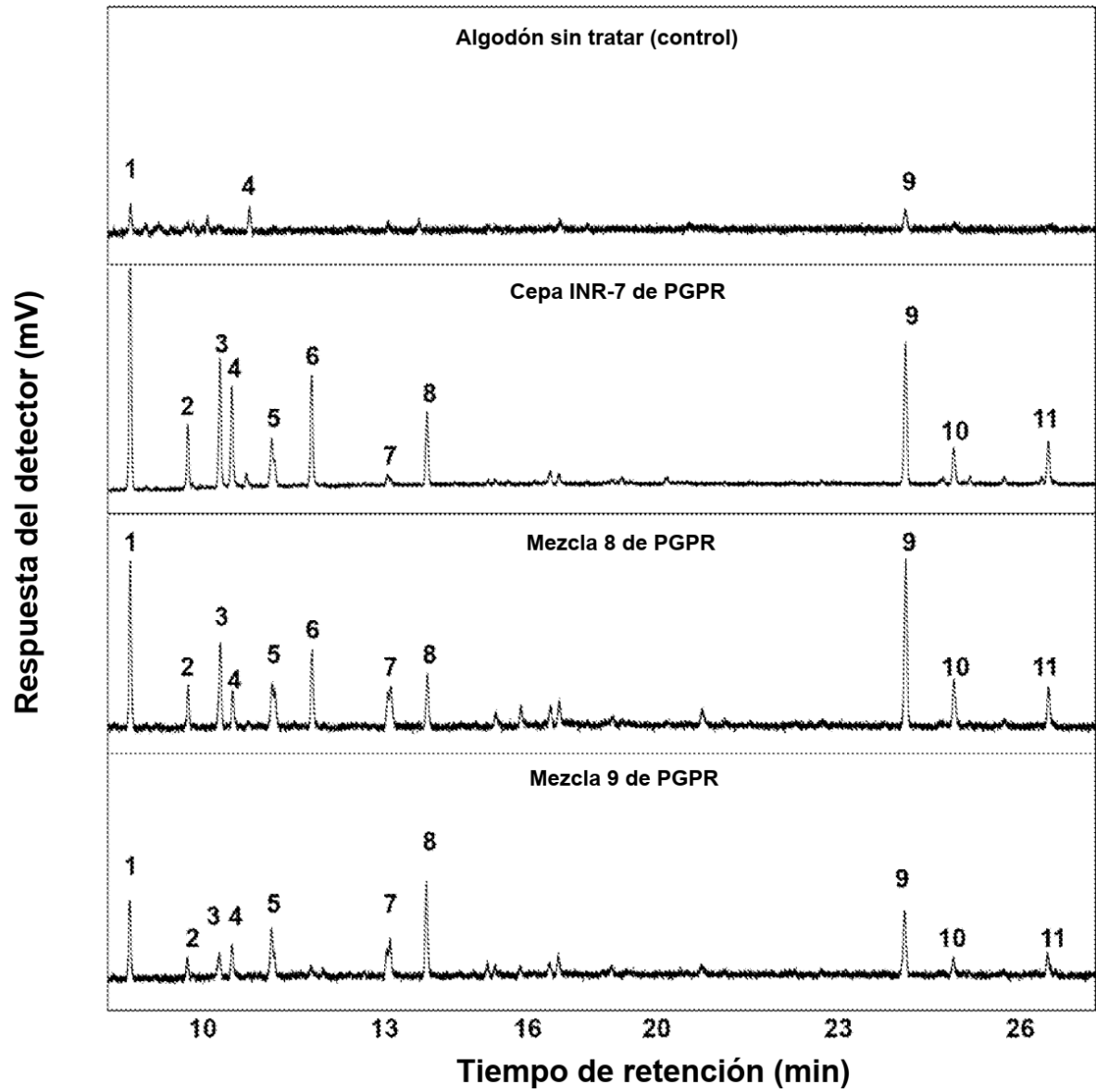


Figura 2

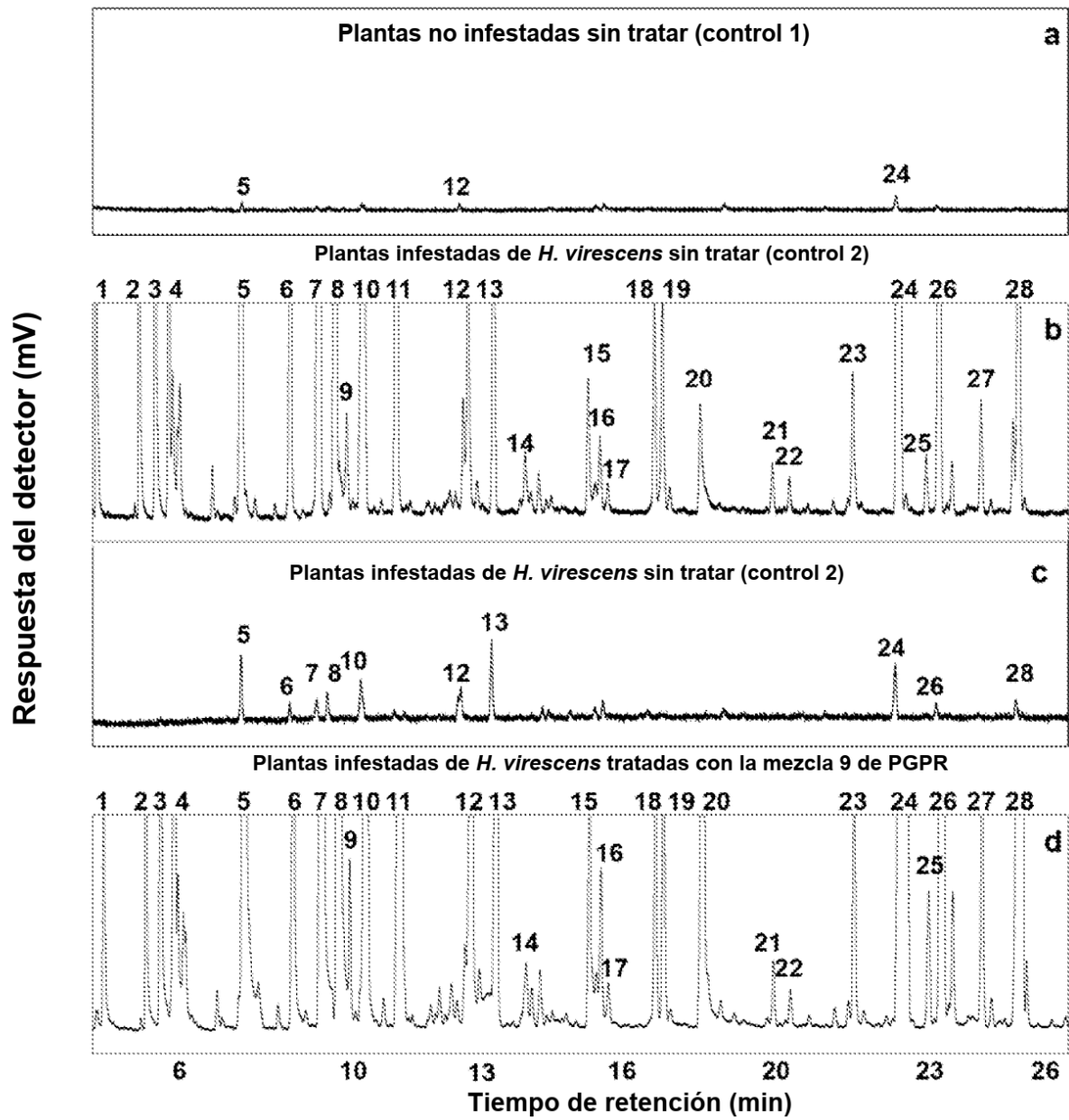


Figura 3

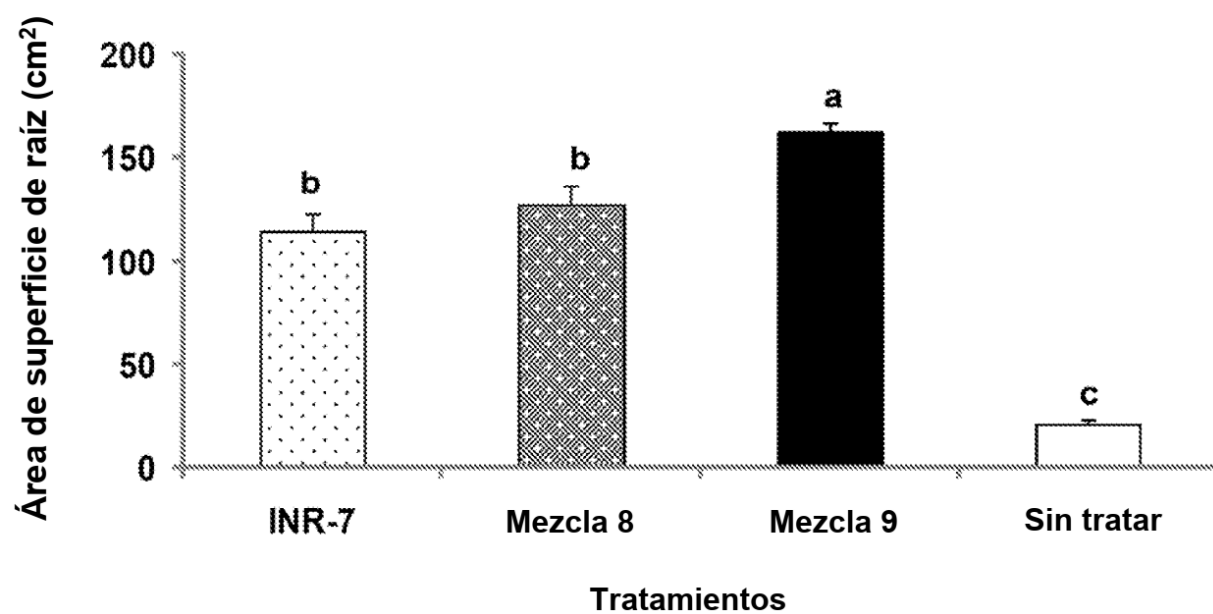


Figura 4

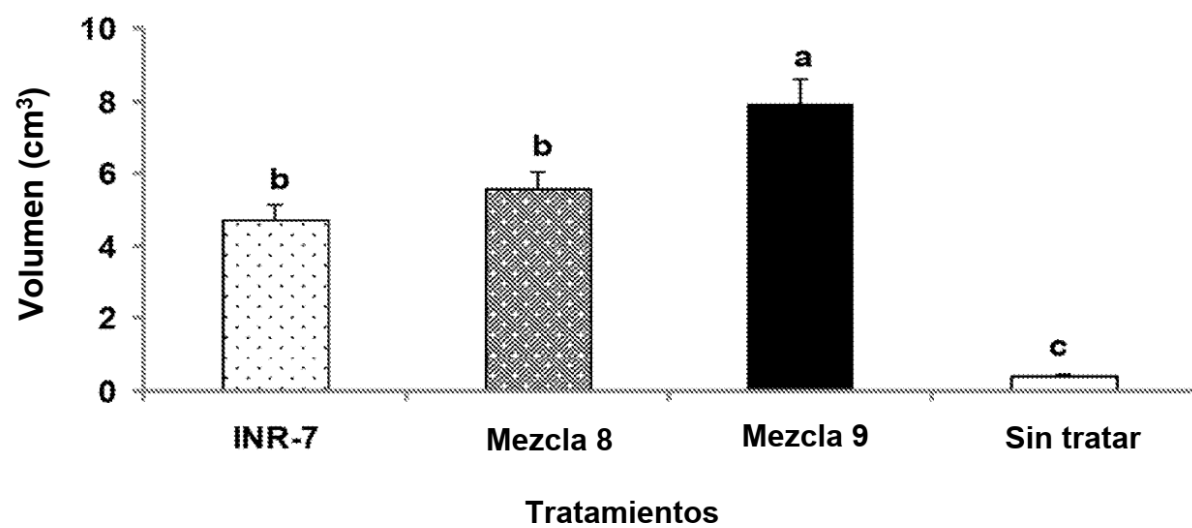


Figura 5

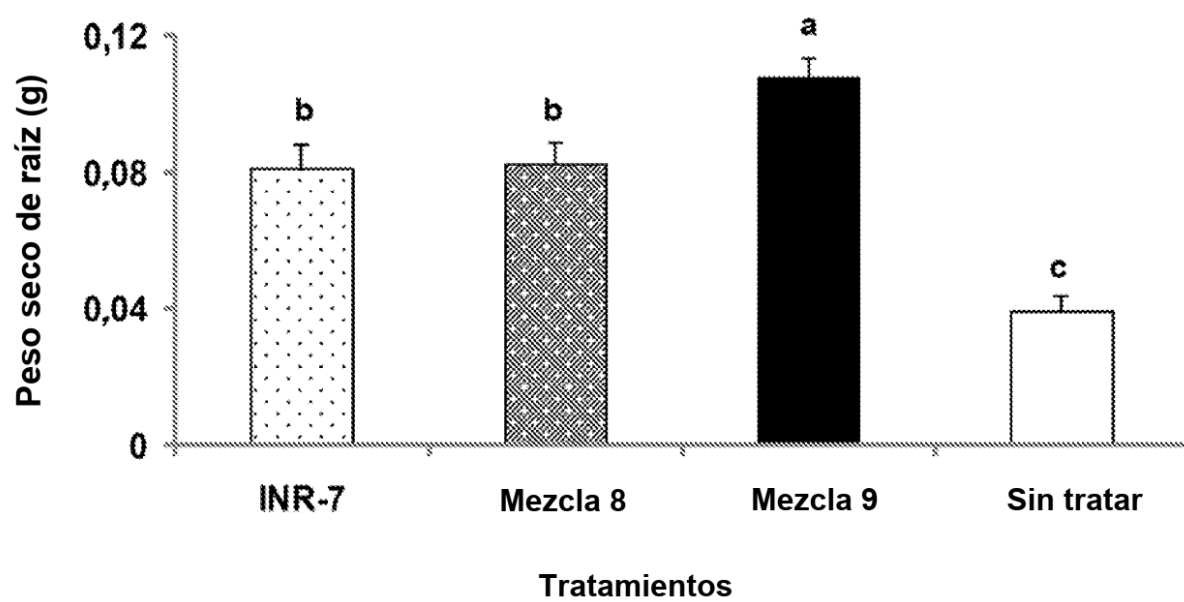


Figura 6

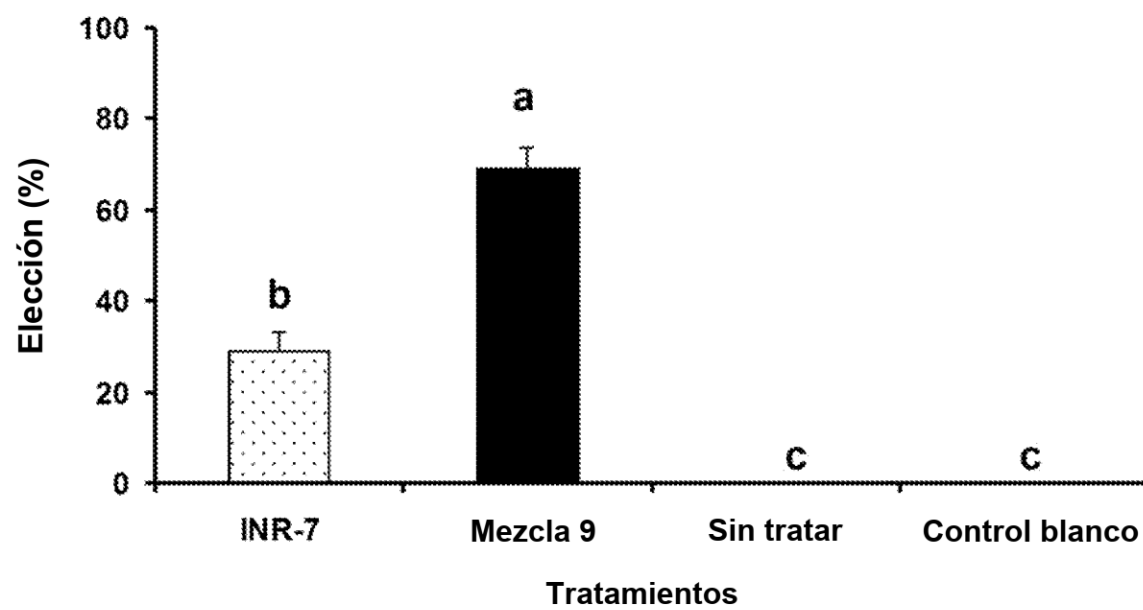


Figura 7

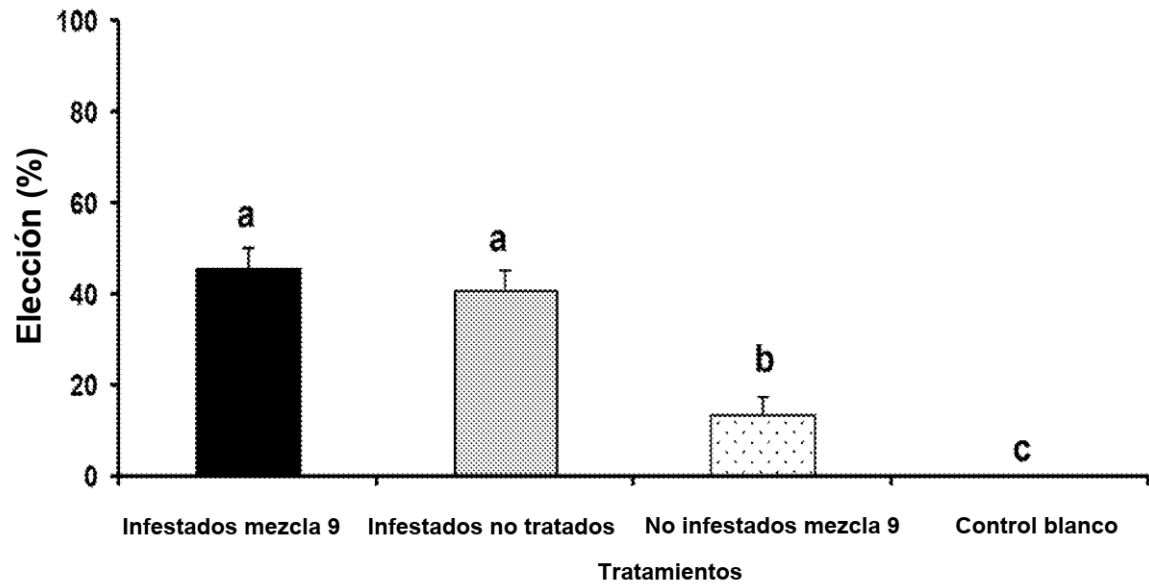


Figura 8

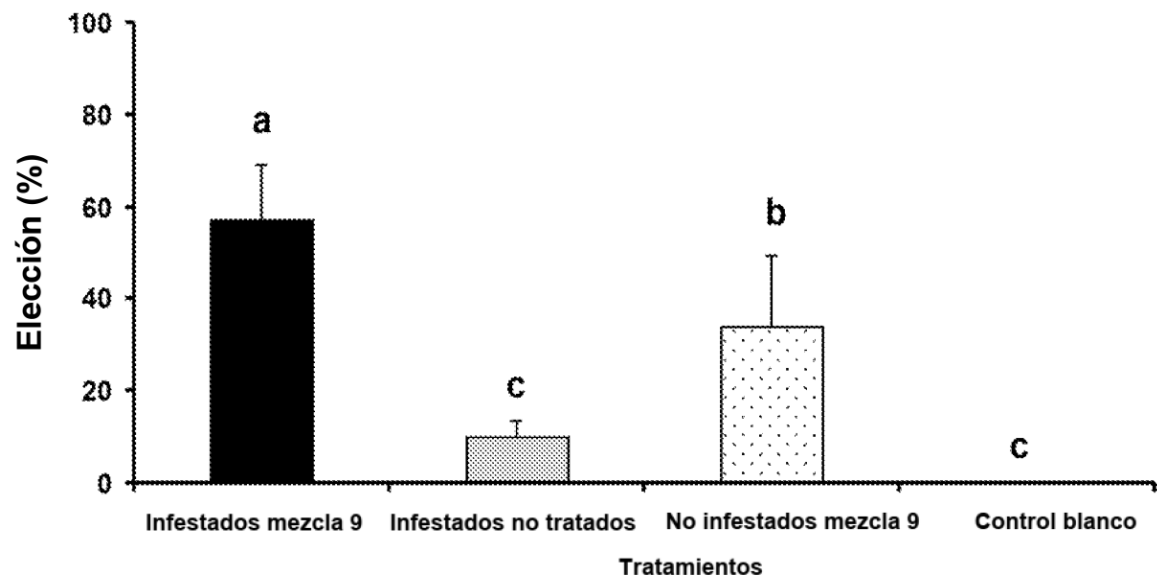
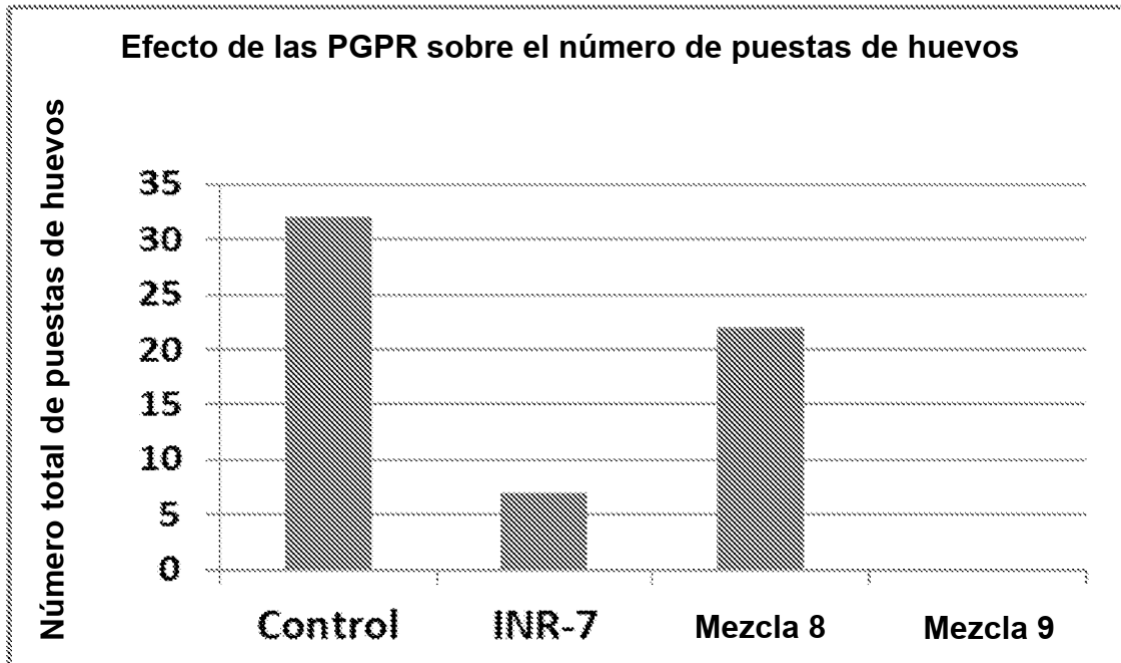


Figura 9

(A)



(B)

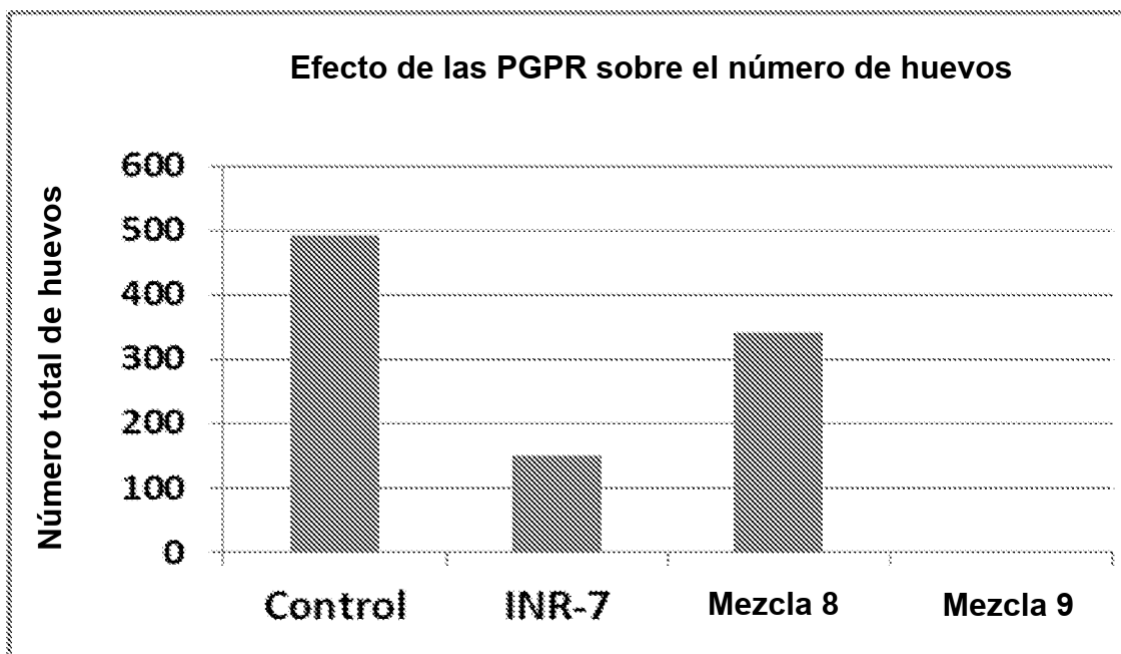
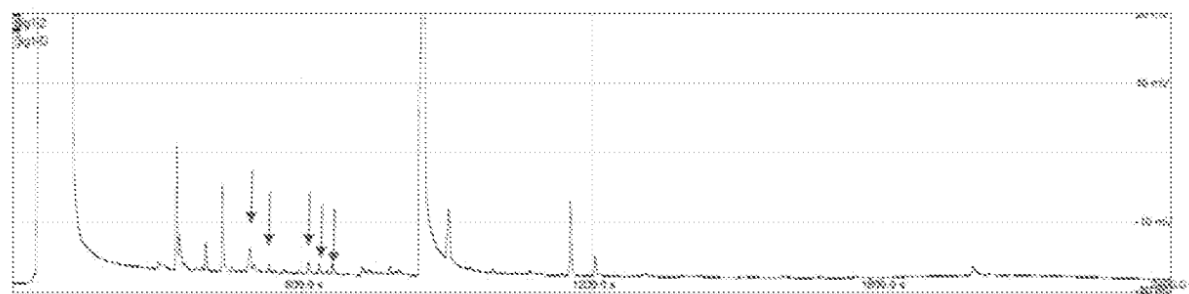
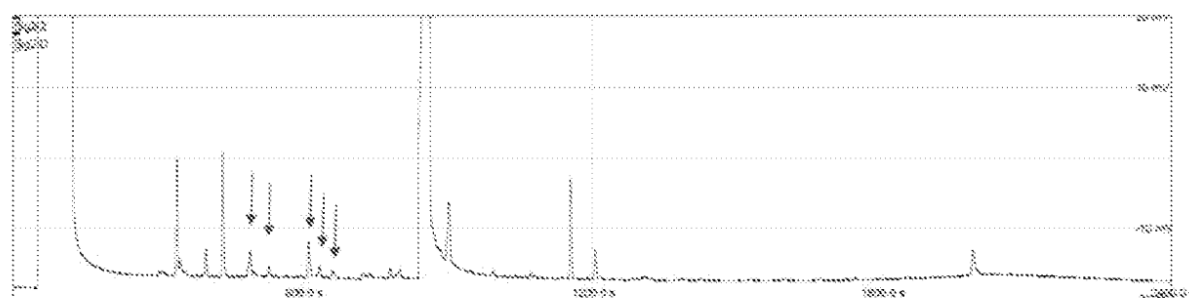


Figura 10

MBI 600



ABU 288



Control

