

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 (*srfA*, 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 *ituD*, 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