

Tesis para optar al título de Doctora en Biología Molecular y Biotecnología de la
Universidad Nacional de San Martín (UNSAM)

**“Aislamiento y caracterización de endofitos y
epifitos de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.).
Estudio de su potencial como promotores del
crecimiento vegetal y de respuesta de defensa”**

Lic. Mailén Hirsch

Directora: María Marina

Co-directora: Natalia M. Villarreal

Instituto Tecnológico de Chascomús

Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de la Maduración de frutos



Mailén Hirsch



María Marina



Natalia M. Villarreal

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a todas aquellas personas que hicieron posible que hoy este llegando al final de esta etapa, pero especialmente a mis directoras María y Naty, ya que esto no hubiera sido posible sin ellas. No sólo me guiaron, enseñaron y bancaron (y sabemos que esto último no es nada fácil), sino que confiaron en mi y me permitieron formar parte de este maravilloso equipo. Muchas gracias por esto y por todos los momentos compartidos!

Agradezco al CONICET por brindarme la beca que me permitió llevar adelante mi formación. Al INTECH y a todas las personas que lo conforman, que con compromiso y dedicación permiten que la ciencia siga en pie y avanzando.

Gracias a todas las personas que conocí durante este camino. A los compañeros/as de laboratorio que tuve durante estos años: Silvi, Pablo y Romi. A José Luis y Bety, que estuvieron ahí para ayudarme y darme mucha charla. A los chicos de la UB1, que me tuvieron que aguantar más de lo que hubieran querido. Gracias! De todos aprendí y me llevo algo valioso. A mi grupo de Intecheras, ojalá hubieran estado desde el principio, no imaginan cuánto me hubieran ayudado. Pero hoy están acá y eso es lo importante. Les agradezco haberme acompañado en esta última etapa. Son geniales!

Ahora yéndome un poquito del INTECH, pero no tanto en realidad, quiero agradecerle a Leo. Mi compañero, mi amigo, mi persona favorita. Ya hicimos la licenciatura y el doctorado juntos, y seguimos. Ya está, si no nos matamos entre nosotros hasta ahora, no lo hacemos más. Gracias por el apoyo durante tantos años! Se que se vienen muchas aventuras juntos, te amo!

A mis amigas de toda la vida, gracias por estar siempre presentes y apoyarme. Son muy importantes para mi.

Por último, quiero cerrar esta etapa agradeciéndole a mi familia. Agradezco a mi mamá, a mis hermanos Ofo y Nico, y a mis hermosos sobrinos Basti, Milo y Ciro. Pero quiero hacer un agradecimiento especial para vos viejo. Más que agradecerle, quiero decirte que esto es por vos y para vos. Estoy segura que, de alguna manera, me acompañaste todos estos años. Aún así, te extraño muchísimo y me hubiese encantado que estuvieses acá. Gracias por todo ♥

PUBLICACIONES

- Publicaciones directamente vinculadas con el trabajo de Tesis

Revistas internacionales con referato:

“Isolation of beneficial bacteria from strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch). Potentialities for fungal disease control and plant growth promotion”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Lara Migueliz, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2023. *Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s10725-023-00989-z>.

Congresos:

“Caracterización de parámetros de calidad de frutos de frutilla provenientes de plantas inoculadas con *Bacillus velezensis* HIII11”. Mailén Hirsch, G. Romina Bustos, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2024. I Congreso Iberoamericano de Alimentos 4.0.

“Evaluación de *Bacillus velezensis* HIII11 como agente de control biológico y promotor del crecimiento vegetal en *Arabidopsis thaliana*”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Beatriz Wyss, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2023. I Jornada Científica INTECH.

“Evaluation of the strawberry epiphyte *Bacillus velezensis* HIII11 as a biological control agent of fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana*”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Lara Migueliz, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2023. XVIII Congreso de la Sociedad Argentina de Microbiología General.

“Influence of the epiphyte *Bacillus velezensis* HIII11 isolated from strawberry on the metabolism of *Arabidopsis thaliana* cell wall”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Beatriz Wyss, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2023. XXXIV Argentinian Meeting of Plant Physiology, RAFV Conference.

“Bacterial isolates from strawberry plants (*Fragaria x ananassa*, Duch.): evaluation of important traits for biological control and plant growth promotion”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2022. XVIII Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE.

“Evaluation of bacterial isolates from strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) as biological control agents of *Botrytis cinerea*”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2021. SAIB – SAMIGE Joint Meeting 2021.

“Aislamiento de endofitos y epifitos de plantas de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.), evaluación de su efecto protector contra *Botrytis cinerea*”. Mailén Hirsch, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2020. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina.

- **Publicaciones no vinculadas directamente con el trabajo de Tesis**

Revistas nacionales e internacionales con referato:

“Biochemical and molecular traits underlying the quality preservation and defence enhancement by heat treatment in harvest-ripe strawberries”. Silvia E. Langer¹, Mailén Hirsch¹, Pablo L. Burges, Gustavo A. Martínez, Pedro M. Civello, María Marina, Natalia M. Villarreal. 2024. *Scientia Horticulturae*. 333, 113287. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113287>.

“Caracterización fisicoquímica y microbiológica del biopreparado Supermagro. Efectos de su aplicación precosecha en parámetros de calidad de frutilla”. Pablo L. Burges, Nazarena Nadler, Mailén Hirsch, Maximiliano Bongiorno, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2023. Trabajo complete publicado en un número de la Revista Investigación Joven, 10(2), 229-233. ISSN:2314-3991. <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/16269>.

“Expression profiling of endo-xylanases during ripening of strawberry cultivars with contrasting softening rates. Influence of postharvest and hormonal treatments”. Mailén Hirsch¹, Silvia E. Langer¹, María Marina, Hernán G. Rosli, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez, Natalia M. Villarreal. 2021. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101, 3676-3684. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10997>.

¹Ambos autores contribuyeron de igual manera.

Congresos:

“Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de tres bioinsumos agroecológicos: Purín de Ortiga (PO), Microorganismos Eficientes Nativos (MEN) y Supermagro (SM)”. G. Romina Bustos, Pablo L. Burges, Mailén Hirsch, Mariana Paez, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2024. I Congreso Provincial de Agroecología.

“Los frutos del Tala (*Celtis ehrenbergiana*): estudio de los principales atributos de calidad de una especie autóctona de Argentina”. G. Romina Bustos, Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, María Marina, Natalia M. Villarreal. 2024. I Congreso Iberoamericano de Alimentos 4.0.

“Caracterización de aislamientos bacterianos del biopreparado agroecológico purín de ortiga”. Pablo L. Burges, Mailén Hirsch, Beatriz Wyss, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2023. I Jornada Científica INTECH.

“Caracterización de parámetros de calidad de los frutos de uva de campo (*Salpichroa organifolia*) durante la maduración y bajo tratamiento postcosecha con CaCl_2 ”. Mariana Paez, Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, María Marina, Natalia M. Villarreal. 2023. IV Congreso de Biología y Tecnología Postcosecha.

“Caracterización fisicoquímica y microbiológica del biopreparado Supermagro. Efectos de su aplicación precosecha en parámetros de calidad de frutilla”. Pablo L. Burges, Nazarena Nadler, Mailén Hirsch, Maximiliano Bongiorno, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2023. IV Congreso de Biología y Tecnología Postcosecha.

“Efecto del tratamiento térmico en la expresión de genes de defensa durante la postcosecha de frutilla”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Silvia E. Langer, Gustavo A. Martínez, Pedro M. Civello, María Marina, Natalia M. Villarreal. 2023. IV Congreso de Biología y Tecnología Postcosecha.

“Characterization of the agroecological bio-input ‘Native Efficient Microorganisms’ and evaluation of wheat germination”. Pablo L. Burges, Mailén Hirsch, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2022. XVIII Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE.

“Biofertilizantes: una alternativa ecoamigable para la sostenibilidad del medio ambiente”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2022. II Jornadas Binacionales Argentina Uruguay. III Congreso Nacional 2022, Ciencias básicas para el desarrollo sustentable.

“Cambios en la pared celular de la Uva de campo durante la maduración del fruto y bajo tratamientos postcosecha”. Natalia M. Villarreal, María Marina, Pablo L. Burges, Mailén Hirsch, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez. 2021. III Congreso Argentino de Biología y Tecnología Postcosecha.

“Endoxilanasas en frutilla: estudio de los perfiles de expresión durante la maduración, tratamientos hormonales y postcosecha”. Mailén Hirsch, Silvia E. Langer, María Marina,

Hernán G. Rosli, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez, Natalia M. Villarreal. 2020. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina.

Trabajos en Eventos Científico-Tecnológicos no publicados:

“Biofertilizers: an agroecological alternative for production”. Mailén Hirsch, Pablo L. Burges, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2022. VI Congresso Internacional de Ciencia, Tecnologia e Inovacao, XXI Encontro Annual e Iniciacao Cientifica da UNIPAR.

“Biofertilizers: an agroecological alternative for production”. Pablo L. Burges, Mailén Hirsch, Natalia M. Villarreal, María Marina. 2022. III Congresso Internacional de Productos Naturais.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
1. ABSTRACT.....	11
2. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	14
2.1. Interacción planta-microorganismos. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.	14
2.2. Mecanismos directos e indirectos de acción de PGPBs.....	14
2.2.1. Síntesis de sideróforos.....	15
2.2.2. Producción de fitohormonas.	16
2.2.3. Movilidad, colonización y formación de <i>biofilms</i>	19
2.2.4. Competencia por espacio y nutrientes con fitopatógenos.....	20
2.2.5. Antibiosis.....	21
2.2.6. Síntesis de enzimas hidrolíticas.	23
2.2.7. Inducción de resistencia en las plantas.	24
2.2.7.1. Modulación de la expresión de genes de defensa en la planta.....	25
2.2.7.2. Síntesis de metabolitos secundarios en la planta.....	25
2.2.7.3. Deposición de calosa.....	26
2.3. Patógenos en plantas.....	27
2.3.1. <i>Botrytis cinerea</i>	28
2.3.2. <i>Rhizopus stolonifer</i>	28
2.4. Control biológico. Avances en el control biológico de fitopatógenos en <i>Arabidopsis</i> y frutos carnosos.....	30
2.5. El género <i>Bacillus</i>	32
2.6. Mecanismos de defensa en las plantas.....	33
2.7. Pared celular vegetal. Estructura y composición.	34
2.8. Generalidades de la frutilla.....	36
2.8.1. Características generales del fruto de frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).....	36
2.8.2. Variedades de frutilla.....	37
2.8.3. Maduración de la frutilla.....	38
2.8.4. Principales atributos de calidad de la frutilla.....	40
2.8.5. Metabolismo de la pared celular primaria de frutilla.....	41
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL.....	45
3.1. Hipótesis de trabajo.....	45
3.2. Objetivo general.....	45
4. CAPÍTULO I: Aislamiento de bacterias epifitas y endofitas de hojas y frutos de frutilla. Caracterización, identificación y evaluación de su potencial para el control biológico y la promoción del crecimiento vegetal.....	46
4.1. INTRODUCCIÓN.....	46

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	47
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
4.3.1. Recolección de material y aislamiento de bacterias epifitas y endofitas a partir de hojas y frutos de frutilla.	47
4.3.2. Antagonismo in vitro de los aislamientos bacterianos hacia <i>Botrytis cinerea</i>	48
4.3.2.1. Antagonismo mediante compuestos difusibles o co-cultivo.	48
4.3.2.2. Antagonismo mediante la producción de compuestos volátiles orgánicos.	48
4.3.3. Extracción de ADN genómico.	48
4.3.4. BOX-PCR.....	49
4.3.5. Formación de <i>biofilms</i>	49
4.3.6. Evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas.....	50
4.3.6.1. Celulasas.	50
4.3.6.2. Proteasas.....	50
4.3.6.3. Lipasas.....	51
4.3.7. Evaluación de movilidad tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i>	51
4.3.8. Producción de sideróforos.....	51
4.3.9. Evaluación de la promoción del crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
4.3.10. Colonización o crecimiento de los aislamientos bacterianos seleccionados en plántulas de <i>A. thaliana</i>	52
4.3.11. Evaluación de la promoción del crecimiento de plantas de <i>A. thaliana</i>	53
4.3.12. Producción de fitohormonas por los aislamientos bacterianos.....	53
4.3.13. Inhibición del crecimiento in vitro de <i>Rhizopus stolonifer</i>	54
4.3.14. Identificación de los aislamientos bacterianos.....	54
4.3.14.1. Amplificación del gen del ARNr 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	54
4.3.14.2. Secuenciación de los fragmentos amplificados.	54
4.3.14.3. Análisis filogenético.	55
4.3.15. Extracción de esporas de <i>B. cinerea</i>	55
4.3.16. Infección con <i>B. cinerea</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> previamente inoculadas con los aislamientos bacterianos seleccionados.	55
4.3.17. Análisis estadístico.....	56
4.4. RESULTADOS	56
4.4.1. Obtención de aislamientos bacterianos a partir de plantas de frutilla.	56
4.4.2. Inhibición del crecimiento in vitro de <i>B. cinerea</i> por los aislamientos bacterianos.....	58
4.4.3. BOX-PCR.....	60
4.4.4. Formación de <i>biofilms</i>	61
4.4.5. Producción de enzimas hidrolíticas.	61
4.4.6. Movilidad tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i>	63

4.4.7. Producción de sideróforos.....	64
4.4.8. Evaluación de la promoción del crecimiento en plántulas de <i>A. thaliana</i>	64
4.4.9. Colonización o crecimiento de las bacterias en plántulas de <i>A. thaliana</i>	66
4.4.10. Evaluación de la promoción del crecimiento en plantas adultas de <i>A. thaliana</i>	67
4.4.11. Producción de fitohormonas.....	69
4.4.12. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> del fitopatógeno <i>Rhizopus stolonifer</i> por los aislamientos bacterianos seleccionados.....	70
4.4.13. Identificación de los aislamientos bacterianos mediante secuenciación y análisis filogenético del gen del ARNr 16S.....	71
4.4.14. Evaluación de la infección con <i>B. cinerea</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i> previamente inoculadas con los aislamientos bacterianos.....	72
4.5. DISCUSIÓN.....	74
4.6. CONCLUSIONES.....	79
5. CAPÍTULO II: Evaluación de respuestas de defensa y cambios en el metabolismo de la pared celular primaria de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculadas con el aislamiento bacteriano HIII11.....	80
5.1. INTRODUCCIÓN.....	80
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	81
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
5.3.1. Identificación de HIII11 mediante secuenciación de los genes <i>recA</i> y <i>recN</i>	81
5.3.2. Análisis filogenético.....	81
5.3.3. Condiciones de cultivo e inoculación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con HIII11....	82
5.3.4. Evaluación de la infección con <i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> previamente inoculadas con HIII11.....	82
5.3.5. Pérdida de electrolitos en hojas de <i>A. thaliana</i>	82
5.3.6. Cuantificación de HIII11 en hojas y raíces de plantas adultas de <i>Arabidopsis</i>	83
5.3.7. Evaluación de respuestas de defensa en <i>A. thaliana</i> Col-0. Expresión relativa de genes.....	83
5.3.7.1. Extracción de ARN total de <i>A. thaliana</i> . Cuantificación y verificación de la integridad.....	84
5.3.7.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	84
5.3.7.3. Control de ADNc mediante PCR.....	84
5.3.7.4. Expresión relativa de genes de defensa mediante PCR en tiempo real.....	85
5.3.8. Determinación del contenido de antocianinas en <i>A. thaliana</i>	86
5.3.9. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en <i>A. thaliana</i>	86
5.3.10. Deposición de calosa.....	87
5.3.11. Evaluación de cambios en el metabolismo de la pared celular vegetal de <i>Arabidopsis</i> en plantas inoculadas con HIII11.....	87

5.3.11.1. Aislamiento de Residuos Insolubles en Alcohol (RIAs).	87
5.3.11.2. Extracción y cuantificación del contenido de almidón de los RIAs obtenidos.	87
5.3.11.3. Obtención de paredes celulares sin almidón.....	88
5.3.11.4. Evaluación del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i> en paredes celulares aisladas de plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con HIII11.....	88
5.3.11.5. Contenido de polisacáridos de la pared celular.	89
5.3.11.5.1. Extracción de pectinas totales. Determinación del contenido de ácido galacturónico y azúcares neutros.....	89
5.3.11.5.2. Extracción y cuantificación de hemicelulosas y celulosa.....	89
5.3.11.5.3. Expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular de <i>Arabidopsis</i>	90
5.4. RESULTADOS	91
5.4.1. Identificación de HIII11 mediante la secuenciación de los genes <i>recA</i> y <i>recN</i>	91
5.4.2. Evaluación de la infección causada por <i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> previamente inoculada con <i>Bacillus velezensis</i> HIII11.	92
5.4.3. Efecto de la inoculación con HIII11 en el porcentaje de pérdida de electrolitos de <i>A. thaliana</i> frente a la infección con <i>B. cinerea</i>	93
5.4.4. Evaluación de la respuesta transcripcional de genes relacionados con la defensa durante la infección con <i>B. cinerea</i> en <i>A. thaliana</i>	95
5.4.5. Contenido de metabolitos secundarios en plantas de <i>Arabidopsis</i> inoculadas con <i>B. velezensis</i> HIII11.	96
5.4.6. Evaluación de la deposición de calosa.....	97
5.4.7. Efecto sobre el metabolismo de la pared celular de <i>A. thaliana</i> provocados por la inoculación con <i>B. velezensis</i> HIII11.	98
5.4.7.1. Determinación del contenido de pared celular y de almidón.	98
5.4.7.2. Evaluación del crecimiento <i>in vitro</i> de fitopatógenos fúngicos en medio sólido conteniendo como única fuente de nutrientes paredes celulares aisladas.	99
5.4.7.3. Metabolismo de cadenas principales de pectinas.....	100
5.4.7.4. Metabolismo de cadenas laterales.	101
5.4.7.5. Metabolismo de hemicelulosas y celulosa.	102
5.5. DISCUSIÓN.....	103
5.6. CONCLUSIONES	110
6. CAPÍTULO III: Efecto de la inoculación de plantas de frutilla con <i>Bacillus velezensis</i> HIII11 en los atributos de calidad y el metabolismo de la pared celular primaria de frutos cosechados en estadio apto para consumo.	111
6.1. INTRODUCCIÓN	111
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	112
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	112

6.3.1. Plantas de frutilla y condiciones de cultivo.....	112
6.3.2. Inoculación de plantas de frutilla y recolección de material para estudio.....	113
6.3.3. Determinación de atributos de calidad de los frutos.....	113
6.3.3.1. pH y acidez titulable.....	113
6.3.3.2. Sólidos solubles totales.....	113
6.3.3.3. Azúcares totales.....	114
6.3.3.4. Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides.....	114
6.3.4. Estudio del metabolismo de la pared celular de frutos de frutilla.....	115
6.3.4.1. Aislamiento y cuantificación de RIAs.....	115
6.3.4.2. Hidratación <i>in vitro</i> de las paredes celulares aisladas.....	115
6.3.4.3. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i> en las paredes celulares aisladas de frutos.....	115
6.3.4.4. Cuantificación de los componentes de la pared celular.....	115
6.3.4.4.1. Extracción de pectinas totales. Determinación del contenido de ácido galacturónico y azúcares neutros.....	115
6.3.4.4.2. Contenido de las fracciones de pectinas, hemicelulosas y celulosa.....	116
6.3.4.5. Evaluación de la transcripción de genes implicados en el metabolismo de la pared celular mediante PCR en tiempo real.....	116
6.3.4.5.1. Extracción de ARN total de frutilla.....	116
6.3.4.5.2. Cuantificación y verificación de la integridad del ARN total.....	118
6.3.4.5.3. Síntesis de ADNc y PCR control.....	118
6.3.4.5.4. Análisis de la expresión relativa mediante PCR en Tiempo Real.....	118
6.3.5. Infección de hojas de frutilla con <i>B. cinerea</i>	119
6.3.6. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de frutilla.....	120
6.3.7. Estudio de la pared celular de hojas de frutilla.....	120
6.3.7.1. Aislamiento y cuantificación de paredes celulares.....	120
6.3.7.2. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> en las paredes celulares aisladas de hojas.....	120
6.3.8. Preparación de extractos libres de células de HIII11. Evaluación de la inhibición <i>in vitro</i> de fitopatógenos fúngicos utilizando los extractos libres de células.....	120
6.3.9. Detección por PCR de genes relacionados con la biosíntesis de compuestos antimicrobianos en el genoma de <i>B. velezensis</i> HIII11.....	121
6.3.10. Evaluación de extractos libres de células en la postcosecha de frutilla.....	122
6.3.11. Análisis estadístico.....	123
6.4. RESULTADOS.....	123
6.4.1. Medida de pH, acidez titulable, sólidos solubles y azúcares totales en frutillas maduras.....	123
6.4.2. Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides en frutillas maduras.....	124
6.4.3. Metabolismo de la pared celular de frutilla.....	125

6.4.3.1. Contenido de pared celular.	125
6.4.3.2. Hidratación <i>in vitro</i> de la pared celular.	126
6.4.3.3. Crecimiento <i>in vitro</i> de fitopatógenos en las paredes celulares aisladas.	126
6.4.3.4. Metabolismo de pectinas.	127
6.4.3.5. Metabolismo de cadenas laterales de pectinas.	130
6.4.3.6. Metabolismo de hemicelulosas y celulosa.	131
6.4.4. Evaluación de la infección con <i>B. cinerea</i> en hojas de frutilla.	132
6.4.4.1. Compuestos fenólicos en hojas de frutilla.	133
6.4.5. Pared celular de hojas de frutilla.	134
6.4.6. Evaluación de la capacidad de los sobrenadantes libres de células de HIII11 para inhibir el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> y <i>R. stolonifer</i>	135
6.4.7. Presencia de genes implicados en la biosíntesis de compuestos antimicrobianos en el genoma de HIII11.	136
6.4.8. Efecto de la aplicación de sobrenadantes libres de células en la postcosecha de frutilla.	137
6.5. DISCUSIÓN	139
6.6. CONCLUSIONES	145
7. CONCLUSIÓN GENERAL	146
8. REFERENCIAS:	147

1. RESUMEN

En la Naturaleza existe una gran diversidad de bacterias que establecen interacciones beneficiosas con las plantas, desempeñando un papel relevante a través de la promoción de su crecimiento y la protección frente a diversos estreses bióticos y abióticos. Estas bacterias son capaces de mejorar la disponibilidad de nutrientes esenciales, sintetizar fitohormonas y modular las respuestas de defensa de las plantas. Además, muchas de ellas actúan como agentes de control biológico, inhibiendo el desarrollo de fitopatógenos mediante la competencia por espacio y nutrientes, la producción de metabolitos antimicrobianos, la inducción de resistencia sistémica en la planta, así como el refuerzo de la pared celular vegetal, entre los mecanismos conocidos en la actualidad.

La frutilla comercial (*Fragaria x ananassa* Duch.) es un cultivo muy apreciado a nivel mundial no sólo por las características organolépticas de sus frutos, sino también por su importante aporte nutricional y propiedades nutraceuticas. Dada su textura delicada y elevada velocidad de ablandamiento, la frutilla es un cultivo altamente susceptible al ataque por diversos patógenos fúngicos, como *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, por lo que el uso de fungicidas de síntesis química ha sido la estrategia mayormente utilizada para el control de enfermedades fúngicas que pueden afectar también al resto de la planta. Es así que, la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal podría no sólo mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas de frutilla, sino que también representa una alternativa interesante al uso de agroquímicos.

El presente trabajo de Tesis, tuvo como objetivo general estudiar los posibles mecanismos de acción mediante los cuales bacterias beneficiosas son capaces de promover el crecimiento vegetal, como así también el control biológico de patógenos fúngicos en plantas y frutos de frutilla, y en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para esto, se realizó el aislamiento de bacterias tanto endofitas como epifitas a partir de hojas y frutos de plantas de frutilla, obteniéndose un total 103 aislamientos cultivables. La evaluación y caracterización de los mismos permitió seleccionar aquellos que reunían el mayor número de características deseables. Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de los aislamientos de inhibir el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* mediante el enfrentamiento, tanto directo como indirecto (mediante compuestos volátiles). Los resultados obtenidos, junto con el análisis mediante BOX-PCR, permitieron seleccionar 47 aislamientos no redundantes capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*. A partir de esta selección, se evaluó la formación de *biofilms* y la síntesis de enzimas hidrolíticas (celulasas, proteasas y lipasas). Estos resultaron permitieron acotar el grupo a un total de 12 aislamientos que formaban *biofilms* y eran capaces de sintetizar al menos una de las enzimas evaluadas. Con la finalidad de determinar otros posibles mecanismos de acción de las bacterias, se realizaron evaluaciones tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando el organismo modelo *A. thaliana*. Como parte de los análisis *in vitro*, se determinó la motilidad de cada uno de ellos evaluando *swimming* y *swarming*, la producción de sideróforos, síntesis de fitohormonas en medio mínimo y, además, la inhibición del

crecimiento del fitopatógeno *R. stolonifer*. A su vez, se evaluó la capacidad de dichos aislamientos de promover el crecimiento de plántulas y plantas adultas de *A. thaliana* y controlar la infección por el fitopatógeno *B. cinerea* en las mismas. Considerando todos los resultados obtenidos, se decidió seleccionar al aislamiento HIII11 como potencial agente de control biológico y promotor del crecimiento vegetal para continuar con los estudios del presente trabajo de Tesis. La secuenciación y posterior análisis filogenético del gen del ARNr 16S y de los genes *recA* y *recN*, permitió identificar a HIII11 como *Bacillus velezensis*.

A partir de esta selección, se estudió el efecto de la inoculación con *B. velezensis* HIII11 en plantas de *A. thaliana* en las respuestas de la misma hacia el ataque por fitopatógenos necrótrofos, como así también su influencia en el metabolismo de la pared celular primaria de las células vegetales. Como resultados relevantes, las plantas previamente inoculadas con la bacteria presentaron una mejor respuesta ante la infección provocada por *B. cinerea* y *R. stolonifer*, mostrando áreas necróticas menores y un mejor estado general de las hojas al compararse con las plantas control. Esta respuesta fue acompañada por una menor pérdida de electrolitos por parte de las hojas tratadas con la bacteria, sugiriendo una mayor integridad de las membranas celulares. En cuanto a la evaluación de posibles mecanismos de defensa activados en estas plantas, se observó un aumento en la expresión de los genes *AtPAL1* y *AtPAL2* (Fenilalanina amonio liasa 1 y 2), *AtPDF1.2* (Defensina 1.2) y *AtPAD3* (Citocromo P450 monooxigenasa 3) tras la inoculación con *B. cinerea* en las plantas tratadas con HIII11 respecto al control. Además, el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos, los cuales están implicados en diversas respuestas de defensa, fue mayor en las plantas inoculadas con la bacteria. En lo que respecta a modificaciones en el metabolismo de la pared celular vegetal, la inoculación con HIII11 dio lugar a plantas de *A. thaliana* con mayor contenido total de pared celular respecto al control. El menor crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer* cuando se les suministraron estas paredes como única fuente de nutrientes sugiere un menor acceso de estos fitopatógenos a las mismas. En cuanto al contenido de las principales fracciones poliméricas de la pared, si bien no hubo un cambio en el contenido de ácido galacturónico en pectinas totales, la inoculación con HIII11 incrementó el contenido de cadenas laterales de pectinas y de las fracciones de hemicelulosas y celulosa. Estos resultados fueron acompañados con el análisis de expresión mediante PCR en Tiempo Real de genes implicados en el metabolismo de estos polímeros. La mayor expresión relativa del gen *AtPME3* (Pectin metilesterasa 3) en las plantas inoculadas con HIII11 y el hecho de que *AtPG1* (Poligalacturonasa 1) no se vio alterada, sugeriría una mayor estabilización de los poliurónidos demetilados de la pared a través de la formación puentes de Ca^{2+} , respecto a los controles. En plantas inoculadas con HIII11, se observó además una reducción significativa de la expresión de los genes *AtAra1* (α -L-arabinofuranosidasa 1) y *At β Gal* (β -galactosidasa), implicados en la degradación de cadenas laterales, y de los genes *AtExp5* (Expansina 5) y *AtXL* (Xilanasa), que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de hemicelulosas. En conjunto,

estos resultados revelan una posible influencia de HIII11 en el contenido e integridad de los polímeros de la pared celular de *A. thaliana*.

En paralelo a los estudios en *A. thaliana*, se analizó el efecto de la inoculación con *B. velezensis* HIII11 en plantas de frutilla. Se evaluaron parámetros de calidad de frutos maduros y la composición de la pared celular, su integridad y la respuesta transcripcional de genes de pared. Los parámetros de calidad relacionados con el gusto de la frutilla, como pH, acidez titulable, sólidos solubles totales y azúcares totales, no se vieron modificados en los frutos provenientes de plantas inoculadas con HIII11 en comparación con los frutos control. En cuanto al contenido de antocianinas, pigmentos hidrosolubles que le confieren el color característico de las frutillas maduras, no se encontraron diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, los frutos de plantas inoculadas con la bacteria presentaron un contenido superior de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales, además de estar implicados en respuestas de defensa, les confieren a los frutos propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Si bien no hubo diferencias en el contenido total de pared celular entre frutos de ambos tratamientos, las paredes aisladas de frutos inoculados con HIII11 presentaron una menor hidratación *in vitro* que las provenientes de frutos control, sugiriendo una menor porosidad de las mismas. Cuando se analizó el contenido de las distintas fracciones pécticas, no se encontraron diferencias en el contenido de ácido galacturónico en pectinas totales ni tampoco en las fracciones correspondientes a PSA, PSE y PSH. Notablemente, al igual que en las plantas de *A. thaliana*, el contenido de cadenas laterales fue mayor en los frutos de plantas inoculadas con HIII11 respecto al control. A la vez, en estos frutos se observó una menor expresión de los genes relacionados con la degradación de dichas cadenas, *FaAra1* (α -L-arabinofuranosidasa 1) y *Fa β Gal4* (β -galactosidasa 4). En cuanto a las fracciones de hemicelulosas y celulosa, no se observaron cambios entre los tratamientos, si bien los resultados de expresión relativa mostraron una disminución en la expresión de *FaExp5* (Expansina 5) en los frutos inoculados con HIII11 y una regulación positiva de *FaXTH2* (Xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa 2), con la posibilidad de que la enzima codificada por este último gen esté actuando como endotransglicosilasa contribuyendo a la integridad de la pared celular.

Por otra parte, se evaluó la infección con *B. cinerea* en las hojas de plantas de frutilla obteniéndose como resultado una menor área necrótica en aquellas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 en comparación con las hojas control, indicando un efecto de control biológico de esta bacteria. A su vez, el crecimiento *in vitro* de este fitopatógeno se vio afectado cuando se le suministró como única fuente de nutrientes las paredes celulares aisladas de hojas inoculadas con la bacteria, de manera similar a lo observado en las paredes aisladas de frutos de frutilla y de hojas de *A. thaliana*.

Continuando con la profundización en la caracterización de *B. velezensis* HIII11 como bacteria promotora del crecimiento vegetal y/o agente de control biológico, se identificó en su genoma la presencia de genes que codifican compuestos con actividad antimicrobiana (*srfA*, que

codifica para una surfactina sintetasa, *fenD*, que codifica para una fengicina sintetasa, *bacA*, que codifica para una proteína de biosíntesis de bacilisina, *bymB*, que codifica para bacilomicina L sintetasa B, e *ituD*, que codifica para una iturina A sintetasa D).

Finalmente, en la búsqueda de la posible aplicación de HIII11 en la postcosecha de frutilla como estrategia para la preservación del fruto, se obtuvieron sobrenadantes libres de células. Al testearse *in vitro*, se comprobó la capacidad de los mismos para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* y *R. stolonifer* de manera dosis dependiente. Notablemente, la aplicación postcosecha de dicho sobrenadante libre de células en una concentración del 25% en frutillas maduras logró retrasar la enfermedad causada por *B. cinerea* respecto a los frutos control.

Palabras clave: bacterias promotoras del crecimiento vegetal, control biológico, frutilla, *Arabidopsis thaliana*, *Bacillus velezensis*, pared celular vegetal

1. ABSTRACT

There is a great diversity of bacteria in Nature establishing beneficial interactions with plants, playing a relevant role by promoting their growth and protecting them against various biotic and abiotic stresses. These bacteria might improve the availability of essential nutrients, synthesizing phytohormones and modulating plant defence responses. Furthermore, many of them act as biological control agents, inhibiting the development of phytopathogens through competition for space and nutrients, the production of antimicrobial metabolites, the induction of systemic resistance in the plant, as well as the reinforcement of the plant cell wall, among the currently known mechanisms.

The commercial strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a crop highly appreciated worldwide not only for the organoleptic characteristics of its fruits but also for its nutritional contribution and nutraceutical properties. Given their delicate texture and high softening speed, strawberries are a crop highly susceptible to attack by various fungal pathogens, such as *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*, which is why the use of chemically synthesized fungicides has been the principal strategy to control fungal diseases that can also affect the rest of the plant. Thus, the application of plant growth-promoting bacteria could not only improve the growth and yield of strawberry plants but also represent an alternative to the use of agrochemicals.

The general objective of this Thesis was to study the possible mechanisms of action through which beneficial bacteria promote plant growth, as well as the biological control of fungal pathogens in strawberry plants and fruits and in the model plant *Arabidopsis thaliana*. For this, the isolation of both endophytic and epiphytic bacteria was carried out from leaves and fruits of strawberry plants, obtaining a total of 103 culturable isolates. Their evaluation and characterization made it possible to select those that met the greatest number of desirable characteristics. The ability of the isolates to inhibit the *in vitro* growth of *B. cinerea* through direct- and indirect confrontation was tested. The results obtained, together with the BOX-PCR analysis, allowed us to select 47 non-redundant isolates capable of inhibiting the *in vitro* growth of *B. cinerea*. The formation of biofilms and the synthesis of hydrolytic enzymes (cellulases, proteases and lipases) were evaluated on these isolates. These results allowed us to narrow the group of bacteria to 12 isolates forming biofilms and synthesizing at least one of the enzymes evaluated. To determine other possible mechanisms of bacteria action, both *in vitro* and *in vivo* evaluations were carried out using the model organism *A. thaliana*. As part of the *in vitro* analyses, the motility of each of them was evaluated by swimming and swarming assays, the production of siderophores, synthesis of phytohormones in a minimal medium and, in addition, the inhibition of the growth of the phytopathogen *R. stolonifer*. The ability of these isolates to promote the seedlings- and adult *A. thaliana* plants' growth and to control the *B. cinerea* infection was evaluated. Considering all the results obtained, we decided to select the HIII11 isolate as a potential biological control agent and plant growth promoter to continue with the studies of this Thesis work. Sequencing and

subsequent phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene and the *recA* and *recN* genes allowed HIII11 to be identified as *Bacillus velezensis*.

Based on this selection, the effect of inoculation with *B. velezensis* HIII11 in *A. thaliana* plants on its responses to attack by necrotrophic phytopathogens was studied, as well as its influence on the metabolism of the primary cell wall of plant cells. As relevant results, plants previously inoculated with the bacteria presented a better response to the infection caused by *B. cinerea* and *R. stolonifer*, showing smaller necrotic areas and a better general condition of the leaves when compared to control plants. This response was accompanied by a lower loss of electrolytes by the leaves treated with the bacteria, suggesting greater integrity of the cell membranes. Regarding the evaluation of possible defence mechanisms activated in these plants, an increase in the expression of the genes *AtPAL1* and *AtPAL2* (Phenylalanine ammonium lyase 1 and 2), *AtPDF1.2* (Defensin 1.2) and *AtPAD3* (Cytochrome P450 monooxygenase 3) after inoculation with *B. cinerea* was observed in the plants treated with HIII11 compared to the control.

Furthermore, the content of anthocyanins and phenolic compounds, involved in various defence responses, was higher in plants inoculated with the bacteria. As regards modifications in the plant cell wall metabolism, the inoculation with HIII11 gave rise to *A. thaliana* plants with a higher total cell wall content compared to the control and lower *in vitro* growth of *B. cinerea* and *R. stolonifer* when supplying these walls as the only source of nutrients suggests less access to these phytopathogens. Considering the content of the main polymeric fractions of the wall, although there was no change in the content of galacturonic acid in total pectins, inoculation with HIII11 increased the content of pectin side chains and hemicelluloses and cellulose fractions. The expression analysis by Real-Time PCR of genes involved in the metabolism of these polymers showed a higher relative expression of the *AtPME3* gene (Pectin methyl esterase 3) in plants inoculated with HIII11 and no changes in the *AtPG1* (Polygalacturonase 1) expression suggesting a stabilization of the demethylated polyuronides of the wall through the formation of Ca²⁺ bridges, compared to the controls. In plants inoculated with HIII11, a significant reduction in the expression of the genes *AtAra1* (α -L-arabinofuranosidase 1) and *At β Gal* (β -galactosidase) (involved in the degradation of side chains) and the genes *AtExp5* (Expansin 5) and *AtXL* (Xylanase) (coding enzymes involved in the metabolism of hemicelluloses) was also observed. Overall, these results reveal a possible influence of HIII11 on the content and integrity of *A. thaliana* cell wall polymers.

In addition, the effect of inoculation with *B. velezensis* HIII11 in strawberry plants was analyzed. Quality parameters associated with the taste and the composition and integrity of the cell wall of ripe fruits were studied. The pH, titratable acidity, total soluble solids and total sugars did not change in fruits from plants inoculated with HIII11 compared to control fruits. As regards the content of anthocyanins (water-soluble pigments that give the characteristic colour of ripe strawberries), no differences were found between treatments. However, the fruits of plants inoculated with the bacteria had a higher content of phenolic compounds and flavonoids, which, in addition to being involved in defence responses, give the fruits antioxidant and anti-

inflammatory properties. Although there were no differences in the total cell wall content between fruits from both treatments, the cell walls isolated from fruits inoculated with HIII11 showed a lower *in vitro* swelling, which suggests a lower porosity than controls. Considering the pectic fractions, no differences in the galacturonic acid content in total pectins, PSA, PSE and PSH were found between HIII11 and controls. Notably, as in *A. thaliana* plants, the content of side chains was higher in the fruits of plants inoculated with HIII11 compared to the control. Simultaneously, a lower expression of the genes related to the degradation of these chains, *FaAra1* (α -L-arabinofuranosidase 1) and *Fa β Gal4* (galactosidase 4), was observed in the HIII11 fruits. Regarding the hemicelluloses and cellulose fractions, even though no changes were shown between the treatments, the Real-Time PCR assays showed a decrease in the expression of *FaExp5* (Expansin 5) in the fruits inoculated with HIII11 and positive regulation of *FaXTH2* (Xyloglucan endo-transglycosidase/hydrolase 2), with the possibility that the enzyme encoded by this last gene is acting as an endo-transglycosylase contributing to the integrity of the cell wall.

Deepening the characterization of *B. velezensis* HIII11 as a plant growth-promoting bacteria and/or biological control agent, the presence of genes that encode compounds with antimicrobial activity (*urfA*, which encodes a surfactin synthetase, *fenD*, which encodes a fengycin synthetase, *bacA*, which encodes a bacilisin biosynthesis protein, *bymB*, which encodes bacillomycin L synthetase B, and *iturD*, which encodes an iturin A synthetase D) was verified.

Finally, in the search for a possible application of HIII11 in strawberry postharvest as a strategy for fruit preservation, cell-free supernatants were obtained. When tested *in vitro*, their ability to inhibit the growth of *B. cinerea* and *R. stolonifer* in a dose-dependent manner was verified. Notably, the postharvest application of the cell-free supernatant at a concentration of 25% in ripe strawberries managed to delay the disease caused by *B. cinerea* compared with controls.

Keywords: Plant growth promoting bacteria, biological control, strawberry, *Arabidopsis thaliana*, *Bacillus velezensis*, plant cell wall

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1. Interacción planta-microorganismos. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Diversos microorganismos tales como bacterias, hongos, y protozoos son capaces de establecer relaciones beneficiosas, patogénicas, o neutrales con la planta hospedadora, pudiendo ocupar diferentes nichos que pueden a su vez estar asociados a diferentes órganos y/o tejidos vegetales. Algunos de ellos, denominados epifitos, son capaces de colonizar y establecerse en la superficie de los distintos órganos de la planta hospedadora. Otros microorganismos poseen la capacidad de colonizar y crecer en el interior de los órganos y tejidos vegetales sin causarle daño, y son conocidos como endofitos. A su vez, existe una población de microorganismos que habitan en el suelo y pueden colonizar la rizosfera de las plantas, es decir la zona que rodea y se encuentra en estrecho contacto con la raíz, como también a la raíz propiamente dicha (Lundberg et al., 2012).

Las interacciones beneficiosas pueden mejorar el crecimiento y la salud de la planta hospedante, suprimir enfermedades causadas por otros microorganismos y aumentar la disponibilidad de nutrientes y su asimilación (Elnahal et al., 2022; Glick, 2015). Si bien hay una amplia variedad de microorganismos, las bacterias son el componente dominante en la microflora de la planta. Aquellas bacterias que interactúan de manera beneficiosa con la planta y poseen la capacidad de promover el crecimiento vegetal se las conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPBs (por su nombre en inglés, *Plant-Growth Promoting Bacteria*). Entre los géneros que pertenecen a esta categoría se incluyen *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, y *Klebsiella* (Soni & Keharia, 2021). Debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal, su potencial como agentes de biocontrol, su rápido crecimiento, fácil manejo y notable capacidad de colonización, estas bacterias son de gran interés para la formulación de inoculantes y su aplicación en la agricultura como biofertilizantes, pesticidas y fitorremediadores (Maitra et al., 2022).

2.2. Mecanismos directos e indirectos de acción de PGPBs.

Las PGPBs pueden afectar al crecimiento y desarrollo de la planta de manera directa o indirecta. La promoción del crecimiento de manera directa se da cuando la bacteria es capaz de facilitarle a la planta la adquisición de nutrientes esenciales y/o modular los niveles de fitohormonas (Santoyo et al., 2016). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden fijar el nitrógeno atmosférico y suministrárselo a la planta; sintetizar sideróforos, los cuales pueden secuestrar y solubilizar hierro a partir del suelo y proveérselo a las células vegetales; modular los niveles hormonales mediante la síntesis de fitohormonas como auxinas, citoquininas, o

giberelinas; solubilizar el fosfato de manera que aumente su disponibilidad para la planta; y sintetizar la enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo) desaminasa, la cual disminuye los niveles de etileno en la planta (Glick, 2015). Por otro lado, de manera indirecta, una PGPB puede promover el crecimiento de la planta hospedadora reduciendo el impacto negativo de diferentes patógenos utilizando distintas estrategias de control biológico. Esto puede ser mediante la síntesis de antibióticos y distintos compuestos antimicrobianos, síntesis de enzimas hidrolíticas, compitiendo por espacio y nutrientes con el fitopatógeno, e incluso, induciendo respuestas de defensa en la planta hospedadora (Olanrewaju et al., 2017). Los microorganismos capaces de inhibir o retrasar el desarrollo de enfermedades en plantas se conocen como agentes de control biológico o BCAs (del inglés, *Biological Control Agents*), tema que se abordará en secciones posteriores. En la **Figura 2.1** se muestran los principales mecanismos directos e indirectos vinculados con la promoción del crecimiento vegetal. En las siguientes secciones, se detallarán sólo aquellos relevantes para este trabajo de Tesis.

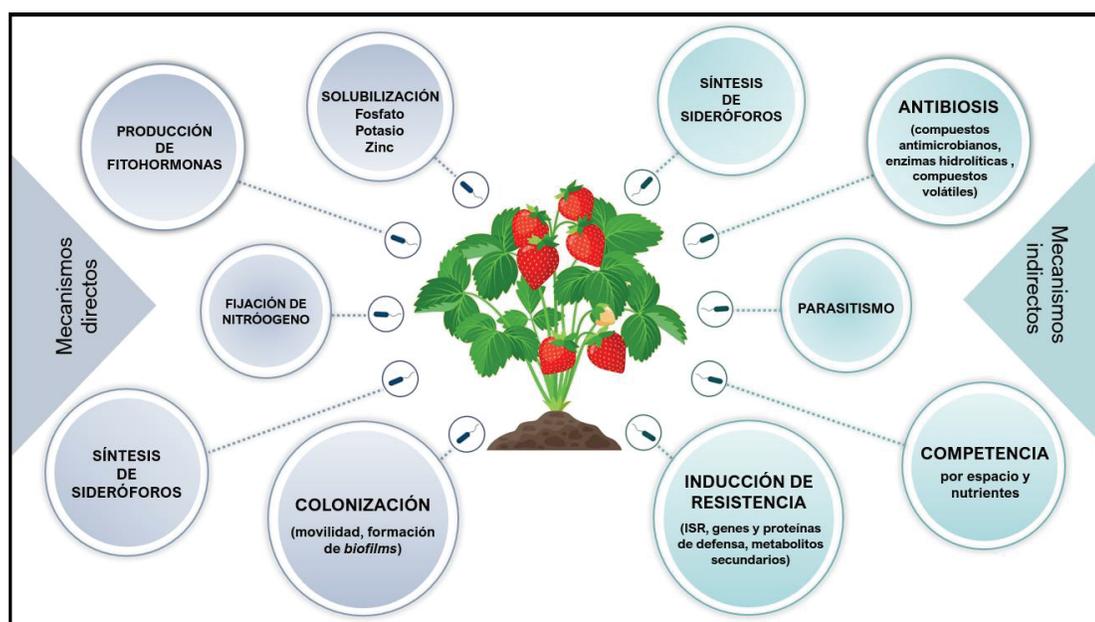


Figura 2.1. Mecanismos directos e indirectos de las PGPBs en la promoción del crecimiento vegetal. En la figura se detallan algunas de las múltiples estrategias que utilizan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal para favorecer el desarrollo de las plantas.

2.2.1. Síntesis de sideróforos.

El hierro (Fe) es un micronutriente requerido en gran cantidad por las plantas. Participa en la biosíntesis de clorofila, reacciones redox y muchas otras actividades fisiológicas importantes (Briat et al., 1995; Liang, 2022). Este nutriente puede encontrarse en dos estados de oxidación, Fe^{3+} o férrico (estado oxidado), y Fe^{2+} o ferroso (estado reducido). Si bien el Fe es abundante en el suelo, no siempre se encuentra fácilmente disponible para las plantas debido a su baja

solubilidad, ya que, en muchos ambientes naturales con condiciones aeróbicas y pH neutro o ligeramente alcalino el Fe predomina en estado férrico, su forma menos soluble. Es así, que las plantas han desarrollado mecanismos que controlan la absorción, utilización y almacenamiento del Fe y principalmente, mecanismos que les permiten responder ante la deficiencia del mismo. Una de estas estrategias es un mecanismo basado en la reducción que involucra la acidificación de la rizosfera mediante la liberación de protones desde la raíz, la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por una reductasa localizada en la membrana, y la toma de Fe^{2+} por un transportador de alta afinidad (Liang, 2022). Otra estrategia se basa en mecanismos de quelación, principalmente presente en gramíneas. La planta libera fitosideróforos desde la raíz para solubilizar y quelar el Fe^{3+} en el suelo (Liang, 2022).

Más allá de los mecanismos desarrollados por las plantas para utilizar el Fe, existen indicios acerca de la importancia de las comunidades microbianas del suelo en la captura y solubilización de Fe en ambientes limitados de este metal. Las PGPBs pueden sintetizar sideróforos, que son moléculas orgánicas de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro, incluso mayor que la de los sideróforos producidos por las plantas (Novo et al., 2018). Los sideróforos secretados por microorganismos promueven la conversión de Fe^{3+} a iones Fe^{2+} , aumentando su disponibilidad para la planta (Saha et al., 2016; Timofeeva et al., 2023), y favoreciendo así, su desarrollo y crecimiento. Se han identificado bacterias promotoras del crecimiento vegetal capaces de sintetizar sideróforos como, por ejemplo, *Bacillus cereus* (Sherpa et al., 2021), *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum lipoferum* (Bagmare et al., 2019).

Por otro lado, las bacterias capaces de producir sideróforos utilizan este mecanismo para el control de determinados fitopatógenos, ya que dichas moléculas competirían por el hierro presente en el ambiente, limitando su acceso y, en consecuencia, inhibiendo el crecimiento de los mismos (Kumar et al., 2022; Saha et al., 2016). Sheng et al. (2020) reportaron que *Brevibacillus brevis* GZDF3 no sólo presentaba cualidades importantes relacionadas con el estímulo del crecimiento vegetal, sino que además era capaz de sintetizar grandes cantidades de sideróforos con importante actividad antagonista hacia *Candida albicans*. Por lo tanto, la producción de sideróforos por microorganismos beneficiosos puede estar implicada tanto en la promoción del crecimiento de la planta hospedadora como en el control biológico de diversos fitopatógenos.

2.2.2. Producción de fitohormonas.

Las fitohormonas son moléculas pequeñas esenciales en la regulación del crecimiento de la planta, su desarrollo, reproducción y supervivencia. Actúan como moléculas señal y lo hacen a bajas concentraciones (Zhao et al., 2021). Los diferentes tipos existentes incluyen citoquininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), brasinoesteroides, y etileno (ET). Las plantas disponen naturalmente de estas fitohormonas a través de dos fuentes: la producción endógena por los propios tejidos vegetales, y la producción

exógena asociada a microorganismos, que incluye numerosas bacterias y hongos. Ambas fuentes de fitohormonas ayudan a las plantas a responder a estreses tanto bióticos como abióticos (Orozco-Mosqueda et al., 2023).

Entre las fitohormonas existentes, las citoquininas se encuentran involucradas en procesos como la fotosíntesis y la diferenciación de cloroplastos. También se conoce que promueven la división celular, modulan la germinación de la semilla, la dominancia apical, el desarrollo de flores y frutos, e inhiben la senescencia en algunos órganos de la planta, especialmente en hojas. Dentro del género *Pseudomonas* se ha encontrado que las citoquininas producidas por la cepa *P. fluorescens* G20-18 promueven el crecimiento de la planta de tomate y aumentan su tolerancia a estrés por sequía (Mekureyaw et al., 2022).

El ácido 3-indolacético (AIA) es la auxina natural más abundante y ampliamente distribuida en las plantas, y es una hormona importante en la regulación de procesos vinculados al crecimiento y desarrollo vegetal, está implicada en procesos de división celular, elongación y diferenciación de la raíz, dominancia apical, floración, maduración de frutos y senescencia (Baca & Elmerich, 2003; Lee & Cho, 2013). Su biosíntesis se da a partir del precursor triptófano (Trp) por múltiples vías enzimáticas, aunque también puede ser sintetizada a través de vías independientes de Trp, especialmente en plantas. La producción de AIA por bacterias beneficiosas ha sido asociada principalmente con la promoción del crecimiento vegetal y se han reportado varios géneros bacterianos que poseen esta capacidad, como *Bacillus*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, entre otros. Tales son los casos de la bacteria *Pseudomonas putida* GR12-2 productora de AIA, que estimula el desarrollo del sistema radicular y promueve el crecimiento de plantas de frijol mungo (*Vigna radiata*) (Patten & Glick, 2002), o la cepa de *Bacillus* sp. LZR216 que, mediante la síntesis de auxinas, modifica la arquitectura de la raíz y estimula el crecimiento de plántulas de *A. thaliana* (Wang et al., 2015). Estas modificaciones, que incluyen el estímulo del crecimiento de raíces laterales y adventicias, mejoran la eficiencia de la toma de nutrientes por la planta y, además, promueve la liberación de exudados por la raíz, modulando de esta manera las asociaciones de la planta con microorganismos (de Andrade et al., 2023).

Se conoce que el ácido abscísico juega un papel importante en las respuestas a estrés y adaptación de las plantas, y aplicaciones exógenas de esta fitohormona en diferentes cultivos puede mejorar la tolerancia a distintos estreses abióticos. Cutler et al. (2010) reportaron que el ABA puede controlar el crecimiento de la raíz y regular el contenido de agua en la planta en condiciones de estrés por sequía, principalmente mediante la reducción de la transpiración a través del cierre estomático. Si bien las plantas regulan endógenamente los niveles de esta fitohormona, también se han identificado diversas PGPBs capaces de sintetizarla y contribuir a su disponibilidad en el entorno. Sgroy et al. (2009) aislaron bacterias endofíticas de *Prosopis strombulifera* a las cuales se les atribuyó características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal, entre ellas la capacidad de sintetizar ABA en el medio de cultivo. Por otro lado, la síntesis de esta fitohormona por *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 condujo a una mayor

tolerancia al estrés salino y un aumento en el rendimiento y productividad de plantas de arroz (Shahzad et al., 2017).

Por otro lado, las giberelinas (o ácido giberélico, AG) controlan diversos aspectos como la división celular y elongación durante el crecimiento y desarrollo de la planta, pudiendo aumentar el crecimiento del tallo, alterar la latencia de las semillas en germinación y aumentar la senescencia de hojas y frutos (Hedden & Kamiya, 1997; Spaepen, 2015). Las formas biológicamente activas de esta fitohormona son AG₁, AG₃, AG₄ y AG₇, siendo AG₃ la forma más común (Orozco-Mosqueda et al., 2023). Las otras giberelinas, que no son activas, pueden estar involucradas en la biosíntesis y/o degradación de las formas activas de esta fitohormona (Yamaguchi, 2008). Las bacterias beneficiosas pueden modular los niveles de esta fitohormona en la planta mediante la síntesis *de novo* de la misma y/o cambiando las giberelinas en estado inactivo a AG activas. Mirskaya et al. (2022) observaron que la inoculación con *Bacillus sp.* V2026 en diferentes líneas de trigo incrementa los niveles endógenos de AG y AIA, mejorando el rendimiento de las mismas.

Las fitohormonas como AS, AJ y ET participan activamente en la respuesta inmune de la planta (Loake & Grant, 2007; Pieterse et al., 2009; Ruan et al., 2019). Generalmente, la inducción de la respuesta sistémica inducida (ISR, del inglés *Induced Systemic Resistance*) se asocia con las vías de señalización de AJ y ET, mientras que la respuesta sistémica adquirida (SAR, del inglés *Systemic Acquired Resistance*) típicamente se asocia con la vía del AS.

El AS y sus derivados, denominados de manera colectiva como salicilatos, regulan varios aspectos relacionados con el crecimiento de la planta, estreses ambientales, y respuestas de defensa contra patógenos. Además de las plantas, se ha reportado que distintos géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Salmonella*, *Achromobacter*, *Vibrio*, *Yersinia*, y *Mycobacteria* sintetizan salicilatos (Mishra & Baek, 2021). Islam et al. (2020) aislaron, a partir de hojas del sauce llorón (*Salix babylonica*), una bacteria endofita capaz de producir AS identificada como *Pseudomonas tremae* EB-44. La inoculación de semillas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* con EB-44 mostró una respuesta de defensa más efectiva de estas plantas contra *P. syringae* pv. *tabaci*, las cuales además mostraron un mayor crecimiento.

El AJ y sus derivados, los jasmonatos, son pequeñas moléculas de señalización derivadas de lípidos producidas por plantas, ciertas bacterias y hongos. Regulan diferentes procesos que están relacionados con el desarrollo de la planta, como la formación de tubérculos y tricomas, la senescencia de las hojas o el desarrollo reproductivo. Además, están implicadas en interacciones simbióticas y respuestas de las plantas a heridas y defensa contra insectos y patógenos (Eng et al., 2018). Si bien, hay pocos reportes sobre la síntesis de esta fitohormona y sus derivados por microorganismos, Forchetti et al. (2007) observaron que tres cepas identificadas como *Achromobacter sp.* SF2, y *Bacillus sp.* SF3 y SF4, eran capaces de producir AJ, su precursor ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA, del inglés *12-oxo-phytodienoic acid*) y ABA en el medio de cultivo.

Por último, el etileno es un potente regulador de numerosos procesos fisiológicos, como la maduración del fruto (Liu et al., 2015), la senescencia de las hojas, el crecimiento de la raíz y de los pelos radiculares (Verbon & Liberman, 2016), el gravitropismo, la respuesta a diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos, entre otros. La síntesis de etileno en las plantas es inducida bajo ciertas condiciones de estrés, lo cual lleva a la inhibición del desarrollo radicular y el crecimiento vegetal. En este sentido, se ha propuesto que muchas PGPBs promueven el crecimiento vegetal provocando una disminución de los niveles de etileno en la planta. Las PGPBs pueden modular los niveles de etileno afectando la expresión de genes que codifican para enzimas de síntesis de la fitohormona, como la ACC-sintasa y la ACC-oxidasa (Tsukanova et al., 2017) o síntesis de la enzima ACC-desaminasa (Glick, 2015). Además de esto, se han identificado diversas interacciones de esta fitohormona con otras y su implicancia en la inmunidad de las plantas (Yang et al., 2015).

Es de suma importancia aclarar que las fitohormonas no actúan de manera independiente, sino que interactúan cooperativamente o en oposición a través de una red compleja de comunicación regulando todos los procesos antes mencionados.

2.2.3. Movilidad, colonización y formación de *biofilms*.

Anteriormente mencionamos que distintos microorganismos pueden ocupar y colonizar distintos nichos en la planta hospedadora, generando interacciones beneficiosas entre ellos. Este proceso de colonización involucra una comunicación compleja entre ambas partes. Usualmente comienza en la raíz, mediante el reconocimiento por parte del microorganismo de compuestos específicos presentes en los exudados de dicho órgano (Afzal et al., 2019). La movilidad y la producción de exopolisacáridos por las bacterias son características que les permiten el desplazamiento hacia condiciones más favorables y la posibilidad de colonizar distintos tejidos de la planta. La colonización endofítica y/o epifítica de los órganos de la planta hospedadora, como así también la colonización de la rizosfera, refleja la habilidad del microorganismo de adaptarse selectivamente a estos nichos ecológicos específicos y esta capacidad ha sido relacionada con la promoción del crecimiento vegetal, como así también con mecanismos de control biológico como la antibiosis y la competencia por nutrientes y nichos (Bonaterra et al., 2022; Compant et al., 2005; Lahlali et al., 2022).

Existen diferentes tipos de movilidad que pueden llevar a cabo las bacterias, los cuales están regulados por las condiciones ambientales, y estos se clasifican en: *swimming*, *swarming*, *twitching*, *gliding* y *sliding*, por sus nombres en inglés (Palma et al., 2022). Los movimientos tipo *swimming* y *swarming* son dependientes de flagelo. El *swimming* se basa en la movilidad de las células individuales sobre un medio líquido o semilíquido, mientras que el *swarming* es la movilidad de una población o grupo de células en un medio semisólido y que, además, está regulada por el sistema de comunicación del tipo *quorum sensing* (Kearns, 2010; Palma et al.,

2022). La movilidad *twitching* es impulsada por la extensión y retracción de los pili de tipo IV y es un movimiento celular lento (Jarrell & McBride, 2008; Mattick, 2002). En cambio, el *gliding* es un movimiento celular más organizado y suave que se produce sin la ayuda de flagelos o pili, sino que depende de proteínas de superficie para el desplazamiento (Jarrell & McBride, 2008). La movilidad tipo *sliding* hace referencia a una forma pasiva de propagación superficial que no requiere de un motor activo, sino que se da por la síntesis de surfactantes que reducen la tensión superficial (Kearns, 2010; Palma et al., 2022).

En este trabajo de Tesis nos enfocamos en la motilidad tipo *swimming* y *swarming* como una característica de relevancia para el control biológico de enfermedades y la promoción del crecimiento vegetal. Lorenzini & Zapparoli (2020) demostraron que bacterias que exhibían mayor movilidad de tipo *swimming* y *swarming* presentaron una mayor capacidad para competir e inhibir el crecimiento *in vitro* del patógeno *Botrytis cinerea*.

Otra característica importante en la colonización y establecimiento en un tejido vegetal, es la capacidad de los microorganismos de formar biopelículas o *biofilms*, por su nombre en inglés (terminología que vamos a utilizar durante todo el trabajo de Tesis). Estos *biofilms* son complejos multicelulares que se dan por la interacción física entre bacterias de una misma especie o incluso entre bacterias de especies diferentes y una superficie. Las células microbianas se adhieren entre sí y a la superficie a través de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, incluidos exopolisacáridos, proteínas y ADN (Lahlali et al., 2022; Vlamakis et al., 2013). La formación de estos *biofilms* les confiere ciertas ventajas a las bacterias como, por ejemplo, protección contra fluctuaciones en las condiciones ambientales. A su vez, distintos estudios han sugerido que la formación de *biofilms* por bacterias beneficiosas juega un papel importante en la protección de las plantas, ya que pueden cubrir hojas y/o raíces proporcionando seguridad contra microorganismos patógenos y favoreciendo el aprovechamiento de determinados nutrientes. Por ejemplo, Haggag & Timmusk (2008) demostraron que *Paenibacillus polymyxa*, una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, coloniza la punta de las raíces de plantas de maní formando *biofilms* y, de esta manera, protege a la planta contra *Aspergillus niger*. Por otro lado, Nie et al. (2022) observaron que la formación de *biofilms* por *Bacillus amyloliquefaciens* B4 en combinación con FeCl₃ tiene un efecto inhibitorio de *Penicillium expansus* y *Botrytis cinerea* durante la postcosecha de diversos frutos.

2.2.4. Competencia por espacio y nutrientes con fitopatógenos.

La competencia se da cuando existe una superposición de nichos entre los fitopatógenos y los microorganismos beneficiosos, resultando en una demanda simultánea de recursos (Lahlali et al., 2022). La competencia por nutrientes (carbohidratos, nitrógeno, y oxígeno) y espacio es un potente mecanismo de acción de bacterias beneficiosas, previniendo el desarrollo de

fitopatógenos y protegiendo a la planta hospedadora (Compant et al., 2005). De esta manera, puede prevenirse o reducirse la incidencia de un patógeno, sin una acción directa sobre el mismo.

Las bacterias beneficiosas pueden limitar la proliferación de fitopatógenos mediante el agotamiento de la fuente de nutrientes, ya que generalmente éstas son más eficientes en la captación de los mismos que los fitopatógenos. Un claro ejemplo de esto es la competencia por el hierro mediante la síntesis de sideróforos (**sección 2.2.1**). Las bacterias antagonistas son capaces de producir grandes cantidades de sideróforos con alta afinidad por el hierro, disminuyendo su disponibilidad para los fitopatógenos (Köhl et al., 2019; Kumar et al., 2022; Lahlali et al., 2022).

En lo que respecta a la competencia por nichos, las habilidades de movilidad, colonización y formación de *biofilms* (**sección 2.2.3**) de las bacterias antagonistas son importantes para lograr invadir y ocupar distintos espacios antes que los fitopatógenos (Soni & Keharia, 2021). A su vez, pueden modular condiciones del nicho haciendo que las mismas no sean favorables para el crecimiento de los patógenos, como cambios en el pH (Kunz, 2006), síntesis de biosurfactantes, síntesis de enzimas (Köhl et al., 2019), entre otros. Tan et al. (2013) reportaron que las cepas CM-2 y T-5 de *B. amyloliquefaciens* demostraron potencial para promover el crecimiento de plantas de tomate y controlar al patógeno *Ralstonia solanacearum*. Observaron una elevada colonización por ambos antagonistas y una reducción en la densidad del patógeno en la rizosfera de tomate.

2.2.5. Antibiosis.

La habilidad de PGPBs de sintetizar distintos compuestos antimicrobianos ha sido ampliamente estudiado para la inhibición, restricción del crecimiento o eliminación de patógenos (Caulier et al., 2019; Fanai et al., 2024). Las moléculas antimicrobianas o antibióticos son metabolitos secundarios que pertenecen a una categoría diversa de compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por microorganismos. Estos compuestos son tóxicos para el crecimiento o funciones metabólicas de otros microorganismos, actuando sobre diversos procesos esenciales como la biosíntesis de la pared celular, y la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Estos compuestos pueden ser de naturaleza volátil (aldehídos, cetonas, alcoholes o sulfuros) o no volátil (fenilpirrol, amino lipopéptidos cíclicos y compuestos nitrogenados heterocíclicos) (Kumar et al., 2022). Los metabolitos producidos por bacterias beneficiosas son de una gran variedad y pueden actuar como agentes antifúngicos, antibacterianos, antihelmínticos, antivirales, antimicrobianos, fitotóxicos, antioxidantes, citotóxicos, y antitumorales (Kumar et al., 2022; Olanrewaju et al., 2017). La producción de estos compuestos les provee ventajas competitivas, ya que se considera uno de los mecanismos de acción más potente contra los fitopatógenos (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Dentro de las bacterias, los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* son los más estudiados en la producción de estos compuestos (Bérdy, 2005; Kumar et al., 2022).

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, del inglés *Volatile Organics Compounds*) son moléculas orgánicas pequeñas (con una masa molecular de 100-500 Da) que se caracterizan por tener una alta presión de vapor, por lo que se volatilizan fácilmente (Cordero et al., 2014). La producción de VOCs por PGPBs se ha relacionado con la promoción del crecimiento de la planta hospedadora como así también, se les ha atribuido actividad antimicrobiana y un papel importante en interacciones a distancia entre microorganismos del suelo (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Cepas de las especies *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* y *B. subtilis* son capaces de sintetizar diferentes compuestos volátiles. Entre ellos, la producción de acetoina y 2-butanona se ha demostrado que estimula respuestas de defensa de la planta y/o induce tolerancia a estrés abiótico, promoviendo, a su vez, el crecimiento de las mismas (Ryu, 2015). Asimismo, se ha visto que la producción de volátiles en la rizosfera de la planta puede indirectamente aumentar el estado nutricional del organismo que los produce y de la planta hospedadora (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Además de estas funciones, los VOCs pueden inhibir directamente a los fitopatógenos. Por ejemplo, el cianuro de hidrógeno o HCN (del inglés, *hydrogen cyanide*) es un metabolito volátil muy efectivo en la inhibición del crecimiento de patógenos de plantas (Siddiqui et al., 2006). Gao et al. (2017) observaron que la producción de VOCs por *B. velezensis* ZSY-1 tiene un amplio espectro de acción antifúngica, logrando la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*, *Alternaria solari*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*, *Coletotrichum lindemuthianum*, *Rhizoctonia solani*, *Valsa mali*, *Monilinia fructicola*, *F. graminearum* y *F. oxysporum f. sp. capsicum*.

Como se mencionó anteriormente, el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado en la producción de antibióticos (Ongena & Jacques, 2007). Incluso, existen distintas formulaciones que se comercializan y aplican actualmente en horticultura, así como en agricultura extensiva. *B. subtilis* produce distintos compuestos antimicrobianos que, de acuerdo a Caulier et al. (2019), se dividen en diferentes clases según su vía de biosíntesis: péptidos ribosómicos, policétidos, híbridos, péptidos no ribosómicos, y compuestos volátiles. Dentro de este género, los péptidos no ribosómicos (NRPs, del inglés *Non-Ribosomal Peptides*) son los más estudiados, donde se encuentran los lipopéptidos (LPs) y los sideróforos. Los LPs más conocidos son la familia de la surfactina (por ejemplo, surfactina, liquenicina, pumilacidina, halobacilina), iturina (por ejemplo, iturina A, bacilomicina L, bacilomicina D, bacilomicina F y micosubtilina) y fengicina (por ejemplo, fengicina, plipastatina y maltacina) (Karačić et al., 2024). Estas familias son las más importantes debido a que las bacterias pueden secretarlas en cantidades biológicamente relevantes durante su crecimiento en condiciones naturales y cada una de ellas puede llevar a cabo diferentes actividades antibióticas y estar involucrada en el antagonismo de varios patógenos de plantas (Fira et al., 2018).

Iturina y fengicina son conocidos principalmente por su elevada actividad antifúngica. A diferencia de estas dos, la surfactina tiene actividad antibacteriana y antiviral, pero se ha descrito también que posee capacidad de inhibir importantes fitopatógenos fúngicos como *B. cinerea*, *F. oxysporum* o *Rhizoctonia solani*. Bouchard-Rochette et al. (2022) reportaron un importante efecto antagonista de *Bacillus pumilus* PTB180 y *Bacillus subtilis* PTB185 contra varios patógenos de plantas, incluidos *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *Sclerotinia sclerotium*, *Phytium ultimum*, y *Phytophthora capsici* debido a la producción de surfactina (por ambas especies) como así también de fengicina e iturina (*B. subtilis* PTB185). El principal mecanismo de acción de los lipopéptidos es mediante la formación de poros en la membrana de los patógenos, conduciendo a un desbalance en el flujo de iones, desestabilización de la membrana plasmática y a la muerte celular (Caulier et al., 2019; Raaijmakers et al., 2010). Además, dada la naturaleza anfipática de los LPs, son excelentes surfactantes, por lo que se conoce que tienen impacto en otros mecanismos metabólicos como la formación de *biofilms*, la motilidad, la virulencia, además de la colonización de raíces u otros tejidos de la planta, así como en las respuestas de defensa en la misma (Caulier et al., 2019).

2.2.6. Síntesis de enzimas hidrolíticas.

Las enzimas microbianas son de gran interés y ampliamente utilizadas en la industria (farmacéutica, alimentos y bebidas, textiles, cosméticos, etc.) debido a su estabilidad, fácil producción y elevada actividad catalítica (Mishra et al., 2020). Además de esto, muchas tienen un papel importante en el ecosistema, ya que contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, se utilizan en biorremediación, son capaces de transformar moléculas orgánicas complejas en compuestos simples que pueden ser aprovechados por las plantas, o incluso en el control de diferentes fitopatógenos.

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal, como diversas bacterias, pueden sintetizar enzimas tales como lipasas, proteasas, celulasas, β -glucanasas, amilasas y quitinasas, las cuales actúan contra distintos fitopatógenos, ya sea atacando su pared celular o incluso degradando compuestos sintetizados por los mismos, confiriéndole protección a la planta y estimulando, de manera indirecta, su crecimiento y desarrollo (Bonaterra et al., 2022; Mishra et al., 2020; Saberi Riseh et al., 2024). Se ha reportado que la producción de estas enzimas puede aumentar durante la interacción entre la bacteria y la planta hospedadora, y las mismas estarían involucradas en el reconocimiento, la adhesión y el movimiento de las bacterias a través de los tejidos vegetales (Oukala et al., 2021).

La evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas *in vitro* por las bacterias se considera un parámetro interesante durante la selección y evaluación de biocontroladores y/o promotores del crecimiento vegetal. Es así, que se ha reportado una amplia variedad de especies bacterianas con capacidad de generar una o varias enzimas hidrolíticas y dicha capacidad se la

ha relacionado con la inhibición de distintos patógenos, como así también al estímulo del crecimiento de la planta hospedadora (Admassie et al., 2022; Ekundayo et al., 2022; Myo et al., 2019; Prihatiningsih et al., 2021).

2.2.7. Inducción de resistencia en las plantas.

El término de resistencia sistémica inducida o ISR se refiere a un estado inducido de resistencia en la planta estimulado por inductores químicos o biológicos, y que protege a la misma contra el futuro ataque por patógenos o insectos. Las plantas pueden desarrollar esta resistencia tras la colonización de sus raíces u órganos por microorganismos no-patogénicos (Pieterse et al., 2014). La ISR es fenotípicamente similar a la SAR (la cual se detallará en secciones posteriores) e incluye la activación de genes relacionados con respuestas de defensa en la planta. Esto incluye genes relacionados con la resistencia a patógenos, así como la expresión de genes que codifican metabolitos o proteínas específicas involucradas en el sistema de defensa vegetal. Tradicionalmente se ha asociado a la ISR con la señalización mediada por jasmonatos y etileno (Pieterse et al., 1998). Sin embargo, a medida que se caracterizan nuevos microorganismos inductores de resistencia sistémica, se hace evidente que varias vías de señalización podrían estar involucradas. Por ejemplo, la ISR mediada por *Bacillus cereus* AR156 contra *Pst* DC3000 depende simultáneamente de la activación de los genes sensibles a AS (*PR1*, *PR2*, *PR5*) y el gen *PDF1.2* relacionado con la vía de AJ/ET (Niu et al., 2011).

Las PGPBs pueden activar ISR como una estrategia para aumentar la resistencia a enfermedades y la tolerancia a estreses abióticos en la planta hospedadora (El-Saadony et al., 2022). Se ha reportado que distintos compuestos microbianos pueden actuar como elicitores de ISR, por ejemplo, antibióticos, sideróforos, lipopolisacáridos, lipopéptidos, entre otros (Kour et al., 2024). El aumento de la resistencia utilizando microorganismos beneficiosos es una potente estrategia agronómica para prevenir pérdidas en los cultivos y disminuir el uso de agroquímicos.

En este contexto, el *priming* juega un papel fundamental, ya que es un proceso mediante el cual las PGPBs inducen en la planta hospedadora un estado de resistencia mejorada o una activación latente de sus mecanismos de defensa. Este proceso se da por una exposición previa a estímulos que sensibilizan a la planta a expresar respuestas de defensa de una manera más eficiente que aquellas que no se encuentren en estado de *priming*. Por lo tanto, estas plantas muestran una activación más rápida y robusta de tales respuestas frente a patógenos, insectos o estrés abiótico, y esto suele estar relacionado con una mayor inmunidad, tanto local como sistémica, así como con una mayor tolerancia al estrés (Conrath et al., 2015; M. Tiwari et al., 2022). Por ejemplo, se reportó que el *priming* con *Bacillus subtilis* induce respuestas de defensa mejoradas en dos cultivares de trigo contra el estrés por sequía al disminuir la peroxidación lipídica, el contenido de prolina y la pérdida de electrolitos de los tejidos de plántulas de trigo, y también, al aumentar la concentración de AS endógeno (Lastochkina et al., 2020).

El fenómeno de *priming* sigue una compleja secuencia de eventos. Primero, el microorganismo debe establecerse en la planta hospedadora. Luego, libera inductores que son reconocidos por receptores específicos de la planta, lo que activa una serie de vías de señalización. Como resultado, se inician respuestas de defensa o se prepara a la planta para responder de manera más efectiva ante futuros ataques por patógenos o situaciones de estrés abiótico (Köhl et al., 2019). Durante este proceso, la planta no activa completamente todos sus mecanismos de defensa, sino que los pone en alerta para responder de manera más eficiente ante el eventual enfrentamiento con un patógeno. A continuación, se detallan algunas respuestas de defensa asociadas a este fenómeno.

2.2.7.1. Modulación de la expresión de genes de defensa en la planta.

Uno de los efectos de *priming* por una bacteria beneficiosa es la expresión más rápida y potente de genes importantes en las vías de señalización, como las del AS, AJ y ET, tras el enfrentamiento con patógenos. Esta respuesta depende de la bacteria beneficiosa en cuestión, así como del tipo de patógeno y su estilo de vida (se detalla en secciones posteriores). Generalmente, las vías de señalización del AJ y ET son más importantes para la resistencia contra fitopatógenos necrótrofos, como *Botrytis cinerea*, mientras que a la vía del AS se la considera más efectiva en respuestas a patógenos con estilos de vida biotróficos o hemibiotróficos, como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Entre los genes más importantes para cada vía de señalización y que comúnmente son utilizados como marcadores para las mismas son el gen *PDF1.2* (del inglés, *Plant-defensin 1.2*), *VSP2* (del inglés, *Vegetative storage protein 2*), *LOX2*, *MYC2*, entre otros, para el caso de la vía de AJ/ET, mientras que para la vía del AS se encuentra la familia de genes que codifican para proteínas PR (del inglés, *Pathogenesis-related*) como *PR1* y *PR5*, entre otros.

Se ha reportado que especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas* pueden inducir un aumento de la resistencia en plantas de *Arabidopsis* contra patógenos fúngicos biotróficos y hemibiotróficos mediante la sobreexpresión de genes relacionados con las vías de señalización del AS, AJ y ET (Nguyen et al., 2020). Asimismo, Bai et al. (2023) determinaron que *B. velezensis* HN-Q-8 es capaz de inducir resistencia al tizón temprano en la planta de papa mediante la sobreexpresión de genes y regulación de actividades enzimáticas relacionadas con la vía del AJ/ET.

2.2.7.2. Síntesis de metabolitos secundarios en la planta.

Las plantas sintetizan dos tipos de compuestos orgánicos: los metabolitos primarios y los metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son producidos en grandes cantidades para mantener procesos vitales como la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo. Ejemplos

de ellos son carbohidratos, aminoácidos, proteínas, lípidos y hormonas. Estos a su vez, participan en la respuesta primaria a la infección por patógenos regulando biomoléculas (Anjali et al., 2023). Por otro lado, los metabolitos secundarios se sintetizan en cantidades mínimas y no desempeñan un papel importante en los procesos vitales antes mencionados, sino que tienen un papel fundamental en la adaptación de las plantas a condiciones desfavorables (estreses bióticos y abióticos), participando de manera directa en las respuestas de defensa de las plantas. Entre estos últimos encontramos alcaloides, antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, quinonas, etc. Además, estos compuestos están directa o indirectamente relacionados con los caracteres organolépticos de plantas y frutos como sabor, color y aroma, lo cual se detallará en secciones posteriores.

Los compuestos fenólicos están formados por un anillo de benceno aromático con uno o más grupos hidroxilos. Se encuentran en mayor medida en frutos y hojas, y son esenciales para la pigmentación, defensa y tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Zagoskina et al., 2023). La mayoría de los compuestos secundarios descubiertos en plantas son antocianinas, flavonoides, fenoles que son sintetizados a través de la vía de los fenilpropanoides. La fenilalanina amonio liasa o PAL (del inglés, *Phenylalanine ammonia lyase*) es la primera enzima en actuar en esta vía. Un incremento en la actividad PAL y acumulación de diversos compuestos fenólicos en las plantas se ha reportado como respuesta a estreses bióticos y abióticos (Galli et al., 2016; Y. Y. Yu et al., 2021). El mecanismo de acción de muchos compuestos fenólicos implica la modulación de las vías de señalización celular o la interacción con componentes esenciales de los patógenos. Esto puede manifestarse a través de la inhibición de enzimas clave para el patógeno o mediante la interferencia de procesos como la multiplicación y diseminación (Ramírez-Gómez et al., 2019).

Otros metabolitos secundarios importantes en las respuestas de defensa son las fitoalexinas. Estas son sintetizadas *de novo* por la planta en respuesta al ataque por patógenos (Anjali et al., 2023). Se ha demostrado que la inducción de estas fitoalexinas antimicrobianas forma parte de las respuestas de defensa de las plantas (Mao et al., 2011). Las fitoalexinas derivadas de fenilalanina y terpenoides son las más estudiadas, siendo la camalexina (3-tiazol-2-il-indol) la fitoalexina principal que se produce en *Arabidopsis* en respuesta a estreses bióticos y abióticos. Los genes *PAD2*, *PAD3* y *CYP7A13* son genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de dicho compuesto (Ren et al., 2008). Se ha demostrado que la mutante *pad3* (del inglés, *phytoalexin deficient 3*) de *Arabidopsis*, incapaz de sintetizar fitoalexinas, es más susceptible a *B. cinerea* (Ferrari et al., 2003).

2.2.7.3. Deposición de calosa.

Dentro de la amplia variedad de respuestas de defensa que pueden activarse en la planta, se encuentra la deposición de calosa. Este polisacárido β -(1,3)-D-glucano con algunas ramificaciones β -(1,6) actúa reforzando la pared celular frente al ataque por patógenos u otros

factores de estrés. En la mayoría de las plantas, la calosa es sintetizada por una familia de calosa sintetasas y dicho polímero tiene un rol importante en varios procesos biológicos (Wang et al., 2021). Como respuesta ante un estrés biótico, por ejemplo, el ataque por un patógeno, la calosa puede sintetizarse en el sitio de infección con la finalidad de reforzar la estructura de la pared celular de manera de restringir o retrasar la invasión del patógeno (Voigt, 2014; Wang et al., 2021). A través del tiempo se han estudiado e identificado PGPBs con capacidad de inducir la deposición de calosa como un mecanismo de defensa en la planta. Marina et al. (2019) sugirieron que la deposición de calosa inducida por las cepas OxA y OxB de *Stenotrophomonas spp.* en *Arabidopsis* sería uno de los principales mecanismos de defensa contra la infección por *B. cinerea*. Asimismo, un estudio reportó que *Bacillus proteolyticus* es capaz de inducir ISR contra patógenos bacterianos y fúngicos mediante el incremento de los depósitos de calosa y acumulación de especies reactivas del oxígeno, la producción de hormonas y metabolitos secundarios, como así también el incremento de los niveles de expresión de múltiples genes de defensa (Yang et al., 2023).

2.3. Patógenos en plantas.

La importancia de controlar las enfermedades en las plantas radica en su impacto directo en la agricultura y por ende en la producción de alimentos. Los cultivos afectados pueden sufrir pérdidas de rendimiento y calidad, lo que no solo pone en riesgo la seguridad alimentaria, sino que también afecta a la economía global. Es así que la protección de los cultivos contra las diferentes plagas y enfermedades puede mejorar substancialmente la producción agrícola. Los hongos son los principales patógenos que afectan a las plantas, seguidos por virus y bacterias. En el caso del cultivo de frutilla, los hongos son los que mayor impacto económico tienen, ya que pueden infectar todas las partes de la planta causando un daño severo e incluso la muerte de la misma (Garrido et al., 2011), afectando considerablemente el rendimiento y producción de frutos.

Los fitopatógenos presentan distintas estrategias mediante las cuales atacan y provocan enfermedades en sus hospedantes, y de acuerdo a su modo de adquisición de nutrientes y crecimiento, se clasifican en: necrótrofos, biótrofos y hemibiótrofos. Los fitopatógenos necrótrofos primero destruyen las células vegetales, generalmente a través de la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal y fitotoxinas, y luego se alimentan de su contenido para continuar su desarrollo. Los biótrofos obtienen nutrientes de los tejidos vivos del hospedador, usualmente a través de estructuras (haustorios) que invaginan la célula vegetal sin generarle daño. Las células hospedantes permanecen vivas mientras que el patógeno hace uso de sus nutrientes. Por último, los fitopatógenos hemibiótrofos tienen un comportamiento biotrófico en una etapa inicial de la infección y luego cambia hacia una estrategia necrótrófica. En este trabajo de Tesis abordamos los estudios con enfoque en dos patógenos fúngicos necrótrofos: *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*.

2.3.1. *Botrytis cinerea*.

B. cinerea Pers. Fr. (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) es un hongo necrótrofo que pertenece al Filo *Ascomycota*, Subfilo *Pezizomycotina*, Clase *Leotiomycetes*, Orden *Helotiales*, Familia *Sclerotiniaceae*, Género *Botrytis*. Produce una enfermedad conocida como podredumbre gris o *grey mould*, por su nombre en inglés. Es un patógeno generalista que puede infectar un amplio rango de especies. En el cultivo de frutilla es considerado uno de los principales patógenos, capaz de producir importantes pérdidas económicas, ya que puede afectar al mismo en el campo, almacenamiento, transporte y mercado (Petrasch et al., 2019). Este hongo puede vivir en los tejidos de la planta en un estado latente sin generar síntomas, y, cuando las condiciones son favorables inicia el proceso de infección, volviéndose altamente destructivo en tejidos senescentes o maduros (Williamson et al., 2007). Se conoce que las frutillas son más resistentes a *B. cinerea* cuando estas se encuentran en su etapa inmadura (Petrasch et al., 2019). La inducción de la infección durante la maduración puede deberse a cambios en la composición bioquímica de los tejidos del hospedador, como un aumento en el contenido de azúcar, producción de volátiles y alteraciones en la defensa de la planta (Prusky & Lichter, 2007).

De manera general, el proceso de infección de *B. cinerea* consiste en primer lugar de un contacto inicial con el hospedador, penetrando el tejido con ayuda de estructuras especializadas o ingresando por aberturas naturales como los estomas. Seguido a esto, se producen dos fases: una fase temprana que se caracteriza por la formación de focos de infección local sin propagación, y una fase tardía caracterizada por la producción de abundante biomasa fúngica y avance de la lesión (Bi et al., 2023). Como parte de su mecanismo de infección, *B. cinerea* sintetiza diferentes compuestos que facilitan la muerte rápida de las células vegetales, como enzimas que degradan la pared celular, toxinas y proteínas que inducen la muerte celular, y a la vez, ha desarrollado mecanismos que le permiten tolerar los metabolitos tóxicos (por ej.: fitoalexinas) sintetizados por las plantas (Bi et al., 2023).

Los síntomas durante la enfermedad causada por *B. cinerea* son variables y difieren según el órgano o tejido infectado. La podredumbre blanda, acompañada por el colapso del tejido parenquimático, seguido de la rápida aparición de masas grises de conidios son, tal vez, los síntomas más típicos en hojas y frutos blandos. En los pétalos de flores, los síntomas pueden variar desde pequeñas marcas hasta una pudrición blanda a gran escala dependiendo de las condiciones ambientales (Williamson et al., 2007).

2.3.2. *Rhizopus stolonifer*.

R. stolonifer pertenece a la Clase *Zygomycetes*, Orden *Mucorales*, Familia *Mucoraceae* y Género *Rhizopus* (Bautista-Baños et al., 2008). Es un hongo saprófito que puede sobrevivir en un

amplio rango de humedad y temperatura, y es considerado un hongo sumamente destructivo (Feliziani & Romanazzi, 2016). La enfermedad en los frutos causada por este fitopatógeno se conoce como podredumbre blanda (*soft rot*), moho negro (*black mold*) o podredumbre por *Rhizopus* (*Rhizopus rot*), y se caracteriza por ser una enfermedad de progresión rápida y agresiva. En condiciones adecuadas de humedad y temperatura, pueden observarse los primeros síntomas a las 24 horas posteriores a la infección. El micelio, que crece de manera rápida y en abundancia, cubre la superficie del fruto afectada produciendo racimos de esporangios fibrosos de color gris. El tejido infectado empieza a descomponerse y perder su consistencia y, luego de 2 o 3 días, comienza a liberar un jugo con olor fermentado o ácido (Feliziani & Romanazzi, 2016; Liu et al., 2024).

El proceso de infección de *R. stolonifer* inicia por la presencia de esporas del mismo, las cuales se ponen en contacto con el tejido vegetal y pueden germinar bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura. Durante la germinación, estas esporas liberan varios aminoácidos, enzimas (como poligalacturonasa y pectin metilesterasa) y otras proteínas. Esto le permite a *R. stolonifer* invadir tejidos lesionados, digerir rápidamente los componentes de la pared celular vegetal, provocar la pérdida de electrolitos del tejido, y conducir a su pudrición (Liu et al., 2024). En estadios avanzados de la infección, *R. stolonifer* produce estructuras reproductivas llamadas esporangios, que contienen esporas. Cuando estas esporas son liberadas al ambiente, pueden contaminar otras plantas o frutos que se encuentren cerca, reiniciando el ciclo de infección. Como estas esporas pueden ser transportadas por el aire, el agua o el contacto directo entre frutos, el hongo se disemina muy fácilmente.

Como se mencionó para el caso de *B. cinerea*, a medida que los frutos maduran estos se vuelven más susceptibles a la infección y colonización por *R. stolonifer*. Petrasch et al. (2019) investigaron la capacidad de *R. stolonifer* de infectar tomates maduros e inmaduros, y confirmaron que este hongo no podía infectar frutos inmaduros y requería que el tejido hospedador experimentara un proceso de maduración para causar la enfermedad con éxito. Además, se ha visto que la habilidad de infección de *R. stolonifer* puede estar relacionada con la época de cosecha de la fruta. En el caso de frutilla, se ha visto que si la misma es cosechada al final de la temporada presenta mayor susceptibilidad a este fitopatógeno que si es cosechada al inicio de la misma (Liu et al., 2024).

El manejo de enfermedades provocadas por *B. cinerea* y *R. stolonifer* se da mediante la aplicación de fungicidas, siendo muy importante la frecuencia y el momento de las aplicaciones para un correcto control. Sin embargo, la resistencia de estos fitopatógenos a los fungicidas es un desafío real para la horticultura, además del impacto negativo que estos compuestos químicos tienen sobre el medioambiente y la salud humana. Esta situación ha impulsado a la investigación y desarrollo de estrategias basadas en el control biológico para el manejo de enfermedades en plantas.

2.4. Control biológico. Avances en el control biológico de fitopatógenos en Arabidopsis y frutos carnosos.

Las prácticas de manejo para el control de enfermedades en plantas se basan en gran medida en la aplicación de pesticidas sintéticos. Sin embargo, el uso excesivo e indiscriminado de estas sustancias puede producir serios problemas de contaminación ambiental y aumento en la resistencia de los fitopatógenos, amenazando a la salud humana y generando un problema de seguridad alimentaria. Por lo tanto, existe una creciente demanda de nuevas estrategias más seguras que reemplacen o al menos complementen a los métodos de control existentes. El control biológico consiste en el uso de microorganismos vivos para reducir y/o mantener la población de un fitopatógeno por debajo de los niveles que producen pérdidas económicas (Carmona-Hernandez et al., 2019). Como ya se mencionó anteriormente, las PGPBs no sólo benefician a la planta mediante una mejora en su nutrición y su crecimiento, sino que estos pueden prevenir enfermedades causadas por diferentes patógenos y actuar como BCAs. De acuerdo con De Silva et al. (2019), una de las estrategias más económicas e importantes para el control de enfermedades y, a su vez, con un impacto medioambiental mínimo, es el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

El uso de *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo para numerosas investigaciones ha sido clave para comprender diversos aspectos de la biología vegetal debido a que se cuenta con su genoma completamente secuenciado, presenta un ciclo de vida rápido y facilidad de manipulación genética. En el contexto del control biológico de enfermedades en plantas, *Arabidopsis* sirve como una valiosa herramienta para estudiar interacciones entre plantas, patógenos y BCAs. Su empleo permite identificar y caracterizar mecanismos relacionados con resistencia inducida, evaluar la eficacia de microorganismos benéficos y explorar nuevas estrategias para mitigar los efectos de enfermedades producidas por diferentes fitopatógenos. Por ejemplo, Maldonado-González et al. (2015) utilizaron *A. thaliana* para estudiar los mecanismos mediante los cuales *P. fluorescens* PICF7 ejerce control biológico sobre *Verticillium dahliae* en la planta de olivo. A su vez, se han realizado importantes avances en el estudio de la inducción de resistencia por *Bacillus* spp. en *A. thaliana* como un mecanismo de control biológico hacia distintos fitopatógenos (Nguyen et al., 2020; Peng et al., 2019; Yang et al., 2023). Los trabajos de Marina et al. (2019) y Colavolpe et al. (2021) determinaron mecanismos de acción de *Stenotrophomonas* spp. y *Burkholderia* sp., respectivamente, en el control biológico de patógenos necrótrophos en *A. thaliana*. Entre los mecanismos descritos se encuentran la regulación de la expresión de genes relacionados con respuestas de defensa, así como también modificaciones en la pared celular vegetal que sugieren un refuerzo de la misma en plantas inoculadas con las bacterias antes mencionadas.

En los frutos carnosos, el control de enfermedades es importante debido a que la infección por patógenos puede ocurrir antes, durante y después de la cosecha, e incluso durante el almacenamiento del fruto. Si bien, diferentes prácticas de manejo, como la correcta manipulación de los frutos evitando daños mecánicos, pueden minimizar la susceptibilidad a la infección, generalmente esto no llega a ser suficiente. Por lo tanto, el control biológico de patógenos mediado por microorganismos beneficiosos ha ganado relevancia en los últimos años, emergiendo como una estrategia clave con numerosos casos exitosos en el control de enfermedades, tanto en la pre como en la postcosecha de frutos. El primer reporte sobre el uso de microorganismos antagonistas fue para el control de la podredumbre por *Botrytis* en frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) con *Trichoderma* spp. (Tronsmo & Dennis, 1977). Otro trabajo clásico sobre control biológico en frutos carnosos es el de Pusey & Wilson (1984) donde estudian el control de la podredumbre marrón en drupas mediado por *B. subtilis*. A partir de entonces, se han identificado y utilizado varios antagonistas para el control de enfermedades en frutos. Si bien existen diversos mecanismos de acción mediante los cuales el BCA ejerce su antagonismo sobre los fitopatógenos, se cree que la competencia por espacio y nutrientes, la antibiosis y la inducción de resistencia son los principales en la supresión de enfermedades en la postcosecha de frutos (Carbú et al., 2016; Dukare et al., 2019; Sharma et al., 2009). En este sentido, Tortora et al. (2011) demostraron que *Azospirillum brasilense* REC3 redujo los síntomas de antracnosis en plantas de frutilla mediante la acumulación de AS y la inducción de genes relacionados con respuestas de defensa. Los autores sugieren, además, que esta respuesta podría relacionarse con modificaciones en la pared celular vegetal como resultado del incremento en los niveles de compuestos fenólicos y en la deposición de calosa. De manera similar, el tratamiento postcosecha con *B. cereus* AR156 en durazno resultó en una reducción significativa de la enfermedad causada por *R. stolonifer*, atribuida a la inducción de resistencia en dichos frutos (Wang et al., 2013). Por otro lado, Cozzolino et al. (2020) reportaron que la síntesis de lipopéptidos por *Bacillus* sp. SL-6 presentaba actividad antifúngica contra *Alternaria alternata* y *B. cinerea* en la postcosecha de peras y manzanas. En este sentido, se determinó que la síntesis de compuestos antifúngicos, tanto difusibles como volátiles, fue el principal mecanismo mediante el cual cinco aislamientos pertenecientes al género *Bacillus* y un aislamiento perteneciente al género *Pantoea* lograron controlar a *B. cinerea* en la postcosecha de frutilla (de Moura et al., 2021). Como estos, existen numerosos aportes en el estudio de microorganismos para el control biológico de enfermedades en frutos, los cuales abren nuevas perspectivas para investigaciones futuras. Estos avances no sólo permiten comprender mejor los mecanismos de acción de los BCAs, sino que también facilitan el desarrollo de estrategias más precisas y eficaces para combatir patógenos de manera sostenible. El control biológico se presenta como una herramienta clave para reducir la dependencia de productos químicos, promover la biodiversidad y garantizar la seguridad alimentaria.

2.5. El género *Bacillus*.

El género *Bacillus* representa un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, aeróbicas o anaeróbicas facultativas, con forma de bastón y capacidad de formar endosporas, lo que les confiere alta tolerancia a condiciones ecológicas adversas. Debido a la habilidad de crecer y esporular en un amplio rango de valores de pH, temperaturas, y niveles de salinidad, *Bacillus* spp. se encuentran presentes en diversos hábitats naturales, incluidos el suelo y las plantas (Bonaterra et al., 2022; Karačić et al., 2024). *B. subtilis*, *B. licheniformis*, y *B. pumilus* han sido identificados como los “miembros originales” del género *Bacillus* (Gordon et al., 1973). Entre ellas, *B. subtilis* ha ganado gran interés, con un rol creciente en la industria, medicina y ciencia básica. Sin embargo, en lo que respecta a la interacción planta-bacteria, se conoce que diferentes miembros pertenecientes a este género tienen múltiples características beneficiosas que ayudan a las plantas directa o indirectamente, ya sea a través de la adquisición de nutrientes, estímulo del crecimiento mediante la síntesis de fitohormonas, protección contra un amplio rango de patógenos y tolerancia a estreses abióticos. Por estos motivos, este género es el más explotado comercialmente en la industria agrobiotecnológica (Saxena et al., 2019). La actividad antimicrobiana contra numerosos patógenos, y el estímulo, a la vez, del crecimiento y rendimiento de las plantas puede ser llevado a cabo por especies pertenecientes al género *Bacillus* a través de varios de los mecanismos de acción descritos en secciones anteriores. Por ejemplo, la inoculación con *B. velezensis* SQR9 induce resistencia sistémica en *Arabidopsis* y reduce significativamente la incidencia de los patógenos *P. syringae* DC3000 y *B. cinerea*. Esta cepa es capaz de producir lipopéptidos, policétidos, VOCs, y exopolisacáridos que actúan de manera sinérgica para activar ISR en la planta a través de diferentes vías de señalización (Wu et al., 2018). A su vez, esta cepa fue capaz de promover el crecimiento de plantas de pimiento y colonizar diferentes tejidos de la misma (Yu et al., 2024). Una característica importante de las bacterias pertenecientes a este género, es su capacidad de sintetizar gran variedad de compuestos antimicrobianos. Como se mencionó en la **sección 2.2.5**, *Bacillus* spp. produce lipopéptidos como surfactina, fengicina e iturina, con propiedades antibacterianas y/o antifúngicas. Además, son capaces de sintetizar sideróforos, enzimas hidrolíticas, compuestos volátiles y muchos otros metabolitos secundarios que juegan un papel esencial en la promoción del crecimiento de plantas y la inhibición de diferentes fitopatógenos.

En el cultivo de frutilla, diversas cepas del género *Bacillus* han sido aisladas de la rizósfera, raíz, hoja o fruto de la planta y evaluadas por su efectividad en el control biológico de patógenos y la promoción del crecimiento, mostrando resultados prometedores (Abd-El-Kareem et al., 2022; de Moura et al., 2021; Hassan et al., 2021; Wang et al., 2021). Además, se han identificado cepas de *Bacillus* aisladas de la rizosfera o tejidos de otras especies vegetales que, al ser evaluadas en frutilla, también han demostrado efectos beneficiosos (Chen et al., 2019; Li et al., 2021; Toral et al., 2018; Vicente-Hernández et al., 2019; Yu et al., 2021). Esto resalta la capacidad de adaptación

de estas bacterias a distintas especies vegetales, ampliando así su potencial aplicación en diversos cultivos. Por ejemplo, *B. methylotrophicus* M4-96, aislada de la rizosfera de maíz, fue capaz de promover el crecimiento vegetal de *A. thaliana* (Pérez-Flores et al., 2017). Cuando Vicente-Hernández et al. (2019) evaluaron esta misma especie en el cultivo de frutilla, observaron que la misma inducía el crecimiento de plántulas *in vitro*, además de inducir la síntesis de calosa en las hojas.

2.6. Mecanismos de defensa en las plantas.

Las plantas se encuentran constantemente expuestas a desafíos ambientales, que incluyen la infección por múltiples patógenos. Su habilidad de responder a estos retos es crucial para su supervivencia. Es así que han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa físicos, químicos o biológicos hacia el ataque por patógenos, tanto preformados como inducibles. Los mecanismos preformados o barreras estructurales previenen la penetración física de los patógenos, y dentro de las mismas se encuentran las cerocidades y los componentes de la pared celular. Además, las plantas acumulan metabolitos secundarios que pueden contrarrestar la invasión del patógeno como, por ejemplo, fitoanticipinas, que actúan como toxinas antimicrobianas, o diferentes compuestos fenólicos.

Por otro lado, los mecanismos de defensa inducibles se desencadenan tras el ataque por un patógeno e involucran la producción de especies reactivas del oxígeno, expresión de genes de defensa, modificaciones en las paredes celulares y cutículas de la planta, deposición de calosa y lignina, y aumento en la producción de compuestos antimicrobianos (Wiesel et al., 2014).

Cuando el fitopatógeno logra evadir los mecanismos de defensa preformados, en la planta se activa una respuesta inmune primaria conocida como Inmunidad activada por PAMP o PTI (del inglés, *PAMP-triggered immunity*). Esta se activa o se inicia cuando la célula vegetal interactúa o reconoce patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs, del inglés *pathogen- or microbe associated molecular patterns*). Estos PAMPs o MAMPs son reconocidos a través de receptores asociados a la superficie de la célula vegetal conocidos como receptores de reconocimiento de patrones o PRRs (del inglés, *Patterns recognition receptors*) (Amil-Ruiz et al., 2011; Pieterse et al., 2014). En caso de que el patógeno logre evadir esta respuesta primaria, las plantas son capaces de activar una segunda línea de defensa, conocida como inmunidad activada por efectores o ETI (del inglés *Effector-triggered immunity*). Este mecanismo de defensa se activa mediante el reconocimiento de elicitores por parte de las células vegetales a través de receptores específicos conocidos como NB-LRR (del inglés, *Nucleotide-binding site, Leucine-rich repeat*). La ETI es una respuesta PTI amplificada, que puede resultar en la resistencia a la enfermedad y, generalmente, se da una respuesta de muerte celular hipersensible (HR) en el sitio de infección (Jones & Dangl, 2006). Estas respuestas se activan localmente en el sitio de infección a los pocos minutos de la infección por el patógeno. Posteriormente, se activan respuestas

similares en sitios no infectados de la planta, distantes del sitio original de infección, lo cual suele resultar en un aumento de la resistencia de la planta a una segunda infección por el patógeno original, así como también a infecciones por otro tipo de patógenos. Este fenómeno se denomina respuesta sistémica adquirida o SAR. En la **sección 2.2.2** mencionamos la dependencia de este tipo de respuesta con la vía de señalización del AS. La SAR se acompaña de la activación coordinada de genes relacionados con la patogénesis o genes PR (del inglés *Pathogenesis-Related*), la mayoría de los cuales codifican para proteínas PR con actividad antimicrobiana (Pieterse et al., 2014). Entre los genes PR más caracterizados se encuentra el *PR1*, que usualmente se utiliza como marcador de SAR.

2.7. Pared celular vegetal. Estructura y composición.

La pared celular es una estructura que lleva a cabo funciones esenciales para las plantas, como proveerles forma a diferentes tipos celulares necesarios para la formación de órganos y tejidos, participar en la comunicación intercelular, actuar como una barrera física frente a patógenos y participar en la activación de respuestas de defensa, jugando un papel importante en las interacciones planta-microorganismo (Ishida & Noutoshi, 2022; Zhang et al., 2021).

Existen dos tipos de principales de paredes celulares: la primaria y la secundaria. Las paredes primarias, presentes en células en crecimiento, se las considera relativamente no especializadas y similares en arquitectura molecular en todos los tipos celulares. En contraste, las paredes secundarias, se forman luego de que el crecimiento celular ha cesado y pueden ser altamente especializadas en estructura y composición (Cosgrove, 1997). Estas paredes secundarias son mucho más gruesas que las paredes primarias, lo que les provee rigidez adicional, pero reduce su flexibilidad. En cambio, la pared celular primaria, es una estructura dinámica que actúa como una barrera semipermeable que protege físicamente a la célula y que es capaz de responder a estímulos bióticos y abióticos (Srivastava et al., 2017). Entre células contiguas se encuentra la lámina media, rica en pectinas y que constituye la interfase entre las paredes de dichas células, proporcionando conexiones intercelulares y manteniendo la integridad estructural de los tejidos vegetales (Zamil & Geitmann, 2017).

El modelo de pared celular vegetal primaria más aceptado indica que la misma está conformada por una red de celulosa-hemicelulosa embebida en una matriz altamente hidrofílica de pectinas, la cual contiene otros componentes en menor proporción tales como glicoproteínas, compuestos de bajo peso molecular e iones (Posé et al., 2018) (**Figura 2.2**).

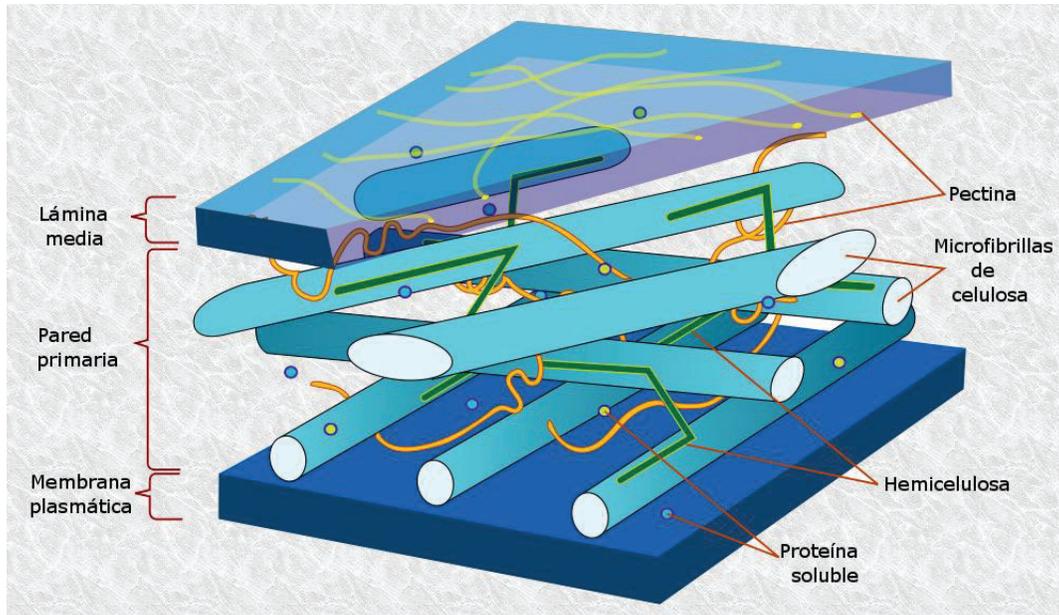


Figura 2.2. Modelo aceptado de pared celular primaria. Se aprecian sus principales componentes y la disposición espacial de los mismos (Ilustración tomada de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plant_cell_wall_diagram-es.png).

Dentro de los polímeros que conforman la pared celular, la celulosa está constituida por cadenas lineales de β -1,4-glucanos, que interactúan una con otra a través de puentes de hidrógeno conformando microfibrillas (Posé et al., 2018). Las hemicelulosas se asocian con las microfibrillas de celulosa para formar una matriz entrecruzada. Son polímeros formados por azúcares neutros que no poseen ácido galacturónico (AG). Las principales clases de hemicelulosas halladas en la pared celular primaria son xiloglucanos, glucomananos y xilanos (Scheller & Ulvskov, 2010). Por otro lado, las pectinas constituyen un conjunto heterogéneo de polímeros altamente hidrofílicos, ricos en azúcares ácidos tales como el AG y el glucurónico. Incluyen los homogalacturonanos (HG), los cuales se encuentran presentes en toda la pared primaria, y son el componente mayoritario de la lámina media; y pectinas de composición química más compleja como los ramnogalacturonanos de tipo I (RGI) y tipo II (RGII) (Harholt et al., 2010). La pared celular también está conformada, en menor proporción, por proteínas estructurales altamente glicosiladas, mayormente por proteínas ricas en hidroxiprolina, en prolina y en glicina (Carpita y McCann, 2000; Srivastava et al., 2017).

El contenido de los distintos polisacáridos en la pared celular puede variar dependiendo del tejido, el entorno y la especie vegetal. Por ejemplo, en hojas de *A. thaliana* la pared celular contiene aproximadamente un 50% de pectina (Zabackis et al., 1995), mientras que, en frutos carnosos, el contenido de pectinas puede llegar a ser un 60% (Prasanna et al., 2007).

Una práctica habitual para el estudio de los componentes de la pared celular, es el aislamiento de la misma y posterior extracción secuencial para la obtención de fracciones enriquecidas en los diferentes componentes (Brummell, 2006). El aislamiento de las paredes se realiza sometiendo el tejido a ebullición en etanol absoluto, para luego filtrar. Dado que los polímeros son insolubles en alcohol, el sólido retenido está compuesto fundamentalmente por las paredes celulares. Las paredes celulares aisladas son el material de partida para las extracciones de cada grupo de polímeros, las cuales se llevan a cabo utilizando: agua, para separar las pectinas unidas por interacciones débiles (pectinas solubles en agua o PSA); agentes quelantes, usualmente EDTA, para secuestrar iones divalentes y extraer las pectinas unidas por interacciones iónicas (pectinas solubles en EDTA o PSE); HCl en caliente para hidrolizar los enlaces covalentes y solubilizar las pectinas unidas covalentemente (pectinas solubles en HCl o PSH); y solución alcalina fuerte, por ejemplo NaOH 4 M, que permite la solubilización de hemicelulosas débil y fuertemente unidas a la pared celular. El residuo remanente se compone principalmente por celulosa (Brummell, 2006).

2.8. Generalidades de la frutilla.

2.8.1. Características generales del fruto de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.).

Los frutos de frutilla comercial (*Fragaria x ananassa* Duch.) poseen cualidades organolépticas (color, sabor, aroma y textura) atractivas para los consumidores, así como propiedades nutricionales y nutraceuticas (vitaminas, fibras y antioxidantes). La fibra presente en la frutilla, junto con su bajo contenido de fructosa y glucosa, contribuye a la regulación de los niveles de azúcar en sangre debido a su digestión lenta, lo que la convierte en una fruta adecuada para personas con diabetes (Karaca & Pirlak, 2022). Además, es una fuente de vitamina C y folato, lo que les confiere propiedades antioxidantes (Giampieri et al., 2012; Samee et al., 2023). Dadas estas importantes cualidades, sus frutos son ampliamente demandados tanto para su consumo en fresco como para la elaboración de helados, yogures, mermeladas, jugos y conservas (Quarshi et al., 2023).

Fragaria x ananassa Duch., originada a partir del cruzamiento entre *F. chinolensis* y *F. virginiana*, es la especie más cultivada a nivel mundial. Es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia de las *Rosaceas*, subfamilia *Rosoideas*, y género *Fragaria* (Azam et al., 2019). La frutilla es un fruto carnoso y se lo clasifica dentro del grupo de los frutos blandos, los cuales comparten características comunes como tamaño pequeño, textura delicada, coloración intensa, y una vida útil postcosecha acotada. Desde el punto de vista botánico, un fruto verdadero se origina exclusivamente de la transformación del tejido ovárico de una flor y alberga en su interior la semilla resultante del desarrollo del óvulo. En el caso de la frutilla, se la considera un fruto falso por no provenir de las paredes del ovario, siendo la parte comestible de la misma el receptáculo floral engrosado. Los frutos verdaderos son los aquenios, cada uno de los cuales contiene una

sola semilla y se encuentran ubicados en la epidermis del receptáculo; están ligados al mismo a través de conexiones vasculares y el conjunto del receptáculo con los aquenios adheridos es lo que normalmente llamamos “fruto” (Perkins-Veazie, 1995; Whitaker et al., 2020).

2.8.2. Variedades de frutilla.

Existen diversas variedades de frutillas que se cultivan en todo el mundo, cada una adaptada a diferentes climas, suelos y necesidades específicas de producción. Estas variedades se clasifican de acuerdo a sus requerimientos de horas de luz del día o respuesta al fotoperíodo, en variedades de día corto y día neutro, y cada una de ellas se diferencian por su tamaño, sabor, textura, intensidad del color y resistencia a enfermedades (Villagrán et al., 2013). La elección de la variedad adecuada es crucial para garantizar el éxito del cultivo, ya que influye en el rendimiento, la calidad del fruto y su adaptabilidad al clima local.

Las variedades de día corto, como su nombre indica, requieren días más cortos (menos de 14 h de luz) y temperaturas frescas (entre 8 y 24 °C) para desarrollar yemas florales. Son las más comunes en la producción comercial y, generalmente, la cosecha se concentra en un período determinado o durante una temporada específica. En Argentina, se cultivan principalmente en la zona centro-norte del país, provincias de Santa Fe (especialmente en la ciudad de Coronda), Tucumán y Corrientes. Algunos ejemplos son las variedades ‘Camarosa’, ‘Sabrina’, ‘Benicia’, ‘Sweet Charlie’, ‘Camino Real’ y ‘Festival’. La variedad ‘Camarosa’, por ejemplo, da frutos de color rojo oscuro en su exterior y pulpa roja intensa, con notable firmeza. Es una variedad de gran vigor y apta tanto para el mercado fresco como para la agroindustria (frutos procesados). Presenta sensibilidad a la enfermedad del oídio y a *Botrytis cinerea* (Villagrán et al., 2013). Por otro lado, las variedades de día neutro son capaces de florecer y producir frutos durante gran parte del año, siempre que las condiciones sean adecuadas, sin depender del fotoperíodo. Son las variedades predominantes en la zona centro-sur del país como las regiones de Buenos Aires, Mendoza y Patagonia. Algunos ejemplos de esta variedad son ‘Albió’, ‘San Andreas’, ‘Monterrey’, ‘Beauty’, ‘Sweet Ann’, ‘Aromas’, entre otras. Dentro de este grupo, la variedad ‘San Andreas’ es ampliamente cultivada a lo largo del mundo, ya que es apta para cultivarse tanto en el suelo como en túnel, es productiva a lo largo de todo el año y sus frutos son grandes, firmes y sabrosos. Este cultivar presenta buena aptitud tanto para el mercado en fresco como para la agroindustria. A su vez, es más tolerante que otras variedades a diferentes enfermedades como el ‘moho gris’ (causado por *Botrytis cinerea*), la mancha común de la hoja (*Mycosphaerella fragariae*), la enfermedad de la hoja quemada (*Diplocarpon earlianum*), enfermedades del suelo (*Colletotrichum spp*, *Verticillium spp*) y al oídio (*Sphaerotheca macularis*) (<https://strawberryplant.eu/offer/san-andreas>).

En Argentina, las principales variedades utilizadas actualmente son ‘Benicia’, ‘San Andreas’, ‘Albion’, ‘Frontera’, ‘Camino Real’ y ‘Monterrey’ (Informe de Secretaría de Agricultura,

Ganadería y Pesca, Argentina, 2023). Las provincias de Santa Fe, Tucumán, Buenos Aires, Jujuy, Corrientes y Neuquén, son las principales productoras de frutilla, siendo las tres primeras las que generan el 70% de la producción total (Kirschbaum et al., 2017). La distribución de las áreas de cultivo, junto con la selección de variedades adaptadas a cada región, permite garantizar una oferta de frutilla durante prácticamente todo el año.

2.8.3. Maduración de la frutilla.

En las plantas superiores, una vez ocurrida la polinización y fecundación se produce el desarrollo de los frutos, proceso caracterizado por un crecimiento y alargamiento de los mismos. Durante la maduración de los frutos carnosos ocurren una serie de cambios fundamentales que afectan sus características físicas y químicas. Entre ellos, se observa una modificación del color debido a variaciones en los niveles de clorofilas, carotenoides y antocianinas; cambios en la textura como consecuencia de alteraciones de la turgencia celular, en el metabolismo y estructura de la pared celular. Además, se produce la importación, acumulación y modificación de azúcares, ácidos y compuestos volátiles, los cuales influyen en la calidad nutricional y el aroma. Asimismo, con la maduración, los frutos se vuelven más susceptibles a la infección por patógenos, lo que representa un desafío para su conservación y comercialización (Giovanni, 2004).

De esta manera, la maduración de los frutos puede definirse como un conjunto de procesos fisicoquímicos que ocurren entre la finalización del desarrollo y el inicio de la senescencia, dando lugar a modificaciones en la textura, aroma, sabor y color de los mismos. Estos cambios mejoran las propiedades organolépticas del fruto, haciéndolo más atractivo tanto para los herbívoros, lo que favorece la dispersión eficiente de las semillas, como para el consumo humano (Sánchez-Gómez et al., 2022). En frutilla, dado que las etapas de desarrollo y maduración no están claramente separadas, se considera que la maduración es un proceso de desarrollo continuo, en el cual varias etapas fisiológicas pueden superponerse (Manning, 1993).

La maduración de la frutilla está regulada por diversas hormonas, cada una con roles específicos en diferentes etapas del desarrollo. Si bien la frutilla es considerada un fruto no climatérico, por su capacidad de madurar en ausencia de un pico en la respiración y la síntesis de etileno, diferentes trabajos han sugerido un papel de esta fitohormona en la maduración de estos frutos (Langer et al., 2022; Merchante et al., 2013; Tosetti et al., 2020; Villarreal et al., 2010; 2016). Se ha reportado que el etileno participa activamente en la maduración acelerando procesos como la síntesis de antocianinas, la degradación de las clorofilas y el ablandamiento de la pared celular (Langer et al., 2022; Merchante et al., 2013; Villarreal et al., 2010). Por otro lado, las auxinas, suministradas inicialmente por los aquenios, son esenciales para la expansión del receptáculo en etapas tempranas, pero su disminución gradual es necesaria para permitir el progreso de la maduración (Tian et al., 2022). Aplicaciones exógenas de auxinas pueden retrasar la maduración del fruto al reprimir la expresión de genes vinculados con el desensamblaje de la

pared celular (Bustamante et al., 2009; Villarreal et al., 2009). En las primeras etapas del desarrollo, las giberelinas son sintetizadas junto con las auxinas, y el fruto aumenta de tamaño debido a una activa división y expansión celular (Sánchez-Gómez et al., 2022). Durante la maduración los niveles de giberelinas decrecen, y se ha sugerido que regulan negativamente dicho proceso (Symons et al., 2012; Villarreal et al., 2009). Por otro lado, el ácido abscísico actúa como un promotor de la maduración al aumentar la captación de azúcares y la síntesis de antocianinas, marcando un punto de transición crucial desde el estadio blanco hacia el rojo maduro (Chen et al., 2016). Finalmente, los metil-jasmonatos estimulan la maduración mediante la inducción de la pigmentación, ablandamiento y metabolismo de azúcares, además de aumentar la producción de etileno (Han et al., 2019).

Cabe destacar que, además de la acción de distintas fitohormonas, los mecanismos involucrados en el proceso de maduración de frutilla también se encuentran regulados por diferentes factores de transcripción y modificaciones epigenéticas, cuyo detalle excede el propósito de esta Tesis.

Respecto a los cambios en el color del fruto, durante la maduración se produce una acumulación de antocianinas, las cuales le confieren el color rojo característico de las frutillas maduras (Sirijan et al., 2020). Estos pigmentos son compuestos polifenólicos hidrosolubles de localización vacuolar, sintetizados por la vía de los fenilpropanoides y su precursor es la fenilalanina (Sirijan et al., 2020). La antocianina predominante en la frutilla es la pelargonidina 3-glucósido (89-95% del contenido total de antocianinas), mientras que en menor medida se encuentran la cianidina 3-glucósido y la pelargonidina 3-rutinósido (Sirijan et al., 2020). Los diferentes estadios de desarrollo y maduración de la frutilla suelen clasificarse en función de su tamaño y color superficial. Estas etapas incluyen: verde pequeño (VP), verde grande (VG), blanco (BL), 25% rojo (25%R), 50% rojo (50%R), 75% rojo (75%R), 100% rojo (100%R) y sobremaduro (SM).

Por otro lado, el ablandamiento extensivo que ocurre durante la maduración pre y postcosecha de los frutos, se debe principalmente a la disolución de la lámina media, la reducción de la adhesión célula-célula y el debilitamiento de las paredes celulares como resultado de la acción coordinada de enzimas que modifican o degradan componentes de la pared celular (Daglio et al., 2024; Paniagua et al., 2014; Yu et al., 2024). El ablandamiento de la fruta es una característica crucial del proceso de maduración, influyendo significativamente en su calidad y en la aceptación por parte del consumidor. Sin embargo, aunque este proceso aumenta las propiedades sensoriales y nutricionales de la fruta, un ablandamiento excesivo conduce a daños físicos y a una mayor susceptibilidad a infecciones que reducen la calidad y causan pérdidas masivas en la producción (Langer et al., 2018; Petrasch et al., 2019; Yu et al., 2024).

Otra característica importante de la maduración de la frutilla es el incremento en la acumulación de azúcares, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios, así como compuestos

volátiles, que influyen en el sabor y aroma del fruto (Fan et al., 2021; Schwieterman et al., 2014). Todas estas modificaciones resaltan la importancia del proceso de maduración en la calidad del fruto y, por lo tanto, en la aceptación del consumidor.

2.8.4. Principales atributos de calidad de la frutilla.

La calidad de las frutillas es un factor determinante tanto para los productores como para los consumidores. Distintos parámetros de calidad, como sabor, aroma, color, textura y tamaño influyen en la percepción general del fruto por el consumidor, y conforman la calidad organoléptica del mismo.

El sabor de la frutilla se considera un aspecto importante de su calidad. Este es influenciado por un conjunto de azúcares y ácidos orgánicos presentes en los frutos maduros, como así también por distintos compuestos volátiles (Fan et al., 2021; Schwieterman et al., 2014). Fructosa, sacarosa y glucosa son los azúcares principales en una frutilla madura, mientras que sorbitol, xilitol y xilosa se encuentran en cantidades traza. A su vez, los principales ácidos son el ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido málico, y en menor cantidad, se encuentran los ácidos glicólico y shikímico (Madhavi et al., 2023). La medida de sólidos solubles totales (SST) ha sido considerada una aproximación al contenido de azúcares totales en el fruto de frutilla (Whitaker et al., 2020), por lo que las mediciones de este parámetro junto con el pH y la acidez titulable son importantes para evaluar la calidad del fruto. El aroma de la frutilla está constituido principalmente por una mezcla compleja de ésteres, aldehídos, alcoholes y compuestos de azufre (Mishra & Kar, 2014). En cuanto a los compuestos volátiles, los ésteres, terpenos y furanos son los que mayormente influyen en la intensidad de la percepción del sabor del fruto (Schwieterman et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, los cambios de color durante la maduración de la frutilla permiten determinar el grado de madurez e índice de cosecha de los mismos (Alvarado-Cepeda et al., 2020). Este cambio en el color del fruto se debe a la síntesis de antocianinas, alteraciones en el contenido de carotenoides y degradación de clorofilas. Como mínimo, se requiere un porcentaje de coloración roja superficial del 75% del fruto para su comercialización.

Asimismo, en frutilla, el almidón se acumula durante etapas muy tempranas del desarrollo y la degradación de los gránulos de este polisacárido predomina fuertemente durante el crecimiento y la maduración del receptáculo (Souleyre et al., 2004). Se cree que este carbohidrato se utiliza en las primeras etapas del crecimiento del fruto hasta que los aquenios están desarrollados, y posteriormente, éstos inducen la rápida asimilación de nutrientes desde la planta (Perkins-Veazie, 1995), por lo que se estima que la degradación del almidón aporta únicamente hasta el 3% del contenido total de azúcares del fruto al final de la maduración (Souleyre et al., 2004). La sacarosa acumulada en los frutos inmaduros se hidroliza en los monosacáridos glucosa y fructosa, y estos tres carbohidratos son los azúcares solubles en frutillas maduras (Azam et al., 2019). Además, la transformación masiva de metabolitos primarios inicia el flujo de carbono hacia las vías de síntesis de metabolitos secundarios, entre ellas la acumulación

de las antocianinas (Azam et al., 2019). De esta manera, la frutilla es un fruto sumidero por excelencia y es necesaria su cosecha en estadios avanzados de maduración para que se haya alcanzado la calidad organoléptica deseada, acortando así el tiempo de vida postcosecha en comparación con otras especies.

La textura del fruto influye directamente en la percepción sensorial del consumidor y hace referencia a las propiedades físicas del fruto que afectan su consistencia y la sensación al morderlo. Factores como la turgencia, firmeza y rigidez de la pared celular, son determinantes clave en la textura del fruto. Este parámetro de calidad no sólo influye en la aceptación por parte del consumidor, sino que además es un indicador de la vida postcosecha del fruto, su preservación, y valor de mercado (Virgen-Ortiz et al., 2020). A medida que avanza la maduración de la frutilla, la pérdida de firmeza se incrementa progresivamente (Paniagua et al., 2014), lo que, como se mencionó anteriormente, puede llevar a un ablandamiento excesivo que compromete significativamente la vida útil del fruto.

2.8.5. Metabolismo de la pared celular primaria de frutilla.

Como se mencionó en la **sección 2.7**, los principales componentes de las paredes celulares son pectinas, celulosa, hemicelulosas y en menor proporción, proteínas estructurales. La maduración de los frutos implica la degradación de los polisacáridos de la pared celular, lo que conduce al ablandamiento del tejido. El desmantelamiento de la estructura primaria de la pared celular implica una pérdida de las cadenas laterales de pectina, un aumento en la solubilización de la fracción péctica y la depolimerización de los poliuronidos y de las hemicelulosas. Estas modificaciones, junto con la disolución de la lámina media son promovidas por la acción coordinada de enzimas o proteínas sin actividad enzimática que degradan los distintos polímeros que constituyen la pared celular, y otras que también pueden tener actividades duales (Posé et al., 2018; Yu et al., 2024). Cada enzima involucrada en el metabolismo de la pared celular exhibe una actividad particular (hidrolasa, transglicosilasa, liasa, etc.) y requiere reconocer su propio sustrato en el apoplasto.

Entre las enzimas vinculadas con el metabolismo de la pared celular primaria se encuentran:

- Enzimas que participan en el metabolismo de pectinas:

Poligalacturonasas (PGs): catalizan la hidrólisis de las uniones α -1,4 entre residuos de ácido galacturónico y pueden ser del tipo endo- (EC 3.2.1.15) o exo-poligalacturonasas (EC 3.2.1.67). Las PGs actúan sobre los HGs, los cuales son sintetizados y secretados al espacio apoplástico con un alto grado de metil esterificación (Willats et al., 2001). Dado que es necesario un cierto grado de demetilación de los HGs para que se conviertan en sustrato de las PGs (Paniagua et al., 2014; Posé et al., 2018; Willats et al., 2001), la actividad PG *in vivo* estaría

influenciada por una acción previa de las pectin metilesterasas. Se reportó que, durante la maduración del fruto de frutilla, la actividad PG total se incrementó y que la misma fue significativamente mayor en todos los estadios de maduración en frutillas del cultivar Toyonoka respecto a frutos de cultivares más firmes (Villarreal et al., 2008). Asimismo, el gen *FaPG1* codifica para una poligalacturonasa específica de fruto (Villarreal et al., 2009) y cuya modulación antisentido da lugar a frutos más firmes que los de plantas de tipo salvaje (Quesada et al., 2009).

Pectato liasas (PLs, EC 4.2.2.2): intervienen en la degradación de las pectinas en los mismos sitios que las PGs pero la ruptura de la cadena de HG no ocurre a través de un proceso hidrolítico, sino que la catálisis se produce por una reacción de β -eliminación, la cual introduce una insaturación C4-C5 en el extremo no reductor del producto de reacción (Zhou et al., 2016). La actividad PL en frutilla presentó bajos niveles en los primeros estadios de maduración, mientras que se mantuvo alta en los estadios más avanzados (Zhou et al., 2016). En frutilla, las PLs pertenecen a una gran familia génica, y se reportó que frutos de plantas antisentido en el gen *FaPLC* fueron significativamente más firmes que los frutos del tipo salvaje (Benítez-Burraco et al., 2003). Los mismos autores, a su vez, identificaron la expresión de otros dos genes (*FaPLA* y *FaPLB*) en el fruto. Recientemente, Lin et al. (2023) identificaron 65 genes *FaPL* en el genoma octaploide del cultivo de frutilla a los cuales nombraron *FaPL1-FaPL65*, y determinaron que la sobreexpresión de *FaPL1* conduce a un ablandamiento del fruto.

Pectin metilesterasas (PMEs, EC 3.1.1.11): catalizan la hidrólisis de metil ésteres del C-6 de residuos de AG, lo cual genera la demetilación de las pectinas. Esta demetilación cambia el pH y la carga en la pared celular lo que, por un lado, permite la interacción de poliurónidos a través de puentes de calcio, pero, por otro, la demetilación torna más susceptibles a los poliurónidos a la degradación por PGs o PLs. Esto indica que las PMEs pueden intervenir tanto en el refuerzo como en el debilitamiento de la pared celular (Posé et al., 2011). En frutilla, se reportó la existencia de cuatro genes que codifican PMEs putativas (*FaPME1-FaPME4*), y sólo *FaPME1* estaría asociada a la maduración (Castillejo et al., 2004).

- Enzimas que participan en el metabolismo de cadenas laterales:

β -Galactosidasas (β -Gals, EC 3.2.1.23): exo-hidrolasas que catalizan la hidrólisis de residuos de β -D-galactosa terminales de los extremos no reductores de β -D-galactósidos que pueden hallarse en hemicelulosas y, más abundantemente, en pectinas (Payasi et al., 2009). En frutilla, se caracterizaron cuatro genes que codifican β -galactosidasas putativas, *Fa β Gal2* y *Fa β Gal3* (que se expresan mayormente en frutos verdes), y *Fa β Gal1* y *Fa β Gal4* (genes que mostraron un patrón de expresión vinculado con la maduración del fruto) (Paniagua et al., 2016; Trainotti et al., 2001). Además, se informó que, plantas transgénicas que expresan el gen *Fa β Gal4*

antisentido de manera constitutiva rindieron frutos más firmes, y presentaron un incremento del contenido de pectinas unidas covalentemente y un mayor contenido de galactosa que frutos controles en el estadio maduro (Paniagua et al., 2016).

α -Arabinofuranosidasas (α -AraS, EC 3.2.1.55): exo-hidrolasas que remueven residuos terminales α -L-arabinosa no reductores de varios homopolisacáridos (arabinanos) y heteropolisacáridos (arabinogalactanos, arabinoxilanos, arabinoxiloglucanos, glucuronoarabinoxilanos, etc.) de polímeros pécticos y hemicelulósicos (Tateishi, 2008). En frutilla, se detectó actividad α -Ara total en todos los estadios excepto en VP, y la actividad se incrementó con el avance de la maduración del fruto. Asimismo, los niveles de esta actividad fueron mayores en el cultivar más blando respecto al cultivar de frutos más firmes (Rosli et al., 2009). Si bien se han clonado varios genes que codifican arabinofuranosidasas putativas en frutilla, se reportó que la expresión del gen *FaAra1* está asociada con la maduración (Rosli et al., 2009).

- Enzimas que participan en el metabolismo de las hemicelulosas:

Endo- β -1,4-D-xilanasas (Xnasas, EC 3.2.1.8): catalizan la hidrólisis de las uniones β -1,4 entre residuos de D-xilosa en sitios internos de las cadenas de xilanos, produciendo xilooligosacáridos, los cuales son los sustratos de las β -D-xilosidasas (Peng & Jin, 2020). En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, se analizó el patrón de actividad Xnasa total durante la maduración de frutos de dos cultivares de frutillas con diferentes tasas de ablandamiento (Hirsch et al., 2020). En el cultivar Toyonoka, caracterizado por un ablandamiento acelerado, la actividad Xnasa total aumentó desde el estadio verde grande hasta el blanco y luego se mantuvo estable hasta el final de la maduración. Además, en los estadios de maduración 50% y 100% R, se registró una actividad significativamente mayor de Xnasa en Toyonoka en comparación con Camarosa, un cultivar que produce frutos más firmes, y se reportó el clonado de tres genes determinándose que la expresión *FaXynA* y *FaXynC* fue significativamente mayor que *FaXynB* en fruto (Hirsch et al., 2020).

β -xilosidasas (β -Xils, EC 3.2.1.37): enzimas capaces de hidrolizar enlaces terminales β -1,4 entre residuos de xilosa a partir del extremo no reductor (Rohman et al., 2019). En frutilla, Martínez et al. (2004) detectaron actividad β -Xil en todos los estadios de maduración, siendo significativamente menor en los estadios inmaduros y alcanzando un máximo en 25-50% R. Asimismo, frutos del cultivar Toyonoka exhibieron una expresión *FaXyl1* y actividad β -Xil total mayor que frutos de un cultivar más firme como Camarosa (Bustamante et al., 2006).

Expansinas (Exps): proteínas cuya función sería la de interrumpir las interacciones puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y hemicelulosas de una manera dependiente del pH, permitiendo la relajación de la pared celular (Posé et al., 2018). Además, dado su efecto directo sobre la pared celular, se ha propuesto que la acción de las expansinas facilitaría el acceso de otras enzimas a sus sustratos, contribuyendo de este modo al desmantelamiento de la pared celular (Cosgrove, 2000). En frutilla, se aislaron siete genes de expansinas (*FaExp1-FaExp7*) y las expresiones de *FaExp1*, *FaExp2* y *FaExp5* se correlacionan con el proceso de maduración (Civello et al., 1999; Dotto et al., 2006; Harrison et al., 2001).

Xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTHs): de acuerdo a sus efectos sobre la pared celular, estas enzimas podrían tener actividad xiloglucano endohidrolasa (XEH; EC 3.2.151) y/o actividad xiloglucano transglicosilasa (XET; EC 2.4.1.207). La primera rompe hidrolíticamente la cadena de xiloglucano, mientras que la segunda, cataliza una ruptura no hidrolítica y posteriormente, transfiere y liga el extremo de la cadena escindida al extremo no reductor de otra cadena de xiloglucano preexistente o recién sintetizada (Eklöf & Brumer, 2010). Si bien la actividad de las XTHs se vinculó al desensamblaje de la matriz celulosa-xiloglucano, contribuyendo de esta manera al ablandamiento de los frutos carnosos, estudios realizados en tomate propusieron que la actividad XET estaría involucrada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Miedes et al., 2010; Miedes & Lorences, 2009). En frutilla, integrantes de nuestro grupo de trabajo clonaron genes que codifican una proteína putativa que poseería ambas actividades (XEH y XET; *FaXTH2*) y una que tendría actividad XET exclusiva (*FaXTH1*), y se reportó que la expresión *FaXTH1* es significativamente mayor en dos cultivares de firmeza elevada, respecto a un cultivar de frutos blandos (Nardi et al., 2014).

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL

3.1. Hipótesis de trabajo

Durante la interacción entre plantas y bacterias beneficiosas se inducen cambios tanto en la planta como en el fruto. Estas modificaciones intervienen en la promoción del crecimiento vegetal, así como en las respuestas de defensa ante microorganismos patógenos.

3.2. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante las interacciones entre plantas con bacterias beneficiosas. Estudiar posibles mecanismos de acción de estos microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos fúngicos en plantas y frutos de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) y en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

4. CAPÍTULO I: Aislamiento de bacterias epifitas y endofitas de hojas y frutos de frutilla. Caracterización, identificación y evaluación de su potencial para el control biológico y la promoción del crecimiento vegetal.

4.1. INTRODUCCIÓN

Como se describió en la **sección 2.1**, la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en plantas de interés agronómico surge como una alternativa al uso de fungicidas y fertilizantes de síntesis química tanto para estimular el crecimiento de la planta como para controlar el desarrollo de enfermedades (Compant et al., 2005; Dukare et al., 2019; Elnahal et al., 2022; Kumar et al., 2022; Shameer & Prasad, 2018).

En el caso particular de la frutilla comercial, como se mencionó anteriormente (**sección 2.8**), las plantas y los frutos de esta especie son altamente susceptibles al ataque de diversos patógenos fúngicos durante la pre y postcosecha (Garrido et al., 2016). Entre las patologías que desarrollan los frutos maduros, y que causan mayores pérdidas económicas, se destaca la enfermedad del moho gris causada por *Botrytis cinerea* (Petrasch et al., 2019), y la enfermedad de la podredumbre blanda producida por *Rhizopus stolonifer* (Feliziani & Romanazzi, 2016). En lo que respecta al cultivo de frutilla, se han estudiado e informado diferentes géneros bacterianos capaces de promover el crecimiento vegetal e incluso, algunas especies dentro de los mismos se describieron como posibles biocontroladores y se caracterizaron distintos mecanismos a través de los cuales podrían estar actuando. Tales son los casos de *Bacillus amyloliquefaciens* BChi1 y *Paraburkholderia fungorum* BRRh-4, capaces de estimular el crecimiento de la planta y aumentar el contenido de compuestos antioxidantes en los frutos de frutilla (Rahman et al., 2018). Agustí et al. (2011) reportaron que la combinación de dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* lograba controlar la enfermedad causada por *Phytophthora cactorum* mediante la producción de metabolitos secundarios. A su vez, Hassan et al. (2021) identificaron una cepa de *Bacillus safensis* capaz de producir enzimas hidrolíticas (quitinasas, proteasas y lipasas) y de inhibir a *B. cinerea* en la postcosecha de frutilla.

Más allá de estos valiosos avances, existe un campo en el cual profundizar para responder preguntas vinculadas con la selección de las mejores bacterias candidatas para controlar enfermedades fúngicas pre y postcosecha, los mecanismos utilizados por las bacterias para generar dichos efectos beneficiosos, los genes de defensa inducidos y las enzimas y metabolitos que participan en la interacción planta-bacteria.

Así, en este primer capítulo de la Tesis se propuso contribuir al conocimiento de la diversidad de bacterias que conviven en estrecho contacto con la planta de frutilla y comprender los mecanismos a través de los cuales estas bacterias pueden promover el crecimiento de la planta hospedadora y protegerla contra el ataque de los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *R. stolonifer*. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento de bacterias cultivables tanto endofitas como

epifitas a partir de hojas y frutos de plantas de frutilla, su posterior identificación y caracterización mediante diferentes enfoques microbiológicos, bioquímicos y moleculares, como así también, la evaluación de la capacidad de las bacterias seleccionadas para promover el crecimiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 4.2.1.** Realizar el aislamiento de bacterias cultivables, tanto endofitas como epifitas a partir de plantas de frutilla.
- 4.2.2.** Caracterizar y evaluar los aislamientos bacterianos para el control biológico de fitopatógenos fúngicos y la promoción del crecimiento vegetal.
- 4.2.3.** Identificar los aislamientos bacterianos mediante amplificación y secuenciación del gen del ARNr 16S.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Recolección de material y aislamiento de bacterias epifitas y endofitas a partir de hojas y frutos de frutilla.

Se cosecharon hojas y frutos en estadio de madurez apto para consumo de plantas de frutilla comercial (cv. 'San Andreas') cultivadas en la localidad de Sierra de los Padres, provincia de Buenos Aires, Argentina (Cifsa, Compañía Industrial Frutihortícola S.A.). La variedad 'San Andreas' pertenece al grupo de los cultivares de 'día neutro', es decir, su crecimiento y floración no se ve afectado por el fotoperíodo (**sección 2.8.2**).

Las hojas y frutos (en estadio de madurez 75-80% rojo) con apariencia sana y ausencia de daño físico se dividieron en tres grupos de aproximadamente 30 hojas (nombrados HI, HII y HIII) y 3 grupos de 10 frutos cada uno (nombrados FI, FII y FIII). Para el aislamiento de los epifitos, cada grupo de órganos (hojas y frutos) fueron lavados durante 5 minutos con una solución de MgCl₂ 10 mM, pH 7,0 y Tween 20 al 0,01% (v/v). Una alícuota (200 µl) de cada lavado se sembró en placa de Petri conteniendo medio LB-agar (10 g l⁻¹ triptona, 5 g l⁻¹ extracto de levadura, 5 g l⁻¹ NaCl, 15 g l⁻¹ agar bacteriológico) y se incubó a 28 °C durante 48 h. Para el aislamiento de los endofitos, previamente se realizó la desinfección superficial de las hojas y frutos con una solución de lavandina comercial al 5% (v/v) suplementada con Tween 20 al 0,01% (v/v) durante 5 min seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Como control, no se observó crecimiento bacteriano tras colocar una alícuota de 200 µL del último lavado en placas con medio LB-agar, confirmando la eficacia de la desinfección. Cada grupo de muestras fue homogeneizado en MgCl₂ 10 mM estéril, pH 7,0 utilizando un *Omni Mixer* (Instrumentos OCl, Omnimixer 17106), y luego una alícuota de 200 µl se sembró en placas con medio LB-agar que se incubaron a 28 °C durante

48 h. Tanto para los epifitos como los endofitos, las colonias consideradas morfológicamente diferentes se seleccionaron y se repicaron para, posteriormente, obtener cultivos puros. Las bacterias aisladas a partir de las hojas fueron nombradas como HI1, HI2, HI3, etc., mientras que las bacterias aisladas a partir de frutos fueron llamadas FI1, FI2, FI3, etc. Los aislamientos puros se almacenaron a -80 °C en LB suplementado con glicerol al 30% (v/v).

4.3.2. Antagonismo *in vitro* de los aislamientos bacterianos hacia *Botrytis cinerea*.

Se utilizó el patógeno *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (teleomorfo *Bryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) cepa B05.10 de la Colección de Cultivos de Hongos del INTECH (IFCC 458/02).

4.3.2.1. Antagonismo mediante compuestos difusibles o co-cultivo.

El fitopatógeno *B. cinerea* se creció en medio APG (Agar Papa Glucosado) a 25 °C durante 72 h. La inhibición del crecimiento fúngico se evaluó mediante co-cultivo de cada bacteria con el hongo en placas de Petri con medio APG. En el centro de cada placa se colocó un disco de 3 mm² de micelio de *B. cinerea* y en los bordes de la misma se sembraron 8 gotas de 1 µl de cultivo bacteriano previamente crecido ON a 28 °C. Placas que contenían al fitopatógeno y sin bacteria fueron utilizadas como controles. Tanto las placas con bacterias como las placas control, se incubaron a 25 °C y se midió el área de crecimiento del micelio a las 72 y 96 horas, utilizando el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA). Se realizaron tres réplicas técnicas para cada bacteria y el control.

4.3.2.2. Antagonismo mediante la producción de compuestos volátiles orgánicos.

Se evaluó de manera exclusiva la inhibición del crecimiento fúngico mediante la producción de compuestos volátiles por las bacterias. Para esto, se plaqueó cada bacteria a partir de cultivos crecidos previamente ON a 28 °C en placas de Petri con medio LB-agar. Por otro lado, un disco de micelio de *B. cinerea* se colocó en placas con medio APG. Ambas placas se enfrentaron entre sí y se sellaron con Parafilm (adaptado de Chen et al., 2018). Se incubaron a 25 °C y las áreas del crecimiento del micelio se tomaron a las 24 y 48 horas, utilizando el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA). Se realizaron tres réplicas técnicas para cada bacteria y el control.

4.3.3. Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el método de fenol/cloroformo de Cheng & Jiang (2006), con leves modificaciones. A partir de un cultivo líquido previamente crecido, se tomó 1 ml de suspensión celular y se centrifugó a 8000 x g durante 2 min. Se descartó

el sobrenadante y el pellet se lavó con 400 µl de buffer STE (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Se centrifugó a 8000 x g durante 2 min y se repitió el paso del lavado. Luego, el pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Se adicionaron 100 µl de fenol saturado con Tris, pH 8,0 y se agitó con vórtex durante 1 min. Tras una centrifugación a 13000 x g durante 5 min a 4 °C se observó una fase acuosa separada de una fase orgánica. Se tomaron 160 µl de la fase acuosa y se transfirieron a un tubo nuevo. Se agregaron 40 µl de buffer TE y 100 µl de cloroformo. Se mezcló y se centrifugó a 13000 x g durante 5 min (4 °C). Este paso de purificación se repitió de 2 a 3 veces hasta observar que una interfaz blanca ya no se encontraba presente. Una vez llegado a ese punto, 160 µl de la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se agregaron 40 µl de buffer TE y 5 µl de ARNasa (10 mg ml⁻¹) y se incubó a 37 °C durante 30 min para digerir el ARN. Se agregaron 100 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 13000 x g durante 5 min a 4 °C. Se transfirieron 150 µl de la fase acuosa a un tubo nuevo y se le adicionaron 700 µl de isopropanol frío. Se mezcló suavemente y se dejó precipitando ON en heladera. Se centrifugó a 13000 x g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 13000 x g durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Una vez seco, se resuspendió el ADN en 100 µl de H₂O mili Q y se almacenó a -20 °C.

4.3.4. BOX-PCR.

La técnica BOX-PCR (Versalovic et al., 1994) se basa en la amplificación de secuencias altamente conservadas entre las bacterias que establece un patrón de bandas característico para cada una. De esta manera, permite identificar los aislamientos no redundantes. Se utilizaron los cebadores universales BOXA1R (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3') a una concentración 10 µM en la siguiente mezcla de reacción: 50 ng de ADN genómico, buffer de reacción 10X (Thermo Scientific, USA), MgCl₂ 50 mM (Thermo Scientific, USA), dNTPs 25 mM (PB-L, Argentina), 2,5 unidades de Taq polimerasa (Thermo Scientific, USA) y H₂O mili Q hasta un volumen final de 15 µl. El programa de PCR utilizado consistió en: 7 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C y 8 min a 65 °C, y una etapa de elongación final de 16 min a 65 °C. El total de producto de PCR se mezcló con 1,5 µl de Gel Red 20X y 3 µl de Orange G 6X. Las bandas se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) en buffer TBE 0,5X durante 4 h a ~80 V y se visualizaron en fotodocumentador *Amersham Image Quant 800* (Cytiva). Los patrones de bandas obtenidos se analizaron utilizando el *software GelAnalyzer19.1*.

4.3.5. Formación de *biofilms*.

La formación de biopelículas o *biofilms* se evaluó en placas multipocillos de acuerdo con Merrit et al. (2005) y Qu et al. (2016), con leves modificaciones. Las cepas bacterianas crecidas previamente ON a 28 °C, se colocaron en una placa de 96 pocillos con medio LB líquido en una dilución 1:100, respectivamente. La placa se incubó durante 24 h a 28 °C. A este tiempo se midió la absorbancia del cultivo a $\lambda = 600$ nm. Luego, la placa se lavó con PBS al 0,9%, se dejó secar durante 30 min a 37 °C, y luego se colocaron 200 μ l de una solución de cristal violeta al 0,5% (p/v). Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente, se llevó a cabo un lavado de la placa con PBS 0,9%, seguido de un lavado con agua destilada. La placa se dejó secando ON a temperatura ambiente. Para disolver el colorante adherido a la placa, se agregaron 200 μ l de etanol 95% (v/v) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se midió en espectrofotómetro a $\lambda = 590$ nm el valor correspondiente a células adheridas a la superficie de la placa. El valor correspondiente a la formación de *biofilms* se calculó mediante la relación A_{590nm}/A_{600nm} para cada bacteria, de manera de relacionar la formación de *biofilms* con el crecimiento de cada una. Se utilizaron 6 pocillos como réplicas en dos ensayos independientes. Como control se utilizó medio LB líquido sin inocular.

4.3.6. Evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas.

Se evaluó la producción de celulasas, proteasas y lipasas por los aislamientos bacterianos que previamente mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de *B. cinerea in vitro*. Para esto, las bacterias se crecieron ON en medio LB líquido a 28 °C. Después de centrifugar, las células bacterianas se resuspendieron en MgCl₂ 10 mM pH 7,0, y se ajustó a una densidad óptica final de 0,8 a $\lambda = 600$ nm (OD₆₀₀). Se realizaron dos ensayos independientes para cada bacteria.

4.3.6.1. Celulasas.

Para la determinación de actividad celulolítica, se utilizó el medio carboximetilcelulosa (CMC)-agar (adaptado de Hossain et al., 2020; Kasana et al., 2008). El medio CMC-agar está compuesto por: 10 g l⁻¹ de CMC sódico, 2 g l⁻¹ de triptona, 4 g l⁻¹ KH₂PO₄, 10 g l⁻¹ Na₂HPO₄.12H₂O, 0,2 g l⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 20 g l⁻¹ de agar bacteriológico, pH 7,0. Se utilizaron placas de Petri de 55 mm, en las cuales se inocularon 5 μ l de suspensión bacteriana (OD₆₀₀ ~ 0.8). Se incubaron a 28 °C durante 48 h. Pasado este tiempo, se tiñeron las placas con una solución de Rojo Congo (2 g l⁻¹) durante 15 minutos, y luego se lavaron con NaCl 1 M durante 15 minutos de acuerdo con Meddeb-Mouelhi et al. (2014). La presencia de una decoloración alrededor de la colonia indica la producción de celulasas.

4.3.6.2. Proteasas.

La actividad proteolítica se detectó utilizando el medio gelatina-agar: 10 g l⁻¹ de gelatina, 5 g l⁻¹ triptona, 1 g l⁻¹ glucosa, 2,5 g l⁻¹ extracto de levadura, 20 g l⁻¹ agar bacteriológico, pH 7,0 (Hossain et al., 2020). Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, se trataron con una solución de HgCl₂ (150 g l⁻¹) en HCl 20% (v/v) (Fry et al., 1994). La producción de proteasas se visualizó como un halo transparente alrededor de la colonia.

4.3.6.3. Lipasas.

Para determinar la producción de lipasas, se utilizó el medio Tween 80-agar: 15 ml l⁻¹ Tween 80, 80,5 g l⁻¹ triptona, 2,5 g l⁻¹ extracto de levadura, 5 g l⁻¹ NaCl, 20 g l⁻¹ agar bacteriológico, pH 5,0 (Hossain et al., 2020; Samad et al., 1989). Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Luego se tiñeron con una solución de rojo metilo (0,2 g l⁻¹ de rojo metilo en etanol 95% (v/v)) y se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h. Pasado este tiempo, la presencia de un halo amarillo alrededor de la colonia indica la presencia de actividad lipolítica.

4.3.7. Evaluación de movilidad tipo *swimming* y *swarming*.

La movilidad por *swimming* o *swarming* de las bacterias seleccionadas se evaluó en placas de Petri de 55 mm utilizando medio mínimo M9 con glucosa (sales M9: 6,78 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 3 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0,5 g l⁻¹ NaCl, 1 g l⁻¹ NH₄Cl, pH 7,2; MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, glucosa 0,4% (p/v)) con diferentes concentraciones de agar bacteriológico: 0,3% (p/v) para *swimming* y 0,6% (p/v) para *swarming* (Ha et al., 2014a, 2014b). Los cultivos bacterianos se crecieron previamente ON a 28 °C en medio LB líquido. Para movilidad tipo *swimming*, se introdujo en la placa de M9-agar 0,3% (p/v) una punta para pipeta estéril con inóculo bacteriano, y para evaluar *swarming*, se colocó una gota de 2 µl en la superficie del medio M9-agar 0,6% (p/v). Luego se incubaron las placas a 28 °C durante 48 horas. Se realizaron dos ensayos independientes para cada aislamiento bacteriano.

4.3.8. Producción de sideróforos.

Para evaluar si los aislamientos bacterianos seleccionados poseen capacidad de producir sideróforos se utilizó el método O-CAS (Pérez-Miranda et al., 2007). Este método consiste, a diferencia del tradicional, en crecer las bacterias en placa de Petri con medio nutritivo y determinar la producción de sideróforos colocando por encima de esta una solución CAS-agar del color azul correspondiente. La producción de sideróforos se puede visualizar como un cambio de color azul a amarillo/naranja sobre las bacterias que muestran dicha capacidad. La solución CAS se preparó de acuerdo con Schywn & Neilands (1987). Brevemente, 60,5 mg de CAS se disolvieron en 50 ml de agua bidestilada y 10 ml de FeCl₃·6H₂O preparado en 10 mM de HCl. Esta

solución se mezcló con 72,9 mg de HDTMA (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) disuelto en 40 ml de agua bidestilada. Se adicionaron 30,24 g l⁻¹ de PIPES y se llevó a pH 6,0. La solución PIPES-CAS se filtró antes de su uso. Agar bacteriológico al 0,8% (p/v) se utilizó como agente gelificante. El medio utilizado para crecer las bacterias fue M9 suplementado con glucosa sin hierro, de manera de estimular la producción de sideróforos. Los aislamientos bacterianos se crecieron ON en medio LB, se centrifugaron y los pellets se lavaron con medio M9. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en medio M9 y se ajustó su concentración a OD₆₀₀ ~ 0,8. Se inocularon 5 µl por placa. El control consistió en medio sin inóculo bacteriano. Se realizaron 2 ensayos independientes con 3 réplicas de cada bacteria.

4.3.9. Evaluación de la promoción del crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

En primer lugar, las semillas de *A. thaliana* Col-0 fueron desinfectadas con una solución de etanol 70% (v/v) y Tritón X-100 al 0,05% (v/v) durante 3 minutos, seguido de 1 minuto en etanol 95% (v/v). Luego de retirado el etanol, las semillas se dejaron secar en papel de filtro estéril. Se colocaron en placas de Petri conteniendo medio MS agar (Murashige & Skoog, 1962), y se colocaron bajo condiciones controladas con un fotoperíodo de 10-14 h (luz-oscuridad), temperatura de 24/21 ± 2 °C y 55/75 ± 5% de humedad relativa (día/noche, respectivamente) hasta obtener plántulas de 15 días (considerando 2 días de estratificación) o en estadio 1.02 (Boyes et al., 2001). Los aislamientos bacterianos se crecieron ON a 28 °C en medio LB líquido. Luego, se recolectaron las células mediante centrifugación (5 min a 10000 rpm), se lavaron y resuspendieron en MgCl₂ 10 mM pH 7,0 estéril para obtener una concentración final de 5 x 10⁸ UFC (Unidades Formadoras de Colonias) ml⁻¹ (Marina et al., 2019). Se utilizaron 10 plántulas por tratamiento (inoculación con epifito o endofito) o control (inoculación con MgCl₂ 10 mM pH 7,0, estéril). A los 13 días post-inoculación, se midió el peso fresco de la parte aérea, el largo de la raíz y el número de raíces laterales. Se realizaron 2 ensayos independientes para cada bacteria.

4.3.10. Colonización o crecimiento de los aislamientos bacterianos seleccionados en plántulas de *A. thaliana*.

Para determinar si los aislamientos bacterianos son capaces de colonizar y crecer en plántulas de *A. thaliana* se utilizó medio MS con agar al 0,8% (p/v), pH 5,7, para llevar a cabo el experimento. En primer lugar, las semillas de *A. thaliana* Col-0 fueron desinfectadas como se mencionó anteriormente (**sección 4.3.9**). Una vez desinfectadas se colocaron en placas de Petri (135 mm) conteniendo el medio nutritivo para su germinación y posterior crecimiento de las plántulas. Las placas se colocaron bajo las condiciones controladas mencionadas en el apartado anterior. Plántulas de 15 días (considerando 2 días de estratificación) o estadio 1.02 (Boyes et al.,

2001) se inocularon con una suspensión de bacteria (1×10^8 UFC ml⁻¹). La inoculación se realizó colocando una gota de 5 µl en el centro de cada plántula, entre ambos cotiledones. Se utilizaron plántulas control a las que se les colocó 5 µl de MgCl₂ 10 mM pH 7,0 estéril. Para evaluar la capacidad de crecimiento de cada bacteria en las plántulas, se tomaron muestras a las 24, 72 y 120 horas post-inoculación. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por bacteria por tiempo, cada una de las cuales consistía en 4 plántulas tomadas al azar. Se llevaron a cabo 3 lavados con 500 µl de MgCl₂ 10 mM, pH 7,0 estéril. A continuación, las plántulas se resuspendieron en 300 µl de la solución de MgCl₂ estéril y se disgregaron hasta obtener un extracto. A partir de los mismos, se realizaron diluciones seriadas en el orden de 1/10 hasta una dilución final de 1/100000. Para llevar a cabo el recuento de UFC, las diluciones se plaquearon en medio LB-agar colocándose dos gotas de 10 µl cada una para cada réplica biológica. Se dejaron crecer durante 18 h a 28 °C y luego se llevó a cabo el recuento correspondiente.

4.3.11. Evaluación de la promoción del crecimiento de plantas de *A. thaliana*.

Para evaluar el efecto de la inoculación con cada aislamiento bacteriano en la promoción del crecimiento de plantas adultas de *A. thaliana*, las plantas se crecieron en macetas conteniendo una mezcla de tierra:arena:perlita (1:1:1) previamente esterilizada. Se utilizaron entre 5 o 6 plantas (1 planta por maceta) por tratamiento. Los inóculos bacterianos se prepararon tal como se describió en la **sección 4.3.9**, hasta obtener una concentración final de 1×10^8 UFC ml⁻¹. Se llevaron a cabo dos inoculaciones: en plantas de 22 y 29 días de edad, con 20 y 50 µl de inóculo en el centro de la roseta de cada planta, respectivamente. Los controles se trataron de igual manera con una solución estéril de MgCl₂ 10 mM, pH 7,0. A los 15 días después de la última inoculación, se midió el peso fresco de la fracción aérea y las raíces, por separado, como así también el largo de la raíz. Además, las rosetas y raíces se colocaron en sobres de papel madera y se dejaron secando durante 10 días en estufa a 70 °C para obtener el peso seco de los mismos.

4.3.12. Producción de fitohormonas por los aislamientos bacterianos.

La identificación y cuantificación de la producción de fitohormonas (ácido indol-acético (AIA), ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (AG₃)) por los aislamientos bacterianos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masa en tándem (LC-MSMS, Waters y Micromass, respectivamente). Para eso, los aislamientos bacterianos se crecieron en 50 ml de medio M9 durante 24 h a 28 °C. Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de estos cultivos se utilizaron para el análisis de fitohormonas. Las metodologías de extracción y purificación de los compuestos fueron realizadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal-FCEFQyN-UNRC, Argentina.

4.3.13. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Rhizopus stolonifer*.

La cepa de *R. stolonifer* utilizada en este estudio pertenece a la colección de Cultivos de Hongos del INTECH (911/22). La inhibición del crecimiento *in vitro* de tal fitopatógeno se evaluó de la misma manera que se lo hizo para *B. cinerea* (sección 4.3.2), pero con modificaciones en los tiempos de incubación para el caso de co-cultivo entre el fitopatógeno y la bacteria, donde las áreas de crecimiento del micelio se midieron a las 24 y 48 horas, debido a la mayor velocidad de crecimiento *in vitro* presentada por este fitopatógeno. Se realizaron 3 réplicas técnicas por aislamiento bacteriano para cada ensayo.

4.3.14. Identificación de los aislamientos bacterianos.

4.3.14.1. Amplificación del gen del ARNr 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la identificación de los aislamientos bacterianos, se utilizó el ADN genómico previamente extraído. Se amplificó el gen que codifica el ARN ribosomal 16S utilizando los cebadores universales 41f (5' – GCTCAAGATTGAACGCTGGCG – 3') y 1488r (5' – CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC – 3'). La mezcla de reacción contuvo 50 ng de molde de ADN, 0,2 $\mu\text{moles l}^{-1}$ de cada cebador, tampón de reacción 10X (Thermo Scientific, Argentina), MgCl_2 25 mmol l^{-1} (Thermo Scientific, Argentina), dNTPs 10 mmol l^{-1} (Promega, Argentina), 1,6 unidades de Taq ADN Polimerasa (Thermo Scientific, Argentina), en un volumen final de 40 μl . La reacción de amplificación se realizó empleando el siguiente programa: 2 min a 94 °C seguido de 10 ciclos de 40 seg a 94 °C, 1 min a 50 °C y 2 min a 72 °C más 25 ciclos de 40 seg a 94 °C, 1 min a 50 °C y 2 min a 72 °C. La extensión final se realizó a 72 °C durante 10 min. Para visualizar los fragmentos amplificados, se mezcló una alícuota de 5 μl del producto de amplificación con 1 μl de tampón de carga (OrangeG, 6X) y 0,5 μl de Gel Red 20X y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TBE (Tris 54 g l^{-1} pH 7, ácido bórico 27,5 g l^{-1} , 20 ml EDTA (0,5 mol l^{-1} , pH 8)) 0,5X. Para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular cuyo fragmento menor es de 100 pares de bases (PB-L, Argentina). Los geles se visualizaron en fotodocumentador *Amersham Image Quant 800* (Cytiva).

4.3.14.2. Secuenciación de los fragmentos amplificados.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en el Laboratorio de Biotecnología acuática-FCByQ-UNR. CCT-Acuario del Río Paraná, Rosario, Argentina. La tecnología utilizada fue secuenciación de Sanger. Esta se realizó a partir de ambos extremos del fragmento amplificado correspondiente al gen 16S, obteniéndose dos secuencias por bacteria. A partir de las mismas se determinaron las secuencias consenso para los análisis posteriores.

4.3.14.3. Análisis filogenético.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa MEGA 11.0 (Tamura et al., 2021). Los alineamientos se realizaron aplicando el algoritmo *ClustalW* y las secuencias alineadas se analizaron filogenéticamente mediante el método UPGMA (del inglés '*Unweighted pair group method with arithmetic mean*') y las distancias se calcularon a través de '*p-distance*'. El soporte estadístico para los clados filogenéticos se evaluó mediante análisis de '*bootstrap*' utilizando un conjunto de datos de 1000 réplicas.

4.3.15. Extracción de esporas de *B. cinerea*.

Para la obtención de esporas de *B. cinerea*, se dejó crecer el hongo de 10 a 12 días en placas de Petri con medio APG suplementado con hojas de tomate hasta observar la presencia de esporas en la misma. Con ayuda de un bisturí, las esporas se depositaron en tubo cónico de 15 ml con 10 ml de una solución de Tween 20 al 0,02% (v/v). Se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 min, y posteriormente, se llevó a cabo el filtrado de las esporas con ayuda de jeringa con algodón estéril con la finalidad de eliminar el exceso de micelio. El filtrado resultante se centrifugó durante 15 min a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. El sedimento de esporas se lavó dos veces con H₂O destilada estéril para eliminar los restos de detergente. Una vez realizados los lavados, las esporas se resuspendieron en medio PDB (del inglés *Potato Dextrose Broth*) suplementado con sacarosa 10 mM y KH₂PO₄ 10 mM y se llevó a cabo la cuantificación de las mismas utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración final de 1×10^5 esporas ml⁻¹. Antes de realizar la infección de las hojas, las esporas se dejaron activando durante 2 horas en PDB suplementado a temperatura ambiente.

4.3.16. Infección con *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* previamente inoculadas con los aislamientos bacterianos seleccionados.

Con la finalidad de evaluar si las bacterias seleccionadas tenían algún efecto en la infección de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana*, se llevó a cabo la inoculación de las mismas con cada uno de los epífitos y endofitos seleccionados. La metodología de inoculación utilizada se explicó en la **sección 4.3.11**. Una vez transcurridos 15 días luego de la última inoculación, se infectaron 3 hojas por planta con dos gotas (5 µl) de suspensión de esporas (1×10^5 esporas ml⁻¹) de *B. cinerea*, una a cada lado de la nervadura central de la hoja. Las bandejas conteniendo a las plantas se cubrieron con film PVC para generar una cámara húmeda y así promover la infección con el fitopatógeno. A las 48 y 72 horas post-infección se cortaron las hojas y se montaron para poder fotografiar en lupa (*Stereo Microscope Discovery.V20*, Zeiss). Las áreas necróticas se midieron

utilizando el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA). Se utilizaron aproximadamente 10 plantas por tratamiento (control e inoculadas con cada bacteria), de las cuales 5 se utilizaron para cortar las hojas infectadas a las 48 h y las 5 plantas restantes para cortar las hojas infectadas a las 72 h.

4.3.17. Análisis estadístico.

El número de réplicas biológicas y técnicas utilizadas se detallan en la metodología de cada ensayo.

Los resultados de los experimentos se muestran como medias \pm SEM. Los datos se analizaron mediante *t*-Test a un nivel de significancia de 0,05 y mediante *2way* ANOVA para el ensayo detallado en la **sección 4.3.16**. En todos los casos, se utilizó el programa *GraphPad Prism* 8 (San Diego, CA, USA) para analizar y graficar los datos obtenidos.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Obtención de aislamientos bacterianos a partir de plantas de frutilla.

Con el objetivo de obtener los aislamientos bacterianos, se recolectaron hojas y frutos (en estadio de madurez 75 - 80% rojo) de plantas de frutilla (var. 'San Andreas'), los que se dividieron en seis grupos: 3 grupos para hojas, denominados HOJA I, HOJA II y HOJA III, y 3 grupos para frutos, llamados FRUTO I, FRUTO II y FRUTO III. A partir de cada grupo se aislaron bacterias epifitas y endofitas, es decir, aquellas bacterias que se encontraban sobre la superficie de cada órgano y aquellas que colonizaron el interior de los mismos, respectivamente (**Figura 4.1**).

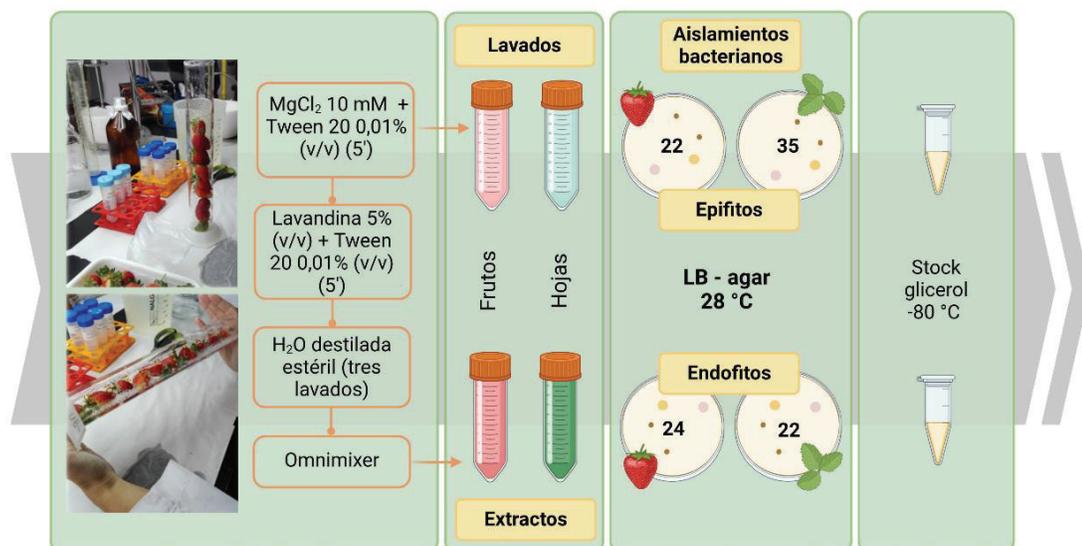


Figura 4.1. Aislamiento de bacterias epifitas y endofitas de plantas de frutilla. En el esquema se muestran los pasos para la obtención de bacterias epifitas y endofitas cultivables a partir de frutos y hojas de plantas de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch, var. 'San Andreas'). Se utilizaron los lavados para aislar a los epifitos y los extractos para el aislamiento de los endofitos. Las bacterias se cultivaron en medio LB a 28 °C (el número de aislamientos obtenidos en cada caso se indican en la figura), y posteriormente, se realizaron los gliceroles para su almacenamiento a -80 °C.

Como resultado, se obtuvieron 103 aislamientos bacterianos cultivables en medio LB, de los cuales 57 fueron aislados como epifitos (22 provenientes de frutos y 35 de hojas) y 46 como endofitos (24 provenientes de frutos y 22 de hojas). En la **Tabla 4.1.** se detallan los grupos de aislamientos bacterianos obtenidos y el nombre asignado a cada uno de ellos:

Tabla 4.1. Aislamientos bacterianos cultivables en medio LB obtenidos a partir de frutos y hojas de plantas de frutilla y su respectiva nomenclatura.

	Grupo	Epifitos	Endofitos
Hojas	I	HI1 - HI2 - HI3 - HI4 - HI5 - HI6 - HI7 HI8 - HI9 - HI10 - HI12	HI13 - HI14 - HI15 - HI16 - HI17 - HI18 - HI19 HI20 - HI21 - HI22 - HI23 - HI24 - HI25
	II	HII1 - HII2 - HII3 - HII4 - HII5 - HII6 - HII7 HII8 - HII9 - HII10 - HII11 - HII12 - HII13	HII15 - HII16 - HII17
	III	HIII1 - HIII2 - HIII3 - HIII4 - HIII5 - HIII6 HIII7 - HIII8 - HIII9 - HIII10 - HIII11	HIII12 - HIII13 - HIII14 - HIII15 - HIII16 - HIII17
Frutos	I	FI1 - FI2 - FI3 - FI4 - FI6 - FI7	FI8 - FI9 - FI10 - FI11 - FI12 - FI13
	II	FII1 - FII2 - FII3 - FII4 - FII5 - FII6	FII7 - FII8 - FII9 - FII10 - FII11 - FII12 FII13 - FII14 - FII15 - FII16
	III	FIII1 - FIII2 - FIII3 - FIII4 - FIII5 - FIII6 FIII7 - FIII8 - FIII9 - FIII10	FIII11 - FIII12 - FIII13 - FIII14 - FIII15 FIII16 - FIII18 - FIII19

4.4.2. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* por los aislamientos bacterianos.

Como una primera aproximación para la identificación de agentes de control biológico, se evaluó la capacidad de los aislamientos bacterianos obtenidos de inhibir o retrasar el crecimiento del fitopatógeno *B. cinerea* mediante ensayos de antagonismo *in vitro*. Este antagonismo se evaluó mediante enfrentamiento directo, esto es, mediante la acción de compuestos difusibles en el medio sintetizados por la bacteria, así como por la competencia por espacio y nutrientes entre el fitopatógeno y cada aislamiento bacteriano y, mediante enfrentamiento indirecto considerando sólo la acción de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) sintetizados por las bacterias. Para el caso del enfrentamiento directo, 82 aislamientos mostraron una inhibición significativa respecto a los controles (39 epifitos y 43 endofitos, **Figura 4.2 a-b**). En cuanto al enfrentamiento indirecto, un total de 69 aislamientos mostraron diferencias significativas en la síntesis de compuestos volátiles respecto a los controles (36 epifitos y 33 endofitos, **Figura 4.3 a-b**).

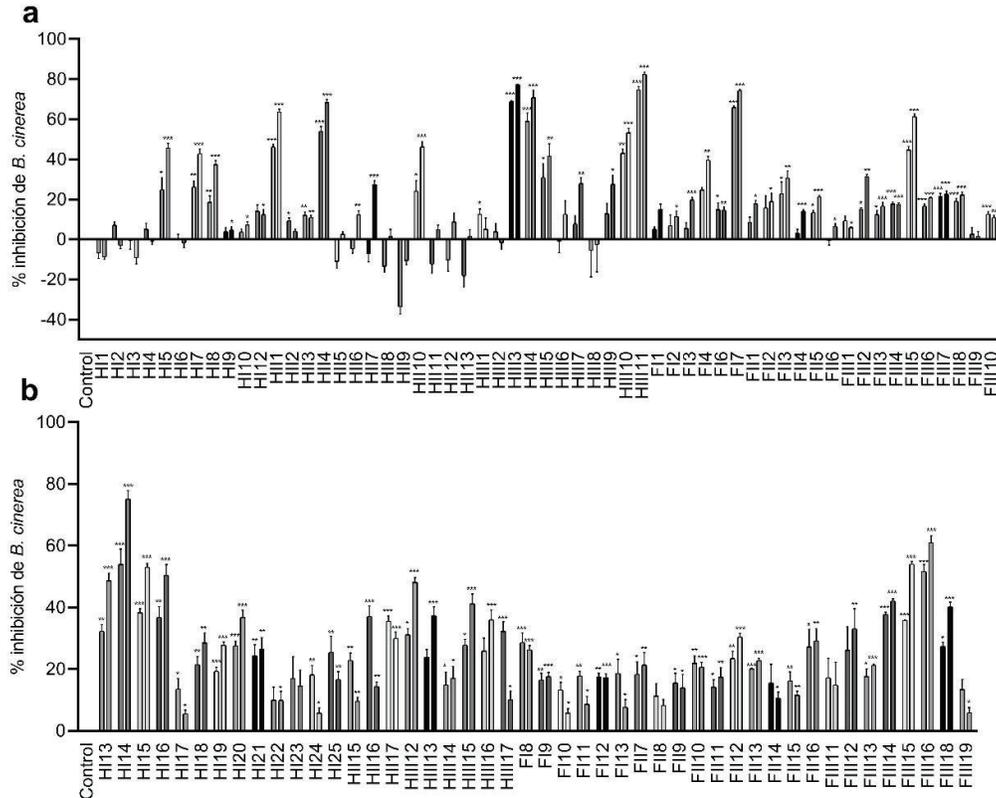


Figura 4.2. Porcentajes de inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* por los aislamientos bacterianos mediante confrontación directa. Se calcularon los porcentajes de inhibición de (a) epifitos y (b) endofitos a partir de las áreas de crecimiento de micelio medidas tras el co-cultivo o enfrentamiento directo de cada bacteria con el fitopatógeno. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

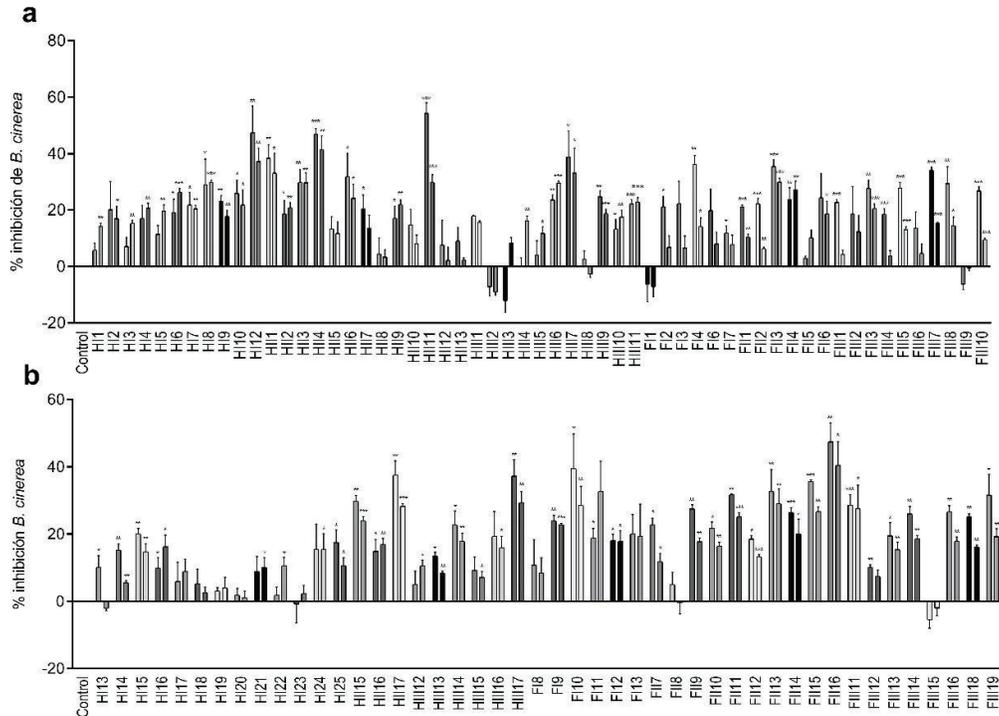


Figura 4.3. Porcentajes de inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* por los aislamientos bacterianos mediante confrontación indirecta. Se calcularon los porcentajes de inhibición de (a) epifitos y (b) endofitos a partir de las áreas de crecimiento de micelio medidas tras la acción de compuestos volátiles orgánicos sintetizados por cada bacteria contra el fitopatógeno. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Considerando los resultados de los dos ensayos, 49 aislamientos (22 epifitos y 27 endofitos) mostraron capacidad de inhibir o retrasar significativamente el crecimiento de *B. cinerea* por ambos mecanismos. El epifito HIII11 mostró el mayor porcentaje de inhibición (82,3%) por enfrentamiento directo, seguido del endofito HI14 (75,1%). Mientras que el epifito HII4 y el endofito FII16 mostraron los mayores porcentajes de inhibición por acción de compuestos volátiles (41,4% y 40,4%, respectivamente) (Figura 4.4 a-b).

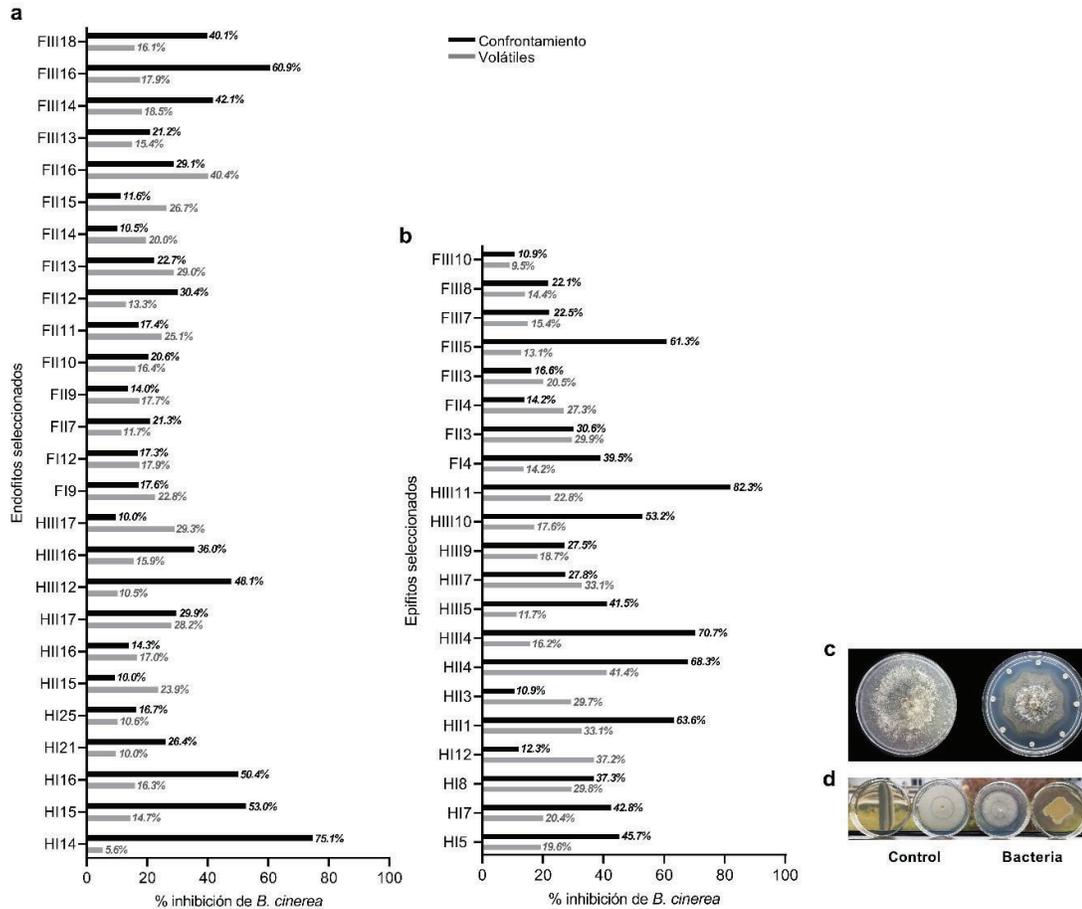


Figura 4.4. Porcentajes de inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* por los aislamientos bacterianos seleccionados. Los porcentajes de inhibición fueron calculados a partir de los (a) endofitos y (b) epifitos que mostraron diferencias significativas en el análisis *t*-Test contra el control (Figura 4.2 y 4.3). La barra negra corresponde a los resultados de inhibición obtenidos por confrontación directa y la barra gris indica los porcentajes obtenidos por la acción de compuestos volátiles. En (c) y (d) se muestran ejemplos de cómo se observa una inhibición por confrontación directa y una inhibición por acción de compuestos volátiles, respectivamente.

4.4.3. BOX-PCR.

Luego de la primera selección realizada (Figura 4.4 a-b), y con el objetivo de identificar y descartar aislamientos redundantes, se utilizó la técnica BOX-PCR. Esta metodología permite amplificar secuencias altamente conservadas entre las bacterias estableciendo un patrón de bandas característico para cada una, permitiendo, mediante comparación de estos patrones, discriminar si se trata o no de la misma bacteria (Versalovic et al., 1994). El estudio se realizó para los 49 aislamientos que mostraron capacidad de inhibir o retrasar el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* tanto por confrontación directa como indirecta. En primer lugar, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de cada bacteria (sección 4.3.3). Luego, se aplicó la técnica BOX-

PCR utilizando cebadores específicos BOXA1R (**sección 4.3.4**). Los patrones de bandas amplificadas para cada aislamiento se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TBE 0,5X y se visualizaron y fotografiaron utilizando el fotodocumentador *Amersham Image Quant 800* (Cytiva). A partir de las fotografías obtenidas, y utilizando el *software GelAnalyzer 19.1*, se pudo identificar la presencia de dos aislamientos que presentaban el mismo patrón de bandas, y que exhibían a su vez similitudes en sus características morfológicas (color, y forma de crecimiento) (datos no mostrados). Así, dichas bacterias redundantes fueron descartadas, y se continuó con un total de 47 aislamientos no redundantes que presentaron antagonismo *in vitro* hacia *B. cinerea* (**Figura 4.4**).

4.4.4. Formación de *biofilms*.

Las biopelículas o *biofilms* son comunidades bacterianas asociadas a una superficie, cubiertas por una matriz extracelular producida por ellas mismas, compuestas principalmente por exopolisacáridos (EPS) y proteínas (Vlamakis et al., 2013). La formación de estas estructuras genera condiciones favorables para la supervivencia de las bacterias en el medio natural (Cairns et al., 2014) y ha sido estudiada como una característica importante en el control biológico de enfermedades en plantas (Ahn et al., 2007; Steddom et al., 2002). En el presente trabajo de Tesis, se evaluó la formación de *biofilms* por los 47 aislamientos no redundantes en placas multipocillo utilizando cristal violeta (**sección 4.3.5**). Se tomaron los valores de absorbancia a 600 nm (A_{600nm}) tras 24 h de incubación de la placa a 28 °C, y luego de la tinción con el colorante (A_{590nm}), lo cual indica la formación de *biofilms*. La relación A_{590nm}/A_{600nm} se calculó para cada bacteria y los valores obtenidos se graficaron en orden decreciente por un lado para los epifitos (**Figura 4.5 a**) y por el otro, para los endofitos (**Figura 4.5 b**). De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que 17 aislamientos (8 epifitos y 9 endofitos) mostraron la mayor capacidad de formar *biofilms in vitro* en comparación con el resto de las bacterias evaluadas. Los mayores valores de A_{590nm}/A_{600nm} fueron para los epifitos HII1 (48,462), HI5 (40,945), HII4 (39,695), y HIII11 (31,408) (**Figura 4.5 a**), y para el endofito HIII16 (20,710) (**Figura 4.5 b**).

4.4.5. Producción de enzimas hidrolíticas.

Para profundizar en la caracterización de los 47 aislamientos no redundantes seleccionados, se evaluó también la capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas. Se utilizaron medios que contenían los sustratos carboximetilcelulosa (CMC), gelatina y Tween-80 para determinar la producción de celulasas, proteasas y lipasas, respectivamente. Mediante mecanismos de revelado específicos (**sección 4.3.6**) se observaron los resultados positivos como un halo de degradación o un cambio de color alrededor de la bacteria (**Figura 4.5 d**). Aproximadamente el 76% de los epifitos presentaron capacidad de sintetizar al menos una de las

enzimas evaluadas, mientras que, para el caso de los endofitos, sólo el 31% mostró dicha capacidad (**Figura 4.5 c**). De los 47 aislamientos, sólo 5 fueron capaces de producir las 3 enzimas evaluadas, cuatro epifitos (HI12, HII2, HIII9 y HIII11) y un endofito (FIII14) (**Figura 4.5 c**).

Tomando en cuenta tanto la capacidad de inhibir o retrasar el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, como de formar *biofilms* y de sintetizar al menos una de las enzimas evaluadas, se decidió focalizar el estudio en 12 aislamientos bacterianos: ocho epifitos (HI5, HII1, HII4, HIII4, HIII5, HIII7, HIII9, y HIII11), y cuatro endofitos (HIII16, FII13, FIII14 y FIII18) (resaltados en gris en la **Figura 4.5**). Por esta razón, en las secciones siguientes se continuó con la caracterización de rasgos relevantes para el control biológico como así también para la promoción del crecimiento vegetal tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

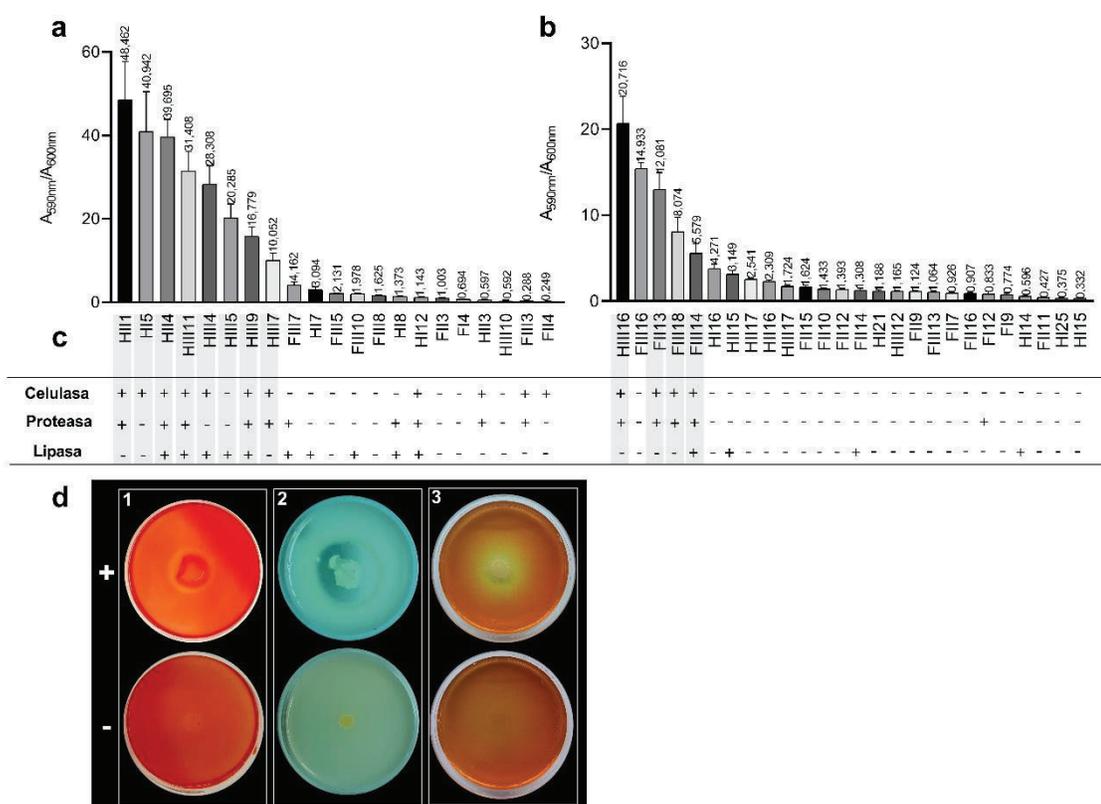


Figura 4.5. Formación de *biofilms* y síntesis de enzimas hidrolíticas por los aislamientos bacterianos.

Se tomaron los valores de A_{600nm} (crecimiento bacteriano) a las 24 h de incubación, y los valores de A_{590nm} se midieron tras la tinción con cristal violeta (formación de *biofilms*). Se calculó la relación A_{590nm}/A_{600nm} para cada bacteria y se graficaron los valores de mayor a menor para los (a) epifitos y (b) endofitos. (c) La producción de celulasas, proteasas y lipasas se indican como positiva (+) y negativa (-). Los aislamientos bacterianos que resultaron positivos en ambos ensayos se resaltan en gris. (d) Resultados positivos (+) y negativos (-) para la producción de celulasas (1), proteasas (2) y lipasas (3).

4.4.6. Movilidad tipo *swimming* y *swarming*.

La caracterización de los doce aislamientos seleccionados se continuó con la evaluación de movilidad tipo *swimming* (movilidad de una célula individual sobre medio líquido o semilíquido) y *swarming* (movilidad de una población de células sobre medio semisólido) en medio mínimo con diferentes concentraciones de agar. Como resultado, cinco epifitos (HII1, HII4, HIII4, HIII5 y HIII11) mostraron ambos tipos de movimientos, mientras que HI5 resultó positivo sólo para movilidad tipo *swimming*, y HIII7 y HIII9 mostraron sólo *swarming* (**Figura 4.6**). Por otro lado, los cuatro endofitos evaluados fueron positivos para *swarming* y negativos para *swimming* (**Figura 4.6**).

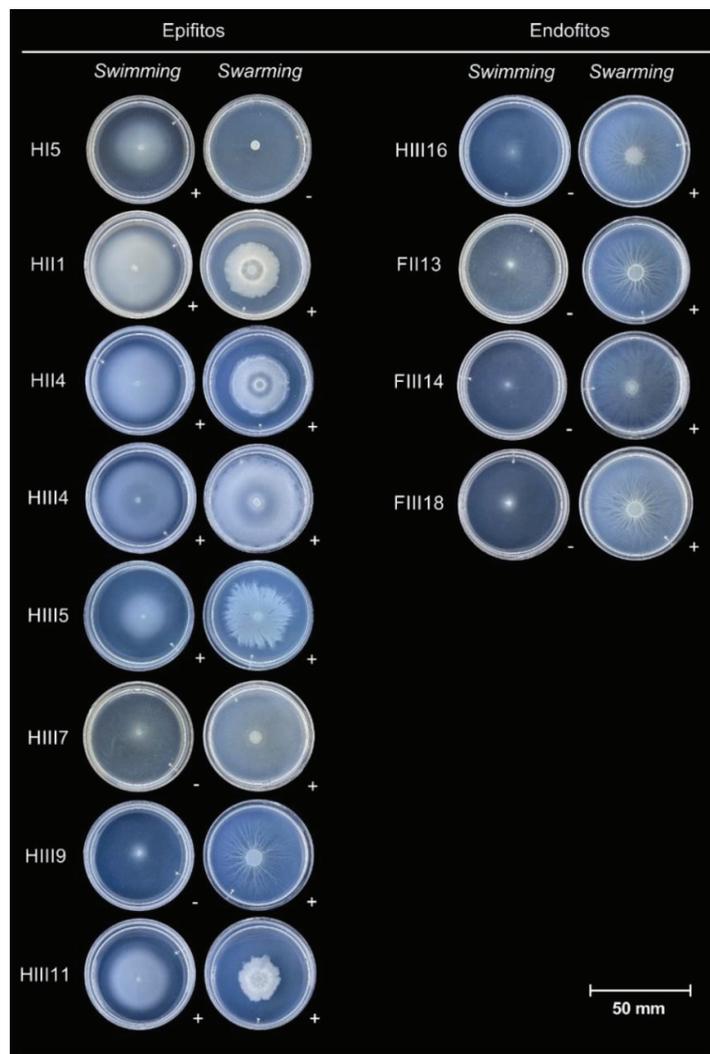


Figura 4.6. Evaluación de movilidad de los aislamientos seleccionados. Cada bacteria se evaluó para movilidad tipo *swimming* y *swarming* en medio mínimo M9 con diferentes concentraciones de agar (0,6 y 0,3% (p/v), respectivamente). Los resultados se indican como positivos (+) y negativos (-).

4.4.7. Producción de sideróforos.

La producción de sideróforos se evaluó utilizando la metodología O-CAS (del inglés *over-CAS*). Previamente, las bacterias se crecieron durante 24 h en medio mínimo M9. Al momento de la inoculación en las placas, se ajustó la concentración de cada una a $OD_{600} \sim 0,8$. Se colocaron 5 μ l de cada suspensión de bacteria por placa, mientras que placas sin bacteria se utilizaron como control. Luego de 5 días de incubación a 28 °C, una solución de CAS-agar se colocó sobre las mismas. Los resultados positivos se observaron como un cambio de color de azul a amarillo sobre la bacteria. Seis de los ocho epifitos seleccionados mostraron resultados positivos (HI5, HII1, HII4, HIII4, HIII5 y HIII11), mientras que los cuatro endofitos evaluados mostraron resultados negativos (Figura 4.7).

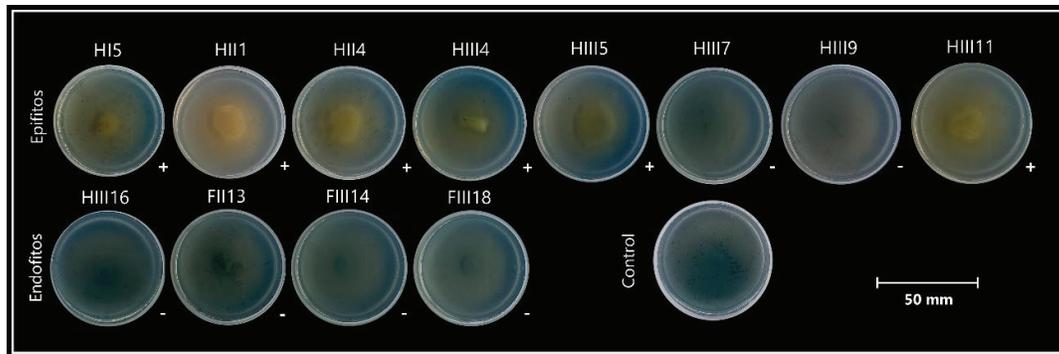


Figura 4.7. Producción de sideróforos. Los 12 aislamientos seleccionados se evaluaron para la producción de sideróforos en medio mínimo M9 utilizando la metodología O-CAS. Los resultados se indican como positivos (+) y negativos (-).

4.4.8. Evaluación de la promoción del crecimiento en plántulas de *A. thaliana*.

Con la finalidad de determinar si los aislamientos seleccionados poseen capacidad de promover el crecimiento vegetal, se evaluó el efecto de la inoculación con los mismos en plántulas de *A. thaliana* Col-0. Para esto, se utilizaron 10 plántulas por tratamiento de 15 días de edad (estadio 1.02) crecidas en medio MS-agar, las cuales fueron inoculadas con 5 μ l de solución de bacteria (5×10^8 UFC ml^{-1}), mientras que las plántulas control se trataron con $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,0 estéril. A los 13 días post-inoculación, se midió el largo de la raíz, el número de raíces laterales y el peso fresco de la parte aérea de cada plántula (Figura 4.8). Con respecto al largo de la raíz, no se observó un incremento significativo en las plántulas tratadas con las distintas bacterias respecto a las plántulas control (Figura 4.8 a). Sin embargo, las plántulas inoculadas con los epifitos HII1, HII4, HIII4 y HIII11 mostraron un mayor número de raíces laterales respecto al control (Figura 4.8 b). Por otro lado, se observó un incremento significativo en el peso fresco de la parte aérea de las plántulas tratadas con HI5, HII1, HIII4 y HIII11 (Figura 4.8 c). Ninguno de los endofitos evaluados mostraron resultados positivos relacionados a la promoción del crecimiento. De

manera llamativa, el epifito HIII9 y los endofitos HIII16 y FII13, mostraron una alteración en el desarrollo de las plántulas, resultando en un acortamiento de la raíz, menor cantidad de raíces laterales y desarrollo de la parte aérea de las mismas en comparación con el control (**Figura 4.8**).

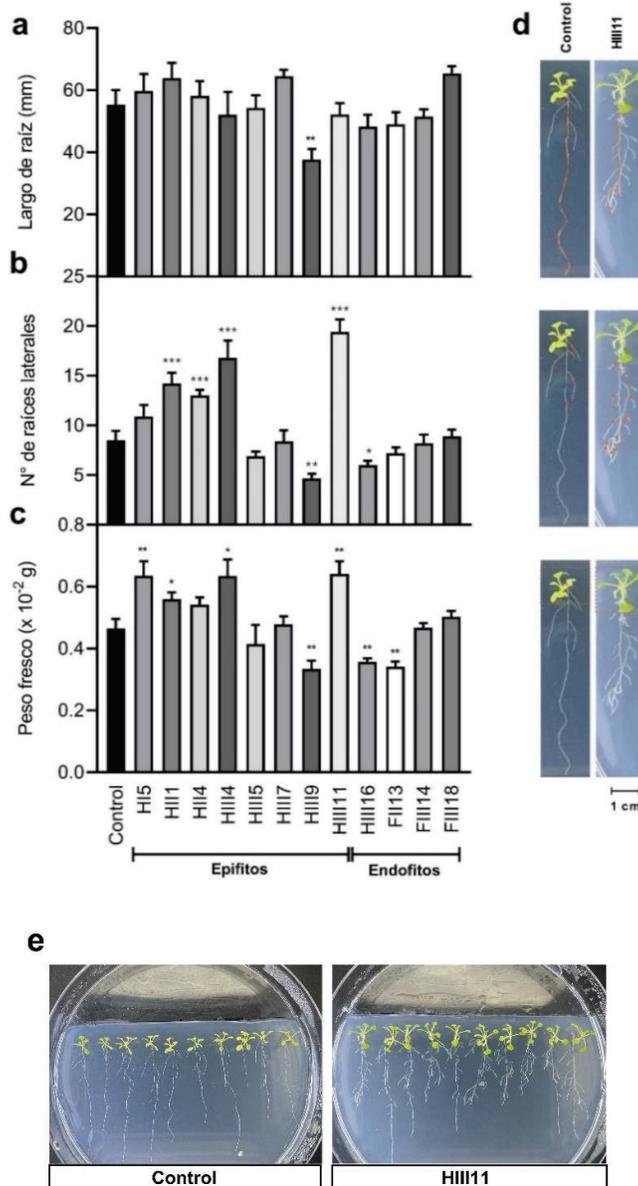


Figura 4.8. Promoción del crecimiento en plántulas de *A. thaliana*. Plántulas de 15 días de edad fueron inoculadas con cada uno de los aislamientos bacterianos seleccionados (5 μ l por plántula, 5×10^8 UFC ml⁻¹). Trece días post-inoculación (dpi) se midió (a) el largo de la raíz (mm), (b) el número de raíces laterales, y (c) el peso fresco de la parte aérea de cada plántula. Los resultados obtenidos para cada bacteria se analizaron mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). En (d) se muestran plántulas de *A. thaliana* 13 dpi: control e inoculadas con HIII11. En (e) se muestran las placas con las 10 plántulas control e inoculadas con HIII11 13 dpi.

4.4.9. Colonización o crecimiento de las bacterias en plántulas de *A. thaliana*.

Para determinar si los aislamientos bacterianos son capaces de colonizar y crecer en plántulas de *A. thaliana*, se inocularon plántulas de 15 días de edad con 5 μ l de suspensión bacteriana (1×10^8 UFC ml^{-1}) correspondiente a cada aislamiento seleccionado. A las 24, 72 y 120 h se llevó a cabo el aislamiento de cada bacteria a partir de las plántulas previamente inoculadas y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Como resultado, se observó que todos los aislamientos lograron crecer en plántulas de *Arabidopsis*. Los aislamientos HI5, HII4, HIII9, HIII11 y FII13 mostraron un pico de crecimiento a las 72 h, disminuyendo el recuento de las mismas a las 120 h (Figura 4.9 a, c, g, h, j). El resto de las bacterias evaluadas continuaron su crecimiento a través del tiempo, algunas en mayor medida que otras, como en el caso de los endofitos HIII16, FIII14 y FIII18 donde se observó un aumento considerable en el número de UFC por plántula a las 120 h (Figura 4.9 i, k, l).

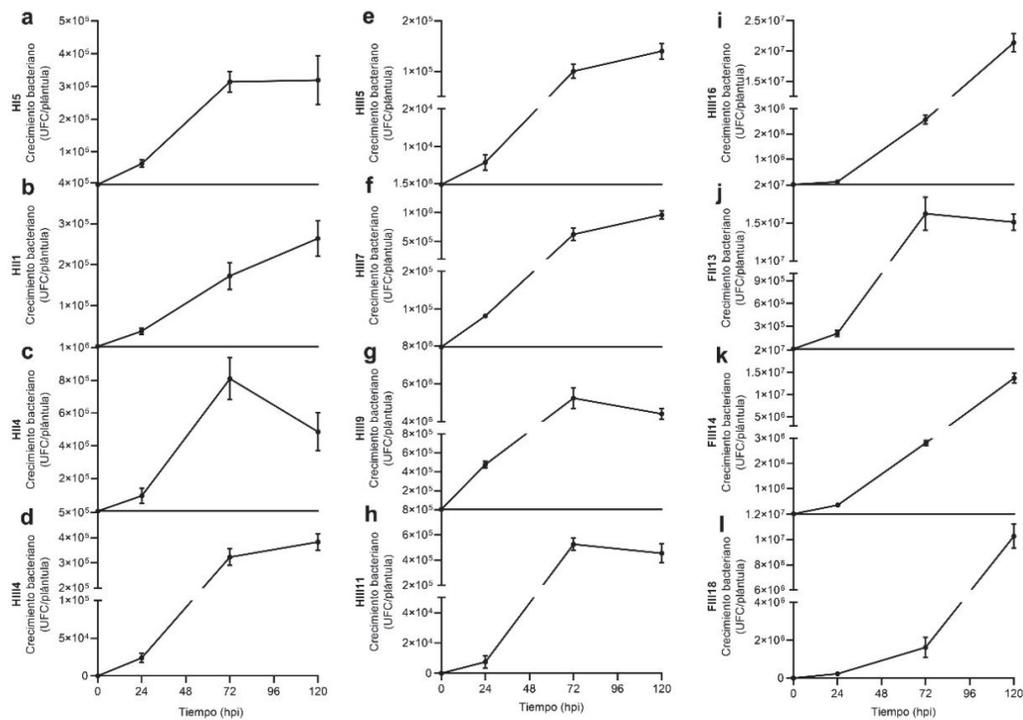


Figura 4.9. Crecimiento de los aislamientos bacterianos en plántulas de *A. thaliana*. Plántulas de *Arabidopsis* Col-0 de 15 días de edad se inocularon con cada aislamiento bacteriano (5 μ l por plántula, 1×10^8 UFC ml^{-1}). A las 24, 72 y 120 hpi (horas postinoculación) se realizó el aislamiento y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de (a) HI5, (b) HII1, (c) HII4, (d) HIII4, (e) HIII5, (f) HIII7, (g) HIII9, (h) HIII11, (i) HIII16, (j) FII13, (k) FIII14 y (l) FIII18. Los resultados se expresaron como UFC por plántula.

4.4.10. Evaluación de la promoción del crecimiento en plantas adultas de *A. thaliana*.

Debido a los cambios observados con respecto a la promoción del crecimiento en plántulas de *Arabidopsis* previamente inoculadas con las bacterias, se decidió evaluar si la inoculación con cada una de ellas a lo largo del desarrollo de la planta generaba cambios morfológicos en la planta adulta. Para esto, se realizaron dos inoculaciones con las bacterias a los 22 y 29 días de edad de las plantas, y se midió el peso fresco de la roseta, peso fresco de la raíz y largo de la raíz 15 días después de la última inoculación (plantas de 44 días de edad). Como resultado, se observó un aumento significativo en el peso fresco de la roseta de plantas previamente inoculadas con los epifitos HI5 y HIII11 respecto a las plantas control, mientras que no hubo diferencias significativas en esta característica en las plantas inoculadas con el resto de las bacterias evaluadas (**Figura 4.10 a**). En lo que respecta al peso fresco de la raíz, se observaron incrementos en la mayoría de las plantas inoculadas respecto a las plantas control (**Figura 4.10 b**). Siete epifitos (HI5, HII1, HIII4, HIII5, HIII7, HIII9 y HIII11) y 2 endofitos (FII13 y FIII18) mostraron diferencias significativas para esta característica. Para el resto de los aislamientos (el epifito HII4 y los endofitos HIII16 y FIII14), los valores fueron similares o levemente superiores respecto al control (**Figura 4.10 b**). Cuando se midió el efecto de la inoculación con cada aislamiento en el largo de la raíz, no se observaron diferencias significativas respecto a las plantas control (**Figura 4.10 c**).

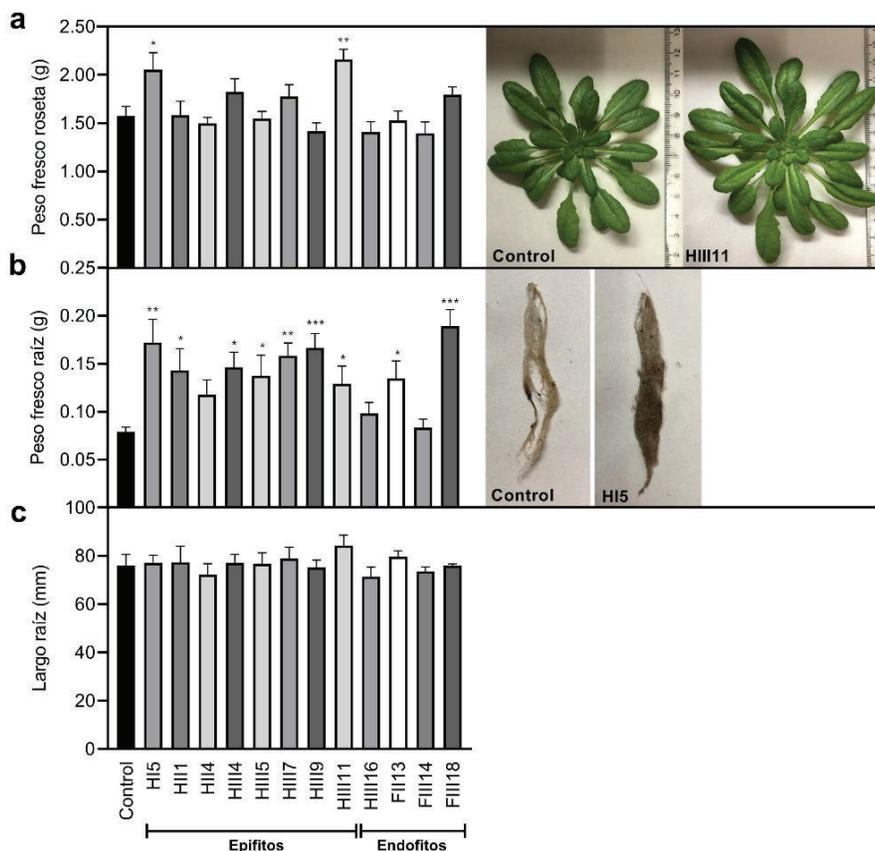


Figura 4.10. Promoción del crecimiento de plantas de *A. thaliana*. Se inocularon entre 5 y 6 plantas por tratamiento (en macetas individuales) dos veces (a los 22 y 29 días de edad) con una suspensión de bacteria (1×10^8 UFC ml^{-1}) o con MgCl_2 10 mM, pH 7,0 para los controles. Luego de 15 días de la última inoculación, se determinaron **(a)** peso fresco de la roseta, **(b)** peso fresco de la raíz y **(c)** largo de la raíz de cada una de las plantas. Los resultados para cada bacteria se analizaron mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Una vez tomados los valores correspondientes al peso fresco, las rosetas y raíces se colocaron por separado en bolsas de papel madera en estufa a 70 °C durante 10 días. Transcurrido ese tiempo, se midió el peso seco de cada órgano. Los epifitos HI5 y HI111, y el endofito FIII18 presentaron un peso seco de la parte aérea significativamente mayor que el control (**Figura 4.11 a**). En cuanto a las raíces, el peso seco de aquellas provenientes de plantas inoculadas con los epifitos HI5, HI14, HI17 y HI19, y con el endofito FIII18, fue mayor en comparación al peso seco de raíces provenientes de plantas control (**Figura 4.11 b**).

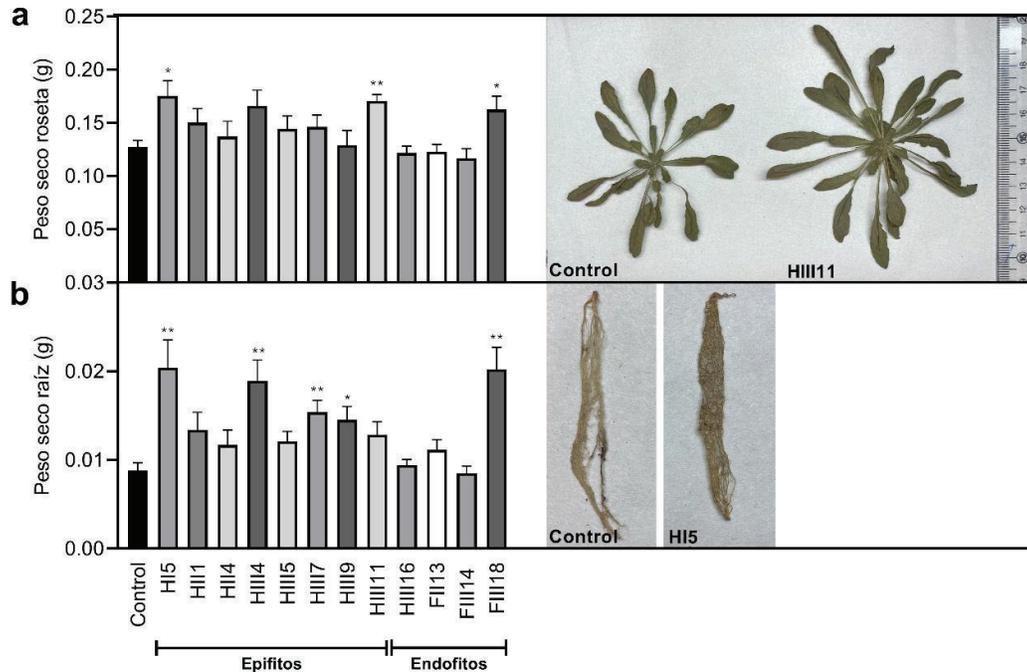


Figura 4.11. Promoción del crecimiento de plantas de *A. thaliana*. Se inocularon entre 5 y 6 plantas por tratamiento (en macetas individuales) dos veces (a los 22 y 29 días de edad) con una suspensión de bacteria (1×10^8 UFC ml^{-1}) o con MgCl_2 10 mM, pH 7,0 estéril para los controles. A los 15 días posteriores a la última inoculación, (a) las rosetas y (b) las raíces se incubaron en estufa a 70 °C durante 10 días para determinar el peso seco de cada uno. Los resultados para cada bacteria se analizaron mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.4.11. Producción de fitohormonas.

Los aislamientos bacterianos seleccionados fueron evaluados por su habilidad de producir fitohormonas como una característica de promoción del crecimiento vegetal (AIA, ABA y AG_3) o de protección de la planta contra patógenos (AS y AJ). Con respecto a la producción de AIA, todos los aislamientos fueron capaces de producir esta hormona en cantidades similares en un rango de 48 a 59 ng ml^{-1} (Tabla 4.2). La mayor cantidad de AG_3 fue producida por el aislamiento HI5 (19,9 ng ml^{-1}), la menor cantidad por HII1 (5,5 ng ml^{-1}), y el resto de los aislamientos presentaron valores intermedios. A su vez, en cuanto a la producción de ABA, el endofito FIII14 y el epífita HII1 se destacan por encima del resto de los aislamientos presentando valores de 442,6 ng ml^{-1} y 362,8 ng ml^{-1} , respectivamente. Con respecto a las hormonas de defensa, todos los aislamientos mostraron habilidad de producir ambas, con valores similares entre ellas para el caso del AS, mientras que, en el caso del AJ, los niveles obtenidos para el epífita HII4 fueron entre un 32,8 a 76,9% mayores que los obtenidos para las demás bacterias (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Producción de fitohormonas. La concentración (ng ml⁻¹) de AIA, AS, AJ, ABA y AG₃ se determinaron mediante HPLC-MS.

		Fitohormonas (ng ml ⁻¹)				
		AIA	AS	AJ	ABA	AG ₃
Epífitos	H15	53,9	5,0	52,1	268,5	19,9
	H11	59,3	6,9	41,2	362,8	5,5
	H14	49,9	6,2	77,5	138,7	10,9
	H14	57,5	3,6	35,8	85,7	15,0
	H15	51,6	5,9	17,9	106,3	8,3
	H17	48,3	5,1	33,7	79,2	8,2
	H19	48,4	4,7	21,3	170,1	9,4
	H11	52,1	7,0	46,0	81,4	10,5
Endófitos	H16	48,5	4,8	18,0	146,3	6,8
	F13	48,5	4,9	38,5	152,8	7,6
	F14	48,5	4,7	30,9	442,6	8,7
	F18	48,5	4,9	26,2	100,9	9,1

4.4.12. Inhibición del crecimiento *in vitro* del fitopatógeno *Rhizopus stolonifer* por los aislamientos bacterianos seleccionados.

Se evaluó la capacidad de los aislamientos bacterianos seleccionados de inhibir el crecimiento *in vitro* de *R. stolonifer* con la finalidad de sumar otro importante fitopatógeno de frutilla al presente estudio. La evaluación se realizó mediante enfrentamiento directo o co-cultivo entre cada bacteria y el hongo, y mediante la acción de sólo compuestos volátiles producidos por la bacteria. Como resultado, de los 12 aislamientos evaluados, 9 lograron inhibir o retrasar el crecimiento de *R. stolonifer* por enfrentamiento directo: los epífitos H15, H11, H14, H14, H15, H19 y H11, y los endófitos F13 y F14 (**Figura 4.12 a**). Los epífitos H14, H11 y H15 presentaron los mayores porcentajes de inhibición (41,39, 40,64 y 40,14%, respectivamente) en este ensayo. En cuanto a la inhibición por compuestos volátiles, si bien se observan diferencias significativas para la mayoría de los aislamientos respecto al control, la mayor capacidad de inhibición la presentaron los epífitos H17, H11 y H14 con porcentajes de inhibición de 38,96, 34,64 y 33,65%, respectivamente (**Figura 4.12 b**). El epífito H19 y el endófito F13 no mostraron capacidad de inhibir o retrasar de manera significativa el crecimiento de *R. stolonifer* a través de la síntesis de compuestos volátiles orgánicos (**Figura 4.12 b**).

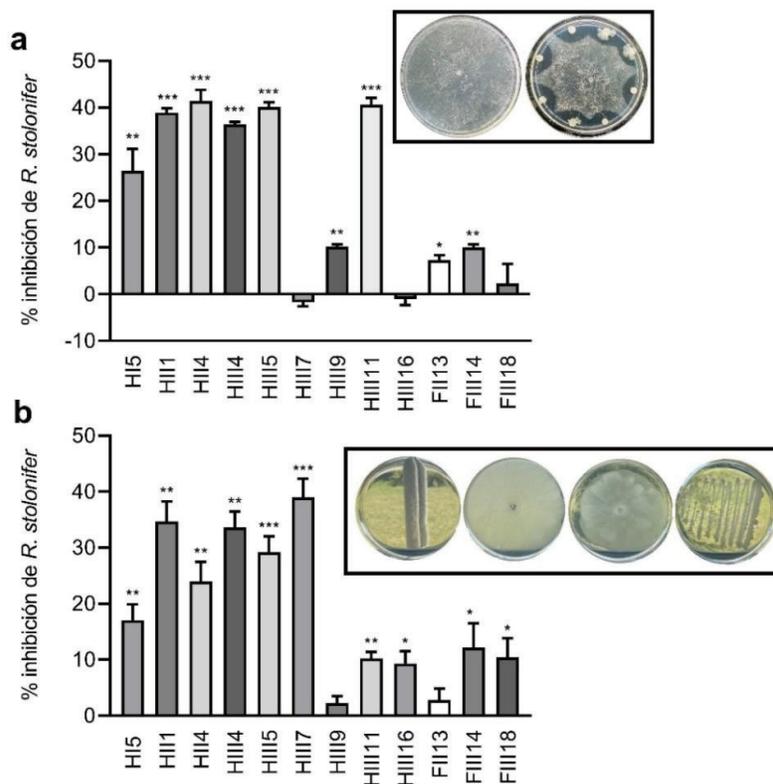


Figura 4.12. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *R. stolonifer*. Se calcularon los porcentajes de inhibición *in vitro* de *R. stolonifer* obtenidos para cada aislamiento bacteriano mediante (a) enfrentamiento directo o co-cultivo y (b) la acción de compuestos volátiles o método indirecto. El análisis estadístico se realizó comparando las áreas de micelio a las 24 y 48 h mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Los resultados graficados corresponden a las medidas obtenidas a tiempo final (48 h).

4.4.13. Identificación de los aislamientos bacterianos mediante secuenciación y análisis filogenético del gen del ARNr 16S.

Se amplificó mediante PCR el gen del ARNr 16S para los 12 aislamientos bacterianos en estudio y a partir de los productos amplificados, se llevó a cabo la secuenciación mediante Sanger, la cual se realizó a partir de cada cebador, obteniéndose secuencias de aproximadamente 700 pb (pares de bases). A partir de las mismas, se obtuvo la secuencia consenso correspondiente a una secuencia parcial del gen del ARNr 16S de cada bacteria. El análisis filogenético de las mismas dio como resultado que los aislamientos evaluados se agrupan dentro del género *Bacillus* (Figura 4.13).

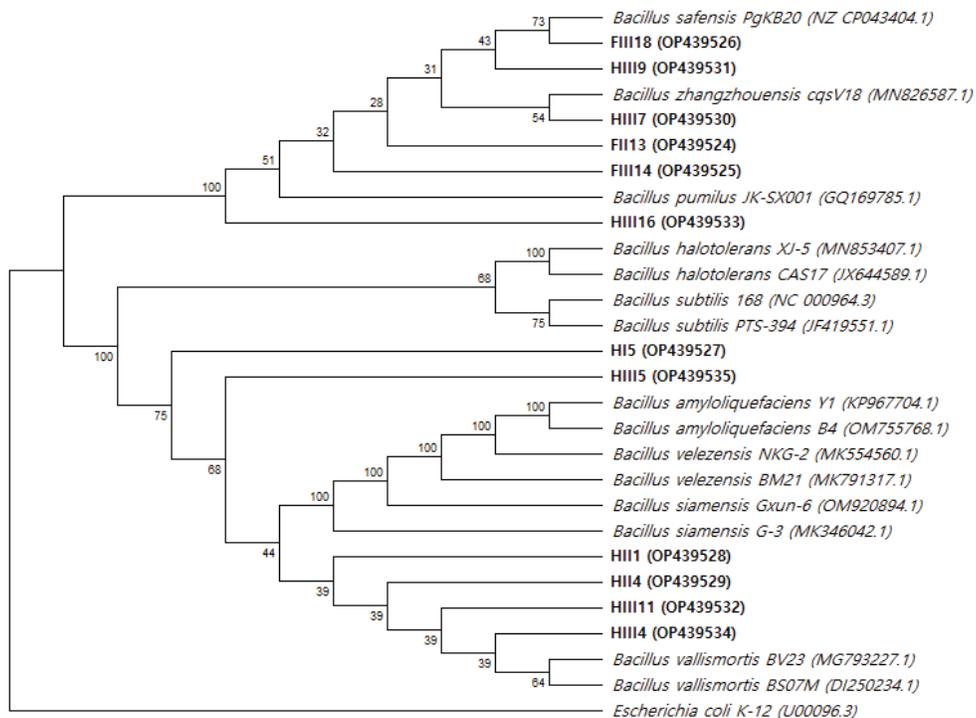


Figura 4.13. Análisis filogenético del gen del ARNr 16S de las bacterias seleccionadas. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se ingresaron en las bases de datos (GenBank, NCBI) y se alinearon utilizando *ClustalW*. El árbol se construyó utilizando el algoritmo UPGMA, y las distancias filogenéticas se calcularon por el método de *p-distance*.

4.4.14. Evaluación de la infección con *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis* previamente inoculadas con los aislamientos bacterianos.

En esta ocasión, decidimos evaluar si la inoculación previa de plantas de *A. thaliana* con cada uno de los aislamientos bacterianos en estudio resultaba en algún efecto sobre la respuesta vegetal tras la infección con *B. cinerea*. Este ensayo se realizó como complemento a la caracterización y evaluación de cada bacteria, con la finalidad de seleccionar a aquella candidata que reúna el mayor número de características que se consideran positivas para la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de fitopatógenos fúngicos, permitiendo continuar el trabajo con dicha bacteria. Los resultados de las áreas de infección medidas a las 48 y 72 hpi (horas post-infección) se muestran en la **Figura 4.14**. Se observa en general que las plantas inoculadas con las bacterias presentan menor área de infección al compararlas con los controles, excepto para aquellas inoculadas con HIII9, HIII16 y FIII18 en las cuales la infección avanzó más a tiempo final (72 hpi) (**Figura 4.14**). Se destaca que, el análisis de los resultados arrojó que sólo las plantas inoculadas con HIII11 mostraron un área de crecimiento de *Botrytis* significativamente menor que el control a las 72 hpi (**Figura 4.14**).

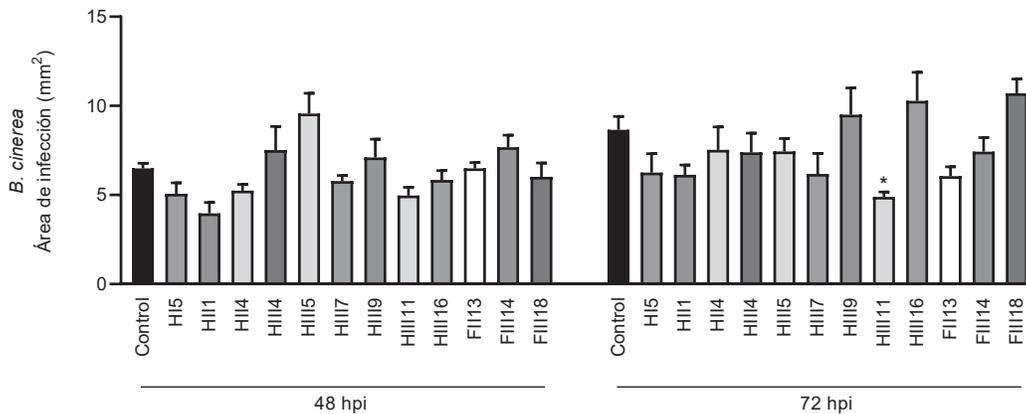


Figura 4.14. Infección con *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* previamente inoculadas con las bacterias seleccionadas. Tres hojas por planta fueron infectadas con una suspensión de esporas de *B. cinerea* (1×10^5 esporas ml^{-1}) y se midieron las áreas necróticas a las 48 y 72 hpi (horas post-infección). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante *2way*-ANOVA (* $p < 0.05$).

Considerando todos los resultados obtenidos para la caracterización *in vitro* de los aislamientos, la evaluación de la promoción del crecimiento tanto en plántulas como planta adulta de *A. thaliana* y la infección con *B. cinerea* en plantas inoculadas con los aislamientos seleccionados, consideramos al aislamiento HIII11 como potencial agente de control biológico y promotor del crecimiento vegetal para continuar el trabajo de Tesis tanto en *A. thaliana* como en plantas de frutilla. Esta bacteria presentó capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de los dos fitopatógenos evaluados (*B. cinerea* y *R. stolonifer*, **Figura 4.4** y **Figura 4.12**, respectivamente), de formar *biofilms* (**Figura 4.5 a**), y de sintetizar las tres enzimas hidrolíticas evaluadas (**Figura 4.5 c**). A su vez, presentó movilidad tipo *swimming* y *swarming* (**Figura 4.6**), capacidad de producir sideróforos (**Figura 4.7**) y capacidad de colonizar y crecer en plántulas de *A. thaliana* (**Figura 4.9 h**). Cuando se evaluó la promoción del crecimiento, las plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con HIII11 presentaron mayor número de raíces laterales y un aumento en el peso fresco de la parte aérea (**Figura 4.8**), mientras que en plantas adultas se observó un aumento en el peso fresco de la roseta y raíz (**Figura 4.10 a y b**, respectivamente) y en el peso seco de la roseta (**Figura 4.11 a**). Por último, cuando se evaluó la infección con *B. cinerea* en las plantas previamente inoculadas con cada uno de los aislamientos bacterianos seleccionados, sólo para el caso de las plantas inoculadas con HIII11 se observó una menor área necrótica a las 72 hpi (**Figura 4.14**).

4.5. DISCUSIÓN

La frutilla es un cultivo susceptible al ataque por diversos patógenos fúngicos, y el manejo precosecha de esta especie requiere el control de enfermedades que afectan a la planta entera (Garrido et al., 2016). Durante la postcosecha, la alta tasa de ablandamiento del fruto conlleva pérdidas por daño mecánico y por ataque de patógenos, siendo la extensión de ambos procesos marcadamente influenciado por el cultivar de frutilla en estudio (Azam et al., 2019; Quarshi et al., 2023; Seijo et al., 2008). Asimismo, se destaca la asociación propuesta por Hassani et al. (2022) entre el microbioma de frutilla y la resistencia de la planta a enfermedades. En este sentido, el cultivar 'San Andreas' presenta una productividad casi ininterrumpida a lo largo del año y frutos con atributos de calidad buscados por productores y consumidores (Karaca & Pirlak, 2022; Shaw & Larson, 2009). Notablemente, 'San Andreas' se describe como una variedad con elevada resistencia a enfermedades en comparación a otros cultivares (Shaw & Larson, 2009). Por esta razón, el aislamiento y la caracterización de microorganismos obtenidos a partir de hojas y frutos de frutilla de la variedad 'San Andreas' y su evaluación como potenciales agentes de control biológico y promotores del crecimiento vegetal fue de interés para el presente trabajo de Tesis.

Los hongos son los fitopatógenos que mayor impacto económico tienen en el cultivo de frutilla. Uno de los principales, *Botrytis cinerea*, puede atacar a la planta de frutilla durante la pre- y postcosecha, causando una enfermedad conocida como podredumbre gris (Feliziani & Romanazzi, 2016; Petrasch et al., 2019). La infección por *B. cinerea* puede ocurrir antes del cuajado, pero usualmente permanece latente hasta la maduración del fruto (Feliziani & Romanazzi, 2016). Se cree que el aumento en la susceptibilidad se debe a la disminución de la integridad de la pared celular y del contenido de compuestos antifúngicos que brindan resistencia a la infección en frutos rojos (Amil-Ruiz et al., 2011). Por esto, se decidió evaluar la capacidad de los endofitos y epifitos aislados de inhibir o retrasar el crecimiento *in vitro* de este fitopatógeno. Como resultado, el 80% del total de 103 aislamientos (57 epifitos y 46 endofitos) fueron capaces de inhibir el crecimiento de este patógeno a través de la síntesis de compuestos difusibles y competencia por espacio o nutrientes (**Figura 4.2**), mientras que el 70% de las bacterias aisladas inhibió a *B. cinerea* mediante la producción de compuestos volátiles (**Figura 4.3**). En este sentido, una cepa de *Bacillus siamensis* aislada de un fruto con textura delicada como lo es el arándano sintetiza VOCs con la habilidad de inhibir marcadamente el crecimiento del micelio de *B. cinerea* (Wang et al., 2022). Los autores informaron que la naturaleza química de los VOCs identificados incluyó aldehídos, cetonas, alcanos, alcoholes, ácidos y ésteres, compuestos aromáticos, un alqueno y un compuesto de azufre, siendo 1-heptanol, 2-etilhexanol y 1,3-xileno los que mostraron ser más tóxicos para el patógeno fúngico. En el presente trabajo de Tesis, 47 aislamientos no redundantes (21 epifitos y 26 endofitos) inhibieron el crecimiento del micelio de *Botrytis* mediante la producción de VOCs y mediante la síntesis de compuestos difusibles y cocultivo (**Figura 4.4**).

Aunque la inhibición de *B. cinerea* es una característica importante para los agentes de control biológico, otros aspectos como la producción de enzimas hidrolíticas y la formación de *biofilms*, son también relevantes para el biocontrol y la colonización de la planta (Allard-Massicotte et al., 2016; Beauregard et al., 2013). Debido a que enzimas microbianas como proteasas, lipasas, celulasas, glucanasas, quitinasas y ligninasas son capaces de conferirle protección a la planta contra un amplio rango de fitopatógenos, su potencial como controladores biológicos ha sido ampliamente estudiado (Mishra et al., 2020). En el presente trabajo evaluamos la producción de celulasas, enzimas capaces de hidrolizar las uniones β -1,4-glicosídicas de la celulosa, el principal componente de los polisacáridos de la pared celular de hongos; proteasas, que no solo degradan la matriz de proteínas de la pared celular de patógenos, sino que también hidrolizan proteínas generadas por ellos; y lipasas, las cuales hidrolizan diferentes sustratos lipídicos y pueden inducir el sistema inmune de la planta por la liberación de lípidos (Saberri Riseh et al., 2024). Si bien, la mayoría de los aislamientos lograron sintetizar al menos una de estas enzimas (16 epifitos y 8 endofitos), los epifitos HI12, HII4, HIII9 y HIII11, y el endofito FIII14, mostraron capacidad de sintetizar las tres (**Figura 4.5 c**). Por otro lado, se ha visto que la formación de *biofilms* por *Pseudomonas putida* 06909 en raíces de cítricos es inducida por exudados del fitopatógeno *Phytophthora parasítica*. La bacteria coloniza el micelio del hongo alimentándose de sus exudados y luego forma un *biofilms* protector en las raíces de cítricos, lo que previene un nuevo crecimiento del patógeno (Ahn et al., 2007; Steddom et al., 2002). En el presente trabajo de Tesis, 17 aislamientos (8 epifitos y 9 endofitos) mostraron una elevada capacidad de formar *biofilms* (**Figura 4.5 a-b**). Considerando la producción de al menos una de las enzimas hidrolíticas estudiadas y la habilidad de formar *biofilms*, seleccionamos doce aislamientos bacterianos: ocho epifitos (HI5, HII1, HII4, HIII4, HIII5, HIII7, HIII9 y HIII11), y cuatro endofitos (HIII16, FII13, FIII14 y FIII18) (resaltadas con gris en **Figura 4.5**). Es importante destacar que estas doce bacterias pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, sintetizar enzimas hidrolíticas, y formar *biofilms*. Cuando se estimó la identidad taxonómica de los aislamientos seleccionados mediante secuenciación del gen del ARNr 16S, todos se agruparon dentro del género *Bacillus* (**Figura 4.13**). En relación con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se han encontrado epifitos asociados a la rizosfera de viñedos Malbec y Cabernet Sauvignon pertenecientes al género *Bacillus* que mostraron una notoria producción de enzimas hidrolíticas vinculadas con el control biológico (Oyuela Aguilar et al., 2021).

Otra característica interesante de los microorganismos beneficiosos es su capacidad para realizar diferentes tipos de movimientos, tal como los conocidos *swimming* y *swarming*, por su nombre en inglés. La movilidad activa es requerida para la colonización, posterior adherencia y formación de *biofilms* (Pratt & Kolter, 1998). Dentro de los 12 aislamientos evaluados, algunos epifitos presentaron ambos tipos de movimientos (HII1, HII4, HIII4 y HIII11), y todos los endofitos en estudio fueron positivos para *swarming*, pero no presentaron movilidad tipo *swimming* (**Figura 4.7**). Gao et al. (2016) demostraron que la motilidad tipo *swarming* en *B. subtilis* SWR01 es

importante para la colonización de la raíz de plantas de tomate. En el caso de bacterias epifíticas aisladas de pomelos marchitos, se sugirió que el efecto antagonista de bacterias del género *Bacillus* sobre la podredumbre causada por *Botrytis cinerea* se debía, en parte, a la capacidad de estas bacterias de exhibir motilidad *swimming* y *swarming*, lo que les facilitaría la colonización de la superficie del fruto y la competencia con el fitopatógeno por recursos y espacio (Lorenzini & Zapparoli, 2020).

Algunas especies bacterianas son capaces de producir sideróforos, los cuales pueden inhibir o detener el movimiento de iones tóxicos y ayudar a mantener el balance iónico (Delaporte-Quintana et al., 2020), así como la absorción de agua por las raíces (Novo et al., 2018). Como se mencionó en la **sección 2.2.1**, la producción de sideróforos se considera un mecanismo directo de promoción del crecimiento vegetal y, a su vez, un controlador indirecto del crecimiento de agentes patógenos (Kumar et al., 2022). En el presente trabajo de Tesis, seis de los ocho epifitos y ninguno de los endofitos, fueron capaces de producir sideróforos (**Figura 4.6**).

La promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de fitopatógenos no es resultado de un único mecanismo de acción llevado a cabo por la bacteria, sino de la combinación de distintas estrategias impulsados por la misma. Además de las características ya evaluadas, la capacidad de colonizar y crecer en la planta hospedadora es importante para que la bacteria pueda establecerse y llevar a cabo su función como agente de control biológico y/o promotor del crecimiento vegetal (Bonaterra et al., 2022; Compant et al., 2005). Todos los aislamientos lograron colonizar y crecer en plántulas de *A. thaliana* en los tiempos evaluados (**Figura 4.9**), observándose para el caso del epifito HIII9 y los endofitos HIII16 y FII13 un crecimiento acelerado y un mayor número de UFC por plántula (**Figura 4.9 g, i, j**, respectivamente).

Uno de los mecanismos más reportados que se utiliza predominantemente para explicar efectos de promoción del crecimiento vegetal por la bacteria es su habilidad de producir auxinas. Patten & Glick (1996) reportaron que alrededor del 80% de los microbios de la rizosfera pueden sintetizar y liberar AIA como un metabolito secundario. La auxina estimula el crecimiento del pelo radicular y el desarrollo de raíces laterales (Lee & Cho, 2013). En frutillas, se reportó que la bacteria *Bacillus velezensis* CE100, aislada a partir de suelo de plantas de tomate, produce alrededor de 3 unidades ml^{-1} de AIA, pudiendo aumentar la biomasa de las plantas inoculadas (Hong et al., 2022). Esta cepa bacteriana también inhibe el crecimiento del micelio y los síntomas de las enfermedades causadas por los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *Fragariae* y *Macrophomina phaseolina* tanto *in vitro* como *in vivo*, evaluado en plantas de frutilla de los cultivares 'Albion' y 'Sequoia'. Notablemente, la coinoculación de plantas de frutilla con *B. velezensis* CE100 y cada fitopatógeno resultó en un incremento significativo de la biomasa de la raíz y la parte aérea de la planta, como así también un mayor rendimiento del fruto comparado con los controles sin inocular o inoculados únicamente con el patógeno.

Además, otras fitohormonas producidas por bacterias como ácido abscísico (ABA) y giberelinas (AG_3), son importantes para la promoción del crecimiento vegetal. En el presente

estudio, las doce bacterias seleccionadas mostraron capacidad de producir las hormonas antes mencionadas (**Tabla 4.2**). En algunos casos, se encontró una correlación entre la producción de las hormonas y el incremento en el número de raíces laterales (HII1, HII4, HIII4 y HIII11, **Figura 4.8 b**) y el peso fresco de la parte aérea (HI5, HII1, HIII4 y HIII11, **Figura 4.8 c**) de plántulas de *Arabidopsis*. Una correlación similar se halló en el peso fresco de raíces (HI5, HII1, HIII4, HIII5, HIII7, HIII9, HIII11, FII13 y FIII18, **Figura 4.10 b**) y rosetas (HI5 y HIII11, **Figura 4.10 a**) de plantas adultas.

El ácido salicílico y jasmónico son fitohormonas con un papel crítico en la defensa de la planta (Loake & Grant, 2007; Ruan et al., 2019). Aunque se ha reportado la activación de las vías de defensa dependiente de AS y AJ por bacterias beneficiosas (Lastochkina et al., 2020; Le et al., 2021), existen pocos reportes sobre la producción de estas hormonas por esta clase de microorganismos. La habilidad de producir AS por bacterias endofíticas pertenecientes a los géneros *Achromobacter* y *Bacillus* aisladas de girasol se ha documentado (Forchetti et al., 2010), y también se ha detectado la producción de esta hormona en una cepa halotolerante de *Bacillus subtilis* aislada de la rizósfera de plantas de trigo (Ji et al., 2022). En el caso del AJ, esta hormona fue cuantificada en medio de cultivo de bacterias que promueven el crecimiento de plantas de girasol y trigo (Forchetti et al., 2007; Ji et al., 2022). Es importante mencionar que, en el presente trabajo, los 12 aislamientos bacterianos seleccionados produjeron AS y AJ (**Tabla 4.2**), y aunque las concentraciones detectadas fueron relativamente bajas, es importante tener en cuenta que ambas hormonas fueron cuantificadas *in vitro*, a partir de bacterias creciendo en medio mínimo, y no en contacto con la planta, de manera que no tendrían ningún estímulo para su síntesis en comparación a posibles situaciones *in planta*.

Bacillus es uno de los géneros predominantes de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Babalola, 2010; Pirttilä et al., 2021). De manera interesante, después de la secuenciación del gen del ARNr 16S, fue posible determinar que los doce aislamientos bacterianos, seleccionados por sus atributos como PGPB y su posible rol como controladores biológicos, pertenecen al género *Bacillus* (**Figura 4.13**). Todas las bacterias aisladas como endofitos (HIII16, FII13, FIII14 y FIII18) se agruparon juntas en la parte superior del árbol (**Figura 4.13**). HIII16 está filogenéticamente asociada con *B. pumilus* la cual se ha reportado que es capaz de promover el crecimiento radicular en arroz (Liu et al., 2020), tolerar el estrés causado por Cd en maíz (Shahzad et al., 2021) y resistir a la desecación en plántulas de *Glycyrrhiza uralensis* (Zhang et al., 2020). Los endofitos FIII18 y el epifito HIII9 se agruparon cerca de *B. safensis*, reportado por Jana et al. (2023) como una bacteria promotora del crecimiento de plantas de arroz. La cepa STJP de *B. safensis* aislada de *Stevia rebaudiana* produce VOCs con la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo patógeno *Alternaria alternata* (Prakash & Arora, 2021), lo cual es consistente con la inhibición de *B. cinerea* y *R. stolonifer* por acción de compuestos volátiles producidos por el endofito FIII18 (**Figura 4.3 b** y **Figura 4.12 b**). Además, los endofitos FII13 y FIII14, y el epifito HIII7 están cerca de *B. zhangzhouensis*, el cual ha sido previamente aislado como un endofito de

fruto de *Xanthium italicum* (Han et al., 2021) y ha sido reportado como PGPB en varias especies de plantas (Han et al., 2021; Maheshwari et al., 2022). Por otro lado, el resto de los epifitos se encuentran en la parte inferior del árbol filogenético. Los aislamientos HIII1, HIII4, HIII4 y HIII11 se agruparon cerca de *B. vallismortis*, una especie que produce compuestos antifúngicos que inhiben el crecimiento de *A. alternata* (Kaur et al., 2017) y tiene la capacidad de degradar algunos pesticidas (Nurzhanova et al., 2021).

En plantas de frutilla, se han reportado estudios acerca del aislamiento y utilización de bacterias del género *Bacillus* como controladores biológicos y promotores del crecimiento. Abd-El-Kareem et al. (2022) determinaron que tres cepas de la especie *B. brevis*, aisladas a partir de suelos de campos de frutilla, pueden controlar el desarrollo de la podredumbre negra de raíz causada por los fitopatógenos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina* y que los resultados obtenidos eran similares a los producidos por un fungicida de síntesis química. Alijani et al. (2022) demostraron que la cepa DM6120 de *B. atrophaeus* aislada de raíces de frutilla puede controlar la enfermedad causada por *Collectotrichum nymphaea*, y estudiaron las múltiples estrategias utilizadas por la bacteria para ejercer el biocontrol. Asimismo, Badar et al. (2022) observaron que la inoculación con *B. subtilis* de estolones de frutilla de los cultivares 'Camarosa', 'Chandler' y 'Tuft's' produjo plantas con mayor número de hojas, área foliar, número de estolones, número de flores y un mayor rendimiento, así como también, una mejora en los atributos de calidad del fruto, como mayor contenido de ácido ascórbico (Vitamina C) y antocianinas que las plantas control. En este trabajo de Tesis, además de la inhibición del fitopatógeno *B. cinerea*, se evaluó la capacidad de los 12 aislamientos seleccionados de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus stolonifer*, otro fitopatógeno que, además de afectar al cultivo de frutilla, tiene una amplia gama de hospedadores (Feliziani & Romanazzi, 2016). La mayoría de los aislamientos lograron inhibir mediante co-cultivo y síntesis de compuestos difusibles, como así también mediante la síntesis de compuestos volátiles, excepto para HIII7, HIII16, FIII13 y FIII18, que lograron inhibir sólo mediante uno de los dos mecanismos (**Figura 4.12 a-b**). En plantas de frutilla, se observó que tratamientos precosecha con bacterias biocontroladoras pertenecientes al género *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. megaterium*) y *Trichoderma* (*T. álbum*, *T. asperellum* y *T. viride*) disminuyeron notablemente el porcentaje de infección con *B. cinerea* y *R. stolonifer* durante el almacenamiento postcosecha de los frutos (Rashid et al., 2022). En los tratamientos con las cepas de *Bacillus* y *T. asperellum*, se observó una reducción del 100% de la infección natural de *R. stolonifer* en comparación con los controles, mostrando la eficacia del tratamiento con cada una de esas bacterias (Rashid et al., 2022).

Si bien, las 12 bacterias seleccionadas reúnen características muy interesantes para la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol de fitopatógenos fúngicos, al evaluar la infección *in planta* en *Arabidopsis* inoculadas con *B. cinerea*, solo las inoculadas previamente con el epifito HIII11 presentaron una reducción en el área necrótica provocada por dicho patógeno. Este aislamiento, además, es el que reúne la mayor cantidad de las características evaluadas que

consideramos interesantes para el control biológico y la promoción del crecimiento vegetal. Por esto, y con la finalidad de profundizar los estudios de los efectos *in planta*, decidimos continuar el trabajo de Tesis con dicho epifito.

4.6. CONCLUSIONES

- De la totalidad de bacterias endofitas y epifitas cultivables aisladas a partir de hojas y frutos de plantas de frutilla, aproximadamente un 48% logró inhibir el crecimiento *in vitro* del fitopatógeno *B. cinerea* a través de un confrontamiento directo, como así también, mediante la síntesis de compuestos volátiles orgánicos.
- Se seleccionaron doce aislamientos bacterianos que inhiben *in vitro* a *B. cinerea*, presentan capacidad de sintetizar al menos una de las enzimas hidrolíticas evaluadas y son capaces de formar *biofilms* (los epifitos HI5, HII1, HII4, HIII4, HIII5, HIII7, HIII9 y HIII11, y los endofitos HIII16, FII13, FIII14 y FIII18). A partir de los mismos, se identificaron bacterias que producen sideróforos, presentan movilidad tipo *swimming* y/o *swarming* y son capaces además de inhibir el crecimiento *in vitro* de *R. stolonifer*.
- La totalidad de las bacterias seleccionadas pertenecen al género *Bacillus*. Presentan, en mayor o menor medida, la capacidad de colonizar y crecer en plántulas de *A. thaliana*, como así también son capaces de sintetizar fitohormonas. Además, los epifitos muestran mayor capacidad de promover el crecimiento de plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis* en comparación con los endofitos.
- El análisis de todos los resultados obtenidos, en conjunto con la evaluación de la infección con *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* previamente inoculadas con cada bacteria, condujo a la selección del epifito HIII11 para continuar con el trabajo de Tesis.

5. CAPÍTULO II: Evaluación de respuestas de defensa y cambios en el metabolismo de la pared celular primaria de plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con el aislamiento bacteriano HIII11.

5.1. INTRODUCCIÓN

El control biológico de enfermedades en plantas es un proceso que involucra microorganismos vivos para inhibir o reducir las poblaciones de plagas o patógenos, proporcionando una alternativa sostenible a los métodos químicos utilizados en la agricultura, los cuales pueden resultar nocivos para la salud humana y animal (Carmona-Hernandez et al., 2019; Schaffner et al., 2024; **sección 2.4**). Como se mencionó en la introducción general, este tipo de control puede ser llevado a cabo a través de distintos mecanismos por parte del agente de control biológico, entre los cuales se pueden mencionar desde la antibiosis y producción de distintos compuestos antimicrobianos, hasta la inducción de respuestas de defensa de las plantas. En el estudio de dichas respuestas *Arabidopsis thaliana* ha sido clave, siendo ampliamente utilizada como modelo experimental. Esta planta es capaz de activar una serie de respuestas moleculares y fisiológicas complejas ante la invasión por agentes patógenos. Entre los mecanismos de acción se encuentran la activación de la respuesta inmune mediada por receptores que reconocen PAMPs o MAMPs (receptores PRR), la biosíntesis de fitoalexinas y otros metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, el refuerzo de la pared celular y la síntesis de proteínas relacionadas con la defensa, entre otros. Las PGPBs o BCAs pueden inducir un fenómeno conocido como *priming* (Pieterse et al., 2014), que fortalece las defensas naturales de la planta frente a futuros desafíos, como infecciones con patógenos o estrés abiótico, haciendo que las mismas respondan de manera rápida y eficiente (Conrath et al., 2015). Bacterias beneficiosas pertenecientes al género *Bacillus* han mostrado capacidad de ayudar a las plantas a desarrollar resistencia a una amplia variedad de enfermedades estimulando las respuestas de defensa de las mismas. *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. atrophaeus* y otras especies dentro de este género han sido eficientes, protegiendo a las plantas contra infecciones fúngicas, bacterianas y virales mediante la inducción de resistencia en la planta hospedadora (Yu et al., 2022). En este contexto, el estudio de la interacción entre las respuestas de defensa de *A. thaliana* y el género *Bacillus* abre nuevas vías para el desarrollo de estrategias de control biológico sostenibles.

Es así, que en este capítulo de la Tesis se propuso evaluar el efecto de la inoculación del aislamiento bacteriano HIII11, seleccionado previamente por las características evaluadas *in vitro*, en plantas de *A. thaliana* para poder estudiar diferentes respuestas de defensa producidas en las mismas tras la infección con patógenos necrótrofos, específicamente *B. cinerea*. A su vez, y dado que la pared celular constituye una de las primeras líneas de defensa contra el ataque por patógenos, y el refuerzo y mayor integridad de la misma se considera una respuesta importante

en las plantas (Wan et al., 2021; Wolf, 2022), se evaluaron posibles modificaciones en el metabolismo de la pared celular en plantas inoculadas con HIII11.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.2.1. Estudiar el efecto de la inoculación con HIII11 en las vías de señalización de respuestas de defensa, la acumulación de compuestos bioactivos, la pérdida de electrolitos y la deposición de calosa en plantas de *A. thaliana*.
- 5.2.2. Evaluar la influencia de la inoculación con HIII11 sobre la integridad de la pared celular primaria, el contenido de los distintos polímeros y la expresión de genes vinculados con el metabolismo de dicha estructura.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Identificación de HIII11 mediante secuenciación de los genes *recA* y *recN*.

Se llevó a cabo la amplificación de los genes *recA* (*Fw* 5' – TGAGTGATCGTCAGGCAGCCTTAG – 3'; *Rv* 5' – TTCTTCATAAGAATACCACGAACCGC – 3') y *recN* (*Fw* 5' – CTTTTGCGATCAGAAGGTGCGTATCCG – 3'; *Rv* 5' – GCCATTATAGAGGAACTGACGATTTTC – 3') (Arguelles-Arias et al., 2009), con la finalidad de identificar a qué especie pertenece el aislamiento HIII11. Para la mezcla de reacción se utilizaron 50 ng de molde de ADN, 0,125 µM de cada cebador, tampón de reacción 10X, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM (PB-L, Argentina), 1,6 unidades de Taq ADN Polimerasa (Thermo Scientific, Argentina), en un volumen final de 40 µl. Las condiciones de ciclado para ambos genes fueron las siguientes: 2 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1:30 min a 72 °C, seguido de una elongación final de 7 min a 72 °C. La separación y visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa tal como se detalló en la **sección 4.3.14.1**. El producto de PCR correspondiente se remitió al Laboratorio de Biotecnología acuática-FCByQ-UNR (CCT-Acuario del Río Paraná, Rosario, Argentina) para su purificación y posterior secuenciación (secuenciación de Sanger). Las secuencias obtenidas se compararon con la de los genes *recA* y *recN* de distintas especies dentro del género *Bacillus* disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

5.3.2. Análisis filogenético.

El análisis filogenético de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa MEGA 11.0 (Tamura et al., 2021). Los alineamientos se realizaron aplicando el algoritmo *ClustalW* y las secuencias alineadas se analizaron filogenéticamente mediante el método de '*Neighbor-Joining*'

y las distancias se calcularon a través de '*p-distance*'. El soporte estadístico para los cladogramas filogenéticos se evaluó mediante análisis de '*bootstrap*' utilizando un conjunto de datos de 1000 réplicas.

5.3.3. Condiciones de cultivo e inoculación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con HIII11.

Las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en condiciones controladas tal como se detalló en el capítulo anterior. La inoculación de las plantas con el aislamiento HIII11 se realizó de igual manera que en la **sección 4.3.11**. Cabe aclarar que, para todos los ensayos mostrados en este capítulo, la metodología de inoculación aplicada fue la misma.

5.3.4. Evaluación de la infección con *B. cinerea* y *R. stolonifer* en plantas de *A. thaliana* previamente inoculadas con HIII11.

Para llevar a cabo los ensayos de protección contra patógenos por efecto de HIII11, se realizaron las inoculaciones correspondientes. A los 15 días posteriores a la última inoculación con la bacteria o tratamiento con $MgCl_2$ 10 mM estéril para el caso de los controles, se inocularon 3 hojas por planta con dos gotas (5 μ l) de una suspensión de esporas (1×10^5 esporas ml^{-1}) del fitopatógeno fúngico evaluado, ya sea *B. cinerea* o *R. stolonifer*. Dicha inoculación se realizó de igual manera para ambos hongos, tal como se detalló en la **sección 4.3.16**. A las 48 y 72 horas post-inoculación se cortaron las hojas, se fotografiaron en la lupa (*Stereo Microscope Discovery.V20*, Zeiss) y posteriormente se determinaron las áreas necróticas utilizando el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA). Se realizaron dos ensayos independientes utilizando aproximadamente 20 plantas por condición (control e inoculado con HIII11) como réplicas biológicas.

5.3.5. Pérdida de electrolitos en hojas de *A. thaliana*.

La medida de pérdida de electrolitos se realizó de acuerdo a Restrepo et al. (2014). Se tomaron 0,3 g de hojas, las cuales se lavaron ligeramente con H_2O bidestilada y se colocaron en tubos cónicos de 50 ml. A continuación, se adicionaron 30 ml de H_2O bidestilada y se agitaron mediante vórtex durante 1 min. Los tubos se incubaron a baño María a 30 °C durante 2 h. Pasado este tiempo, se midió la conductividad eléctrica inicial (EC1) utilizando un conductímetro EC700 (Apera). Luego, se realizó una incubación a 100 °C durante 15 min para llevar a cabo la extracción de la totalidad de los electrolitos del tejido. En este punto, se midió la conductividad eléctrica final (EC2). El porcentaje de electrolitos liberados se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ electrolitos} = \left(\frac{EC1}{EC2} \right) \times 100$$

Esta determinación se realizó a las 48 y 72 horas post-inoculación con *B. cinerea*, utilizando 3 réplicas biológicas para cada caso. Cada réplica biológica consistió en un pool aleatorio de hojas provenientes de distintas plantas.

5.3.6. Cuantificación de HIII11 en hojas y raíces de plantas adultas de Arabidopsis.

Se realizó el aislamiento y recuento de HIII11 en hojas, raíces y rizosfera de plantas de *Arabidopsis* 15 días después de la última inoculación. Se utilizaron 2 hojas por réplica biológica para el aislamiento del total de la bacteria (comportamiento como epifito y endofito). Además, se utilizaron 2 hojas por réplica biológica para aislar de forma secuencial a la bacteria que se encuentra de manera epifítica, y posteriormente, la que se encuentra como endofito. Para el recuento total, las hojas previamente pesadas, se colocaron en tubos cónicos de 15 ml, se adicionaron 3 ml de MgCl₂ 10 mM pH 7,0, estéril. Posteriormente, se maceraron con ayuda de pilón y mortero, generándose un extracto a partir del cual se realizaron diluciones seriadas. Para el aislamiento de los epifitos, las hojas previamente pesadas se colocaron en tubos cónicos de 15 ml y se lavaron con 3 ml de MgCl₂ 10 mM, estéril. Una alícuota (300 µl) de esta solución conteniendo los epifitos se reservó para realizar diluciones seriadas. Para el aislamiento de los endofitos, estas mismas hojas se desinfectaron con una solución de lavandina al 5% (v/v) conteniendo 0,01% (v/v) de Tween 20 durante 30 segundos. Luego, las hojas se lavaron 3 veces con MgCl₂ para eliminar restos de la solución de desinfección. A las hojas lavadas se les adicionaron 3 ml de MgCl₂ para obtener un extracto de las mismas. Para el aislamiento de las bacterias rizosféricas, la raíz de cada planta junto con una región estrecha del suelo circundante se colocó en tubo cónico de 15 ml y se adicionaron 5 ml de MgCl₂ estéril. Las muestras se agitaron con vórtex durante 1 minuto, y se tomó una alícuota (500 µl) del líquido. A partir de los extractos obtenidos, se realizaron diluciones seriadas en MgCl₂ 10 mM estéril en un factor de 1/10 hasta alcanzar una dilución final de 1/100000. Luego, las diluciones se cultivaron en placas de Petri conteniendo medio LB-agar y se incubaron a 28 °C durante 18 h. Pasado ese tiempo, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias. Se utilizaron 5 réplicas biológicas, cada una consistiendo en una planta de *A. thaliana*. Por cada réplica biológica se realizaron 2 diluciones seriadas independientes como réplicas técnicas.

5.3.7. Evaluación de respuestas de defensa en *A. thaliana* Col-0. Expresión relativa de genes.

Se inocularon las plantas de *A. thaliana* Col-0 con HIII11 tal cual se indicó en la **sección 4.3.11**. Se utilizaron plantas sin infectar (considerado como tiempo 0 h), y a las 6 y 24 horas posteriores a la inoculación con *B. cinerea* (6 hpi y 24 hpi, respectivamente).

5.3.7.1. Extracción de ARN total de *A. thaliana*. Cuantificación y verificación de la integridad.

La extracción y purificación de ARN total se llevó a cabo utilizando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría utilizando la función NanoDrop del equipo *Synergy H1 Hybrid Reader* (Biotek) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TBE 0,5X. Para esto, se utilizó 1 µl de cada muestra de ARN total a los cuales se les adicionaron 0,3 µl de Gel Red 20X y 0,6 µl de buffer muestra Orange G 6X. La corrida electroforética se llevó a cabo a ~70 V durante 30 min en buffer TBE 0,5X. La integridad de las muestras de ARN se verificó a través de la visualización de dos bandas discretas correspondientes a ARNr en fotodocumentador *Amersham Image Quant 800* (Cytiva).

5.3.7.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc).

Las muestras de ARN total se trataron con ADNasa I (Promega), con la finalidad de eliminar una posible contaminación con ADN. Para la síntesis de la hebra de ADNc (ADN complementario) se utilizaron 2 µg de ARN total obtenido para cada muestra, 0,8 µl de enzima transcriptasa reversa M-MLV 200 U µl⁻¹ (del inglés, *Moloney murine leukemia virus*; Promega), 0,05 mM de dNTPs, 223,2 pmoles de hexámeros (Biodynamics S.R.L.), 4 µl de buffer de reacción 5X de la enzima (Promega) y agua mili Q hasta un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción se incubó a 38 °C por 1 hora y luego a 95 °C durante 5 minutos.

5.3.7.3. Control de ADNc mediante PCR.

El éxito en la síntesis de ADNc se verificó mediante PCR a punto final de cada una de las muestras. Para ello, se utilizaron cebadores específicos para el gen de referencia *AtUBQ10*, el cual codifica para una Poliubiquitina 10 (**Tabla 5.1**). Para la reacción se utilizaron 0,5 µl de molde de ADNc, 0,375 µl de cada cebador (directo e inverso, $ci = 10 \mu M$) de *AtUBQ10*, 1,5 µl de buffer 10X de reacción Taq Polimerasa, 0,075 µl de enzima Taq Polimerasa ($5 U \mu l^{-1}$), 0,3 µl de dNTPs ($ci = 2,5 mM$), 0,9 µl de MgCl₂ ($ci = 25 mM$) y agua mili Q hasta completar un volumen final de 15 µl. Para llevar a cabo la amplificación, se utilizó el siguiente programa de PCR: desnaturalización inicial a 95 °C, 4 min. Cuarenta ciclos de 94 °C, 45 segundos; 60 °C, 30 segundos; 72 °C, 30 segundos. Elongación final a 72 °C, 7 min.

La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 0,5X. El total del volumen de reacción se mezcló con 1,2 µl de Gel Red 20X y 3 µl de Orange G 6X. Se utilizó un marcador de peso molecular correspondiente a 50 pb (PB-L, Argentina), del cual se sembraron 7 µl con 1 µl de Gel Red 20X. La electroforesis se llevó a cabo a ~ 80 V durante aproximadamente 1 h. Las bandas resultantes se visualizaron en fotodocumentador *Amersham Image Quant 800* (Cytiva).

5.3.7.4. Expresión relativa de genes de defensa mediante PCR en tiempo real.

En primer lugar, se estimó la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos utilizados, cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 5.1**. Para ello se procedió a la obtención de las curvas de eficiencia en el equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), realizando previamente una serie de diluciones usando como molde ADNc de muestras de hojas de plantas de *A. thaliana* que 24 horas antes habían sido inoculadas con el fitopatógeno *B. cinerea*.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando la mezcla comercial Fast Start Universal SYBR Green Master Rox 2X (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, en el equipo mencionado en el párrafo anterior. Las condiciones de PCR fueron: 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 min a 60 °C; y posteriormente, se realizó una curva de disociación (o *melting*) de 60 °C a 95 °C con incrementos de 0,3 °C. Se midió la fluorescencia al final de cada paso de amplificación. Los niveles de expresión relativa correspondieron al promedio de cinco extracciones independientes de ARN para cada condición, normalizadas con el gen de referencia *AtUBQ10*. Los niveles de expresión se calcularon conforme el método descrito por Pfaffl (2001) y se expresaron en unidades arbitrarias ± SEM.

Tabla 5.1. Secuencias de oligonucleótidos (*Fw* ('forward') o cebador directo; *Rv* ('reverse') o cebador inverso) utilizados en la evaluación de expresión relativa de genes relacionados con respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana*. Se detalla el número de acceso a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y la descripción de cada gen.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	N° acceso	Descripción gen
<i>AtUBQ10</i>	<i>Fw</i> : TTGCGTCTGCGTGGAGGTATG <i>Rv</i> : ATCCGCCAAAGTACGACCATCC	NC_003075.7	Poliubiquitina 10
<i>AtPAL1</i>	<i>Fw</i> : GTGTCGCACTTCAGAAGGAA <i>Rv</i> : GGCTTGTTTCTTTCGTGCTT	NM_129260.3	Fenilalanina amonio liasa 1
<i>AtPAL2</i>	<i>Fw</i> : GTGCTACTTCTCACCGGAGA <i>Rv</i> : TATTCCGGCGTTCAAAAATC	NM_115186.4	Fenilalanina amonio liasa 2
<i>AtPR1</i>	<i>Fw</i> : TAGGTGCTCTTGTCTTTC <i>Rv</i> : CGGAGACGCCAGACAAG	NM_127025.3	Proteína relacionada a patogénesis 1
<i>AtPR5</i>	<i>Fw</i> : GACTGTGGCGGTCTAAGATGT <i>Rv</i> : TGAATTCAGCCAGAGTGACG	NM_106161.3	Proteína relacionada a patogénesis 5
<i>AtPDF1.2</i>	<i>Fw</i> : GCTTCATCATCACCTTATCTT <i>Rv</i> : GGCTTCTCGCACAATTCTG	NM_123809.4	Defensina de planta 1.2
<i>AtPAD3</i>	<i>Fw</i> : ACAAGAACAGGGCAAGGAAA <i>Rv</i> : GATCAGGGTAAGAGGACGA	NM_113595.4	Citocromo P450 monooxigenasa

5.3.8. Determinación del contenido de antocianinas en *A. thaliana*.

Se tomaron 0,15 g de hojas previamente molidas en N₂(l), los cuales se resuspendieron en 0,5 ml de una solución de HCl 1% (v/v) en metanol. Las muestras se incubaron durante 10 min en hielo, agitando por inversión a los 5 min. Luego, se centrifugaron a 3000 x g a 4 °C durante 10 min y se recuperaron los sobrenadantes. La cuantificación de antocianinas se llevó a cabo midiendo absorbancia a $\lambda = 515$ nm en el espectrofotómetro *Synergy H1 Hibrid Reader* (Biotek). El contenido de antocianinas se expresó como miligramos de pelargonidina-3-glucósido por kilogramo de hoja (mg kg⁻¹; Emolar = 3,6 x 10⁶ M⁻¹m⁻¹). La determinación se realizó a las 0, 6 y 48 hpi con *B. cinerea*, utilizando 5 réplicas biológicas de 3 plantas cada una de ellas, para cada tiempo.

5.3.9. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en *A. thaliana*.

Se tomaron 0,25 g de hojas previamente molidas en N₂(l) y se les adicionó 1,5 ml de etanol 100% (v/v) frío. Se mezcló por inversión y vórtex, y luego se centrifugó a 9000 x g a 4 °C durante 15 min. Se utilizaron 0,1 ml del sobrenadante para determinar los compuestos fenólicos. Éstos se mezclaron con 1,16 ml de H₂O_a y 0,15 ml del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N. Luego de 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 1,5 ml de solución Na₂CO₃ 2% (p/v) en NaOH 0,1 N. Se incubó en oscuridad durante 1 h a 25 °C y se midió la absorbancia a $\lambda = 760$ nm. La curva estándar se construyó utilizando distintos volúmenes de ácido gálico 10 mg ml⁻¹ en etanol 100% (v/v), y el contenido de compuestos fenólicos se expresó como miligramos de ácido gálico por kilogramo

de hoja. La determinación se realizó a las 0, 6 y 48 hpi, utilizando 5 réplicas biológicas de 3 plantas cada una, para cada tiempo.

5.3.10. Deposición de calosa.

Se realizó la evaluación de la deposición de calosa en hojas sin inocular e inoculadas con *B. cinerea* provenientes de plantas control y plantas tratadas con HIII11, a las 24 y 48 horas post-inoculación con el fitopatógeno. Para ello se utilizó la metodología descrita previamente por Schenk & Schikora (2015) y Bach-Pages & Preston (2018), con modificaciones leves. En primer lugar, las hojas se cortaron y colocaron en una solución de ácido acético:etanol (1:3) en agitación durante toda la noche. Las hojas desteñidas se lavaron con K_2HPO_4 150 mM (pH 9,5) durante 30 min en agitación. Luego, se tiñeron con una solución de azul de anilina 0,1% (p/v) en K_2HPO_4 150 mM (pH 9,5) durante 1 h y 30 min. Pasado este tiempo, las hojas se lavaron con H_2O bidestilada estéril y luego se equilibraron con glicerol 50% (v/v) para su montaje y visualización en lupa de fluorescencia (*Stereo Microscope Discovery.V20*, Zeiss) utilizando filtro DAPI (λ excitación a 370 nm – λ emisión a 509 nm).

5.3.11. Evaluación de cambios en el metabolismo de la pared celular vegetal de Arabidopsis en plantas inoculadas con HIII11.

5.3.11.1. Aislamiento de Residuos Insolubles en Alcohol (RIAs).

El aislamiento de los polisacáridos totales de la pared celular de las hojas de *A. thaliana* se realizó de acuerdo con D'amour et al. (1993) con modificaciones leves. Un gramo de hojas previamente pulverizadas en $N_{2(l)}$ se mezcló con 20 ml de etanol 100% (v/v) y luego se incubaron en baño María a 100 °C con reflujo durante 30 min. El homogenato resultante se llevó a temperatura ambiente en baño de agua y se filtró al vacío. El residuo sólido se lavó tres veces con 5 ml etanol 100% (v/v), se secó durante 14 h a 37 °C y posteriormente se registró su peso. Se realizaron 5 extracciones independientes de RIAs, las cuales se expresaron como gramos de Residuos Insolubles en Alcohol por kilogramo de hoja.

5.3.11.2. Extracción y cuantificación del contenido de almidón de los RIAs obtenidos.

La extracción del almidón se realizó a partir de los RIAs obtenidos previamente para cada condición de acuerdo a Carpita & Kanabus (1987), con modificaciones. Para ello, los RIAs se trataron con 5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO, 99,5%) y se agitaron durante 24 h a 22 °C. Luego, se centrifugó durante 5 min a 1600 x g a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante en un tubo limpio. Una alícuota del mismo se reservó para la cuantificación del almidón mediante el

método de la antrona (antrona 0,2% (p/v) en H₂SO₄ 72% (v/v)). Para esto, se tomaron 50 µl de cada muestra, a los cuales se les adicionaron 500 µl de antrona. Las muestras se homogeneizaron por vórtex y se incubaron en baño María a 100 °C durante 12 min. Posteriormente, los tubos se colocaron en baño de agua líquida-hielo y se mezclaron nuevamente por vórtex. La cuantificación se realizó midiendo absorbancia a una $\lambda = 625$ nm y se realizó una curva de calibración con volúmenes variables de glucosa 0,04% (p/v). Los resultados se expresaron como gramos de glucosa por kilogramo de hoja.

Se destaca que la hidrólisis química del almidón y la posterior cuantificación del contenido de glucosa fue puesta a punto por miembros del Laboratorio en un trabajo previo donde se utilizaron RIAs de tomate (Perini et al., 2017). En esos ensayos se incluyeron muestras de almidón comercial como controles positivos para verificar la eficacia del método utilizado.

5.3.11.3. Obtención de paredes celulares sin almidón.

Si bien el sobrenadante de las muestras mencionadas en la **sección 5.3.11.2.** se utilizó para la estimación del contenido de almidón, cada uno de los pellets obtenidos (constituidos mayoritariamente por paredes celulares) se filtraron al vacío y se secaron durante 18 h en estufa a 37 °C. Posteriormente, las paredes celulares se pasaron a tubos cónicos y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior uso.

5.3.11.4. Evaluación del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer* en paredes celulares aisladas de plantas de *A. thaliana* inoculadas con HIII11.

En placas de Petri conteniendo RIAs sin almidón o paredes celulares (0,375 mg RIA ml⁻¹, en medio agar-agua al 0,8% p/v) como única fuente de nutrientes se cultivaron tanto *B. cinerea* como *R. stolonifer*. Los RIAs se obtuvieron de plantas de *A. thaliana* inoculadas con HIII11 como se mencionó en la **sección 4.3.11**, mientras que los RIAs control se obtuvieron de plantas sin inocular con dicha bacteria. Cada placa se inoculó con una fracción de micelio (3 mm²) del patógeno correspondiente, se incubaron a 25 °C y se midieron las áreas de crecimiento del micelio a las 24, 48, 72 y 96 h para el caso de *B. cinerea*, y 24 y 48 h para *R. stolonifer*. Se utilizó el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA) para realizar las medidas de las áreas. Para cada condición (plantas inoculadas con HIII11 y control) y patógeno, se utilizaron 5 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas. Cabe aclarar que la concentración de RIAs utilizada se determinó previamente por el grupo de trabajo realizando una curva de crecimiento de cada patógeno en distintas concentraciones de paredes celulares aisladas de hojas de *Arabidopsis* (Marina et al., 2019; Nardi et al., 2015).

5.3.11.5. Contenido de polisacáridos de la pared celular.

5.3.11.5.1. Extracción de pectinas totales. Determinación del contenido de ácido galacturónico y azúcares neutros.

Veinte mg de paredes celulares se resuspendieron en 25 ml de HCl 0,05 M y se incubaron en baño María a 100 °C durante 1 h con reflujo. Posteriormente, se llevaron a temperatura ambiente en baño de agua y luego se filtraron al vacío. El residuo resultante de cada muestra se lavó tres veces con 5 ml de HCl 0,05 M con la finalidad de extraer la totalidad de las pectinas, es decir, pectinas de interacciones débiles, iónicas y covalentes. Se registró el volumen del filtrado recogido en el Kitasato utilizando una probeta. Las muestras se diluyeron al ½ con HCl 0,05 M, y 200 µl de cada dilución se mezclaron con 600 µl de Na₂B₄O₇·10H₂O (Bórax) 0,0125 M en H₂SO_{4(c)} y los tubos se llevaron a baño María durante 5 min. A continuación, se enfriaron en baño de agua-hielo y se añadieron 20 µl de 3-fenilfenol 0,15% (p/v) en NaOH 0,5% (p/v) (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). Luego se mezcló por vórtex y los tubos se regresaron al baño de agua-hielo. Finalmente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min en oscuridad y se volvió a homogeneizar por vórtex. Para descartar la absorbancia de azúcares no específicos, las muestras se trataron paralelamente de igual manera, pero en estos tubos se añadieron 20 µl de NaOH 0,5% (p/v) en lugar de 3-fenilfenol. Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron volúmenes variables de ácido galacturónico (AG) 1 mM, pH 5,5. La cuantificación de ácidos urónicos se llevó a cabo midiendo la absorbancia a $\lambda = 520$ nm y los resultados se expresaron como gramos de AG por kilogramo RIA.

El contenido de azúcares neutros (AN) en pectinas totales se estimó por el método de la antrona utilizando glucosa como estándar (D'amour et al., 1993). Los resultados se expresaron como gramos de glucosa cada kilogramo de RIA.

5.3.11.5.2. Extracción y cuantificación de hemicelulosas y celulosa.

A partir del residuo sólido resultante de la extracción de pectinas totales se llevó a cabo la extracción de las fracciones de hemicelulosas y celulosa. Para esto, el residuo sólido se mezcló con 25 ml de NaOH 4 M y se agitó durante 8 h a 20 °C. El homogenato se filtró al vacío y se lavó tres veces con 2,5 ml de NaOH 4 M. Se registró el volumen filtrado, el cual se denominó como fracciones de hemicelulosas. El sólido remanente se consideró como celulosa. La fracción correspondiente a celulosa se hidrolizó completamente con H₂SO₄ 66% (v/v) a 37 °C por 1 h. La cuantificación de hemicelulosas y celulosa se realizó a través del método de la antrona utilizando cantidades variables de glucosa 0,04% (p/v) para construir una curva de calibración (D'amour et al., 1993). Los resultados se expresaron como gramos de glucosa cada kg de RIA.

5.3.11.5.3. Expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular de *Arabidopsis*.

La extracción de ARN total y síntesis de ADN copia se realizó como se indicó anteriormente (**sección 5.3.6.1**). El cálculo de la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos utilizados (las secuencias de los mismos se detallan en la **Tabla 5.2**) fue realizado previamente en el Laboratorio por el grupo de trabajo utilizando el equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (Nardi et al., 2015).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo tal como se detalló en la **sección 5.3.6.4**. Los niveles de expresión relativa correspondieron al promedio de cinco extracciones independientes de ARN para cada condición, normalizadas con el gen de referencia *AtUBQ10*. Los niveles de expresión se calcularon conforme el método descrito por Pfaffl, (2001) y se expresaron en unidades arbitrarias \pm SEM.

Tabla 5.2. Secuencias de oligonucleótidos (*Fw* ('forward') o cebador directo; *Rv* ('reverse') o cebador inverso) utilizados en la evaluación de expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular de *Arabidopsis thaliana*. Se detalla el número de acceso de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y la descripción de cada gen.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	N° acceso	Descripción gen
<i>AtAra1</i>	<i>Fw</i> : TGGATTATGGGCCGAAGTTGTTAG <i>Rv</i> : GTAACCAGGGTTATAAACTCCGAC	NM_111911.5	α -L-arabinofuranosidasa 1
<i>AtβXil5</i>	<i>Fw</i> : GGTACATAGTTTCGGATTGTGATTC <i>Rv</i> : CCACAGTTCATGTTCAAACCTGC	NM_112852.2	β -xilosidasa 5
<i>AtPME3</i>	<i>Fw</i> : CCGTCGTCTCACGCCGTGCTAAG <i>Rv</i> : GTGAAGTAATTGTGCTCCACGG	NM_112289.3	Pectin metilesterasa 3
<i>AtExp8</i>	<i>Fw</i> : CTCTATTCAACAACGGACTC <i>Rv</i> : TGCTGAAGAGGAGGATTGC	NM_129623.3	Expansina 8
<i>AtExp5</i>	<i>Fw</i> : CAAGGTTATGGACTGGAGAC <i>Rv</i> : GAGAAAGATCGAAATGGTGG	NM_113824.3	Expansina 5
<i>AtβGal</i>	<i>Fw</i> : GAGAACCCTGCCACTAGAAACACC <i>Rv</i> : ACAATAGGGAGATCTCTGGCGATG	NM_001124794.2	β -galactosidasa
<i>AtPG1</i>	<i>Fw</i> : CCAGAACAGCCAGCAGATGA <i>Rv</i> : CGAGCTGGCATTCAACAATCG	NM_102195.3	Poligalacturonasa 1
<i>AtXL</i>	<i>Fw</i> : CGGTGCATGGATTGGTGGAGGTTATG <i>Rv</i> : GCCTTCTAGTCTCACCCACTTCTCC	NM_104617.4	Xilanasa

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Identificación de HIII11 mediante la secuenciación de los genes *recA* y *recN*.

En el capítulo I se pudo determinar, mediante la secuenciación del gen del ARNr 16S y posterior análisis filogenético, que los 12 aislamientos bacterianos seleccionados pertenecen al género *Bacillus*, y entre ellos el aislamiento HIII11 (**Figura 4.13**).

Con la finalidad de identificar a qué especie pertenece HIII11, se llevó a cabo la amplificación de los genes *recA* y *recN*. Las secuencias obtenidas para cada gen se analizaron, en primer lugar, mediante comparación con las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A partir de esto, se llevó a cabo el alineamiento y posterior análisis filogenético. La construcción del árbol filogenético arrojó como resultado, que la cepa HIII11 pertenece efectivamente al género *Bacillus* y permitió determinar que la especie es *velezensis* (**Figura 5.1 a y b**).

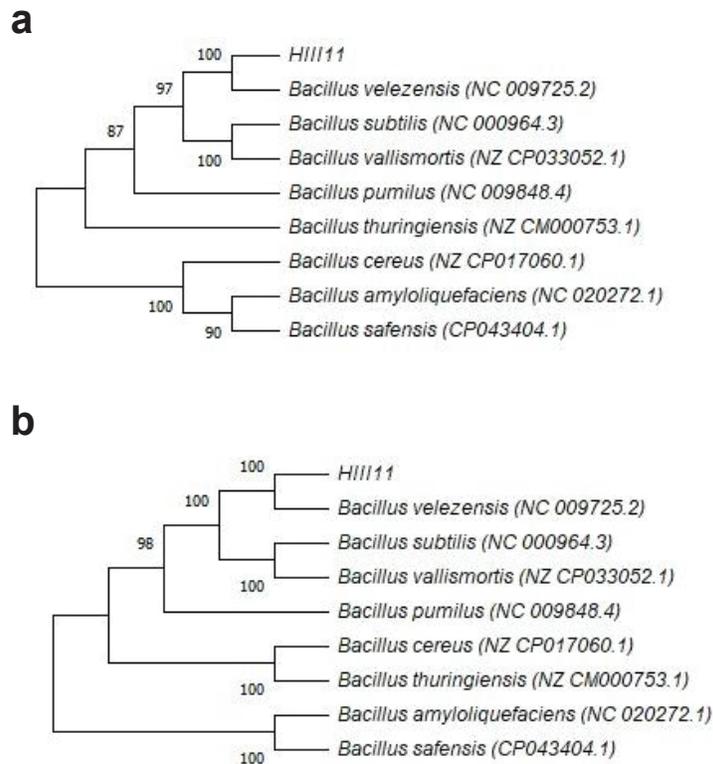


Figura 5.1. Análisis filogenético de los genes (a) *recA* y (b) *recN* de HIII11. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se ingresaron en las bases de datos y se alinearon utilizando *ClustalW*. Los árboles se construyeron utilizando el algoritmo de *Neighbor-Joining*, y las distancias filogenéticas se calcularon por el método de *p-distance*.

5.4.2. Evaluación de la infección causada por *B. cinerea* y *R. stolonifer* en plantas de *A. thaliana* previamente inoculadas con *Bacillus velezensis* HIII11.

En el capítulo I se evaluó la infección con *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* inoculadas previamente con las 12 bacterias seleccionadas. Los resultados obtenidos mostraron que las plantas inoculadas con HIII11 presentaron una reducción en el área necrótica provocada por la infección con el patógeno (**Figura 4.14**). En este caso, aplicando las mismas condiciones de crecimiento y metodología de inoculación, se evaluó nuevamente la infección con *B. cinerea* y, además, se llevó adelante la evaluación de la infección provocada por *R. stolonifer*. Para ambos fitopatógenos, se midieron las áreas necróticas a las 48 y 72 hpi (horas post-inoculación). Como resultado, las plantas inoculadas con HIII11 presentaron menor área necrótica promedio producto de la infección con *B. cinerea* respecto de las plantas control (tratadas con MgCl₂ 10 mM, estéril), con diferencias significativas a las 72 hpi (**Figura 5.2 a**). Asimismo, se evidenció que, las hojas provenientes de plantas inoculadas con las bacterias presentaban un mejor estado general en comparación con las hojas de plantas control, observándose, por ejemplo, una menor clorosis (**Figura 5.2 b**).

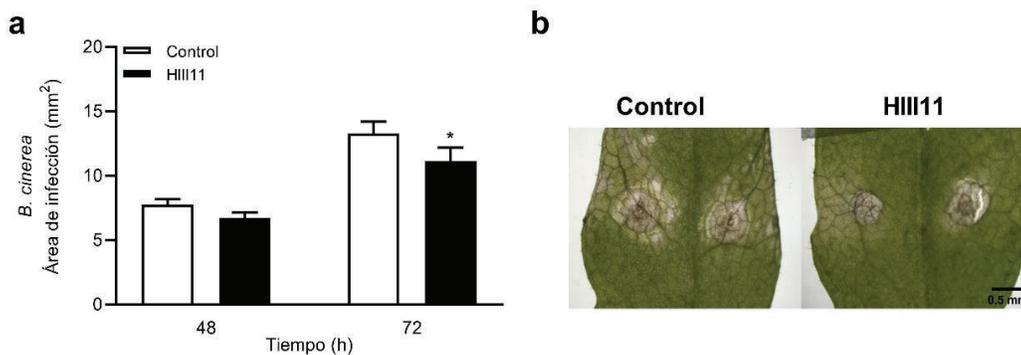


Figura 5.2. Infección con *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* previamente inoculadas con HIII11. Se inocularon 3 hojas por planta con una suspensión de esporas de *B. cinerea* (1×10^5 esporas ml⁻¹). (a) A las 48 y 72 horas post-inoculación (hpi) se midieron las áreas necróticas correspondientes con el avance de la infección. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante 2way-ANOVA ($*p < 0,05$). (b) Necrosis en hojas control e inoculadas con HIII11 a las 72 hpi.

En cuanto a la infección con *R. stolonifer*, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con *B. cinerea*, observándose una menor área necrótica a las 72 hpi (**Figura 5.3 a**). A su vez, es importante aclarar que las hojas infectadas de plantas previamente inoculadas con HIII11 presentaban un mejor aspecto y estado frente a las hojas de plantas control (**Figura 5.3 b**).

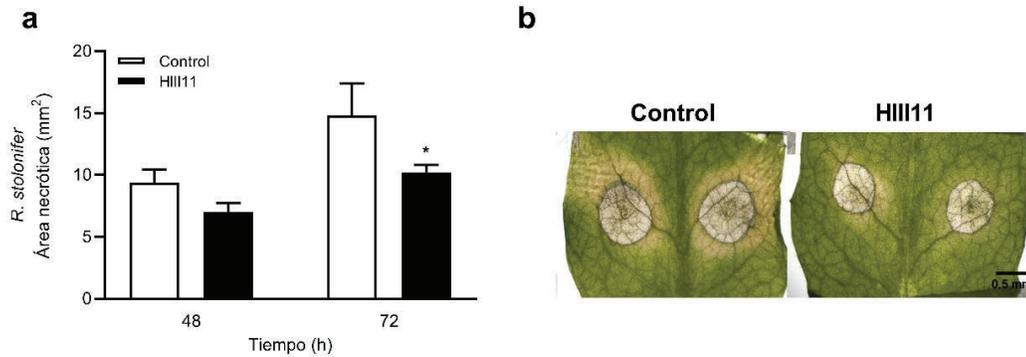


Figura 5.3. Infección con *R. stolonifer* en plantas de *A. thaliana* previamente inoculadas con HIII11. Se infectaron 3 hojas por planta con una suspensión de esporas de *R. stolonifer* (1×10^5 esporas ml^{-1}). (a) A las 48 y 72 horas post-inoculación (hpi) se midieron las áreas necróticas correspondientes con el avance de la infección. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *2way*-ANOVA (* $p < 0,05$). (b) Necrosis en hojas control e inoculadas con HIII11 a las 72 hpi.

5.4.3. Efecto de la inoculación con HIII11 en el porcentaje de pérdida de electrolitos de *A. thaliana* frente a la infección con *B. cinerea*.

Con el objetivo de determinar si la inoculación de plantas de *Arabidopsis* con *Bacillus velezensis* HIII11 modificaba la pérdida de electrolitos a distintos tiempos luego de la infección con el patógeno *B. cinerea*, se procedió a la medida conductimétrica de este parámetro tal como se describió en la **sección 5.3.5**. Como resultado relevante, se observó que las plantas previamente inoculadas con HIII11 presentaban un porcentaje de pérdida de electrolitos significativamente menor ($\sim 14\%$) que las plantas sin inocular ($\sim 21\%$), tanto a las 48 como 72 hpi con *Botrytis* (**Figura 5.4**). Cabe destacar que, para descartar un efecto *per se* de la inoculación con HIII11 en estos porcentajes, se realizaron medidas conductimétricas en plantas sin inocular con el fitopatógeno. Como resultado, no se detectaron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con HIII11 y plantas sin inocular (**Figura 5.4**).

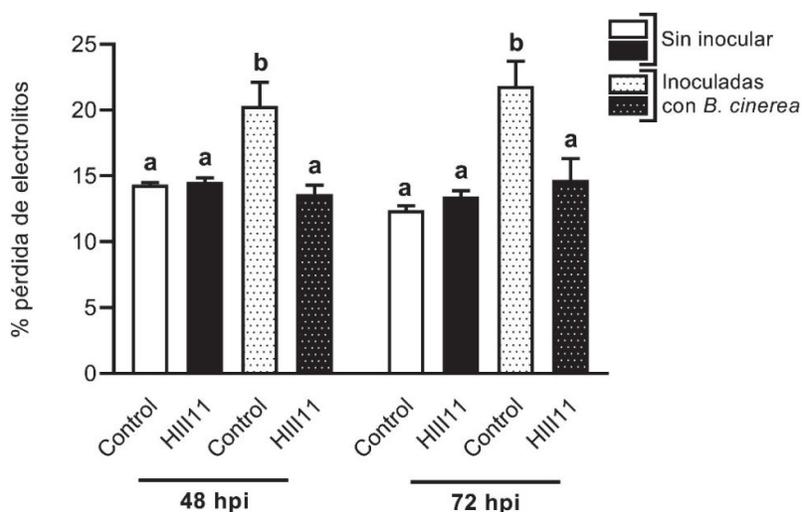


Figura 5.4. Pérdida de electrolitos en hojas de *A. thaliana*. A través de la medida de conductividad eléctrica se calculó el porcentaje de pérdida de electrolitos de hojas de *A. thaliana* control y previamente inoculadas con HIII11. Esto se evaluó en hojas sin inocular con *B. cinerea* (barras lisas) y hojas inoculadas con este patógeno a las 48 y 72 hpi (barras con puntos). Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante 2Way-ANOVA. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos en las **secciones 5.4.2 y 5.4.3**, revelan un efecto positivo de la bacteria en la planta de *A. thaliana* que hace que la misma responda mejor a la infección por hongos necrótrofos. Es por esto, que nos preguntamos si la bacteria ejerce este biocontrol de manera directa, estando presente en el tejido o zona de infección activando distintos mecanismos para combatir al fitopatógeno, o si la misma está actuando de una manera indirecta, induciendo respuestas de defensa en la planta o incluso, cambios fisiológicos, tales como el refuerzo de la pared celular.

Por esta razón, y con el objetivo de obtener respuestas a estas inquietudes, se procedió en primer lugar al aislamiento y recuento de HIII11 a partir de plantas de *A. thaliana* pasados 15 días luego de la última inoculación. Este tiempo de toma de muestra se escogió ya que es el momento en el cual se evaluaron las características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal, y en el que se inoculó con los patógenos fúngicos para evaluar el control biológico de HIII11 sobre los mismos (**sección 4.3.9 y 5.3.4**, respectivamente). Es así que, a este tiempo, se cortaron hojas de plantas inoculadas y de plantas sin inocular con HIII11 (controles) y, por otra parte, se tomó la raíz de cada planta con parte de la rizosfera. A partir de las hojas se evaluó la posible colonización epifítica y endofítica de HIII11 en Arabidopsis, y a partir de la rizosfera, se evaluó la presencia del aislamiento en la misma.

Como **resultado**, HIII11 no se encontró colonizando las hojas de Arabidopsis, ni como epifito ni como endofito en el momento evaluado, pero si se re aisló la bacteria a partir de

muestras de la rizosfera. Tras varios recuentos, HIII11 se encontró en un promedio de $7,5 \times 10^5$ UFC por gramo de rizosfera a los 15 días posteriores a la última inoculación.

5.4.4. Evaluación de la respuesta transcripcional de genes relacionados con la defensa durante la infección con *B. cinerea* en *A. thaliana*.

Como se mencionó en la **sección 2.2.7**, las plantas son capaces de prepararse para una activación más rápida y robusta de sus defensas frente al estrés biótico o abiótico. Este fenómeno se conoce como *priming* y puede ser inducido por bacterias beneficiosas. Es así, que con la finalidad de evaluar este posible efecto por parte de *B. velezensis* HIII11 en plantas de *A. thaliana*, se determinó la expresión relativa de genes relacionados con diferentes respuestas de defensa a distintos tiempos post-inoculación con *B. cinerea*. Se midió la expresión relativa de genes que codifican proteínas que participan en la vía de los fenilpropanoides (*AtPAL1* y *AtPAL2*), en la vía de los Jasmonatos/Etileno (JAs/ET) (*AtPDF1.2*), en la síntesis de fitoalexinas (*AtPAD3*) y en la vía del Ácido Salicílico (AS) (*AtPR1* y *AtPR5*).

Como resultado, observamos que en plantas sin inocular (0 hpi) no se encontraron diferencias en la acumulación de ARN mensajero de ninguno de los seis genes evaluados (**Figura 5.5**). En el caso de *AtPDF1.2* y *AtPR1*, no se detectaron sus transcriptos en este tiempo (**Figura 5.5 c y f**, respectivamente). En lo que respecta a los genes que codifican para la enzima fenilalanina amonio liasa o PAL (*AtPAL1* y *AtPAL2*), se detectó un aumento significativo de transcriptos a las 6 hpi en plantas previamente inoculadas con HIII11 respecto a las plantas control, sin embargo, esta diferencia no se mantuvo a las 48 hpi (**Figura 5.5 a y b**, respectivamente). A su vez, se observó un aumento significativo en la expresión de *AtPDF1.2* y *AtPAD3* a las 6 hpi (**Figura 5.5 c y d**, respectivamente).

Por otro lado, cuando se evaluaron los genes involucrados en la vía del AS, se observó una menor expresión de *AtPR1* en las plantas inoculadas con HIII11 a las 6 hpi. Sin embargo, a las 48 hpi la expresión relativa de dicho gen fue significativamente mayor en las plantas tratadas previamente con la bacteria respecto a las plantas control (**Figura 5.5 e**). En el caso de *AtPR5*, no observamos diferencias estadísticas entre los tratamientos en ninguno de los tiempos evaluados (**Figura 5.5 f**).

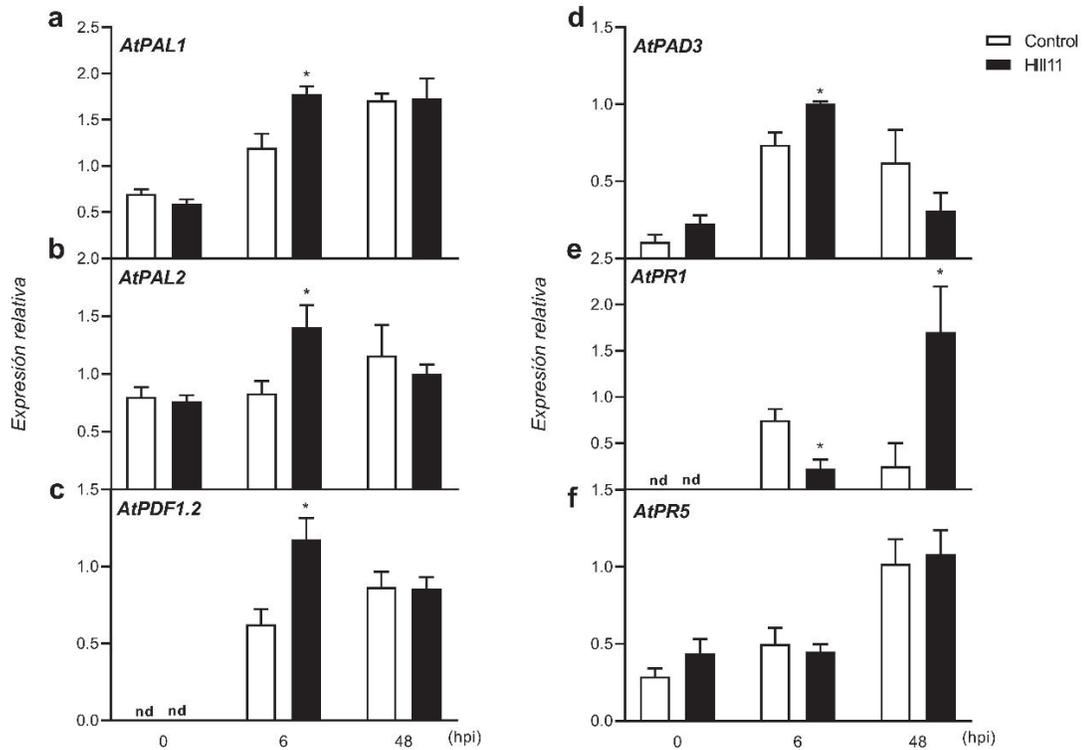


Figura 5.5. Expresión relativa de genes relacionados con respuestas de defensa en *A. thaliana*. Se evaluó por qRT-PCR la expresión relativa de (a) *AtPAL1*, (b) *AtPAL2*, (c) *AtPDF1.2*, (d) *AtPAD3*, (e) *AtPR1* y (f) *AtPR5* en plantas de *A. thaliana* sin infectar (0 hpi), y a las 6 y 48 hpi (horas post-inoculación) con *B. cinerea* (1×10^5 esporas ml^{-1}). Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control para cada condición (* $p < 0,05$).

5.4.5. Contenido de metabolitos secundarios en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *B. velezensis* HIII11.

Como resultado de la determinación de antocianinas, se observó un mayor contenido de estos metabolitos secundarios en las plantas previamente inoculadas con HIII11 sin infectar (0 hpi), como así también a las 6 horas posteriores a la inoculación con *B. cinerea* (Figura 5.6 a). A las 48 hpi, si bien el contenido promedio de antocianinas en las plantas inoculadas con la bacteria se mantuvo mayor que en los controles, no se detectaron diferencias significativas (Figura 5.6 a).

Cuando se analizó el contenido de compuestos fenólicos totales, se detectó una acumulación significativamente mayor en plantas inoculadas con HIII11 a las 6 hpi respecto a los controles, y no se observaron diferencias en los otros tiempos evaluados (Figura 5.6 b).

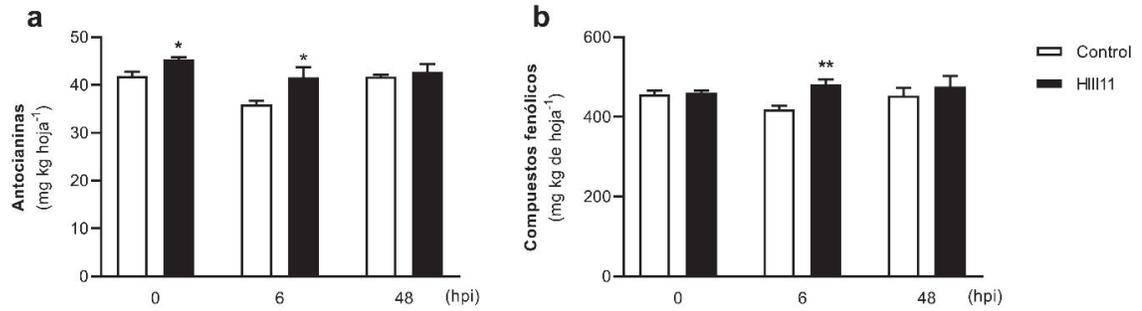


Figura 5.6. Contenido de antocianinas y compuestos fenólicos en *A. thaliana*. Se midió el contenido de (a) antocianinas y (b) compuestos fenólicos en plantas de *A. thaliana* sin infectar (0 hpi) e infectadas con *B. cinerea* (1×10^5 esporas ml⁻¹) a las 6 y 48 hpi. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control en cada tiempo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.4.6. Evaluación de la deposición de calosa.

Con la finalidad de evaluar la síntesis de calosa tras la inoculación con *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* control y tratadas con *B. velezensis* HIII11, se tomaron hojas a las 24 y 48 horas posteriores a la inoculación con el fitopatógeno. La tinción con azul anilina y posterior visualización en lupa de fluorescencia, permitió observar que la presencia de depósitos de calosa en hojas provenientes de plantas control fue mayor que en hojas de plantas inoculadas con la bacteria a las 24 hpi (**Figura 5.7**). A las 48 hpi, esta respuesta no se mantuvo con la misma intensidad en las plantas control observándose menor cantidad de dichos depósitos, mientras que, en las hojas tratadas, si bien se observa mayor fluorescencia correspondiente a la síntesis de calosa que a las 24 hpi, esta respuesta es leve (**Figura 5.7**). Como control se tomaron hojas de las mismas plantas sin inocular con *B. cinerea*. Como se observa en la **Figura 5.7**, la síntesis de calosa no se produce de manera espontánea.

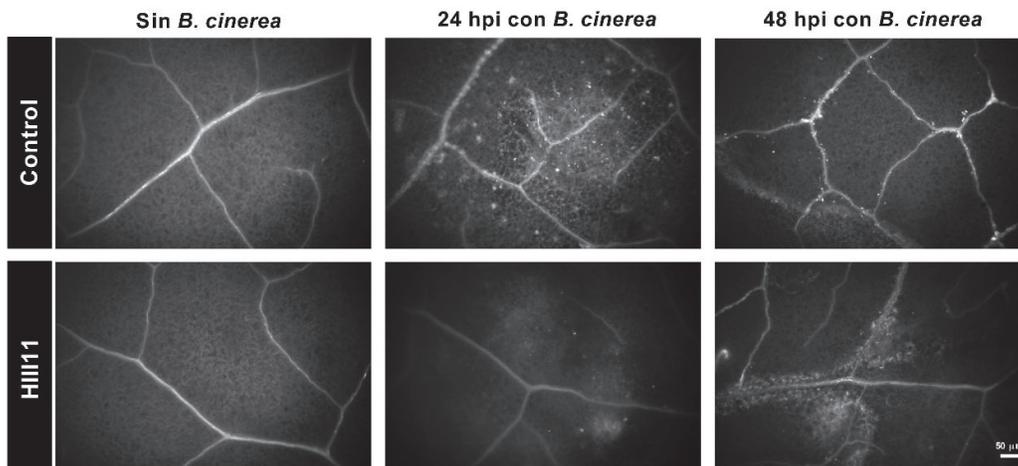


Figura 5.7. Deposición de calosa en hojas de *A. thaliana*. Deposición de calosa en hojas provenientes de plantas de *A. thaliana* control e inoculadas con HIII11 a las 24 y 48 hpi (horas post-inoculación) con *B. cinerea*. Como control, se evaluó la deposición de calosa en hojas sin inocular con el fitopatógeno.

5.4.7. Efecto sobre el metabolismo de la pared celular de *A. thaliana* provocados por la inoculación con *B. velezensis* HIII11.

5.4.7.1. Determinación del contenido de pared celular y de almidón.

Con el fin de evaluar posibles modificaciones en el metabolismo de la pared celular de plantas de *Arabidopsis* previamente inoculadas con HIII11 se llevó a cabo, en primer lugar, el aislamiento de los residuos insolubles en alcohol (RIAs) (constituidos mayoritariamente por pared celular, lámina media y por una fracción de gránulos de almidón) a partir de hojas de plantas control y plantas inoculadas con dicha bacteria. Como resultado, observamos que las plantas inoculadas con HIII11 presentaban un contenido de RIAs ligeramente mayor (49,29 g RIA kg hoja⁻¹) respecto al control (46,36 g RIA kg hoja⁻¹) (**Figura 5.8 a**).

A su vez, para determinar si esta diferencia podría estar influenciada por el contenido de almidón presente en tales muestras, se procedió a realizar la extracción y cuantificación de los gránulos de almidón. Como resultado, se determinó que el contenido promedio de almidón es de 1,82 y 1,54 g kg⁻¹ de hoja, para los controles y plantas inoculadas, respectivamente (**Figura 5.8 b**), sin diferencias estadísticas entre ambos tratamientos.

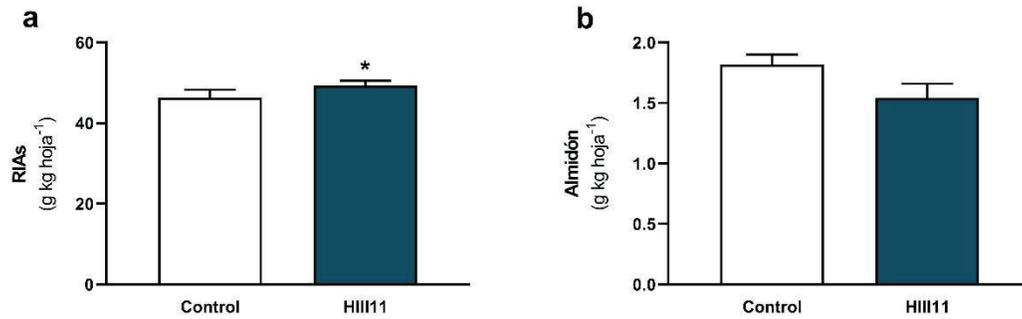


Figura 5.8. Efecto de la inoculación de plantas de Arabidopsis con HIII11 en (a) el contenido de residuos insolubles en alcohol (RIAs), (b) en el contenido de almidón de los RIAs aislados previamente. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante *t*-Test contra el control ($*p < 0,05$). En ambos casos las barras representan la media \pm SEM.

5.4.7.2. Evaluación del crecimiento *in vitro* de fitopatógenos fúngicos en medio sólido conteniendo como única fuente de nutrientes paredes celulares aisladas.

Como una forma de investigar el efecto de la inoculación de HIII11 en la accesibilidad de los fitopatógenos a las paredes celulares de Arabidopsis, se evaluó la capacidad de *B. cinerea* y *R. stolonifer* para crecer *in vitro* cuando se le suministraron los RIAs sin almidón como única fuente de nutrientes. Como resultado, a las 72 y 96 h se observó un crecimiento significativamente menor de *B. cinerea* en las paredes celulares aisladas de hojas de *A. thaliana* previamente inoculadas con HIII11 en comparación con el control (**Figura 5.9 a**). Para el caso de *R. stolonifer*, en los tiempos evaluados (24 y 48 h) se observó un menor crecimiento del fitopatógeno en los RIAs provenientes de plantas inoculadas con la bacteria, con diferencias estadísticas respecto al control a tiempo final (48 h) (**Figura 5.9 b**).

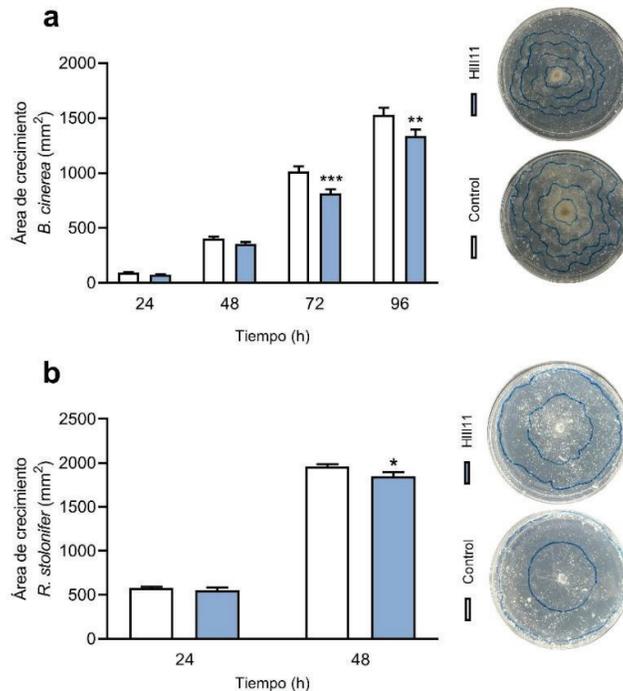


Figura 5.9. Crecimiento *in vitro* de fitopatógenos en las paredes celulares aisladas. Crecimiento de (a) *B. cinerea* y (b) *R. stolonifer* en placas conteniendo agar 0,8% (p/v) y 0,375 mg ml⁻¹ de RIAs sin almidón como única fuente de nutrientes provenientes de plantas de *A. thaliana* control e inoculadas con HIII11. Se midieron las áreas de crecimiento del micelio a las 24, 48, 72 y 96 h para *B. cinerea* y a las 24 y 48 h para *R. stolonifer*. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante 2Way-ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.4.7.3. Metabolismo de cadenas principales de pectinas.

Se realizó la extracción de pectinas totales a partir de los RIAs obtenidos para ambas condiciones. Mediante la cuantificación del AG en las pectinas totales se estimó el contenido de cadenas principales de pectinas (u homogalacturonanos, HGs) en las mismas. Como resultado, no se encontraron diferencias en el contenido de AG entre las pectinas de plantas inoculadas con HIII11 y plantas control (**Figura 5.10 a**). Además, se analizó la expresión relativa de dos genes implicados en el metabolismo de estos polisacáridos: *AtPME3*, que codifica para una enzima pectin metilesterasa, y *AtPG1*, que codifica para una poligalacturonasa putativa. Como resultado de estos análisis, observamos una sobreexpresión de *AtPME3* en las plantas inoculadas con HIII11 respecto a las plantas control (**Figura 5.10 b**). Mientras que para el caso del gen *AtPG1*, si bien en promedio la expresión es menor en plantas inoculadas con HIII11, no se observaron diferencias significativas respecto a las plantas control (**Figura 5.10 c**).

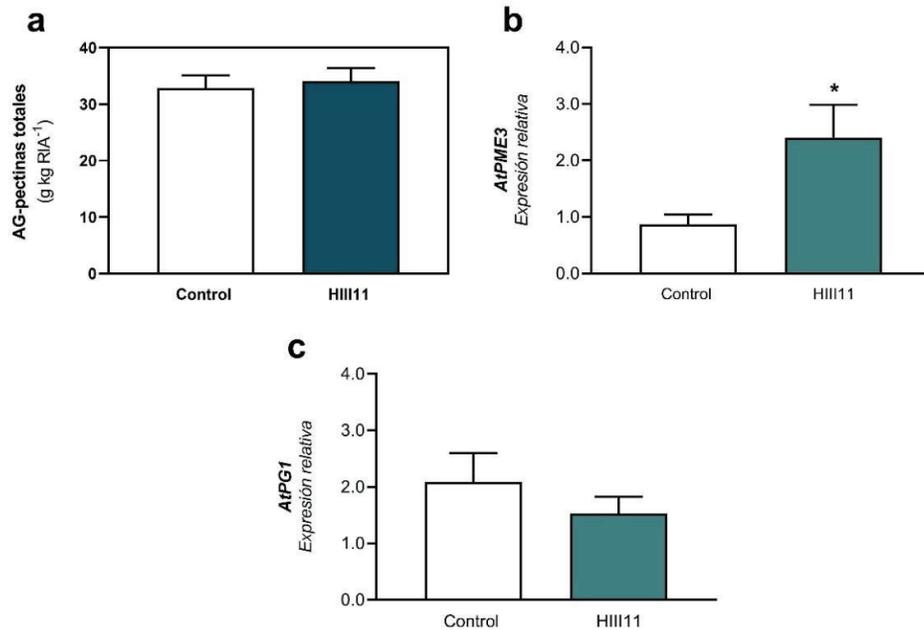


Figura 5.10. Metabolismo de pectinas. (a) Contenido de ácido galacturónico en pectinas totales a partir de los RIAs aislados de hojas de *A. thaliana* previamente inoculadas con HIII11 y control. Se midió la expresión relativa de los genes (b) *AtPME3* y (c) *AtPG1* relacionados con el metabolismo de pectinas. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.4.7.4. Metabolismo de cadenas laterales.

En lo que respecta al metabolismo de cadenas laterales de pectinas, se determinó el contenido de azúcares neutros sobre la fracción de pectinas totales previamente aislada. Como resultado, se observó un contenido significativamente mayor de azúcares neutros en las pectinas obtenidas de plantas previamente inoculadas con HIII11 en comparación con el control (**Figura 5.11 a**). A su vez, se evaluó la expresión relativa de *AtAra1* y *AtβGal*. Estos genes codifican para proteínas arabinofuranosidasa y β-galactosidasa, respectivamente, involucradas en la degradación de galactanos y arabinanos de la pared celular vegetal. Como resultado, la expresión de ambos genes se encontró disminuida de manera significativa en las plantas inoculadas con la bacteria respecto a las plantas control (**Figura 5.11 b y c**).

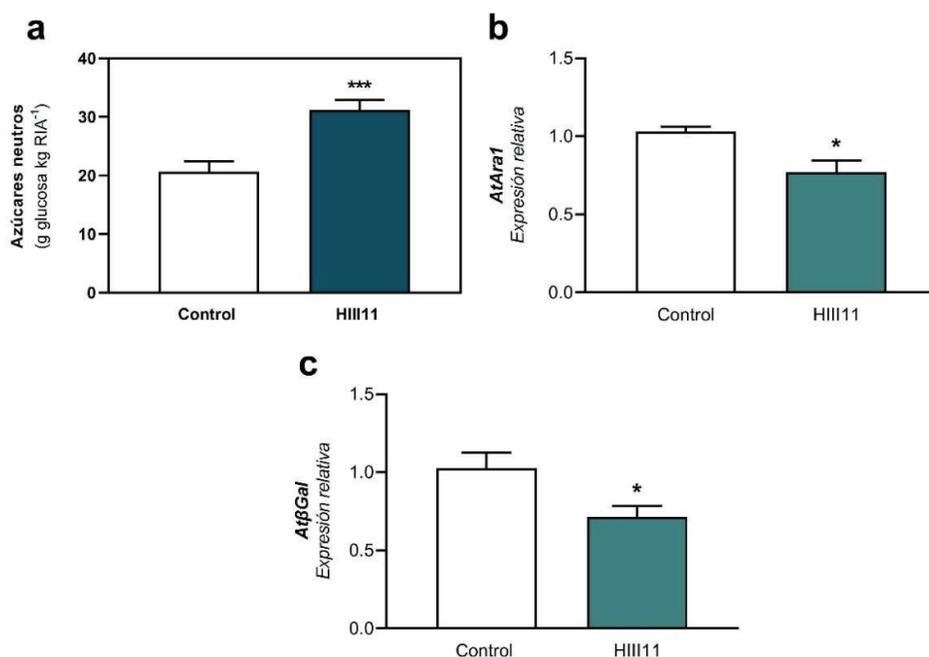


Figura 5.11. Metabolismo de cadenas laterales. (a) Medida del contenido de azúcares neutros a partir de los RIAs aislados de hojas de *A. thaliana* previamente inoculadas con HIII11 y control. Se midió la expresión relativa de los genes (b) *AtAra1* y (c) *AtβGal* relacionados con el metabolismo de cadenas laterales de la pared celular vegetal. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

5.4.7.5. Metabolismo de hemicelulosas y celulosa.

Se llevó a cabo el aislamiento y cuantificación de las fracciones de hemicelulosas y celulosa, como así también se analizó la expresión de genes vinculados con la modificación de estos polímeros en la pared celular.

El contenido de ambos polisacáridos fue significativamente mayor en plantas inoculadas con HIII11 en comparación con las plantas control (**Figura 5.12 a y b**). Cuando evaluamos mediante PCR en tiempo real la expresión relativa de los genes *AtExp8* y *AtExp5*, los cuales codifican para expansinas, se observó una menor expresión de ambos genes en las plantas inoculadas con HIII11 respecto al control (**Figura 5.12 c y d**). Sin embargo, sólo para *AtExp5* esta diferencia fue estadísticamente significativa (**Figura 5.12 d**). Por otro lado, también se midió la expresión relativa de los genes *AtXL* y *AtXyl5*, los cuales codifican para una enzima xilanasa y una β -xilosidasa 5, respectivamente. Como resultado, la expresión de *AtXL* se encontró disminuida en las plantas de *A. thaliana* tratadas con HIII11 (**Figura 5.12 e**), mientras que no se observaron variaciones en la expresión de *AtXyl5* entre ambos tratamientos (**Figura 5.12 f**).

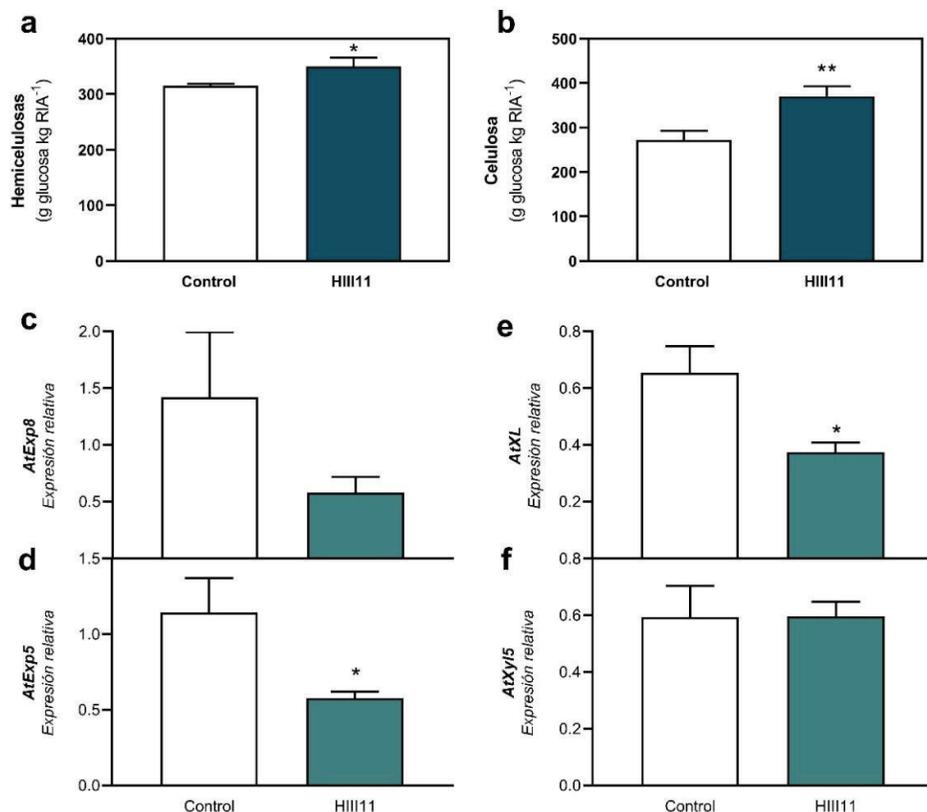


Figura 5.12. Metabolismo de hemicelulosas y celulosa. (a) Medida del contenido de hemicelulosas y (b) celulosa a partir de los RIAs aislados de hojas de *A. thaliana* previamente inoculadas con HIII11 y control. Se midió la expresión relativa de los genes (c) *AtExp8*, (d) *AtExp5*, (e) *AtXL* y (f) *AtXyl5* relacionados con el metabolismo de hemicelulosas y celulosa de la pared celular vegetal. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.5. DISCUSIÓN

El género *Bacillus* comprende un número importante de especies que han demostrado ser efectivas en la promoción del crecimiento y desarrollo de la planta hospedadora, a la vez que le proveen protección ante diferentes tipos de estreses, tanto bióticos como abióticos (Fira et al., 2018; Karačić et al., 2024; Pérez-García et al., 2011; Tiwari et al., 2019). En el capítulo anterior, tras sucesivas caracterizaciones, se seleccionaron 12 aislamientos bacterianos que reunían cualidades importantes para el control biológico y la promoción del crecimiento vegetal. La secuenciación del gen del ARNr 16S y posterior análisis filogenético, permitió determinar que los 12 aislamientos seleccionados pertenecen al género *Bacillus* (Figura 4.13). En base a los resultados obtenidos, se seleccionó al aislamiento HIII11 para continuar con el presente trabajo de Tesis. Debido a que la identificación mediante 16S no fue suficiente para dilucidar la especie dentro del género *Bacillus* a la cual pertenece HIII11, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de los genes *recA* y *recN*, los cuales fueron previamente identificados y utilizados

por otros grupos de investigación con este fin (Arguelles-Arias et al., 2009; Zeigler, 2003). De esta manera, se determinó que HIII11 pertenece a la especie *velezensis* dentro del género *Bacillus*. Esta especie está estrechamente relacionada con *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, las cuales han sido muy estudiadas en la promoción del crecimiento vegetal, así como en el control biológico de enfermedades en plantas. Actualmente, las bacterias pertenecientes a la subespecie *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* han sido denominadas como *B. velezensis* (Rabbee et al., 2019). Dentro de dicha subespecie se han identificado bacterias asociadas a plantas y típicamente utilizadas como PGPBs o BCAs. Incluso, se han desarrollado productos que se encuentran disponibles comercialmente como, por ejemplo, RhizoVital® (Alemania) basado en *B. amyloliquefaciens* FZB42, ahora denominada *B. velezensis* FZB42 (Fan et al., 2018). Este formulado es utilizado para controlar una amplia variedad de enfermedades asociadas al suelo. Se conoce que esta cepa es capaz de estimular el crecimiento de la planta y producir diferentes tipos de metabolitos secundarios biológicamente activos que inhiben patógenos (Fan et al., 2018). Esto ha sido reportado en frutilla (Sylla et al., 2013), lechuga (Chowdhury et al., 2013), trigo (Talboys et al., 2014), y tomate (Elanchezhiyan et al., 2018), por ejemplo.

Dentro de la identificación de microorganismos de interés agronómico, el uso de *A. thaliana* como organismo modelo nos permite evaluar y estudiar distintos mecanismos relacionados a la interacción planta-bacteria, permitiendo luego aplicar esos conocimientos a cultivos de importancia agrícola. Su pequeño tamaño y ciclo de vida corto, como así también la disponibilidad de su genoma secuenciado y la facilidad de su manipulación genética, ha permitido el desarrollo de importantes estudios. En el capítulo anterior se observó que la inoculación con HIII11 estimuló el crecimiento de la roseta de plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis*, como así también el desarrollo de raíces laterales (**Figura 4.8 y 4.10**). A su vez, cuando se inocularon las plantas con *B. cinerea*, aquellas que habían sido inoculadas con HIII11 mostraron una menor área necrótica en comparación con los demás aislamientos (**Figura 4.14**). Cuando esto se evaluó nuevamente, la respuesta de las plantas fue muy similar a la observada en ensayos anteriores sugiriendo un efecto de *B. velezensis* HIII11 en el control biológico de *B. cinerea* en *Arabidopsis* (**Figura 5.2**). Sumado a esto, las plantas tratadas con la bacteria mostraron menor área necrótica respecto a los controles cuando se inocularon con *R. stolonifer* (**Figura 5.3**), ampliando el especto de biocontrol de HIII11. De manera similar, integrantes de nuestro grupo de trabajo, utilizando como modelo de estudio *A. thaliana*, reportaron que *Burkholderia* sp. AU4i (aislada originalmente de arveja) era capaz de promover el crecimiento de plántulas, y a la vez, reducir lesiones provocadas tanto por *B. cinerea* como por *S. sclerotiorum* en las hojas de *Arabidopsis* (Colavolpe et al., 2021).

A medida que avanza la infección por un patógeno, la planta sufre una serie de cambios fisiológicos que pueden volverse visibles, como manchas o lesiones necróticas, deformidad de la hoja, decoloración (clorosis), deshidratación, entre otros. Entre los diferentes marcadores de estrés en los tejidos se encuentra la pérdida de electrolitos, la cual es producida por una disminución en la integridad de las membranas celulares (Bach-Pages & Preston, 2018). Por lo

que la medida de la cantidad de electrolitos liberados ha sido utilizada como una forma de estimar el daño celular producido a causa de un estrés tanto abiótico como biótico, como lo es el ataque por patógenos (Demidchik et al., 2014). Las hojas de *A. thaliana* provenientes de plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 presentaron un mejor estado y aspecto general comparado con las hojas de plantas control tras la infección con *B. cinerea* y *R. stolonifer* (**Figura 5.2 b y 5.3 b**), por lo cual se decidió analizar la pérdida de electrolitos en las mismas. Las hojas de plantas control perdieron más electrolitos que las hojas provenientes de plantas tratadas previamente con HIII11, tanto a las 48 como a las 72 horas posteriores a la inoculación con *B. cinerea* (**Figura 5.4**). A su vez, el porcentaje de pérdida de electrolitos fue significativamente mayor respecto del determinado en hojas no infectadas. Sin embargo, en el caso de hojas de plantas inoculadas previamente con HIII11, el porcentaje de pérdida de electrolitos fue prácticamente igual en las hojas sin infectar e infectadas con *B. cinerea* a los tiempos evaluados (**Figura 5.4**), mostrando que este marcador de estrés no aumenta durante la infección con *B. cinerea* cuando la planta ha sido tratada previamente con HIII11. En base a los resultados obtenidos, HIII11 le conferiría una protección a la planta durante la infección provocada por *B. cinerea* reduciendo la pérdida de la integridad de las membranas provocada por la infección por dicho fitopatógeno. En este sentido, Govrin et al. (2006) observaron que el tratamiento con toxinas de *B. cinerea* en hojas de *A. thaliana* provoca una respuesta hipersensible dada por la generación de especies reactivas del oxígeno, la reducción de la fotosíntesis, un aumento en la pérdida de electrolitos y aparición de necrosis, indicando la muerte celular.

Como se mencionó anteriormente, las PGPBs poseen propiedades que impactan en el crecimiento y desarrollo de la planta, en su rendimiento, como así también en la resistencia o tolerancia a estreses. El uso de PGPBs con capacidad de ejercer control biológico de enfermedades en plantas es una estrategia no tóxica y segura con el medio ambiente, y puede ser una alternativa al uso de agroquímicos (El-Saadony et al., 2022). Para ello, estas bacterias dependen de su capacidad para colonizar y establecerse en la rizosfera u otros tejidos de la planta hospedadora (Bonaterra et al., 2022; Lahlali et al., 2022). La mayoría de las bacterias que se comportan como endofitos ingresan al interior de los tejidos a través de las raíces, así como en las hojas a través de los estomas y de esta manera logran colonizar el espacio interno de los órganos. En el caso de los epifitos, su establecimiento dependerá no sólo de su capacidad de colonizar sino también de adaptarse a condiciones ambientales más severas (exposición UV, fluctuaciones en la temperatura, baja disponibilidad de agua y nutrientes, entre otros) (Schlechter et al., 2019). En este caso, HIII11 fue aislada a partir de las hojas de plantas de frutilla como un epifito. Se observó la colonización y el crecimiento de HIII11 en plántulas de *A. thaliana* en un período de tiempo corto, a las 120 h luego de la inoculación (**Figura 4.9 h**). Sin embargo, cuando se inocularon plantas adultas dicha bacteria no pudo ser reaislada a partir de las hojas, ni como epifito ni como endofito, luego de 15 días desde la inoculación, pero pudo ser reaislada en estas plantas a partir de la rizosfera. Este resultado podría sugerir que, dependiendo de las condiciones

ambientales y de la especie vegetal, HIII11 podría colonizar la rizosfera y/o diferentes órganos de la planta hospedadora. Por lo que es una posibilidad que pueda inicialmente encontrarse como bacteria rizosférica y lograr posteriormente, colonizar y adaptarse a la filósfera de las hojas en plantas de frutilla. Considerando la caracterización realizada en el capítulo I, HIII11 posee importantes cualidades que son necesarias para poder llevar a cabo este proceso como, por ejemplo, la capacidad de moverse o de producir *biofilms*. *B. velezensis* GF267, aislada junto con otras bacterias a partir de la rizosfera de distintas especies vegetales, demostró capacidad de inhibir la enfermedad causada por *Xanthomonas perforans* en plantas de tomate ya sea mediante aplicación de la bacteria en las hojas como en el suelo, indicando la capacidad de colonizar ambos espacios y ejercer control biológico (Mates et al., 2019).

Como parte de los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal que pueden llevar a cabo las bacterias beneficiosas, se encuentra el aumento de la resistencia mediante la inducción de la expresión de genes involucrados en las vías de señalización de defensa (**sección 2.2.7.1**). Nguyen et al. (2020) reportaron que la inoculación con *B. subtilis* PTA-271 en plantas de *A. thaliana* reducía los síntomas provocados por la infección con *B. cinerea* y demostraron la inducción de una respuesta sistémica mediante el aumento de la expresión relativa de los genes *AtPR1*, *AtPDF1.2* y *AtPR4*. Los autores informaron que, en ausencia del patógeno, la expresión relativa de estos genes fue prácticamente nula, algo que también se observó en nuestros estudios donde no se detectaron transcritos de *AtPDF1.2* y *AtPR1* a las 0 hpi (**Figura 5.5 c y e**). La activación de mecanismos de defensa genera un gasto energético importante para las plantas, por lo cual ante la ausencia de una amenaza o señal de alarma no sería necesario que estas respuestas se encuentren activas (Tiwari et al., 2022; van Hulten et al., 2006), haciendo así más eficiente el uso de recursos. A las 6 hpi con *B. cinerea* se observó un aumento en la expresión de los genes *AtPAL1*, *AtPAL2*, *AtPDF1.2* y *AtPAD3* en las plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 (**Figura 5.5 a, b, c y d**, respectivamente) respecto al control, mientras que a las 48 hpi se observó en las mismas una regulación positiva del gen *AtPR1* (**Figura 5.5 e**). En concordancia con estos resultados, se reportó que *AtPR1*, *AtPDF1.2* y *AtPR4* se encontraron regulados de manera positiva tras la infección con *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *B. subtilis* PTA-217 respecto al control (Nguyen et al., 2020). De manera similar, la inoculación con *B. proteolyticus* OSUB18 en plantas de *A. thaliana* indujo la sobreexpresión de los genes *AtPR1* y *AtPDF1.2* tras la infección con *B. cinerea* o *Pseudomonas syringae Pst* DC3000 (Yang et al., 2023). En lo que respecta a los genes *PAL*, se ha descrito una familia de 4 en *A. thaliana* (*PAL1-4*), de los cuales *PAL1* y *PAL2* se consideran los más importantes en la regulación de la vía de los fenilpropanoides (Huang et al., 2010). Esta vía es responsable de la síntesis de una amplia variedad de compuestos que desempeñan funciones importantes en la señalización y respuestas de defensa en las plantas (**sección 2.2.7.2**). Otros compuestos secundarios, como las fitoalexinas, son producidos por las plantas en respuesta al ataque por patógenos. Se ha reportado en *Arabidopsis* que la sobreexpresión de *PAD3*, gen que codifica

proteínas implicadas en la biosíntesis de estos compuestos, genera resistencia hacia *B. cinerea* (Feng et al., 2015).

En línea con lo anteriormente mencionado, otros metabolitos secundarios implicados en la defensa contra patógenos necrótrofos incluye compuestos como los derivados de indoles gluocosinolatos, fenilpropanoides, ácidos grasos y flavonoides. Los compuestos fenólicos y polifenoles son ampliamente conocidos por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Ghozlan et al., 2020). Colavolpe et al. (2021) observaron que la PGPR *Burkholderia sp.* AU4i induce la acumulación tanto de antocianinas como de compuestos fenólicos en plántulas de *Arabidopsis*. En el presente trabajo de Tesis, la inoculación con *B. velezensis* HIII11 produjo mayor acumulación de antocianinas en plantas de *A. thaliana* sin infectar (0 h) y 6 hpi con *B. cinerea* respecto a las plantas control (**Figura 5.6 a**). van Baarlen et al. (2007) reportaron estudios que indicarían que las antocianinas podrían mantener quiescente a *B. cinerea* y retrasar su infección. A su vez, también se observó un mayor contenido de compuestos fenólicos totales en dichas plantas a las 6 hpi con el patógeno (**Figura 5.6 b**). Sin embargo, a las 48 hpi no se encontraron diferencias en el contenido de estos compuestos entre plantas control y tratadas (**Figura 5.6**), sugiriendo que la acumulación de estos metabolitos secundarios se estaría dando como una respuesta temprana al ataque por patógenos.

La deposición de calosa es un posible mecanismo de defensa de la planta hacia el ataque por patógenos y se ha demostrado que es uno de los más relevantes ante *B. cinerea* (Asselbergh & Höfte, 2007). Por otra parte, se ha visto que este mecanismo puede ser inducido por algunas PGPBs en plantas (Toral et al., 2020). En un trabajo previo del grupo, se reportó que la deposición de calosa es uno de los mecanismos necesarios para que dos cepas de *Stenotrophomonas* beneficiosas protejan plantas de *Arabidopsis* contra la infección de *B. cinerea*. Estas cepas inducen la deposición de calosa en *Arabidopsis*, y no son capaces de proteger a la planta en *Arabidopsis* mutantes (*pmr4*) incapaces de depositar calosa (Marina et al., 2019). En este caso, a las 24 hpi con *B. cinerea* se observó deposición de calosa en las plantas control, mientras que esta respuesta se encontró más atenuada en las hojas de plantas inoculadas con HIII11 (**Figura 5.7**). Sin embargo, a las 48 hpi, se observó fluorescencia similar en ambos tratamientos, principalmente rodeando la zona de infección (**Figura 5.7**). La deposición de calosa es un mecanismo que se expresa en respuesta al daño mecánico o tras la invasión de patógenos en las hojas de las plantas (Pacheco-Coeto et al., 2019). Si la inoculación con HIII11 mejora las condiciones del tejido de *A. thaliana* y esto influye en la respuesta de la misma hacia la infección por fitopatógenos, es posible que la planta no requiera activar una defensa que implique un costo energético, como lo es la deposición de calosa. Dado que la calosa es una respuesta típica de la planta al ataque de patógenos para reforzar las paredes celulares y restringir la propagación de la infección, su menor acumulación en las hojas tratadas con HIII11 a las 24 hpi podría indicar que el daño es menor en comparación con el control (**Figura 5.7**). A su vez, esto sugeriría que HIII11 promueve un estado fisiológico más resistente o preparado de *A. thaliana*, posiblemente a

través de la activación de otros mecanismos, como la inducción de genes de defensa y la acumulación de metabolitos secundarios en los tejidos, haciendo que la misma responda de manera más eficiente a la infección por *B. cinerea*, como se observó en la **Figura 5.2**.

Como se mencionó en la introducción general (**sección 2.7**), la pared celular vegetal no sólo constituye una barrera contra el ataque por patógenos, sino que además es una estructura dinámica capaz de percibir estímulos bióticos y abióticos y desencadenar diferentes vías de señalización (Swaminathan et al., 2022). Es así que, estudiar modificaciones en el contenido de los polisacáridos de las mismas, como así también cambios en su metabolismo por acción de bacterias beneficiosas resulta de gran interés. En este sentido, se realizó el aislamiento de las paredes celulares de plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *B. velezensis* HIII11, comparándolas con plantas control. Los resultados indican que las plantas inoculadas con HIII11 presentaron un mayor contenido de pared celular en comparación con el control, como se muestra en la **Figura 5.8 a**. Esto podría sugerir que la interacción con la bacteria podría estar favoreciendo la síntesis o acumulación de componentes estructurales de la pared celular. Además, se descartó que la diferencia observada en el peso de los RIAs se debiera al contenido de almidón presente en las hojas, ya que este se extrae junto con las paredes celulares (**Figura 5.8 b**).

Los patógenos, durante el proceso de infección, pueden sintetizar diversas enzimas que degradan los distintos componentes de la pared celular vegetal permitiéndoles acceder a la misma. El menor crecimiento de *B. cinerea* y *R. stolonifer* en los RIAs aislados de plantas previamente inoculadas con HIII11 nos sugiere que dichas paredes celulares presentarían una mayor integridad si son comparadas con las paredes celulares de plantas sin inocular (control) y, por lo tanto, serían menos accesibles para los mismos (**Figura 5.9**). Esto también fue observado en paredes celulares aisladas de plantas de *A. thaliana* inoculadas con bacterias oxalotróficas del género *Stenotrophomonas*, en las cuales se vio reducido significativamente el crecimiento de *B. cinerea* y *S. sclerotium* (Marina et al., 2019). Además de constituir una barrera física, la pared celular es un reservorio de compuestos antimicrobianos (Molina et al., 2021). Una mayor acumulación de estos compuestos en las paredes celulares de plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 podría también explicar el menor crecimiento *in vitro* de los fitopatógenos en las mismas, en caso de que dichas moléculas permanecieran en las paredes celulares durante el proceso de extracción etanólica.

Debido a su naturaleza dinámica, la pared celular vegetal es capaz de cambiar su arquitectura y composición en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Molina et al., 2024). Además, se cree que las PGPBs pueden inducir modificaciones en la pared celular de la planta hospedadora conduciendo al refuerzo de la misma. Recientemente Planchon et al. (2020) determinaron que *B. subtilis* ATCC 6633, una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, inducía un refuerzo de la pared celular en el tallo de plantas de lino. En el presente trabajo de Tesis, se evidenció cierta influencia de *B. velezensis* HIII11 en el metabolismo de la pared celular de *A. thaliana*. La cuantificación del AG en pectinas totales no arrojó diferencias entre plantas

tratadas y plantas control (**Figura 5.10 a**), mientras que, si hubo cambios en la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de pectinas, destacándose el incremento en la expresión de *AtPME3* (**Figura 5.10 b**) cuando las plantas fueron inoculadas con HIII11 respecto al control, sin modificaciones estadísticamente significativas en la expresión de *AtPG1* (**Figura 5.10 c**). Como se mencionó previamente, la actividad pectin metilesterasa puede resultar en dos tipos de efectos para la pared celular: por un lado, la demetilación puede cambiar el pH y la carga en la pared lo que permite la interacción de poliurónidos a través de puentes de calcio dando lugar al refuerzo de la misma. Por el otro, la demetilación torna más susceptibles a los polímeros pécticos a la degradación por poligalacturonasas. Dado que la expresión de *AtPG1* no se vio modificada, la regulación positiva de *AtPME3* por *B. velezensis* HIII11 resulta interesante, ya que la misma podría relacionarse con un refuerzo de las uniones de los poliurónidos. Resultados similares fueron obtenidos por Colavolpe et al. (2021), donde la inoculación con *Burkholderia* sp. AU4i en plantas de *A. thaliana* indujo un aumento de la expresión de *AtPME3*, mientras que no observaron ningún efecto sobre la abundancia de ARNm de *AtPG1*.

En lo que respecta al metabolismo de cadenas laterales, los resultados obtenidos indicarían que la inoculación con *B. velezensis* HIII11 altera este proceso, ya que se observó un incremento significativo en la cantidad de azúcares neutros en las plantas inoculadas con la bacteria respecto al control (**Figura 5.11 a**). Además, de manera interesante, la expresión de *AtAra1* y *AtβGal* se encontró disminuida en las plantas inoculadas (**Figura 5.11 b y c**) sugiriendo una menor degradación de los principales constituyentes de estas cadenas.

Por último, las fracciones de hemicelulosas y celulosa fueron mayores en las paredes celulares aisladas de plantas de *Arabidopsis* inoculadas con HIII11 (**Figura 5.12 a y b**), sugiriendo un efecto de la bacteria en el metabolismo de estos componentes de la pared celular. Marina et al. (2019) observaron que la expresión de genes relacionados con el metabolismo de hemicelulosas (*AtXL1*, *AtExp5*, *AtExp8*, *AtXyl5*) se encontraba disminuida en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Stenotrophomonas* sp. OxB, sugiriendo que la degradación de la pared celular de *A. thaliana* podría estar siendo atenuada por la interacción con esta cepa. En este contexto, la expresión relativa de *AtExp5* y *AtXL* se encontró disminuida en plantas inoculadas con HIII11 (**Figura 5.12 d y e**) y, si bien la expresión de *AtExp8* no mostró diferencias estadísticas, esta fue menor en las plantas tratadas en comparación con el control (**Figura 5.12 a**), reforzando la idea de que *B. velezensis* HIII11 podría estar modulando de manera negativa los mecanismos responsables de la degradación de hemicelulosas.

5.6. CONCLUSIONES

- El aislamiento bacteriano identificado como *Bacillus velezensis* HIII11 demostró ser efectivo en la mejora de la resistencia de plantas de *A. thaliana* Col-0 ante la infección por fitopatógenos necrótrofos, presentando una menor área necrótica, una menor pérdida de electrolitos, la sobreexpresión de genes relacionados con respuestas de defensa y una mayor acumulación en sus tejidos de antocianinas y compuestos fenólicos.
- *B. velezensis* HIII11 es capaz de modular el metabolismo de la pared celular de *A. thaliana* regulando de manera positiva el gen *AtPME3*, relacionado con el refuerzo de la pared celular, y regulando de manera negativa los genes *AtAra1*, *AtβGal*, *AtExp5* y *AtXL*, relacionados con el desensamblaje de la misma. Además, el menor crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer* en dichas paredes, sumado a las modificaciones en el contenido de cadenas laterales y de hemicelulosas, sugiere que *B. velezensis* sería capaz de modificar la estructura de la pared celular en *A. thaliana*.

6. CAPÍTULO III: Efecto de la inoculación de plantas de frutilla con *Bacillus velezensis* HIII11 en los atributos de calidad y el metabolismo de la pared celular primaria de frutos cosechados en estadio apto para consumo.

6.1. INTRODUCCIÓN

El fruto de frutilla es muy apreciado a nivel global por sus propiedades organolépticas, pero también por su aporte nutricional (**sección 2.8.3**). La calidad de estos frutos está determinada fundamentalmente por el tamaño, color, textura, aroma y equilibrio entre el contenido de azúcares y acidez, así como por el nivel de metabolitos secundarios con propiedades funcionales (Basu et al., 2014; Schwieterman et al., 2014).

Estudios recientes han evidenciado el efecto positivo de la inoculación con PGPBs en la producción, fisiología, crecimiento y calidad de la frutilla, sugiriendo el potencial de esta práctica como una alternativa al uso de fertilizantes y plaguicidas de síntesis química (Badar et al., 2022; Mateos-Naranjo et al., 2025; Sretenović et al., 2024; Valle-Romero et al., 2023). Dentro del género *Bacillus*, se reportó que la aplicación de distintas cepas mejoró el rendimiento de las plantas, aumentando el número de frutos, el contenido de vitamina C (Erturk et al., 2012; Esitken et al., 2010), y sólidos solubles totales en los mismos, como así también se evidenció un mayor contenido de compuestos fenólicos en las hojas (Morais et al., 2019) y frutos (Rahman et al., 2018) de plantas tratadas con las bacterias respecto a los controles, mostrando, a su vez, un incremento significativo de la actividad antioxidante en ambos órganos. Además, este género bacteriano ha demostrado ser eficiente en la inhibición o reducción de enfermedades causadas por fitopatógenos en el cultivo de frutilla. Abd-El-Kareem et al. (2022) reportaron que una cepa de *B. brevis* fue capaz de reducir las enfermedades causadas por *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina* en un 74, 76 y 79%, respectivamente. Asimismo, distintas cepas de la especie *B. safensis* lograron controlar a los fitopatógenos *Botrytis cinerea* (Hassan et al., 2021) y *Colletotrichum fragariae* (Li et al., 2021) en la postcosecha de frutilla.

Durante el desarrollo de esta Tesis, se evaluaron posibles mecanismos de acción mediante los cuales *B. velezensis* HIII11 podría promover el crecimiento o ejercer control biológico de patógenos fúngicos. En el capítulo II se realizaron evaluaciones utilizando el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* Col-0 obteniendo resultados interesantes respecto a respuestas de defensa activadas en las plantas, como así también modificaciones en la pared celular de las mismas. Como se mencionó anteriormente, la pared celular primaria es una estructura dinámica y compleja que actúa como una barrera semipermeable para restringir y proteger físicamente a la célula (Srivastava et al., 2017). En el caso de los frutos carnosos, a medida que avanza la maduración, la pared celular comienza a desensamblarse y, junto con la disolución de la lámina media, conduce al ablandamiento de los mismos aumentando la susceptibilidad al daño mecánico y al ataque por patógenos. Las modificaciones en la pared celular ocurren a través de un sistema

sincronizado de señales y enzimas que actúan sobre los distintos componentes de estas estructuras (Daglio et al., 2024; Posé et al., 2018; Vicente et al., 2007). En frutilla, se han reportado numerosos estudios sobre los cambios producidos en el metabolismo de la pared celular como resultado de la aplicación de diferentes tratamientos postcosecha físicos y químicos (Langer et al., 2018, 2019, 2022; Ortiz Araque et al., 2019; Priyadarshi et al., 2024). En estos trabajos, se informa tanto sobre las modificaciones en el contenido de los distintos polímeros que constituyen la pared celular primaria de frutilla, como cambios en los niveles de expresión y en la actividad de enzimas que actúan sobre las diferentes fracciones pécticas y hemicelulósicas luego de aplicación de tratamientos térmicos, luz visible y UV, atmósferas controladas, reguladores del crecimiento vegetal, entre otros.

Respecto al efecto de estímulos bióticos, de acuerdo a nuestro conocimiento, no hay reportes sobre la influencia de la aplicación de PGPBs en el metabolismo de la pared celular de frutilla. De esta manera, en el presente capítulo se propuso estudiar la inoculación precosecha de plantas de frutillas del cultivar 'San Andreas' con *Bacillus velezensis* HIII11 y determinar su efecto en el fruto en lo que respecta a los principales parámetros de calidad y posibles modificaciones en la pared celular del mismo. A su vez, se decidió evaluar la aplicación de extractos libres de células de esta bacteria como un posible tratamiento postcosecha de frutilla para el control de la enfermedad producida por el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 6.2.1.** Caracterizar el efecto de la inoculación precosecha con el aislamiento seleccionado HIII11 en los principales parámetros de calidad de frutillas maduras.
- 6.2.2.** Estudiar la influencia de la inoculación en la composición de la pared celular de frutilla, su integridad y la respuesta transcripcional de genes de pared.
- 6.2.3.** Evaluar la aplicación de los extractos libres de células como estrategia de preservación de la calidad postcosecha de frutilla.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1. Plantas de frutilla y condiciones de cultivo.

Se utilizaron 50 plantines de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch.) variedad 'San Andreas', los cuales se plantaron en macetas de 10 litros conteniendo tierra y arena en proporción 1:1. Las mismas se colocaron en invernáculo y el riego se realizó manualmente con agua de lluvia. Al momento de iniciar las inoculaciones, las plantas se dividieron al azar en dos grupos identificándose 25 plantas como tratadas con HIII11 y 25 como plantas control (tratadas con MgCl₂ 10 mM, pH 7,0 estéril).

6.3.2. Inoculación de plantas de frutilla y recolección de material para estudio.

Las plantas tratadas con HIII11 se inocularon con una solución de bacteria en MgCl_2 10 mM estéril a una concentración final de 1×10^8 UFC ml^{-1} , mientras que las plantas utilizadas como controles se trataron sólo con MgCl_2 10 mM pH 7,0 estéril. La inoculación se realizó mediante riego (10 ml) en la base de cada planta y rociado (o asperjado) de las hojas con la solución correspondiente. El proceso de inoculación se repitió cada 10 días, realizándose 10 inoculaciones en total. Finalizado el ensayo, y durante los 7 días posteriores a la última inoculación, se cosecharon 52 frutos de plantas controles y tratadas en estadio de madurez apto para consumo (75 – 85% coloración superficial roja). Tanto los frutos de plantas inoculadas como los controles se dividieron de forma aleatoria en tres grupos, se cuartearon, se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -20 °C para posteriores análisis.

Para el caso de los ensayos con hojas de frutilla, se utilizaron 15 plantas control y 15 plantas tratadas cortándose una hoja trifoliada de cada planta luego de 24 h de la última inoculación. Los 45 folíolos de plantas tratadas y los 45 de plantas control se dividieron aleatoriamente en 3 grupos para los siguientes ensayos: infección con *B. cinerea*, infección con *R. stolonifer* y control, y determinaciones bioquímicas (ensayos de integridad de pared y determinación de compuestos fenólicos).

6.3.3. Determinación de atributos de calidad de los frutos.

6.3.3.1. pH y acidez titulable.

Para ambas medidas, se utilizaron 1,2 g de frutos congelados molidos en N_2 . El tejido pulverizado se resuspendió en 12 ml de H_2O bidestilada. Las muestras se agitaron por vórtex y se centrifugaron a $7000 \times g$ durante 5 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se midió el pH de las muestras utilizando un pHmetro (OAKTON pH-700) previamente calibrado.

Para determinar la acidez titulable se realizaron titulaciones de las muestras con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,1 (AOAC, 1990), y la misma se expresó como porcentaje de acidez titulable (% AT) que corresponde a g de ácido cítrico cada 100 g de fruto. Se analizaron tres réplicas biológicas por condición, cada una de las cuales estaba constituida por un conjunto de frutos y cada muestra se tituló por duplicado.

6.3.3.2. Sólidos solubles totales.

Para la determinación de los sólidos solubles totales (SST) se partió de aproximadamente 3 g de fruto. Los mismos se maceraron con ayuda de mortero y pilón hasta obtener un jugo. Una

alícuota del extracto se pasó a tubo nuevo y se centrifugó a 13200 x g durante 5 minutos. A partir de 100 µl de cada muestra se midió el contenido de SST como °Brix utilizando un refractómetro de mesada (MA871, Milwaukee Instruments). Se utilizaron 3 réplicas biológicas por tratamiento, cada una de las cuales está constituida por un conjunto de frutos y las mediciones se realizaron por duplicado.

6.3.3.3. Azúcares totales.

A partir de frutos pulverizados en N_{2(l)}, se pesaron 0,13 g de los mismos y se homogeneizaron en 1,8 ml de etanol 100% (v/v). El homogenato se centrifugó a 9000 x g durante 10 min a 4 °C. Una alícuota del sobrenadante (300 µl) se pasó a tubo nuevo. A partir de esta alícuota se realizó una dilución 1/50 para llevar a cabo la cuantificación. La mezcla de reacción consistió en 50 µl de cada extracto diluido con 500 µl de antrona 0,2% (p/v) en H₂SO₄ 72% (v/v), la cual se agitó suavemente por vórtex y se incubó durante 12 min a 100 °C. Las muestras se llevaron luego a un baño de agua y hielo, y el contenido de azúcares totales se midió espectrofotométricamente a una λ = 625 nm. Se construyó una curva estándar usando distintos volúmenes de glucosa 0,04% (p/v) como patrón y los resultados se expresaron como gramos de glucosa por kilogramo de fruto. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por tratamiento, cada una de las cuales está constituida por un conjunto de frutos y se realizaron dos ensayos independientes.

6.3.3.4. Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides.

La medida de antocianinas y compuestos fenólicos se realizó tal como se describió en la **sección 5.3.8** y **5.3.9**, respectivamente. Para realizar la medida de flavonoides, se utilizaron aproximadamente 0,25 g de frutos previamente pulverizados con pilón y mortero en N_{2(l)}. El tejido se homogeneizó en 1,5 ml de etanol 80% (v/v). Las muestras se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min a 4 °C y se pasaron los sobrenadantes a tubos nuevos. Se mezclaron 100 µl de cada extracto con 400 µl de H₂O_d y 50 µl de NaNO₂ 5% (p/v). Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 50 µl de AlCl₃ al 10% (p/v) a cada muestra y se incubaron nuevamente durante 5 – 7 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 µl de NaOH 1 M y 300 µl de H₂O_d. El contenido de flavonoides se midió por espectrofotometría a λ = 450 nm. La curva estándar se construyó con una solución de Quercetina 0,45 mg ml⁻¹ en etanol 80% (v/v), y el contenido de flavonoides se indicó en miligramos por kilogramo de fruto. La medida de los tres compuestos se realizó utilizando 3 réplicas biológicas para cada tratamiento, cada una constituida por un conjunto de frutos y se realizaron dos mediciones independientes.

6.3.4. Estudio del metabolismo de la pared celular de frutos de frutilla.

6.3.4.1. Aislamiento y cuantificación de RIAs.

Para la obtención de las paredes celulares como residuos insolubles en alcohol (RIAs) se utilizaron 5 g de fruto congelado, los cuales se pulverizaron con pilón y mortero en N₂(l). La metodología utilizada para la extracción de RIAs se detalló en la **sección 5.3.11.1**. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por tratamiento, cada una de las cuales estaba constituida por un conjunto de frutos.

6.3.4.2. Hidratación *in vitro* de las paredes celulares aisladas.

Para evaluar la hidratación de las paredes celulares, se pesaron exactamente 10,0 mg de RIAs de cada muestra en tubos de 2 ml, se agregaron 2 ml de H₂O bidestilada estéril y se resuspendió mezclando por inversión y vórtex. Los tubos se colocaron en gradillas en posición horizontal y se agitaron durante 24 h a 22 °C. Posteriormente, se los colocó durante 4 horas a temperatura ambiente en forma vertical para favorecer la decantación de las paredes celulares. La altura de los RIAs hidratados se registró con una regla milimétrica. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por tratamiento, y se realizaron dos ensayos independientes.

6.3.4.3. Crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer* en las paredes celulares aisladas de frutos.

El crecimiento *in vitro* de ambos fitopatógenos en las paredes celulares obtenidas a partir de frutos de frutilla se evaluó tal como se detalló en la **sección 5.3.11.4**. La concentración de RIAs de frutilla óptima para este tipo de ensayos (0,2 mg de RIAs por ml de agar-agua 0,8% (p/v)) fue determinada previamente por el grupo de trabajo (Villarreal et al., 2016). El crecimiento de *B. cinerea* se evaluó a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, mientras que en el caso de *R. stolonifer*, se tomaron valores a las 24 y 48 h.

6.3.4.4. Cuantificación de los componentes de la pared celular.

6.3.4.4.1. Extracción de pectinas totales. Determinación del contenido de ácido galacturónico y azúcares neutros.

La extracción de pectinas totales y posterior determinación del contenido de ácido galacturónico y azúcares neutros se realizó tal como se describe en la **sección 5.3.11.5.1** del capítulo II.

6.3.4.4.2. Contenido de las fracciones de pectinas, hemicelulosas y celulosa.

Veinticinco miligramos de RIAs se resuspendieron en 25 ml de H₂O_d para solubilizar las pectinas de interacciones más débiles (pectinas solubles en agua o PSA). La mezcla se agitó durante 14 h a 20 °C, luego se filtró al vacío y el sólido resultante se lavó tres veces con 5 ml de H₂O_d. Se registró el volumen de los filtrados obtenidos, los cuales se nombraron como PSA. El residuo sólido se resuspendió en una solución de un agente quelante para solubilizar las pectinas de interacciones iónicas (pectinas solubles en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o PSE), para lo cual se utilizaron 12,5 ml de acetato de sodio (NaAc) 0,05 M conteniendo EDTA 0,04 M, pH 4,5 y se agitó durante 4 h a 20 °C. El homogenato se filtró al vacío y el sólido se lavó tres veces con 2,5 ml de la misma solución. Se registró el volumen de los filtrados y se nombraron como PSE. El residuo sólido se resuspendió en 12,5 ml de HCl 0,05 M y se hidrolizó a 100 °C por 1 h con agitación periódica, para liberar las pectinas de unión covalente (pectinas solubles en HCl o PSH). Las muestras se enfriaron y filtraron al vacío, y el residuo se lavó tres veces con HCl 0,05 M. Se registró el volumen de los filtrados y se nombraron como PSH.

El contenido de ácido galacturónico de cada fracción se determinó a través del método del 3-fenilfenol de acuerdo a Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) de igual manera a lo descrito previamente para pectinas totales (**sección 5.3.11.5.1**). La curva de calibración se construyó utilizando diferentes volúmenes de AG 1 mM, pH 5,5. Los resultados se expresaron como gramos de glucosa por kilogramo de RIAs.

Para la extracción de hemicelulosas y celulosa, el residuo sólido resultante de la extracción de las fracciones pécticas se mezcló con 25 ml de NaOH 4 M y se agitó durante 8 h a 20 °C. El resto de la extracción y cuantificación de las fracciones se realizó de igual manera que para las hojas de *A. thaliana*, detallado en la **sección 5.3.11.5.2**.

6.3.4.5. Evaluación de la transcripción de genes implicados en el metabolismo de la pared celular mediante PCR en tiempo real.

6.3.4.5.1. Extracción de ARN total de frutilla.

Los frutos de frutilla poseen un alto contenido de compuestos fenólicos y pectinas, lo cual dificulta la extracción de ARN total, requiriendo de un método más complejo para su obtención. De esta manera, se utilizó un protocolo modificado de la técnica del 2-butoxietanol (2-BE) (Manning, 1991) puesto a punto previamente en el Laboratorio (Villarreal et al., 2016). Tanto para las muestras control como tratadas (inoculadas con HIII11), la extracción de ARN total se realizó por quintuplicado. Para ello, 5 g de tejido se pulverizaron con pilón y mortero en presencia de N_{2(l)}. Se tomaron 0,2 g de tejido y se homogeneizaron en tubos para microcentrífuga de 2 ml con

900 µl de buffer de extracción (Tris 0,2 M, EDTA 0,01 M, pH 7,6 ajustado con H₃BO₃) preparado en agua mili Q, 45 µl de SDS (dodecilsulfato sódico) 10% (p/v) y 18 µl de β-mercaptoetanol. Posteriormente, se procedió a la homogeneización del macerado por inversión y vórtex y, con el fin de separar ácidos nucleicos totales de proteínas, se añadió inmediatamente 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (relación 25:24:1) agitando vigorosamente hasta que la mezcla obtuvo un aspecto lechoso. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 20 min a 10000 x g a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 0,4 volúmenes (400 µl) de 2-BE a 4 °C y se mezcló por inversión y vórtex. Se incubó durante 30 min a 0 °C, para permitir la precipitación de pectinas y se centrifugó durante 20 min a 10000 x g a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se le agregaron 0,6 volúmenes de 2-BE, se mezcló por inversión y vórtex y se incubó durante 1 h a 0 °C. En este paso, el 2-BE quedó en proporción 1:1 lo que permitió que precipiten ácidos nucleicos totales. Se centrifugó a 10000 x g durante 25 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante con micropipeta y se dejó secar el pellet en estufa a 37 °C por 5 min. El pellet se resuspendió en 972 µl de agua mili Q estéril y se agregaron 28,4 µl de NaAc 3 M, pH 5,2 más 400 µl de 2-BE y se mezcló por inversión y vórtex. Aquí se continuaron eliminando pectinas que pueden no haberse descartado en los pasos anteriores. Se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 10000 x g a 4 °C durante 25 min. Se tomaron las dos fases líquidas y se les añadieron 600 µl de 2-BE, quedando nuevamente el 2-BE en proporción 1:1 y precipitando, por lo tanto, los ácidos nucleicos. Se incubó a 0 °C durante 1 h y a continuación, se centrifugó a 10000 x g durante 25 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 900 µl de etanol 70% (v/v). Se centrifugó a 16000 x g a 4 °C durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con 700 µl de etanol 100% (v/v). Se centrifugó 10 min a 10000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a 37 °C durante 5 min. Para lograr la precipitación selectiva del ARN frente a ácidos nucleicos totales, el pellet remanente se resuspendió en 500 µl de agua mili Q permitiendo hidratar durante 15 min en hielo. Luego se añadieron 165 µl de LiCl 12 M homogeneizando mediante pipeteo. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó durante 30 min a 10000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 750 µl de etanol 70% (v/v). Nuevamente, se centrifugó durante 10 min a 10000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se procedió a un segundo lavado, pero esta vez con etanol 100% (v/v). Se centrifugó 10 min a 10000 x g a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet se secó a 37 °C durante 5 min y finalmente, el ARN total obtenido se resuspendió en 25 µl de agua mili Q y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

6.3.4.5.2. Cuantificación y verificación de la integridad del ARN total.

La cuantificación y verificación de la integridad del ARN total extraído se realizó de igual manera que para el ARN total extraído de *A. thaliana* detallado en la **sección 5.3.6.1.** de materiales y métodos del capítulo II.

6.3.4.5.3. Síntesis de ADNc y PCR control.

La síntesis de ADNc y el control de la efectividad en la síntesis a través de PCR a tiempo final, se realizó tal como se detalla en la **sección 5.3.6.2.** y **5.3.6.3.** para Arabidopsis, con la diferencia de que, en este caso, se utilizaron cebadores específicos para un gen de referencia que codifica para una Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de frutilla (*FaGaPDH1*, **Tabla 6.1**). La separación por electroforesis y visualización de los productos de amplificación se realizó como se detalla en el capítulo II (**sección 5.3.6.3.**).

6.3.4.5.4. Análisis de la expresión relativa mediante PCR en Tiempo Real.

Previamente al presente trabajo de Tesis, en el Laboratorio se contaba con el valor de eficiencia de amplificación para cada par de oligonucleótidos utilizados y cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 6.1** (Langer et al., 2018; Villarreal et al., 2016).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo tal como se detalló en la **sección 5.3.6.4.** Los niveles de expresión relativa correspondieron al promedio de cinco extracciones independientes de ARN total para cada condición, los cuales se calcularon conforme al método descrito por Pfaffl (2001), normalizando con el gen de referencia *FaGaPDH1* y se expresaron en unidades arbitrarias \pm SEM.

Tabla 6.1. Secuencias de oligonucleótidos (*Fw* (*forward*) o cebador directo; *Rv* (*reverse*) o cebador reverso) utilizados en la evaluación de expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular en frutilla. Se indica, además, el número de acceso de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y la descripción de cada gen.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	N° acceso	Descripción gen
<i>FaGaPDH1</i>	<i>Fw</i> : TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG <i>Rv</i> : AGCAGGCAGAACCTTCCGACAG	AB363963.1	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
<i>FaPME1</i>	<i>Fw</i> : CAAGTGCACCCAACCTTCTGA <i>Rv</i> : CTGAGCTACCACAACGTCCA	AY324809	Pectin metilesterasa 1
<i>FaPG1</i>	<i>Fw</i> : AATGTGAGATTCGACAGAGTG <i>Rv</i> : GTGGAAATTTTGCTGTTAAGTG	DQ458990	Poligalacturonasa
<i>FaPLB</i>	<i>Fw</i> : ATTA CTGCTGGTGCTGGTG <i>Rv</i> : ACTGCAAATCACCATAA	AF339024	Pectato liasa B
<i>FaPLC</i>	<i>Fw</i> : GCGAAAGAGGTGACACATAGA <i>Rv</i> : CCTAGAATAGCTTCTGGAACCTG	U63550	Pectato liasa C
<i>FaAra1</i>	<i>Fw</i> : CCGATTCCACCTCTTCAGTCC <i>Rv</i> : AATGGGTCGCCCGGATGCCTG	EF635628	α -L-arabinofuranosidasa
<i>FaβGal1</i>	<i>Fw</i> : GCAGCTAATGATTCTGAGTCTC <i>Rv</i> : TCCAGACTCTCCACAATCATC	AJ278703	β -Galactosidasa 1
<i>FaβGal4</i>	<i>Fw</i> : CATGGAATTATGGAGACTCAGAC <i>Rv</i> : GCTCCACAGCTTATGAACTAC	KR189030	β -Galactosidasa 4
<i>FaExp2</i>	<i>Fw</i> : AGCTAGCTCTCACTTTCTTTCTC <i>Rv</i> : ATCACCACCTCCATCGAAAGTG	AF159563	Expansina 2
<i>FaExp5</i>	<i>Fw</i> : TCTCGCCCAGCCCGTCTTCCAGCAT <i>Rv</i> : TGGGTTGCCAATTAGTTCTT	AF226702	Expansina 5
<i>FaXTH1</i>	<i>Fw</i> : ACTCTGCTCTTGAGCATAGTGC <i>Rv</i> : GAGCTGAATCTCATTGCCACC	GQ367550	Xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa 1
<i>FaXTH2</i>	<i>Fw</i> : AGCTTTCTTTTGGTTCTCTCTC <i>Rv</i> : CCTTAACAACCAAAGCAGATGGT	GQ367551	Xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa 2
<i>FaXyl1</i>	<i>Fw</i> : TGCTACCAGAGATCGACGTG <i>Rv</i> : CAACACCGGCATAGTTTCCT	EU736110	β -Xilosidasa

6.3.5. Infección de hojas de frutilla con *B. cinerea*.

Veinticuatro horas después de la última inoculación con HIII11 se cortaron hojas de distintas plantas de frutilla. Las mismas se colocaron en placas de Petri con agar-agua al 0,8% (p/v) y posteriormente, se infectaron con dos gotas de 5 μ l de una suspensión de esporas de *B. cinerea* (1×10^5 esporas ml^{-1}) a cada lado de la nervadura central del folíolo. Las placas se colocaron en el cuarto de plantas con condiciones controladas (22 °C, 10 h luz – 14 h oscuridad) y se tomaron fotografías de las hojas a las 72, 96 y 120 horas post-inoculación con el fitopatógeno. Las áreas necróticas se midieron utilizando el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA). Se evaluaron 15 folíolos por tratamiento, divididas al azar en 5 placas.

6.3.6. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de frutilla.

Para realizar la extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en hojas de frutilla, se aplicó la metodología detallada anteriormente (**sección 5.3.9**).

6.3.7. Estudio de la pared celular de hojas de frutilla.

6.3.7.1. Aislamiento y cuantificación de paredes celulares.

El aislamiento de las paredes celulares a partir de hojas de frutillas se realizó de la misma manera que se mencionó anteriormente (**sección 5.3.11.1**). Se partió de 1 g de tejido pulverizado en N₂(l) y se utilizaron 3 réplicas biológicas para cada tratamiento (control e inoculado con HIII11). Cada réplica biológica consistía en un conjunto de hojas provenientes de 15 plantas distintas (5 plantas diferentes por réplica seleccionadas al azar). Una vez obtenidos los RIAs, estos se pesaron y se registraron los valores.

A los RIAs obtenidos se le extrajo el almidón tal como se realizó para las paredes celulares obtenidas de *A. thaliana* (**sección 5.3.11.2**), y luego se procedió a la recuperación de los RIAs sin almidón (**sección 5.3.11.3**) para su utilización en posteriores

6.3.7.2. Crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* en las paredes celulares aisladas de hojas.

El crecimiento *in vitro* del fitopatógeno *B. cinerea* en las paredes celulares sin almidón aisladas a partir de las hojas de plantas de frutilla se realizó como se explicó en la **sección 5.3.11.4**, con leves modificaciones. La concentración de RIAs utilizada fue previamente puesta a punto por el grupo de trabajo (Nadler et al., 2024), y corresponde a 0,75 mg RIA ml⁻¹ de agar-agua 0,8% (p/v). El área de crecimiento del micelio de *B. cinerea* se midió a las 24, 48 y 72 horas de incubación utilizando el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA).

6.3.8. Preparación de extractos libres de células de HIII11. Evaluación de la inhibición *in vitro* de fitopatógenos fúngicos utilizando los extractos libres de células.

Para la obtención de los extractos libres de células de HIII11, la bacteria se creció durante 72 h en medio LB líquido a 28 °C y posteriormente, se centrifugó a 15000 x *g* durante 20 min. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro para jeringa de 0,2 µm de poro (Minisart, Sartorius) en tubo cónico estéril. El sobrenadante libre de células se mezcló con medio APG en distintas proporciones (5, 15, 25 y 50%) para el armado de las placas de Petri correspondientes. Las mismas, se inocularon con un disco (3 mm²) de micelio de *B. cinerea* y de *R. stolonifer* y se colocaron a 25 °C para evaluar si el crecimiento de ambos fitopatógenos se veía afectado por la

presencia del sobrenadante de HIII11 en el medio. Se midieron las áreas de crecimiento de micelio a las 24, 48 y 72 h para el caso de *B. cinerea*, y 24 y 48 h para *R. stolonifer*, utilizando el programa *ImageJ* 1.52a (NIH, USA). Se realizaron tres réplicas técnicas por cada proporción de sobrenadante para cada hongo. Como control se utilizaron placas de APG con H₂O_d estéril como reemplazo del sobrenadante.

6.3.9. Detección por PCR de genes relacionados con la biosíntesis de compuestos antimicrobianos en el genoma de *B. velezensis* HIII11.

Para investigar la presencia de distintos genes implicados en la biosíntesis de compuestos antimicrobianos en el genoma de HIII11, se utilizó la técnica de PCR usando como molde el ADN genómico de la bacteria previamente extraído (**sección 4.3.3**) y cebadores específicos cuyas secuencias fueron publicadas en Hammami et al. (2022) (**Tabla 6.2**).

Tabla 6.2. Secuencias de oligonucleótidos (*Fw* ('forward') o cebador directo; *Rv* ('reverse') o cebador reverso) utilizados en la detección mediante PCR de genes relacionados con la biosíntesis de compuestos antimicrobianos. Se indica, además, la descripción del gen y el programa de ciclado utilizado para cada caso.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Proteína	Programa PCR
<i>fenD</i>	<i>Fw</i> : GGCCCGTTCTCTAAATCCAT <i>Rv</i> : GTCATGCTGACGAGAGCAAA	Fengicina sintetasa D	95 °C, 4 min 94 °C, 1 min
<i>bacA</i>	<i>Fw</i> : CAGCTCATGGGAATGCTTTT <i>Rv</i> : CTCGGTCCTGAAGGGACAAG	Proteína de biosíntesis de bacilisina	58 °C, 1 min 70 °C, 1 min 70 °C, 5 min
<i>srfA</i>	<i>Fw</i> : TCGGGACAGGAAGACATCAT <i>Rv</i> : CCACTCAAACGGATAATCCTGA	Surfactina sintetasa	
<i>bmyB</i>	<i>Fw</i> : GAATCCCGTTGTTCTCCAAA <i>Rv</i> : GCGGGTATTGAATGCTTGTT	Bacilomicina sintetasa B	95 °C, 4 min 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min 70 °C, 1 min 70 °C, 5 min
<i>ituD</i>	<i>Fw</i> : GATGCGATCTCCTTGATGT <i>Rv</i> : ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	Iturina A sintetasa D	94 °C, 3 min 94 °C, 1 min 60 °C, 30 s 72 °C, 1 min 72 °C, 6 min

Para los 5 genes se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 50 ng de molde de ADN genómico, 0,6 µM de cada cebador, buffer de reacción 10X (PB-L, Argentina), MgCl₂ 25 mM (PB-

L, Argentina), dNTPs 10 mM (Promega), 1,6 unidades de Taq ADN Polimerasa (PB-L, Argentina), en un volumen final de reacción de 12 μ l.

Una vez obtenidos los productos de amplificación, los mismos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TBE 0,5X. El total del volumen de reacción se mezcló con 0,75 μ l de Gel Red 20X y 2 μ l de Orange G 6X. Se utilizó un marcador de peso molecular correspondiente a 50 pb (PB-L, Argentina), del cual se sembraron 7 μ l con 1 μ l de Gel Red 20X. Las bandas resultantes se visualizaron en fotodocumentador *Amersham Image Quant 800* (Cytiva).

6.3.10. Evaluación de extractos libres de células en la postcosecha de frutilla.

En este caso, por un lado, se evaluó el crecimiento *in vivo* del fitopatógeno *B. cinerea*, y por el otro, la aparición espontánea de podredumbres durante el almacenamiento de los frutos. Se prepararon los sobrenadantes libres de células tal como se detalló anteriormente (**sección 6.3.8**) en una proporción del 25% en H₂O_d estéril. Aproximadamente 200 frutos en estadio de madurez comercial, se utilizaron para llevar a cabo ambos ensayos.

Los frutos seleccionados para evaluar el crecimiento *in vivo* de *B. cinerea*, se desinfectaron con una solución comercial de NaClO 0,2% (v/v) durante 5 min, se enjuagaron con agua comercial durante 10 min (cambiando el agua a los 5 min) y se continuó la desinfección con etanol 70% (v/v) durante 2 min. Luego, se repitió el proceso de enjuague con H₂O_d. Los frutos se dividieron en 2 tratamientos: control (H₂O_d estéril) y sobrenadante libre de células a una proporción del 25%. Se utilizaron 47 frutos por tratamiento y la aplicación de sobrenadante o H₂O_d estéril se realizó mediante dos asperjados por fruto. Luego, se secaron los frutos a temperatura ambiente durante dos horas y, pasado este tiempo, se colocaron en bandejas plásticas, sin contacto directo entre ellos. Para la inoculación con *B. cinerea*, se extrajeron las esporas (**sección 4.3.15**) y se ajustaron a una concentración final de 1 x 10⁴ esporas ml⁻¹. Se inocularon dos gotas de 10 μ l sobre la superficie de cada fruto, y los frutos inoculados se incubaron en oscuridad a 20 °C durante 5 días. Las lesiones observadas en los frutos se clasificaron de acuerdo al grado de severidad como frutos sin infectar (sin desarrollo de infección), grado 1 (infección leve), grado 2 (infección moderada) y grado 3 (infección avanzada).

Con respecto a la evaluación de aparición espontánea de podredumbres, los frutos se seleccionaron y dividieron en dos tratamientos: control (H₂O_d estéril) y sobrenadante libre de células al 25%. Previo a la aplicación de los tratamientos, se registró el peso fresco de cada fruto y este se continuó registrando diariamente hasta la finalización del ensayo. La aplicación de los tratamientos se realizó como se mencionó más arriba. Los frutos se colocaron en bandejas plásticas cubiertas con film PVC y se almacenaron en oscuridad a 20 °C durante 5 días. Los frutos se observaron diariamente y se contaron la aparición de distintas podredumbres en los mismos.

6.3.11. Análisis estadístico.

El número de réplicas biológicas y técnicas utilizadas se detallan en la metodología de cada ensayo.

Los resultados de los experimentos se muestran como medias \pm SEM. Según corresponda, los datos se analizaron mediante *t*-Test a un nivel de significancia de 0,05 o mediante *2way*-ANOVA. En todos los casos, se utilizó el programa *GraphPad Prism 8* (San Diego, CA, USA) para analizar y graficar los datos obtenidos.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Medida de pH, acidez titulable, sólidos solubles y azúcares totales en frutillas maduras.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la inoculación precosecha con HIII11 en parámetros de calidad vinculados con el gusto (o 'taste') de frutillas cosechadas en estadio de maduración apto para consumo, se llevaron a cabo las medidas de pH, acidez titulable, sólidos solubles totales (SST) y azúcares totales de los frutos y se compararon con los de las plantas control. Como resultado, no se observaron variaciones en el pH (**Figura 6.1 a**), con valores promedios de 3,53 y 3,54 para los frutos de las plantas control e inoculadas con HIII11, respectivamente. En el mismo sentido, el porcentaje de acidez titulable (% AT) no varió entre condiciones, siendo de un promedio de 1,08 para el control y 1,13 para frutos tratados (**Figura 6.1 b**).

La medida de sólidos solubles totales (SST) arrojó valores promedios de 7,2 y 7,4 °Brix para los frutos control y tratados, respectivamente (**Figura 6.1 c**). Con respecto al contenido de azúcares totales, si bien este fue levemente mayor en los frutos control (50,6 g glucosa kg fruto⁻¹) en comparación con los frutos de plantas previamente inoculadas con HIII11 (46,8 g glucosa kg fruto⁻¹), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 6.1 d**).

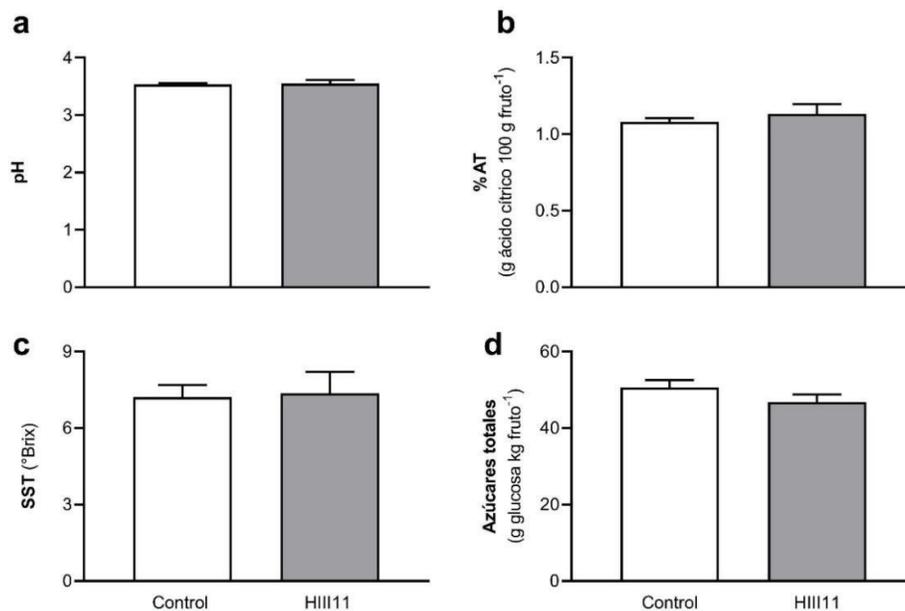


Figura 6.1. Atributos vinculados con el sabor de frutos de frutilla. Se midió (a) pH, (b) porcentaje de acidez titulable (%AT), (c) sólidos solubles totales (SST) y (d) azúcares totales de frutos provenientes de plantas control (MgCl_2 10 mM, estéril) y frutos de plantas previamente inoculadas con *B. velezensis* HIII11 (1×10^8 UFC ml^{-1}). Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control.

6.4.2. Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides en frutillas maduras.

Como parte de la caracterización de los frutos se evaluó el efecto de la inoculación con *B. velezensis* HIII11 en el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides totales en frutillas maduras. Como resultado, no se observaron variaciones en el contenido de antocianinas entre los frutos control y tratados (**Figura 6.2 a**). Sin embargo, se destaca que el contenido de compuestos fenólicos totales (**Figura 6.2 b**) y de flavonoides (**Figura 6.2 c**) fue significativamente mayor en los frutos provenientes de plantas previamente inoculadas con la bacteria en comparación con los frutos de plantas control.

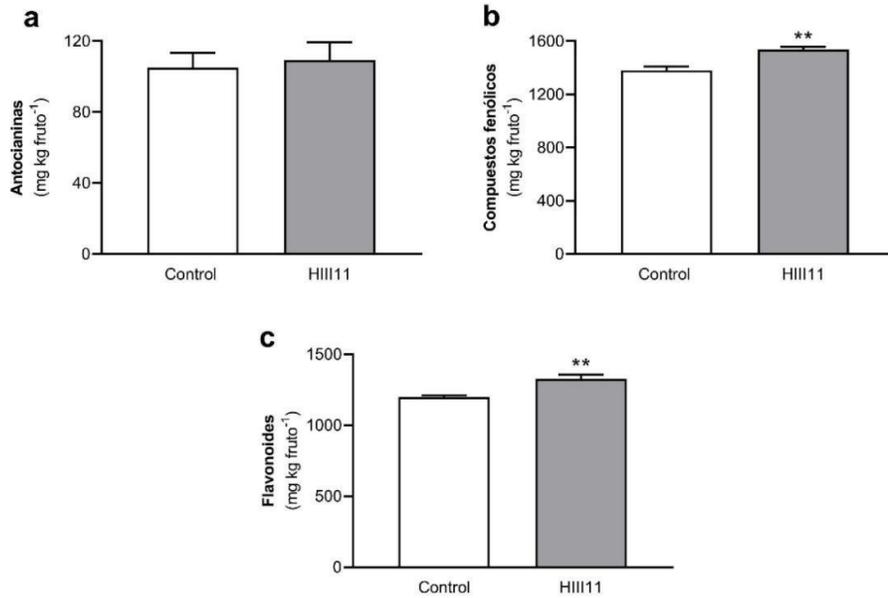


Figura 6.2. Contenido de metabolitos secundarios en frutos de frutilla. Se midió el contenido de (a) antocianinas, (b) compuestos fenólicos y (c) flavonoides totales de frutos provenientes de plantas control (MgCl_2 10 mM, estéril) y frutos de plantas previamente inoculadas con *B. velezensis* HIII11 (1×10^8 UFC ml^{-1}). Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (** $p < 0,01$).

6.4.3. Metabolismo de la pared celular de frutilla.

6.4.3.1. Contenido de pared celular.

Con el fin de evaluar el efecto de la inoculación con HIII11 en el contenido de pared celular primaria y lámina media de los frutos, se llevó a cabo el aislamiento de las mismas como residuos insolubles en alcohol. Como resultado, no se observaron diferencias en la cantidad de RIAs entre frutos control y tratados (Figura 6.3).

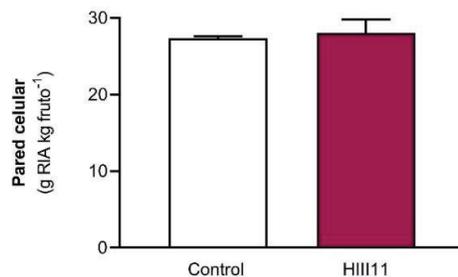


Figura 6.3. Contenido de paredes celulares. Las paredes celulares se aislaron como residuos insolubles en alcohol (RIAs) a partir de frutos provenientes de plantas control (MgCl_2 10 mM, estéril) y frutos de plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 (1×10^8 UFC ml^{-1}). Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control.

6.4.3.2. Hidratación *in vitro* de la pared celular.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación con HIII11 en la hidratación *in vitro* de las paredes celulares de frutos de frutilla, se pesaron exactamente 10 mg de RIAs extraídos de frutos control y tratados, los cuales se hidrataron en agua destilada durante 24 h en agitación. Luego, se dejaron decantar de forma vertical y se midieron las alturas de los RIAs hidratados para cada caso. Como resultado, se observó una hidratación significativamente menor en las paredes celulares aisladas de frutos provenientes de plantas inoculadas con HIII11 respecto a los frutos control (Figura 6.4).

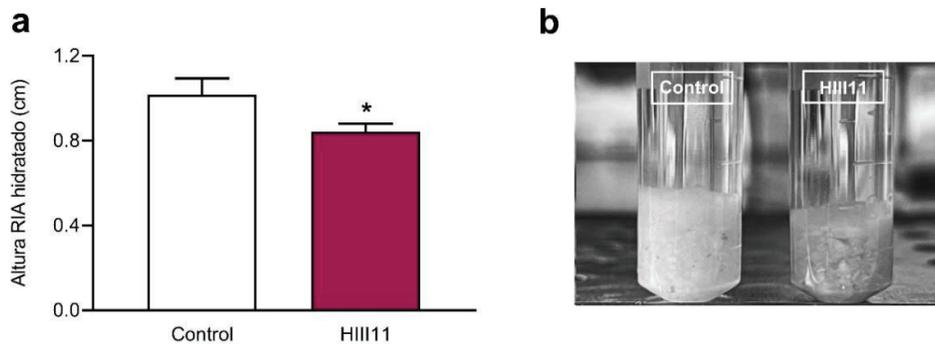


Figura 6.4. Hidratación de paredes celulares. (a) Una masa exacta de 10 mg de paredes celulares aisladas a partir de frutos control e inoculados con *B. velezensis* HIII11 se hidrataron durante 24 h a 22 °C y se registró la altura de las mismas. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control ($*p < 0,05$). En (b) se ilustra la diferencia de altura entre los RIAs hidratados de frutos control y tratados.

6.4.3.3. Crecimiento *in vitro* de fitopatógenos en las paredes celulares aisladas.

Se evaluó la capacidad de *B. cinerea* y *R. stolonifer* de acceder a las paredes celulares aisladas de los frutos control y tratados, a través de un ensayo de crecimiento *in vitro* de cada fitopatógeno en agar-agua conteniendo RIAs como única fuente de nutrientes. El área de crecimiento de micelio para *B. cinerea* se midió a las 24, 48, 72, 96 y 120 h (Figura 6.5 a). Como resultado se observó un crecimiento promedio menor de este fitopatógeno en las paredes celulares aisladas de frutos tratados con HIII11 respecto a los controles a través del tiempo, el cual fue estadísticamente significativo a las 96 y 120 h (Figura 6.5 a). Por otro lado, debido a su alta velocidad de crecimiento *in vitro*, para *R. stolonifer* las áreas se midieron a las 24 y 48 h (Figura 6.5 b). En este caso, si bien se observó un crecimiento promedio ligeramente menor en las paredes celulares aisladas de frutos tratados respecto a los controles esta diferencia no fue significativa (Figura 6.5 b).

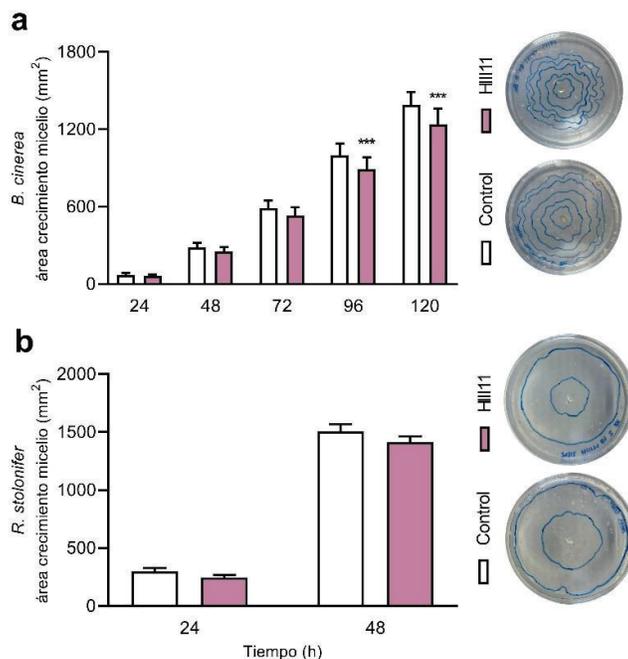


Figura 6.5. Crecimiento *in vitro* de fitopatógenos en paredes celulares aisladas de frutillas maduras. Crecimiento de (a) *B. cinerea* y (b) *R. stolonifer* en placas conteniendo agar 0,8% (p/v) y 0,2 mg ml⁻¹ de RIAs como única fuente de nutrientes provenientes de frutos de plantas de frutilla control e inoculadas con *B. velezensis* HIII11. Se midieron las áreas de crecimiento del micelio a las 24, 48, 72, 96 y 120 h para *B. cinerea* y a las 24 y 48 h para *R. stolonifer*. Las barras representan la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó mediante 2Way-ANOVA (****p* < 0,001).

Para continuar con la evaluación de las posibles modificaciones en el metabolismo de la pared celular de los frutos provenientes de plantas previamente inoculadas con HIII11, se realizó la extracción secuencial y la cuantificación de las distintas fracciones de los polisacáridos que la componen, y se evaluó también la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de cada fracción.

6.4.3.4. Metabolismo de pectinas.

Con el fin de analizar las posibles modificaciones en el contenido de homogalacturonanos (HG) que forman parte de las pectinas de las paredes celulares aisladas de frutos tratados respecto a los controles, se llevó a cabo la extracción y cuantificación de HGs en pectinas totales (Figura 6.6 a), como así también en las pectinas solubles en agua o PSA (Figura 6.6 b), pectinas solubles en EDTA o PSE (Figura 6.6 c) y pectinas solubles en HCl o PSH (Figura 6.6 d). Como

resultado, no se observaron diferencias en el contenido de HGs totales entre plantas control y tratadas (**Figura 6.6 a**), ni en las demás fracciones (**Figura 6.6 b, c, d**).

Además, se llevó a cabo el análisis de la expresión relativa de genes implicados en el metabolismo de estos polímeros presentes en la pared celular primaria y lámina media. Los resultados evidenciaron un aumento significativo en la expresión relativa de *FaPME1*, el cual codifica para una pectin metilesterasa, en los frutos inoculados con HIII11 respecto a los controles (**Figura 6.6 e**), mientras que la expresión de *FaPG1*, gen que codifica una poligalacturonasa, no varió entre tratamientos (**Figura 6.6 f**). En lo que respecta a los genes que codifican para pectato liasas putativas, en frutos provenientes de plantas inoculadas con HIII11 se encontró disminuida la expresión de *FaPLB* respecto al control (**Figura 6.6 g**), pero no se observaron diferencias en la expresión relativa de *FaPLC* (**Figura 6.6 h**).

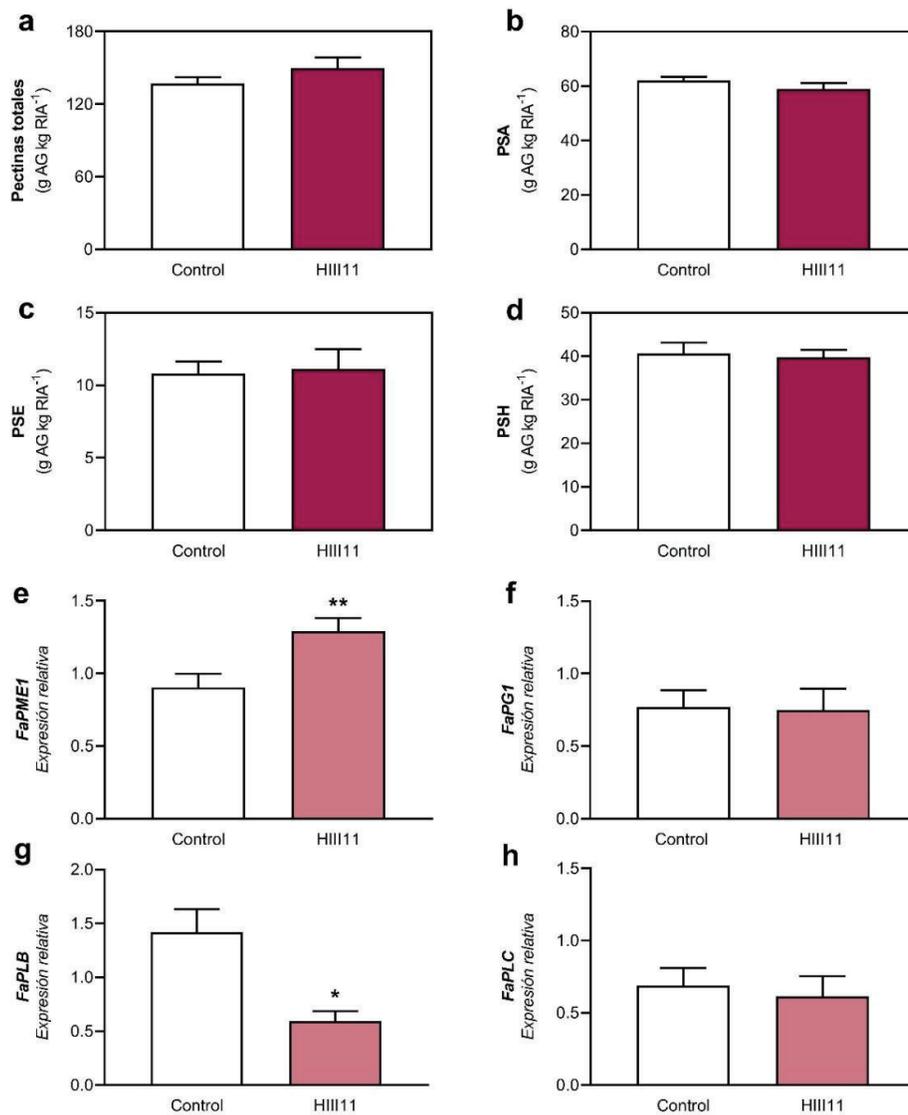


Figura 6.6. Metabolismo de cadenas principales (homogalacturonanos) de pectinas. Contenido de ácido galacturónico (AG) en (a) pectinas totales, (b) pectinas solubles en agua (PSA), (c) pectinas solubles en EDTA (PSE) y (d) pectinas solubles en HCl (PSH) de paredes celulares aisladas a partir de frutos control e inoculados con HIII11. Evaluación mediante PCR en tiempo real de la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de cadenas principales de pectinas, (e) *FaPME1*, (f) *FaPG1*, (g) *FaPLB* y (h) *FaPLC*. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

6.4.3.5. Metabolismo de cadenas laterales de pectinas.

Con respecto al metabolismo de cadenas laterales de pectinas, se llevó a cabo la cuantificación de azúcares neutros, obteniéndose como resultado un contenido significativamente mayor en los frutos inoculados con HIII11 respecto a los frutos control (**Figura 6.7 a**).

Se evaluó, además, la expresión relativa del gen *FaAra1*, que codifica para una arabinofuranosidasa putativa, y de los genes *FaβGal1* y *FaβGal4*, que codifican para β-galactosidasas. En frutos cosechados a partir de plantas inoculadas con la bacteria, se observó una disminución en la expresión de *FaAra1* (**Figura 6.7 b**) respecto al control. De igual manera, en estos frutos, la expresión de *FaβGal1* (**Figura 6.7 c**) y *FaβGal4* (**Figura 6.7 d**) fue menor en comparación con el control, aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo para el caso de *FaβGal4* (**Figura 6.7 e**).

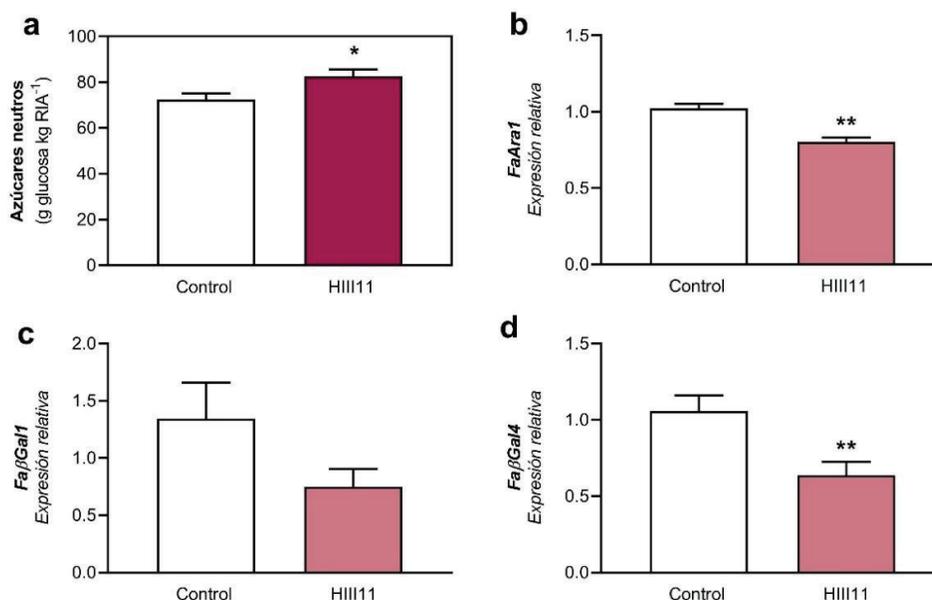


Figura 6.7. Metabolismo de cadenas laterales de pectinas. Contenido de (a) azúcares neutros en pectinas totales de paredes celulares aisladas a partir de frutos control e inoculados con HIII11. Evaluación mediante PCR en tiempo real de la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de cadenas laterales de pectinas (b) *FaAra1*, (c) *FaβGal1*, y (d) *FaβGal4*. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

6.4.3.6. Metabolismo de hemicelulosas y celulosa.

Para continuar con la evaluación de los polisacáridos que componen la pared celular de frutilla, se realizó la extracción y cuantificación de las fracciones de hemicelulosas y celulosa. A su vez, se estudiaron las expresiones relativas de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de estos polímeros.

Como resultado, si bien en promedio el contenido de hemicelulosas fue mayor en frutos tratados con HIII11 respecto a los controles, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 6.8 a**). Respecto al contenido de celulosa, no se hallaron diferencias entre los frutos de plantas inoculadas y los frutos de plantas control (**Figura 6.8 b**). En cuanto a la evaluación de la expresión relativa de genes, no se detectaron cambios en la expresión de *FaExp2*, gen que codifica para la Expansina 2 (**Figura 6.8 c**), pero sí se detectó una disminución significativa en la expresión de *FaExp5* en frutos tratados comparado con el control (**Figura 6.8 d**). Respecto a la expresión xiloglucano transglicosilasa hidrolasa, no se observaron diferencias en *FaXTH1* entre frutos controles y tratados (**Figura 6.8 e**), mientras que se observó un incremento significativo en la expresión de *FaXTH2* en los frutos de plantas inoculadas con HIII11 (**Figura 6.8 f**). Por último, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de *FaXyl1*, gen que codifica una β -xilosidasa, entre frutos tratados y controles (**Figura 6.8 g**).

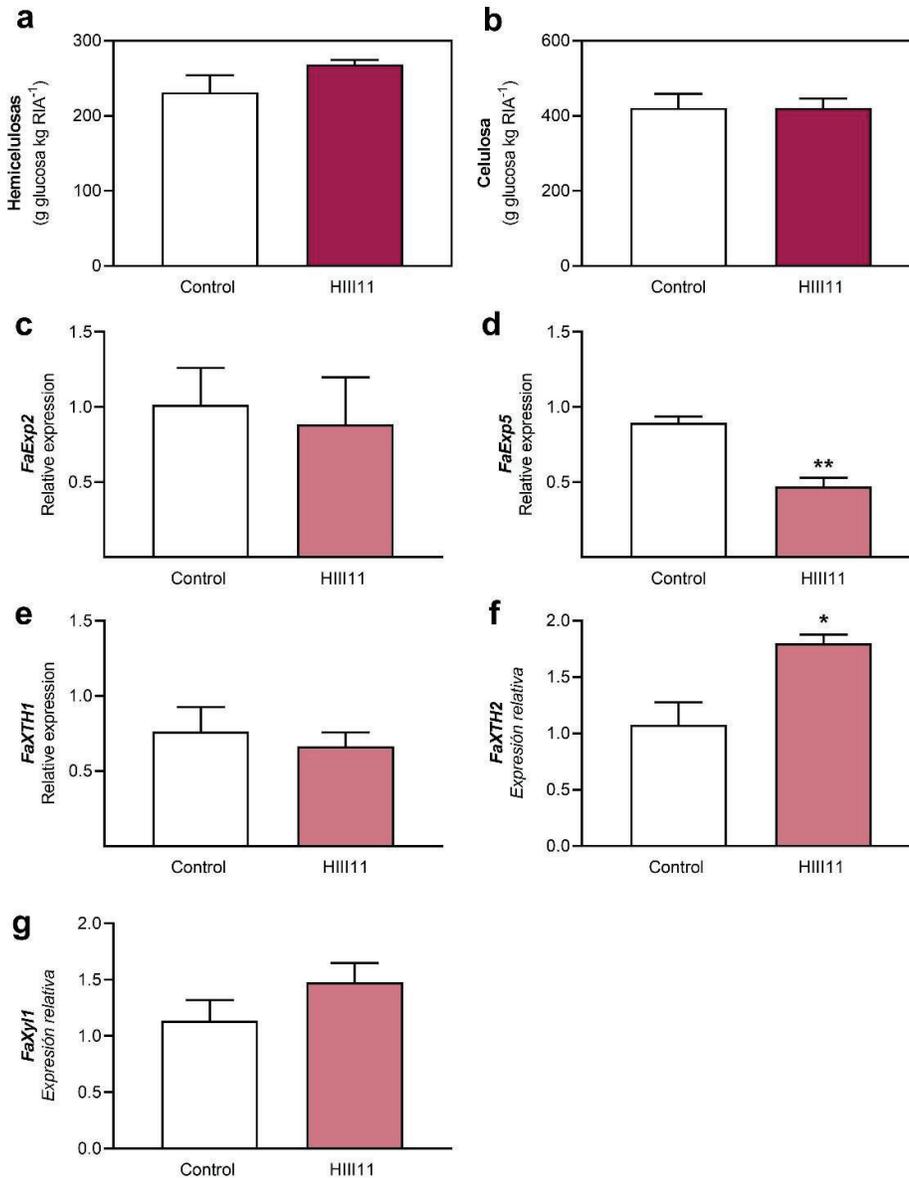


Figura 6.8. Metabolismo de hemicelulosas y celulosa. Contenido de (a) hemicelulosas y (b) celulosa de paredes celulares aisladas a partir de frutos control e inoculados con HIII11. Evaluación mediante PCR en tiempo real de la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de hemicelulosas (c) *FaExp2*, (d) *FaExp5*, (e) *FaXTH1*, (f) *FaXTH2*, y (g) *FaXyl1*. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

6.4.4. Evaluación de la infección con *B. cinerea* en hojas de frutilla.

Con la finalidad de estudiar la respuesta de las plantas de frutilla a la infección con *B. cinerea*, 24 horas luego de la última inoculación con *Bacillus velezensis* HIII11, se cortaron hojas de distintas plantas y se colocaron en placas de Petri conteniendo agar-agua al 0,8% (p/v). Luego,

estas hojas se inocularon con dos gotas de una suspensión de esporas de *B. cinerea* (1×10^5 esporas ml^{-1}) y posteriormente se evaluó el área necrótica a las 72, 96 y 120 h. Como resultado, en las hojas provenientes de plantas inoculadas con HIII11, el área de infección por *B. cinerea* fue menor en todos los tiempos evaluados en comparación con las hojas tomadas de plantas controles y estas diferencias fueron estadísticamente significativas a las 96 y 120 h (**Figura 6.9 a**). La **Figura 6.9 b** ilustra el mayor avance de la infección fúngica en las hojas control en comparación a las hojas de plantas tratadas con HIII11.

Cabe aclarar que, paralelamente se inocularon otro grupo de hojas con *R. stolonifer*, sin embargo, la infección de las mismas no fue exitosa (datos no mostrados).

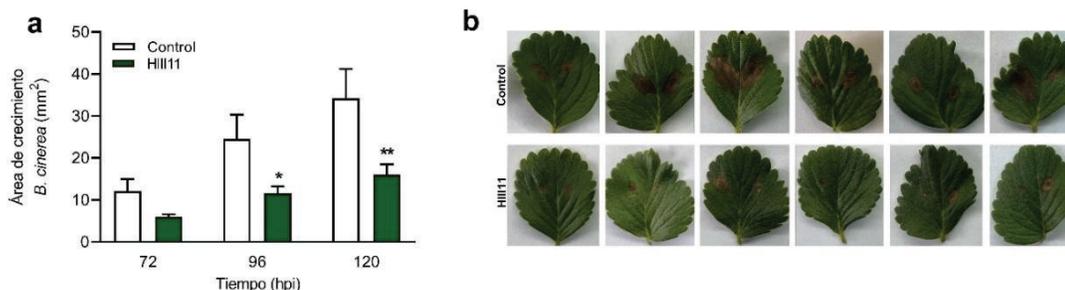


Figura 6.9. Infección con *B. cinerea* de hojas de frutilla. Evaluación de la infección con *B. cinerea* en hojas de frutilla de plantas inoculadas con HIII11 y control cortadas y colocadas en agar-agua 0,8% (p/v). **(a)** Medida del área necrótica a las 72, 96 y 120 horas post-inoculación (hpi). Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante 2way-ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). **(b)** Foliolos de plantas controles e inoculadas con HIII11 a las 120 hpi con *B. cinerea*.

6.4.4.1. Compuestos fenólicos en hojas de frutilla.

Con el objetivo de determinar si la inoculación con HIII11 inducía un aumento en la acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas de frutilla, se procedió a la cuantificación de dichos metabolitos. Como resultado, y a diferencia de lo observado en fruto (**Figura 6.2 b**), no se encontraron diferencias en el contenido de compuestos fenólicos entre las hojas control y tratadas con la bacteria (**Figura 6.10**).

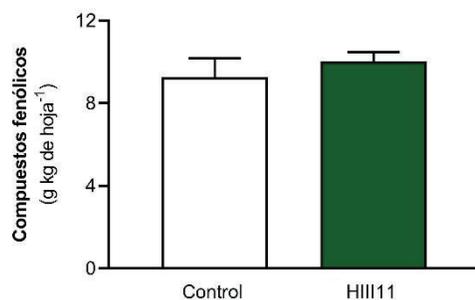


Figura 6.10. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de frutilla. Medida del contenido de compuestos fenólicos totales de hojas provenientes de plantas control e inoculadas con HIII11. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test contra el control.

6.4.5. Pared celular de hojas de frutilla.

Se realizó el aislamiento de las paredes celulares como RIAs a partir de hojas de plantas de frutilla controles e inoculadas con HIII11 y se comparó el contenido de las mismas con hojas de plantas control. Como resultado, no se observaron diferencias en el contenido de RIAs entre tratamientos (**Figura 6.11 a**).

Por otro lado, una vez extraído el almidón de los RIAs, se evaluó el crecimiento *in vitro* del fitopatógeno *B. cinerea* cuando se le suministraron dichas paredes celulares como única fuente de nutrientes. El área de crecimiento del micelio se registró a las 24, 48 y 72 h, observándose una reducción significativa del crecimiento del hongo en las paredes celulares aisladas a partir de hojas inoculadas con HIII11 a las 48 y 72 h respecto a las hojas control (**Figura 6.11 b**).

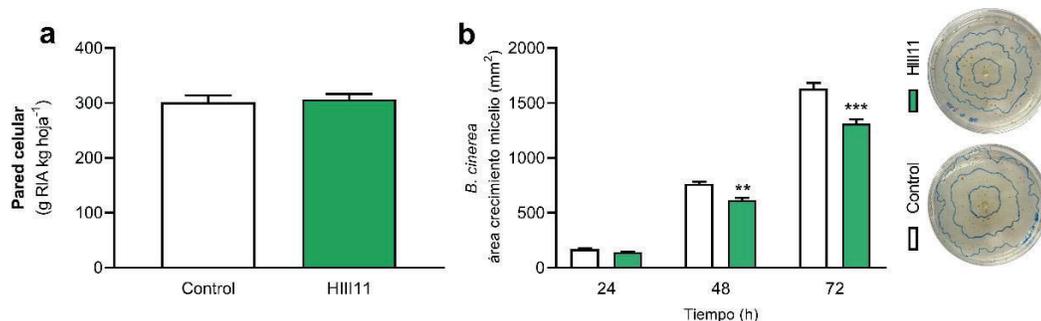


Figura 6.11. Contenido de paredes celulares de hojas de frutilla y crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*. (a) Contenido de residuos insolubles en alcohol (RIAs) a partir de hojas de plantas de frutilla control e inoculadas con HIII11. En (b) se evaluó el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* en las paredes celulares aisladas una vez eliminado el almidón. Se midió el crecimiento del micelio a las 24, 48 y 72 h. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-Test para (a) y *2way*-ANOVA para (b) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.4.6. Evaluación de la capacidad de los sobrenadantes libres de células de HIII11 para inhibir el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer*.

Con la finalidad de evaluar la posible producción y liberación al medio de compuestos antimicrobianos por HIII11, la bacteria se creció durante 72 h a 28 °C en medio LB líquido. Luego, el cultivo se centrifugó y filtró para que el mismo quede libre de células. Este sobrenadante filtrado se mezcló en distintas proporciones con medio APG y se realizó el armado de las placas de Petri correspondientes. Las mismas se inocularon con un disco de micelio de, por un lado, *B. cinerea* y, por el otro, *R. stolonifer*. Las placas se colocaron a 25 °C y se evaluó el crecimiento de cada fitopatógeno midiendo el área micelial. Para el caso de *R. stolonifer*, se evaluó el crecimiento a las 24 y 48 h (**Figura 6.12 a**), mientras que para *B. cinerea*, se tomaron valores a las 24, 48 y 72 h (**Figura 6.12 b**). Se observó una disminución del crecimiento de *R. stolonifer* a partir de la presencia de un 15% del sobrenadante libre de células en el medio en ambos tiempos evaluados, haciéndose esta diferencia más marcada respecto al control a medida que aumenta la proporción del sobrenadante en el medio (**Figura 6.12 a**). Con un 50% de sobrenadante presente en el medio, el crecimiento de *R. stolonifer* se inhibió un 82,2% a tiempo final (**Figura 6.12 a**). En el caso de *B. cinerea*, se observó una disminución en el crecimiento con un 5% del sobrenadante en el medio, con diferencias significativas a las 24 y 48 h (**Figura 6.12 b**). Para el resto de las proporciones evaluadas (15, 25 y 50%) se observan diferencias significativas con el control en todos los tiempos medidos, alcanzando una inhibición de un 78,7% a tiempo final con 50% de sobrenadante en el medio (**Figura 6.12 b**).

En la **Figura 6.12 c** se ilustra el crecimiento de ambos fitopatógenos a tiempo final (48 h para *R. stolonifer* y 72 h para *B. cinerea*) en las distintas proporciones de sobrenadante de HIII11 libre de células.

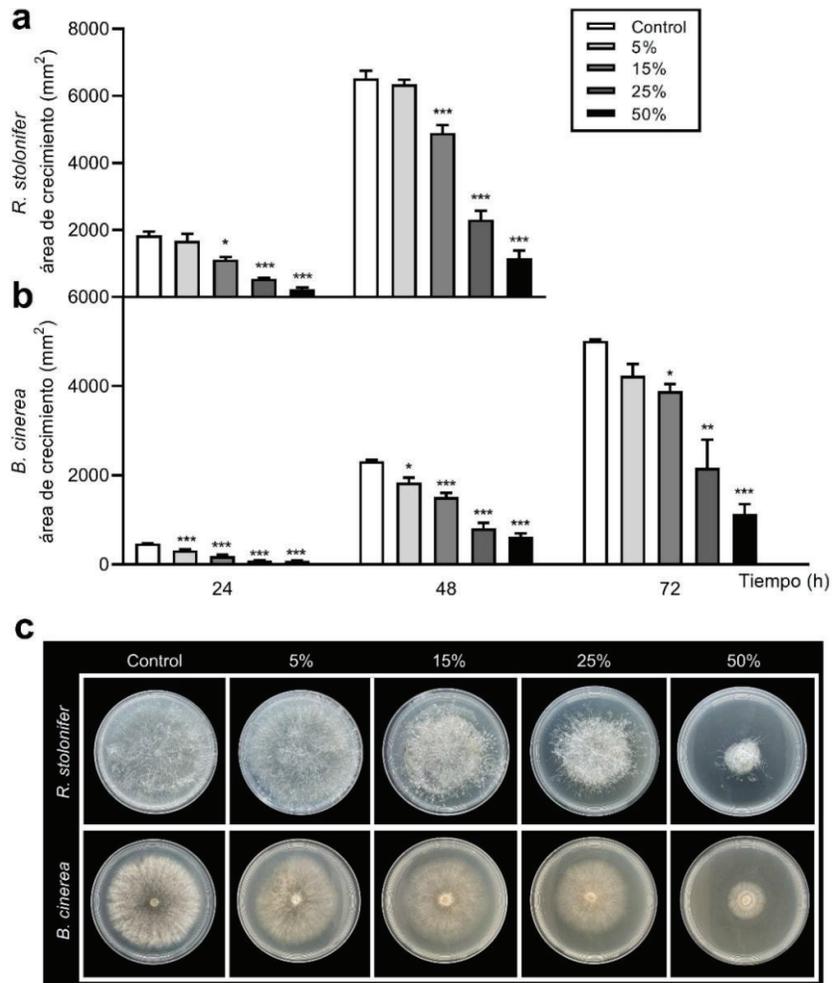


Figura 6.12. Inhibición del crecimiento *in vitro* de fitopatógenos fúngicos por acción de compuestos antimicrobianos sintetizados por HIII11. A partir de un cultivo de HIII11 crecido durante 72 h, se tomó el sobrenadante y se filtró. A continuación, se armaron placas conteniendo medio APG y distintas proporciones del sobrenadante. Las placas se inocularon con un disco de micelio de cada fitopatógeno, y se evaluó el crecimiento de los mismos a través del tiempo: (a) 24 y 48 h para *R. stolonifer*, y (b) 24, 48 y 72 h para *B. cinerea*. Las barras representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante 2way-ANOVA ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$). En (c) se ilustra la inhibición del crecimiento de cada fitopatógeno a tiempo final en distintas proporciones de sobrenadante libre de células en el medio de cultivo.

6.4.7. Presencia de genes implicados en la biosíntesis de compuestos antimicrobianos en el genoma de HIII11.

A través de la técnica de PCR a tiempo final con cebadores específicos (sección 6.3.9) y utilizando como molde el ADN genómico de HIII11, se confirmó la presencia de los genes *srfA*, que codifica para una surfactina sintetasa (Figura 6.13 a), *fenD*, que codifica para una fengicina sintetasa (Figura 6.13 b), *bacA*, que codifica para una proteína de biosíntesis de bacilisina (Figura

6.13 c), *bymB*, que codifica para bacilomicina L sintetasa B (**Figura 6.13 d**), e *ituD*, que codifica para una iturina A sintetasa D (**Figura 6.13 e**) en el genoma de *Bacillus velezensis* HIII11.

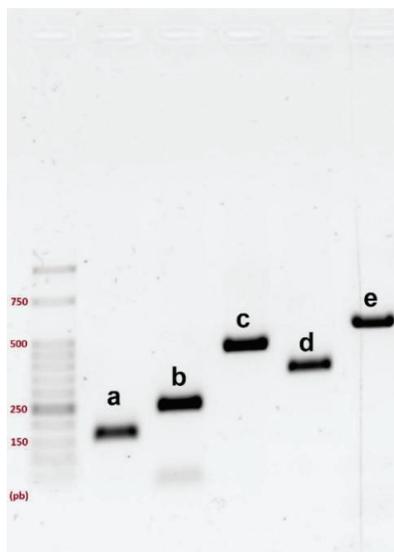


Figura 6.13. Determinación mediante PCR de la presencia de genes relacionados con la biosíntesis de compuestos antimicrobianos en el genoma de HIII11. Visualización en gel de agarosa 0,8% (p/v) de fragmentos amplificados mediante PCR de los genes (a) *srfA*, (b) *fenD*, (c) *bacA*, (d) *bymB* y (e) *ituD* utilizando como molde el ADN genómico de HIII11.

6.4.8. Efecto de la aplicación de sobrenadantes libres de células en la postcosecha de frutilla.

Se evaluó la aplicación de sobrenadantes libres de células de *B. velezensis* HIII11 con la finalidad de determinar si podrían ejercer un efecto protector contra la infección por *B. cinerea* en la postcosecha de frutilla. Para esto, se utilizaron frutillas comerciales en el estadio de maduración 85-95% rojo, las cuales se desinfectaron y colocaron en bandejas plásticas. En un primer ensayo se evaluaron 3 tratamientos: control (H_2O_d estéril), tratamiento con sobrenadante al 25% y tratamiento con sobrenadante al 50%. Tras la inoculación con *B. cinerea* y posterior almacenamiento a 20 °C, se evaluó el estado de cada fruto y, de acuerdo al grado de infección y lesiones que presentaban, se los clasificó en sin infección (aquellos que no presentaban lesiones o daño), grado 1 (daño o infección leve), grado 2 (daño o infección moderada) y grado 3 (daño o infección avanzada). Como resultado se observó una dependencia significativa entre el tratamiento de 25% y el grado de infección, pero no así para el de 50% (**resultados no mostrados**). De esta manera, se decidió trabajar con la proporción de 25% de sobrenadante. A partir de esto, se realizó nuevamente el ensayo utilizando 47 frutos para cada tratamiento (control y sobrenadante al 25%). Una vez inoculados los frutos con *B. cinerea*, se almacenaron a 20 °C durante 5 días. A este tiempo, se realizó la clasificación de los frutos y análisis correspondiente

(Figura 6.14). Notablemente, un 8% de los frutos tratados con el sobrenadante al 25% no presentaron infección alguna, mientras que en el caso de los controles el 100% de los frutos presentó algún grado de infección, mostrándose una clara diferencia en la cantidad de frutos agrupados como grado 1 y 2 entre tratamientos. Los controles presentaron un 28% de frutos grado 1 contra un 43% para los tratados, mientras que para el grado 2 la proporción fue de un 53 y un 28% para los controles y tratados con sobrenadante, respectivamente (Figura 6.14 a). El análisis por Chi-cuadrado arrojó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, con un *P-value* de 0,0003. En la Figura 6.14 b, se muestran imágenes de frutillas con los distintos grados de infección.

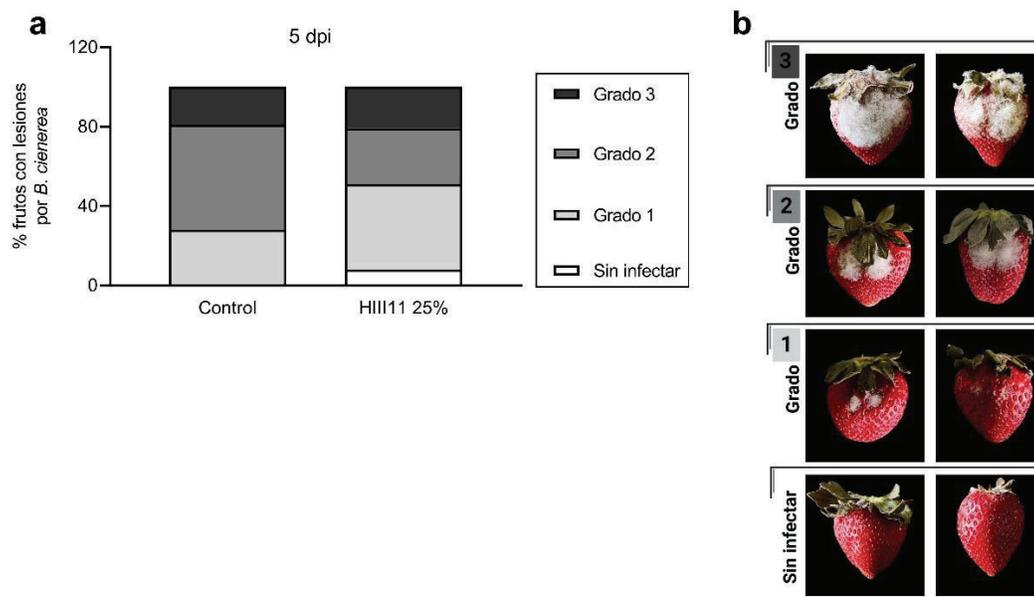


Figura 6.14. Efecto del sobrenadante libre de células en la infección por *B. cinerea* en la postcosecha de frutilla. (a) Porcentajes de frutos control y tratados con el sobrenadante de HIII11 al 25% a los 5 dpi con *B. cinerea*. Los frutos se clasificaron según los daños presentados en sin infectar (sin presencia de área necrótica y/o micelio), grado 1 (daño leve), grado 2 (daño moderado) y grado 3 (daño avanzado). En (b) se muestra una imagen representativa de los diferentes daños (sin infectar, grado 1, 2 y 3) causados por *B. cinerea*. Los resultados se analizaron mediante Chi-cuadrado con $\alpha = 0,05$ y 1 grado de libertad.

En paralelo a la evaluación del crecimiento *in vivo* de *B. cinerea*, se estudió el efecto de la aplicación de 25% de sobrenadante libre de células de HIII11 en la aparición espontánea de podredumbres y la pérdida de peso fresco durante el almacenamiento postcosecha de frutilla. Los frutos se almacenaron a 20 °C durante 5 días. Como resultado, un 54% de los frutos tratados con 25% de sobrenadante no presentaron podredumbres, mientras que en el caso de los frutos control un 42% no se vieron afectados (Figura 6.15 a). Si bien esta diferencia no fue

estadísticamente significativa, se observó una tendencia de una menor aparición de podredumbres espontáneas tras el tratamiento con el sobrenadante (**Figura 6.15 a**).

En lo que respecta a la pérdida de peso fresco, no se observaron diferencias entre los frutos control y tratados con 25% de sobrenadante libre de células a través del tiempo, mostrándose porcentajes prácticamente iguales entre ambos tratamientos a los 5 días de almacenamiento (**Figura 6.15 b**).

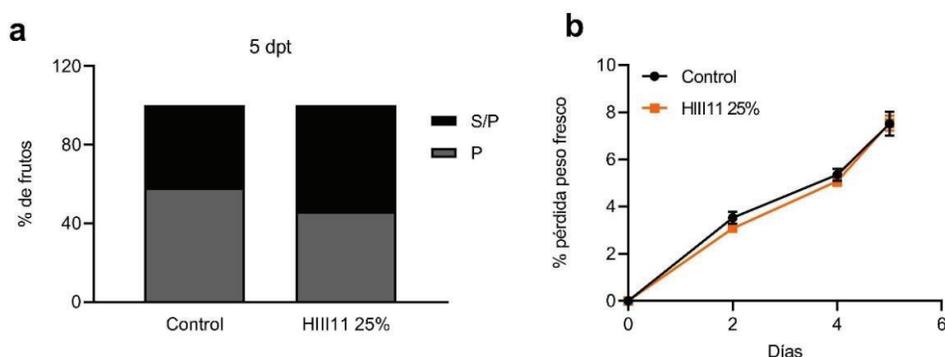


Figura 6.15. Efecto del sobrenadante libre de células en la aparición espontánea de podredumbres en la postcosecha de frutilla. (a) Porcentajes de frutos que presentaron podredumbres (P) y sin podredumbres (S/P) control y tratados con 25% de sobrenadante de HIII11 luego de un almacenamiento de 5 días a 20 °C. Análisis mediante Chi-cuadrado con $\alpha = 0,05$ utilizando test de Fisher. (b) Pérdida de peso fresco de los frutos control y tratados con sobrenadante de HIII11 al 25% durante el almacenamiento a 20 °C. El análisis estadístico se realizó mediante *2way*-ANOVA.

6.5. DISCUSIÓN

El uso de fungicidas de síntesis química es la estrategia más utilizada para el control de patógenos fúngicos tanto en la pre- como en la postcosecha de frutilla, como así también de muchos otros frutos (Dukare et al., 2019; Wang et al., 2021). Como se mencionó a lo largo de esta Tesis, los efectos negativos del uso de agroquímicos han conducido a diversas investigaciones en la búsqueda de alternativas, entre ellas el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y/o biocontroladoras de enfermedades. En el cultivo de frutilla, la aplicación de PGPBs podría mejorar el crecimiento de la planta, el rendimiento, aumentar la vida útil del fruto, preservar su textura y calidad (Gupta & Kaushal, 2017). Se han reportado estudios donde la aplicación de PGPBs durante la precosecha ha resultado en un estímulo del crecimiento de plantas de frutilla, en el aumento en el rendimiento y calidad de los frutos (Badar et al., 2022), como así también una mejora en la respuesta de las plantas a infecciones por diferentes patógenos (Abd-El-Kareem et al., 2022). Otros trabajos, en los cuales analizaron la aplicación de PGPBs durante la postcosecha de los frutos, han destacado que la síntesis de compuestos antifúngicos por las bacterias es un importante mecanismo para la reducción de la incidencia de

patógenos como *B. cinerea* (de Moura et al., 2021; Guinebretiere et al., 2000; Wang et al., 2021) y *Colletotrichum fragariae* (Li et al., 2021), como así también la inducción de respuestas de defensa en los frutos (Yu et al., 2021). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se llevó a cabo la inoculación de plantas de frutilla (var. 'San Andreas') con la bacteria *Bacillus velezensis* HIII11, y posteriormente se cosecharon frutos en estadio apto para consumo y hojas para su análisis.

El sabor único de la frutilla es muy apreciado por los consumidores. Los ácidos orgánicos junto con los azúcares son componentes claves del sabor de la frutilla, y la relación de ácidos/azúcares es usada frecuentemente como índice de la calidad del fruto (Manning, 1993). En frutilla, así como en otras especies, el sabor o *flavor* está definido por la respuesta perceptual por parte de los consumidores al gusto, aroma y sensación táctil de los frutos (Fan et al., 2021; Schwieterman et al., 2014). De esta manera, la caracterización de los azúcares y ácidos orgánicos, pigmentos, turgencia y compuestos volátiles, que provocan los sentidos del gusto, la visión, la sensación táctil y el olfato, respectivamente, en el desarrollo del sabor, resultan de interés.

En este trabajo de Tesis, se analizaron algunos de los parámetros de calidad relacionados con el sentido del gusto en frutos provenientes de plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 y plantas control. Como resultado no se observaron variaciones en el pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y azúcares totales entre ambos tratamientos (**Figura 6.1**), evidenciando que estos parámetros de calidad no se verían afectados por la aplicación precosecha de esta bacteria. En un trabajo postcosecha, Wang et al. (2021) demostraron que la aplicación de *Bacillus halotolerans* cepa KLBC XJ-5 en frutilla fue capaz de ejercer control biológico contra *Botrytis cinerea*, sin generar cambios en parámetros relacionados con el gusto del fruto, como la acidez titulable y el contenido de sólidos solubles.

Otro parámetro de calidad como el color rojo de las frutillas maduras, está relacionado con el contenido de antocianinas, y la cuantificación de estos compuestos suele utilizarse como un marcador del progreso de la maduración (Morales-Delgado et al., 2014). En el presente trabajo de Tesis, el tratamiento con HIII11 no produjo cambios en el contenido de antocianinas respecto a los frutos control (**Figura 6.2 a**). Asimismo, un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides aporta al fruto de frutilla propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y constituye un atributo de calidad apreciado por los consumidores (Basu et al., 2014; Pap et al., 2021). Además, se conoce que estos metabolitos secundarios protegen a la planta frente a distintas condiciones de estrés funcionando como moléculas de señalización o como agentes antimicrobianos (Yu et al., 2021). Un resultado muy interesante obtenido en el presente trabajo de Tesis, evidenció que los frutos provenientes de plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 presentaron un contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos y flavonoides totales en comparación con los frutos de plantas control (**Figura 6.2 b-c**). De manera similar, el tratamiento de plantas de frutilla con *Paraburkholderia fungorum* BRRh-4 y *Bacillus amyloliquefaciens* BChi1 aumentó significativamente el contenido de flavonoides, fenólicos y

antocianinas en los frutos en comparación con el control (Rahman et al., 2018). Por otro lado, también se ha visto que tratamientos postcosecha de frutillas con PGPBs o BCAs fueron capaces de incrementar el contenido de fenoles totales, flavonoides o compuestos relacionados en los frutos (Hassan et al., 2021; Wang et al., 2021).

En el capítulo anterior se observó que plantas de *A. thaliana* inoculadas con *B. velezensis* HIII11 presentaban modificaciones en el contenido de distintos polisacáridos de la pared celular, como así también expresión diferencial de genes vinculados con el metabolismo de los mismos en comparación con plantas control (**secciones 5.4.7.3, 5.4.7.4 y 5.4.7.5**), sugiriendo una influencia de la bacteria en el refuerzo de la pared celular de hojas de Arabidopsis. Por lo tanto, en el presente capítulo, se decidió evaluar si *B. velezensis* HIII11 podría generar un efecto similar en el metabolismo de la pared celular de frutos de frutilla cosechados de plantas inoculadas con la bacteria. Si bien, no se observaron diferencias en el contenido de pared celular total entre los tratamientos (**Figura 6.3**), cuando se evaluó la hidratación *in vitro* de las paredes de frutos de plantas inoculadas con HIII11 se evidenció una menor altura de RIA hidratado en comparación con los RIAs de frutos control (**Figura 6.4**). En nuestro Laboratorio, se realizó el primer reporte de la hidratación *in vitro* de los RIAs a lo largo de la maduración del fruto de frutilla y se observó que a medida que avanzan los estadios de maduración, aumenta la hidratación de las paredes celulares (Langer et al., 2018). Este aumento ha sido asociado con una mayor solubilización de pectinas, la hidrólisis de cadenas laterales y la pérdida de la red celulosa-hemicelulosas (Brummell, 2006; Redgwell et al., 1997a, 1997b). A su vez, cuando se evaluó el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer* en un medio que contenía los RIAs, se observó que *B. cinerea* creció significativamente menos en las paredes celulares aisladas de los frutos de plantas inoculadas con HIII11 respecto al control (**Figura 6.5 a**). Esto podría deberse a modificaciones en estructura y composición de la pared celular, que hacen que la misma sea menos susceptible a la degradación por enzimas hidrolíticas del fitopatógeno. Si bien, no hubo diferencias para el caso de *R. stolonifer*, se observó una tendencia de retraso en el crecimiento de este patógeno en los RIAs de frutos tratados en comparación con el control (**Figura 6.5 b**). Estos resultados, junto con el resultado de hidratación, sugieren cambios en la estructura de la pared celular en los frutos tras el tratamiento con *B. velezensis* HIII11. Resultados similares se observaron en frutos en los cuales la composición y estructura de la pared celular fue modificada por distintos estímulos abióticos como tratamientos térmicos, con soluciones de CaCl₂ y un inhibidor de la percepción de la hormona etileno (Langer et al., 2018, 2019, 2022; Villarreal et al., 2016).

Cuando se procedió a la obtención de cada una de las fracciones que constituyen la pared celular de los frutos provenientes de plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 y control, no se observaron diferencias en el contenido de ácido galacturónico de pectinas totales ni tampoco en las fracciones correspondientes a PSA, PSE y PSH (**Figura 6.6 a, b, c y d**). Sin embargo, el análisis de la expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo de pectinas mostró un aumento en la expresión de los genes *FaPME1* y una disminución en la expresión de *FaPLB*

(Figura 6.6 e y g) en frutos HIII11 en comparación con el control, sin cambios en la expresión de *FaPG1* y *FaPLC* (Figura 6.6 f y h). Como se mencionó en la sección 2.8.5, la actividad pectin metilesterasa constituye un punto clave de control tanto para el desensamblaje y como el ensamblaje de la red de pectinas en la pared celular primaria y lámina media (Pelloux et al., 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la regulación positiva en la expresión de *FaPME1* en frutos de plantas tratadas con HIII11 y el hecho de que no se observaran cambios en la expresión de *FaPG1* entre los tratamientos, podría conducir a un refuerzo de las uniones de poliurónidos demetilados a través de puentes de calcio y posiblemente a pectinas menos depolimerizadas. Un resultado similar se obtuvo en las hojas de *A. thaliana* inoculadas con *B. velezensis* HIII11 (Figura 5.10). A su vez, la expresión disminuida y sin alteración de *FaPLB* y *FaPLC*, respectivamente, en los frutos tratados con HIII11 refuerzan esta sugerencia, ya que estos genes están involucrados en el desensamblaje de las pectinas, junto con *FaPG1* (Benítez-Burraco et al., 2003; Quesada et al., 2009).

En el presente trabajo se encontró que el contenido de azúcares neutros en pectinas totales fue significativamente mayor en los frutos inoculados con HIII11 en comparación con los frutos control (Figura 6.7 a). La pérdida de azúcares neutros de las cadenas laterales que se produce durante la maduración de frutilla es un proceso catalizado por enzimas tales como β -galactosidasas y α -arabinofuranosidasas (Paniagua et al., 2016; Rosli et al., 2009). Particularmente, la regulación antisentido del gen *Fa β Gal4* dio lugar a plantas de frutilla transgénicas con frutos más firmes que los de plantas del tipo salvaje (Paniagua et al., 2016). Los autores informaron además que los frutos antisentido presentaron un mayor contenido de residuos de galactosa que las plantas salvajes y sugieren que una menor pérdida de residuos de galactosa de las cadenas laterales de la pared celular resultaría en una reducción de la porosidad de esta estructura obstruyendo el acceso de otras enzimas que degradan la pared, tales como PGs o PLs, conduciendo a una reducción del ablandamiento del fruto. De manera interesante, en este trabajo de Tesis, la expresión relativa del gen *Fa β Gal4* (y *FaAra1*) se vio disminuida de manera significativa en los frutos HIII11 respecto a los frutos controles (Figura 6.7 b y d). Asimismo, estos resultados coinciden con una menor hidratación *in vitro* de las paredes celulares de frutos de plantas inoculadas con HIII11 respecto al control (Figura 6.4), sugiriendo una menor porosidad de las paredes de frutos HIII11.

Respecto a las fracciones de hemicelulosas y celulosa, las mismas no se vieron modificadas por el tratamiento con *B. velezensis* HIII11, si bien en promedio la cantidad de hemicelulosa fue mayor en frutos HIII11 (Figura 6.8 a y b). En lo que respecta al análisis mediante PCR en tiempo real de genes relacionados con el metabolismo de hemicelulosas se observó una reducción significativa de la expresión relativa de *FaExp5* (Figura 6.8 d). Las expansinas conforman un grupo de proteínas estructurales que participan en la relajación de la pared celular, y la expresión de genes de expansinas se asoció con el desarrollo y la maduración de la frutilla (Civello et al., 1999; Dotto et al., 2006, sección 2.8.5).

Como se mencionó en la **sección 2.8.5**, dentro de la familia de las XTHs algunas de estas proteínas pueden presentar actividad xiloglucano endohidrolasa (XEH), actividad xiloglucano endotransglicosilasa (XET), o ambas, generando diferentes efectos en la pared celular (Eklöf & Brumer, 2010). En frutilla, se reportó el clonado y caracterización de un gen que codifica una proteína putativa que poseería tanto actividad hidrolasa como transglicosilasa (*FaXTH2*) y un gen que codifica una proteína putativa que tendría actividad transglicosilasa exclusiva (*FaXTH1*) (Nardi et al., 2014). En el presente trabajo, se observó que los frutos de plantas de frutilla inoculadas con *B. velezensis* HIII11 presentaron una regulación positiva de *FaXTH2* (**Figura 6.8 f**), mientras que la expresión de *FaXTH1* no varió respecto al control (**Figura 6.8 e**). Dada la posible naturaleza dual de *FaXTH2*, y los resultados obtenidos en cuanto a la hidratación y crecimiento *in vitro* de fitopatógenos en las paredes celulares de frutos provenientes de plantas inoculadas con HIII11, no se descarta la posibilidad de que la enzima codificada por este gen esté actuando preferentemente como endotransglicosilasa catalizando la escisión y ligadura no hidrolítica de las cadenas de xiloglucano.

Los frutos de frutilla (tanto los aquenios como el receptáculo) actúan como verdaderos sumideros de los fotosintatos generados en las hojas de la planta madre (Miyoshi et al., 2017). De esta manera, la salud de las hojas es fundamental para un correcto desarrollo y maduración de los frutos, por lo que la aplicación de tratamientos precosecha que sean capaces de ejercer un control biológico resultan de gran interés. En este sentido, en el presente trabajo de Tesis, se detectó una restricción significativa en el crecimiento de *B. cinerea* en las hojas de plantas inoculadas con HIII11 en comparación con el control (**Figura 6.9**). Cuando se aislaron las paredes celulares de las hojas, si bien no se observó diferencia en el contenido total de las mismas entre tratadas y control (**Figura 6.11 a**), el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* fue significativamente menor en los RIAs aislados de hojas de plantas inoculadas con *B. velezensis* HIII11 (**Figura 6.11 b**), sugiriendo una menor accesibilidad del fitopatógeno a estas paredes celulares en comparación con las de hojas control. En otros trabajos realizados en nuestro Laboratorio se aislaron las paredes celulares de hojas y frutos de plantas de frutilla del cultivar ‘San Andreas’ tratadas semanalmente durante 4 meses con el biopreparado de uso agroecológico Supermagro (el cual posee una carga de bacterias cultivables de $4,5 \times 10^4$ UFC ml⁻¹) y se observó que a las 48 h el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* en dichas paredes fue significativamente menor en comparación con las plantas control (Burges et al., 2023; Nadler et al., 2024). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la aplicación precosecha de PGPBs individuales o de biopreparados, podrían inducir modificaciones en la pared celular de hojas y frutos de frutilla que las harían menos accesibles a las enzimas hidrolíticas de fitopatógenos.

Finalmente, cabe destacar que la síntesis y liberación de diferentes compuestos antimicrobianos por el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiada y constituye un poderoso mecanismo mediante el cual la bacteria puede inhibir a un importante número de fitopatógenos (Caulier et al., 2019; Fira et al., 2018; Ongena & Jacques, 2007; Zhang et al., 2023). A su vez, la

aplicación de dichos compuestos podría utilizarse como una estrategia para el control de enfermedades en plantas (Caulier et al., 2019), y la aplicación de los sobrenadantes bacterianos filtrados es una práctica utilizada para evaluar los efectos de los mismos. En este sentido, Chen et al. (2019) evaluaron los efectos inhibitorios de sobrenadantes filtrados de *B. amyloliquefaciens* RS-25, *B. licheniformis* MG-4, *B. subtilis* Z-14, y *B. subtilis* Pnf-4 contra *B. cinerea* tanto *in vitro* como en la postcosecha de frutilla, tomate y uva. Los resultados mostraron porcentajes de reducción de enfermedad que van desde un 55 hasta un 79% en los casos de frutilla y tomate, respectivamente, mientras que en uva la reducción de la enfermedad fue mayor a un 80% con los sobrenadantes de las cepas Pnf-4, MG-4 y RS-25, y de tan solo un 12% con Z-14. En este trabajo de Tesis, se evaluó en primer lugar el efecto del sobrenadante libre de células de HIII11 en la inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer* a distintas proporciones (5, 15, 25 y 50%). Se observó un aumento progresivo de la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos a medida que aumentaba la proporción de sobrenadante en el medio, alcanzando con un 25% de sobrenadante una inhibición del 66 y 59% de *R. stolonifer* y *B. cinerea*, respectivamente (**Figura 6.12**). Otros autores informaron que, los compuestos antimicrobianos, específicamente lipopéptidos sintetizados por la cepa *Bacillus* XT1 CECT 8661 lograron retrasar el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, mientras que, durante la postcosecha de uva, frutilla y tomate, redujeron la incidencia de la enfermedad en los frutos en un 100, 12 y 50%, respectivamente (Toral et al., 2018). El mismo grupo de investigación identificó dentro de ese conjunto de lipopéptidos a los compuestos bacilomicina D, fengicina A y B, y surfactina. Así, durante el desarrollo de esta Tesis, se decidió investigar la presencia de genes que codifican para proteínas importantes en la biosíntesis de los compuestos antimicrobianos en el genoma de *B. velezensis* HIII11. Como resultado, utilizando oligonucleótidos específicos y a través de la técnica de PCR a tiempo final se lograron identificar genes que codifican para la síntesis de surfactina, fengicina, bacilisina, bacilomicina e iturina (**Figura 6.13**). Wang et al. (2021) reportaron que *B. halotolerans* KLBC XJ-5 logró controlar a *B. cinerea* en la postcosecha de frutillas, y la presencia en su genoma de genes implicados en la biosíntesis de múltiples tipos de antibióticos condujo a los autores a suponer que la síntesis de estos compuestos por KLBC XJ-5 sería uno de los mecanismos implicados en el control de este fitopatógeno. En este trabajo de Tesis, la aplicación postcosecha de los sobrenadantes libres de células de HIII11 en una proporción del 25% logró reducir o retrasar la infección por *B. cinerea* en frutillas maduras (**Figura 6.14**). A su vez, el tratamiento mostró una tendencia en reducir la aparición de podredumbres espontáneas (tanto de origen fúngico como bacteriano) durante el almacenamiento postcosecha de frutilla (**Figura 6.15**). Estos resultados sugieren que la síntesis de distintos compuestos antimicrobianos constituiría otro mecanismo, junto con los ya identificados en este trabajo de Tesis, mediante el cual *Bacillus velezensis* HIII11 podría ejercer control biológico hacia patógenos necrótrofos, preservando, a su vez, la calidad de los frutos.

6.6. CONCLUSIONES

- La inoculación de plantas de frutilla con *Bacillus velezensis* HIII11 no ocasionó cambios en parámetros de calidad vinculados con el desarrollo del gusto y color del fruto.
- El tratamiento precosecha con HIII11 rindió frutos con una mayor acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides respecto a los controles.
- *B. velezensis* HIII11 influye en el metabolismo de la pared celular de frutos de frutilla, principalmente modulando la expresión de genes como *FaPME1*, *FaPLB*, *FaAra1*, *FaβGal4*, *FaExp5* y *FaXTH2*, y modificando el contenido de cadenas laterales de la misma.
- La inoculación con *B. velezensis* HIII11 restringió el crecimiento *in vivo* de *B. cinerea* en hojas de plantas de frutilla, e *in vitro* cuando se le suministraron las paredes celulares aisladas de las hojas y de los frutos en comparación con el control, resultados que sugieren un potencial como controlador biológico de HIII11.
- *B. velezensis* HIII11 podría sintetizar y liberar al medio compuestos antimicrobianos con capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* y *R. stolonifer*.
- La aplicación postcosecha del sobrenadante libre de células de HIII11 logró retrasar la enfermedad causada por *B. cinerea* en frutillas maduras.

7. CONCLUSIÓN GENERAL

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis doctoral, refuerzan la idea de que bacterias beneficiosas como *Bacillus velezensis* HIII11, pueden desempeñar un papel clave en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos en cultivos de interés comercial.

A través de diversos mecanismos, se reveló que HIII11 es capaz de inducir respuestas de defensa en las plantas y por otra parte preservaría la integridad de la pared celular vegetal, además de inhibir el crecimiento de fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Rizhopus stolonifer*. Se comprobó que la aplicación precosecha de HIII11 en plantas de frutilla no altera parámetros de calidad importantes del fruto, y favorece la acumulación de metabolitos con propiedades antioxidantes como compuestos fenólicos y flavonoides.

Asimismo, los sobrenadantes libres de células de HIII11 revelaron propiedades antimicrobianas, y su aplicación postcosecha en frutillas maduras retrasó el desarrollo de enfermedades fúngicas.

De esta manera, podemos concluir que, la bacteria *Bacillus velezensis* HIII11 tiene un potencial como alternativa sostenible al uso de fungicidas de síntesis química en el manejo de enfermedades a campo y posiblemente en la preservación postcosecha de un producto frutihortícola de relevancia mundial como la frutilla.

8. REFERENCIAS:

- Abd-El-Kareem**, F., Elshahawy, I. E., & Abd-Elgawad, M. M. M. (2022). Native bacteria for field biocontrol of black root rot in Egyptian strawberry. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00775-3>
- Admassie**, M., Woldehawariat, Y., & Alemu, T. (2022). In vitro evaluation of extracellular enzyme activity and its biocontrol efficacy of bacterial Isolates from Pepper plants for the management of *Phytophthora capsici*. *BioMed Research International*, 6778352. <https://doi.org/10.1155/2022/6778352>
- Afzal**, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. In *Microbiological Research* 221, 36–49. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Agustí**, L., Bonaterra, A., Moragrega, C., Camps, J., & Montesinos, E. (2011). Biocontrol of Root rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum* with a combination of two *Pseudomonas fluorescens* strains. *Source: Journal of Plant Pathology*, 93(2), 363–372.
- Ahn**, S. J., Yang, C. H., & Cooksey, D. A. (2007). *Pseudomonas putida* 06909 genes expressed during colonization on mycelial surfaces and phenotypic characterization of mutants. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 120–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03232.x>
- Alijani**, Z., Amini, J., Ashengroph, M., Bahramnejad, B., & Mozafari, A. A. (2022). Biocontrol of strawberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum nymphaeae* using *Bacillus atrophaeus* strain DM6120 with multiple mechanisms. *Tropical Plant Pathology*, 47, 245-259. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00477-7>
- Allard-Massicotte**, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J. F., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, H. P., & Beaugregard, P. B. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio*, 7(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01664-16>
- Alvarado-Cepeda**, Y. A., Mendoza-Villarreal, R., Sandoval-Rangel, A., Vega-Chávez, J. L., & Franco-Gaytán, I. (2020). Physicochemical and sensory quality of strawberries fruits obtained in two cultivation systems. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*, 8(43), 18–29. <https://www.researchgate.net/publication/348881631>
- Amil-Ruiz**, F., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., & Caballero, J. L. (2011). The strawberry plant defense mechanism: A molecular review. In *Plant and Cell Physiology*, 52(11), 1873–1903. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr136>
- Anjali**, K. S., Korra, T., Thakur, R., Arutselvan, R., Kashyap, A. S., Nehela, Y., Chaplygin, V., Minkina, T., & Keswani, C. (2023). Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress*, 8, 100154. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154>

- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009).** *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8(63). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Asselbergh, B., & Höfte, M. (2007).** Basal tomato defences to *Botrytis cinerea* include abscisic acid-dependent callose formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1–3), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.10.001>
- Azam, M., Ejaz, S., Naveed Ur Rehman, R., Khan, M., & Qadri, R. (2019).** Postharvest quality management of strawberries. In *Strawberry - Pre- and Post-Harvest Management Techniques for Higher Fruit Quality*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82341>
- Babalola, O. O. (2010).** Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1559–1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
- Baca, B. E., & Elmerich, C. (2003).** Microbial production of plant hormones. Elmerich, C., Newton, W.E. (eds) *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, Kluwer Academic Publishers, 113-143. http://doi.org/10.1007/1-4020-3546-2_6
- Bach-Pages, M., & Preston, G. M. (2018).** Methods to quantify biotic-induced stress in plants. In *Methods in Molecular Biology*, 1734, 241–255. Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_19
- Badar, M. A., Mehmood, K., Hassan, I., Ahmed, M., Ahmad, I., Ahmad, N., & Hasan, M. U. (2022).** Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) enhance growth and yield of strawberry cultivars. *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(3), 2187–2203. https://doi.org/10.15666/aeer/2003_21872203
- Bagmare, R., Syed, I., Ingole, A., & Bagmare, P. (2019).** Siderophore production by plant growth promoting microorganisms. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 1450–1452. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>
- Bai, X., Li, Q., Zhang, D., Zhao, Y., Zhao, D., Pan, Y., Wang, J., Yang, Z., & Zhu, J. (2023).** *Bacillus velezensis* Strain HN-Q-8 induced resistance to *Alternaria solani* and stimulated growth of potato plant. *Biology*, 12(6), 856. <https://doi.org/10.3390/biology12060856>
- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., Lyons, T. J., Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., Lyons, T. J., Basu, A., Nguyen, A., & Betts, N. M. (2014).** Strawberry as a functional food : An evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 790–806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>
- Bautista-Baños, S., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernandez-Lauzardo, A. N., & Barka, E. A. (2008).** The *Rhizopus stolonifer*-Tomato interaction. *Plant-Microbe Interactions*, 661(2), 269–289.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013).** *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 110(17), E1621–E1630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
- Benítez-Burraco**, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M. L., Moyano, E., Caballero, J. L., & Muñoz-Blanco, J. (2003). Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 633–645. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg065>
- Bérdy**, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* 58(1): 1–26, 2005. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Bi**, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Blumenkrantz**, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uranic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, 484–489. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1)
- Bonaterra**, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., & Montesinos, E. (2022). Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10(9), 1759. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091759>
- Bouchard-Rochette**, M., Machrafi, Y., Cossus, L., Thuy An Nguyen, T., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2022). *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 170, 104925. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104925>
- Boyes**, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., Mccaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499–1510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1105/tpc.010011>
- Briat**, J. F., Fobis-Loisy, I., Grignon, N., Lobréaux, S., Pascal, N., Savino, G., Thoiron, S., von Wirén, N., & Van Wuytswinkel, O. (1995). Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell*, 84(1–2), 69–81. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(96\)81320-7](https://doi.org/10.1016/0248-4900(96)81320-7)
- Brummell**, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103–119. <https://doi.org/10.1071/FP05234>
- Burges**, P. L., Nadler, N., Hirsch, M., Bongiorno, M., Villarreal, N. M., & Marina, M. (2023). Caracterización fisicoquímica y microbiológica del biopreparado “Supermagro”. Efectos de su aplicación precosecha en parámetros de calidad de frutilla. *Investigación Joven*, 10(2), 229–233. <https://doi.org/https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/16269>
- Bustamante**, C. A., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2009). Cloning of the promoter region of β -xylosidase (*FaXyl1*) gene and effect of plant growth regulators on the expression of *FaXyl1* in strawberry fruit. *Plant Science*, 177(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.03.015>
- Bustamante**, C. A., Rosli, H. G., Añón, M. C., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2006). β -Xylosidase

- in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Science*, 171(4), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.05.011>
- Cairns**, L. S., Hogley, L., & Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular Microbiology*, 93(4), 587–598. <https://doi.org/10.1111/mmi.12697>
- Carbú**, M., González-Rodríguez, V. E., Garrido, C., Husaini, A. M., & Cantoral, J. M. (2016). New biocontrol strategies for strawberry fungal pathogens. In *Strawberry: growth, development and diseases*, 196–211. CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780646633.0196>
- Carmona-Hernandez**, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. In *Agronomy* 9(3), 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>
- Carpita**, N. C., & Kanabus, J. (1987). Extraction of Starch by Dimethyl Sulfoxide and Quantitation by Enzymatic Assay. *Analytical Biochemistry*, 161, 132–139. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90662-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90662-2)
- Carpita**, N. C., & McCann, M. C. (2000). The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (eds), 52-108.
- Castillejo**, C., De La Fuente, J. I., Iannetta, P., Botella, M. Á., & Valpuesta, V. (2004). Pectin esterase gene family in strawberry fruit: Study of *FaPE1*, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany*, 55(398), 909–918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh102>
- Caulier**, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10(302). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chen**, J., Mao, L., Lu, W., Ying, T., & Luo, Z. (2016). Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. *Planta*, 243(1), 183–197. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2402-5>
- Chen**, P. H., Chen, R. Y., & Chou, J. Y. (2018). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, 46(1), 33–46. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454013>
- Chen**, X., Wang, Y., Gao, Y., Gao, T., & Zhang, D. (2019). Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *Plant Pathology Journal*, 35(5), 425–436. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0064>
- Cheng**, H. R., & Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 28(1), 55–59. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>
- Chowdhury**, S. P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., & Grosch, R. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community.

PLoS ONE, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068818>

- Civello**, P. M., Powell, A. L. T., Sabehat, A., & Bennett, A. B. (1999). An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry Fruit 1. *Plant Physiology*, 121, 1273–1279. <https://doi.org/10.1104/pp.121.4.1273>
- Colavolpe**, M. B., Villarreal, N. M., Langer, S. E., Romero, F. M., Martínez, G. A., Saini, A., Ruiz, O. A., & Marina, M. (2021). Burkholderia sp. Strain AU4i Promotes Arabidopsis Growth and Increases Plant Defence Response to Necrotrophic Pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(5), 1939–1949. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10238-6>
- Compant**, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Conrath**, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Cordero**, P., Príncipe, A., Jofré, E., Mori, G., & Fischer, S. (2014). Inhibition of the phytopathogenic fungus *Fusarium proliferatum* by volatile compounds produced by *Pseudomonas*. *Archives of Microbiology*, 196(11), 803–809. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1019-6>
- Cosgrove**, D. J. (1997). Assembly and Enlargement of the Primary Cell Wall in Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 13, 171–201. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.171>
- Cosgrove**, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407, 321–326. <https://doi.org/10.1038/35030000>
- Cozzolino**, M. E., Distel, J. S., García, P. A., Mascotti, M. L., Ayub, M. J., Benazzi, L. M., Di Masi, S. N., & Silva, P. G. (2020). Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus* sp. isolate SL-6. *Scientia Horticulturae*, 261(108957). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108957>
- Cutler**, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- Daglio**, Y., Ponce, N. M. A., Ortiz, C. M., Stortz, C. A., & Vicente, A. (2024). Cell wall disassembly events accompanying softening in the core and external zones of the strawberry fruit receptacle. *Postharvest Biology and Technology*, 216(1), 113034. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.113034>
- D'amour**, J., Gosselin, C., Arul, J., Castaigne, F., & Willemot, C. (1993). Gamma-Radiation Affects Cell Wall Composition of Strawberries. *Journal of Food Science*, 58, 182–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03239.x>
- de Andrade**, L. A., Santos, C. H. B., Frezarín, E. T., Sales, L. R., & Rigobelo, E. C. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. *Microorganisms*,

- 11(4), 1088. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088>
- de Moura**, G. G. D., de Barros, A. V., Machado, F., Martins, A. D., Silva, C. M. da, Durango, L. G. C., Forim, M., Alves, E., Pasqual, M., & Doria, J. (2021). Endophytic bacteria from strawberry plants control gray mold in fruits via production of antifungal compounds against *Botrytis cinerea* L. *Microbiological Research*, 251. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126793>
- De Silva**, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- Delaporte-Quintana**, P., Lovaisa, N. C., Rapisarda, V. A., & Pedraza, R. O. (2020). The plant growth promoting bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum brasilense* contribute to the iron nutrition of strawberry plants through siderophores production. *Plant Growth Regulation*, 91(2), 185–199. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00598-0>
- Demidchik**, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., & Yurin, V. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: The role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1259–1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>
- Dotto**, M. C., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2006). Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5–6), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.06.008>
- Dukare**, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1498–1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>
- Eklöf**, J. M., & Brumer, H. (2010). The XTH gene family: An update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. *Plant Physiology*, 153(2), 456–466. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156844>
- Ekundayo**, F. O., Folorunsho, A. E., Ibisanmi, T. A., & Olabanji, O. B. (2022). Antifungal activity of chitinase produced by *Streptomyces* species isolated from grassland soils in Futa Area, Akure. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00782-4>
- El-Saadony**, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., El-Tahan, A. M., Ebrahim, A. A. M., Abd El-Mageed, T. A., Negm, S. H., Selim, S., Babalghith, A. O., Elrys, A. S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13, 923880. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>
- Elanchezhian**, K., Keerthana, U., Nagendran, K., Prabhukarthikeyan, S. R., Prabakar, K., Raguchander, T., & Karthikeyan, G. (2018). Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by

- Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.008>
- Elnahal**, A. S. M., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., AbuQamar, S. F., & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*, 162(4), 759–792. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>
- Eng**, F., Zienkiewicz, K., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E., & Feussner, I. (2018). Jasmonic acid biosynthesis by microorganisms: derivatives, first evidences on biochemical pathways and culture conditions for production. *PeerJ Preprints*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26655v1>
- Erturk**, Y., Ercisli, S., & Cakmakci, R. (2012). Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting Rhizobacteria inoculation. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 817–826. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663437>
- Esitken**, A., Yildiz, H. E., Ercisli, S., Figen Donmez, M., Turan, M., & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124(1), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012>
- Fan**, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- Fan**, Z., Hasing, T., Johnson, T. S., Garner, D. M., Barbey, C. R., Colquhoun, T. A., Sims, C. A., Resende, M. F. R., & Whitaker, V. M. (2021). Strawberry sweetness and consumer preference are enhanced by specific volatile compounds. *Horticulture Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00502-5>
- Fanai**, A., Bohia, B., Lalremruati, F., Lalhriatpuii, N., Lalrokimi, Lalmuanpuii, R., Singh P. K., & Zothanpuia. (2024). Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. *PeerJ*, 12, e17882. <https://doi.org/10.7717/peerj.17882>
- Feliziani**, E., & Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), 47–63. <https://doi.org/10.3233/JBR-150113>
- Feng**, H., Xia, W., Shan, C., Zhou, T., Cai, W., & Zhang, W. (2015). Quaternized chitosan oligomers as novel elicitors inducing protection against *B. cinerea* in Arabidopsis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.060>
- Ferrari**, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., & Ausubel, F. M. (2003). Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal*, 35(2), 193–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01794.x>
- Fira**, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens

- by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Forchetti**, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1145–1152. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1077-7>
- Forchetti**, G., Masciarelli, O., Izaguirre, M. J., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2010). Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Current Microbiology*, 61(6), 485–493. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9642-1>
- Fry**, S. M., Huang, J. S., & Milholland, R. D. (1994). Isolation and Preliminary Characterization of Extracellular Proteases Produced by Strains of *Xylella fastidiosa* from Grapevines. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(4), 357–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/Phyto-84-357>
- Galli**, V., Messias, S., Cristina, E., Moura, J., Luis, A., & Valmor, C. (2016). Mild salt stress improves strawberry fruit quality. *Food Science and Technology*, 73, 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.001>
- Gao**, S., Wu, H., Yu, X., Qian, L., & Gao, X. (2016). Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control*, 98, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.011>
- Gao**, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., & Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>
- Garrido**, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F. J., González-Rodríguez, V. E., & Cantoral, J. M. (2011). New Insights in the Study of Strawberry Fungal Pathogens. *Genes, Genomes and Genomics*, 5(1), 24–39. www.eppo.org
- Garrido**, C., González-rodríguez, V. E., Carbú, M., Husaini, A. M., & Cantoral, J. M. (2016). Fungal Diseases of Strawberry and their Diagnosis. In A. . Husaini & D. Neri (Eds.), *Strawberry: growth, development and diseases*, 157–195. CAB International. <https://doi.org/10.1079/9781780646633.0157>
- Ghozlan**, M. H., EL-Argawy, E., Tokgöz, S., Lakshman, D. K., & Mitra, A. (2020). Plant Defense against Necrotrophic Pathogens. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2122–2138. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.1112149>
- Giampieri**, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Giovanni**, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16,

S170-S180. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>

- Glick, B. R.** (2015). Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. In *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*, 1–28. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0_1
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., & Pang, C. H.-N.** (1973). *The Genus Bacillus*, 427. <http://books.google.com>
- Govrin, E. M., Rachmilevitch, S., Tiwari, B. S., Solomon, M., & Levine, A.** (2006). An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology*, 96(3), 299–307. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0299>
- Guinebretiere, M. H., Nguyen-The, C., Morrison, N., Reich, M., & Nicot, P.** (2000). Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Food Protection*, 63(3), 386–394. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.3.386>
- Gupta, S., & Kaushal, R.** (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Bioresource for Enhanced Productivity of Solanaceous Vegetable Crops. *Acta Scientific Agriculture*, 1(3), 10–15. <https://www.researchgate.net/publication/366372600>
- Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A.** (2014a). Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 67–72. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_8
- Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A.** (2014b). Plate-Based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 59–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_7
- Haggag, W. M., & Timmusk, S.** (2008). Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 961–969. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03611.x>
- Hammami, R., Oueslati, M., Smiri, M., Nefzi, S., Ruissi, M., Comitini, F., Romanazzi, G., Cacciola, S. O., & Sadfi Zouaoui, N.** (2022). Epiphytic Yeasts and Bacteria as Candidate Biocontrol Agents of Green and Blue Molds of Citrus Fruits. *Journal of Fungi*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/jof8080818>
- Han, C., Kuchkarova, N., Zhou, S., Zhang, C., Shi, K., Zou, T., & Shao, H.** (2021). Plant growth - promoting abilities and community structure of culturable endophytic bacteria from the fruit of an invasive plant *Xanthium italicum*. *3 Biotech*, 11, 449. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02997-0>
- Han, Y., Chen, C., Yan, Z., Li, J., & Wang, Y.** (2019). The methyl jasmonate accelerates the strawberry fruits ripening process. *Scientia Horticulturae*, 249, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.061>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Scheller, H. V.** (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*,

153(2), 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>

- Harrison, E. P.,** Mcqueen-Mason, S. J., & Manning, K. (2001). Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1437–1446. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.360.1437>
- Hassan, E. A.,** Mostafa, Y. S., Alamri, S., Hashem, M., & Nafady, N. A. (2021). Biosafe management of botrytis grey mold of strawberry fruit by novel bioagents. *Plants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/plants10122737>
- Hassani, M. A.,** Gonzalez, O., Hunter, S. S., Holmes, G. J., Hewavitharana, S. S., Ivors, K., & Lazcano, C. (2022). Microbiome network connectivity and composition linked to disease resistance in strawberry plants. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.10.07.511207>
- Hedden, P.,** & Kamiya, Y. (1997). GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 48, 431–460. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.431>
- Hirsch, M.,** Langer, S. E., Marina, M., Rosli, H. G., Civello, P. M., Martínez, G. A., & Villarreal, N. M. (2020). Expression profiling of endo-xylanases during ripening of strawberry cultivars with contrasting softening rates. Influence of postharvest and hormonal treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3676–3684. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10997>
- Hong, S.,** Kim, T. Y., Won, S., Moon, J., Ajuna, H. B., Kim, K. Y., & Ahn, Y. S. (2022). Control of Fungal Diseases and Fruit Yield Improvement of Strawberry Using *Bacillus velezensis* CE 100. *Microorganisms*, 10(2), 365. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms10020365>
- Hossain, T. J.,** Chowdhury, S. I., Mozumder, H. A., Chowdhury, M. N. A., Ali, F., Rahman, N., & Dey, S. (2020). Hydrolytic Exoenzymes Produced by Bacteria Isolated and Identified From the Gastrointestinal Tract of Bombay Duck. *Frontiers in Microbiology*, 11(2097). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02097>
- Huang, J.,** Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q., & Chen, Z. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(4), 1526–1538. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157370>
- Ishida, K.,** & Noutoshi, Y. (2022). The function of the plant cell wall in plant-microbe interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 192, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.10.015>
- Islam, M. N.,** Ali, M. S., Choi, S. J., Park, Y. II, & Baek, K. H. (2020). Salicylic acid-producing endophytic bacteria increase nicotine accumulation and resistance against wildfire disease in tobacco plants. *Microorganisms*, 8(1), 31. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010031>
- Jana, S. K.,** Islam, M. M., Hore, S., & Mandal, S. (2023). Rice seed endophytes transmit into the plant seedling, promote plant growth and inhibit fungal phytopathogens. *Plant Growth*

- Regulation*, 99, 373–388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10725-022-00914-w>
- Jarrell, K. F., & McBride, M. J.** (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 466–476. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1900>
- Ji, C., Tian, H., Wang, X., Song, X., Ju, R., Li, H., Gao, Q., Li, C., Zhang, P., Li, J., Hao, L., Wang, C., Zhou, Y., Xu, R., Liu, Y., Du, J., & Liu, X.** (2022). *Bacillus subtilis* HG-15, a Halotolerant Rhizoplane Bacterium, Promotes Growth and Salinity Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum*). *BioMed Research International*, 2022, 9506227. <https://doi.org/10.1155/2022/9506227>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Karaca, N. F., & Pirlak, L.** (2022). Studies on Determination of Strawberry Cultivars Suitable for Ereğli-Konya Ecological Conditions. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, 36(1), 48–57. <https://doi.org/10.15316/sjafs.2022.008>
- Karačić, V., Miljaković, D., Marinković, J., Ignjatov, M., Milošević, D., Tamindžić, G., & Ivanović, M.** (2024). *Bacillus* Species: Excellent Biocontrol Agents against Tomato Diseases. *Microorganisms*, 12(457). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030457>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A.** (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- Kaur, P. K., Joshi, N., Singh, I. P., & Saini, H. S.** (2017). Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. *Journal of Applied Microbiology*, 122(1), 139–152. <https://doi.org/10.1111/jam.13303>
- Kearns, D. B.** (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kirschbaum, D. S., Vicente, C. E., Cano-Torres, M. A., Gambardella, M., Veizaga-Pinto, F. K., & Antunes, L. E. C.** (2017). Strawberry in South America: From the Caribbean to Patagonia. *Acta Horticulturae*, 1156, 947–956. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.140>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J.** (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10(845). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kour, D., Negi, R., Khan, S. S., Kumar, S., Kaur, S., Kaur, T., Sharma, B., Dasila, H., Kour, H., Ramniwas, S., Chaubey, K. K., Neelam, D. K., & Yadav, A. N.** (2024). Microbes mediated induced systemic response in plants: A review. *Plant Stress*, 11(100334). <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100334>
- Kumar, S., Diksha, Sindhu, S. S., & Kumar, R.** (2022). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 3(100094). <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- Kunz, S.** (2006). Fire blight control in organic fruit growing – systematic investigation of the mode

of action of potential control agents. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft*, 408, 249–253.

- Lahlali**, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(596). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Langer**, S. E., Marina, M., Burgos, J. L., Martínez, G. A., Civello, P. M., & Villarreal, N. M. (2019). Calcium chloride treatment modifies cell wall metabolism and activates defense responses in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*, Duch). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8), 4003–4010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9626>
- Langer**, S. E., Marina, M., Francese, P., Civello, P. M., Martínez, G. A., & Villarreal, N. M. (2022). New insights into the cell wall preservation by 1-methylcyclopropene treatment in harvest-ripe strawberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 299, 111032. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111032>
- Langer**, S. E., Oviedo, N. C., Marina, M., Burgos, J. L., Martínez, G. A., Civello, P. M., & Villarreal, N. M. (2018). Effects of heat treatment on enzyme activity and expression of key genes controlling cell wall remodeling in strawberry fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.015>
- Lastochkina**, O., Garshina, D., Ivanov, S., Yuldashev, R., Khafizova, R., Allagulova, C., Fedorova, K., Avalbaev, A., Maslennikova, D., & Bosacchi, M. (2020). Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* modulates physiological responses of two different *Triticum aestivum* L. Cultivars under drought stress. *Plants*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/plants9121810>
- Le**, K. D., Kim, J., Nguyen, H. T., Yu, N. H., Park, A. R., Lee, C. W., Kim, J., & Kim, J. (2021). *Streptomyces* sp. JCK-6131 Protects Plants Against Bacterial and Fungal Diseases via Two Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 12(726266), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.726266>
- Lee**, R. D. W., & Cho, H. T. (2013). Auxin, the organizer of the hormonal/environmental signals for root hair growth. In *Frontiers in Plant Science*, 4. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00448>
- Li**, X., Zhang, M., Qi, D., Zhou, D., Qi, C., Li, C., Liu, S., Xiang, D., Zhang, L., Xie, J., & Wang, W. (2021). Biocontrol Ability and Mechanism of a Broad-Spectrum Antifungal Strain *Bacillus safensis* sp. QN1NO-4 Against Strawberry Anthracnose Caused by *Colletotrichum fragariae*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735732>
- Liang**, G. (2022). Iron uptake, signaling, and sensing in plants. In *Plant Communications*, 3(5). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100349>
- Lin**, Y., He, H., Wen, Y., Cao, S., Wang, Z., Sun, Z., Zhang, Y., Wang, Y., He, W., Li, M., Chen, Q., Zhang, Y., Luo, Y., Wang, X., & Tang, H. (2023). Comprehensive Analysis of the Pectate Lyase Gene Family and the Role of *FaPL1* in Strawberry Softening. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713217>

- Liu, H., Wang, Z., Xu, W., Zeng, J., Li, L., Li, S., & Gao, Z. (2020).** *Bacillus pumilus* LZP02 promotes rice root growth by improving carbohydrate metabolism and phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(10), 1222–1231. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-20-0106-R>
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J. P., & Bouzayen, M. (2015).** Ethylene control of fruit ripening: Revisiting the complex network of transcriptional regulation. In *Plant Physiology*, 169(4), 2380–2390. American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01361>
- Liu, Q., Chen, Q., Liu, H., Du, Y., Jiao, W., Sun, F., & Fu, M. (2024).** *Rhizopus stolonifer* and related control strategies in postharvest fruit: A review. In *Heliyon*, 10(8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29522>
- Loake, G., & Grant, M. (2007).** Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.008>
- Lorenzini, M., & Zapparoli, G. (2020).** Epiphytic bacteria from withered grapes and their antagonistic effects on grape-rotting fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 319. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108505>
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektsen, A., & Kunin, V. (2012).** Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Madhavi, B. G. K., Kim, N. E., Basak, J. K., Choi, G. M., & Kim, H. T. (2023).** Comparative study of strawberry growth and fruit quality parameters in horizontal and vertical production systems. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 64(3), 409–419. <https://doi.org/10.1007/s13580-022-00494-8>
- Maheshwari, R., Kumar, P., Bhutani, N., & Suneja, P. (2022).** Exploration of plant growth - promoting endophytic bacteria from *Pisum sativum* and *Cicer arietinum* from South – West Haryana. *Journal of Basic Microbiology*, 1–18. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100575>
- Maitra, S., Brestic, M., Bhadra, P., Shankar, T., Praharaj, S., Palai, J. B., Shah, M. M. R., Barek, V., Ondrisik, P., Skalick, M., & Hossain, A. (2022).** Bioinoculants — Natural Biological Resources for Sustainable Plant Production. *Microorganisms*, 10(51), 1–35. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010051>
- Maldonado-González, M. M., Bakker, P. A. H. M., Prieto, P., & Mercado-Blanco, J. (2015).** *Arabidopsis thaliana* as a tool to identify traits involved in *Verticillium dahliae* biocontrol by the olive root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Frontiers in Microbiology*, 6(266). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00266>
- Manning, K. (1991).** Isolation of Nucleic Acids from Plants by Differential Solvent Precipitation. *Analytical Biochemistry*, 195, 45–50. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90292-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90292-2)
- Manning, K. (1993).** Soft fruit. In G. Seymour, J. Taylor, & G. Tucker (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Published by Chapman and Hall, 347–377.

- Mao**, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., & Zhang, S. (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *23*(4), 1639–1653. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084996>
- Marina**, M., Romero, F. M., Villarreal, N. M., Medina, A. J., Gárriz, A., Rossi, F. R., Martínez, G. A., & Pieckenstain, F. L. (2019). Mechanisms of plant protection against two oxalate-producing fungal pathogens by oxalotrophic strains of *Stenotrophomonas spp.* *Plant Molecular Biology*, *100*(6), 659–674. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00888-w>
- Martínez**, G. A., Chaves, A. R., & Civello, P. M. (2004). β -xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*(2), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.12.001>
- Mateos-Naranjo**, E., García-López, J. V., Flores-Duarte, N. J., Romano-Rodríguez, E., Rodríguez-Llorente, I. D., Pérez-Romero, J. A., Pajuelo, E., & Redondo-Gómez, S. (2025). Development of a PGPB-based biofertilizer to optimize strawberry cultivation in semiarid regions: Screening, validation and scaling up to commercial production. *Scientia Horticulturae*, *340*, 113929. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113929>
- Mates**, A. de P. K., Pontes, N. de C., & Halfeld-Vieira, B. de A. (2019). *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. *Biological Control*, *137*, 104013. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104013>
- Mattick**, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, *56*, 289–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>
- Meddeb-Mouelhi**, F., Moisan, J. K., & Beauregard, M. (2014). A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, *66*, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.07.004>
- Mekureyaw**, M. F., Pandey, C., Hennessy, R. C., Nicolaisen, M. H., Liu, F., Nybroe, O., & Roitsch, T. (2022). The cytokinin-producing plant beneficial bacterium *Pseudomonas fluorescens* G20-18 primes tomato (*Solanum lycopersicum*) for enhanced drought stress responses. *Journal of Plant Physiology*, *270*, 153629. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153629>
- Merchante**, C., Vallarino, J. G., Osorio, S., Aragüez, I., Villarreal, N., Ariza, M. T., Martínez, G. A., Medina-Escobar, N., Civello, M. P., Fernie, A. R., Botella, M. A., & Valpuesta, V. (2013). Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *Journal of Experimental Botany*, *64*(14), 4421–4439. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert257>
- Merrit**, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2005). Growing and Analyzing Static Biofilms. *Currents Protocols in Microbiology*, 1B.1.1-1B.1.17. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>
- Miedes**, E., Herbers, K., Sonnewald, U., & Lorences, E. P. (2010). Overexpression of a cell wall enzyme reduces xyloglucan depolymerization and softening of transgenic tomato fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(9), 5708–5713. <https://doi.org/10.1021/jf100242z>

- Miedes, E., & Lorences, E. P.** (2009). Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) during tomato fruit growth and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 166(5), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.07.003>
- Mirskaya, G. V., Khomyakov, Y. V., Rushina, N. A., Vertebny, V. E., Chizhevskaya, E. P., Chebotar, V. K., Chesnokov, Y. V., & Pishchik, V. N.** (2022). Plant Development of Early-Maturing Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Inoculation with *Bacillus sp.* V2026. *Plants*, 11(1817). <https://doi.org/10.3390/plants11141817>
- Mishra, A. K., & Baek, K. H.** (2021). Salicylic acid biosynthesis and metabolism: A divergent pathway for plants and bacteria. *Biomolecules*, 11(705). <https://doi.org/10.3390/biom11050705>
- Mishra, P., Mishra, J., Dwivedi, S. K., & Arora, N. K.** (2020). Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens. In *Microorganisms for Sustainability*, 11, 259–285. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_10
- Mishra, R., & Kar, A.** (2014). Effect of storage on the physicochemical and flavour attributes of two cultivars of strawberry cultivated in Northern India. *The Scientific World Journal*, 794926. <https://doi.org/10.1155/2014/794926>
- Miyoshi, Y., Hidaka, T., Hidaka, K., Okayasu, T., Yasutake, D., & Kitano, M.** (2017). Dynamics of photosynthate loading in strawberries affected by light condition on source leaves. *Environmental Control in Biology*, 55(1), 53–58. <https://doi.org/10.2525/ecb.55.53>
- Molina, A., Jordá, L., Torres, M. Á., Martín-Dacal, M., Berlanga, D. J., Fernández-Calvo, P., Gómez-Rubio, E., & Martín-Santamaría, S.** (2024). Plant cell wall-mediated disease resistance: Current understanding and future perspectives. *Molecular Plant*, 17, 699–724. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.04.003>
- Molina, A., Miedes, E., Bacete, L., Rodríguez, T., Mélida, H., Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Rivière, M.-P., López, G., Freyrier, A., Barlet, X., Pattathil, S., Hahn, M., & Goffner, D.** (2021). Arabidopsis cell wall composition determines disease resistance specificity and fitness. *PNAS*, 118(5), e2010243118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010243118/-DCSupplemental>
- Morais, M. C., Mucha, Â., Ferreira, H., Gonçalves, B., Bacelar, E., & Marques, G.** (2019). Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), 5341–5349. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9773>
- Morales-Delgado, D. Y., Téllez-Medina, D. I., Rivero-Ramírez, N. L., Arellano-Cárdenas, S., López-Cortez, S., Hernández-Sánchez, H., Gutierrez-López, G., & Cornejo-Mazón, M.** (2014). Effect of Convective Drying on Total Anthocyanin Content, Antioxidant Activity and Cell Morphometric Parameters of Strawberry Parenchymal Tissue (*Fragaria x ananassa* Duch). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 179–187. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62031166014>
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with

- Tohaoco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Myo**, E. M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K., & Ge, B. (2019). Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control*, 134, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.017>
- Nadler**, N., Villarreal, N. M., & Marina, M. (2024). Efectos de la aplicación precosecha del biopreparado de uso agroecológico Supermagro en parámetros de calidad de frutilla. Trabajo Final para optar al título de Técnico Universitario de Laboratorio. Universidad Nacional de San Martín.
- Nardi**, C. F., Villarreal, N. M., Opazo, M. C., Martínez, G. A., Moya-León, M. A., & Civello, P. M. (2014). Expression of *FaXTH1* and *FaXTH2* genes in strawberry fruit. Cloning of promoter regions and effect of plant growth regulators. *Scientia Horticulturae*, 165, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.035>
- Nardi**, C. F., Villarreal, N. M., Rossi, F. R., Martínez, S., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2015). Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism. *Plant Molecular Biology*, 88(1–2), 101–117. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0311-4>
- Nguyen**, N. H., Trotel-Aziz, P., Villaume, S., Rabenoelina, F., Schwarzenberg, A., Nguema-Ona, E., Clément, C., Baillieul, F., & Aziz, A. (2020). *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* trigger common and distinct systemic immune responses in *Arabidopsis thaliana* depending on the pathogen lifestyle. *Vaccines*, 8(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030503>
- Nie**, L. J., Ye, W. Q., Xie, W. Y., & Zhou, W. W. (2022). Biofilm: New insights in the biological control of fruits with *Bacillus amyloliquefaciens* B4. *Microbiological Research*, 265, 127196. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127196>
- Niu**, D.-D., Liu, H.-X., Jiang, C.-H., Wang, Y.-P., Wang, Q.-Y., Jin, H.-L., & Guo, J.-H. (2011). The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate-and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways. *MPMI*, 24(5), 533–542. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Novo**, L. A. B., Castro, P. M. L., Alvarenga, P., & da Silva, E. F. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Assisted Phytoremediation of Mine Soils. In *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*, 281–295. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812986-9.00016-6>
- Nurzhanova**, A., Mukasheva, T., Berzhanova, R., Kalugin, S., Omirbekova, A., & Mikolasch, A. (2021). Optimization of microbial assisted phytoremediation of soils contaminated with pesticides. *International Journal of Phytoremediation*, 23(5), 482–491. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1825330>
- Olanrewaju**, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 197.

<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

- Ongena, M., & Jacques, P. (2007).** Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, *16*(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Santoyo, G., & Glick, B. R. (2023).** Recent Advances in the Bacterial Phytohormone Modulation of Plant Growth. *Plants*, *12*(606). <https://doi.org/10.3390/plants12030606>
- Ortiz Araque, L. C., Ortiz, C. M., Darré, M., Rodoni, L. M., Civello, P. M., & Vicente, A. R. (2019).** Role of UV-C irradiation scheme on cell wall disassembly and surface mechanical properties in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *150*, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.01.002>
- Oukala, N., Pastor, V., & Aissat, K. (2021).** Bacterial endophytes: The hidden actor in plant immune responses against biotic stress. *Plants*, *10*(1012). <https://doi.org/10.3390/plants10051012>
- Oyuela Aguilar, M., Alvarez, F., Medeot, D., Jofré, E., Semorile, L., & Pistorio, M. (2021).** Screening of epiphytic rhizosphere-associated bacteria in argentinian malbec and cabernet-sauvignon vineyards for potential use as biological fertilisers and pathogen-control agents. *Oeno One*, *55*(4), 145–157. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.4.4655>
- Pacheco-Coeto, R., Cárdenas-Torres, L., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J. V., & Aquino-Pérez, G. (2019).** Calosa y especies reactivas del oxígeno expresadas en hojas de caña de azúcar por daño mecánico de mosca pinta. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *22*, 105–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1862>
- Palma, V., Gutiérrez, M. S., Vargas, O., Parthasarathy, R., & Navarrete, P. (2022).** Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions. *Microorganisms*, *10*(563). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030563>
- Paniagua, C., Blanco-Portales, R., Barceló-Muñoz, M., García-Gago, J. A., Waldron, K. W., Quesada, M. A., Muñoz-Blanco, J., & Mercado, J. A. (2016).** Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene *Fa β Gal4* increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, *67*(3), 619–631. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv462>
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2014).** Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*, *114*(6), 1375–1383. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu149>
- Pap, N., Fidelis, M., Azevedo, L., do Carmo, M. A. V., Wang, D., Mocan, A., Pereira, E. P. R., Xavier-Santos, D., Sant’Ana, A. S., Yang, B., & Granato, D. (2021).** Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. *Current Opinion in Food Science*, *42*, 167–186. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.06.003>

- Patten**, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Patten**, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795–3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Payasi**, A., Nath Mishra, N., Lucia Soares Chaves, A., & Singh, R. (2009). Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15(2), 103–113. <https://doi.org/10.1007/s12298-009-0012-z>
- Pelloux**, J., Rustérucchi, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12(6), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001>
- Peng**, G., Zhao, X., Li, Y., Wang, R., Huang, Y., & Qi, G. (2019). Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological Research*, 227, 126297. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126297>
- Peng**, Z., & Jin, Y. (2020). Purification, identification, and characterization of an endo-1,4- β -xylanase from wheat malt. *Molecules*, 25(1572). <https://doi.org/10.3390/molecules25071572>
- Pérez-Flores**, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P., & Macías-Rodríguez, L. (2017). *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, 254(6), 2201–2213. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1109-9>
- Pérez-García**, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Pérez-Miranda**, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- Perini**, M. A., Sin, I. N., Villarreal, N. M., Marina, M., Powell, A. L. T., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2017). Overexpression of the carbohydrate binding module from *Solanum lycopersicum* expansin 1 (SI-EXP1) modifies tomato fruit firmness and *Botrytis cinerea* susceptibility. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.029>
- Perkins-Veazie**, P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. In *Horticultural reviews*, 17, 267–297. John Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470650585.ch8>
- Petrasch**, S., Knapp, S. J., van Kan, J. A. L., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877–892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- Petrasch**, S., Silva, C. J., Mesquida-pesci, S. D., Gallegos, K., Abeele, C. Van Den, Papin, V.,

- Fernandez-acero, F. J., & Blanco-ulate, B. (2019). Infection Strategies Deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a Function of Tomato Fruit Ripening Stage. *Frontiers in Plant Science*, 10(223), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00223>
- Pfaffl**, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 45–45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pieterse**, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pieterse**, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., & Van Loon, L. C. (1998). A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10, 1571–1580. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.9.1571>
- Pieterse**, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pirttilä**, A. M., Tabas, H. M. P., Baruah, N., & Koskimäki, J. J. (2021). Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. *Microorganisms*, 9(817). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040817>
- Planchon**, A., Durambur, G., Besnier, J. B., Plasson, C., Gügi, B., Bernard, S., Mérieau, A., Trouvé, J. P., Dubois, C., Laval, K., Driouich, A., Mollet, J. C., & Gattin, R. (2020). Effect of a *Bacillus subtilis* strain on flax protection against *Fusarium oxysporum* and its impact on the root and stem cell walls. *Plant Cell and Environment*, 44(1), 304–322. <https://doi.org/10.1111/pce.13882>
- Pombo**, M. A., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2009). Irradiación de frutillas con UV-C: efecto sobre la síntesis de proteínas, degradación de la pared celular y mecanismos de defensa. Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología. Universidad Nacional de San Martín.
- Posé**, S., Paniagua, C., Matas, A. J., Gunning, A. P., Morris, V. J., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2018). A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy. *Trends in Food Science and Technology*, 87, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.011>
- Posé**, S., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2011). Strawberry Fruit Softening: Role of Cell Wall Disassembly and its Manipulation in Transgenic Plants. *Genes, Genomes and Genomics*, 5(1), 40–48. <https://www.researchgate.net/publication/235695342>
- Prakash**, J., & Arora, N. K. (2021). Novel metabolites from *Bacillus safensis* and their antifungal property against *Alternaria alternata*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 114(8), 1245–1258. [165](https://doi.org/10.1007/s10482-</p>
</div>
<div data-bbox=)

- Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R. N. (2007).** Fruit ripening phenomena-an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408390600976841>
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285–293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x>
- Prihatiningsih, N., Asnani, A., & Djatmiko, H. A. (2021).** Extracellular protease from *Bacillus subtilis* b315 with antagonistic activity against bacterial wilt pathogen (*Ralstonia solanacearum*) of chili. *Biodiversitas*, 22(3), 1291–1295. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220327>
- Priyadarshi, R., Jayakumar, A., Krebs de Souza C., Rhim, J-W., Kim, J. T. (2024).** Advances in strawberry postharvest preservation and packaging: A comprehensive review. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 23(4), e13417. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13417>
- Prusky, D., & Lichter, A. (2007).** Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters*, 268(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00603.x>
- Pusey, P. L., & Wilson, C. L. (1984).** Pusey and Wilson, 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68, 753–756.
- Qu, L., She, P., Wang, Y., Liu, F., Zhang, D., Chen, L., Luo, Z., Xu, H., Qi, Y., & Wu, Y. (2016).** Effects of norspermidine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 402–412. <https://doi.org/10.1002/mbo3.338>
- Quarshi, H. Q., Ahmed, W., Azmant, R., Chendouh-Brahmi, N., Quyyum, A., & Abbas, A. (2023).** Post-Harvest Problems of Strawberry and Their Solutions. In *Recent Studies on Strawberries*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102963>
- Quesada, M. A., Blanco-Portales, R., Pose, S., García-Gago, J. A., Jiménez-Bermúdez, S., Muñoz-Serrano, A., Caballero, J. L., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J. A., & Muñoz-Blanco, J. (2009).** Antisense down-regulation of the *FaPG1* gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiology*, 150(2), 1022–1032. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138297>
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010).** Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012).** Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 403–424. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019).**

- Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(1046). <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rahman**, M., Rahman, M., Sabir, A. A., Mukta, J. A., Khan, M. M. A., Mohi-Ud-Din, M., Miah, M. G., & Islam, M. T. (2018). Plant probiotic bacteria *Bacillus* and *Paraburkholderia* improve growth, yield and content of antioxidants in strawberry fruit. *Scientific Reports*, 8(504). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20235-1>
- Ramírez-Gómez**, X. S., Jiménez-García, S. N., Campos, V. B., & García Campos, M. L. (2019). Plant Metabolites in Plant Defense Against Pathogens. In *Plant Pathology and Management of Plant Diseases*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87958>
- Rashid**, I., Adbelghany, R., & Abd-EL-Hamed, W. (2022). Potential of Bioagents Application Pre-Harvest Strawberry on Fruit Rots and Quality under Storage Conditions. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 50(2), 79–87. <https://doi.org/10.21608/ejp.2022.161990.1069>
- Redgwell**, R. J., Fischer, M., Kendal, E., & MacRae, E. A. (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polyssacharides of fruit cell walls. *Planta*, 203(2), 174–181. <https://doi.org/10.1007/s004250050179>
- Redgwell**, R. J., Macrae, E., Hallett, I., Fischer, M., Perry, J., & Harker, R. (1997). In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Source: Planta*, 203(2), 162–173. <https://doi.org/10.1007/s004250050178>
- Ren**, D., Liu, Y., Yang, K.-Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., & Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *PNAS*, 105(14), 5638–5643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711301105>
- Restrepo**, H., Gómez, M. I., Garzón, A., Manrique, Lady, Alzate, F., López, J., & Rodríguez, A. (2014). Respuesta bioquímica de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) a diferentes condiciones de temperaturas nocturnas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 252–262. <https://doi.org/10.17584/rcch.2013v7i2.2239>
- Rohman**, A., Dijkstra, B. W., & Puspaningsih, N. N. T. (2019). β -xylosidases: Structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5524). <https://doi.org/10.3390/ijms20225524>
- Rosli**, H. G., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2009). α -L-Arabinofuranosidase from strawberry fruit: Cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(4), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.12.009>
- Ruan**, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2479). <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Ryu**, C. M. (2015). Bacterial volatiles as airborne signals for plants and bacteria. In *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, 53–61. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_8

- Saberi Riseh**, R., Vatankhah, M., Hassanisaadi, M., & Barka, E. A. (2024). Unveiling the Role of Hydrolytic Enzymes from Soil Biocontrol Bacteria in Sustainable Phytopathogen Management. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 29(3), 105. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2903105>
- Saha**, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Samad**, M. Y. A., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Zin Wan Yunus, W., Ampon, K. I., & Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9, 51–56. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-7012\(89\)90030-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90030-4)
- Samee**, A., Ibrahim, M. S., Amir, R. M., Hassan, I., Ali, M., Zahoor, Z., Khan, A. U., & Nasir, H. (2023). A Comprehensive Review on the Health-Orientated Aspects of Strawberries. *Food Science & Applied Microbiology Reports*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.61363/fsamr.v2i1.57>
- Sánchez-Gómez**, C., Posé, D., & Martín-Pizarro, C. (2022). Insights into transcription factors controlling strawberry fruit development and ripening. *Frontiers in Plant Science*, 13(1022369). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1022369>
- Santoyo**, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Saxena**, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2019). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>
- Schaffner**, U., Heimpel, G. E., Mills, N. J., Muriithi, B. W., Thomas, M. B., GC, Y. D., & Wyckhuys, K. A. G. (2024). Biological control for One Health. *Science of the Total Environment*, 951(175800). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175800>
- Scheller**, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schenk**, S., & Schikora, A. (2015). Staining of Callose Depositions in Root and Leaf Tissues. *BIO-PROTOCOL*, 5(6). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1429>
- Schlechter**, R. O., Miebach, M., & Remus-Emsermann, M. N. P. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.003>
- Schwieterman**, M. L., Colquhoun, T. A., Jaworski, E. A., Bartoshuk, L. M., Gilbert, J. L., Tieman, D. M., Odabasi, A. Z., Moskowitz, H. R., Folta, K. M., Klee, H. J., Sims, C. A., Whitaker, V. M., & Clark, D. G. (2014). Strawberry flavor: Diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception. *PLoS ONE*, 9(2), e88446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088446>
- Schywn**, B., & Neilands, B. B. (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and

- Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Seijo**, T. E., Chandler, C. K., Mertely, J., Moyer, C., & Peres, N. A. (2008). Resistance of Strawberry Cultivars and Advanced Selections to Anthracnose and Botrytis Fruit Rots. *Florida State Horticultural Society*, 121, 246–248. <https://www.researchgate.net/publication/242313981>
- Sgroj**, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A., & Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 371–381. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2116-3>
- Shahzad**, A., Qin, M., Elahie, M., Naeem, M., Bashir, T., Yasmin, H., Younas, M., Areeb, A., Irfan, M., Billah, M., Shakoor, A., & Zulfiqar, S. (2021). *Bacillus pumilus* induced tolerance of Maize (*Zea mays* L.) against Cadmium (Cd) stress. *Scientific Reports*, 11(1), 17196. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96786-7>
- Shahzad**, R., Khan, A. L., Bilal, S., Waqas, M., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2017). Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany*, 136, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.010>
- Shameer**, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84(3), 603–615. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>
- Sharma**, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>
- Shaw**, D. V., & Larson, K. D. (2009). *Strawberry plant named “San Andreas”* (US PP19,975 P2).
- Sheng**, M., Jia, H., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, T., Long, Y., Lan, J., Hu, Z., Zeng, Z., Wang, B., & Liu, H. (2020). Siderophore Production by Rhizosphere Biological Control Bacteria *Brevibacillus brevis* GZDF3 of *Pinellia ternata* and Its Antifungal Effects on *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 689–699. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10066>
- Sherpa**, M. T., Bag, N., Das, S., Haokip, P., & Sharma, L. (2021). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from organically grown high yielding pole type native pea (*Pisum sativum* L.) variety Dentami of Sikkim, India. *Current Research in Microbial Sciences*, 2(100068). <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100068>
- Siddiqui**, I. A., Shaikat, S. S., Sheikh, I. H., & Khan, A. (2006). Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 641–650. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9084-2>

- Sirijan**, M., Pipattanawong, N., Saeng-On, B., & Chaiprasart, P. (2020). Anthocyanin content, bioactive compounds and physico-chemical characteristics of potential new strawberry cultivars rich in-anthocyanins. *Journal of Berry Research*, *10*(3), 397–410. <https://doi.org/10.3233/JBR-190487>
- Soni**, R., & Keharia, H. (2021). Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming Bacilli. *Planta*, *254*(49). <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03695-0>
- Souleyre**, E. J. F., Janetta, P. P. M., Ross, H. A., Hancock, R. D., Shepherd, L. V. T., Viola, R., Taylor, M. A., & Davies, H. V. (2004). Starch metabolism in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *Physiologia Plantarum*, *121*(3), 369-376. <https://doi.org/10.1111/j.oo31-9317.2004.0338.x>
- Spaepen**, S. (2015). Plant hormones produced by microbes. In *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, 247–256. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_26
- Sretenović**, M., Tamaš, N., Zec, G., Stojanoski, M., Tešić, N., Miletić, N., & Djordjević, B. (2024). Productivity, biocontrol and postharvest fruit quality of strawberry cultivar 'Clery' using plant growth promoting microorganisms. *Cogent Food and Agriculture*, *10*(1), 2310896. <https://doi.org/10.1080/23311932.2024.2310896>
- Srivastava**, V., McKee, L. S., & Bulone, V. (2017). Plant Cell Walls. In *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–17. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001682.pub3>
- Steddom**, K., Menge, J. A., Crowley, D., & Borneman, J. (2002). Effect of Repetitive Applications of the Biocontrol Bacterium *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal on Citrus Soil Microbial Communities. *Biological Control*, *92*(8), 857–862. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.8.857>
- Swaminathan**, S., Lionetti, V., & Zabolina, O. A. (2022). Plant Cell Wall Integrity Perturbations and Priming for Defense. *Plants*, *11*(3539). <https://doi.org/10.3390/plants11243539>
- Sylla**, J., Alsanius, B. W., Krüger, E., Reineke, A., Strohmeier, S., & Wohanka, W. (2013). Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology*, *103*(10), 1001–1011. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0014-R>
- Symons**, G. M., Chua, Y. J., Ross, J. J., Quittenden, L. J., Davies, N. W., & Reid, J. B. (2012). Hormonal changes during non climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, *63*(13), 4741-4750. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers147>
- Talboys**, P. J., Owen, D. W., Healey, J. R., Withers, P. J. A., & Jones, D. L. (2014). Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biology*, *14*(51). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-51>
- Tamura**, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

- Tan**, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., Xu, Y., & Shen, Q. (2013). Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Protection*, 43, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.08.003>
- Tateishi**, A. (2008). β -Galactosidase and α -L-Arabinofuranosidase in Cell Wall Modification Related with Fruit Development and Softening. *J. Japan. Soc. Hort. Sci*, 77(4), 329–340. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.77.329>
- Tian**, Y., Xin, W., Lin, J., Ma, J., He, J., Wang, X., Xu, T., & Tang, W. (2022). Auxin Coordinates Achene and Receptacle Development During Fruit Initiation in *Fragaria vesca*. *Frontiers in Plant Science*, 13(929831). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.929831>
- Timofeeva**, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant Growth-Promoting Soil Bacteria: Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization, Siderophore Production, and Other Biological Activities. *Plants*, 12(4074). <https://doi.org/10.3390/plants12244074>
- Tiwari**, M., Pati, D., Mohapatra, R., Sahu, B. B., & Singh, P. (2022). The Impact of Microbes in Plant Immunity and Priming Induced Inheritance: A Sustainable Approach for Crop protection. *Plant Stress*, 4(100072). <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100072>
- Tiwari**, S., Prasad, V., & Lata, C. (2019). Bacillus: Plant growth promoting bacteria for sustainable agriculture and environment. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biotechnology in Agro-environmental Sustainability*, 43–55. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00003-1>
- Toral**, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9(1315). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Toral**, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2020). Crop protection against *Botrytis cinerea* by rhizosphere biological control agent *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms*, 8(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070992>
- Tortora**, M. L., Díaz-Ricci, J. C., & Pedraza, R. O. (2011). Protection of strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*, 356(1–2), 279–290. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0916-6>
- Tosetti**, R., Elmi, F., Pradas, I., Cools, K., & Terry, L. A. (2020). Continuous Exposure to Ethylene Differentially Affects Senescence in Receptacle and Achene Tissues in Strawberry Fruit. *Frontiers in Plant Science*, 11(174). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00174>
- Trainotti**, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S., & Casadoro, G. (2001). Beta-Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 52(361). PMID: 11479328.
- Tronsmo**, A., & Dennis, C. (1977). The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Neth. J. Pl. Path*, 83(1), 449–455. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF03041462>
- Tsukanova**, K. A., Chebotar, V., Meyer, J. J. M., & Bibikova, T. N. (2017). Effect of plant growth-

- promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African Journal of Botany*, 113, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>
- Valle-Romero**, P., García-López, J. V., Redondo-Gómez, S., Flores-Duarte, N. J., Rodríguez-Llorente, I. D., Idaszkin, Y. L., Pajuelo, E., & Mateos-Naranjo, E. (2023). Biofertilization with PGP Bacteria Improve Strawberry Plant Performance under Sub-Optimum Phosphorus Fertilization. *Agronomy*, 13(335). <https://doi.org/10.3390/agronomy13020335>
- Van Baarlen**, P., Legendre, L., & Van Kan, J. A. L. (2007). Plant defence compounds against *Botrytis* infection. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Ch. 6, 143–161.
- van Hulst**, M., Pelser, M., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., & Ton, J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *PNAS*, 103(14), 5602–5607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510213103>
- Verbon**, E. H., & Liberman, L. M. (2016). Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*, 21(3), 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
- Versalovic**, J., Schneider, M., De Bruin, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25–40.
- Vicente-Hernández**, A., Salgado-Garciglia, R., Valencia-Cantero, E., Ramírez-Ordorica, A., Hernández-García, A., García-Juárez, P., & Macías-Rodríguez, L. (2019). *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria × ananassa* ‘Aromas’) plants in vitro and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(3), 765–777. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9888-6>
- Vicente**, A. R., Saladié, M., Rose, J. K. C., & Labavitch, J. M. (2007). The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: Looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1435–1448. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2837>
- Villagrán**, V., Legarraga, M., & Zschau, B. (2013). Variedades de frutilla. In *Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, Ch. 2, 262. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7619>
- Villarreal**, N. M., Bustamante, C. A., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2010). Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 683–689. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3868>
- Villarreal**, N. M., Marina, M., Nardi, C. F., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2016). Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism. *Plant Science*, 252, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.018>
- Villarreal**, N. M., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2009). Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. *Plant Science*, 176(6), 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.019>
- Villarreal**, N. M., Rosli, H. G., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2008). Polygalacturonase activity

- and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.011>
- Virgen-Ortiz**, J. J., Morales-Ventura, J. M., Colín-Chávez, C., Esquivel-Chávez, F., Vargas-Arispuro, I., Aispuro-Hernández, E., & Martínez-Téllez, M. A. (2020). Postharvest application of pectic-oligosaccharides on quality attributes, activities of defense-related enzymes, and anthocyanin accumulation in strawberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5), 1949–1961. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10207>
- Vlamakis**, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- Voigt**, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*, 5, 168. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00168>
- Wan**, J., He, M., Hou, Q., Zou, L., Yang, Y., Wei, Y., & Chen, X. (2021). Cell wall associated immunity in plants. *Stress Biology*, 1(3). <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00003-4>
- Wang**, C., Duan, T., Shi, L., Zhang, X., Fan, W., Wang, M., Wang, J., Ren, L., Zhao, X., & Wang, Y. (2022). Characterization of volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* YJ15 and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 106, 2321–2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0230-RE>
- Wang**, F., Xiao, J., Zhang, Y., Li, R., Liu, L., & Deng, J. (2021). Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111456>
- Wang**, J., Zhang, Y., Li, Y., Wang, X., Nan, W., Hu, Y., Zhang, H., Zhao, C., Wang, F., Li, P., Shi, H., & Bi, Y. (2015). Endophytic microbes *Bacillus sp.* LZR216-regulated root development is dependent on polar auxin transport in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Reports*, 34(6), 1075–1087. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1766-0>
- Wang**, X., Xu, F., Wang, J., Jin, P., & Zheng, Y. (2013). *Bacillus cereus* AR156 induces resistance against Rhizopus rot through priming of defense responses in peach fruit. *Food Chemistry*, 136(2), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.032>
- Wang**, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021). Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. In *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–15. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22052393>
- Whitaker**, V. M., Knapp, S. J., Hardigan, M. A., Edger, P. P., Slovin, J. P., Bassil, N. V., Hytönen, T., Mackenzie, K. K., Lee, S., Jung, S., Main, D., Barbey, C. R., & Verma, S. (2020). A roadmap for research in octoploid strawberry. In *Horticulture Research*, 7(1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0252-1>
- Wiesel**, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R. J., & Hein, I. (2014).

- Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 5(655). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>
- Willats**, W. G. T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1010662911148>
- Williamson**, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wolf**, S. (2022). Annual Review of Plant Biology Cell Wall Signaling in Plant Development and Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 73, 323–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820>
- Wu**, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(5), 560–567. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Yamaguchi**, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
- Yang**, P., Zhao, Z., Fan, J., Liang, Y., Bernier, M. C., Gao, Y., Zhao, L., Opiyo, S. O., & Xia, Y. (2023). *Bacillus proteolyticus* OSUB18 triggers induced systemic resistance against bacterial and fungal pathogens in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1078100>
- Yang**, Y., Ahammed, G. J., Wu, C., Fan, S., & Zhou, Y. (2015). Crosstalk among Jasmonate , Salicylate and Ethylene Signaling Pathways in Plant Disease and Immune Responses. *Current Protein and Peptide Science*, 16(5), 450–461. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150330141638>
- Yu**, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. In *Plants*, 11(3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>
- Yu**, Y. Y., Dou, G. X., Sun, X. X., Chen, L., Zheng, Y., Xiao, H. M., Wang, Y. P., Li, H. Y., Guo, J. H., & Jiang, C. H. (2021). Transcriptome and Biochemical Analysis Jointly Reveal the Effects of *Bacillus cereus* AR156 on Postharvest Strawberry Gray Mold and Fruit Quality. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.700446>
- Yu**, Z., Wang, D., Zhang, B., Mao, H., Wang, Z., Yan, Z., Tao, C., Deng, X., Shen, Q., & Li, R. (2024). *Bacillus velezensis* SQR9 promotes plant growth through colonization and rhizosphere–phyllosphere bacteria interaction. *Environmental Microbiology Reports*, 16(2). <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13250>
- Zablackis**, E., Huang, J., Müllerz, B., Darvill, A. C., & Albersheim, P. (1995). Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Leaves. In *Plant Physiol*, 1.

www.plantphysiol.org

- Zagoskina**, N. V, Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V, Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in Plants : Structure , Biosynthesis , Abiotic Stress Regulation , and Practical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13874). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
- Zamil**, M. S., & Geitmann, A. (2017). The middle lamella—more than a glue. *Physical Biology*, 14(015004). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aa5ba5>
- Zeigler**, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1893–1900. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02713-0>
- Zhang**, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251-272. <https://doi.org/10.1111/jipb.13055>
- Zhang**, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., Miao, Y., Shen, Q., & Zhang, R. (2023). Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: Improving the efficiency of green agriculture. In *Microbial Biotechnology*, 16(12), 2250–2263. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>
- Zhang**, X., Xie, Z., Lang, D., Chu, Y., Cui, G., & Jia, X. (2020). *Bacillus pumilus* improved drought tolerance in *Glycyrrhiza uralensis* G5 seedlings through enhancing primary and secondary metabolisms. *Physiologia Plantarum*, 171(3), 388–399. <https://doi.org/10.1111/ppl.13236>
- Zhao**, B., Liu, Q., Wang, B., & Yuan, F. (2021). Roles of Phytohormones and Their Signaling Pathways in Leaf Development and Stress Responses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(12), 3566–3584. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07908>
- Zhou**, H., Li, G., & Zhao, X. (2016). Comparative analysis of pectate lyase in relation to softening in strawberry fruits. *Canadian Journal of Plant Science*, 96(4), 604–612. <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0323>

El presente manuscrito corresponde a la versión final de la Tesis de doctorado de Mailén Hirsch, la cual incluye los cambios y/o correcciones sugeridas por los evaluadores: Dr. Nazareno Castagno (INTECH-CONICET, UNSAM); Dr. Ariel Vicente (LIPA-CONICET, UNLP) y Dra. Marina Pombo (INFIVE-CONICET, UNLP).



Mailén Hirsch



María Marina



Natalia M. Villarreal