

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología



**Aplicación de microorganismos promotores del
crecimiento vegetal con *actividad quorum
quenching* frente a estrés biótico y abiótico**

Miguel Ángel Rodríguez González

Tesis Doctoral, 2022

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de
Sistemas

Directoras de tesis

Dra. Inmaculada Llamas Company

Catedrática

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Dra. Inmaculada Sampedro Quesada

Profesora Titular

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología

Memoria presentada por el Graduado en
Farmacia **D. Miguel Ángel Rodríguez González**
para aspirar al grado de Doctor

Granada, 2022

VºBº de las directoras

Fdo.: **Dra. Inmaculada Llamas Company**
Catedrática
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo.: **Dra. Inmaculada Sampedro Quesada**
Profesora Titular
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

El doctorando
Fdo.: **Miguel Ángel Rodríguez González**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Miguel Ángel Rodríguez González
ISBN: 978-84-1117-254-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/73628>

El doctorando / *The doctoral candidate* **Miguel Ángel Rodríguez González** y las directoras de la tesis / *and the thesis supervisors*: **Inmaculada Llamas Company** e **Inmaculada Sampedro Quesada**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado bajo la dirección de las directoras de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se ha respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of thesis supervisors and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) has been respected.

Lugar y fecha / Place and date

Granada, 10 de febrero de 2022

Fdo.: **Dra. Inmaculada Llamas Company**

Catedrática
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo.: **Dra. Inmaculada Sampedro Quesada**

Profesora Titular
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

El doctorando
Fdo.: **Miguel Ángel Rodríguez González**

Esta tesis doctoral ha sido subvencionada por las siguientes ayudas de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad:

Título: Alternativa ecológica y sostenible para combatir la vibriosis en acuicultura: quorum sensing versus quorum quenching. AGL2015-68806-R

Investigadores principales: Inmaculada Llamas Company y Fernando Martínez- Checa Barrero

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional I+D+I

Título: *Role of intra- and inter- species signalling via small molecules in microbe-plant-interactions (infection and symbiosis).* RYC-2014-15532

Investigador principal: Inmaculada Sampedro Quesada

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional I+D+I

Asimismo, durante la realización de la tesis doctoral, el Doctorando ha disfrutado de las siguientes becas o contratos:

Contrato: Contrato de investigación con cargo a grupo de investigación

Entidad financiadora: Exopolisacáridos microbianos G09-BIO-188

Duración: 15/09/2021 - 15/12/2021

Contrato: Contrato de investigación con cargo a grupo de investigación

Entidad financiadora: Exopolisacáridos microbianos G09-BIO-188

Duración: 15/12/2020 - 14/03/2021

Contrato: Contrato de investigación con cargo a grupo de investigación

Entidad financiadora: Proyecto de Ramón y Cajal, RYC-2014-15532

Duración: 31/07/2019 - 31/10/2019

Contrato: Programa Operativo de Empleo Juvenil

Entidad financiadora: Ministerio de Trabajo y Economía Social

Duración: 31/01/2018 – 30/07/2019

Beca: Movilidad Internacional para Estudiantes de Doctorado

Entidad financiadora: Universidad de Granada

Duración: 01/09/2021-30/11/2021

Lugar: Institute of Biology (IBL), Universidad de Leiden, Leiden, Países Bajos

Beca: *Transnational Access program EPPN2020 Grants*

Entidad financiadora: Proyecto Europeo Horizonte2020

Duración: 16/01/2021-06/03/2021

Lugar: INRA, Université de Bordeaux, Burdeos, Francia

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en revistas indexadas:

Rodríguez, M., Reina, J. C., Sampedro, I., Llamas, I. (2022). *Peribacillus castrilensis* sp. nov., a plant-growth promoting and biocontrol species isolated from a river otter in Castril, Granada, southern Spain. *Front Microbiol* (En preparación)

Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I., Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Sci Rep*, 10(1), 4121. DOI: 10.1038/s41598-020-61084-1

Rodríguez, M., Reina, J. C., Béjar, V., Llamas, I. (2020). *Psychrobacillus vulpis* sp. nov., a new species isolated from faeces of a red fox in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(2), 882-888. DOI: 10.1099/ijsem.0.003840

Vega, C., **Rodríguez, M.**, Llamas, I., Béjar, V., Sampedro, I. (2019). Silencing of phytopathogen communication by the halotolerant PGPR *Staphylococcus equorum* strain EN21. *Microorganisms*, 8 (1). DOI: 10.3390/microorganisms8010042

Rodríguez, M., Reina, J. C., Béjar, V., & Llamas, I. (2019). *Paenibacillus lutrae* sp. nov., a chitinolytic species isolated from a river otter in Castril Natural Park, Granada, Spain. *Microorganisms*, 7(12), 637. DOI: 10.3390/microorganisms7120637

Del mismo modo, los resultados de la Tesis han sido presentados en las siguientes comunicaciones orales a Congresos:

Rodríguez, M., Béjar, V., Cassan, C., Decros, G., Flandin, A., Petriacq, P., Gibon, Y., Llamas, I., Sampedro, I. *Metabolomic and enzymatic profiling of tomato plants colonized by three halotolerant plant growth-promoting strains*. XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Nacional, virtual, 2021

Rodríguez, M., Béjar, V., Llamas, I., Llamas, I. Sampedro, I. *Peribacillus* sp . N3, *Pseudomonas* sp . P6 y *Staphylococcus* sp . EN21, tres cepas halotolerantes inhibitoras de la virulencia de fitopatógenos mediante quorum quenching. XVI Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Nacional, virtual, 2021

Rodríguez, M., Sampedro, I., Blanco, L., del Castillo, J., Béjar, V., Llamas, I., Llamas, I. Aplicación de la cepa P6 de *Pseudomonas* sp. en la promoción del crecimiento vegetal y en la lucha frente a fitopatógenos. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Nacional, Málaga, 2019

Rodríguez, M., Sampedro, I., Blanco, L., del Castillo, J., Béjar, V., Llamas, I., Llamas, I. Actividad *quorum quenching* y promotora del crecimiento vegetal de la cepa P6 de *Pseudomonas* sp. II

Congreso Nacional/ IV Jornadas de Investigadores en Formación Fomentando la interdisciplinariedad (JIFFI). Nacional, Granada, 2019

Así como las siguientes comunicaciones a Congresos en formato póster:

Castillo, I., **Rodríguez, M.**, Durán, A., Llamas, I., Sampedro, I. El Saladar de El Margen, ambiente hipersalino fuente de bacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal y capacidad de biocontrol. XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Nacional, virtual, 2021

Rodríguez, M., Béjar, V., Cassan, C., Decros, G., Flandin, A., Petriacq, P., Gibon, Y., Llamas, I., Sampedro, I. *Deciphering the Pseudomonas syringae pv. tomato biocontrol mechanism of three halotolerant strains by metabolomic and enzymatic approaches*. FEMS-ASM World Microbe. Internacional, virtual, 2021

Rodríguez, M., Sampedro, I., Béjar, V., Cassan, C., Decros, G., Flandin, A., Petriacq, P., Gibon, Y., Llamas, I., Sampedro, I. Promoción del crecimiento vegetal y biocontrol de fitopatógenos por la actividad de tres cepas de los géneros *Peribacillus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*. XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Virtual, 2021

Rodríguez, M., Béjar, V., Llamas, I., Llamas, I. Sampedro, I. Interferencia en los sistemas quorum sensing de fitopatógenos y promoción del crecimiento vegetal por tres cepas halotolerantes. II Jornadas de Jóvenes Investigadores Facultad de Farmacia. Nacional, Granada, 2020

Índice

Índice de figuras.....	15
Índice de tablas.....	19
Índice Anexo	20
Abreviaturas.....	21
Resumen	23
Summary	25
Introducción.....	28
1. La Revolución Verde 2.0 o la Bio-Revolución	30
2. La rizosfera y los microorganismos rizosféricos	31
2.1 Fijación de nitrógeno	32
2.2 Solubilización de fósforo	33
2.3 Producción de sideróforos.....	33
2.4 Producción de fitohormonas.....	34
2.5 Producción de ACC desaminasa	35
2.6 Producción de enzimas hidrolíticas.....	36
2.7 Biocontrol.....	36
2.8 Colonización del tejido vegetal	36
2.9 Promoción de la tolerancia al estrés biótico en la planta: resistencia sistémica inducida	38
2.10 Promoción de la tolerancia al estrés abiótico en la planta	39
3. Sistemas <i>quorum sensing</i>	40
3.1 Autoinductores o moléculas señal	41
3.2 Mecanismos de interferencia en los sistemas <i>quorum sensing</i>	42
4. <i>Quorum sensing</i> en fitopatógenos bacterianos.....	44
4.1 Podredumbre blanda: <i>D. solani</i> , <i>P. atrosepticum</i> y <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	45
4.2 Fuego bacteriano: <i>Erwinia amylovora</i>	46
4.3 Moteado bacteriano: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	48
5. Ambientes salinos y áridos como fuente de microorganismos PGP-QQ.....	49
Objetivos	52
Material y métodos	58
1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	60
2. Especies vegetales	61
3. Plásmidos	61
4. Medios de cultivo	62
5. Antimicrobianos.....	65

6. Moléculas <i>N</i> -acil homoserina lactonas (AHLs).....	65
7. Otras soluciones.....	65
8. Muestreo y aislamiento de cepas bacterianas	67
9. Técnicas para el estudio de la promoción del crecimiento vegetal	67
9.1. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad promotora del crecimiento vegetal	67
9.2. Determinación de la tolerancia a la salinidad	68
9.3. Ensayos de bioseguridad	68
9.4. Bacterización de semillas o biopriming	68
9.5. Ensayos de promoción del crecimiento <i>in vivo</i> en cámara de cultivo	69
9.6. Estudio de la colonización bacteriana.....	70
9.6.1 Ensayos de movilidad	70
9.6.2 Ensayo de quimiotaxis.....	70
9.6.3 Formación de <i>biofilm</i> y producción de exopolisacáridos.....	71
9.6.4 Ensayos de colonización vegetal	71
9.7. Ensayos <i>in vivo</i> en invernadero.....	73
9.7.1. Determinación de metabolitos primarios	73
9.7.2. Determinación de la actividad enzimática del metabolismo central	76
9.7.3. Análisis del estado redox	82
9.7.4. Análisis de hormonas vegetales.....	87
9.8. Determinación de la tolerancia al estrés hídrico en <i>A. thaliana</i>	87
10. Técnicas para el estudio de la actividad <i>quorum quenching</i>	89
10.1 Determinación de la actividad <i>quorum quenching in vitro</i>	89
10.2 Determinación de la actividad enzimática <i>quorum quenching</i>	89
10.3 Determinación de la actividad <i>quorum quenching</i> mediante HPLC-MS.....	90
10.4 Localización celular de la actividad <i>quorum quenching</i>	90
10.5 Actividad <i>quorum quenching</i> frente a extractos de fitopatógenos.....	91
10.6 Actividad <i>quorum quenching</i> en cocultivo con fitopatógenos	91
10.4 Ensayos de inhibición de la patogenicidad <i>in vitro</i> en frutos, raíces y tubérculos.....	93
10.5 Ensayos de inhibición de la patogenicidad <i>in vivo</i> en plantas de tomate	94
11. Técnicas moleculares.....	95
11.1 Extracción de ADN genómico	95
11.2 Reacción de amplificación de ADN en cadena.....	95
11.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	96
11.4 Transformación de células.....	98
11.5 Conjugación.....	98
11.6 Secuenciación, tratamiento y análisis de secuencias	99

11.7 Identificación taxonómica basada en el gen ARNr 16S	99
11.8 Expresión heteróloga de genes QQ.....	99
11.9 Marcaje con GFP	100
13. Análisis estadístico	100
Capítulo 1	102
Resumen	104
Summary	106
1. Muestreo en el Saladar de El Margen.....	108
2. Caracterización de la actividad promotora del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	109
3. Evaluación de la tolerancia a salinidad	111
4. Determinación de la actividad promotora del crecimiento vegetal <i>in vivo</i>	111
4.1. Bacterización de semillas de tomate	111
4.2. Ensayo de promoción del crecimiento en plantas de tomate	114
5. Determinación de la actividad degradadora de AHLs sintéticas.....	116
6. Identificación taxonómica de las cepas	117
7. Determinación de la actividad antibacteriana	122
8. Discusión	122
Capítulo 2	129
Resumen	131
Summary	133
1. Análisis de la movilidad bacteriana	136
2. Evaluación de la quimiotaxis bacteriana	137
3. Análisis de la formación de <i>biofilm</i> y producción de exopolisacáridos	139
4. Evaluación de la colonización de plantas de tomate <i>in vitro</i> por las bacterias de estudio.....	140
5. Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal <i>in vivo</i> en plantas de tomate mediante cultivo en invernadero.....	143
5.1 Determinación de biomasa y contenido en clorofila	143
5.2 Análisis del metabolismo central	144
5.3 Determinación del balance redox	145
5.4 Evaluación de la actividad enzimática del metabolismo central	147
5.5 Estudio del perfil hormonal de la planta	148
6. Discusión	149
Capítulo 3	159
Resumen	160
Summary	163
1. Ensayos de bioseguridad	165

2. Evaluación de la actividad <i>quorum quenching</i> frente a fitopatógenos	166
3. Caracterización de la actividad <i>quorum quenching</i>	169
4. Estudio filogenético y estructural de enzimas <i>quorum quenching</i>	170
5. Expresión heteróloga de enzimas <i>quorum quenching</i>	177
6. Discusión	178
Capítulo 4	184
Summary	188
1. Interferencia en la patogenicidad en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	190
2. Interferencia en la patogenicidad de la bacteria <i>E. amylovora</i> en peras	193
3. Interferencia en la patogenicidad de <i>D. solani</i> en patatas	194
4. Interferencia en la patogenicidad de <i>P. atrosepticum</i> en patatas	195
5. Interferencia en la patogenicidad de <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> en zanahorias	197
6. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 en plantas de tomate en cámara climática Fitotron	198
6.1. Evaluación de la incidencia y severidad de la infección	198
6.2. Determinación de la concentración de clorofila	200
7. Ensayos de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 en plantas de tomate en condiciones de invernadero	202
7.1. Determinación de biomasa y contenido en clorofila y de parámetros de incidencia y severidad de la infección	202
7.2. Análisis de depósitos de calosa	206
7.3. Análisis del metabolismo central	207
7.4. Determinación del balance redox	209
7.5. Evaluación de la actividad enzimática del metabolismo central	211
7.6. Estudio del perfil hormonal de la planta	213
8. Evaluación de la tolerancia al estrés hídrico en plantas de <i>A. thaliana</i>	215
9. Discusión	220
Discusión general	232
Conclusiones	239
Bibliografía	245
Anexo	290

Índice de figuras

Figura 1. Consumo de fertilizantes (A) y de pesticidas (B) expresado según los distintos países en el año 2018 (izquierda) y de manera global en cada continente desde el inicio del siglo XXI (derecha)	31
Figura 2. Actividad promotora del crecimiento vegetal ejercida por cepas bacterianas mediante mecanismos directos e indirectos.....	32
Figura 3. Hormonas vegetales y sus funciones en la planta	35
Figura 4. Principales tipos de movilidad bacteriana	38
Figura 5. Sistema QS LuxI/LuxR encargado de la regulación de la expresión de luminiscencia en <i>A. fischeri</i>	41
Figura 6. Estructura química de algunas AHLs con y sin sustituciones en posición 3.....	42
Figura 7. Principales tipos de enzimas QQ según su mecanismo de degradación de las moléculas AHLs. HSL, homoserina lactona.....	43
Figura 8. Ciclo de infección de las enterobacterias de la podredumbre blanda en patatas.....	46
Figura 9. Ciclo de infección de <i>E. amylovora</i> , agente causante del fuego bacteriano, en árboles de la familia Rosaceae.....	47
Figura 10. Mecanismo de infección de <i>P. syringae</i> pv. tomato en las hojas de tomate.....	48
Figura 11. Estudio de la colonización de raíces de tomate por las cepas seleccionadas.....	72
Figura 12. Representación de la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)	78
Figura 13. Representación de la actividad de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-GAPDH)	79
Figura 14. Representación esquemática de la determinación de la actividad de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO)	80
Figura 15. Representación esquemática de la actividad de la enzima invertasa ácida	81
Figura 16. Representación esquemática de las reacciones implicadas en la determinación de ascorbato reducido (AscH) y ascorbato oxidado (Asc [•]).....	83
Figura 17. Representación esquemática de las reacciones empleadas en la determinación de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).....	83
Figura 18. Representación esquemática de las reacciones cíclicas necesarias para la determinación de NAD ⁺ y de NADP ⁺	84
Figura 19. Representación esquemática de la reacción de formación de iones triyodo a partir de yoduro potásico (KI) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en medio ácido.	86
Figura 20. Ensayo de difusión en placa Petri para la determinación de quorum quenching.	89
Figura 21. Interferencia en la virulencia de los fitopatógenos mediante cocultivo.	92
Figura 22. Determinación de la dosis infectiva en <i>A. thaliana</i> Col-0.....	93
Figura 23. Distribución de las zonas de muestreo en el Saladar de El Margen	108
Figura 24. Bacterización de semillas de tomate	112
Figura 25. Variación en el crecimiento de las plantas de tomate inoculadas con las cepas bacterianas de estudio.....	115

Figura 26. Efectos en el desarrollo foliar y radicular tras el tratamiento por irrigación radicular con las cepas EN21 y SN31 en plantas de tomate.....	115
Figura 27. Actividad quorum quenching de la cepa P6 frente a AHLs sintéticas.....	117
Figura 28. Reconstrucción filogenética de la cepa N3 ^T y las cepas más próximas basada en la secuencia del gen ARNr 16S mediante el algoritmo de maximum-likelihood basado en modelo Kimura 2-parámetros.....	119
Figura 29. Reconstrucción filogenética de la cepa Z8 ^T y las cepas más próximas basada en la secuencia del gen ARNr 16S mediante el algoritmo de neighbour-joining.....	120
Figura 30. Posición filogenética de la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa N10 ^T y su relación con otras cepas próximas basada en el algoritmo de neighbour-joining.....	121
Figura 31. Determinación de la movilidad de tipo <i>swimming</i> en placas de TSB.....	136
Figura 32. Distribución de los clústers de genes de movilidad asociados al movimiento flagelar.....	137
Figura 33. Recuentos del ensayo de quimiotaxis en capilar de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	138
Figura 34. Distribución de los clústers de genes de quimiotaxis y movilidad.....	139
Figura 35. Determinación de la producción de <i>biofilm</i> en placa <i>microtiter</i>	140
Figura 36. Análisis de la colonización de raíces de tomate por las cepas <i>S. equorum</i> EN21 y <i>P. castrilensis</i> N3.....	141
Figura 37. Análisis de la colonización de raíces de tomate por la cepa <i>P. segetis</i> P6.....	142
Figura 38. Análisis de biomasa y contenido en clorofila de las plantas de tomate irrigadas con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	144
Figura 39. Estudio de compuestos del metabolismo central de hojas de plantas de tomate tratadas con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 mediante irrigación.....	145
Figura 40. Caracterización del perfil redox de hojas de plantas de tomate tratadas con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 mediante irrigación.....	147
Figura 41. Análisis de la actividad de enzimas del metabolismo central de plantas de tomate tratadas con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	148
Figura 42. Determinación semicuantitativa de fitohormonas en las hojas de las plantas de tomate irrigadas con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	149
Figura 43. Ensayo de toxicidad de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en nauplios de <i>A. salina</i>	165
Figura 44. Actividad quorum quenching en cocultivo de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 y los fitopatógenos <i>E. amylovora</i> , <i>D. solani</i> , <i>P. atrosecticum</i> , <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	166
Figura 45. Efecto de la interferencia de los sistemas quorum sensing de los fitopatógenos <i>D. solani</i> y <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	167
Figura 46. Determinación de la localización de la actividad quorum quenching sobre C10-HSL mediante ensayo de difusión en placa.....	169
Figura 47. Identificación del enzima QQ tipo lactonasa mediante la prueba de la restauración del anillo lactónico a pH ácido, empleando C10-HSL y C12-HSL como sustratos.....	170
Figura 48. Determinación semicuantitativa de AHLs remanentes por HPLC-MS.....	170

Figura 49. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de aminoácidos de las enzimas pertenecientes a las principales familias de acilasas y lactonasas y de las secuencias de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 empleando el algoritmo de Neighbor-Joinning	172
Figura 50. Alineamiento múltiple de la secuencia de las lactonasas de las cepas <i>S. equorum</i> EN21 y <i>P. castrilensis</i> N3 y las secuencias de las principales lactonasas de la familia de las metalo- β -lactamasas	174
Figura 51. Alineamiento múltiple de la secuencia de las acilasas de las cepas <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 y las secuencias de las principales acilasas de la familia de las penicilina G acilasas	175
Figura 52. Análisis estructural in silico de las acilasas y lactonasas de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	177
Figura 53. Evaluación de la actividad quorum quenching tras la clonación de las acilasas A y B de la cepa <i>P. segetis</i> P6 en <i>E. coli</i> DH5 α	178
Figura 54. Determinación de la dosis infectiva de <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0	190
Figura 55. Evaluación de la interferencia en la patogenicidad en plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 mediante cocultivos P6 a distintas concentraciones de patógeno	191
Figura 56. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 en <i>A. thaliana</i> Col-0 mediante cocultivo con la cepa <i>P. segetis</i> P6	191
Figura 57. Micrografías de las hojas de <i>A. thaliana</i> Col-0 procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 obtenidas mediante microscopía DIC.....	192
Figura 58. Micrografías de las hojas de <i>A. thaliana</i> Col-0 procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 obtenidas mediante microscopía de fluorescencia..	192
Figura 59. Determinación de la concentración de clorofila por espectrofotometría en las plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 tratadas con los monocultivos de las cepas de estudio y los cocultivos de estas con el patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000.....	193
Figura 60. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>E. amylovora</i> en peras (<i>P. communis</i> cv. Blanquilla) mediante cocultivo con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6	194
Figura 61. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>D. solani</i> en patatas (<i>S. tuberosum</i> cv. Monalisa) mediante cocultivo con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6	195
Figura 62. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>D. solani</i> en patatas (<i>S. tuberosum</i> cv. Monalisa) mediante cocultivo con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6	196
Figura 63. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> en zanahorias (<i>D. carota</i> cv. Amsterdam 2) mediante cocultivo con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	198
Figura 64. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 en plantas de tomate (<i>S. lycopersicum</i> var. Roma) mediante cocultivo con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	200
Figura 65. Determinación del peso seco (mg) en plantas de tomate tras la pulverización con los mono y cocultivos de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 y las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	200
Figura 66. Micrografías de las hojas de tomate procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 por parte de la cepa <i>S. equorum</i> EN21	201
Figura 67. Determinación de la concentración de clorofila total en plantas de tomate tratadas con los mono y cocultivos de las cepas de estudio por espectrofotometría	201

Figura 68. Detalle de la sintomatología detectada en las plantas de tomate tratadas con el patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 mediante irrigación previa con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6	203
Figura 69. Detalle de la sintomatología detectada en las plantas de tomate tratadas con los cocultivos entre el patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 y las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	204
Figura 70. Análisis de biomasa y contenido en clorofila en las plantas de tomate tras el irrigadas con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	205
Figura 71. Estudio de depósitos de calosa en las hojas de tomate procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 por irrigación previa con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	207
Figura 72. Mapas de calor del análisis del metabolismo central en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en plantas de tomate	208
Figura 73. Análisis de la varianza de los resultados de metabolitos en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en plantas de tomate	209
Figura 74. Mapas de calor del análisis del balance redox en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en plantas de tomate	210
Figura 75. Análisis de la varianza de los resultados de compuestos redox obtenidos tras los tratamientos por irrigación previa y mediante cocultivo entre el patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 y las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	211
Figura 76. Análisis de la actividad de enzimas del metabolismo central de las plantas de tomate en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 tras los tratamientos por irrigación previa y mediante cocultivo	213
Figura 77. Mapas de calor del análisis del perfil hormonal en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en plantas de tomate	214
Figura 78. Análisis de la varianza del perfil hormonal tras los tratamientos por irrigación previa y mediante cocultivo entre el patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 y las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6. A, análisis de componentes principales (PCA); B, análisis bivariable entre cada tratamiento y los distintos compuestos redox analizados. ($p < 0,05$, $n=3-5$).....	215
Figura 79. Evaluación de la capacidad de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 para tolerar la presión hídrica	217
Figura 80. Estudio in vitro de la tolerancia a estrés hídrico en plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 mediante la inoculación con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6	218
Figura 81. Evaluación del impacto del estrés hídrico en plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 tras la inoculación con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	219

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en esta tesis y sus principales características.....	60
Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo y sus principales características.	62
Tabla 3. Primers empleados en este trabajo, su secuencia y su función. Las secuencias de corte de las enzimas de restricción se muestran subrayadas.....	97
Tabla 4. Recuento de cepas seleccionadas en base a su morfología colonial procedentes de los aislamientos de las muestras de plantas, suelos y aguas en el Saladar de El Margen.....	109
Tabla 5. Caracterización de la actividad promotora del crecimiento vegetal in vitro de las cepas seleccionadas	110
Tabla 6. Rango de tolerancia salina y concentración óptima de crecimiento de las cepas bacterianas.	111
Tabla 7. Bacterización de semillas de tomate con las distintas cepas.....	113
Tabla 8. Variación del crecimiento y desarrollo de plantas de tomate tratadas con las cepas bacterianas mediante irrigación radicular y mediante la combinación biopriming+irrigación	116
Tabla 9. Determinación de la actividad <i>quorum quenching</i> empleando AHLs sintéticas.....	117
Tabla 10. Identificación taxonómica de las cepas basada en la secuencia del gen ARNr 16S.	118
Tabla 11. Actividad antibacteriana de las cepas QQ mediante ensayo de difusión en pocillo frente a los principales fitopatógenos.....	122
Tabla 12. Recuentos de epífitos del ensayo de colonización de las raíces de tomate	141
Tabla 13. Caracterización fenotípica de los cocultivos entre las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 con los distintos fitopatógenos.	168
Tabla 14. Análisis de la virulencia de <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 en plantas de tomate irrigadas previamente con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 y tras la pulverización de los cocultivos entre cada una de las cepas y el patógeno.....	206
Tabla 15. Enzimas y transportadores relacionados con la tolerancia a estrés hídrico localizados en el genoma de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.	217
Tabla 16. Evaluación de la colonización de las raíces de plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 0 tras la inoculación con las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6.....	220

Índice Anexo

Figura S1. Análisis de K-medias de los resultados del análisis de compuestos de metabolismo central en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato (Pst) por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en plantas de tomate	292
Figura S2. Análisis de K-medias de los resultados del análisis de compuestos redox en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato (Pst) por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en plantas de tomate	292
Figura S3. Análisis de K-medias de los resultados del análisis de fitohormonas en el biocontrol del patógeno <i>P. syringae</i> pv. tomato (Pst) por parte de las cepas <i>S. equorum</i> EN21, <i>P. castrilensis</i> N3 y <i>P. segetis</i> P6 en plantas de tomate	293

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indolacético
Ap	Ampicilina
Asc	Ascorbato total
AscA	Ascorbato reducido
Cm	Cloranfenicol
DHA	Dihidroascorbato
ERA	Exudados radiculares artificiales
GA3	Ácido giberélico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFP	Proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
Gm	Gentamicina
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
ISR	Resistencia sistémica inducida
JA	Ácido jasmónico
Km	Kanamicina
LB	Luria-Bertani
MeJa	Metiljasmonato
NAD⁺	Nicotín adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP⁺	Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
p/v	Relación peso/volumen
PEG	Polietilenglicol
PGP	Promoción del crecimiento vegetal (Plant growth promoting)
QQ	Quorum quenching
QS	Quorum sensing
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
TSA	Agar de triptona y soja
TSB	Caldo de triptona y soja
UFC	Unidades formadoras de colonias
v/v	Relación volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido

Resumen

La industria agrícola está alcanzando una situación límite debido al desproporcionado uso de fertilizantes y pesticidas químicos para aumentar la producción y combatir los fitopatógenos. Además, los desafíos del cambio climático generan un entorno hostil para los cultivos por el incremento de temperatura, de salinidad en el suelo o la sequía.

Numerosos estudios han demostrado los beneficios del uso de bacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal (PGP) en la agricultura en condiciones de estrés biótico y abiótico. Por otra parte, existe una evidencia experimental de que los sistemas de comunicación *quorum sensing* (QS) están muy extendidos entre los microorganismos procariontes, y las moléculas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) controlan numerosos factores de virulencia en ellos. En las últimas décadas, han sido numerosos los esfuerzos para reducir el uso de fertilizantes químicos y antimicrobianos en los campos de cultivo con el fin de evitar la salinización de los suelos y la aparición de resistencias. Una alternativa a estos nocivos métodos podría ser el uso de cepas bacterianas que combinen la actividad promotora del crecimiento vegetal y la interferencia en la virulencia de fitopatógenos mediante *quorum quenching* (QQ). Con este propósito, se realizó un muestreo en el Saladar de El Margen (Granada), para conseguir aislar cepas que, además de tener la capacidad de resistir las condiciones climáticas adversas como la salinidad o la sequía, cumplan con estas dos características.

En primer lugar, el muestreo en plantas, suelos y aguas del Saladar, un ambiente hipersalino y semiárido tuvo como resultado el aislamiento de 320 cepas en base a su morfología colonial. Estas junto con otras 71 cepas previamente aisladas por el grupo BIO 188 de ambientes salinos conformaron la colección de cepas de estudio de esta tesis doctoral. Tras un cribado inicial *in vitro* de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal en 391 cepas, se seleccionaron 14 por su elevado potencial PGP que además demostraron una gran tolerancia a la salinidad. Los ensayos de promoción del crecimiento *in vivo* mostraron la capacidad de algunas de actuar positivamente sobre la germinación y el vigor de semillas de tomate, así como en el crecimiento y el desarrollo de la planta. Algunas exhibieron capacidad de interferir en los sistemas QS mediante una elevada versatilidad en la degradación enzimática de AHLs sintéticas. El análisis taxonómico permitió identificarlas como miembros de los géneros *Bacillus*, *Cobetia*, *Paenibacillus*, *Peribacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacillus* y *Staphylococcus*, siendo tres de ellas nuevas especies, *Psychrobacillus vulpis* Z8^T (Rodríguez et al., 2019), *Paenibacillus lutrae* N10^T (Rodríguez et al., 2019) y *Peribacillus castrilensis* N3^T (artículo en preparación).

En base a su potencial PGP y a su actividad QQ *in vitro*, se seleccionaron 3 cepas: *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 y *Pseudomonas segetis* P6, todas ellas aisladas de la rizosfera de la planta halófila *Salicornia hispánica*.

Se determinó la interacción planta-microorganismo a través del estudio de la movilidad, la quimiotaxis a ácido γ -aminobutírico (GABA) y exudados radiculares de plantas, así como la formación de *biofilm* y la producción de exopolisacáridos, todos ellos factores asociados a la colonización radicular de las plantas. Se demostró una movilidad de tipo *swimming* y *swarming* en la cepa *P. castrilensis* N3 y de tipo *swimming*, *swarming* y *twitching* en la cepa *P. segetis* P6. Todas mostraron atracción hacia los distintos compuestos y exudados de plantas ensayados, así como capacidad de formar *biofilm* en distintas condiciones de cultivo con o sin suplementación de exudados de plantas como inductores de la formación de estas biopelículas. Únicamente la cepa *P. segetis* P6 fue capaz de producir exopolisacárido. Estos resultados fueron confirmados mediante el

análisis de genes asociados con la movilidad, la quimiotaxis y la producción de exopolisacáridos. Un ensayo de colonización radicular *in vitro* en plantas de tomate finalmente confirmó que estas cepas realizan una colonización eficiente de la raíz de la planta.

Mediante un primer ensayo *in vivo* en plantas de tomate se demostró un incremento en el peso de la parte aérea y radicular, así como un elevado desarrollo de su arquitectura radicular. Estos efectos positivos son consecuencia de varios factores: un claro impacto en el metabolismo del nitrógeno de las plantas asociado a un aumento de aminoácidos y proteínas la ausencia de estrés en la planta, a un incremento de la actividad de enzimas relacionadas con la fijación de CO₂ y la asimilación de amonio, y al notable incremento de la concentración de ácido indolacético en las plantas tratadas con las tres cepas, todo ello sin causar estados de estrés en la planta.

En relación con la actividad frente a fitopatógenos las tres cepas degradaron las AHL de *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, lo que se tradujo en la interferencia de determinados rasgos fenotípicos que podrían afectar a su virulencia, como son la movilidad o la actividad enzimática. Se identificaron una enzima de tipo lactonasa en la cepa *S. equorum* EN21, dos enzimas de tipo acilasa en la cepa *P. segetis* P6 y una enzima de cada tipo en la cepa *P. castrilensis* N3, mostrando todas ellas homología con otras enzimas QQ previamente descritas. Estos hallazgos se confirmaron posteriormente por HPLC-MS y mediante el análisis genómico y estructural. En el caso de las acilasas de la cepa *P. segetis* P6 la actividad fue confirmada mediante una expresión heteróloga en *E. coli* DH5α.

Los resultados de la inhibición de la virulencia en patatas, peras y zanahorias señalaron la capacidad de *P. segetis* P6 de inhibir completamente la virulencia de los fitopatógenos ensayados, Por el contrario, *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 dieron lugar a un control parcial de la infección, salvo en el caso de esta última que inhibió totalmente la sintomatología producida por *D. solani*. Con respecto a los ensayos de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. *tomato* en plantas de tomate, todas las cepas redujeron la incidencia y la severidad de la infección e incrementaron la biomasa y la clorofila. El análisis de metabolitos primarios y de compuestos redox, de la actividad enzimática y del perfil de fitohormonas, justificó estas propiedades.

Por último, se analizó el papel de estas cepas en el crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés abiótico, en concreto, estrés hídrico y se observaron indicios de la capacidad de estas cepas para promover el crecimiento de las plantas de *A. thaliana* en condiciones de sequía al observar un incremento de la biomasa aérea y radicular con respecto a las plantas control.

A la luz de nuestros resultados podemos afirmar que los ambientes salinos y áridos constituyen una fuente poco explorada de microorganismos con propiedades interesantes en la industria agrícola constituyendo una alternativa eficaz, segura y respetuosa al uso de fertilizantes y pesticidas químicos en los campos de cultivo.

Summary

Agricultural industry is reaching a limit situation due to the disproportionate use of chemical fertilizers and pesticides to increase production and fight phytopathogens. In addition, the challenges of climate change generate a hostile environment for crops by the increase in temperature, soil salinity or drought.

Numerous studies have shown the benefits of using bacteria with plant growth promoting activity (PGP) in agriculture under biotic and abiotic stress. Moreover, there is experimental evidence that quorum sensing (QS) communication systems are widespread among prokaryotic microorganisms, and N-acylhomoserine lactones (AHLs) molecules control numerous virulence factors in them. In recent decades, there have been numerous efforts to reduce the use of chemical and antimicrobial fertilizers in crop fields in order to prevent soil salinization and resistance emergence. An alternative to these harmful methods could be represented by the use of bacterial strains which combine plant growth promoting activity with the interference in the pathogens virulence by quorum quenching (QQ). For this purpose, samples were taken from the Saladar de El Margen (Granada), to isolate strains which possess the ability to resist adverse climatic conditions such as salinity or drought, while meet these two characteristics.

First, sampling in plants, soil and water from the Saladar, a hypersaline and semi-arid environment resulted in the isolation of 320 strains based on their colonial morphology. These, together with 71 strains previously isolated by the BIO 188 group from saline environments made up the collection of study strains of this doctoral thesis. After an initial in vitro screening of characteristics related with plant growth promotion in 391 strains, 14 were selected for their high PGP potential which also demonstrated a high tolerance to salinity. In vivo growth promotion assays showed the ability of some to act positively on the germination and vigour of tomato seeds, as well as in the growth and development of the plant. Some of them exhibited the ability to interfere with QS systems through high versatility of synthetic AHL enzymatic degradation. Taxonomic analysis allowed us to identify them as members of the genera *Bacillus*, *Cobetia*, *Paenibacillus*, *Peribacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacillus* and *Staphylococcus*, three of them constituting new species, *Psychrobacillus vulpis* Z8^T (Rodríguez et al., 2019), *Paenibacillus lutrae* N10^T (Rodríguez et al., 2019) and *Peribacillus castrilensis* N3^T (article in preparation).

Based on their in vitro PGP potential and QQ activity, 3 strains were selected: *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 and *Pseudomonas segetis* P6, all of them isolated from the rhizosphere of the halophilic plant *Salicornia hispanica*.

Plant-microorganism interaction was determined through the study of motility, chemotaxis to γ -aminobutyric acid (GABA) and root exudates, as well as the formation of biofilm and the production of exopolysaccharides, all factors associated with plant root colonization. Swimming and swarming motility was demonstrated in *P. castrilensis* N3 and swimming, swarming and twitching in the *P. segetis* P6. All showed attraction to the different compounds and plant root exudates tested, as well as the ability to form biofilm in different growing conditions with or without supplementation of plant exudates, as inducers of the formation of these biofilms. By contrast, only *P. segetis* P6 was able to produce exopolysaccharide. These results were confirmed by genome mining of genes associated with motility, chemotaxis, and exopolysaccharide production. An in vitro root colonization trial on tomato plants finally confirmed that these strains perform efficient colonization of the plant's root.

A first in vivo test in tomato plants demonstrated an increase in the weight of the aerial and root part, as well as a high development of its root architecture. These positive effects are the result of several

factors: a clear impact on the nitrogen metabolism of plants related with an increase in amino acids and proteins, an increase in the activity of enzymes related to CO₂ fixation and ammonium assimilation, and the notable increase in indoleacetic acid concentration in plants treated with these three strains, all this without causing states of stress in the plant.

In relation to the activity against phytopathogens the three strains degraded *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato AHLs, which translates into the interference of certain phenotypic traits that could affect their virulence, such as motility or enzymatic activity. A lactonase-type enzyme was identified in *S. equorum* EN21, two acylase-type enzymes in *P. segetis* P6 and one enzyme of each type in *P. castrilensis* N3, all of which showed homology with other previously described QQ enzymes. These findings were subsequently confirmed by HPLC-MS and by genomic and structural analysis. In the case of acylases of *P. segetis* P6, the activity was confirmed by a heterologous expression in *E. coli* DH5 α .

Results from the interference of virulence assays in potatoes, pears and carrots indicated the ability of *P. segetis* P6 to completely inhibit the virulence of the tested phytopathogens. By contrast, *S. equorum* EN21 and *P. castrilensis* N3 resulted in a partial control of the infection, except for the last strain which totally inhibited the symptomatology produced by *D. solani*. Regarding the interference tests on *P. syringae* pv. tomato pathogenicity in tomato plants, all strains reduced the incidence and severity of infection and increased plant biomass and chlorophyll content. An analysis of primary metabolites and redox compounds, enzymatic activity and phytohormone profiling, justified these properties.

Finally, the role of these strains on growth promotion under abiotic stress, in particular drought stress, was analysed and we detected clues of the ability of these strains to promote the growth of *A. thaliana* plants under drought conditions, what was associated with an increase in aerial and root biomass with respect to the control plants.

Summarizing our results, we can affirm that saline and arid environments constitute an unexplored source of microorganisms with interesting properties for the agricultural industry constituting an effective, safe and eco-friendly alternative to the use of chemical fertilizers and pesticides in crop fields.

Introducción

1. La Revolución Verde 2.0 o la Bio-Revolución

A mediados del siglo XX, la agricultura experimentó una gran revolución a nivel mundial que permitió incrementar la producción vegetal y proveer de alimentos a una población que mostraba un elevado crecimiento en un espacio muy corto de tiempo, a la vez que el excedente de la producción se convirtió en un producto de mercado. Esta se conoció como “la Revolución Verde” y fue posible gracias a la implementación de nuevas técnicas de riego, de cultivo basadas en el uso de insumos químicos (fertilizantes, pesticidas y herbicidas) y en la mejora y selección de las variedades de las plantas empleadas en los campos de cultivo, especialmente de maíz, trigo y arroz (Backer et al., 2018). Esto ha hecho que la producción de vegetales, frutas, y raíces y tubérculos alcancen valores de 1088,8; 1020,2 y 832,1 millones de toneladas en el año 2018, respectivamente (FAO, 2020).

A pesar de los beneficios y avances que generó esta revolución, el cultivo intensivo, junto al uso indiscriminado de fertilizantes y pesticidas de origen químico han provocado una severa degradación del suelo de cultivo por salinización y acidificación de éste, una elevada contaminación de las aguas subterráneas, así como una intensa pérdida de biodiversidad de la microbiota presente en el suelo y la aparición o selección de cepas resistentes (Mishra et al., 2020; Van Vu et al., 2019). Actualmente, el uso de estos insumos está alcanzando niveles límite con un consumo anual de 188,2 y 4,12 millones de toneladas de fertilizantes y de pesticidas, respectivamente, en una superficie de 4826,6 millones de hectáreas a nivel mundial (Fig. 1) (FAO, 2020). A causa de esto, a mediados de la primera década del siglo XXI se produjo una desaceleración en la producción de alimentos de origen vegetal con respecto al constante crecimiento de la población, que se estima que alcanzará los 9.800 millones de habitantes en el año 2050, lo que unido a los desafíos que plantea el cambio climático (salinización, sequía y desertificación, erosión y disminución del terreno de cultivo por un incremento del nivel del mar) suponen un nuevo reto para la industria agrícola en las próximas décadas, haciendo necesaria una nueva revolución (Benbi, 2017; Pingali, 2012).

Si bien la industria apuesta por una segunda revolución basada en la modificación o edición genética de las especies de cultivo para aumentar su productividad y/o su resistencia a los fitopatógenos, esta tecnología es aún incipiente y afronta férreas restricciones legislativas, especialmente en la Unión Europea, por lo que no constituye una posible solución a corto plazo (Ledford, 2019; Mallapaty, 2019). En cambio, hace décadas que se inició el estudio de ciertos microorganismos que actúan como bioestimulantes y agentes de biocontrol en los campos de cultivo y que se conocen como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM, *Plant Growth Promoting Microorganisms*). Estos constituyen una excelente alternativa al uso de fertilizantes y pesticidas de origen químico, y llevan décadas empleándose en la agricultura orgánica, aunque esta únicamente constituye el 1% del total en la actualidad. Es por ello que muchos autores apuestan por estos microorganismos como los protagonistas de la segunda revolución en la industria agrícola, ya conocida como “la Revolución Verde 2.0” o “la Bio-Revolución” (Timmusk et al., 2017; Vacheron et al., 2015; Zaidi et al., 2019).

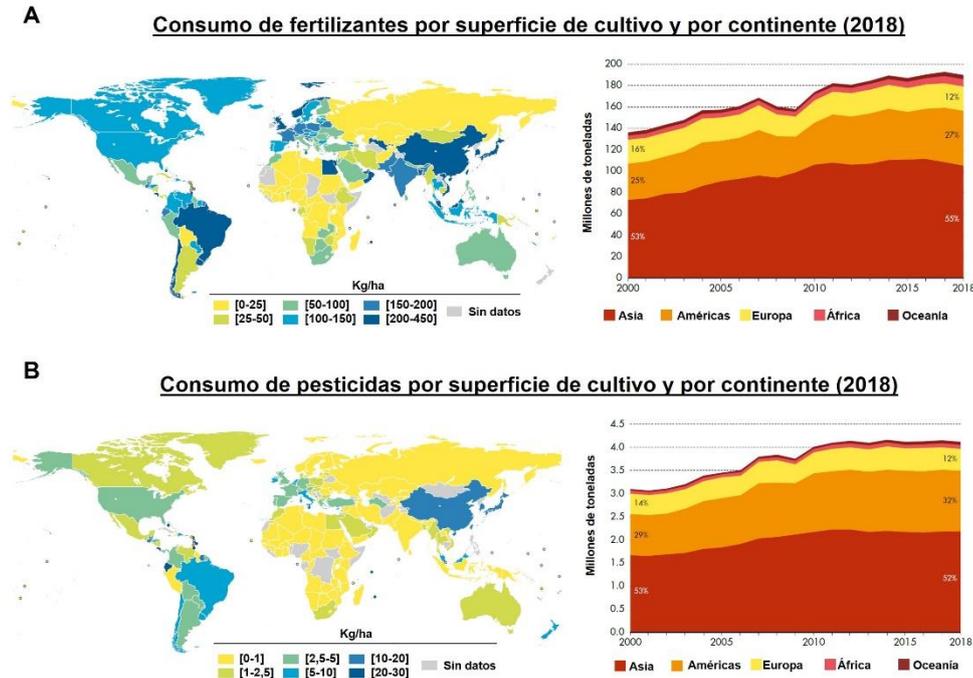


Figura 1. Consumo de fertilizantes (A) y de pesticidas (B) expresado según los distintos países en el año 2018 (izquierda) y de manera global en cada continente desde el inicio del siglo XXI (derecha). Los gráficos indican el aporte de cada continente al consumo total y se expresa en porcentaje. Imágenes y gráficos adaptados de FAO, 2020.

2. La rizosfera y los microorganismos rizosféricos

En las últimas décadas, cada vez son más los estudios que analizan la implicación de la microbiota presente en los campos de cultivo en la productividad y salud de las plantas, especialmente en la zona influenciada por los exudados de las raíces de las plantas, lo que se conoce como rizosfera (Hartmann et al., 2009). La rizosfera es la porción de tierra adyacente a las raíces y cuya composición se ve afectada por la liberación de exudados ricos en azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y enzimas que secretan estas (Badri et al., 2009). En este ambiente, las bacterias son los microorganismos predominantes. Así, por cada gramo de suelo se estiman valores de $10^8 - 10^9$ bacterias, $10^6 - 10^8$ arqueas, $10^7 - 10^8$ actinomicetos, $10^5 - 10^6$ hongos, $10^3 - 10^5$ algas, $10^3 - 10^5$ protozoos y 10 nematodos (Rughöft et al., 2016). Además de ser las más abundantes, su diversidad metabólica y su capacidad para usar distintos sustratos como fuentes de energía, hacen de las bacterias unos interesantes aliados para las plantas. Así, se han denominado bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria*) a aquellas cepas que tienen un impacto positivo en el crecimiento, la productividad y/o en la resistencia a enfermedades de las plantas y condiciones ambientales adversas (Prasad et al., 2019). En respuesta a esto, se estima que las plantas invierten un 20% del carbono fijado en el mantenimiento de la microbiota rizosférica mediante la liberación de exudados (Philippot et al., 2013; Stringlis et al., 2018).

Multitud de estudios han demostrado la actividad PGP de cepas pertenecientes principalmente a los géneros *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Khatoon et al., 2020). Estas cepas ejercen sus efectos beneficiosos mediante mecanismos directos e indirectos (Fig. 2). Entre los primeros se encuentra la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas o de la enzima ácido 1-aminociclopropanoico (ACC) desaminasa, mientras que los mecanismos indirectos están relacionados con la producción de sideróforos, de

enzimas líticas, la inducción de la resistencia sistémica de la planta o el biocontrol de patógenos (Ahmad et al., 2008; Bharti et al., 2016; Weyens et al., 2009).

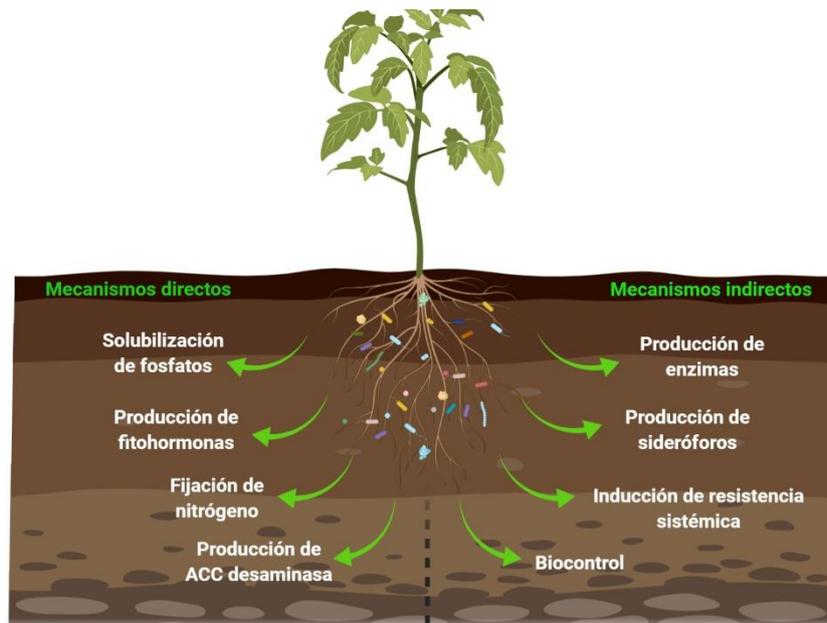


Figura 2. Actividad promotora del crecimiento vegetal ejercida por cepas bacterianas mediante mecanismos directos e indirectos. ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

2.1 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es imprescindible para la síntesis de una elevada diversidad de biomoléculas y juega un papel importante en diversos procesos fisiológicos de las plantas (Leghari et al., 2016). Según las estimaciones, la cantidad de nitrógeno total de la geosfera es de 10^{17} toneladas. Sin embargo, sólo el 2% puede ser utilizado directamente por las plantas, ya que estas pueden asimilarlo en forma de nitrato y amonio, principalmente, y menos común, en forma de aminoácidos, oligopéptidos, nucleótidos o urea (Stevens, 2019; Subba Rao et al., 2017). En cambio, la disponibilidad de nitrógeno aumenta considerablemente cuando interviene la actividad microbiana a través de tres procesos: mineralización, nitrificación y fijación (Kemmitt et al., 2008).

La fijación de nitrógeno gaseoso (N_2) es el mecanismo más frecuente y relevante en el dominio *Bacteria*. Los microorganismos diazotrofos son aquellos que llevan a cabo esta fijación basada en la transformación del nitrógeno en dos moléculas de amonio, y su posterior reducción a amonio, mediante la actividad de la enzima nitrogenasa.

Las bacterias diazotrofas se clasifican en dos grandes grupos: simbióticas y de vida libre. Las primeras se caracterizan por la formación de estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno y están principalmente representadas por especies de la familia *Rhizobiaceae* asociadas a plantas leguminosas, así como especies de los géneros *Azospirillum*, *Azoarcus* y *Herbaspirillum* asociadas a cereales, y especies del género *Frankia*, simbióticas de ciertas dicotiledóneas (Andrews & Andrews, 2017). Por otra parte, se encuentran los diazotrofos de vida libre, descritos principalmente como miembros de los géneros *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Streptomyces* (Santoyo et al., 2021).

2.2 Solubilización de fósforo

El fósforo es un elemento indispensable para el crecimiento y desarrollo vegetal que está implicado en la mayoría de los procesos metabólicos como son la fotosíntesis, la respiración o la síntesis de macromoléculas (Khan et al., 2010). Además, interviene en la resistencia a enfermedades, influye en la floración y en la maduración de semillas, y estimula el desarrollo del sistema radicular (Heydari et al., 2019).

Si bien el fósforo es un elemento muy abundante en el suelo, entre el 95% y el 99% se encuentra en forma insoluble, mientras que el restante se halla en forma de ortofosfato, siendo fácilmente asimilable por las plantas (Alori et al., 2017). Entre las formas insolubles, se distinguen dos tipos de fósforo: su forma inorgánica (Pi), que corresponde al 35-70% del fósforo insoluble total, y se encuentra como fosfato di y tricálcico e hidroxapatita, formando parte de las rocas sedimentarias, ígneas y metamórficas (Guignard et al., 2017). El restante se presenta como fósforo orgánico (Po) representado principalmente por el ácido fítico (Tang et al., 2018; Tiessen, 2008).

Diversas cepas PGP han demostrado su capacidad para aumentar la biodisponibilidad del fósforo presente en el suelo mediante dos mecanismos:

- Solubilización química
Se trata de un proceso que afecta a las formas inorgánicas de fósforo y está mediado por la excreción de ácidos orgánicos producidos por el metabolismo bacteriano, principalmente el ácido glucónico, aunque también son importantes el ácido láctico, isovalérico, acético, succínico, cítrico u oxálico (Naraian & Kumari, 2017). Estos ácidos promueven el intercambio de los cationes presentes en el fosfato por protones, transformándolos en compuesto solubles. Esta solubilización se ha descrito en diversas especies PGP de los géneros *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cladosporium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* (de Boer et al., 2019).
- Solubilización enzimática
La solubilización enzimática, también conocida como mineralización, es una forma de solubilización mediada por enzimas bacterianas y que afecta a los complejos orgánicos de fósforo presentes en el suelo. Estas enzimas catalizan la conversión de esos complejos en formas de fósforo inorgánico mediante hidrólisis. Entre ellas destacan las fosfatasas no específicas (ácida y alcalina), la fitasa, cuyo sustrato es el ácido fítico, y las fosfonatasas y C-P liasas, que actúan sobre los fosfonatos (Alori et al., 2017; Sharma et al., 2012). Esta solubilización se ha descrito en numerosas especies PGP de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Phyllobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* y *Serratia* (Farias et al., 2018; M. Kumar et al., 2016; Safdarian et al., 2019).

2.3 Producción de sideróforos

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y un metal esencial en las plantas puesto que interviene en la síntesis de la clorofila y del ADN, forma parte de diversas enzimas e interviene en el cloroplasto a nivel estructural y funcional. En cambio, es difícilmente asimilable por las plantas puesto que, en presencia de oxígeno se encuentra como ion férrico (Fe⁺³) formando parte de

hidróxidos ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) y de oxohidróxidos ($\text{FeO}(\text{OH})$), compuestos altamente insolubles (Hider & Kong, 2010; Rout & Sahoo, 2015; D.-J. Zhang et al., 2018).

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (200-2000 Da) que contienen grupos hidroxilo y/o carbonilo capaces de quelar el ion férrico con una elevada afinidad. Posteriormente estos complejos sideróforo- Fe^{+3} son interiorizados en la célula mediante un complejo sistema de transporte activo. Aunque algunas gramíneas producen y excretan fitosideróforos derivados del ácido muginéico (Masuda et al., 2019), existe una elevada diversidad de cepas PGP con la capacidad para producir estas macromoléculas. Estas cepas pertenecen a los géneros *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*, principalmente (Ali & Vidhale, 2013; Hesse et al., 2018; Pahari et al., 2017).

Adicionalmente, la producción de estos sideróforos por parte de las cepas PGP también está implicada en la competición con otros microorganismos presentes en el suelo por un elemento indispensable como es el hierro, constituyendo así un método de biocontrol de patógenos (Kour et al., 2019).

2.4 Producción de fitohormonas

Otro de los mecanismos por los cuales las bacterias promotoras del crecimiento vegetal interactúan con las plantas es mediante la síntesis de fitohormonas y sus análogos estructurales que promueven el crecimiento de las plantas y/o su tolerancia a estrés biótico y abiótico (Fig. 3) (Cassán et al., 2014; Shigenaga & Argueso, 2016). En base a su estructura y funciones en la planta, las fitohormonas se clasifican en cinco grupos clásicos: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. Esta clasificación se ha ampliado en las últimas décadas con la incorporación de brasinoesteroides, jasmonatos, ácido salicílico y estrigolactonas (Lau & Deng, 2010; Tran & Pal, 2014). Entre ellas, cuatro son producidas por las bacterias PGP: auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido abscísico.

Auxinas

Las auxinas son una familia de moléculas derivadas del triptófano que desempeñan funciones en diversos procesos fisiológicos de la planta, como la elongación celular, la división y procesos de diferenciación, promoviendo el crecimiento de la planta con especial incidencia en la raíz y en la arquitectura de esta, incrementando la formación de pelos radicales (Nascimento et al., 2020; F. Zhang et al., 2018). Entre los compuestos que forman esta familia, el ácido indolacético (AIA) es el más representativo y se estima que el 80% de las bacterias PGP tiene la capacidad de sintetizar esta fitohormona (Kim et al., 2011; Spaepen & Vanderleyden, 2011; Spaepen et al., 2007). Entre ellas, esta producción se ha descrito en cepas de los géneros *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* (Eida et al., 2018; Saad et al., 2020; Tabassum et al., 2017; Tsolakidou et al., 2019).

Giberelinas

Las giberelinas son un grupo de hormonas involucradas en diversos procesos relacionados con el desarrollo y el crecimiento de la planta tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés (Goswami et al., 2016). Intervienen en la germinación de semillas, la floración, el crecimiento del tallo y la maduración de frutos (Martins et al., 2019). En condiciones de estrés estas hormonas regulan los niveles de antioxidantes y la peroxidación de lípidos de membrana. La producción de estas hormonas está más restringida y se detectó en cepas PGP de los géneros *Acetobacter*,

Azospirillum, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum* (Nagel et al., 2018; Nett, Contreras, et al., 2017; Nett, Montanares, et al., 2017).

Citoquininas

Las citoquininas son hormonas producidas por cepas PGP que promueven el crecimiento de la planta interviniendo en la división celular, el retraso de la senescencia y el crecimiento de las hojas y las raíces, así como en la respuesta a condiciones de estrés abiótico (Zürcher & Müller, 2016). Por ello, la producción y liberación de estas fitohormonas a la rizosfera por cepas de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Stenotrophomonas*, favorece el crecimiento de las plantas afectadas (Glick, 2012; Naz et al., 2009; Park et al., 2017; Selvakumar et al., 2018).

Ácido abscísico

Por último, el ácido abscísico interviene en la inhibición de la germinación de semillas, induce estados de senescencia y la abscisión de hojas y frutos. A pesar de sus efectos negativos en el crecimiento de la planta, juega un papel fundamental en la tolerancia al estrés abiótico mediante la activación de mecanismos que promueven la tolerancia al estrés, siendo el más importante el cierre estomático. Por ello, las cepas capaces de producir esta hormona suponen un interesante aliado en ambientes y condiciones hostiles (Munemasa et al., 2015; Sah et al., 2016). La producción de estas hormonas por bacterias PGP es relativamente escasa y se ha detectado en cepas de los géneros *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Cohen et al., 2015; Egamberdieva et al., 2017; Park et al., 2017; Tiwari et al., 2016).

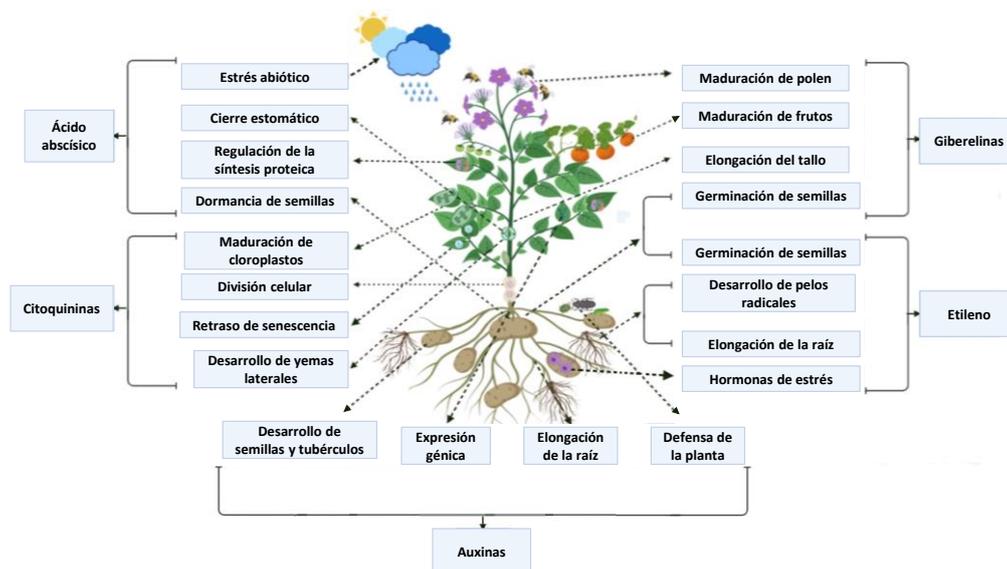


Figura 3. Hormonas vegetales y sus funciones en la planta. Imagen adaptada de Kathoon et al. (2020).

2.5 Producción de ACC desaminasa

El etileno, una de las cinco hormonas clásicas, promueve el crecimiento en las plantas interviniendo en procesos como la germinación de semillas y el desarrollo de las raíces (Fig. 3) (Hassan et al., 2017). Sin embargo, también ejerce un papel muy importante en condiciones de estrés biótico y abiótico, en las que su concentración se ve incrementada originando efectos negativos en la planta como la inhibición de la elongación radicular o la defoliación, dando lugar a un estado de senescencia en la planta (Bhattacharyya & Jha, 2012; Brijesh Singh et al., 2019; Hassan et al., 2017). La síntesis de esta

hormonas se lleva a cabo a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), sustrato que difunde a la rizosfera a través de las raíces. Es ahí donde ciertas cepas bacterianas con la capacidad de producir la enzima ACC desaminasa degradan este compuesto a α -cetobutirato y amonio, reduciendo así la producción de etileno y constituyendo una fuente de carbono y nitrógeno en la rizosfera (Glick et al., 1998; Orozco-Mosqueda et al., 2020). Esta actividad ha sido descrita en multitud de géneros como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Serratia* (Acuña et al., 2019; Barnawal et al., 2014; Duan et al., 2013; Lee et al., 2020; Orozco-Mosqueda et al., 2020) y es especialmente relevante en situaciones de estrés biótico y abiótico, pues permiten a la planta desarrollarse reduciendo el impacto del etileno.

2.6 Producción de enzimas hidrolíticas

La producción de enzimas hidrolíticas que exhiben ciertas bacterias PGP es un recurso valioso en la rizosfera como mecanismo de supervivencia, así como en las interacciones planta-microorganismo dentro de los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal. Así, la producción de enzimas como amilasa, celulasa, lecitinasa, lipasa, pectinasa, proteasa y quitinasa aumentan la capacidad de las bacterias PGP para utilizar diversos sustratos presentes en los exudados de la planta y detritos celulares, empleándolos como fuente de energía, lo que favorece su establecimiento en la rizosfera (Behera et al., 2017). Por otra parte, la producción de estas enzimas por las cepas PGP otorga una ventaja en la competición por la colonización de la rizosfera y promueven el crecimiento de la planta mediante el biocontrol de fitopatógenos fúngicos y bacterianos (Oleńska et al., 2020; Siqueira et al., 2020). Esta actividad es especialmente abundante y diversa en especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Arora et al., 2008; Kumar et al., 2010), aunque también cepas de los géneros *Azospirillum*, *Frankia*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Serratia* o *Yersinia* han demostrado tener actividad en este aspecto (Compant et al., 2019; Expósito et al., 2017; Schlatter et al., 2017).

2.7 Biocontrol

A parte de la producción de sideróforos y enzimas líticas, entre los mecanismos implicados en la competencia con otros microorganismos presentes en la rizosfera, ciertas bacterias PGP sintetizan compuestos antimicrobianos que les permiten establecerse en la rizosfera desplazando a otros competidores (Fira et al., 2018). Entre los compuestos con actividad antagonista sintetizados por las bacterias PGP se encuentran los antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas, biosurfactantes, cianuro de hidrógeno (HCN) y compuestos orgánicos volátiles (COVs) (H. Wang et al., 2021). En este ámbito predominan especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* con la producción de un amplio repertorio de compuestos de todos los grupos descritos (Huang et al., 2018; Mazurier et al., 2009; Rai et al., 2017; Ramette et al., 2011; Upadhyay & Srivastava, 2011; Xu et al., 2013).

2.8 Colonización del tejido vegetal

Como se indicó previamente, la rizosfera constituye un entorno rico en azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y proteínas generado por la liberación de exudados por parte de las raíces de las plantas (Badri et al., 2009). Esta región alberga alrededor de 10^{11} células microbianas por gramo, pertenecientes a más de 30.000 especies bacterianas distintas (Mendes et al., 2011). Si bien no existe un consenso sobre la necesidad de que las cepas colonicen la planta para ser consideradas PGP, este

fenómeno favorece el establecimiento de una relación más estrecha y persistente entre la planta y la bacteria. En base a la bibliografía existente, la colonización radicular depende de la movilidad de las cepas, la quimiotaxis a compuestos presentes en los exudados radiculares y la formación de *biofilms* y la producción de exopolisacáridos (Al-Ali et al., 2018; Allard-Massicotte et al., 2016; Fan et al., 2018).

Movilidad y quimiotaxis

Para sobrevivir y prosperar en la rizosfera, las rizobacterias necesitan moverse en gradientes químicos hacia lugares donde su metabolismo es óptimo. Por su parte, los exudados de las raíces difieren en cantidad y composición que dependen de diferentes factores, como la especie de planta, el desarrollo de esta y las condiciones ambientales del suelo (Carvalhais et al., 2013; Chaparro et al., 2014; Kong et al., 2021; Mönchgesang et al., 2016). Así, las plantas tienen la capacidad de reclutar el microbioma de la rizosfera en función de sus necesidades mediante la liberación de compuestos atrayentes o repelentes para determinadas cepas bacterianas (Bardy et al., 2017).

La quimiotaxis es la habilidad para percibir estímulos químicos y coordinar el movimiento hacia ellos respondiendo a gradientes de concentración, una característica ampliamente descrita en bacterias (Bakker et al., 2020; Sampedro et al., 2015). En este reconocimiento juegan un papel fundamental los quimiorreceptores, representados por las proteínasceptoras de grupos metilo (MCPs, *Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins*), que actúan como receptores de membrana encargados de reconocer el estímulo y desencadenar la respuesta quimiotáctica (Feng et al., 2021; Scharf et al., 2016).

Entre los distintos tipos de movilidad descritos en las bacterias, la movilidad de tipo *swimming* ha sido la más estudiada en estas (Nakamura & Minamino, 2019). Este tipo de movilidad se produce en células independientes en medios líquidos mediante la rotación del flagelo que da lugar a un movimiento en tres dimensiones. Sin embargo, en la naturaleza, las bacterias se encuentran unidas a superficies sólidas, por lo que estas usan mecanismos de movilidad en superficies. Entre ellos destacan la movilidad de tipo *swarming*, *twitching*, *gliding* y *sliding* (Wadhwa & Berg, 2021) (Fig. 4).

La movilidad de tipo *swarming* es un tipo de movimiento en masa sobre superficies húmedas y en medios ricos mediante flagelos, y está asociada a la producción de osmolitos y/o surfactantes por parte de la bacteria que disminuyen la tensión superficial del medio favoreciendo la movilidad (Kearns, 2010; Partridge & Harshey, 2013). Otros tipos de desplazamiento en superficies están representados por la movilidad de tipo *twitching* mediado por la extensión y retracción de pili de tipo IV que permiten a la bacteria “reptar” a través de superficies (Berry & Pelicic, 2015; Maier & Wong, 2015), o la movilidad de tipo *gliding* asociada a complejos de adhesión focal que permiten a la bacteria moverse lentamente a través de la superficie (Lauber et al., 2018; Shrivastava et al., 2016). Finalmente, la movilidad de tipo *sliding* está mediada por las fuerzas de empuje que ejerce el crecimiento de la colonia desde el interior, aunque requiere la producción de surfactantes para reducir la tensión superficial (Hölscher & Kovács, 2017; Shrout, 2015).

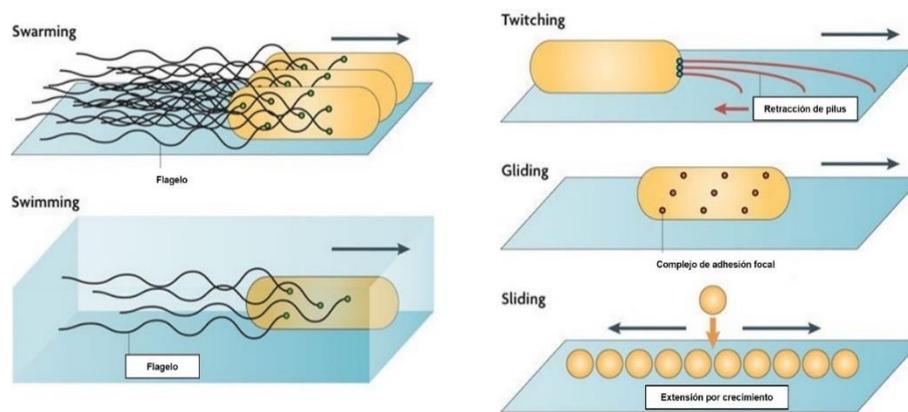


Figura 4. Principales tipos de movilidad bacteriana. Imagen adaptada de (Kearns, 2010).

Formación de *biofilm* y producción de exopolisacáridos

Una vez que las bacterias han alcanzado las raíces de las plantas guiadas por gradientes quimiotácticos de los exudados radiculares, la formación de *biofilm* en la superficie de estas favorece la colonización. El *biofilm* o biopelícula es una estructura formada por una matriz de exopolisacáridos, proteínas, lípidos y células bacterianas, que favorece la adhesión a distintas superficies (Danhorn & Fuqua, 2007; Zboralski & Fillion, 2020). Estos *biofilms* permiten establecer una relación más estrecha entre la planta y las cepas PGP, y proveen de protección a las raíces frente a diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Banerjee et al., 2019).

2.9 Promoción de la tolerancia al estrés biótico en la planta: resistencia sistémica inducida

Al igual que otros organismos, las plantas poseen sistemas inmunológicos que las protegen de distintos tipos de patógenos. Este sistema se basa en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) mediante receptores localizados en la membrana celular, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*). Así, tras el reconocimiento de estos patrones se desencadena una respuesta inmune (PTI, *PAMP-Triggered Immunity*) que da lugar a la activación de sistemas de defensa celular en la planta relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la deposición de calosa en la pared (Pieterse et al., 2014; Zehra et al., 2021).

A pesar de que este sistema es efectivo de forma inicial, muchos patógenos han desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune mediante la inhibición de los sistemas de señalización de esta o incluso impidiendo por completo su detección inicial por los PRRs (Bardoel et al., 2011; de Jonge et al., 2010).

En respuesta a esta evasión de la primera línea de defensa, las plantas activan una segunda línea que se inicia por el reconocimiento de efectores de la virulencia de los patógenos dando lugar a lo que se conoce como inmunidad desencadenada por efectores (ETI, *Effector-Triggered Immunity*) cuyo resultado es la muerte celular en la zona de infección como un mecanismo para evitar la diseminación de la infección. Por otra parte, la activación de ambas líneas de defensa a nivel local promueve la producción de compuestos mensajeros y hormonas que dan lugar a la inducción de cierto grado de resistencia en el resto de los tejidos de las plantas, lo que se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*) (Dempsey & Klessig, 2012; Dodds & Rathjen, 2010; Shores et al., 2006). Las vías de señalización en SAR están reguladas por la hormona ácido salicílico con

la consecuente activación de genes relacionados con la patogénesis (PR, *pathogenesis related*) que codifican proteínas con actividad antimicrobiana (van Loon et al., 2006). La activación de estos genes PR, a su vez está coordinada por factores transcripcionales “NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1” (NPR1) (Ton et al., 2002).

Algo parecido se ha observado en plantas expuestas a determinados microorganismos mutualistas como las bacterias y micorrizas PGP por vía radicular. Estos microorganismos son capaces de estimular una resistencia sistémica en planta denominada resistencia sistémica inducida (ISR, *Induced Systemic Resistance*) (Knoester et al., 1999; Pozo et al., 2008) Aunque los mecanismos de ambos tipos de resistencia son muy similares, la activación de la ISR se caracteriza por un incremento en los niveles de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), aunque también se han detectado ciertas interacciones microorganismo PGP-planta que cursan con la activación de la vía del ácido salicílico (SA) (Rabbee et al., 2019; Tjamos et al., 2005; Ton et al., 2002). Por otra parte, la intervención de NPR1 es un rasgo común en ambas modalidades de resistencia, aunque en el caso de la ISR no tiene como fin la producción de PR, siempre y cuando la resistencia venga mediada por la vía JA/ET (Hossain et al., 2008; Segarra et al., 2009).

La investigación de este tipo de resistencia inducida por microorganismos PGP ha determinado que no solo el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, *Microbe-Associated Molecular Patterns*) la promueve, sino también distintos compuestos producidos por estos, denominados inductores o elicitores. Los inductores son muy variados e incluyen lipopolisacáridos, AHLs, COVs, sideróforos y surfactantes (Pieterse et al., 2014).

Entre las respuestas de defensa celular que se desencadenan como consecuencia de la activación del ISR mediante PGPR, se encuentra la cascada oxidativa y la acumulación de especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂, el refuerzo de paredes celulares mediante la acumulación de depósitos de calosa, la acumulación de enzimas de defensa como la fenilalanina amonio liasa (PPA) o la polifenol oxidasa (PPO) y la producción de metabolitos secundarios como fenoles o malondialdehído (MDA) (Chowdhury et al., 2015; Nie et al., 2017).

2.10 Promoción de la tolerancia al estrés abiótico en la planta

A parte del estrés biótico que suponen las infecciones microbianas que afectan a las plantas, estas afrontan diversos desafíos en un mundo cada vez más cambiante climáticamente hablando. Entre los distintos tipos de estrés abiótico que afectan a las plantas, la sequía y la salinidad son los más frecuentes y los que más pérdidas causan en la agricultura (Santoyo et al., 2021). Ambos tipos de estrés comparten una caída en el potencial hídrico que dificulta la captación de agua en la planta y originan cambios fisiológicos y bioquímicos, desencadenando así una disminución del crecimiento y de la producción en las plantas. Entre ellos destaca la disminución de la tasa fotosintética, el cierre estomático, una disminución del contenido relativo de agua (RWC, *Relative Water Content*) y un incremento del estrés oxidativo (Noman et al., 2018).

En este aspecto, determinadas cepas PGP de los géneros *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, entre otros, han demostrado su capacidad para reducir los daños causados por el estrés osmótico mediante diversos mecanismos (Curá et al., 2017; Gururani et al., 2013; S. S. Vurukonda et al., 2016).

Por un lado, se encuentran los mecanismos de las cepas PGP relacionados con la nutrición vegetal, previamente descritos en esta sección, como la solubilización de nutrientes, la fijación de nitrógeno y la

producción de sideróforos, que promueven el crecimiento de la planta. Además, está bien descrito que las cepas PGP pueden alterar el perfil hormonal de las plantas bajo estrés mediante la producción de auxinas, ácido abscísico, citoquininas y de la enzima ACC desaminasa (Arora & Jha, 2019; S. S. K. P. Vurukonda et al., 2016). Estas modificaciones hormonales dan lugar a un incremento del crecimiento y desarrollo de las raíces que favorece una mayor superficie de absorción de nutrientes y agua (Dimkpa et al., 2009); la inducción del cierre estomático que reduce la transpiración y las pérdidas de agua (Barnawal et al., 2017; Bresson et al., 2013), así como una disminución del efecto inhibitorio que ejercen niveles elevados de etileno en el crecimiento de la planta (Saikia et al., 2018).

Por otra parte, algunas cepas PGP ejercen su efecto en la tolerancia a estrés osmótico mediante la producción de osmolitos o solutos compatibles, compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos, azúcares o alcoholes, entre los que destacan la prolina, la glicina betaína y la trehalosa (El-Shawa et al., 2020; Hafez et al., 2020). Estos compuestos incrementan su concentración en el citoplasma de las células vegetales y bacterianas como una respuesta al estrés osmótico. Sin embargo, se ha descrito que determinadas cepas PGP tienen la habilidad de sobre producir y excretar estos compuestos al medio externo para ser captados por las raíces de las plantas y mejorar su potencial hídrico (Abdelaal et al., 2020; Roychoudhury & Banerjee, 2016). Asimismo, la formación de *biofilms* y producción de exopolisacáridos por parte de estas bacterias mutualistas constituyen mecanismos implicados en la tolerancia al estrés osmótico, pues protegen a la raíz de la presión osmótica producida por la salinidad o la sequía. Además, la estructura de esos exopolisacáridos confiere una elevada capacidad para retener agua, lo que mejora la hidratación de las raíces y las protege del medio externo (Abdelaal et al., 2021; Etesami & Maheshwari, 2018; Naseem & Bano, 2014).

3. Sistemas *quorum sensing*

Los sistemas *quorum sensing* (QS) son un mecanismo de comunicación dependiente de densidad celular mediante el cual las bacterias detectan la población circundante para regular la expresión génica. Esta comunicación se lleva a cabo mediante la producción y excreción de moléculas señales o autoinductores (AI) al medio externo, de tal forma que cuando estas alcanzan una concentración determinada, se produce su reconocimiento e incorporación en la célula bacteriana promoviendo o reprimiendo la expresión de determinados genes (Fuqua et al., 1994; González & Keshavan, 2006; Jayaraman & Wood, 2008). Este sistema de detección del entorno permite a las bacterias coordinar su actividad, actuando en conjunto y reduciendo los costes derivados de activar una determinada actividad cuando el entorno no es favorable.

Este mecanismo de comunicación fue descrito por primera vez en la bacteria luminiscente *Aliivibrio fischeri* que establece una relación mutualista con el calamar hawaiano (*Euprymna scolopes*) y que tiene como resultado la expresión de la enzima luciferasa, encargada de la producción de la luminiscencia de esta bacteria (Ruby, 1996).

De manera general, estos sistemas se componen de dos genes: uno que codifica la enzima sintasa, encargada de la síntesis de las moléculas señal, y el otro es un regulador transcripcional, que actúa como receptor de las moléculas y regula la expresión de los genes diana.

Si tenemos en cuenta el sistema QS modelo de *A. fischeri*, en situaciones de baja densidad celular, la sintasa, denominada LuxI, da lugar a la producción de autoinductores que difunden a través de la membrana siguiendo gradientes de concentración. Conforme la comunidad bacteriana crece, la concentración extracelular del autoinductor se incrementa hasta alcanzar un valor límite que conduce a su reconocimiento por parte del regulador transcripcional LuxR. Seguidamente se forma un complejo AI-

LuxR que se activa e induce la expresión bidireccional del operón *lux* cuyo resultado es la síntesis de la luciferasa, enzima encargada de la producción de luminiscencia en *A. fischeri* (Fig. 5). Esta activación simultánea a ambos lados del operón no solo da lugar a la expresión de los genes implicados en la luminiscencia y la síntesis de autoinductores, sino que además amplifica la capacidad de respuesta al inducir una mayor producción de receptores LuxR (Fuqua et al., 2001).

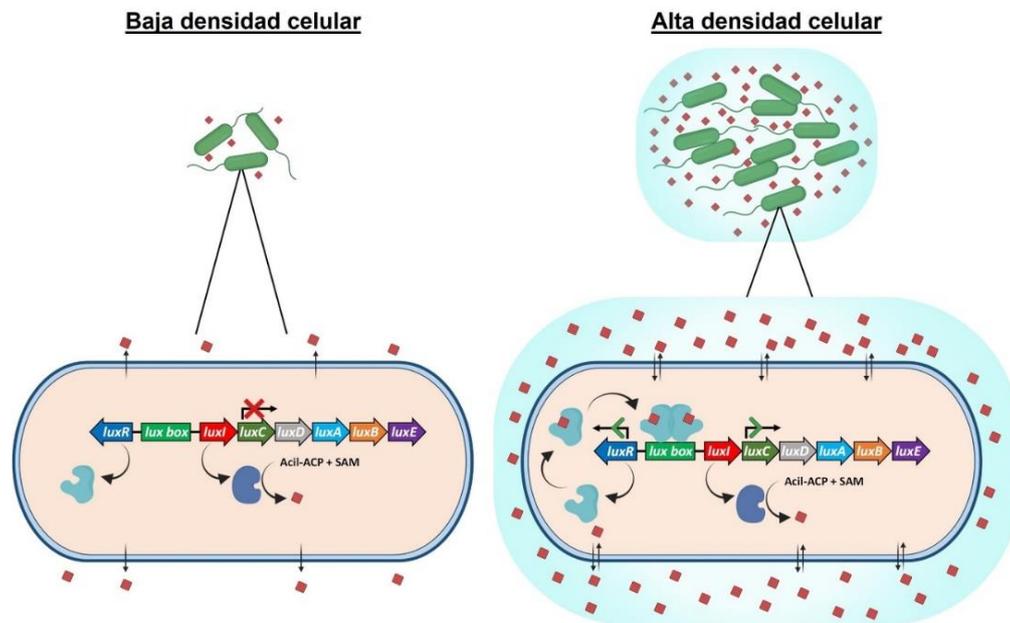


Figura 5. Sistema QS LuxI/LuxR encargado de la regulación de la expresión de luminiscencia en *A. fischeri*.

Si bien el sistema de QS de *A. fischeri* fue el primero en describirse en 1994, en las siguientes décadas la bibliografía disponible en este tema ha tenido un crecimiento exponencial, demostrando la presencia de estos sistemas en especies bacterianas que habitan nichos ecológicos muy diversos; desde patógenos humanos, vegetales y animales, así como microorganismos extremófilos, simbioses y mutualistas de distintos organismos, en los que regulan funciones como la luminiscencia, estados de competencia, movilidad, la producción de antibióticos, la formación de *biofilm* y producción de exopolisacáridos, la esporulación o la producción de factores de virulencia (Montgomery et al., 2013; Wu & Luo, 2021). Posteriormente, se detallarán las funciones que cumplen los sistemas QS de varios fitopatógenos relevantes en agricultura.

3.1 Autoinductores o moléculas señal

La investigación de los sistemas QS ha permitido la identificación de la naturaleza química de las moléculas señal. Así, en bacterias gram positivas, los péptidos autoinductores (AIP, *AutoInducer Peptides*) regulan los sistemas QS (Papenfort & Bassler, 2016) como se ha descrito en algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* o *Streptococcus* (Koul et al., 2016; Monnet et al., 2016).

En el caso de las bacterias gram negativas, las moléculas señal predominantes son de tipo *N*-acilhomoserina lactonas (AHLs), descritas en multitud de especies de los géneros *Acidithiobacillus*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Dickeya*, *Escherichia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, o *Yersinia*

(Koul et al., 2016; Schuster et al., 2013). Por otra parte, existe un “lenguaje” común en los sistemas QS de bacterias gram negativas y positivas mediado por moléculas de tipo furanosil-borato diéster (AI-2) (Chen et al., 2002). Además de estas tres familias de autoinductores ampliamente distribuidas, se ha descrito la implicación de otras muchas moléculas en los sistemas QS. Entre ellas, ácidos grasos, también conocidos como factor de señal difusible (DSF), en cepas de *Burkholderia*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* y *Xylella* (Flavier et al., 1997; L. Zhou et al., 2017), cetonas en especies de los géneros *Legionella* y *Vibrio* (Tiaden & Hilbi, 2012); o quinolonas y dicetopiperacinas en *Pseudomonas aeruginosa* (Heeb et al., 2011; Pesci et al., 1999).

Puesto que la temática de esta tesis se basa en el estudio de los sistemas QS de fitopatógenos gram negativos, nos centraremos en las moléculas de tipo AHL.

Las moléculas de tipo AHL tienen una estructura química anfipática formada por un anillo lactónico, como grupo hidrófilo, y una parte hidrófoba correspondiente a un ácido graso cuya longitud de cadena varía entre 4 y 18 átomos de carbono (Fig. 6). Esta cadena hidrocarbonada puede presentar dobles enlaces y distintos tipos de sustituciones de tipo hidroxilo u oxo, generalmente en la posición 3, que aumentan la diversidad de esta familia de moléculas señal (Fuqua et al., 2001). La síntesis de estas se lleva a cabo en el interior de la célula bacteriana mediante la actividad de la sintasa (LuxI) a partir de S-adenosil metionina (SAM) y una proteína transportadora de grupos acilo (ACP) (Fig. 6) (LaSarre & Federle, 2013). En cuanto al transporte de estas moléculas en la célula, se realiza mediante difusión pasiva a través de las membranas para aquellas moléculas con una cadena hidrocarbonada de 8 o menos átomos, mientras que las AHLs de mayor tamaño emplean un transporte activo mediante bombas de flujo (Fuqua et al., 2001; Minagawa et al., 2012).

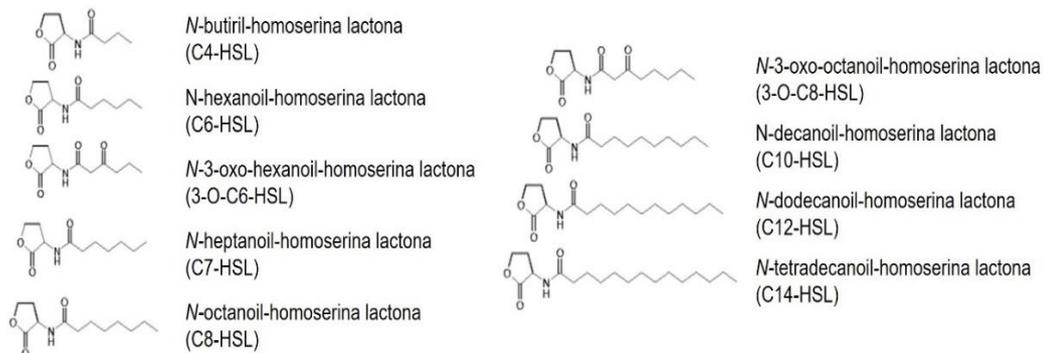


Figura 6. Estructura química de algunas AHLs con y sin sustituciones en posición 3. Imagen adaptada de (Kumari et al., 2008).

3.2 Mecanismos de interferencia en los sistemas quorum sensing

Teniendo en cuenta la ventaja competitiva que supone la expresión de determinadas funciones mediante sistemas QS, algunas bacterias han desarrollado la capacidad de interferir en estos como un mecanismo de competencia. Además, esta interferencia juega un papel importante en la autorregulación de los sistemas QS una vez que estos han cumplido su función (Koul & Kalia, 2017).

En función de la intervención o no de enzimas, la interferencia en los sistemas QS se clasifica en dos grupos: inhibición del *quorum sensing* (QSI) y degradación enzimática de autoinductores o *quorum quenching* (QQ) (Bhardwaj et al., 2013; Kalia et al., 2019).

Por su parte, se ha descrito que la interferencia de los sistemas QS puede llevarse a cabo mediante cuatro mecanismos: la inhibición de la síntesis de las moléculas señal, el secuestro de las moléculas señal, la inhibición del transporte de las moléculas señal, la inhibición de la unión entre las moléculas señal y el receptor (Chung et al., 2011; Fuqua et al., 2001; Manefield et al., 2002). Aunque en los últimos años, estos mecanismos de interferencia de los sistemas QS están siendo altamente investigados por su potencial en el control de patógenos, en este trabajo nos centraremos en los mecanismos de interferencia de QS mediados por la degradación enzimática de las moléculas señal de tipo AHL o *quorum quenching* (QQ).

QQ es el mecanismo de interferencia del QS más estudiado y se basa en la degradación o modificación enzimática de las moléculas señal, impidiendo que estas sean reconocidas por el regulador transcripcional y con ello, no se active la expresión génica (Grandclement et al., 2016). En función de su mecanismo de acción, se han descrito varios tipos de enzimas degradadoras de moléculas señal de tipo AHL: lactonasas, acilasas y oxidorreductasas (Fetzner, 2015).

Las lactonasas producen la apertura del anillo lactónico de las moléculas AHL dando lugar a una cadena acil-homoserina. Esta reacción es reversible en condiciones de pH ácido (Yates et al., 2002). Las acilasas catalizan la hidrólisis del enlace amido de la molécula AHL, liberando una molécula de ácido graso y la homoserina lactona. Por último, las oxidorreductasas modifican las moléculas AHLs mediante la oxidación o reducción del ácido graso lateral, originando cambios estructurales que disminuyen la afinidad con el receptor o impiden su reconocimiento (Fig. 7) (Dong et al., 2007; Uroz et al., 2009).

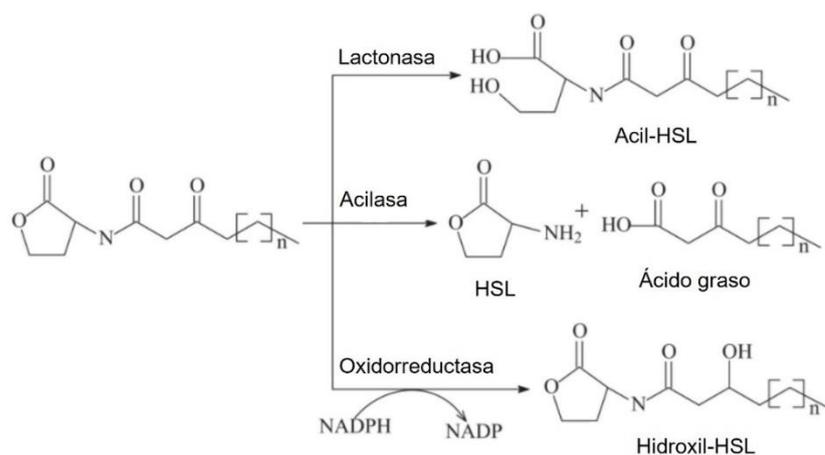


Figura 7. Principales tipos de enzimas QQ según su mecanismo de degradación de las moléculas AHLs. HSL, homoserina lactona. Imagen adaptada de (Chen et al., 2013).

Lactonasas

Las lactonasas fueron las primeras enzimas QQ en ser descubiertas (Y. H. Dong et al., 2000) y muestran una elevada capacidad para degradar AHLs de distinta longitud, con o sin sustituciones en el tercer carbono (Fetzner, 2015). En su mayoría, estas enzimas pertenecen a la familia de las metalo- β -lactamasas (MBL) y tienen un centro activo rico en histidina (HxHxDH-H-D-H) cuya asociación con dos iones de zinc es imprescindible para la actividad catalítica de las mismas (Kim et al., 2005; Wang et al., 2004).

También existen otras familias de lactonasas menos ricas en representantes con actividad QQ, como las fosfotriesterasas (PLL) identificadas principalmente en arqueas (Bergonzi et al., 2018; Bzdrenga et al., 2017); las paraoxonasas (PON), enzimas encargadas de la detoxificación hepática en mamíferos que muestran actividad QQ y han sido identificadas en bacterias (Bar-Rogovsky et al., 2013) o un pequeño grupo de α/β -hidrolasas con actividad degradadora de moléculas AHLs. Recientemente, una nueva

familia de lactonasas, las isocorismatasas, con un único representante, HqiA, fue descrita en nuestro laboratorio por (Torres et al., 2017) tras el rastreo de una librería metagenómica construida a partir de una muestra de suelo salino.

Acilasas

En cuanto a las enzimas acilasas, la primera descripción relacionada con su actividad QQ fue contemporánea a la de la primera lactonasa (Leadbetter & Greenberg, 2000). La mayoría de ellas pertenecen a la superfamilia de las N-terminal nucleófilo (Ntn) hidrolasas, cuya actividad se debe a un ataque nucleofílico sobre el enlace amido (Bokhove et al., 2010). Dependiendo del tipo de aminoácido encargado de este ataque en el centro activo de la enzima, hay dos grandes familias: las penicilina G acilasas (PGAs), que contienen serina como nucleófilo, y las penicilina V acilasas (PVAs), con cisteína como nucleófilo (Mukherji et al., 2014; Sunder et al., 2017). Tanto las PGAs como las PVAs han sido nombradas así por su actividad β -lactamasa sobre la bencilpenicilina y la fenoximetilpenicilina, respectivamente (Sio & Quax, 2004). Por otra parte, también se ha descubierto la enzima QQ AiiO, perteneciente a otra familia de acilasas con homología estructural con α/β -hidrolasas (Przepiora et al., 2022).

Oxidorreductasas

Por último, las enzimas oxidorreductasas catalizan la modificación de la cadena lateral de las moléculas AHLs impidiendo así su reconocimiento por parte de los receptores. Además de su escasa representación, en su mayoría han sido descritas mediante análisis metagenómicos (Jiang et al., 2019).

4. Quorum sensing en fitopatógenos bacterianos

En 2012, (Mansfield et al., 2012) realizaron una encuesta sobre los fitopatógenos bacterianos con mayor importancia a nivel científico y económico entre especialistas en fitopatología. Tras 458 votaciones de la comunidad internacional, los 10 fitopatógenos más votados por orden de relevancia fueron los siguientes:

1. *Pseudomonas syringae* pvs.
2. *Ralstonia solanacearum*
3. *Agrobacterium tumefaciens*
4. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
5. *Xanthomonas campestris* pvs
6. *Xanthomonas axonopodis* pvs
7. *Erwinia amylovora*
8. *Xylella fastidiosa*
9. *Dickeya solani* y *D. dadantii*
10. *Pectobacterium atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Además de su relevancia agrícola, la implicación de sistemas QS en la expresión de la virulencia de estos fitopatógenos ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, entre ellos, únicamente *A. tumefaciens*, *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y algunos de los patovares de *P. syringae* emplean AHLs como moléculas señal (Crépin et al., 2012a; Farias et al., 2019; Pique et al., 2015). Generalmente estos sistemas QS controlan la movilidad, la expresión de factores de virulencia y la colonización del hospedador (Balteneck et al., 2021).

4.1 Podredumbre blanda: *D. solani*, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*

D. solani, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* son bacterias gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que forman parte del grupo denominado enterobacterias de la podredumbre blanda (SRE, *Soft Rot Enterobacteriae*).

Estos tres patógenos son conocidos desde 1917, época en la que se agrupaban en el género *Erwinia* como *E. chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* y *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Con el auge del análisis del gen ARNr 16S, se transfirieron al género *Pectobacterium* (Hauben et al., 1998) como *P. chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Unos años después, el análisis genómico de la subespecie *P. carotovorum* subsp. *atroseptica* hizo que se elevara a la categoría de especie, como *P. atrosepticum* (Gardan et al., 2003), mientras que el análisis genómico de *P. chrysanthemi* permitió identificar seis especies diferentes que fueron transferidas a un nuevo género, el género *Dickeya*: *D. zaeae*, *D. dadantii*, *D. chrysanthemi*, *D. dieffenbachiae*, *D. dianthicola* y *D. paradisiaca* (Samson et al., 2005). Además, *D. solani* constituye una especie de reciente aislamiento y descripción taxonómica (Jan M van der Wolf et al., 2014).

D. solani, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* tienen como principales hospedadores a plantas solanáceas y algunas plantas ornamentales, afectando especialmente a la planta y a los tubérculos de patata (*Solanum tuberosum* L.), mientras que *P. c.* subsp. *carotovorum* tiene un rango de hospedadores más amplio, infectando además a zanahoria (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Gardan et al., 2003; Hauben et al., 1998; Jan M van der Wolf et al., 2014).

Actualmente, estos tres patógenos son especialmente relevantes por la devastación y las pérdidas económicas que producen en los cultivos de patata. Mientras que las especies de *Pectobacterium* tienen una distribución global, *D. solani* ha sido aislada únicamente en Europa e Israel, siendo responsable de mermas del 2 al 10% de la producción anual, lo que se traduce en una pérdida de 46 millones de euros anuales (Dupuis et al., 2021).

D. solani, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* son patógenos necrótrofos que producen una sintomatología conocida como pie negro de la patata, cuando afectan al tejido vascular, y podredumbre blanda, cuando lo hacen en los tubérculos. La sintomatología producida es tan similar que impide distinguir al agente causal a simple vista y se caracteriza por una maceración del tejido de color crema que se torna negra en presencia de aire, conocida como podredumbre blanda de la patata. Con el tiempo, el patógeno alcanza los vasos de la planta y se distribuye de manera ascendente causando un marchitamiento oscuro, conocido como pie negro, lo que provoca un colapso del tallo y la planta termina muriendo (van der Wolf & De Boer, 2007).

En cuanto al ciclo de infección (Fig. 8), las tres cepas coinciden y este se inicia normalmente con semillas de patata contaminadas con el patógeno de manera asintomática. Durante la siembra, las heridas provocadas en los tubérculos provocan el inicio de la infección dando lugar a la aparición de la podredumbre blanda y continua hasta el desarrollo del pie negro. Además, los insectos, las lluvias y el agua de riego son potenciales vectores para la dispersión a plantas cercanas. Igualmente, en muchos casos los despojos de plantas y de tubérculos contaminados son abandonados en los campos de cultivo constituyendo el nicho idóneo para la supervivencia del patógeno durante el invierno. Por último, los daños producidos en las patatas durante la recolecta son los responsables de la activación de la infección postcosecha que causa grandes pérdidas en el almacenamiento (Charkowski et al., 2012; Golanowska & Łojkowska, 2016; Pérombelon, 2002).

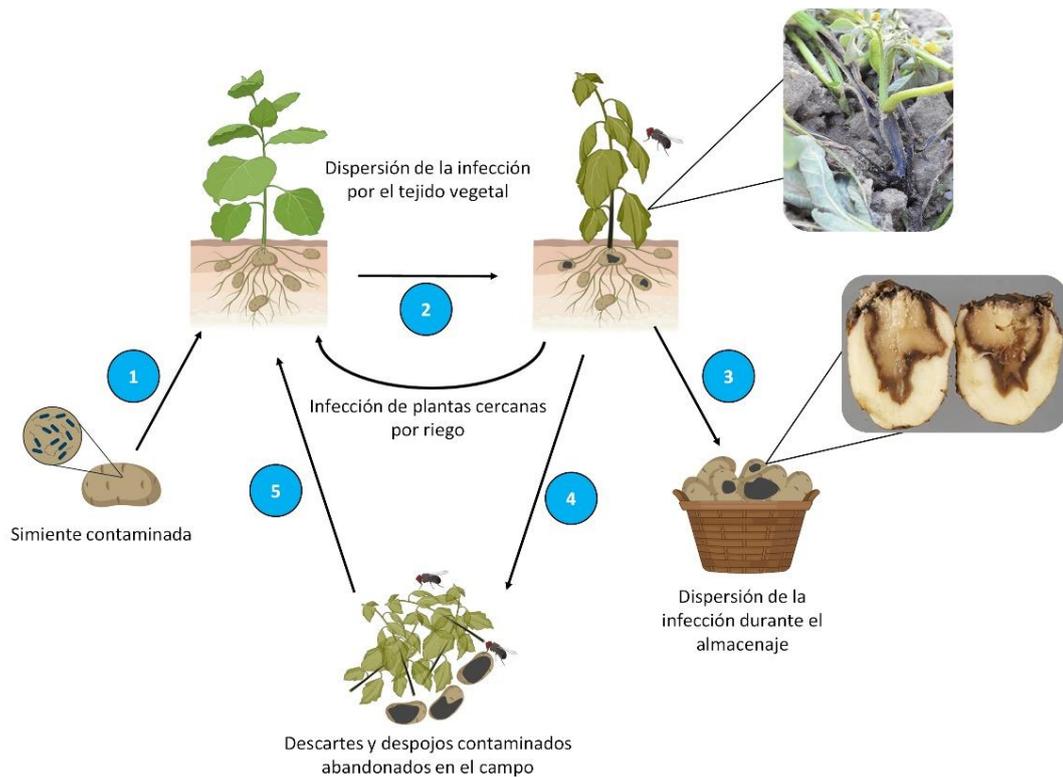


Figura 8. Ciclo de infección de las enterobacterias de la podredumbre blanda en patatas. Fotografías adaptadas del Consejo para el Desarrollo de la Agricultura y la Horticultura (AHDB, *Agriculture and Horticulture Development Board*) en Coventry (Reino Unido).

La patogenicidad de estas enterobacterias se basa en la producción de enzimas degradadoras de la pared celular (PCWDEs, *plant wall cell degrading enzymes*), como pectinasas, celulasas, hemicelulasas y metaloproteasas (Charkowski et al., 2012; Pérombelon, 2002; Potrykus et al., 2014). Además, intervienen otros factores de virulencia como la producción de sideróforos y de exopolisacárido, la movilidad y la quimiotaxis (Davidsson et al., 2013; Faure & Dessaux, 2007; Lee et al., 2013; Pollumaa et al., 2012).

En el caso de *D. solani*, se ha demostrado que la expresión de PCWDEs, la producción de sideróforos y de exopolisacáridos, y la movilidad están reguladas por el sistema de QS ExpR/ExpI con la intervención de C6-HSL, 3-O-C6-HSL y 3-O-C8-HSL (Crépin et al., 2012a; Potrykus et al., 2014; Potrykus et al., 2018; Przepiora et al., 2022). Por su parte, un estudio demostró que los sistemas QS de *P. atrosepticum* y *P. c. subsp. carotovorum* regulan la expresión del 26% de su genoma (Liu et al., 2008) entre los que se encuentran los encargados de la producción de PCWDEs, la formación de *biofilm* y la producción de otros factores esenciales en la virulencia de estos patógenos. Estos presentan un sistema QS de tipo ExpR/ExpI mediado por las AHLs 3-oxo-C6-HSL y 3-oxo-C8-HSL (Baltenneck et al., 2021; Crépin et al., 2012a; Latour et al., 2007).

4.2 Fuego bacteriano: *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que genera la infección en árboles frutales conocida como en fuego bacteriano.

Sus hospedadores principales son plantas de la familia *Rosaceae* entre las que destacan el manzano (*Malus domestica* L.) y el peral (*Pyrus communis*, L.). Es un patógeno no obligado que puede afectar a

hojas, flores, frutos y partes leñosas causando necrosis y un marchitamiento negro, característico de la enfermedad. Por otra parte, en las etapas activas de la infección es común detectar un exudado bacteriano (Gusberti et al., 2015).

Desde su identificación en el Reino Unido en 1957 como agente causante del fuego bacteriano se ha distribuido rápidamente por toda Europa, siendo el principal patógeno que afecta a los árboles frutales, causando pérdidas de 35 millones de euros desde 1989 a 2003, ya que el único tratamiento descrito como efectivo para esta infección son la tetraciclina y la estreptomycin, aunque la legislación europea no permite su uso (Chatterjee, 2001; Santander et al., 2012).

El ciclo de infección de *E. amylovora* comienza con una inoculación primaria en heridas de los árboles causadas por herramientas infectadas o bien patógenos que sobreviven durante el invierno en los tumores latentes originados infecciones previas. En primavera, el patógeno se reactiva dando lugar a una elevada producción del característico exudado de este patógeno, que contiene una elevada cantidad de células bacterianas. Este puede ser dispersado a las flores de otros árboles mediante insectos atraídos por los exudados causando la infección floral epifítica (Fig. 9). En este punto, la infección puede transmitirse a otras flores mediante insectos polinizadores y causar la infección floral que da lugar a la muerte de las flores. Por otra parte, las flores infectadas pueden ser lavadas por la lluvia desplazando al patógeno a las hojas, las ramas y los frutos, en los que este puede penetrar causando la infección foliar y frutal. En este caso, la diseminación del patógeno por la planta causa una infección sistémica que termina por secarse y morir (Din et al., 2007).

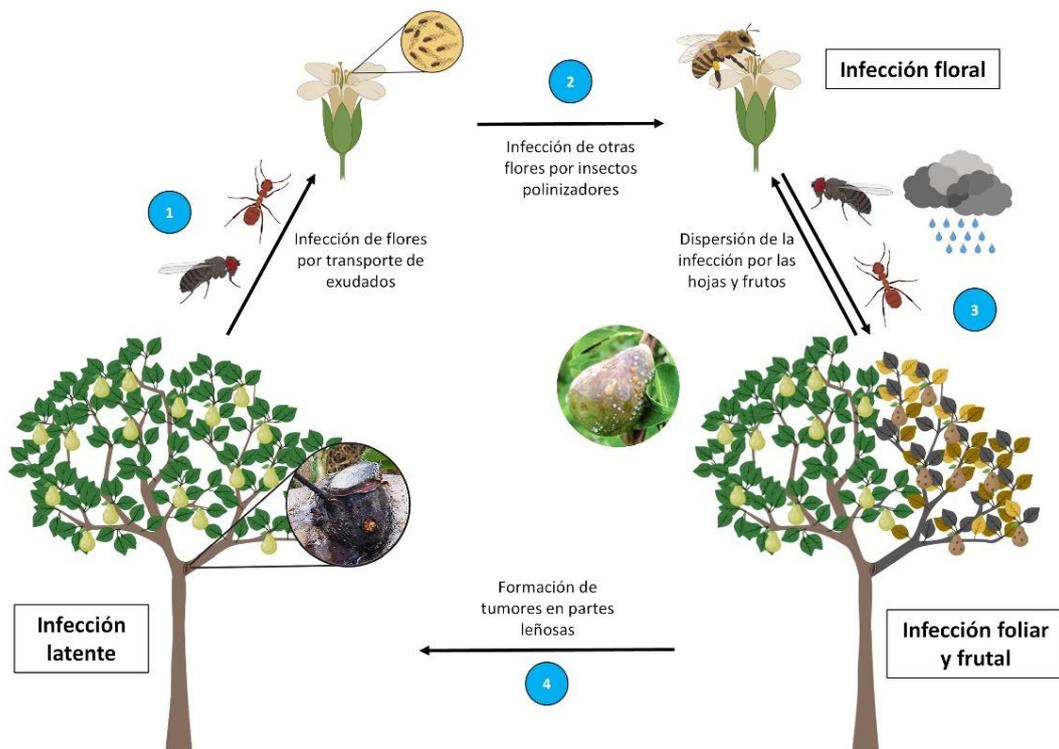


Figura 9. Ciclo de infección de *E. amylovora*, agente causante del fuego bacteriano, en árboles de la familia *Rosaceae*. Fotografías adaptadas de (Aćimović & Meredith, 2017).

La patogenicidad de *E. amylovora* ha sido ampliamente estudiada y se debe a la expresión de factores de virulencia como son la producción de los exopolisacáridos amilovorano y levano, sideróforos y metaloproteasas, la formación de *biofilm* y la movilidad (Kachadourian et al., 2004; Koczan et al., 2011; Mann et al., 2013; Vrancken et al., 2013). Por otra parte, se ha demostrado que parte de su virulencia está regulada mediante sistemas QS de tipo EamR/EamI, con la producción de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL

(Molina et al., 2005; Vittorio Venturi et al., 2004). Aunque se desconoce el alcance que tienen los sistemas QS en la regulación de la virulencia de *E. amylovora*, ha quedado demostrada su implicación en la regulación de la formación de *biofilm* y la producción de los exopolisacáridos amilovorano y levano, ambos factores imprescindibles en la patogenicidad (Koczan et al., 2009; Piqué et al., 2015).

4.3 Moteado bacteriano: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Pseudomonas syringae pv. *tomato* es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* y es el agente causal del moteado del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), que afecta tanto al tejido vegetal como a los frutos.

Los síntomas característicos de esta infección son lesiones necróticas de color marrón oscuro rodeadas de un halo clorótico distribuidas en las hojas, tallos y frutos de la planta. El desarrollo de la enfermedad puede resultar en una clorosis generalizada, seguida de desecación y muerte de la planta (Preston, 2000).

P. syringae pv. *tomato* es un patógeno hemibiotrofo que habita distintos ambientes con presencia de agua dulce, así como en las superficies de las hojas de forma epífita, las semillas, restos vegetales infectados o en el suelo. Una vez que alcanza las hojas de un hospedador compatible, se multiplica en superficie y aprovecha la apertura estomática o heridas por agentes climáticos e insectos para penetrar en la planta. Una vez en el apoplasto, se multiplica sin causar daños a la planta, hasta que la población es suficiente y se activa la producción de numerosos compuestos que interfieren en la respuesta inmunitaria y el metabolismo de la planta (Fig. 10) (Melotto et al., 2006; X. F. Xin & S. Y. He, 2013).

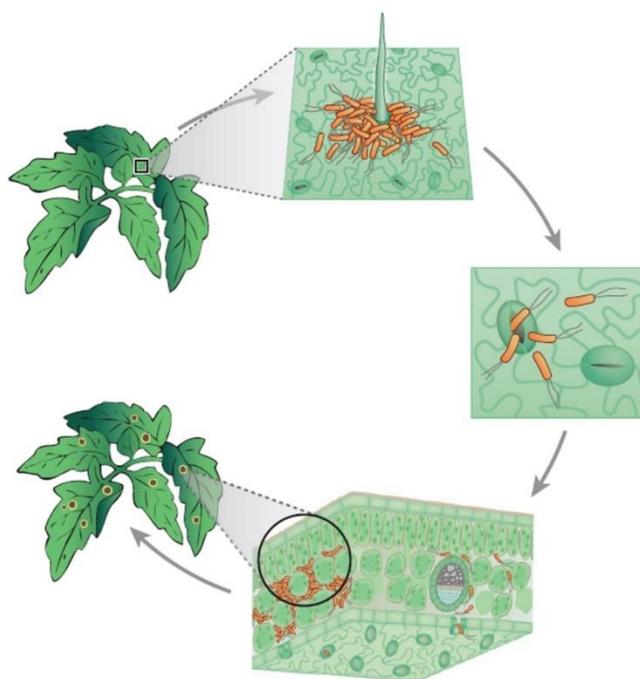


Figura 10. Mecanismo de infección de *P. syringae* pv. *tomato* en las hojas de tomate. Imagen adaptada de Xin y He (2013).

P. syringae pv. *tomato* pertenece al complejo *Pseudomonas syringae* formado por más de 50 patovares que afectan a distintos hospedadores de importancia agrícola (Berge et al., 2014). La mayoría de estos patovares han sido ampliamente estudiados y constituyen modelos de gran valor de la interacción patógeno-hospedador a nivel molecular, como es el caso de la cepa Pto DC3000, resistente a

ampicilina que además de plantas de tomate, es capaz de infectar a la planta modelo de *A. thaliana* Col-0, así como causar reacciones de hipersensibilidad (HR) en hospedadores ampliamente empleados en la investigación (Preston, 2000; X.-F. Xin & S. Y. He, 2013).

Este patógeno posee gran cantidad de factores de virulencia, como el sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), esencial para la virulencia; la producción de fitotoxinas; movilidad de tipo *swimming* y *swarming*, y la producción sideróforos, surfactantes y exopolisacáridos; que le permiten evadir los sistemas de defensa de la planta y establecer la infección (Djami-Tchatchou et al., 2022; Lindeberg et al., 2012; Nogales et al., 2015; Wei & Collmer, 2018).

En cuanto a la regulación de la virulencia mediada por sistemas QS, se ha detectado el sistema de QS Psyl/PsyR en diversos patovares de *P. syringae*, entre los que se encuentra el que afecta al tomate (Morohoshi, Oshima, et al., 2020), aunque algunos autores descartan la intervención de dicho sistema en la virulencia de este patógeno (Elasri et al., 2001; Nakatsu et al., 2019). Sin embargo, en los últimos años están surgiendo cada vez más estudios que confirman la producción de AHLs y el control de al menos parte de su virulencia mediante sistemas QS (Newman et al., 2008; Passera et al., 2019).

5. Ambientes salinos y áridos como fuente de microorganismos PGP-QQ

Una gran parte de la superficie terrestre está formada por tierras áridas, semiáridas y salinas. La vida en estas regiones supone un desafío por las duras condiciones ambientales con limitaciones de agua, altos niveles de radiación solar, una elevada salinidad en el suelo y la deficiencia de nutrientes, que tienen graves consecuencias en el crecimiento y la supervivencia de las plantas (Alsharif et al., 2020).

En los últimos años, las plantas que crecen en este tipo de ambientes extremos han atraído un mayor interés, ya que la comunidad microbiana asociada a estas desempeña un papel fundamental en la adaptación a las condiciones extremas (Redman et al., 2002; Yuan et al., 2016). Por ello, las plantas halófitas constituyen nichos poco explorados en los que habitan microorganismos adaptados a ambientes extremos y que podrían suponer una fuente de biofertilizantes y agentes de control biológico en la industria agrícola (Norton et al., 2016). Entre las propiedades de estos microorganismos se encuentran la mejora de la fertilidad del suelo, el aumento de la tolerancia de las plantas agrícolas a diversos tipos de estrés ambientales y de la productividad de los cultivos, constituyendo además una opción respetuosa para el medio ambiente (Alsharif et al., 2020; Ramawat, 2009). Recientemente, la investigación del papel de estas cepas en la promoción del crecimiento y la tolerancia al estrés abiótico ha dado sus frutos demostrando que estas juegan un papel fundamental tanto en halófitos como en otras plantas de interés agrícola. Así, algunas de las cepas que colonizan la rizosfera de *Arthrocnemum macrostachyum* ejercen un papel indispensable en la tolerancia a la salinidad de esta planta (Navarro-Torre et al., 2017); las rizobacterias aisladas de *Salicornia strobilacea* promueven su crecimiento mediante distintos mecanismos (Marasco et al., 2016); diversas especies aisladas de la rizosfera de *Salicornia europaea* han demostrado su capacidad promotora del crecimiento en plantas de caña de azúcar (Etesami & Maheshwari, 2018; N. Zhou et al., 2017) o bien, cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de *Suaeda salsa* promueven la tolerancia al estrés hídrico en plantas de pepino y arroz (Yuan et al., 2016).

Por otra parte, aunque la interferencia de los sistemas QS es un mecanismo descrito en microorganismos que habitan los ambientes marinos, poco se sabe de este fenómeno en hábitats salinos y áridos (Torres et al., 2019). Debido a la escasez de nutrientes y al amplio rango de factores estresantes de estos ambientes, la actividad QQ puede constituir una ventaja competitiva para los microorganismos que allí habitan a la hora de colonizar la rizosfera de las plantas.

Por ello, algunos autores proponen que las plantas de los ambientes áridos y salinos pueden ser nichos perfectos para estudiar la diversidad bacteriana con la intención de seleccionar bacterias con características únicas para mejorar el crecimiento y la resistencia al estrés biótico y abiótico de las plantas en la industria agrícola, y con ello, el rendimiento de una manera ecológica y sostenible con el medio ambiente (Albdaiwi et al., 2019; Mukhtar et al., 2020a; Szymańska et al., 2018).

Objetivos

La industria agrícola está alcanzando una situación límite debido al uso excesivo de fertilizantes químicos y de pesticidas. Por ello, la Unión Europea está promoviendo el desarrollo de nuevas estrategias de biocontrol que sean más efectivas, no contaminantes y que eviten la aparición de resistencias a los tratamientos en los patógenos y la degradación del suelo de cultivo. Numerosos estudios han demostrado los beneficios del uso de bacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal en la agricultura. Por otra parte, existe una evidencia experimental de que los sistemas de comunicación *quorum sensing* están muy extendidos entre los organismos procariontes, entre los que se incluyen los fitopatógenos, y de que las moléculas *N*- acil homoserina lactona controlan numerosos factores de virulencia en ellos. El grupo de investigación Exopolisacáridos Microbianos (BIO-188) tiene una gran trayectoria en el estudio de los mecanismos de interferencia de la comunicación bacteriana, entre ellos *quorum quenching*, y su uso como nueva estrategia en la lucha contra los patógenos.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es la utilización *in vivo* de bacterias procedentes de ambientes extremos con actividades promotoras del crecimiento vegetal y *quorum quenching* en la lucha contra fitopatógenos de interés general y en la tolerancia al estrés hídrico.

Para ello, en esta investigación se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar cepas bacterianas procedentes de distintos ambientes extremos en base a su actividad promotora del crecimiento vegetal y actividad *quorum quenching*.
2. Evaluar la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vivo* de las cepas seleccionadas empleando plantas de interés agrícola.
3. Determinar la capacidad de las bacterias seleccionadas para interferir en los sistemas *quorum sensing* de diferentes fitopatógenos y atenuar su virulencia.
4. Analizar la actividad *quorum quenching in vivo* de las cepas seleccionadas, así como la actividad promotora del crecimiento vegetal en condiciones de estrés biótico y abiótico.

Objectives

Agricultural industry is reaching a limit situation due to the excessive intake of chemical fertilizers and pesticides. For this reason, European Union is promoting the development of new, more effective and non-polluting biocontrol strategies, which avoid the resistance emergence in pathogens and the soil degradation. Numerous studies have shown the benefits of bacterial strains which possess plant growth-promoting activity. On the other hand, there is experimental evidence that quorum sensing (QS) communication systems are widespread among prokaryotic organisms, including phytopathogens, and that N-acylhomoserine lactone (AHLs) control numerous virulence factors in them. The Research Group Microbial Exopolysaccharides (BIO 188) has a long history in the study of the mechanisms of of the bacterial communication interference, including quorum quenching (QQ), and its use as a new strategy for fighting pathogens.

The main objective of this Doctoral Thesis is the *in vivo* use of bacteria isolated from extreme environments possessing plant growth-promoting and quorum quenching activities for fighting agricultural phytopathogens, as well as promoting drought stress tolerance.

To this end, this research will address the following specific objectives:

1. Select bacterial strains from different extreme environments based on their plant growth-promoting and quorum quenching activities.
2. Evaluate the *in vivo* plant growth-promoting activity of the selected strains using agriculturally relevant plants species.
3. Determine the ability of the selected bacteria to interfere with different phytopathogens quorum sensing systems and attenuate their virulence.
4. Analyse the *in vivo* quorum quenching activity of the selected strains, as well as plant growth-promoting activity under biotic and abiotic stress.

Material y métodos

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas empleadas en esta tesis se recogen en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en esta tesis y sus principales características.

Cepa	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>relA1, lacZΔM15, supE44, thi-1</i>	(Woodcock et al., 1989)
<i>E. coli</i> HB101	Sm ^R , <i>recA, hsdRM, strA, pro, leu, thi</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> S17 λ <i>pir</i>	Sm ^R , <i>recA1, λ pir, thi, pro</i>	(Miller & Mekalanos, 1988)
<i>E. coli</i> SM10 λ <i>pir</i>	Km ^R , <i>thi-1, thr, leu, tonA, lacY, supE, recA, λ pir</i>	(Miller & Mekalanos, 1988)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44, recA1, hsdR17, gyrA46, thi, relA1, lac-F'</i>	(Hanahan, 1983)
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Biosensor, Km ^R , <i>cvil::mini-Tn5, AHL⁻</i>	(McClellan et al., 1997)
<i>C. violaceum</i> VIR07	Biosensor, Km ^R , <i>cvil, AHL⁻</i>	(Morohoshi et al., 2008)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	Biosensor, Gm ^R , <i>traG::lacZ, AHL⁻</i>	(Shaw et al., 1997)
<i>Dickeya solani</i> LMG 25993 ^T	Patógeno de plantas	(Jan M van der Wolf et al., 2014)
<i>Erwinia amylovora</i> CECT 222 ^T	Patógeno de plantas	(Hauben et al., 1998)
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> CECT 314 ^T	Patógeno de plantas	(Gardan et al., 2003)
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CECT 225 ^T	Patógeno de plantas	(Hauben et al., 1998)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Patógeno de plantas	(Whalen et al., 1991)
Colección de 71 cepas	Aisladas de distintos ambientes hipersalinos y de heces de zorro rojo (<i>Vulpes vulpes</i>) y de nutria (<i>Lutra lutra</i>)	Colección BIO-188
Colección de 320 cepas	Aisladas del Saladar de El Margen	Este trabajo

Las condiciones de cultivo para las cepas empleadas en este estudio se describen a continuación. Las cepas de *E. coli*, *C. violaceum* y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) se cultivaron en medio LB. Para el crecimiento de esta última se adicionó 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 2,5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (LB/MC). Por su parte, los fitopatógenos y las cepas aisladas para su estudio en este trabajo se cultivaron en medio TSB, salvo aquellos aislados procedentes de ambientes oligotróficos, que se cultivaron en medio TSBd. Todas las cepas se incubaron a 28°C con una agitación de 120 rpm, excepto las cepas de *E. coli* que se incubaron a 37°C.

La conservación a largo plazo se realizó mediante criopreservación a -80°C empleando glicerol al 30% (v/v), mientras que la conservación a corto plazo se llevó a cabo por resiembras en medio sólido. En el caso de las cepas fitopatógenas se partió de réplicas criopreservadas con el fin de evitar alteraciones en la virulencia.

2. Especies vegetales

Las especies vegetales empleadas en este trabajo como sistema de experimentación fueron la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) en el caso de los ensayos *in vitro*, y plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L. var. Roma para los ensayos *in vitro* e *in vivo* en cámara de cultivo de plantas Fitotron®. En el caso de los ensayos en invernadero, se adquirieron plantones de tomate (*S. lycopersicum* L.) var. Mina con un mes de crecimiento y libres de pesticidas.

Las semillas de ambas especies se esterilizaron en superficie como se describe a continuación y posteriormente se almacenaron a 4°C durante 72 horas con el fin de sincronizar y homogeneizar la germinación (estratificación).

A. *thaliana* Col-0: las semillas se esterilizaron en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con 500 μL de etanol 70% (v/v) y SDS al 0,1% (p/v) durante 5 minutos con agitación en vórtex. Posteriormente, se retiró el etanol y se añadieron 500 μL de lejía comercial al 50% (v/v) en agua destilada y SDS al 0,1% (p/v) durante 20 minutos en agitación. Finalmente, se retiró la lejía y se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril. Las semillas se mantuvieron en imbibición en agua estéril durante 1,5 horas.

S. *lycopersicum* L.: las semillas se esterilizaron en tubos de centrífuga de 15 mL con 10 mL de lejía comercial al 50% (v/v) en agua durante 15 minutos, tras los que se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en 10 mL de peróxido de hidrógeno al 7% (v/v) durante 15 minutos, seguido de cuatro lavados con agua destilada estéril. Las semillas se mantuvieron en imbibición en agua estéril durante 1,5 horas.

3. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este estudio con fines de expresión y clonación de genes se describen a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo y sus principales características.

Vector	Características	Referencia
pBK-miniTn7-gfp1	Km ^R , Cm ^R , <i>cat</i> , <i>bla</i> , <i>gfp</i> , <i>mob</i> ⁺	(Koch et al., 2001)
pGEM-T	Ap ^R , vector de clonación de productos de PCR	Promega
pGEX-4T-2	Ap ^R , vector de clonación y expresión	Novagen
pRK600	Cm ^R , <i>mob</i> ⁺ , <i>ori-ColE1</i> , RK2- <i>tra</i> , vector auxiliar en la movilización	(Figurski & Helinski, 1979)
pUX-BF13	Ap ^R , <i>mob</i> ⁺ , <i>tnsABCDE</i> , <i>ori-R6K</i> , vector donador de la Tn7 transposasa	(Bao et al., 1991)

4. Medios de cultivo

A continuación, se detalla la composición de los medios de cultivo empleados en el aislamiento, crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas empleadas en este estudio. Éstos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. En los casos en que fue necesario, el pH de los medios se ajustó a 7 ($\pm 0,2$) usando soluciones de NaOH 1M o de HCl 1M. Los medios se solidificaron por la adición de agar bacteriológico al 1,5% (p/v) previamente a la esterilización.

Agar de triptona y soja (TSA). Medio deshidratado (Difco®) para el aislamiento y mantenimiento de las cepas bacterianas.

Caldo de triptona y soja (TSB). Medio deshidratado (Difco®) empleado para el cultivo de cepas bacterianas.

Agar de triptona y soja diluido (TSA_d). Medio deshidratado empleado en el aislamiento y mantenimiento de cepas bacterianas procedentes de ambientes oligotróficos. Su composición se basa en una dilución de medio TSB al 10% (v/v).

Caldo de triptona y soja diluido (TSB_d). Medio deshidratado empleado en el cultivo de cepas bacterianas procedentes de ambientes oligotróficos. Su composición se basa en una dilución de medio TSB al 10% (v/v) de la cantidad recomendada por el fabricante.

Agar citrato de Simmons (SCA) (Simmons, 1926). Medio diferencial deshidratado (Beckton Dickinson, BD®) empleado en la selección de cepas con capacidad para usar el citrato como fuente de carbono.

Medio AB (Chilton et al., 1974). Medio de cultivo de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) empleado para detección de moléculas AHL. Posteriormente a la esterilización, se adicionó D-manitol (2 g/L), previamente esterilizado por filtración, y X-gal (80 µg/mL). Su composición se describe a continuación:

Tampón fosfato 20X 50 mL
Solución de sales 20X 50 mL
Agar 15 g
Agua destilada c.s.p..... 1000 mL

La composición del tampón fosfato 20X se detalla a continuación:

K ₂ HPO ₄	60 g
NaH ₂ PO ₄	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Así como la composición de la solución de sales 20X:

NH ₄ Cl	20,0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O.....	6,0 g
KCl	3,0 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Medio Luria-Bertani (LB). Medio deshidratado (Difco®) para el cultivo de *A. tumefaciens* NTL4, *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07 y *E. coli*.

Medio MY (Quesada et al., 1993). Medio de cultivo empleado en la determinación de la formación de *biofilms*. También se empleó como medio selectivo para los recuentos de los cocultivos a una concentración de NaCl del 5% (p/v). La composición que se detalla a continuación está referida a un 1% (p/v) de NaCl.

D-Glucosa.....	10 g
Proteosa peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Extracto de levadura	3 g
NaCl	10 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

La caracterización *in vitro* de la actividad promotora del crecimiento vegetal de las cepas bacterianas analizadas en este estudio se realizó empleando los siguientes medios de cultivo:

Gelatina nutritiva (Uttley & Collins, 1993). Medio deshidratado (Difco®) empleado en la detección de enzimas proteolíticas.

Medio libre de nitrógeno (Burk) (Poonguzhali et al., 2006). Medio de cultivo sin fuente de nitrógeno para la detección de la producción de nitrogenasa.

KH ₂ PO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,1 g
Na ₂ MO ₄ · 2H ₂ O	1,2 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1,4 mg
Sacarosa	20,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Medio ácido 1-aminociclopropano (ACC) desaminasa (Poonguzhali et al., 2006). Medio empleado para la detección de la enzima ACC desaminasa. Se preparó suplementando ACC 1 M, previamente esterilizado por filtración, al medio Burk sólido hasta una concentración final de 3 mM, una vez que éste se esterilizó en autoclave.

Medio agar sangre (Uttley & Collins, 1993). Medio comercial (Beckton Dickinson, BD®) empleado para la determinación de la actividad hemolítica.

Medio cromoazurol sulfonato (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987). Medio empleado para la detección de la producción de sideróforos.

Cromoazurol sulfonato (CAS)	0,6 g
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTMAB)	0,3 g
Ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES)	0,3 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O 1 mM en HCl 10 mM	10 mL
Agar.....	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Medio DNasa (Jeffries et al., 1957). Medio deshidratado (Difco®) empleado para determinar la degradación de ADN.

Medio fosfatasa ácida (Pikovskaya, 1984). Medio de cultivo para la determinación de la solubilización de fosfato inorgánico mediante la enzima fosfatasa ácida. El pH de este medio de ajustó a 7,5.

D-Glucosa.....	5 g
MgCl ₂	2,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
KCl	0,1 g
(NH ₄)NO ₃	2,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 mL

Medio fosfatasa alcalina (Baird-Parker, 1963). Medio de cultivo empleado para la detección de la producción de la enzima fosfatasa alcalina. Se preparó añadiendo fosfato de fenolftaleína al 1% (p/v), previamente esterilizada por filtración, al medio TSA hasta una concentración final de 0,01% (p/v), una vez que éste se esterilizó en autoclave.

Medio TSA almidón (Uttley & Collins, 1993). Medio usado en la determinación de la producción la enzima amilasa. Se preparó suplementando almidón al 1% (p/v) al medio TSA.

Medio TSA caseína (Uttley & Collins, 1993). Medio empleado para la evaluación de la hidrólisis de la caseína por parte de la enzima caseinasa. Su preparación se llevó a cabo esterilizando el medio TSA con el 50% (v/v) de agua y posteriormente se añadió el 50% (v/v) restante con leche desnatada pasteurizada.

Medio TSA celulosa (Villalba LS, 2004). Medio usado para la detección de la hidrólisis de la celulosa. Se preparó añadiendo un 1% (p/v) de celulosa microcristalina al medio base TSA.

Medio TSA quitina (Castro et al., 2011). Medio de cultivo empleado para evaluar la hidrólisis de la quitina. Se preparó añadiendo un 1% (p/v) de quitina coloidal al medio TSA.

Medio TSA Tween® 20 (Mourey & Kilbertus, 1976). Medio empleado para la detección de esterazas usando Tween® 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano) como sustrato. Para ello se añadió un 1% (v/v) de Tween® 20 y 0,1 g/L de CaCl₂ al medio TSA.

Medio TSA Tween® 80 (Mourey & Kilbertus, 1976). Medio empleado para la detección de lipasas usando Tween® 80 (monooleato de polioxietilensorbitano) como sustrato. Para ello se añadió un 1% (v/v) de Tween® 80 y 0,1 g/L de CaCl₂ al medio TSA.

Medio Murashige y Skoog (Murashige & Skoog, 1962). Medio mineral deshidratado (MP Biomedicals®) empleado en el cultivo *in vitro* de Arabidopsis y tomate. Se adicionó sacarosa al 50% (p/v), previamente esterilizada por filtración, hasta una concentración final de 0,25% (p/v). Para la obtención de medios semisólidos, se añadió agar al 0,3% y al 0,8 % (p/v).

5. Antimicrobianos

Las soluciones de antimicrobianos (Sigma-Aldrich®) se prepararon en agua bidestilada estéril, excepto en el caso del cloranfenicol, que se disolvió en etanol absoluto. Dichas soluciones se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Cuando fue necesario, los antimicrobianos se adicionaron a los medios de cultivo para obtener las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap) 100 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL, gentamicina (Gm) 50 µg/mL y kanamicina (Km) 50 µg/mL.

6. Moléculas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs)

Las moléculas AHLs sintéticas (Sigma-Aldrich®) adicionadas a los medios fueron las siguientes: *N*-butanoil-DL-homoserina lactona (C4-HSL), *N*-hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-HSL), *N*-3-oxohexanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C6-HSL), *N*-octanoil-DL-homoserina lactona (C8-HSL), *N*-3-oxooctanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C8-HSL), *N*-decanoil-DL-homoserina lactona (C10-HSL), *N*-3-hidroxidecanoil-DL-homoserina lactona (3-OH-C10-HSL), *N*-dodecanoil-DL-homoserina lactona (C12-HSL) y *N*-3-oxododecanoil-DL-homoserina lactona (3-O-C12-HSL). Las soluciones stock de cada compuesto se disolvieron en metanol 70% (v/v) y se prepararon a 10 mM. Posteriormente se utilizaron a una concentración final de 10 µM o 25 µM.

7. Otras soluciones

Tampón fosfato (PB). Solución tamponada empleada para la rehidratación del tejido vegetal en los ensayos de depósitos de calosa. Se preparó a una concentración 0,07 M de Na₂HPO₄ ajustando el pH a 9 mediante la adición de una disolución de NaH₂PO₄ 0,06M.

Tampón fosfato salino (PBS). Solución tampón utilizada en la determinación de la localización celular de enzimas *quorum quenching*, así como en el montaje de muestras para microscopía de fluorescencia. Su composición se detalla a continuación. El pH de esta solución se ajustó a 6,5.

NaCl 17,5 g

Na ₂ HPO ₄	0,7 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE). Solución tampón empleada en la preparación y electroforesis de geles de agarosa. Se preparó una solución 1X en agua bidestilada a partir de una solución TAE 50X (Panreac) cuya composición se basa en tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 2M, ácido acético 1M y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,05M a pH 8,5.

Tampón de quimiotaxis (BC). Solución tampón empleada en los ensayos cuantitativos de quimiotaxis. Se preparó acorde a la siguiente composición y posteriormente se esterilizó por filtración.

KH ₂ PO ₄	2,7 g
K ₂ HPO ₄	5,3 g
Glicerol 50% (p/v)	1 mL
EDTA	5,8 mg
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Solución mineral Hewitt (Hewitt, 1952). Solución nutritiva mineral para plantas. Su composición se detalla a continuación:

KNO ₃	0,3 g
Ca(NO ₃) ₂	1,4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4 g
EDTA-Fe (II)	30 mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2,2 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,24mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,29 mg
H ₃ BO ₃	18,6 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,03 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,03 mg
NaH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Solución salina citrada (SSC). Solución empleada en la resuspensión de ADN genómico tras su extracción. Su composición se basa en NaCl 0,15M y citrato sódico 0,015M en agua bidestilada. El pH se ajustó a 7.

EDTA salino. Solución empleada en la extracción de ADN genómico como inhibidora de ADNasas. Su composición se basa en NaCl 0,15M y ácido etilendiaminotetraacético 0,1M en agua bidestilada. El pH se ajustó a 8.

Reactivo de Salkowski. Solución empleada en la determinación de la producción de ácido indolacético. Su composición se basa en 1 mL de FeCl₃ 0,5M y 49 mL de ácido perclórico al 35% (p/v). Este reactivo es de preparación extemporánea y debe protegerse de la luz.

X-gal. La solución de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido (X-gal) se preparó a una concentración final de 20 mg/mL utilizando *N,N*- dimetilformamida como disolvente, y se conservó a -20°C.

8. Muestreo y aislamiento de cepas bacterianas

En este estudio se realizó un aislamiento de cepas bacterianas a partir de muestras recolectadas en el Saladar de El Margen, Cúllar, Granada (37°38'50.6"N 2°37'22.2"W), un criptohumedal salino y semiárido con una surgencia de agua en la estación lluviosa.

El muestreo se realizó en el mes de febrero de 2019 y se tomaron muestras de agua, suelo y plantas en recipientes estériles y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento. Para el aislamiento de cepas se emplearon placas de TSA suplementadas con NaCl al 2% y al 5% (p/v). Las muestras de agua se sembraron en las placas tras realizar diluciones seriadas (10^{-6} – 10^{-8}). Para las muestras de suelo, se tomó 1 g de éste, se suspendieron en 9 mL de solución salina 0,9% (p/v) estéril, se dispersaron por sonicación y se sembraron en placa tras realizar diluciones seriadas.

En el caso de las muestras de plantas, se aisló la microbiota endófito y epífita de las raíces y de la parte aérea. Para el aislamiento de epífitos, las plantas se lavaron con agua destilada estéril y se depositaron en placas, mientras que, en el caso de los endófitos, las plantas se lavaron con agua destilada estéril y se sumergieron en etanol 70% (v/v) durante 5 minutos. Posteriormente, se lavaron en agua destilada estéril y se cortaron fragmentos de 5 mm de la parte aérea y radicular, que se depositaron en las placas.

Las placas se incubaron a 28°C durante 7 días y se seleccionaron un grupo de 320 aislados en función de las diferentes morfologías coloniales. Posteriormente, se aislaron nuevamente en placas de TSA con la correspondiente concentración de NaCl.

9. Técnicas para el estudio de la promoción del crecimiento vegetal

9.1. Determinación *in vitro* de la actividad promotora del crecimiento vegetal

Con el fin evaluar el potencial promotor del crecimiento vegetal de las cepas de estudio, éstas se sometieron a una batería de pruebas metabólicas *in vitro*. Se evaluó la hidrólisis de ADN, almidón, caseína, celulosa, gelatina y quitina, la producción de ACC-desaminasa, esterasa, fosfatasa ácida y alcalina, lecitinasa, lipasas, nitrogenasa, sideróforos, surfactantes y de ácido indolacético (IAA), empleando los medios de cultivo previamente descritos en el apartado 4. Para ello, se partió de un cultivo de 24 horas de cada cepa en medio TSB y se sembraron 20 µL de éste en las placas correspondientes. El resultado se determinó tras 7 días de incubación a 28°C, salvo en el caso de la producción de sideróforos, que se evaluó transcurridas 24 horas.

En el caso de las pruebas de ACC-desaminasa y nitrogenasa, el crecimiento en los medios de cultivo es indicativo de un resultado positivo. La presencia de un halo alrededor del crecimiento bacteriano se consideró un resultado positivo para las pruebas de caseína, celulosa, hemólisis, fosfatasa ácida y lecitinasa. De igual modo, en el caso de la prueba de amilasa, DNasa, fosfatasa alcalina y sideróforos, se obtuvieron los resultados tras la adición de lugol, HCl 1M, amoníaco 30% (v/v) y una sobrecapa de medio CAS, respectivamente. La presencia de un precipitado en forma de cristales próximo al crecimiento bacteriano indicó un resultado positivo para la producción de esterasas y lipasas.

Por último, la producción de IAA por parte de las cepas se evaluó siguiendo el protocolo descrito por (Goswami et al., 2016) tras 5 días de cultivo a 28°C y 120 rpm en medio TSB suplementado con 500 mg/L de L-triptófano. Estos cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos y se

transfirieron 2 mL del sobrenadante a tubos de cristal. Posteriormente, se añadieron 100 µL de ácido ortofosfórico (HClO₄) y 4 mL del reactivo de Salkowski, se agitó en vórtex y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 25 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 530 nm. Para la cuantificación se realizó una curva patrón de IAA (0-100 µg/mL) en medio TSB.

9.2. Determinación de la tolerancia a la salinidad

El rango de salinidad tolerado por las cepas, así como su valor óptimo de crecimiento se evaluaron en tubos de medio TSB con distintas concentraciones de NaCl: 0,5%, 2%, 5%, 7,5%, 12,5%, 15% y 25% (p/v) y se incubaron a 28°C y 120 rpm durante 5 días. El crecimiento se analizó por espectrofotometría a 600 nm.

9.3. Ensayos de bioseguridad

Con el objetivo de evaluar la bioseguridad de las cepas seleccionadas, se realizó un ensayo con nauplios de *Artemia salina* y un ensayo de bioluminiscencia con *Aliivibrio fischeri* para determinar su posible toxicidad.

En el caso del ensayo en *A. salina* (Rajabi et al., 2015), se eclosionaron los quistes (JBL Artemio Pur) en agua de mar estéril (salinidad 36 g/L, pH 7,3), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dispusieron 20 nauplios por placa Petri con 20 mL de agua de mar estéril y se añadieron 10 µL de una suspensión de células de cada cepa en agua de mar estéril, a las que previamente se les realizaron dos lavados. Finalmente se incubaron a 25°C durante 96 horas, haciendo recuentos cada 24 horas. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento, empleando como control negativo, solución salina estéril y como control positivo, una suspensión de células de *Vibrio coralliilyticus*, un patógeno de crustáceos.

En el caso del ensayo de bioluminiscencia con *A. fischeri*, se realizó empleando el kit Microtox® (Onorati & Mecozzi, 2004) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la toxicidad de un cultivo de 8 horas de cada cepa seleccionada en medio TSB, así como del sobrenadante de éste obtenido tras centrifugar a 9.000 rpm durante 20 minutos. Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Dr. Clementina Pozo del Instituto Universitario de Investigación del Agua (Universidad de Granada).

9.4. Bacterización de semillas o biopriming

La influencia de las cepas bacterianas en el proceso de germinación de las semillas de tomate (*S. lycopersicum* L. var. Roma) se evaluó mediante un ensayo de bacterización de semillas o *biopriming*, siguiendo el protocolo descrito por (Mahmood et al., 2016). Para ello, se esterilizaron 30 semillas por cada tratamiento siguiendo el protocolo previamente descrito en el apartado 2 y se mantuvieron en imbibición en agua destilada estéril durante 1 hora.

Por otra parte, las células bacterianas procedentes de cultivos de 18 horas en medio TSB, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y finalmente se realizó una suspensión de 10⁹ UFC/mL. Las semillas estériles se añadieron a la suspensión bacteriana y se incubó a 28°C y 120 rpm durante 1 hora. Posteriormente se eliminó la suspensión bacteriana mediante pipeteo y las semillas se dispusieron en placas Petri con papel de filtro esterilizado y humedecido con 5 mL de agua destilada

estéril y se incubaron a 28°C durante 4 días en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se midió el porcentaje de germinación y la longitud de cada plántula, con el fin de calcular el índice de vigor (I_v).

$$I_v = \text{Longitud promedio} \times \text{Porcentaje de germinación}$$

Se realizaron tres réplicas por tratamiento utilizando semillas incubadas en agua destilada estéril como control negativo.

9.5. Ensayos de promoción del crecimiento *in vivo* en cámara de cultivo

Con el propósito de evaluar la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vivo* de las cepas seleccionadas, se realizaron ensayos en plantas de tomate (*S. lycopersicum* L. var. Roma) en condiciones de laboratorio. En este ensayo se realizaron dos enfoques: un tratamiento basado en la irrigación radicular de las plantas con una suspensión de las cepas y otro tratamiento basado en la actividad combinada de la bacterización de semillas y su posterior irrigación radicular con una suspensión bacteriana.

Los ensayos se llevaron a cabo en macetas con una capacidad de 1,5 L de vermiculita esterilizada como sustrato. En cada recipiente se sembraron 50 semillas de tomate esterilizadas siguiendo el protocolo antes descrito. En el caso del ensayo de bacterización combinado con irrigación radicular, las semillas se trataron con una suspensión bacteriana como se describe en la sección anterior. Una vez que las plantas alcanzaron 5 cm, se procedió a aplicar el primer tratamiento mediante irrigación con 5 mL de una suspensión bacteriana (10^9 UFC/mL) proveniente de un cultivo de 24 horas en medio TSB. Para preparar estas suspensiones, se centrifugaron los cultivos a 9.000 rpm durante 5 minutos y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Se realizó un total de cuatro tratamientos a lo largo de un mes, y transcurrido este tiempo, se recolectaron las plantas para su análisis. Durante el tiempo que duró el experimento, las plantas se mantuvieron en una cámara climática para el crecimiento de plantas Fitotron®, con una humedad relativa (HR) del 60%, una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de día largo (luz:oscuridad, 16:8 horas).

Los experimentos se llevaron a cabo en duplicado (100 plantas en total) y como controles, se emplearon plantas procedentes de semillas incubadas con agua destilada estéril, en el caso de los ensayos de bacterización e irrigación radicular, y posteriormente, se regaron con 5 mL de agua destilada estéril. Una parte del material vegetal recolectado se destinó a la determinación de la biomasa de la parte aérea y radicular, y otra parte a la determinación de la concentración de clorofila y la visualización de depósitos de calosa.

Determinación de la biomasa. Se recolectaron 50 plantas de cada tratamiento y se determinó la longitud de la parte aérea y radicular. Posteriormente, se secaron en un horno ventilado a 70°C durante 72 horas y se determinó el peso seco de ambas partes.

Quantificación de clorofila. Con el fin de evaluar el estado fotosintético de las plantas, se realizó una determinación de clorofila A (Chl_a), clorofila B (Chl_b) y clorofila total (Chl_T) mediante espectrofotometría siguiendo los protocolos descritos por Arnon (Arnon, 1949) y por Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987). Para ello se tomaron 0,1 g de la parte aérea y se trituraron en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizó una extracción con 2 mL (V_{ex}) de acetona al 80% (v/v) en tubos de vidrio sellados durante 24 horas en oscuridad y se midió la absorbancia del sobrenadante a 645, 646 y 663 nm empleando cubetas de cuarzo tras centrifugar las muestras a 12.000 rpm durante 10

minutos. La concentración de clorofila (mg/g de peso fresco) se calculó mediante las siguientes fórmulas:

Arnon (1949)	Lichtenthaler (1987)
$\text{Chl}_a = \frac{(-2,69 \times A_{645} + 12,70 \times A_{663}) \times V_{\text{ex}}}{1000 \times W}$	$\text{Chl}_a = \frac{(-1,93 \times A_{646} + 11,93 \times A_{663}) \times V_{\text{ex}}}{1000 \times W}$
$\text{Chl}_b = \frac{(22,90 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) \times V_{\text{ex}}}{1000 \times W}$	$\text{Chl}_b = \frac{(20,36 \times A_{646} - 5,50 \times A_{663}) \times V_{\text{ex}}}{1000 \times W}$
$\text{Chl}_T = \frac{(20,21 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) \times V_{\text{ex}}}{1000 \times W}$	$\text{Chl}_T = \frac{(18,43 \times A_{646} + 6,43 \times A_{663}) \times V_{\text{ex}}}{1000 \times W}$

Depósitos de calosa. Para determinar el impacto de las cepas bacterianas en los sistemas de defensa de las plantas de tomate, concretamente en el mecanismo de la resistencia sistémica inducida (ISR), se analizó la presencia de depósitos de calosa en las hojas siguiendo el protocolo descrito por (Scalschi et al., 2015). Para ello, se recolectó una muestra representativa de cada tratamiento y se eliminó la clorofila mediante una decoloración con etanol 96% (v/v), renovándolo cuando se mostraba saturado de pigmentos. Seguidamente, las hojas se rehidrataron con tampón fosfato (PB) 0,07M durante 30 minutos. Se retiró el tampón y las hojas se tiñeron con una disolución de azul de metileno al 0,05% (p/v) en PB durante 30 minutos. Posteriormente, se retiró el colorante, se añadió una disolución de azul de metileno al 0,5% (p/v) en PB y se mantuvieron en tinción en oscuridad durante 5 días. Los depósitos de calosa se observaron mediante microscopía de epifluorescencia con filtro ultravioleta (380nm) tras montar las muestras con el envés hacia abajo entre cubre y porta, empleando azul de metileno al 0,05% (p/v) como medio de montaje.

9.6. Estudio de la colonización bacteriana

9.6.1 Ensayos de movilidad

La movilidad de las cepas seleccionadas se determinó en medio TSB empleando distintas concentraciones de agar (p/v): 0,3% (*swimming*), 0,5% (*swarming*) y 1% (*twitching*). Para ello se partió de un cultivo de 24 horas en medio TSB.

En el caso del ensayo en medio sólido para determinar la movilidad de tipo *swimming*, se inocularon 2 μL del cultivo en la capa intermedia del medio de cultivo. La inoculación se realizó en superficie para el ensayo de determinación de movilidad tipo *swarming*, mientras que para el análisis de la movilidad tipo *twitching*, el inóculo se depositó en el fondo, entre la placa Petri y el medio de cultivo. Tras 24 horas de incubación a 28°C se evaluó la presencia o ausencia y el tipo de movilidad de las cepas.

9.6.2 Ensayo de quimiotaxis

La quimiotaxis de las cepas seleccionadas se evaluó frente a exudados de plantas: de tomate (*S. lycopersicum* L.) var Mina, de *Salicornia hispanica* y de *A. thaliana*, así como ácido γ -aminobutírico (GABA) y casaminoácidos (CA). Los exudados de plantas se obtuvieron tras someter a agitación las raíces de éstas en 100 mL de agua bidestilada estéril a 4°C durante 24 horas. En el caso del GABA y de los casaminoácidos, se prepararon disoluciones al 1,3% y al 10% (p/v) en agua bidestilada estéril, respectivamente. Tanto los exudados como estas disoluciones se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20°C hasta su uso.

El ensayo de quimiotaxis cuantitativo (Reyes-Darias et al., 2016) se realizó en placas *microtiter* de 96 pocillos empleando microcapilares con 1 μ L de cada compuesto a analizar. Se empleó un cultivo de 24 horas en medio TSB de cada cepa, al que se le realizaron dos lavados con tampón de quimiotaxis (BC) tras centrifugar y posteriormente se resuspendió en el mismo volumen de éste. Se añadieron por pocillo 150 μ L de la suspensión bacteriana diluida 1:300 en BC. Los capilares se dispusieron en los pocillos mediante adaptadores de silicona y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras el periodo de incubación se extrajeron los capilares, se lavaron superficialmente con agua destilada estéril y su contenido se extrajo mediante centrifugación en 99 μ L de BC. Finalmente se realizaron diluciones seriadas en BC y se realizó un recuento en placa de unidades formadoras de colonias por capilar. Con fines comparativos y como tratamiento control se utilizaron capilares cargados con 1 μ L de BC. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado empleando 8 réplicas por compuesto a ensayar.

9.6.3 Formación de *biofilm* y producción de exopolisacáridos

La formación de *biofilm* se evaluó mediante el ensayo con cristal violeta en placas *microtiter* de 96 pocillos (O'Toole, 2011) empleando distintos medios de cultivo con y sin suplementación de GABA, exudados de tomate, de salicornia y de arabisopsis a varias concentraciones, como inductores de la formación de *biofilm*. Los medios ensayados fueron TSB, LB y MY y la suplementación de los compuestos y exudados se realizó al 10% o 20% (v/v).

El ensayo se llevó a cabo partiendo de un cultivo de 24 horas de las cepas en medio TSB. Éstas se sembraron al 1% (v/v) en pocillos con 100 μ L de los diferentes medios de cultivo ensayados y se incubaron a 28°C sin agitación durante 72 horas. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se procedió a la tinción con cristal violeta. Para ello se retiró el cultivo, se añadieron 150 μ L de cristal violeta al 1% (p/v) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se eliminó el colorante y se realizaron cinco lavados con agua destilada. Posteriormente se resuspendieron las células que forman el *biofilm* con 300 μ L de etanol 96% (v/v) y se midió la absorbancia a 540 nm.

Adicionalmente se cuantificó la producción de exopolisacáridos (EPS) en 1 L de un cultivo de cada cepa en medio TSB incubado a 28°C y 120 rpm durante 5 días siguiendo el protocolo descrito por (Quesada et al., 1993). Los cultivos se centrifugaron a 9.000 rpm durante 10 minutos, el *pellet* bacteriano se resuspendió en 10 mL de agua destilada estéril y se congeló a -80°C para su posterior liofilización. Al sobrenadante se le añadió 2 volúmenes de etanol 96% (v/v) frío y se dejó durante 24 horas en refrigeración. Posteriormente, se centrifugó a 9.000 rpm durante 20 minutos y el precipitado se disolvió en 10 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se congeló a -80°C para su posterior liofilización. Una vez obtenidos ambos liofilizados, se calculó el rendimiento de la producción de EPS en relación con la biomasa.

9.6.4 Ensayos de colonización vegetal

La capacidad de las cepas seleccionadas para colonizar el tejido vegetal se evaluó de forma cuantitativa en plantas de tomate empleando medio MS líquido suplementado con 2,5 g/L de sacarosa, como soporte líquido, y el mismo medio solidificado mediante la adición de agar al 0,5% (p/v), como soporte semisólido. Para ello, se esterilizaron las semillas de tomate siguiendo el protocolo previamente descrito en el apartado 2 de esta sección. En ambos casos, las semillas se inocularon con una suspensión bacteriana (10^9 UFC/mL) de cada cepa en agua destilada procedentes

de un cultivo de 24 horas en medio TSB, al que se le realizaron dos lavados con agua destilada estéril.

En los ensayos en soporte semisólido, las semillas se incubaron en esta suspensión a 28°C y 120 rpm durante 1 hora y, posteriormente, se dispusieron en placas cuadradas de 12x12 cm. Estas se incubaron a 21°C en oscuridad durante 48 horas y se trasladaron a un invernadero a 25°C con un fotoperiodo de día largo (luz:oscuridad, 16:8 horas) durante 7 días (Fig. 11A). En el caso de los ensayos en soporte líquido, se añadió 1 mL de medio MS al 0,8% (p/v) de agar sobre un portaobjetos estéril y una vez que éste solidificó, se depositó una semilla. Posteriormente, esta se cubrió con 1 mL del mismo medio y cada portaobjetos se introdujo verticalmente en un tubo de centrifuga de 50 mL que contenía 15 mL de medio MS suplementado con 2,5 g/L de sacarosa y un 1% (v/v) de la suspensión de cada cepa previamente descrita. Igualmente, los tubos se incubaron a 21°C en oscuridad durante 48 horas y posteriormente se trasladaron a un invernadero en las mismas condiciones que el ensayo anterior durante 7 días (Fig. 11B).

Transcurridos 7 días, las plantas de ambos ensayos se separaron cuidadosamente de sus respectivos soportes y se sumergieron 3 veces en agua destilada estéril para eliminar las células no adheridas a la raíz. Se analizó la colonización epífita y endófito de las cepas mediante dilución seriada y recuentos en placa, tras triturar las raíces en un mortero. Para los recuentos de endófitos, las plantas se desinfectaron en superficie empleando etanol 70% (v/v) durante 1 minuto, seguido de lejía comercial al 2% (v/v) en agua durante 3 minutos y en etanol 70% (v/v) durante 30 segundos, para finalmente realizar tres lavados con agua destilada estéril. Para los recuentos de epifitos, las raíces se trituraron sin desinfección y se calculó su valor por diferencia con el recuento de endófitos.

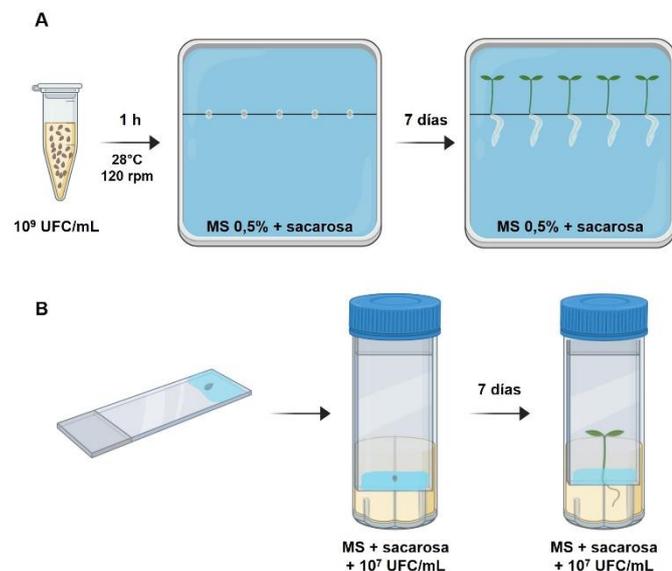


Figura 11. Estudio de la colonización de raíces de tomate por las cepas seleccionadas. A, ensayo en placa empleando un soporte semisólido; B, ensayo en tubo de centrifuga empleando un soporte líquido. MS, medio Murashige y Skoog.

Una vez determinado el grado de colonización de las cepas de estudio, esta se analizó cualitativamente mediante microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC, *Differential Interference Contrast*) y de contraste de fases (PC, *Phase Contrast*) entre porta y cubre, empleando glicerol al 70% (v/v) como medio de montaje en un microscopio LEICA DM5500B. En el caso de la cepa *P. segetis* P6, además, se evaluó la colonización empleando la cepa marcada con GFP mediante microscopía de fluorescencia a 488 nm y mediante microscopía confocal láser de barrido (CLS, *Confocal Laser Scanning*) empleando un microscopio invertido Nikon EclipseTi-E.

9.7. Ensayos *in vivo* en invernadero

Con el fin de evaluar la efectividad *in vivo* de las cepas seleccionadas en el cultivo de tomate, se realizó un ensayo en invernadero en las instalaciones de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ-CSIC) en Granada, empleando plantones de tomate (*S. lycopersicum* L. var. Roma) libres de pesticidas suministrados por Saliplant S.L. (Santa Fe, Granada).

Los plantones de tomate se trasplantaron individualmente en macetas de 0,6 L empleando turba esterilizada como sustrato. Tras una semana de cultivo, se realizaron los tratamientos basados en la irrigación radicular con 5 mL de una suspensión bacteriana en agua destilada estéril procedente de un cultivo de 24 horas en medio TSB, tras realizar dos lavados en agua destilada estéril. Se emplearon 12 plantones para cada tratamiento y este se aplicó semanalmente durante un mes. Las plantas se mantuvieron en el invernadero durante todo el experimento en condiciones controladas con un fotoperiodo de día largo (luz:oscuridad, 16:8 horas), a una temperatura de 25°C de día y 20°C de noche, humedad relativa 60-80% y una luminosidad de 250 microsiemens/cm²/sg. A lo largo de todo el ensayo, las plantas se regaron con 150 mL de solución nutritiva Hewitt, y con agua según demanda del cultivo. Como control negativo se emplearon 12 plantones de tomate regados con agua destilada estéril.

Una vez finalizado el experimento, se recolectaron las plantas y se dividieron en dos bloques, uno se empleó para la determinación de la longitud y peso seco de la parte aérea y radicular, mientras que en el otro bloque se recolectaron únicamente las hojas y se trituraron en nitrógeno líquido y se almacenaron tanto a -80°C, como material fresco, como liofilizadas. Posteriormente, el material vegetal recolectado se empleó en la determinación de metabolitos primarios, de la actividad del metabolismo central, del balance redox y del contenido en hormonas vegetales. Estas mediciones se realizaron en la plataforma de fenotipado metabólico (*High Throughput Metabolic phenotyping platform*, HiTMe) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Alimentarias y Ambientales (INRAE) de Burdeos (Francia) en colaboración con los doctores Yves Gibon y Pierre Petriácq. El protocolo seguido para estas determinaciones se describe a continuación.

9.7.1. Determinación de metabolitos primarios

Con el fin de evaluar el efecto que produjeron los distintos tratamientos en el metabolismo de las plantas de tomate se realizó una determinación de clorofila, aminoácidos totales, carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), principales ácidos orgánicos (malato y citrato), polifenoles, proteínas y almidón.

Obtención de extractos de metabolitos a partir de material fresco. Para el estudio de los metabolitos se emplearon 5 réplicas por cada una de las técnicas de cada tratamiento de 20 (±3) mg de material fresco y se sometieron a una extracción etanólica de metabolitos. Para ello se añadieron 250 µL de etanol 80% (v/v) en ácido 4-(2-hidroxietil)piperazinetanosulfónico (HEPES)/KOH 10mM a pH 6 y se incubó a 80°C durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante (S1) se transfirió a un tubo nuevo. El *pellet* resultante se resuspendió en 150 µL de etanol 80% (v/v) en HEPES/KOH 10mM a pH 6 y se incubó a 80°C durante 20 minutos. Se centrifugó en las mismas condiciones y el sobrenadante se mezcló con el obtenido previamente (S1+S2). Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 250 µL de etanol 50% (v/v) en HEPES/KOH 10mM a pH 6 y se incubó a 80°C durante 20 minutos.

Se centrifugó en las mismas condiciones y el sobrenadante se mezcló con los obtenidos previamente (S1+S2+S3). El *pellet* se conservó a -20°C para su uso posteriormente.

El extracto total se empleó en la determinación de clorofila, carbohidratos (sacarosa, fructosa y glucosa), aminoácidos totales, ácidos orgánicos (malato y citrato) y polifenoles, mientras que el *pellet* resultante se empleó en la determinación de almidón y de proteínas totales. En todo momento, los extractos se mantuvieron en hielo y protegidos de la luz para evitar la degradación de metabolitos sensibles. Como control de la extracción y de las posteriores determinaciones se empleó un estándar de hojas de tomate cuya concentración de metabolitos fue previamente determinada por el laboratorio de la plataforma HitMe, además de los blancos control sin muestra vegetal. Una vez obtenidos los valores de cada parámetro se normalizaron empleando el peso de muestra.

Clorofila. La cuantificación de clorofila se realizó según el protocolo descrito previamente en el apartado 9.5

Aminoácidos. El contenido en aminoácidos totales de las muestras se llevó a cabo mediante espectrofotometría de fluorescencia siguiendo el protocolo descrito por (Bantan-Polak et al., 2001). El ensayo se realizó en placas *microtiter* añadiendo los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	3 µL
Tampón Na ₂ B ₄ O ₇ 0,1 M (pH 8)	15 µL
Fluorescamina 0,1 % en acetonitrilo	90 µL
Agua destilada	100 µL

Toda la reacción se llevó a cabo en oscuridad por la fotosensibilidad del compuesto fluorescamina y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, midiendo la DO en un espectrofotómetro de fluorescencia (405 nm de excitación y 485 nm de emisión). La cuantificación de aminoácidos totales se realizó empleando una curva patrón de glutamato (0, 100, 200, 400 y 800 µM) en etanol 70% (v/v) en HEPES/KOH 10mM a pH 6.

Carbohidratos. El contenido de glucosa, fructosa y sacarosa se determinó mediante espectrofotometría a través de la formación de NADPH tras la adición secuencial de las enzimas hexoquinasa (HK), fosfoglucoasa isomerasa (PGI) e invertasa (Inv), respectivamente (E. Luna et al., 2020) El ensayo se realizó en placas *microtiter* añadiendo los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal	40 µL
Tampón HEPES/KOH 0,1M, MgCl ₂ 3mM (pH 7)	147 µL
ATP 100 mM	6 µL
NADP 45 mM	6 µL
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (750 U/mL) en HEPES/KOH.....	1 µL

Tras ello, se midió la DO a 340 nm y 37°C (1 medida/min durante 2 horas) hasta que la medida se estabilizó (aprox. 15 minutos). Fue entonces cuando se añadieron secuencialmente las enzimas en cada pocillo y se midió la DO hasta que se estableció antes de añadir la siguiente enzima:

HK (900 U/mL en tampón HEPES/KOH).....	1 µL
PGI (1.000U/mL en tampón HEPES/KOH)	1 µL
Inv (30.000 U/mL en tampón HEPES/KOH)	1 µL

La concentración de cada carbohidrato se determinó mediante la variación de la DO (ΔDO) asociada a la formación de NADPH tras la adición de cada enzima, aplicando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta DO / 2,85 * 6,22$$

Ácidos orgánicos. La actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos de las plantas se evaluó mediante la determinación de citrato y malato. En el caso del citrato, la determinación se realizó empleando el kit comercial *Citric Acid Assay Kit* (Megazyme®) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cambio, se siguió el método descrito por (Nunes-Nesi et al., 2007) para la determinación de malato mediante la intervención de las enzimas glutamato-oxoglutarato aminotransferasa (GOT) y malato deshidrogenasa (MDH). El ensayo se realizó en placas *microtiter* añadiendo los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	20 μL
Tampón Tricina/KOH 0,1M (pH 9)	69 μL
NAD 30mM	10 μL
Glutamato 20mM	10 μL
GOT (200 U/mL en tampón Tricina/KOH).....	1 μL

Posteriormente se midió la DO a 340 nm y 20°C (1 medida/min) durante 15 min y se añadieron 2 μL de enzima MDH (1.000 U/mL en tampón Tricina/KOH) en cada pocillo. Una vez que la DO se estabilizó, se añadió 1 μL de enzima fumarasa (100 U/mL en tampón Tricina/KOH) y se midió la DO durante 1,5 horas.

La concentración de malato se determinó mediante la variación de la DO (ΔDO) asociada a la formación de NADH tras la adición de cada enzima, aplicando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol NADH} = \Delta DO / 2,85 * 6,22$$

Compuestos fenólicos. El contenido en compuestos fenólicos totales se determinó siguiendo el protocolo descrito por (Vinson et al., 2001) con algunas modificaciones, en el que se emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). Todo el procedimiento se realizó en placas *microtiter* protegiendo las muestras de la luz, y añadiendo los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	10 μL
Reactivo de Folin-Ciocalteu	10 μL
Agua destilada	150 μL

La reacción se incubó durante 8 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 30 μL de Na_2CO_3 al 20% (p/v) en cada pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos y se midió la DO a 700 nm. La concentración de fenoles totales se calculó mediante una curva patrón de ácido pirogálico (0, 100, 200 y 500 mg/L) en etanol 70%.

Obtención de extractos para la determinación de proteínas y almidón. El *pellet* obtenido previamente tras la extracción de metabolitos se sometió a una extracción en medio básico para la determinación de proteínas y de almidón. Para ello, el *pellet* se resuspendió en 400 μL de NaOH 0,1M, se agitó y se incubó a 95°C durante 30 minutos. Tras ello se enfrió a temperatura ambiente,

se agitó de nuevo y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se empleó en la determinación de proteínas y almidón.

Proteínas. La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando 5 μ L de extracto y 180 μ L del reactivo de Bradford (Thermo Fisher) en cada pocillo. Las placas se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, para finalmente medir la DO a 595nm. La cuantificación de proteínas en las muestras se llevó a cabo empleando una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) (0, 80, 160, 320 y 640 μ g/mL) en NaOH 0,1M y los resultados se expresaron como mg/g.

Almidón. El almidón en las muestras se determinó mediante espectrofotometría tras la digestión de este con las enzimas amiloglucosidasa y α -amilasa hasta monómeros de glucosa y la posterior determinación de la formación de NADPH (Hendriks et al., 2003). La digestión se llevó a cabo en tubos Micronic® de 1,1 mL resuspendiendo el *pellet* del extracto obtenido previamente y se procedió de la siguiente forma. Se ajustó el pH de la suspensión a un valor de 4 - 5 empleando el tampón HCl 0,5M, acetato sódico/NaOH 0,1M (pH 4,9). Seguidamente se añadieron 100 μ L de una suspensión de la enzima amiloglucosidasa (50 U/mL en tampón acetato/NaOH 50 mM, pH 4,9) y la enzima α -amilasa (30 U/mL en tampón acetato/NaOH 50 mM, pH 4,9) en cada pocillo y se incubó a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 2500 rpm durante 10 min y se transfirieron 30 μ L de sobrenadante a cada pocillo de una placa *microtiter*, al que se añadieron los siguientes reactivos:

Tampón HEPES/KOH 0,1M, MgCl ₂ 3mM (pH 7)	147 μ L
ATP 100 mM	6 μ L
NADP 45 mM	6 μ L
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (750 U/mL) en HEPES/KOH.....	1 μ L

Tras ello, se midió la DO a 340 nm y 20°C (1 medida/min) durante 15 min hasta que la DO se estabilizó y entonces se añadió 1 μ L HK (900 U/mL en tampón HEPES/KOH 0,1M, MgCl₂ 3mM, pH 7) en cada pocillo. La DO se midió hasta que se estabilizó (aprox. 45 min).

La concentración de almidón se determinó mediante la variación de la DO (Δ DO) asociada a la formación de NAPDH tras la adición de cada enzima, aplicando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{DO} / 2,85 * 6,22$$

9.7.2. Determinación de la actividad enzimática del metabolismo central

El impacto de los distintos tratamientos en el metabolismo central de las plantas de tomate se evaluó mediante la determinación de la actividad de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49), ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO, EC 4.1.1.39), NAD-glutamato deshidrogenasa (NAD-GDH, EC 1.4.1.2), NADP gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP-GAPDH, EC 1.2.1.13), nitrato reductasa (NR, EC 1.7.1.1), así como la invertasa ácida vacuolar (VInv, EC 3.2.1.26) y la invertasa de la pared celular (CWInv, EC 3.2.1.26).

Obtención de extractos para la determinación de la actividad enzimática. Para ello, se realizó una extracción de enzimas solubles partiendo de 20 mg de material fresco de cada muestra y se siguió el protocolo descrito por (Gibon et al., 2004) que emplea 500 μ L de tampón de extracción, cuya composición es la siguiente:

Glicerol	10% (v/v)
Tampón HEPES/KOH pH 7,5	50 mM μ L
BSA	0,25% (p/v)
Triton X-100	0,1% (v/v)
MgCl ₂	10 mM
Leupeptina	10 mM
EDTA	1 mM
Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N, N',N'-tetraacético (EGTA)	1 mM
Benzamidina	1 mM
Ácido ϵ -aminocaprónico	1 mM
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	1 mM
1,4-ditiotreitol (DTT)	1 mM

La extracción se llevó a cabo en un molino a 20 Hz durante 2 minutos empleando bolas de acero (\emptyset 3mm) para asegurar una adecuada homogenización. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4.000 rpm y 4°C durante 10 minutos y se separaron el sobrenadante y el *pellet*. El sobrenadante se empleó en la determinación de la actividad enzimática, mientras que el *pellet* se sometió a una segunda extracción siguiendo el protocolo previamente descrito, pero empleando 500 μ L del tampón de extracción suplementado con sorbitol 250 mM. Tras la centrifugación, el sobrenadante se empleó en la determinación de la invertasa de la pared celular (CWI). El protocolo específico para la determinación de la actividad de cada enzima se detalla a continuación.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Yves Gibon et al., 2002). La actividad de esta enzima se evaluó mediante la detección espectrofotométrica a 340 nm del NADPH formado en la transformación de glucosa-6-fosfato (G6P) en 6-fosfogluconolactona (6PG) mediada por esta enzima. Para ello, se emplearon placas *microtiter* en las que se adicionaron los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	5% (v/v)
Tampón tricina/KOH pH 8,5	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Triton X-100	0,8 mM
NADP ⁺	0,5 mM
G6P	0 mM (V_{Blank}) / 25 mM (V_{Sat})

Tras ello, se agitaron las placas y se midió la DO a 340nm y a una temperatura de 25°C hasta que la curva se estabilizó (aprox. 45 min). Finalmente, la actividad de la enzima G6PDH se calculó mediante diferencia con un blanco (V_{Blank}) en el que se empleó agua bidestilada como sustrato en lugar de glucosa-6-fosfato (V_{Sat}).

NAD-Glutamato deshidrogenasa (NAD-GDH) (Gibon et al., 2004). La actividad de la enzima GDH dependiente de NAD se evaluó mediante la determinación de NAD⁺ generado en la transformación de 2-oxoglutarato en glutamato con la intervención de amonio. Para aumentar la sensibilidad de esta medida, el NAD⁺ producido por la GDH se sometió a una reacción cíclica de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) que da lugar a la reducción del NAD⁺ a NADH. Paralelamente, este NADH es oxidado a NAD⁺ a expensas de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en presencia de etosulfato de fenazina (PES), que actúa como donador de electrones, dando lugar a la formación de MTT reducido, un compuesto insoluble de tipo formazan con absorbancia a 570nm (Fig. 12) (Y. Gibon et al., 2002).

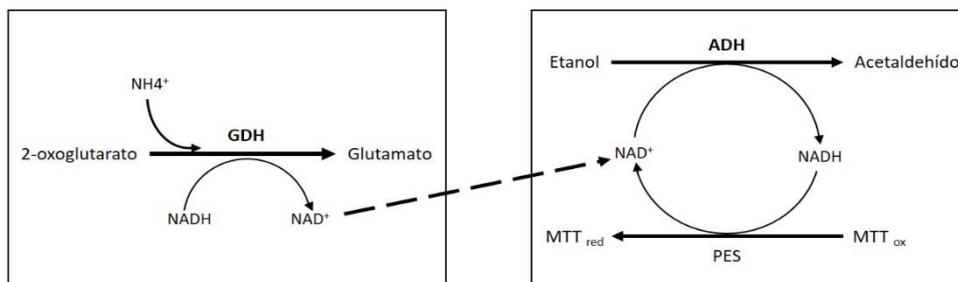


Figura 12. Representación de la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) y su posterior acoplamiento a la reacción cíclica de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) asociada a la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en presencia de etosulfato de fenazina (PES). MTT_{red}, MTT reducido; MTT_{ox}, MTT oxidado.

En base a este principio, la actividad de la GDH se evaluó en placas *microtiter* empleando los extractos previamente obtenidos mediante el siguiente protocolo. La primera reacción se inició tras la adición de los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	10% (v/v)
Tampón tricina/KOH pH 8,5	100 mM
Triton X-100	0,8 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mM
Acetato de amonio	640 mM
NADH	0,1 mM
2-oxoglutarato	0 mM (V _{Blank}) / 15 mM (V _{Sat})

Tras incubar a 25°C durante 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 20 µL de HCl 0,5 M en tampón tricina/KOH 0,1 M a pH 9 y se incubó a 90°C durante 10 minutos para eliminar cualquier excedente de NADH. Tras un enfriamiento rápido de las placas, se neutralizó el pH mediante la adición de 20 µL de NaOH 0,5 M por pocillo. Posteriormente, se procedió a la reacción cíclica mediante la adición de los siguientes reactivos:

Tampón tricina/KOH pH 9	100 mM
MTT	0,6 mM
EDTA	4 mM
Etol absoluto.....	500 mM
Alcohol deshidrogenasa (ADH)	6 U/mL
PES	0,1 mM

La reacción se inició con la adición de PES y se midió la absorbancia inmediatamente a 570 nm hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 45 min). Toda la reacción se llevó a cabo en oscuridad puesto que los compuestos MTT y PES son fotosensibles. Finalmente, la actividad de la enzima NAD-GDH se calculó mediante diferencia con un blanco (V_{Blank}) en el que se empleó agua bidestilada como sustrato en lugar de 2-oxoglutarato (V_{Sat}) y empleando una curva patrón de NAD⁺ (0, 50, 100 y 200 µM).

NADP-Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP-GAPDH) (Gibon et al., 2004). La actividad de la enzima GAPDH dependiente de NADP se evaluó en los extractos previamente obtenidos mediante acoplamiento con una reacción cíclica como las descritas previamente, pero en este caso se empleó la formada por las enzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y glicerol-3-fosfato oxidasa (G3POX) que intervienen en la transformación continua de dihidroxiacetona-fosfato (DAP) y glicerol-3-fosfato (G3P) mediante la oxidación de NADH (Fig. 13).

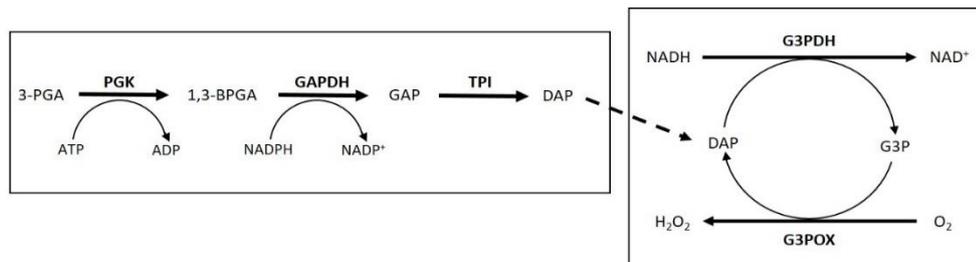


Figura 13. Representación de la actividad de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-GAPDH) y su posterior acoplamiento a la reacción cíclica de las enzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y glicerol-3-fosfato oxidasa (G3POX). 3-PGA, 3-fosfoglicerato; PGK, fosfoglicerato kinasa; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; 1,3-BPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; TPI, triosa-fosfato isomerasa; DAP, dihidroxiacetona-fosfato; G3P, glicerol-3-fosfato.

En base a esto, la actividad de esta enzima se evaluó en placas *microtiter* mediante la adición de los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	10% (v/v)
Tampón tricina/KOH pH 8	100 mM
MgCl ₂	30 mM
KCl	20 mM
EDTA	2 mM
Triton X-100	0,8 mM
DTT	5 mM
PGK	10 U/mL
TPI	1 U/mL
ATP	5 mM
3-PGA	0 mM (V _{Blank}) / 6 mM (V _{Sat})

La reacción se inició con la adición de NADPH hasta una concentración 0,5 mM en cada pocillo y se incubó a 25°C durante 20 minutos. Tras ello, se detuvo la reacción mediante la adición de 20 µL de HCl 0,5 M en tampón tricina/KOH 0,1 M a pH 9 y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se neutralizó el pH mediante la adición de 20 µL de NaOH 0,5 M y se inició la reacción cíclica mediante la adición de los siguientes reactivos:

Tampón tricina/KOH pH 8	100 mM
MgCl ₂	1,5 mM
GDH	0,7 U/mL
GPOX	1,8 U/mL
NADH	1 mM

Tras ello, se midió la DO a 340 nm hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 30 min.) y la actividad de la enzima NADP-GDH se calculó mediante diferencia con un blanco (V_{Blank}) en el que se empleó agua bidestilada como sustrato en lugar de 3PGA (V_{Sat}) y empleando una curva patrón de DAP (0, 50, 100 y 200 µM).

Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) (Sulpice et al., 2009). La actividad de la enzima RuBisCO se evaluó tras una serie de reacciones enzimáticas que dieron lugar a dihidroxiacetona-fosfato (DAP) y su posterior acoplamiento a la reacción cíclica G3PDH/G3POX previamente descrito (Fig. 14).

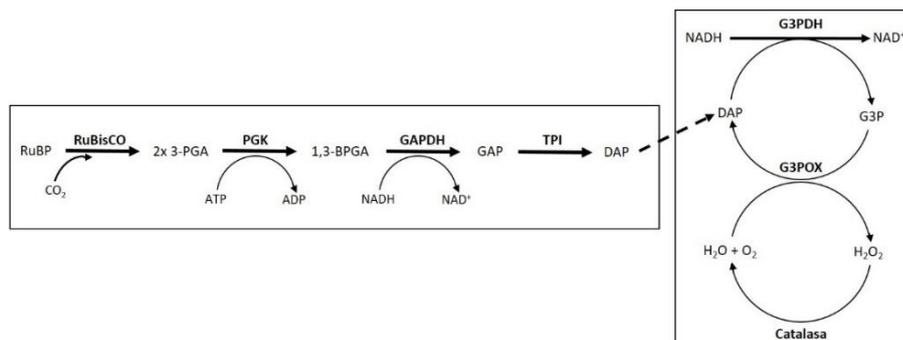


Figura 14. Representación esquemática de la determinación de la actividad de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) mediante acoplamiento a la reacción cíclica de las enzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y glicerol-3-fosfato oxidasa (G3POX). RuBP, ribulosa-1,5-bisfosfato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; PGK, fosfoglicerato kinasa; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; 1,3-BPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; TPI, triosa-fosfato isomerasa; DAP, dihidroxiacetona-fosfato; G3P, glicerol-3-fosfato.

La determinación de la actividad de esta enzima se llevó a cabo en placas *microtiter* en las que se añadieron los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal	10% (v/v)
Tampón tricina/KOH pH 8	100 mM
EDTA	2 mM
Triton X-100	8 mM
MgCl ₂	20 mM
NaHCO ₃	10 mM
Ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP)	0 mM (V _{Blank}) / 1 mM (V _{Sat})

La reacción se inició con la adición de los extractos de material vegetal a una concentración del 10% (v/v) en cada pocillo y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 minuto. Inmediatamente después, se detuvo la reacción mediante la adición de 20 µL de etanol 80° y se incubó en las mismas condiciones durante 5 minutos para desnaturalizar las enzimas. Tras ello se añadieron 50 µL de agua bidestilada en cada pocillo y se iniciaron las reacciones cíclicas mediante la adición de los siguientes reactivos:

Tampón tricina/KOH pH 8	100 mM
MgCl ₂	1,5 mM
PGK	5 U/mL
ATP	0,5 mM
NAD-GAPDH	0,5 U/mL
NADH	1 mM
TPI	0,5 U/mL
G3PDH	0,5 U/mL
G3PDH	0,5 U/mL
Catalasa	1000 U/mL

Tras ello se midió la absorbancia a 340 nm hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 30 min.), y se determinó la actividad mediante diferencia entre la reacción empleando RuBP como sustrato (V_{Max}) y la cinética empleando agua destilada (V_{Blank}), así como una curva patrón de 3-PGA (0, 20, 40 y 80 µM).

Nitrato reductasa (NR) (Gibon et al., 2004). La actividad de esta enzima se evaluó mediante la reacción colorimétrica resultante de la interacción entre los nitritos y la sulfanilamida que dan lugar a una sal de diazonio. Posteriormente, esta sal reacciona con el N-(1-naftil) etilendiamino dihidrocloruro (NNEDA) para formar una amina aromática que absorbe a 540 nm. Para ello, se distribuyeron los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	10% (v/v)
Tampón HEPES/KOH pH 7,5.....	50 mM
Triton X-100	0,8 mM
EDTA	2 mM
KNO ₃	20 mM
Na ₂ MoO ₄	10 mM
1,4-ditiotreitol (DTT)	0,5 mM
Leupeptina	20 μM
Flavín adenín dinucleótido (FAD)	0,1 mM
Acetato de magnesio	0 mM (V _{Max}) / 15 mM (V _{Sel})

La reacción enzimática se inició con la adición de NADH hasta una concentración final de 0,5 mM en cada pocillo. Las placas se incubaron a 25°C durante 20 y 40 minutos. Tras ello, la reacción se detuvo por la adición de 20 μL de acetato de zinc 0,6 M por pocillo y se protegió de la luz para añadir 20 μL de PES. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 100 μL de sulfanilamida al 0,5% (p/v) y N(1-naftil) etilendiamina diclorhidrato (NNEDA) al 0,01% (p/v) ambos disueltos en ácido ortofosfórico al 2,5 % (v/v). Seguidamente se midió la DO a 540 nm hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 30 min) y se determinó la actividad de la enzima mediante diferencia entre la reacción empleando nitrato de potasio como sustrato (V_{Max}) y la cinética empleando acetato de magnesio como competidor por la enzima (V_{Sel}) y con la ayuda de una curva patrón de NaNO₂ (0; 0,5; 1 y 2 mM).

Invertasa ácida (VInv y CWInv) (Y. Gibon et al., 2002). La actividad de la enzima invertasa ácida vacuolar (VInv), así como la de la pared celular (CWInv) se determinó mediante la detección espectrofotométrica a 340 nm del NADPH formado en la reacción de transformación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona (Fig. 15).

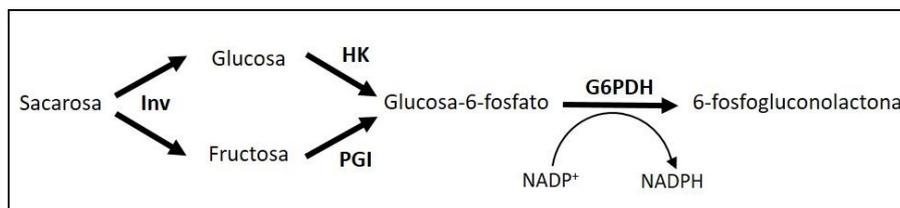


Figura 15. Representación esquemática de la actividad de la enzima invertasa ácida y su mecanismo de detección. Inv, invertasa ácida; HK, hexoquinasa; PGI, fosfogluconolactona isomerasa; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La determinación de ambas enzimas se realizó en placas *microtiter* empleando los extractos previamente obtenidos con o sin sorbitol para la determinación de CWInv y de VInv, respectivamente, a los que se añadieron los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal.....	10% (v/v)
Tampón acetato sódico/KOH (pH 5)	50 mM
Sacarosa	20 mM
Triton X-100	0,5 mM

Las placas se incubaron a 25°C durante 40 minutos. Tras ello, se añadieron 30 µL de imidazol 4M (pH 7,6) por pocillo, se cubrieron las placas con láminas adhesivas de aluminio y se incubaron a 98°C durante 10 minutos. Posteriormente y tras un enfriamiento rápido, las placas se centrifugaron a 4.000 rpm durante 2 minutos. Las reacciones para la determinación de la actividad de la enzima se iniciaron mediante la adición de los siguientes reactivos:

Tampón HEPES/KOH pH 7	100 mM
ATP	3 mM
NADP ⁺	0,6 mM
G6PDH grado II	10 U/mL

Tras ello, se agitaron las placas y se midió la absorbancia a 340 nm hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 15 min.). Posteriormente se añadieron las enzimas hexoquinasa y fosfoglucosa isomerasa (1 U/mL) en cada pocillo y se midió la absorbancia a 340 nm hasta que la cinética fue estable (aprox. 90 min.). Finalmente, la actividad de la enzima se determinó mediante una curva patrón de glucosa (0; 0,2; 0,5; 1 mM).

9.7.3. Análisis del estado redox

La forma en que los distintos tratamientos interfirieron en el balance redox de las plantas se evaluó mediante la determinación de los niveles de ascorbato total, reducido y oxidado (Asc, AscA y DHA, dehidroascorbato), de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG), de cofactores redox (NAD⁺, NADH, NADP⁺ y NADPH) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para cada análisis se emplearon 5 réplicas técnicas de 50 mg de material fresco para la determinación de ascorbato y NAD⁺ y NADP⁺, así como otros 50 mg para la determinación de NADH y NAPH, mientras que la determinación de peróxido de hidrógeno requirió muestras de 200 mg de material fresco.

Obtención de extractos para la determinación de ascorbato, glutatión y NAD⁺ y NADP⁺. El material vegetal se sometió a una extracción ácida empleando 500 µL de HCl 0,1M en tubos Micronic® de 1,1 mL. Ésta se llevó a cabo en molino a 20 Hz durante 2 minutos empleando bolas de acero (∅ 3mm) para asegurar una adecuada homogenización. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 4.000 rpm y 4°C durante 15 minutos y el sobrenadante se empleó en las siguientes determinaciones.

Ascorbato total, reducido y oxidado (Gillespie & Ainsworth, 2007). La determinación de ascorbato reducido (AscA) se llevó a cabo mediante la detección espectrofotométrica de un complejo formado por 2,2'-bipiridina y el ion ferroso (Fe⁺²) generado tras la reducción del ion férrico por parte del ácido ascórbico reducido (AscA) presente en las plantas (Fig. 16). Por otra parte, el ascorbato total (Asc) se determinó por el mismo método, pero tratando las muestras con 1,4-ditiotreitol (DTT) que provoca la reducción del ascorbato oxidado (DHA). Por último, el contenido en ascorbato oxidado se calculó por diferencia entre el ascorbato total y el reducido.

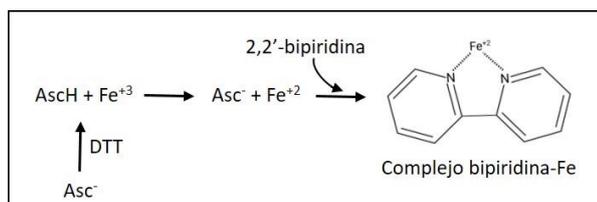


Figura 16. Representación esquemática de las reacciones implicadas en la determinación de ascorbato reducido (AscH) y ascorbato oxidado (Asc) mediante la formación de un complejo entre el ion ferroso (Fe^{+2}) y el 2,2'-bipiridina.

Las determinaciones de Asc y de AscA se realizaron en paralelo en placas *microtiter* empleando el siguiente protocolo. Se dispusieron 20 μ L de extracto ácido de cada muestra vegetal en cada pocillo y se añadió el mismo volumen del compuesto DTT 5 mM (Asc) o de tampón fosfato sódico (PBS) 0,4 M (pH 7,4) (AscA). Las placas se cubrieron con láminas de aluminio adhesivas, se agitaron enérgicamente y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. El exceso de DTT se eliminó mediante la adición de 10 μ L de N-etilmaleimida (NEM) 40 mM (Asc_{Tot}) o de PBS 0,4 M (pH 7,4) (AscA). Se agitaron las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 80 μ L del reactivo de revelado en cada pocillo. Este se preparó protegido de la luz y en el momento de la determinación mediante el mezclado de las soluciones A y B, cuya composición se detalla a continuación:

	Ácido ortofosfórico	6M
Solución A	Ácido tricloracético	280 mM
	$FeCl_3$	40 mM
Solución B	2,2'-bipiridina en etanol 70°.....	250 mM

Finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante 40 minutos y se midió la absorbancia a 520 nm hasta que la cinética se estabilizó.

Las concentraciones de ascorbato reducido y de ascorbato total se determinaron mediante extrapolación de las lecturas de DO correspondientes a cada placa empleando una curva patrón de ácido ascórbico (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,5; 2 y 2,5 mM) en HCl 0,1 M. Por último, la concentración de ascorbato oxidado se calculó por diferencia entre el total y el reducido.

Glutación reducido y oxidado (GSH/GSSG) (Pierre Pétriacq et al., 2012). La concentración de glutación total (GSH_{Tot}) presente en las plantas tras aplicar los distintos tratamientos se determinó mediante la reacción entre el glutati6n en su forma reducida (GSH) con el ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenz6ico) (DTNB) que da lugar a la formaci6n de ácido 5-tio-2-nitrobenz6ico (TNB), cuantificable por espectrofotometría a 412 nm (Fig. 17). Por otra parte, para la determinaci6n del glutati6n oxidado (GSSG), las muestras se trataron previamente con 4-vinilpiridina (VPD) que se une covalentemente al glutati6n reducido presente impidiendo su interferencia en la determinaci6n.

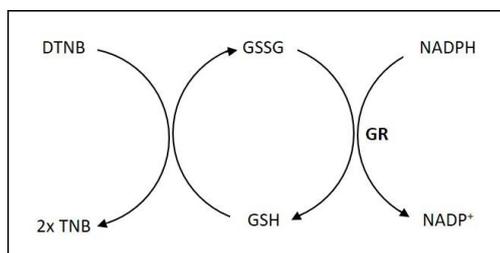


Figura 17. Representaci6n esquemática de las reacciones empleadas en la determinaci6n de glutati6n reducido (GSH) y oxidado (GSSG) mediante la formaci6n del ácido 5-tio-2-nitrobenz6ico (TNB) empleando el ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenz6ico) (DTNB) como sustrato. La enzima glutati6n reductasa (GR) interviene en la transformaci6n de GSSG a GSH a expensas del NADPH.

En base a esto, se realizaron dos mediciones de forma paralela en placas *microtiter* para determinar la concentraci6n de glutati6n total (GSH_{Tot}) y de glutati6n oxidado (GSSG). Para ambas mediciones se transfirieron 250 μ L del extracto ácido previamente obtenido a una placa *microtiter* y se neutralizó aadiendo 50 μ L de PBS 0,2M (pH 5,6) y NaOH 0,1M hasta alcanzar un pH de 4,5 – 5.

El volumen de NaOH añadido en cada pocillo se anotó para calcular posteriormente el factor de dilución.

Para la determinación de glutatión oxidado (GSSG) se aplicó el siguiente protocolo. Se tomaron 200 μL del extracto de material vegetal neutralizado y se añadieron 4 μL de 4-vinilpiridina (VPD) 0,5M en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Seguidamente se centrifugaron las placas a 4.000 rpm y 4°C durante 15 minutos para precipitar el excedente de VPD y se transfirieron 150 μL del sobrenadante a tubos de centrifuga vacíos. Estos se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y de nuevo se transfirieron 100 μL del sobrenadante a tubos de centrifuga nuevos. Finalmente se inició la reacción de determinación mediante la adición de los siguientes reactivos:

Extracto de material vegetal	10% (v/v)
Tampón PBS (pH 7,5)	100 mM
EDTA	5 mM
DTNB.....	0,6 mM
NADPH	0,5 mM
GR	1 U/mL

Tras ello se midió la absorbancia a 412 nm hasta que la cinética se estabilizó. La concentración de GSSG en las muestras se determinó empleando una curva patrón de GSSG (0, 5, 10, 20 μM) a la que se le añadieron los reactivos de determinación previamente descritos.

Para la determinación de glutatión total (GSH_{Tot}), se empleó el extracto neutralizado sin tratar con 4-vinilpiridina (VPD) y se siguió el protocolo empleado en la determinación de GSSG a partir de la adición de los reactivos que desencadenan la reacción de detección, aunque el extracto se añadió al 5% (v/v). La concentración de GSH_{Tot} en las muestras se determinó empleando una curva patrón de GSH (0, 20, 40, 100 μM). Finalmente, los niveles de glutatión reducido (GSH) se determinaron por diferencia entre el glutatión total (GSH_{Tot}) y el reducido (GSSG).

NAD⁺ y NADP⁺ (Pierre Pétriacq et al., 2012). El impacto que tuvieron los distintos tratamientos en los niveles de NAD⁺ y NADP⁺ se determinó mediante las reacciones cíclicas de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, respectivamente, ambas acopladas a la reacción de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en presencia de etosulfato de fenazina (PES), que da lugar a MTT reducido, un compuesto de tipo formazán que absorbe a 570 nm (Fig. 18).

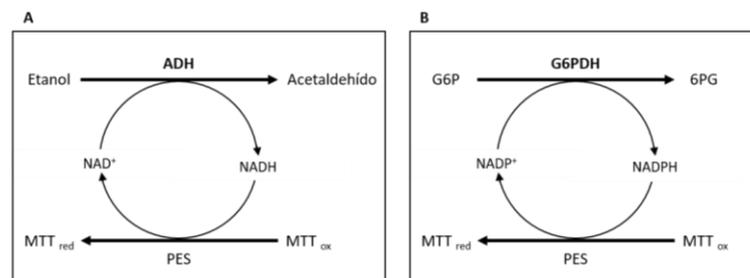


Figura 18. Representación esquemática de las reacciones cíclicas necesarias para la determinación de NAD⁺ mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (A) y de NADP⁺ mediante la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (B), ambas acopladas a la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con la intervención del etosulfato de fenazina (PES), como donador de electrones. G6P, glucosa-6-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconolactona; MTT_{red}, MTT reducido; MTT_{ox}, MTT oxidado.

Para el análisis de ambos compuestos se tomaron 50 μL del extracto ácido previamente obtenido y se incubaron a 95°C durante 5 minutos para promover la degradación de las formas reducidas. Posteriormente, se enfriaron en hielo y se neutralizaron con 50 μL de NaOH 0,1M.

La determinación de NAD^+ se llevó a cabo en oscuridad y empleando placas *microtiter* mediante la adición de los siguientes reactivos:

Extracto vegetal neutralizado.....	10% (v/v)
Tampón Tricina/KOH (pH 9)	40 mM
MgCl_2	2 mM
EDTA	8 mM
MTT	1 mM
Etanol absoluto	1% (v/v)
ADH.....	0 (V_{Blank}) / 20 (V_{Sat}) U/mL

Igualmente, la determinación de NADP^+ se llevó a cabo en las mismas condiciones mediante la adición de los siguientes reactivos:

Extracto vegetal neutralizado.....	10% (v/v)
Tampón Tricina/KOH (pH 9)	40 mM
MgCl_2	2 mM
EDTA	8 mM
MTT	1 mM
G6P	5 mM
G6PDH	0 (V_{Blank}) / 5 (V_{Sat}) U/mL

En ambos casos, la reacción se inició con la adición de PES hasta una concentración final de 0,2 mM y se midió la absorbancia a 570 nm y 37°C hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 20 min.). La concentración de NAD^+ y NADP^+ en las muestras se determinó por sustracción con un blanco (V_{Blank}) en el que no se adicionó la enzima correspondiente, y empleando una curva patrón de NAD^+ o de NADP^+ (0, 1, 2, 4 y 10 μM).

Extracción y determinación de NADH y NADPH (P. Pétriacq et al., 2012). La determinación de los niveles de NADH y NADPH se llevó a cabo tras realizar una extracción básica de 20 mg de material fresco empleando 100 μL de NaOH 0,1M en tubos Micronic® de 1,1 mL. Los tubos se agitaron enérgicamente y se incubaron a 95°C durante 5 minutos para promover la degradación de NAD^+ y NADP^+ . Posteriormente los tubos se centrifugaron a 4.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Finalmente se tomaron 50 μL del sobrenadante y se neutralizaron con el mismo volumen de HCl 0,1M tamponado con Tricina/KOH 10 mM.

La determinación de NADH y NADPH se realizó protegiendo las placas de la luz y siguiendo el mismo protocolo que en la de sus homólogos oxidados, basado en las reacciones cíclicas de las enzimas ADH y G6PDH, pero empleando metosulfato de fenazina (PMS), como donador de electrones, y 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), como compuesto indicador de la reducción a 600 nm, puesto que pierde su color amarillo conforme se produce su reducción en la reacción cíclica. Así la determinación de NADH se llevó a cabo en placas *microtiter* añadiendo los siguientes reactivos:

Extracto vegetal neutralizado..... 5% (v/v)
 Tampón HEPES/KOH (pH 7,5) 50 mM
 EDTA 1 mM
 DCPIP 0,1 mM
 Etanol absoluto 8% (v/v)
 ADH..... 0 (V_{Blank}) / 130 (V_{Sat}) U/mL

La determinación de NADPH se realizó añadiendo los siguientes reactivos:

Extracto vegetal neutralizado..... 5% (v/v)
 Tampón HEPES/KOH (pH 7,5)..... 40 mM
 EDTA 8 mM
 DCPIP 0,1 mM
 G6P 0,5 mM
 G6PDH 0 (V_{Blank}) / 20 (V_{Sat}) U/mL

En ambos casos, la reacción se inició con la adición de PMS hasta una concentración final de 0,5 mM y se midió la absorbancia a 600 nm y 37°C hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 20 min.). La concentración de NADH y NADPH en las muestras se determinó por sustracción con un blanco (V_{Blank}) en el que no se adicionó la enzima correspondiente, y empleando una curva patrón de NADH o NADPH (0, 1, 2 y 4 μM).

Extracción y determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Junglee et al., 2014). La determinación de H_2O_2 se llevó a cabo mediante el principio de la oxidación del yoduro de potasio (KI) por el peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas, lo que da lugar a la formación de yodo molecular (I_2). Posteriormente, éste reacciona con el yoduro (I^-) presente en el medio dando lugar a la formación de iones triyodo (I_3^-) que producen una coloración amarilla detectable a 350 nm (Fig. 19).

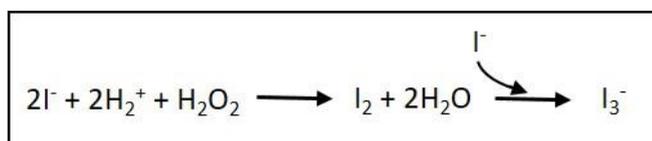


Figura 19. Representación esquemática de la reacción de formación de iones triyodo a partir de yoduro potásico (KI) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en medio ácido.

Así, para la determinación de H_2O_2 , cada réplica de material vegetal fresco se dividió en dos de 100 mg, una se empleó como blanco (B) y la otra como reacción (R). La extracción se llevó a cabo protegiendo los extractos de la luz en todo momento y empleando 600 μL del siguiente tampón de extracción:

Ácido tricloroacético (TCA) 2,5% (v/v)
 Tampón fosfato potásico pH 8..... 25 mM
 Yoduro potásico..... 0 mM (B) / 500 mM (R)

Los tubos se incubaron a 4°C durante 2 minutos para permitir que el tampón de extracción impregnara el material vegetal, y, posteriormente, se procedió a una extracción en molino a 20 Hz durante 2 minutos empleando bolas de acero (\varnothing 3mm). De nuevo se incubaron los tubos a 4°C durante 10 minutos y se centrifugaron a 4.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Finalmente se transfirieron 10 μL del sobrenadante a placas *microtiter* y se midió la DO a 350 nm y 25°C hasta que la cinética se estabilizó (aprox. 45 min.). La concentración de peróxido de hidrógeno se determinó

mediante sustracción de la DO del blanco y con la ayuda de una curva patrón de H₂O₂ (0, 25, 50, 75 y 100 µM) en TCA.

9.7.4. Análisis de hormonas vegetales

El estudio del perfil hormonal de las plantas de tomate incluyó ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA3), ácido indolacético (IAA) y metiljasmonato (MeJa) mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a espectrometría de masa (MS, *Mass Spectrometry*) tras realizar una extracción alcohólica del material vegetal. La extracción se llevó a cabo empelando 20 mg de cada muestra en tubos Micronic® de 1,1 mL y se añadieron 300 µL de una solución de extracción, compuesta por etanol 70°, ácido fórmico al 0,1% (v/v) y metilvanillato (250 µg/mL), como estándar interno para espectrometría de masas. Los tubos se agitaron enérgicamente y se sonicaron a 37 kHz en un baño con hielo durante 15 minutos (Elmasonic S300, Elma). Posteriormente se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos. Sobre el *pellet* se realizó una segunda extracción en las mismas condiciones. Finalmente, se mezclaron los sobrenadantes de ambas extracciones, obteniendo 600 µL de extracto y se filtraron empleando placas *microtiter* de 96 pocillos (MSGVS2210, 0,22 µm, fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófilo, Durapore® de baja unión de proteínas, Millipore).

La determinación se llevó a cabo en un dispositivo *Ultimate* 3000 UHPLC acoplado a un espectrómetro LTQ-Orbitrap Elite mediante ionización negativa por electrospray (ESI-) siguiendo el protocolo descrito por (Estrella Luna et al., 2020) y empleando varios controles de calidad de concentración conocida, previamente analizados, y varios blancos para eliminar posibles interferencias en la determinación.

Las señales obtenidas de la espectrometría de masas se procesaron empleando el *software* XCMS v3.6.1 (Smith et al., 2005) y se seleccionaron aquellas que cumplieron los siguientes requisitos: ausencia en los blancos, variación del tiempo de retención menor a 60 segundos ($\Delta RT < 60s$), variación de la masa/carga inferior a 0,015 Da ($\Delta m/z < 0,015 Da$) y un coeficiente de variación de los controles de calidad inferior al 30% (CV QC < 30%). Las señales que cumplieron estos requisitos se normalizaron por mediana, se transforman por raíz cúbica y se aplicó la distribución de Pareto para realizar un posterior análisis estadístico multivariable (MVA) empleando la utilidad *MetaboAnalyst* v.3 (Xia et al., 2015). El análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) se realizaron con un intervalo de confianza del 95%.

9.8. Determinación de la tolerancia al estrés hídrico en *A. thaliana*

Con el propósito de evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas para promover la tolerancia al estrés hídrico *in vitro* en plantas de *A. thaliana* Col-0, inicialmente se estudió la tolerancia de estas al polietilenglicol (PEG) 8000, empleado como agente inductor de estrés hídrico. Para ello se realizaron ensayos de crecimiento en medio TSB diluido 1/10 (TSB 1/10) y suplementado con PEG a una concentración de 0%, 5%, 10% y 15% (p/v).

Posteriormente, se analizó el crecimiento de las cepas seleccionadas en medio TSB 1/10 suplementado con PEG al 5% y al 15% (p/v) con o sin adición de exudados radiculares artificiales (ERA) en placas *microtiter* a 28°C y 100 rpm durante 72 horas en un lector de placas BioTek™ Synergy™ HTX (DO 600 nm, una lectura/30 min), con el fin de determinar la influencia de estos

compuestos en el crecimiento de las cepas. La composición de los exudados radiculares artificiales se detalla a continuación (Baudoin et al., 2003):

Glucosa	3,31 g
Fructosa.....	3,31 g
Sacarosa	3,15 g
Ácido cítrico	0,88 g
Ácido succínico.....	0,81 g
Ácido láctico	0,83 g
L-serina.....	1,93 g
Ácido L-glutámico.....	1,62 g
L-alanina	1,64 g
KKH ₂ PO ₄	1,75 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Por otra parte, se estudió la influencia que ejerce la presencia de PEG 8000 y de ARE en la formación de *biofilm* por parte de las cepas seleccionadas. Para ello se realizó un experimento de formación de *biofilm* en placas *microtiter* empleando medio TSB 1/10 suplementado o no con PEG al 5 y al 15% (p/v) y, a su vez, suplementado o no con ERA al 1% (v/v). Las placas se incubaron a 28°C sin agitación durante 72 horas y se determinó la formación de *biofilm* siguiendo el protocolo previamente descrito.

Tras estas determinaciones se realizó un ensayo de tolerancia al estrés hídrico en las plantas de *arabidopsis*. Para ello se desinfectaron las semillas siguiendo el protocolo previamente descrito en la sección 2 y se mantuvieron en imbibición durante 1,5 horas. Tras ello se sembraron en placas cuadradas con medio MS y se incubaron en una cámara de cultivo de plantas Fitotron® durante 7 días. Tras ello, se tomaron 10 plántulas en condiciones de esterilidad y se transfirieron a nuevas placas cuadradas de medio MS suplementadas con PEG 8000 al 4% (p/v). Seguidamente, se inocularon las raíces de las plantas con 1 µL de una suspensión bacteriana de cada cepa (10⁹ UFC/mL) en MgSO₄ 10 mM estéril, las placas se sellaron y se incubaron en cámara de cultivo durante 21 días en condiciones controladas con un fotoperiodo de día largo (luz:oscuridad, 16:8 horas), a una temperatura de 25°C de día y 20°C de noche, humedad relativa 60-80% y una luminosidad de 250 microsiemens/cm²/sg. Como controles, se emplearon placas de medio MS sin suplementación de PEG 8000, como control de plantas no estresadas, así como el tratamiento de las plantas con 1 µL de MgSO₄ 10 mM estéril, como control no inoculado tanto en plantas estresadas como en condiciones normales. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado, empleando 10 plántulas por placa.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recolectaron las plantas y se determinó la biomasa aérea y radicular (peso fresco y seco), el contenido en clorofila de la parte aérea y la colonización radicular, siguiendo los protocolos previamente descritos en esta sección; así como el contenido relativo en agua de las hojas (RWC, *Relative Water Content*) (Pieczyński et al., 2013). Para el cálculo de este último se recolectaron 3 hojas de cada planta, se determinó su peso fresco (PF) y su sumergieron en agua destilada durante 18 horas. Tras ello, se determinó el pedo saturado de agua (PSat) y posteriormente se secaron en un horno a 80 °C durante 24 horas, para finalmente determinar el peso seco (PS). El contenido relativo de agua de las hojas se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$RWC (\%) = \frac{(PF - PS)}{(PSat - PS)} \times 100$$

10. Técnicas para el estudio de la actividad *quorum quenching*

10.1 Determinación de la actividad *quorum quenching* *in vitro*

El análisis de la actividad QQ se llevó a cabo mediante un ensayo de difusión en placa empleando C10-HSL (Fig. 20) siguiendo el protocolo descrito por (Romero et al., 2011). Para ello, se realizó un cultivo de las cepas en medio TSB a 28°C y 120 rpm durante 24 horas. Posteriormente, se adicionó C10-HSL a una concentración final de 10 µM y se incubó de nuevo en las mismas condiciones durante 24 horas. A continuación, los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos y se transfirieron 100 µL del sobrenadante a un pocillo previamente realizado en placas de LB que contenían una sobrecapa de *C. violaceum* VIR07. La incubación de estas placas se realizó a 28°C durante 24 horas, y se empleó como control negativo el medio TSB suplementado con cada AHL 10 µM. La actividad degradadora de AHL se detectó por la ausencia de coloración alrededor de los pocillos tras la incubación.

Para determinar el rango de degradación de AHLs de las cepas seleccionadas por su actividad degradadora sobre C10-HSL se siguió el mismo protocolo anterior. Se evaluó la degradación de C4-HSL, C6-HSL, 3-O-C6-HSL, C8-HSL, 3-O-C8-HSL, 3-OH-C10-HSL, C12-HSL, 3-O-C12-HSL y C14-HSL, y se emplearon los biosensores *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en las placas con medio AB-Xgal y *C. violaceum* Vir07 y CV026 en las placas con medio LB .

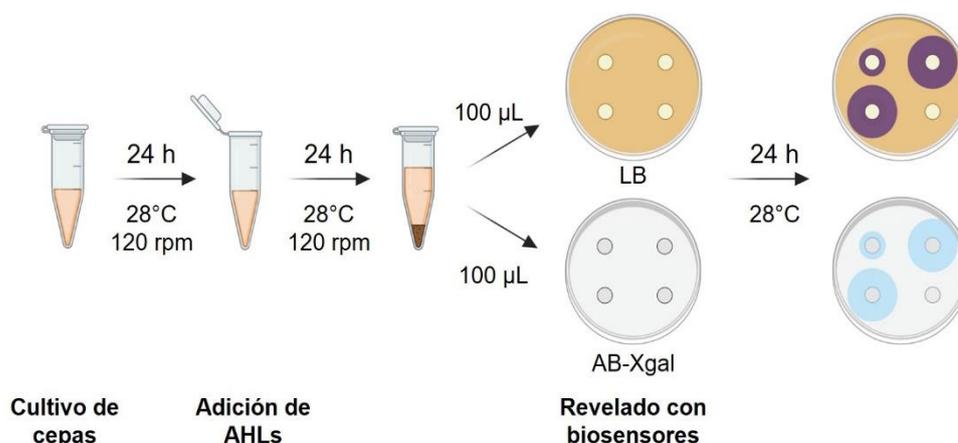


Figura 20. Ensayo de difusión en placa Petri para la determinación de *quorum quenching*.

10.2 Determinación de la actividad enzimática *quorum quenching*

El tipo de enzima implicada en la degradación enzimática de las AHLs de las cepas seleccionadas se determinó mediante la prueba de restauración del anillo lactónico a pH ácido (Yates et al., 2002). Para esta determinación se añadió C10-HSL a una concentración final de 10 µM a 1 mL de un cultivo de 24 horas en medio TSB y se incubó en las mismas condiciones durante otras 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a 12.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se dividió en dos alícuotas de 500 µL.

Una de las alícuotas se sometió a una extracción de AHLs con 500 µL de acetato de etilo y se agitó en vórtex durante 5 minutos, seguido de una centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos.

Se retiró la fase orgánica a un nuevo microtubo y se repitió la extracción en las mismas condiciones sobre la fase acuosa. Una vez obtenidas ambas extracciones, se procedió a la evaporación del acetato de etilo en un concentrador a vacío y temperatura ambiente. Finalmente, el extracto se resuspendió en 5 µL de metanol 70% (v/v) y se conservó a -20°C hasta su uso. En el caso de la otra alícuota de sobrenadante, a ésta se ajustó el pH a 2 mediante la adición de HCl 1M y se incubó a 28°C y 120 rpm durante 24 horas. De esta forma se facilitó la posible recuperación de la estructura de la molécula AHL, en caso de que se tratase de una enzima lactonasa. Posteriormente se realizó una extracción de AHLs con acetato de etilo y el extracto se resuspendió en 5 µL de metanol 70% (v/v).

Finalmente se realizó un ensayo de difusión en placa Petri empleando *C. violaceum* Vir07 como biosensor. Se realizó una sobrecapa de éste en una placa de LB agar 1,5% (p/v) y se dispusieron discos de celulosa estériles de 5 mm (∅) sobre los que se depositaron los 5 µL de los extractos obtenidos previamente. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas.

10.3 Determinación de la actividad *quorum quenching* mediante HPLC-MS

La actividad QQ de las cepas seleccionadas se determinó a través de la cuantificación de AHLs remanentes mediante una cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS, *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (Milton et al., 2001). Para ello, se añadió C10-HSL a una concentración final de 10 µM a un cultivo de las cepas seleccionadas en medio TSB y se incubó a 28°C y 120 rpm durante 24 horas. Posteriormente, se obtuvo un extracto orgánico del sobrenadante siguiendo el protocolo previamente descrito y el extracto se resuspendió en 400 µL de acetato de etilo. Como control negativo se empleó un medio TSB estéril adicionado de C10-HSL a la misma concentración, e incubado y procesado del mismo modo.

El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HPLC 1100 (Agilent) equipado con una precolumna C8 (2,1 × 12,5 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula) que se mantuvo a 45°C. La fase móvil utilizada fue ácido fórmico 0,1% (v/v) en agua y ácido fórmico 0,1% (v/v) en acetonitrilo (Romero et al., 2011). Los experimentos de espectrometría de masas (MS) se realizaron en un detector ESI-MS (Waters Synapt) y en un equipo cuádrupolo triple API 4000 (Applied Biosystem) equipado con una fuente Turbolon utilizada en modo electrospray de iones positivos y monitorización de múltiples reacciones (MRM). Las señales MRM se utilizaron para obtener información de cuantificación relativa mediante la comparación con una curva de calibración construida por abundancia de iones moleculares obtenidos a partir de AHLs sintéticas estándar.

10.4 Localización celular de la actividad *quorum quenching*

La localización celular de la actividad enzimática se determinó en el sobrenadante y en el extracto celular crudo (ECC) en 20 mL de un cultivo de las cepas en medio TSB a 28°C y 120 rpm durante 24 horas. Para ello, el sobrenadante se obtuvo por centrifugación de éste a 12.000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se esterilizó por filtración (tamaño de poro de membrana 0,22 µm). El *pellet* bacteriano se lavó dos veces con el mismo volumen de PBS, se centrifugó y se resuspendió en 5 mL del mismo tampón. Posteriormente se sometió a una lisis celular por

sonicación intermitente en un baño de hielo (35 kHz de frecuencia) y luego se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 30 min. El extracto celular crudo obtenido se filtró para su esterilización.

La concentración de proteínas se determinó en el sobrenadante y en el extracto celular por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando una solución de albúmina como patrón. Finalmente, la concentración de proteínas se ajustó a 35 µg/mL y se realizó un ensayo de degradación de AHLs con C10-HSL con cada una de las fracciones y un ensayo de difusión en placa para su detección.

10.5 Actividad quorum quenching frente a extractos de fitopatógenos

La actividad *quorum quenching* de las cepas seleccionadas frente a las AHLs producidas por los fitopatógenos *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. tomato DC3000, se evaluó frente a extractos crudos orgánicos que contienen las AHLs producidas por éstos. Cada extracto se obtuvo a partir de 5 mL de cultivos de 24 horas en medio TSB a 28°C, como se describe previamente y se resuspendió en 5 µL de metanol 70% (v/v). Éste se adicionó a 5 mL de un cultivo de 24 horas en medio TSB de cada cepa QQ y se incubó a 28°C durante 24 horas. Los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos y las AHLs presentes en el sobrenadante se extrajeron con acetato de etilo. Finalmente, se realizó un ensayo de difusión en placa Petri de estos extractos empleando discos de celulosa en medio AB-Xgal usando *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) como biosensor. Como controles se emplearon extractos obtenidos de cada patógeno y de cada cepa QQ.

10.6 Actividad quorum quenching en cocultivo con fitopatógenos

La capacidad de las cepas seleccionadas para interferir en la virulencia de los fitopatógenos mediante la degradación de AHLs *in vitro* se evaluó mediante la técnica del cocultivo entre ambos microorganismos (Fig. 21).

Ensayos de antagonismo. Para descartar mecanismos de antagonismo frente a los fitopatógenos mediado por metabolitos secundarios producidos por las cepas QQ, se realizó un ensayo de antibiosis. Para ello, se cultivaron las cepas QQ en medio TSB a 28°C y 120 rpm durante 5 días. El sobrenadante de estos, obtenido por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos, se esterilizó por filtración y se depositaron 100 µL en pocillos realizados en placas de medio TSA en las que previamente se había sembrado un tapiz de cada fitopatógeno mediante un hisopo estéril. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 horas y se determinaron los halos de inhibición alrededor de los pocillos.

Ensayos de cocultivo entre fitopatógenos y cepas QQ. Los cocultivos se llevaron a cabo en medio TSB empleando distintas concentraciones de patógeno 1:100, 5:100 y 10:100 (patógeno/cepa QQ). Para ello, se empleó un cultivo de cada patógeno tras 24 horas de incubación y se añadió en la proporción correspondiente a un cultivo de 24 horas de las cepas QQ y estos cocultivos se incubaron a 28°C y 120 rpm durante 24 horas. Para cada mezcla, se preparó un control basado en el mismo volumen de cultivo de patógeno en medio TSB y otro control basado en un cultivo de 48 horas de la bacteria QQ.

Tras 24 horas de incubación de los cocultivos y monocultivos se determinó la concentración (UFC/mL) de cada microorganismo en los cocultivos mediante diluciones seriadas y siembra en

medio TSB y en el medio selectivo MY al 5% (p/v) de NaCl para las cepas halotolerantes, a 28°C durante 24 horas.

Interferencia en actividad fenotípica mediante *quorum quenching*. La implicación de la degradación de AHLs en la virulencia de los fitopatógenos se evaluó empleando distintas pruebas metabólicas y fenotípicas tras el cocultivo de los fitopatógenos con las cepas QQ. Se evaluó la hidrólisis de ADN, almidón, caseína, celulosa, gelatina y quitina, la producción de esterasa, fosfatasa ácida y alcalina, lecitinasa, lipasas, sideróforos y surfactantes, empleando los medios de cultivo previamente descritos. Igualmente, se analizó la posible alteración en la movilidad de los fitopatógenos en placas de TSA con 0,3, 0,5 y 1% (p/v) de agar. Los cultivos puros de los fitopatógenos y de las cepas QQ se emplearon con fines comparativos en este ensayo.

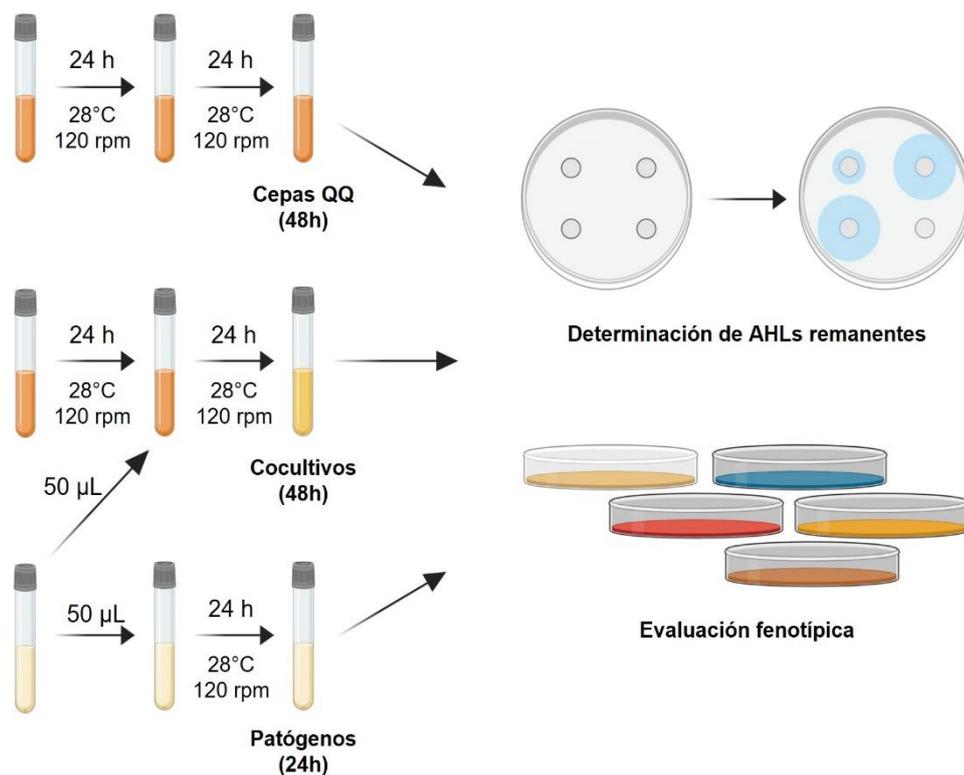


Figura 21. Interferencia en la virulencia de los fitopatógenos mediante cocultivo.

Determinación de la dosis infectiva en *arabidopsis*. Con el fin de establecer la dosis infectiva de cada fitopatógeno para los ensayos posteriores, se realizó un ensayo de infección en plantas de *A. thaliana* Col-0 (Fig. 22). Las semillas se esterilizaron como se describió anteriormente y se sembró una semilla por pocillo en placas *microtiter* de 96 pocillos que contenían 150 μ L de medio Murashige y Skoog al 0,8% (p/v) de agar suplementado con 2,5 g/L de sacarosa. Las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 21°C en oscuridad durante 48 horas. Posteriormente, se llevaron a una cámara de cultivo Fitotron® a 25°C e iluminación de día largo durante 8 días. Para la inoculación de las plántulas, se partió de 5 mL de cultivos (10^9 UFC/mL) de 24 horas de cada fitopatógeno en medio TSB, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos y se realizaron dos lavados, para finalmente resuspender las células en 5 mL de agua destilada estéril. Tras ello se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} – 10^{-7}) y se inoculó 1 μ L de cada suspensión en las proximidades de las plantas. Las placas se incubaron cámara de cultivo Fitotron® durante 7 días y se evaluó el estado de éstas. La dosis infectiva se estableció como la concentración de patógeno superior a

aquella que produjo la muerte del 50% de las plantas de *Arabidopsis*. Se realizaron 12 réplicas para cada dosis de patógeno y como control, se inoculó el mismo volumen de agua destilada estéril.

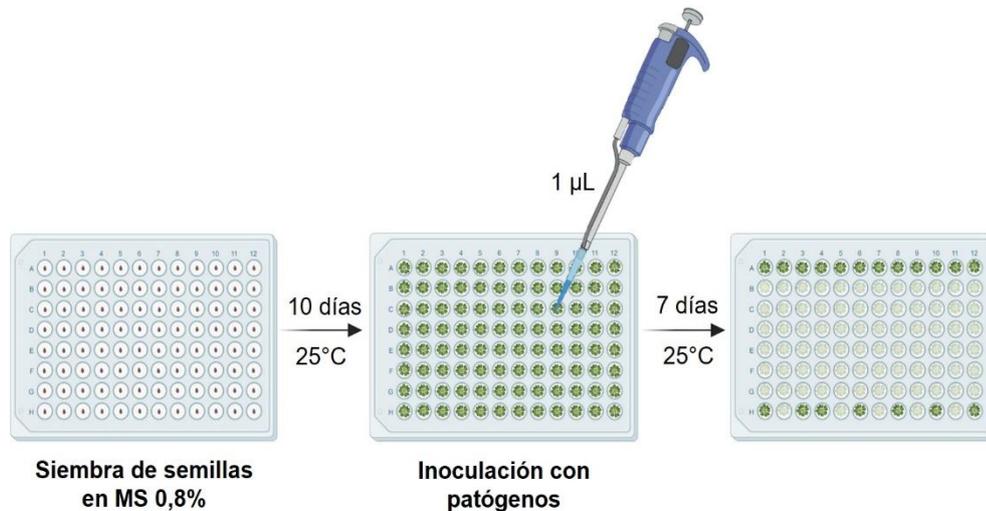


Figura 22. Determinación de la dosis infecciosa en *A. thaliana* Col-0. Cada fila de la placa *microtiter* representa un tratamiento: A, control; B, 10^8 UFC/mL; C, 10^7 UFC/mL; D, 10^6 UFC/mL; E, 10^5 UFC/mL; F, 10^4 UFC/mL; G, 10^3 UFC/mL; H, 10^2 UFC/mL.

10.4 Ensayos de inhibición de la patogenicidad *in vitro* en frutos, raíces y tubérculos

La interferencia en la virulencia de *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* a causa de la actividad *quorum quenching* de las cepas seleccionadas, se evaluó mediante ensayos de cocultivo en patatas (*Solanum tuberosum* L., cv. Monalisa), peras (*Pyrus communis* cv. Blanquilla) y zanahorias (*Daucus carota* L., cv. Amsterdam 2). Las patatas se infectaron con *D. solani* y *P. atrosepticum* (Torres et al., 2017), mientras que las peras y zanahorias se inocularon con *E. amylovora* (Y. H. Dong et al., 2000) y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Garge & Nerurkar, 2016), respectivamente.

Se realizó un cocultivo de cada patógeno con las cepas QQ como se ha descrito previamente y como control se cultivaron ambas bacterias en cultivo puro. Tras la incubación, los cocultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos, se realizaron dos lavados del *pellet* bacteriano empleando agua destilada estéril y finalmente, se resuspendió en 5 mL de agua destilada. Las peras, patatas y zanahorias se lavaron con agua, se desinfectaron en superficie con etanol 70% (v/v) y se dejaron secar en campana de flujo laminar.

En el caso de las patatas y las zanahorias se cortaron en rodajas de 1 cm de grosor y se depositaron en placas Petri. Las rodajas de patatas se inocularon con 5 µL de cada tratamiento en tres puntos equidistantes, mientras que las rodajas de zanahoria se inocularon con 5 µL en el centro. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 horas.

En el caso de las peras, se cortaron por la mitad, se dispusieron en placas Petri y se les realizaron cuatro orificios equidistantes, en los que se inocularon 20 µL del tratamiento correspondiente. Las placas se introdujeron en cajas de 30x30x15 cm con papel del filtro esterilizado y humedecido con agua destilada estéril, y se incubaron a 28°C durante 5 días.

Tras la incubación se analizó la severidad y la incidencia de la infección en los tres sistemas vegetales. El porcentaje de maceración en patatas y zanahorias se evaluó empleando en *software* de

procesamiento de imagen ImageJ (Schneider et al., 2012). Se realizaron 5 réplicas de cada tratamiento para cada modelo vegetal y se empleó agua destilada y una suspensión de la cepa QQ como controles negativos, y una suspensión de cada patógeno como control positivo.

10.5 Ensayos de inhibición de la patogenicidad *in vivo* en plantas de tomate

La interferencia de las cepas QQ seleccionadas en la virulencia del fitopatógeno *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 se evaluó en plantas de tomate (*S. lycopersicum* L. var. Roma) mediante un ensayo en cámara de cultivo de plantas Fitotron® y mediante un ensayo en invernadero en la EZZ-CSIC siguiendo el protocolo descrito por (Yang et al., 2009).

Ensayos en cámara de plantas Fitotron®. Las plantas se obtuvieron por siembra de semillas esterilizadas, como se describió en ensayos previos, en macetas de 1,5L con vermiculita esterilizada y se mantuvieron en la cámara de cultivo en las mismas condiciones. Una vez alcanzaron 5 cm, las plantas se introdujeron en bolsas de plástico, se rociaron con 5 mL de agua destilada estéril y se mantuvieron 24 horas en la cámara con el fin de facilitar la apertura estomática. Tras ello, se pulverizaron 5 mL del cocultivo 1:100 entre el patógeno y las cepas PGP-QQ y se volvieron a cerrar las bolsas durante 24 horas. Posteriormente, se extrajeron las plantas de las bolsas y se mantuvieron en la cámara de cultivo de plantas durante 5 días evaluando diariamente la evolución de la infección. Los controles se sometieron al mismo procedimiento y se pulverizaron con 5 mL de una suspensión de cada cepa QQ (10^8 UFC/mL), 5 mL de una suspensión de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (10^8 UFC/mL) o 5 mL de agua destilada estéril.

Tras el ensayo se midió la biomasa, la incidencia y severidad de la infección, el contenido en clorofila y los depósitos de calosa, como se describió previamente.

Ensayo en invernadero. Con el fin de evaluar si la disminución de la virulencia de este patógeno se debía a la actividad QQ o bien a una activación previa de mecanismos de resistencia sistémica inducida en la planta por parte de estas cepas, se plantearon dos tipos de experimentos: un tratamiento basado en la irrigación radicular las cepas PGP-QQ previo a la infección foliar con el patógeno y otro tratamiento basado en la aplicación foliar de los cocultivos de patógeno y cepas PGP-QQ seleccionadas. Los cocultivos se obtuvieron siguiendo el protocolo previamente descrito, mientras que, en los ensayos de irrigación radicular previo, las plantas se trataron con una suspensión de las cepas QQ procedente de un cultivo de 24 horas en medio TSB al que se le realizaron dos lavados con agua destilada estéril.

Para las plantas tratadas con los cocultivos, se siguieron los mismos protocolos antes descrito en los ensayos en cámara de cultivo, pero empleando plantones individuales de tomate sembrados en macetas de 1L. Transcurrida una semana en el invernadero, las plantas se pulverizaron con 5 mL de agua destilada estéril para fomentar la apertura estomática y tras 24 horas, se pulverizaron los tratamientos, evaluando el efecto de estos diariamente a lo largo de una semana.

En el caso de los ensayos con irrigación radicular, las plantas se trataron con 5 mL de una suspensión en agua destilada estéril de cada cepa PGP-QQ (10^8 UFC/mL) semanalmente durante 1 mes. Posteriormente, se realizó el protocolo de apertura estomática y tras 24 horas se pulverizaron 5 mL de una suspensión en agua destilada de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (10^8 UFC/mL). Tras 24 horas, se abrieron las bolsas y las plantas se mantuvieron en invernadero durante 5 días, evaluando los síntomas diariamente. Como controles se emplearon plantas no tratadas con la cepa QQ a las que se les pulverizaron 5 mL de agua destilada y plantas no tratadas con la cepa QQ a las que se les

pulverizaron 5 mL de una suspensión en agua destilada de *P. syringae* pv. tomato DC3000 (10^8 UFC/mL).

Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad: fotoperiodo de día largo (luz:oscuridad, 16:8 horas) y una luminosidad de 250 microsiemens/cm²/sg, 25°C de día y 20°C de noche y una humedad relativa del 60-80%.

Finalizados ambos experimentos, se evaluó la longitud y el peso seco de la parte aérea y radicular, se determinó la clorofila, el contenido total de ácidos orgánicos, aminoácidos, carbohidratos, polifenoles y proteínas, así como la actividad enzimática del metabolismo central, la actividad antioxidante y el contenido en hormonas vegetales, según la metodología descrita previamente.

11. Técnicas moleculares

11.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN de las cepas bacterianas se llevó a cabo por el método descrito por (Marmur, 1961). Para ello se centrifugaron 200 mL de un cultivo de 24 horas de las cepas a 9.000 rpm y se realizaron dos lavados con solución salina estéril. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 25 mL de EDTA salino, y se le añadieron 10 mg de lisozima y se incubó a 37°C y 120 rpm durante 30 minutos. Seguidamente se añadieron 2,5 mL de SDS al 25% (p/v) y se incubó a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 5 mL de perclorato sódico (5M) y 32,5 mL de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1), se agitó enérgicamente y se incubó a 37°C y 120 rpm durante 30 minutos. Tras 2 horas en reposo a temperatura ambiente, se centrifugó a 9.000 rpm y se recuperó la fase acuosa. A esta se le realizó otra extracción con 32,5 mL de cloroformo:alcohol isoamílico, y la fase acuosa se sometió a una precipitación de ADN con 70 mL de etanol 100% (v/v) frío (-20°C). El ADN precipitado se disolvió en 3 mL de solución salina citrada (SSC) 0,1X y se añadieron 24 µL de una solución de ARNasa (40 µg/mL) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se añadieron 36 µL de una solución de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Ambas enzimas se inactivaron a 60°C durante 10 minutos y se realizaron dos extracciones con 3 mL de cloroformo:alcohol isoamílico. Finalmente, se añadieron 50 µL de acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol 100% (v/v) frío (-20°C) para precipitar el ADN y se conservó a -20°C durante 24 horas. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos y se hicieron dos lavados con etanol 70% (v/v), para finalmente resuspenderlo en 50 µL de agua bidestilada estéril.

Tras la extracción, la pureza y la concentración del ADN se evaluaron empleando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific).

11.2 Reacción de amplificación de ADN en cadena

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) se llevó a cabo con el kit Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs®) empleando 1 µg de ADN y siguiendo las directrices del fabricante. Los parámetros de la reacción de PCR se eligieron en función del tamaño de los fragmentos de ADN a amplificar, la temperatura de hibridación de los *primers* y el

tiempo de elongación. Las secuencias y la función de los *primers* empleados en este trabajo se detallan en la tabla 3.

11.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los plásmidos y los productos de PCR o de la digestión con enzimas de restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa a los que se les adicionó la solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe™ (INtRON Biotechnology). Los fragmentos menores de 500 pb se separaron en geles de agarosa al 2 % (p/v) disueltos en TAE 1X y los fragmentos mayores en geles al 0,7 % (p/v). Se empleó el tampón de carga *Loading Buffer Blue 5X* (Bioline) a razón de 1µL por cada 5 µL de muestra. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 5-10 V/cm. El ADN se visualizó tras la exposición del gel a la luz ultravioleta (254 nm) en un transiluminador *Universal Hood* (Biorad).

Los marcadores de peso molecular que se utilizaron como referencia del tamaño y concentración de ADN fueron el *Hyperladder I* y *IV* (Bioline).

Tabla 3. *Primers* empleados en este trabajo, su secuencia y su función. Las secuencias de corte de las enzimas de restricción se muestran subrayadas. El *primer* 16F_B27 contiene una degeneración, M: A/C.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Función	Referencia
16F_B27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Identificación taxonómica	Lane, 1991
16R_B1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC	Identificación taxonómica	Lane, 1991
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación de productos de PCR clonados en pGEM-T	Promega
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación de productos de PCR clonados en pGEM-T	Promega
P6AcilA-F	ATGCAATCGCGTGTGTTTCG	Amplificación de P6AcilA	Este trabajo
P6AcilA-R	TTATTTGCCGGGCGTGAGC	Amplificación de P6AcilA	Este trabajo
P6AcilB-F	<u>ATGAAACGCTCCCTCACTGC</u>	Amplificación de P6AcilB	Este trabajo
P6AcilB-R	<u>TCAGCGGGCAGGCATGAGGG</u>	Amplificación de P6AcilB	Este trabajo
P6AcilA-F- <i>Bam</i> HI	<u>GGATCC</u> ATGCAATCGCGTG	Expresión y purificación de P6Acil en pGEX-4T-2	Este trabajo
P6AcilA-R- <i>Eco</i> RI	<u>GAATTC</u> TATTTGCCGGGC	Expresión y purificación de P6Acil en pGEX-4T-2	Este trabajo
lacZRC	GCTTCATCAGCAGGATATCC	Verificación de la inserción de p-P6Acil	Este trabajo
Tn7- <i>Glm</i> S	CATCATGGCAGACAAACAAAAG	Verificación de la inserción de Tn7	(Lambertsen et al., 2004)
Tn7RR109	CAGCATAACTGGACTGATTTTCAG	Verificación de la inserción de Tn7	(Lambertsen et al., 2004)

11.4 Transformación de células

Transformación por choque térmico. La preparación de células competentes con CaCl₂ se llevó a cabo partiendo de un cultivo de *E. coli* DH5α en 100 mL de medio LB a 37°C y 120 rpm. Cuando este alcanzó una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,8, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sedimento se resuspendió en 10 mL de una solución 100 mM de CaCl₂ y se mantuvo a 4°C durante 16 horas. Posteriormente, se centrifugó en las mismas condiciones y el sedimento se resuspendió en 5 mL de una solución de glicerol al 20% (v/v) y CaCl₂ 100 mM. La suspensión se repartió en alícuotas de 40 µL y se conservó a -80°C hasta su uso.

La transformación por choque térmico se llevó a cabo mezclando 40 µL de células competentes de *E. coli* DH5α con 10 µL de plásmido (10 pg -100 ng) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Seguidamente se realizó el choque térmico a 42°C durante 30 segundos y se mantuvo en hielo durante 2 minutos. Finalmente se añadieron 450 µL de medio LB y se incubó en estufa a 37°C y 120 rpm durante 1 hora para permitir la expresión del plásmido. Las células transformantes se seleccionaron en placas de medio LB al 1,5% (p/v) de agar suplementadas con el antimicrobiano adecuado, ampicilina (100 µg/L), X-gal (60 mg/L) e IPTG (32 mg/L).

Transformación por electroporación. Las células electrocompetentes se obtuvieron a partir de un cultivo de *E. coli* en 5 mL de medio LB (10⁸ UFC/mL) a 37°C y 120 rpm durante 24 horas. Este sirvió de inóculo para el inicio de un subcultivo, que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO de 0,8. Tras ello, este subcultivo se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en 25 mL de agua bidestilada estéril a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados en las mismas condiciones empleando 15, 5 y 1 mL, respectivamente, de agua bidestilada estéril a 4°C. Finalmente el *pellet* bacteriano se resuspendió en 120 µL de agua destilada estéril, se repartió en alícuotas de 40 µL y se conservó en hielo hasta su uso.

La electroporación se llevó a cabo en un dispositivo Micropulser (BIO-RAD) a 2,5 kV empleando cubetas de electroporación de 2 mm. Para ello se mezclaron 20 µg de ADN plasmídico con 40 µL de células y se electroporaron. El producto se recuperó añadiendo 750 µL de medio LB a la cubeta de electroporación y se transfirió a un tubo *ependorf*, que se incubó a 37°C y 120 rpm durante 2 horas para permitir la expresión del plásmido. Las células transformantes se seleccionaron en placas de medio LB al 1,5% (p/v) de agar suplementadas con el antimicrobiano adecuado.

11.5 Conjugación

La transferencia de construcciones plasmídicas se realizó en algunos casos mediante conjugación tetraparental. Como bacteria donadora se empleó *E. coli* XL1-Blue portadora del plásmido pBK-miniTn7-gfp1 y como células *helper* *E. coli* SM10λpir portadora del plásmido pUX-BF13 y *E. coli* HB101 portadora del plásmido pRK600. Estas se cultivaron en medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL), ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (20 µg/mL), respectivamente, a 37°C y 120 rpm durante 24 horas. Las cepas receptoras se sembraron en medio TSB a 28°C y 120 rpm durante 24 horas. Todos los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos y se realizaron dos lavados con solución salina estéril para eliminar los antimicrobianos. Posteriormente se realizó una mezcla 1:1:1:1 de cada cepa y esta se depositó en un filtro de nitrocelulosa de 0,22 µm dispuesto sobre una placa de LB al 1,5% (p/v) de agar y se incubó a 28°C durante 24 horas. Finalmente, la masa bacteriana se recolectó del filtro, se resuspendió en 1 mL de solución salina y se sembró en placas de citrato de Simmons suplementadas con Km (50 µg/mL) como medio selectivo para la cepa receptora portadora del plásmido conjugado.

11.6 Secuenciación, tratamiento y análisis de secuencias

Productos de PCR. La secuenciación de los productos de ADN amplificados por PCR se llevó a cabo en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN) del CSIC (Granada) utilizando un secuenciador 373 Stretch de Applied Biosystems mediante el método *Big Dye Terminators* (Perkin Elmer).

La calidad de las secuencias obtenidas se analizó empleando el *software* Chromas 2.6.6 y se compararon con aquellas disponibles en la base de datos EMBL y GenBank a través de la plataforma BLAST (Altschul et al., 1990) y con las de la plataforma EzBioCloud, en el caso de la identificación taxonómica (Yoon et al., 2017).

Genomas. La secuenciación de genomas de las cepas seleccionadas se llevó a cabo en las instalaciones de StabVida (Universidad de Caparica, Portugal) mediante la plataforma Illumina® HiSeq®2500. Las secuencias obtenidas se procesaron con el *software* BBDuk para eliminar los adaptadores y las secuencias de baja calidad, mientras que el ensamblado de las secuencias se realizó con el programa SPAdes 3.11.1 (Nurk et al., 2013). Una vez obtenido el genoma completo, se realizó su anotación empleando las plataformas *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (Aziz et al., 2008) e *Integrated Microbial Genomes and Microbiome* (IMG/M) (Markowitz et al., 2011).

Construcción de árboles filogenéticos. Se obtuvieron los correspondientes alineamientos de las secuencias génicas de interés y se construyeron los árboles filogenéticos empleando el programa MEGA X (Kumar et al., 2018) mediante los algoritmos de *neighbour-joining* (NJ), *maximum-likelihood* (ML) y *maximum-parsimony* (MP).

11.7 Identificación taxonómica basada en el gen ARNr 16S

Las cepas estudiadas se identificaron taxonómicamente mediante la secuenciación del gen ARNr 16S empleando los *primers* 16F_B27 y 16R_B1488 (Tabla X). Una vez obtenidas las secuencias, estas se procesaron y se alinearon, como se describió previamente, para obtener la secuencia consenso. Finalmente, ésta se comparó con aquellas depositadas en las bases de datos EMBL, GenBank y EzBioCloud con el fin de realizar la identificación.

Cuando la calidad o la longitud de la secuenciación no fue suficiente para identificar taxonómicamente las cepas, se realizó una clonación del gen ARNr 16S en el plásmido pGEM-T y se secuenció empleando los *primers* SP6 y T7 (Tabla 3).

11.8 Expresión heteróloga de genes QQ

Los genes relacionados con la actividad *quorum quenching* se identificaron a partir de la anotación del genoma de las bacterias objeto de estudio y se procedió a su clonación en pGEX-4T-2 y expresión en *E. coli* DH5 α .

Los genes QQ se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores P6Acil-F-*Bam*HI y P6Acil-F-*Eco*RI. Tras ello, se comprobó el tamaño del producto de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v) empleando TAE 1X como tampón. El producto de PCR se purificó empleando el kit *Illustra GFX PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare) y se sometió a una digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI siguiendo las instrucciones del fabricante (New England BioLabs®). El vector

pGEX-4T-2 purificado igualmente se digirió con las mismas enzimas y en las mismas condiciones. Tras ello, tanto el producto de PCR como el plásmido se purificaron, y se realizó una ligación empleando la T4 ligasa (Promega). Finalmente, el plásmido con el inserto se purificó y se transformó en *E. coli* DH5 α mediante electroporación como se describe en el apartado anterior. Los transformantes se seleccionaron en placas de medio LB al 1,5% (p/v) de agar suplementado con ampicilina 100 μ g/mL.

La actividad degradadora de AHLs de los transformantes se evaluó frente a C12-HSL mediante un ensayo de difusión en placa en medio AB-Xgal empleando *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) como biosensor. Como controles se emplearon el medio LB suplementado con C12-HSL (10 μ M) y un cultivo de *E. coli* DH5 α que contenía el plásmido pGEX-4T-2 sin inserto.

11.9 Marcaje con GFP

Con el fin de analizar la colonización de las plantas por parte de las cepas seleccionadas se procedió a su marcaje con la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) mediante el sistema de transposón mini-Tn7 por conjugación tetraparental (Lumjiaktase et al., 2010). En esta se emplearon los plásmidos pBK-miniTn7-gfp1, pUX-BF13 y pRK600 que actuaron como donador y auxiliares, respectivamente.

Tras la conjugación, las cepas conjugantes se seleccionaron en agar citrato de Simmons suplementado con kanamicina (50 μ g/mL) tras una incubación a 28°C durante 48 horas. La correcta inserción del transposón en el genoma se comprobó mediante PCR empleando los *primers* Tn7-*GlmS* y Tn7RR109, que amplifican un fragmento de unas 150 pb, y una posterior electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, el marcaje de las cepas con GFP se evaluó mediante microscopía de fluorescencia a 488 nm empleando un microscopio invertido Nikon EclipseTi-E.

13. Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente empleando los programas Statgraphics Centurion XVI y GraphPad Prism 7.04. La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk o el test de D'Agostino y Pearson. Cuando estos fueron normales, se analizaron mediante ANOVA simple empleando el test de Tukey para la comparación de medias. En cambio, cuando los datos no mostraban normalidad, se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis aplicando el test de Dunn para la comparación múltiple. En todos los casos, el intervalo de confianza se fijó al 95%.

Capítulo 1

Selección de cepas bacterianas procedentes de distintos ambientes extremos en base a su actividad promotora del crecimiento vegetal y actividad *quorum quenching*

Resumen

En las últimas décadas han sido muchos los esfuerzos para reducir el uso de fertilizantes químicos y pesticidas en los campos de cultivo. Una alternativa a estos métodos inadecuados de gestión agrícola podría estar representada por el uso de cepas bacterianas que combinen la actividad promotora del crecimiento vegetal y la interferencia en la virulencia de los fitopatógenos mediante *quorum quenching*. Con el propósito de aislar cepas que, además de tener la capacidad de resistir las condiciones climáticas adversas como la salinidad o la sequía, cumplan con estas dos características, se realizó un muestreo en el Saladar de El Margen (Granada), un ambiente hipersalino y semiárido.

El muestreo realizado en plantas, suelos y aguas del Saladar dio lugar a 320 aislados que se seleccionaron en base a su morfología colonial. Estos, junto con las 71 cepas previamente aisladas por el grupo BIO 188 de diversos ambientes salinos y no salinos, se sometieron a un análisis de la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vitro* con el que se seleccionaron 14 cepas por sus prometedores resultados relacionados con la nutrición vegetal, la producción de fitohormonas y enzimas hidrolíticas. Estas cepas bacterianas además demostraron una gran tolerancia a la salinidad.

En cuanto a la promoción del crecimiento vegetal *in vivo*, los ensayos de bacterización de semillas de tomate arrojaron resultados positivos en la mayoría de las cepas seleccionadas, con un incremento en el índice de vigor y en el porcentaje de germinación de estas. Igualmente, en el caso de los ensayos de promoción del crecimiento en plantas de tomate, se observó un incremento de la longitud y de la biomasa con respecto al control tras la inoculación de las cepas seleccionadas mediante irrigación radicular. Por otra parte, la capacidad para degradar AHLs sintéticas mostró una elevada versatilidad en la mayoría de las cepas.

El análisis filogenético del gen ARNr 16S permitió identificar las cepas seleccionadas, las cuales resultaron ser especies previamente descritas. Por último, se descartaron para el estudio aquellas cepas que afectaban el crecimiento de los fitopatógenos *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Por tanto y teniendo en cuenta los resultados de la actividad promotora del crecimiento *in vitro* e *in vivo*, junto a la actividad *quorum quenching* y las pruebas de antibiosis, se seleccionaron tres cepas para los ensayos posteriores: *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 y *Pseudomonas segetis* P6.

Summary

In recent decades there have been many efforts to reduce the chemical fertilizers and pesticides input in crop fields. An alternative to these inadequate methods of agricultural management could be represented by the use of bacterial strains which combine plant growth-promoting activity and the interference of phytopathogens virulence through quorum quenching. In order to isolate strains meeting these two characteristics, in addition to possess the ability to resist adverse climatic conditions such as salinity or drought, samples were taken from Saladar de El Margen (Granada), a hypersaline and semi-arid environment.

The sampling carried out in plants, soil and water from the Saladar gave rise to 320 isolates which were selected based on their colonial morphology. These, together with another 71 strains previously isolated by the BIO 188 group from various saline and non-saline environments, underwent an in vitro analysis of plant growth-promoting traits, from which 14 strains were selected for their promising results related to plant nutrition, phytohormone and hydrolytic enzymes production. These strains also demonstrated a high salinity tolerance.

Regarding the in vivo plant growth-promotion, tomato seed biopriming yielded positive results in most of the selected strains, with an increase in the vigour index and in the germination percentage them. Similarly, in the case of growth promotion trials in tomato plants, an increase in length and biomass was observed after inoculation of the selected strains by root irrigation with respect to control plants. On the other hand, the ability to degrade synthetic AHLs showed high versatility in most strains.

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene allowed to identify the selected strains, which turned out to be previously described strains. Finally, those strains which exhibited antibiosis against the phytopathogens *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* were discarded from this study. Therefore, and considering the results of the in vitro and in vivo growth promoting activity, together with the quorum quenching activity and the antibiosis tests, three strains were selected for the subsequent study: *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 and *Pseudomonas segetis* P6.

1. Muestreo en el Saladar de El Margen.

Con el fin de aislar cepas bacterianas halotolerantes que combinen la actividad promotora del crecimiento vegetal y la actividad *quorum quenching*, se realizó un muestreo en el Saladar de El Margen, un hábitat semiárido e hipersalino poco estudiado por sus características extremas. Este entorno es un criptohumedal con surgencias de agua en las estaciones lluviosas, mientras que en el resto del año se acumulan depósitos de cloruros y sulfatos en la superficie, constituyendo un ambiente hipersalino donde habitan diversas especies de plantas halófitas. Por ello, se realizó un muestreo en el mes de febrero del año 2019 y se distinguieron cuatro zonas (Fig. 23) caracterizadas por la presencia o ausencia de agua superficial y por el tipo de vegetación presente:

- **Zona 1.** Surgencia de agua con una salinidad media (conductividad eléctrica, CE, de 7 a 10 dS/m) y presencia de la planta halófito *Salicornia ramosissima* como única especie vegetal.
- **Zona 2.** Zona comprendida entre la surgencia y el arroyo, con una elevada salinidad (CE 20–25 dS/m), gran cantidad de depósitos superficiales de sales y pequeñas zonas de agua de escorrentía estancada, así como la presencia mayoritaria de la especie vegetal *Arthrocaulon macrostachyum*.
- **Zona 3.** Zona próxima al arroyo, con agua de escorrentía estancada y una salinidad media-alta (CE 12–15 dS/m), caracterizada por la presencia de la planta halófito *Salicornia hispanica* principalmente.
- **Zona 4.** Zona más distante de la surgencia, sin agua superficial y una salinidad alta (CE 16–19 dS/m), con una mayor diversidad vegetal en la que se encontraron las especies vegetales *A. macrostachyum*, *S. hispanica* y *Suaeda vera*.

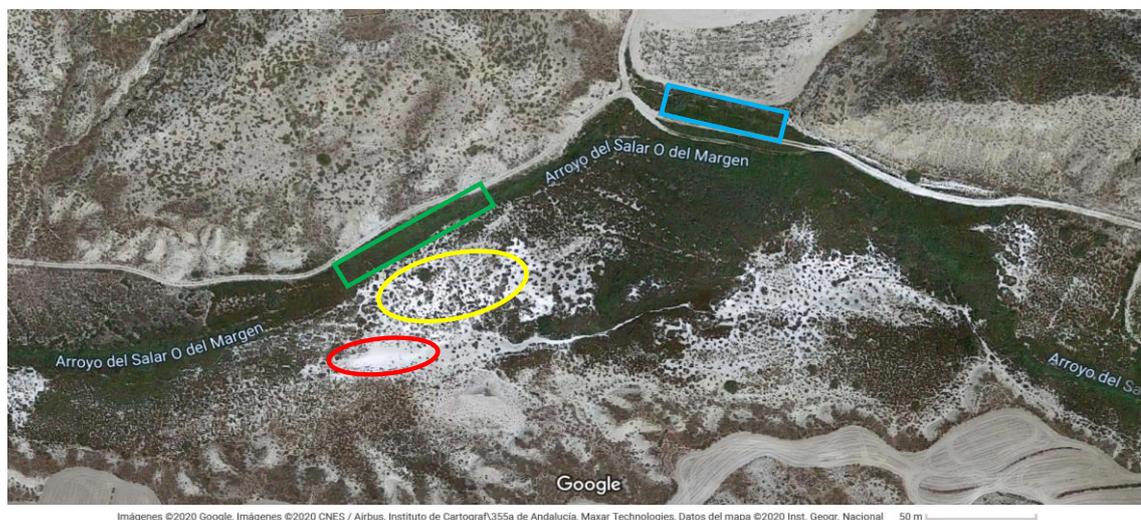


Figura 23. Distribución de las zonas de muestreo en el Saladar de El Margen. Zona 1, sección de color rojo; zona 2, sección de color amarillo; zona 3, sección de color verde; zona 4, sección de color azul.

Tras el procesamiento de las distintas muestras de plantas, suelos y aguas, se seleccionaron para el presente estudio un total de 320 aislados en base a la morfología de sus colonias, de las cuales 186 se aislaron en medio TSBd al 2% (p/v) de NaCl y 134 en TSBd al 5% (p/v) de NaCl. La mayoría de ellas procedían de las muestras de plantas (54,9%) y de las muestras de suelo (38,6%), mientras que, en las muestras de agua, el número de aislados fue escaso (6,5%) (Tabla 4).

Entre las plantas, las muestras aisladas de *S. ramosissima* y *S. vera* fueron las que más variedad colonial mostraron, mientras que el suelo rizosférico de todas las plantas resultó tener una mayor cantidad de morfologías distintas que aquel que se encontraba en la proximidad de las plantas, salvo en el caso de *S. ramosissima*, de cuya muestra se obtuvo una cantidad de aislados muy similar

en ambos casos. Por su parte, las colonias obtenidas de las muestras de aguas tenían un aspecto muy mucoso por la posible producción de exopolisacáridos (EPS), aunque la variedad morfológica fue muy escasa.

Tabla 4. Recuento de cepas seleccionadas en base a su morfología colonial procedentes de los aislamientos de las muestras de plantas, suelos y aguas en el Saladar de El Margen en medio TSBd con distintas concentraciones de cloruro sódico.

Localización y muestra		Cepas seleccionadas	
		2% NaCl (p/v)	5% NaCl (p/v)
Zona 1	<i>S. ramossisima</i>	26	16
	Suelo rizosférico de <i>S. ramossisima</i>	3	3
	Suelo próximo a <i>S. ramossisima</i>	4	3
	Agua	4	5
Zona 2	<i>A. macrostachyum</i>	22	11
	Suelo rizosférico de <i>A. macrostachyum</i>	10	4
	Suelo próximo a <i>A. macrostachyum</i>	3	3
	Suelo salino seco	8	5
Zona 3	<i>S. hispanica</i>	18	17
	Suelo rizosférico de <i>S. hispanica</i>	5	7
	Suelo próximo a <i>S. hispanica</i>	2	2
	Suelo salino seco	3	3
Zona 4	<i>A. macrostachyum</i>	7	14
	Suelo rizosférico de <i>A. macrostachyum</i>	5	1
	Suelo próximo a <i>A. macrostachyum</i>	3	1
	<i>S. hispanica</i>	8	6
	Suelo rizosférico de <i>S. hispanica</i>	4	1
	Suelo próximo a <i>S. hispanica</i>	3	1
	<i>S. vera</i>	25	15
	Suelo rizosférico <i>S. vera</i>	3	3
Suelo próximo a <i>S. vera</i>	1	1	
Suelo salino seco	12	6	

Tras la obtención de cultivos puros de cada cepa en medio TSBd con la correspondiente concentración de cloruro sódico, se realizó una resiembra de cada una de ellas en medio TSA para evaluar la capacidad de estas para crecer en las condiciones de cultivo comúnmente empleadas en el laboratorio. De las 320 cepas, únicamente 124 crecieron en estas condiciones y fueron las que se emplearon en los siguientes análisis.

2. Caracterización de la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vitro*

Para el estudio de la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vitro* se utilizaron las 124 cepas seleccionadas en el muestreo del Saladar de El Margen junto con otras 71 cepas, previamente aisladas y pertenecientes a la colección de cepas del grupo BIO-188, procedentes de ambientes hipersalinos (50), de heces de zorro rojo (*V. vulpes*) (12) y de heces de nutria europea (*L. lutra*) (9). Se determinó la hidrólisis de ADN, almidón, caseína, celulosa, gelatina y quitina, la producción de las enzimas ACC-desaminasa, esterasa, fosfatasas ácida y alcalina, lecitinasa, lipasas, nitrogenasa, y de sideróforos y surfactantes.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron 14 cepas que mostraron un resultado positivo para un mínimo de 9 pruebas (Tabla 5). Entre ellas, las cepas L193 y BA (salinas de la

Malahá), las cepas N3, N6 y N8 (heces de nutria) y la cepa Z8 (heces de zorro rojo) se aislaron en trabajos previos y corresponden a la colección del grupo BIO-188. Las ocho cepas restantes (P1, P2, P4, P6, EN21, EN21, SN31 y SS1B) proceden de la rizosfera de las plantas de *S. hispanica* recolectadas en la zona 3 de El Saladar de El Margen.

Las cepas que mostraron un mayor rango de actividad promotora de crecimiento vegetal fueron L193, BA, N3, N8 y P6. En su mayoría estas cepas resultaron activas para la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno atmosférico y la captación de hierro mediante sideróforos. El resto de las cepas mostró una variedad de pruebas positivas menor, aunque, en la mayoría de ellas, se observaron resultados positivos para las principales pruebas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal.

La producción de la enzima ACC desaminasa fue un resultado común en la mayoría de las cepas seleccionadas, así como la hidrólisis del almidón. Igualmente, la producción de ácido indolacético, de enzimas con actividad proteolítica (gelatinasa y caseinasa) y la hemólisis total fueron frecuentes en muchas de las cepas.

Por último, la producción de celulasa, DNasa, esterasas, lecitinasa, lipasas y quitinasa resultó ser menos frecuente.

Tabla 5. Caracterización de la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vitro* de las cepas seleccionadas. +, actividad positiva; -, ausencia de actividad.

Cepa	Actividad															
	ACC desaminasa	Amilasa	Caseinasa	Celulasa	DNasa	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina	Gelatinasa	Hemólisis	Lecitinasa	Nitrogenasa	Quitinasa	Sideróforos	Tween® 20	Tween® 80	Ácido indolacético
Colección BIO-188	L193	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
	N3	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	N6	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
	N8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	Z8	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
Saladar de El Margen	P1	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
	P2	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
	P4	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	P6	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
	EN21	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
	EN31	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
	SN31	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
	SS1B	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-

3. Evaluación de la tolerancia a salinidad

Con el fin de evaluar la potencial aplicación de las 14 cepas seleccionadas por su actividad PGP en campos de cultivo salinizados, se realizó un estudio del rango de cloruro sódico tolerado por éstas, así como el valor óptimo para su crecimiento.

Las cepas se sembraron en medio TSA agar en presencia de concentraciones de NaCl comprendidas entre 0,5 y 25 % (p/v). Tras la incubación se observó que todas mostraron un rango de crecimiento del 0,5 al 5,0% NaCl (p/v) (Tabla 6). Las cepas L193, BA, N6, EN21, SN31 y SS1B mostraron un rango de salinidad más amplio, logrando crecer hasta el 25% (p/v) de NaCl, mientras que la cepa Z8 fue la que mostró un rango de tolerancia más estrecho (0,5 – 2 % (p/v)).

La concentración óptima de crecimiento de NaCl difirió para todas las cepas de estudio y estuvo comprendida entre el 0,5 y el 7,5% (p/v). En base a ello, la mayoría de las cepas se clasifican como halotolerantes, excepto las cepas P1, P2 y P4, cuya concentración óptima fue del 5 – 7,5 % NaCl y por lo tanto se consideran halófilas moderadas.

Tabla 6. Rango de tolerancia salina y concentración óptima de crecimiento de las cepas bacterianas. +++, crecimiento elevado (10^7 - 10^9 UFC/mL); ++, crecimiento moderado (10^4 - 10^6 UFC/mL); +, crecimiento escaso (10^1 - 10^3 UFC/mL); -, ausencia de crecimiento.

	Cepa	Concentración de NaCl (%)						
		0,5	2,0	5,0	7,5	12,5	15,0	25,0
Colección BIO-188	L193	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	BA	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	N3	+++	+++	++	+	-	-	-
	N6	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	N8	+++	+++	++	+	-	-	-
	Z8	+++	+++	+	-	-	-	-
Saladar de El Margen	P1	+	++	+++	+++	++	++	-
	P2	+	+	+++	++	-	-	-
	P4	+	+	+++	++	-	-	-
	P6	+++	+++	+++	++	-	-	-
	EN21	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	EN31	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	SN31	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	SS1B	+++	+++	+++	+++	++	++	+

4. Determinación de la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vivo*

Una vez analizada la actividad PGP *in vitro*, se evaluó dicha actividad *in vivo* mediante un ensayo de bacterización de semillas de tomate (*biopriming*), así como con un ensayo en plantas de tomate en cámara de cultivo de plantas Fitotron®.

4.1. Bacterización de semillas de tomate

El ensayo de bacterización de semillas de tomate con las 14 cepas seleccionadas previamente mostró resultados satisfactorios para la mayoría de los tratamientos de estudio, observándose

incrementos significativos en la longitud de la plántula, del porcentaje de germinación y del índice de vigor con respecto a las plantas control (Tabla 7).

En cuanto a la longitud de los germinados, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las semillas tratadas con las cepas N8, P2, P4 y P6 (Fig. 24), con incrementos en la longitud del 53,5%, 84,0%, 181,0% y 192,6%, respectivamente, con respecto al control. Por su parte, la cepa SN31 mostró un incremento del 21,3%, aunque no fue estadísticamente significativo. Las demás cepas no mostraron incrementos significativos en la longitud. En cambio, el tratamiento de las semillas con la cepa EN31 provocó una ligera disminución del 1,4% en la longitud de estas. En el caso de las semillas tratadas con la cepa N6, se observó una reducción de la longitud de la raíz del 5,6%, aunque esta fue compensada con el incremento de la longitud de la parte aérea, logrando un aumento de la longitud total del 0,7% con respecto a su control.

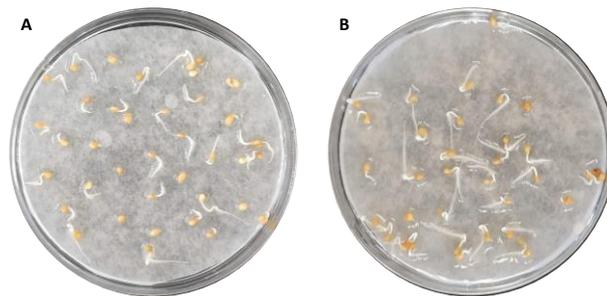


Figura 24. Bacterización de semillas de tomate. A, semillas control tratadas con agua destilada estéril; B, semillas tratadas con una suspensión de la cepa P6 en agua destilada estéril.

Con respecto al porcentaje de germinación, el tratamiento de las semillas con las cepas N3, N6, BA, EN21, SN31 y L193 produjo un aumento estadísticamente significativo de este parámetro con respecto al tratamiento control con agua destilada estéril. En concreto, se observaron incrementos del 18,6%, 9,2%, 15,7%, 15,7%, 5,7% y 13,0%, respectivamente. En cambio, las cepas que anteriormente produjeron un aumento de la longitud del germinado no incrementaron el porcentaje de germinación, produciendo una ligera disminución en el caso de las cepas P2 y SS1B. Además, la cepa EN31 no tuvo ningún efecto en el porcentaje de germinación con respecto al control.

Tabla 7. Bacterización de semillas de tomate con las distintas cepas. Los valores se expresan como la media de cada tratamiento seguida de la desviación estándar.
 *, p < 0,033; **, p < 0,002; ***, p < 0,001

	Cepa	Longitud total (cm)	Variación longitud total (%)	Germinación (%)	Variación germinación (%)	Índice de vigor	Variación índice de vigor (%)
Colección BIO-188	L193	5,5 ± 1,7	8,6	96,7 ± 1,1 **	13,0	531,7 ± 153,8	23,4
	BA	5,2 ± 1,4	4,0	90,0 ± 5,2 *	15,7	468,0 ± 102,2	22,5
	N3	4,9 ± 1,5	2,8	92,2 ± 1,9 ***	18,6	451,8 ± 132,1	23,9
	N6	5,1 ± 1,6	0,7	92,2 ± 2,4 *	9,2	470,2 ± 133,3	9,1
	N8	8,3 ± 0,6 **	53,6	83,0 ± 7,4	6,8	688,9 ± 67,9 **	60,7
	Z8	3,9 ± 0,6	9,5	94,6 ± 2,2	3,0	368,9 ± 59,8	12,7
Saladar de El Margen	P1	1,7 ± 0,2	4,9	97,5 ± 2,2	5,6	165,8 ± 22,8	13,3
	P2	2,9 ± 0,7 *	84,0	90,3 ± 5,7	-2,2	261,9 ± 55,9	78,9
	P4	4,5 ± 0,5 ***	181,0	92,7 ± 0,8	0,5	417,2 ± 47,4 ***	185,0
	P6	4,6 ± 0,5 ***	192,6	96,5 ± 3,5	4,5	443,9 ± 96,5 ***	203,3
	EN21	5,4 ± 1,5	8,0	90,0 ± 1,8 *	15,7	486,0 ± 122,2	27,2
	EN31	4,9 ± 1,4	-1,4	86,7 ± 4,5	0,0	424,8 ± 116,8	-1,4
	SN31	5,7 ± 1,8	21,3	82,2 ± 2,3*	5,7	468,5 ± 140,3	27,8
	SS1B	5,6 ± 1,6*	12,7	84,4 ± 8,0	-2,6	472,6 ± 179,2	12,0

Teniendo en cuenta el índice de vigor como un marcador global de la influencia de las cepas bacterianas en las semillas, se observó que las cepas N8, P4 y P6 dieron lugar a incremento del 60,7%, 185,0% y 203,3%, respectivamente, todos estadísticamente significativos con respecto al control.

En base a los resultados negativos en cuanto a índice de vigor obtenidos en los ensayos de *biopriming* de semillas de tomate tratadas con las cepas N6 y EN31, se decidió descartar a estas cepas para futuros estudios.

4.2. Ensayo de promoción del crecimiento en plantas de tomate

En cuanto al efecto de las cepas en el desarrollo de las plantas de tomate, se realizó un ensayo de promoción del crecimiento vegetal mediante la inoculación semanal de las mismas con suspensiones de las cepas en agua destilada estéril. Transcurridas 6 semanas, se recolectó el tejido vegetal y se determinó la longitud y el peso seco de la parte aérea y radicular.

Las plantas tratadas con las cepas N8 y SN31 mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles en la longitud de la parte aérea y radicular y en la longitud total, en el caso de la primera, mientras que aquellas plantas tratadas con la cepa SN31, mostraron diferencias significativas en la longitud de la parte radicular y total (Fig. 25A). Por otra parte, y en relación al peso de la planta, las cepas N8, P4, P6, EN21 y SN31 mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en el peso seco de las partes aérea y radicular y en el peso total, salvo en el caso de la cepa N8, en la que no se observaron diferencias significativas en el peso de la parte aérea (Fig. 25B).

El mayor efecto en el desarrollo de las plantas de tomate se observó en aquellas tratadas con la cepa N8, en las que se obtuvo un incremento en la longitud de la parte aérea y radicular del 8,9% y del 37,6%, respectivamente, mientras que el incremento de peso seco se situó en un 3,5% y un 241,3% para las partes aéreas y radicular, respectivamente.

El tratamiento de las plantas con la cepa SN31 mostró un incremento en el peso seco del 82,8%, 97,7% y 85,6% en las partes aérea, radicular y en el peso total, respectivamente. En cuanto a la longitud, se observó un débil incremento del 2,1% en la parte aérea, mientras que se obtuvo un incremento del 28,3% y del 12,5% en la longitud de la parte radicular y en la longitud total, respectivamente.

En cuanto al peso seco de las plantas tratadas con las cepas P4 y P6, se observó un aumento del 16,5% y del 18,2% en la parte aérea y radicular, respectivamente en aquellas tratadas con la cepa P4, mientras que la cepa P6 produjo un aumento del 19,3% y del 21,6% en la parte aérea y radicular, respectivamente.

La cepa EN21 mostró un aumento de 43,4%, 33,2% y 41,5% en el peso seco de la parte aérea, radicular y en el peso total, respectivamente.

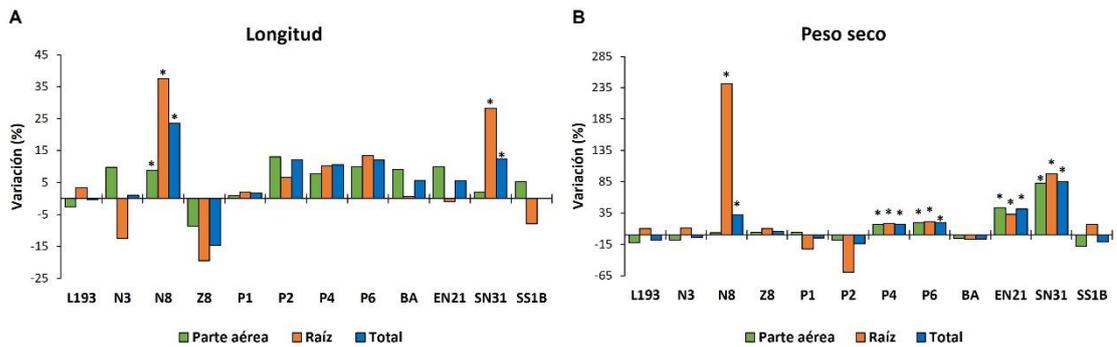


Figura 25. Variación en el crecimiento de las plantas de tomate inoculadas con las cepas bacterianas de estudio. A, longitud; B, peso seco. *, diferencias estadísticamente significativas con respecto a su control. Nótese la distinta escala de porcentaje de variación en ambos gráficos.

En todos los tratamientos en los que se produjo un aumento del peso seco de la parte radicular, se pudo observar un gran desarrollo de raíces secundarias y de pelos radicales en detrimento de una mayor longitud de la raíz principal. Del mismo modo, se observó una mayor densidad foliar con un incremento en el número y tamaño de las hojas en aquellas plantas que mostraban un incremento en el peso seco de la parte aérea (Fig. 26).

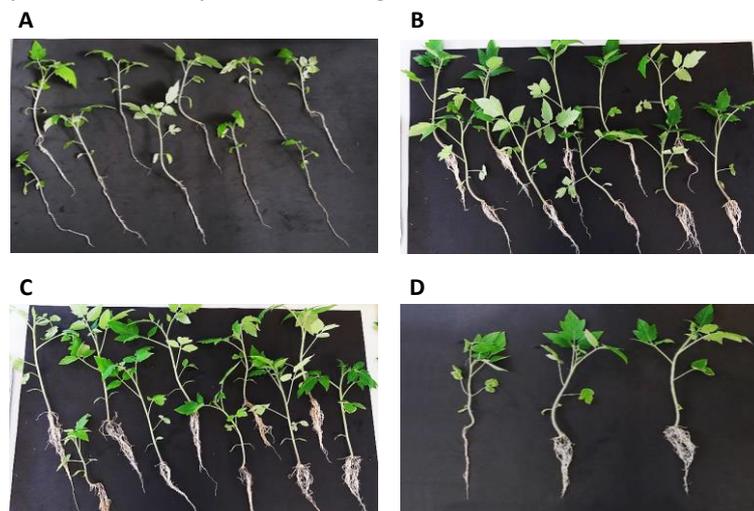


Figura 26. Efectos en el desarrollo foliar y radicular tras el tratamiento por irrigación radicular con las cepas EN21 y SN31 en plantas de tomate. A, plantas control regadas con agua destilada estéril; B, plantas tratadas con la cepa EN21; C, plantas tratadas con la cepa SN31; D, comparativa de ejemplares control y tratados con la cepa EN21 y con la cepa SN31 (de izquierda a derecha).

En base a los resultados obtenidos en los ensayos previos de germinación, se decidió realizar un tratamiento combinado de bacterización de semillas con las cepas y el posterior irrigación radicular con una suspensión de estas, para comprobar si ambas modalidades muestran sinergias en la promoción del crecimiento en plantas de tomate al establecerse la relación bacteria-planta desde etapas tempranas.

Los resultados de este ensayo mostraron un notable incremento en el desarrollo de las plantas de tomate cuando se bacterizaron las semillas y, posteriormente, se regaron con las cepas N3, EN21, SN31 y SS1B (Tabla 8). Por otra parte, las plantas tratadas con las cepas N3 y SS1B mediante *bioprimer*+irrigación radicular mostraron un incremento significativo de la longitud de la parte aérea con respecto a las plantas control. Además, se observó que este tipo de tratamiento incrementó este parámetro con respecto a las plantas tratadas únicamente por irrigación radicular.

Con respecto al peso seco, se observó un incremento estadísticamente significativo en todos los casos con respecto a las plantas control. En este caso, el tratamiento combinado de *biopriming*+irrigación radicular mostró un notable incremento en el peso seco de las plantas en comparación con el tratamiento por irrigación radicular, siendo especialmente importante en las cepas N3 y SS1B. En cambio, las plantas a las que se les aplicaron las cepas L193, Z8, P1, P2 y BA mediante tratamiento combinado mostraron un mayor desarrollo en cuanto a longitud y biomasa que las aquellas tratadas exclusivamente por irrigación radicular. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles.

Tabla 8. Variación del crecimiento y desarrollo de plantas de tomate tratadas con las cepas bacterianas mediante irrigación radicular y mediante la combinación *biopriming*+irrigación con respecto al control. *, diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Tratamiento	Cepa	Variación (%)					
		Longitud parte aérea	Longitud raíz	Longitud total	Peso parte aérea	Peso raíz	Peso total
Irrigación	N3	9,8	-12,5	1,0	-7,8	11,2	-4,2
	EN21	10,0	-0,9	5,6	43,4*	33,2*	41,5*
	SN31	2,1	28,3*	12,5*	82,8*	97,7*	85,6*
	SS1B	5,3	-7,9	0,1	-17,7	16,8	-11,2
<i>Biopriming</i> + Irrigación	N3	16,1*	11,4	14,3*	110,7*	55,3*	106,8*
	EN21	10,5	-1,6	5,8	114,4*	59,8*	110,5*
	SN31	1,6	29,4*	12,4	149,5*	87,2*	145,0*
	SS1B	14,5*	7,0	11,6	95,3*	67,1*	93,3*

5. Determinación de la actividad degradadora de AHLs sintéticas

A las cepas seleccionadas por su actividad PGP, se les analizó la actividad *quorum quenching* sobre AHLs sintéticas mediante un ensayo de difusión en placa. Para ello, a los cultivos de cada cepa se le adicionaron AHLs de cadena corta, media y larga, con o sin sustituciones (C4-HSL, C6-HSL, 3-O-C6-HSL, C8-HSL, 3-O-C8-HSL, C10-HSL, 3-OH-C10-HSL, C12-HSL, 3-O-C12-HSL y C14-HSL) y tras su incubación se detectaron las AHLs remanentes.

Los resultados de este ensayo muestran que las cepas P1, P2, P4 y BA no degradaron ninguna de las AHLs probadas (Tabla 9). En cambio, las cepas L193, N3, N8, Z8, P6 y EN21 mostraron una elevada versatilidad de degradación, siendo especialmente importante la actividad de la cepa P6. Esta degradó completamente todas las AHLs, mostrando una degradación parcial en el caso particular de 3-O-C6-HSL (Fig. 27). Se observó un patrón de degradación similar para la cepa EN21 obteniéndose en este caso una degradación parcial de C12-HSL. La cepa N3 mostró una mayor capacidad para degradar las AHLs de cadena media y larga, con o sin sustituciones en la cadena hidrocarbonada.

Tabla 9. Determinación de la actividad *quorum quenching* empleando AHLs sintéticas mediante un ensayo de difusión en placa. +, degradación leve; ++, degradación moderada; +++, degradación completa; -, no degradación.

Procedencia	Cepa	N-acil homoserina lactona									
		C4-HSL	C6-HSL	3-O-C6-HSL	C8-HSL	3-O-C8-HSL	C10-HSL	3-OH-C10-HSL	C12-HSL	3-O-C12-HSL	C14-HSL
Colección BIO 188	L193	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++
	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N3	+	+	++	+++	+++	++	+	++	+++	+++
	N8	+++	+	+	++	+++	++	++	+	+++	+++
	Z8	++	++	+	++	+++	++	+++	++	+++	+++
Saladar de El Margen	P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P6	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	EN21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	SN31	-	++	+++	++	+++	++	+++	-	-	-
	SS1B	-	+++	+++	++	+++	++	+++	-	-	-

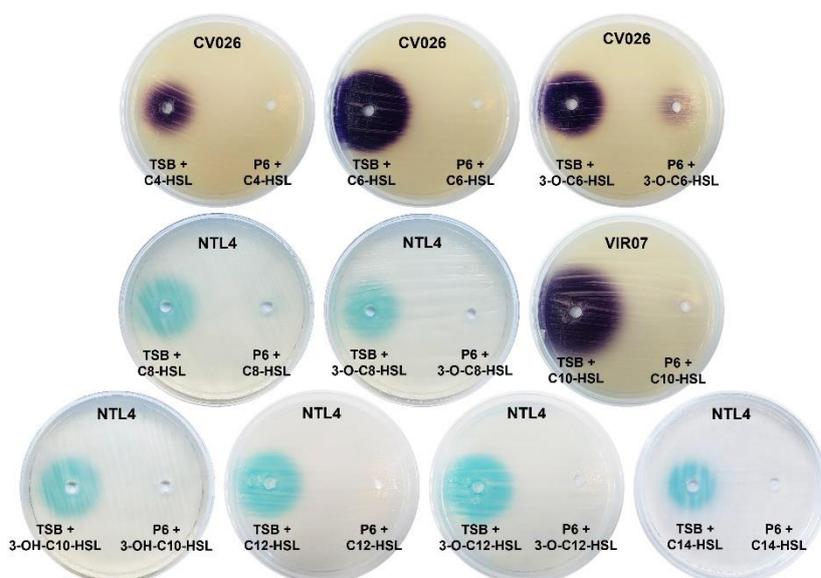


Figura 27. Actividad *quorum quenching* de la cepa P6 frente a AHLs sintéticas detectada mediante ensayo de difusión en placa empleando los biosensores *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en medio LB y AB-Xgal.

6. Identificación taxonómica de las cepas

La identificación taxonómica de las 12 cepas seleccionadas por su actividad PGP mediante el gen ARNr 16S, mostró homología con cepas previamente descritas y depositadas en las bases de datos, siendo el porcentaje de identidad superior al 99% (Tabla 10).

En el caso de la cepa Z8, mostró un porcentaje de identidad del 99,2% con la especie *Psychrobacillus lasiocapitis* DSM 100484^T, un porcentaje que podría indicar que se trataba de una

cepa nueva de este género. Por su parte, el análisis de la secuencia de la cepa N3 mostraba un porcentaje de identidad muy parecido con *Brevibacterium frigoritolerans* DSM 8801^T (99,93%) y *Peribacillus simplex* DSM 1321^T (99,88%) que impidió identificar correctamente la especie más próxima filogenéticamente. Por ello, las cepas N3 y Z8 se seleccionaron para un estudio taxonómico más profundo ya que podrían constituir nuevas especies. En este estudio taxonómico también se incluyó también la cepa N10, procedente de heces de nutria, que destacó por su elevada actividad quitinolítica y por un porcentaje de identidad del 95,4% con *Paenibacillus chitinolyticus* LMG 18047^T, aunque no fue seleccionada en este trabajo por su escasa actividad PGP detectada en el primer cribado descrito anteriormente.

Tabla 10. Identificación taxonómica de las cepas basada en la secuencia del gen ARNr 16S. Pb, pares de bases.

	Cepa	Tamaño (pb)	Especie	Identidad (%)
Colección BIO-188	L193	1465	<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070 ^T	99,40
	BA	1348	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	99,43
	N3	1460	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T	99,93
			<i>Peribacillus simplex</i> DSM 1321 ^T	99,88
	Z8	1476	<i>Psychrobacillus lasiicapitis</i> DSM 100484 ^T	99,20
Saladar de El Margen	P1	1345	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T	100,0
	P2	1472	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> DSM 6840 ^T	100,0
	P4	1402	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> DSM 6840 ^T	100,0
	P6	1362	<i>Pseudomonas segetis</i> CIP 108523 ^T	99,93
	EN21	1434	<i>Staphylococcus equorum</i> ATCC 43958 ^T	99,86
	SN31	1429	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502 ^T	99,85
	SS1B	1431	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	99,79

La secuenciación del genoma de las cepas N3, Z8 y N10 y su posterior análisis filogenómico junto con la caracterización fenotípica y quimiotaxonómica, dio lugar a la descripción de tres nuevas especies, *Peribacillus castrilensis* N3^T (artículo en preparación), *Psychrobacillus vulpis* Z8^T (Rodríguez et al., 2020) y *Paenibacillus lutrae* N10^T (Rodríguez et al., 2019), respectivamente.

A continuación, se incluye un breve resumen de la descripción de las tres cepas:

Descripción de *Peribacillus castrilensis* sp. nov.

Peribacillus castrilensis (cas'tri'len'sis. N.L. *castrilensis* por su aislamiento del parque natural de Castril, Granada, España).

Peribacillus castrilensis sp. nov. es una cepa móvil, Gram positiva, con forma de bacilo, con endosporas en esporangios deformantes. Las colonias de *Peribacillus castrilensis* sp. nov. son de color crema en medio TSA tras 48 horas de incubación a 28°C. Esta cepa es halotolerante y puede crecer en presencia de entre 0,5 y 7,5% (p/v) de NaCl, siendo el 1% (p/v) la concentración óptima. Crece en un rango de temperatura de 10 a 42°C, con un óptimo a 28°C, y en un rango de pH de 6 a 8, con pH 7 como valor óptimo. *Peribacillus castrilensis* sp. nov. es un microorganismo quimioorganótrofo, y aerobio estricto. No reduce el nitrato en condiciones aeróbicas, es catalasa positivo y oxidasa negativo. Esta cepa es positiva para la producción de arginina hidrolasa, triptófano desaminasa y de indol, pero negativa en la prueba ONPG, en la producción de lisina y

ornitina descarboxilasas, ureasa, acetoína, H₂S y en la utilización de citrato. No produce ácidos a partir de ningún compuesto ensayado en las galerías API 50CH, excepto a partir de la esculina, en la que se detectó una reacción débil.

Los principales ácidos grasos de *Peribacillus castrilensis* sp. nov. son anteiso-C_{15:0} (68.07%) e iso-C_{15:0} (8.71%). El contenido en G+C del genoma es 40,3 mol% según la determinación *in silico*.

La cepa tipo N3^T (= LMG 32505^T) se aisló de heces de nutria europea en el parque natural de Castril, Granada (España).

El código de acceso de la secuencia del gen ARNr 16S de *Peribacillus castrilensis* N3^T en las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ es OL619301, y la secuencia completa del genoma se encuentra depositada bajo el código JAJNAF000000000 (Fig. 28).

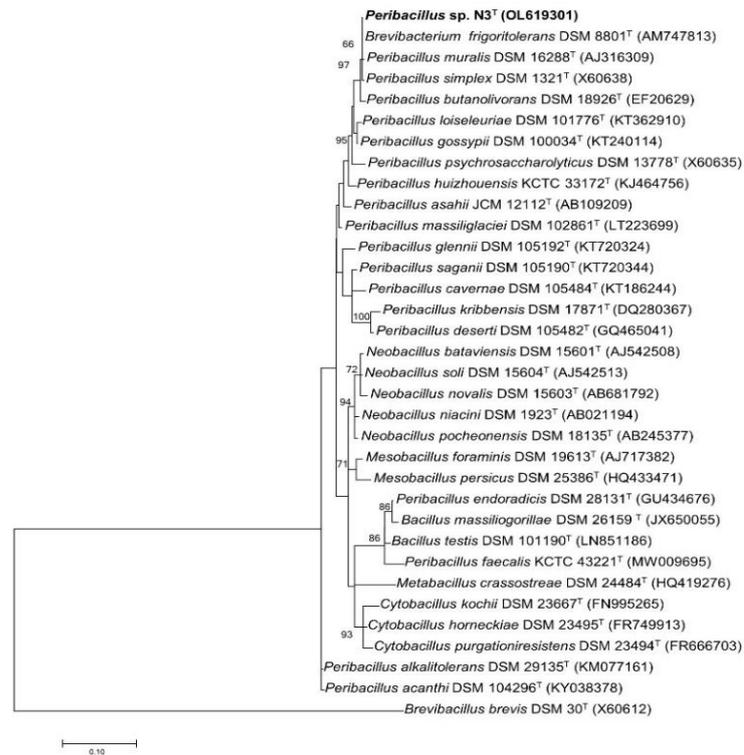


Figura 28. Reconstrucción filogenética de la cepa N3^T y las cepas más próximas basada en la secuencia del gen ARNr 16S mediante el algoritmo de *máximum-likelihood* basado en modelo Kimura 2-parámetros. Se empleó una distribución discreta de tipo gamma para realizar el modelo de tasa de diferencias evolutivas entre posiciones [5 categorías (+G, parámetro = 0,2703)]. Los números de acceso de cada secuencia en las bases de datos Genbank/EMBL/DDBJ se indican entre paréntesis. Los valores de *Bootstrap* se expresan como porcentajes tras 1000 réplicas, y se muestran aquellos superiores al 60% en las ramificaciones. La barra indica 0,1 sustituciones por nucleótido. La secuencia del gen ARNr 16S de *Brevibacillus brevis* DSM 30^T se empleó como *outgroup*.

Descripción de *Psychrobacillus vulpis* sp. nov.

Psychrobacillus vulpis (vul'pis. L. gen. n. vulpis, del zorro).

Las células son bacilos, Gram positivos, móviles, anaerobios facultativos y con capacidad de formar esporas. Las endosporas forman esporangios deformantes y son centrales y redondeadas con un tamaño de 0,8 – 0,9 x 0,8 – 0,9 µm. Las colonias de color gris-transparente con forma de hélice invaden completamente la placa tras 5 días de incubación a 28°C. Halófila débil con un rango de tolerancia a NaCl comprendido entre el 0 y 5,5% (p/v) y un óptimo en 2,5% (p/v). Crecimiento en un rango de pH de 6 a 10, entre 0 y 37°C, con óptimos a pH 7 y 28°C. Resultados positivos en

catalasa, oxidada y producción de H₂S, y negativos en Voges-Proskauer y producción de indol. Hidrólisis positiva para el almidón, Tween 20, Tween 80, ADN y L-tirosina, pero negativa para la celulosa, caseína, gelatina, quitina, hemo y esculina. Resultados positivos en la producción fosfatasa ácida y alcalina y de sideróforos. Positiva en la reducción de nitrato, pero negativa para las enzimas arginina dehidrolasa, β-galactosidasa y ureasa. No se detectó la asimilación de ningún compuesto evaluado en las galerías API 20NE, excepto N-acetilglucosamina, malato y ácido adípico. Resultados positivos para esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, tripsina, α-quimiotripsina y naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. Débilmente positiva para la producción de valina arilamidasa. No se detectó la producción de ácidos a partir de ningún sustrato en el sistema API 50CH.

Los principales ácidos grasos celulares son iso-C_{14:0}, iso-C_{15:0} y anteiso-C_{15:0}. Los principales lípidos polares son difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, mientras que la principal quinona isoprenoide respiratoria es MK-8 con una inferior presencia de MK-7. El contenido en G+C de la cepa tipo es 35,9 mol%.

La cepa tipo es Z8^T (=CECT 9721^T=LMG 31001^T, aislada de heces de zorro rojo (*Vulpes vulpes*) recolectadas en el parque nacional de Las Tablas de Daimiel, Ciudad Real, España.

El código de acceso de la secuencia del gen ARNr 16S de *Psychrobacillus vulpis* Z8^T en las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ es MH910346, y la secuencia completa del genoma se encuentra depositada bajo el código VDG100000000 (Fig. 29).

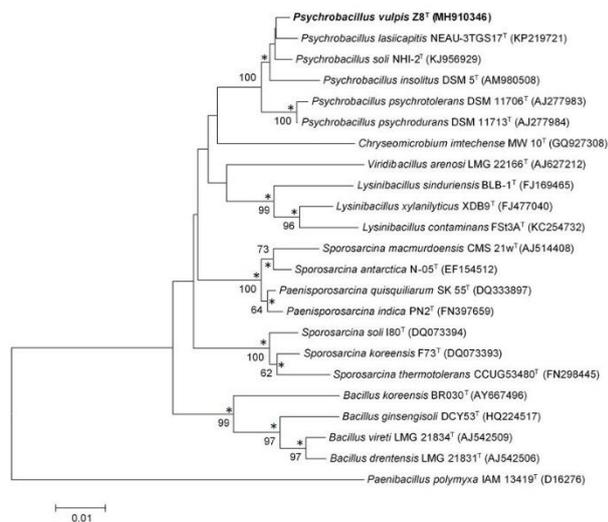


Figura 29. Reconstrucción filogenética de la cepa Z8^T y las cepas más próximas basada en la secuencia del gen ARNr 16S mediante el algoritmo de *neighbour-joining*. Los números de acceso de cada secuencia en las bases de datos Genbank/EMBL/DDBJ se indican entre paréntesis. Los valores de *bootstrap* se expresan como porcentajes tras 1000 réplicas, y se muestran aquellos superiores al 60% en las ramificaciones. La barra indica 0,01 sustituciones por nucleótido. Los asteriscos indican que los correspondientes nodos se obtuvieron también en los árboles generados aplicando los algoritmos de *maximum-likelihood* y *maximum-parsimony*. La secuencia del gen ARNr 16S de *Paenibacillus polymyxa* IAM 13419^T se empleó como *outgroup*.

Descripción de *Paenibacillus lutrae* sp. nov.

Paenibacillus lutrae (lu'trae. L. fem. gen. n. lutrae perteneciente a la nutria *Lutra lutra* de la cual fue aislada la cepa).

Paenibacillus lutrae sp. nov. es una bacteria móvil, recta, Gram positiva, con forma de bacilo de 2,2 x 0,8 μm que forma endosporas ovales en esporangios deformantes. Las colonias de

Paenibacillus lutrae sp. nov. en medio LB son de color rosa tras 48 horas de incubación a 28°C. El patrón de crecimiento de las células es uniforme en medio líquido. Es capaz de crecer en concentraciones de NaCl comprendidas entre 0 y 3% (p/v), con un óptimo al 1% (p/v). Las células crecen en un rango de temperatura de 15 a 37°C, con un óptimo en 28°C, y un rango de pH de 7 a 10, con pH 8 como óptimo. *Paenibacillus lutrae* sp. nov. es un microorganismo quimioorganótrofo y anaerobio facultativo. No es capaz de reducir el nitrato en condiciones aerobias. Las pruebas rojo de metilo e indol fueron negativas, así como la presencia de catalasa y oxidasa. No se detectó la producción de ácidos a partir de adonitol, D-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, *myo*-inositol, lactosa, D-manitol, D-manosa, D-melezitosa, L-ramnosa, sacarosa, D-salicilina, D-sorbitol, sorbosa o D-trehalosa. La hidrólisis de Tween 20 fue positiva, pero no la de almidón, caseína, lecitina, gelatina, Tween 80, urea o hemo, ni tampoco se detectó la producción de fosfatasas. Produce H₂S a partir de L-cisteína, pero no butanodiol a partir de glucosa (Voges-Proskauer negativo). La prueba de ONPG es negativa. No crece en agar MacConkey. Es susceptible a ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), novobiocina (30 µg), penicilina G (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), rifampicina (2 µg) y tetraciclina (30 µg). Es resistente a estreptomomicina (10 µg), kanamicina (30 µg) y trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg).

Los ácidos grasos principales de la *Paenibacillus lutrae* sp. nov. son anteiso-C_{15:0} (56,95%), C_{16:0} (11,69%) e iso-C_{15:0} (8,46%), y la principal quinona isoprenoide es MK-7. Los lípidos polares mayoritarios son difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfoaminolípidos (PNL). El diaminoácido del peptidoglicano de la pared celular es ácido *meso*-diaminopimélico (tipo A1γ). El contenido en G+C del genoma está comprendido entre el 45 y el 48 mol% de acuerdo con el método de la temperatura de fusión (T_m) y del 49,8 mol% en el caso de la determinación *in silico*.

La cepa tipo N10^T (= CECT 9541^T =LMG 30535^T) se aisló de heces de nutria europea en el parque natural de Castril en Granada (España).

El código de acceso de la secuencia del gen ARNr 16S de *Paenibacillus lutrae* N10^T en las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ es MG831947, y la secuencia completa del genoma se encuentra depositada bajo el código RHLK00000000. (Fig. 30)

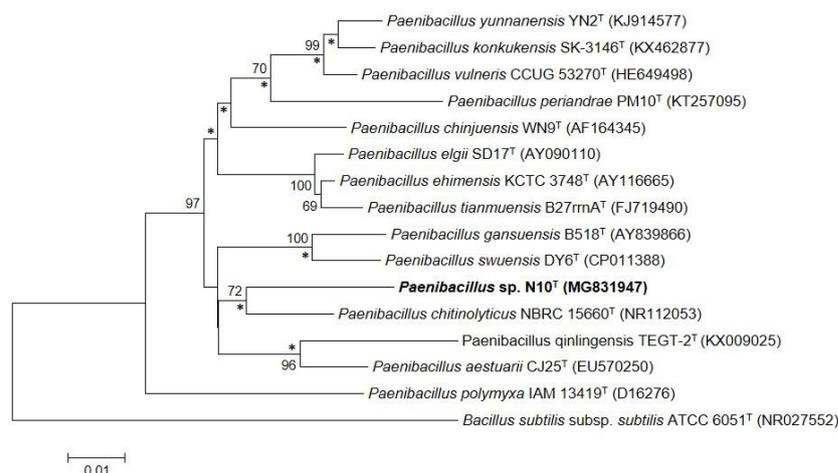


Figura 30. Posición filogenética de la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa N10^T y su relación con otras cepas próximas basada en el algoritmo de *neighbour-joining*. Los números de acceso de cada secuencia en las bases de datos Genbank/EMBL/DDBJ se indican entre paréntesis. Los valores de *bootstrap* se expresan como porcentajes tras 1000 réplicas, y se muestran aquellos superiores al 60% en las ramificaciones. La barra indica 0,01 sustituciones por nucleótido. Los asteriscos indican que los correspondientes nodos se obtuvieron también en los árboles generados aplicando los algoritmos de *maximum-likelihood* y *maximum-parsimony*. La secuencia del gen ARNr 16S de los *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051^T se empleó como *outgroup*.

7. Determinación de la actividad antibacteriana

Con el fin de determinar si las cepas seleccionadas producían metabolitos que pudieran interferir en el crecimiento de los fitopatógenos *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 se realizó un ensayo de antibiosis en medio sólido empleando el sobrenadante procedente de un cultivo de 5 días de cada cepa QQ en medio TSB, previamente esterilizado por filtración.

Los resultados del ensayo revelaron que las cepas *B. atrophaeus* L193, *B. atrophaeus* N8, *P. vulpis* Z8, *B. velezensis* SN31 y *B. amyloliquefaciens* SS1B mostraban diferente grado de actividad antibacteriana frente a los distintos fitopatógenos (Tabla 11). La cepa *B. atrophaeus* N8 inhibió moderadamente el crecimiento de cuatro de los cinco fitopatógenos, mientras que la cepa *P. vulpis* Z8, mostró actividad frente a tres fitopatógenos. Las cepas *B. velezensis* SN31 y *B. amyloliquefaciens* SS1B fueron las que exhibieron una mayor actividad, inhibiendo considerablemente el crecimiento de todos los fitopatógenos. En cambio, las cepas *P. castrilensis* N3, *P. segetis* P6 y *S. equorum* EN21 no produjeron ningún efecto sobre el crecimiento de estos patógenos de plantas.

Tabla 11. Actividad antibacteriana de las cepas QQ mediante ensayo de difusión en pocillo frente a los principales fitopatógenos.

Fitopatógeno	Halo de inhibición (mm)							
	L193	N3	N8	Z8	P6	EN21	SN31	SS1B
<i>D. solani</i>	8	0	7	0	0	0	14	14
<i>E. amylovora</i>	9	0	5	5	0	0	17	16
<i>P. atrosepticum</i>	5	0	8	3	0	0	14	14
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	2	0	9	7	0	0	11	12
<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	6	0	0	0	0	0	14	15

A pesar de sus buenas características PGP y QQ, los resultados obtenidos en este ensayo dieron lugar a la exclusión de las cepas *B. atrophaeus* L193, *B. atrophaeus* N8, *P. vulpis* Z8, *B. velezensis* SN31 y *B. amyloliquefaciens* SS1B para los posteriores ensayos ya que este trabajo tiene como objetivo estudiar la actividad QQ sobre la virulencia de los patógenos sin afectar al crecimiento de estos. Por ello, se seleccionaron las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para la determinación y caracterización de la actividad *quorum quenching in vitro* y los siguientes ensayos.

8. Discusión

Desde hace varias décadas, la biodiversidad de los ambientes salinos ha sido muy estudiada debido a las características únicas que presentan los microorganismos que habitan en esas condiciones y a la producción de compuestos de elevado interés biotecnológico. Sin embargo, son escasos los estudios que analizan la actividad promotora del crecimiento vegetal y la actividad

quorum quenching de las cepas bacterianas asociadas a las especies de halófitos que crecen en estas condiciones. Por ello, en este trabajo se planteó la búsqueda de cepas bacterianas que combinaran la actividad PGP y QQ, y que mostraran la elevada tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico que les confieren las condiciones de estos ambientes salinos, lo que permitiría aplicarlas en suelos agrícolas con diversas características fisicoquímicas.

El procesamiento de las muestras procedentes de suelos, aguas y plantas del Saladar de El Margen dio lugar a la selección de 320 cepas distintas en base a su morfología colonial en medio TSA diluido al 10% (p/v) de nutrientes (TSA_d). En cuanto a la concentración de NaCl, no se observó una gran diferencia entre la cantidad de cepas aisladas al 2 y al 5%, probablemente debido a las fluctuaciones de salinidad que sufre la zona del humedal entre las estaciones lluviosa y seca, que hacen que los microorganismos que habitan esas zonas tengan una elevada tolerancia a los cambios de este parámetro. Sin embargo, sí se encontró una elevada variedad en la morfología colonial de las muestras procedentes de plantas y de suelos rizosféricos con respecto a las muestras procedentes de los suelos no rizosféricos y de las muestras de agua. Esto es común en los ambientes extremos y oligotróficos, como el Saladar de El Margen, en los que la diversidad microbiana aumenta considerablemente en la rizosfera de las plantas halófitas por el aporte de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, proteínas, ácidos grasos en forma de exudados y de restos vegetales que realizan estas (Badri et al., 2009; Mukhtar et al., 2020b). En cuanto a la variedad de morfología colonial con respecto a la procedencia de las muestras, la planta *S. ramossisima* recolectada en la zona 1 fue la que mostró una mayor cantidad, lo que podría estar relacionado con una salinidad inferior, una mayor oxigenación de suelo y un mayor aporte de nutrientes a causa de la circulación superficial del agua de la zona de aislamiento.

Tras el aislamiento de las 320 cepas en cultivo puro, se realizó una prueba para seleccionar aquellos aislados capaces de crecer en las condiciones de cultivo comúnmente empleadas en el laboratorio (medio TSA sin diluir y NaCl 0,5%, p/v). Del total de los aislados, 124 crecieron en medio TSA, lo que indica que muchas de ellas son sensibles al estrés oxidativo que generan los componentes de un medio rico como este (Kato et al., 2018) o bien se trata de cepas halófilas débiles que requieren cierta concentración de NaCl superior al 0,5% (p/v) para su crecimiento.

Estos 124 aislados del Saladar de El Margen, junto con otras 71 cepas pertenecientes a la colección del grupo BIO-188 se sometieron a un estudio de la actividad promotora del crecimiento vegetal mediante pruebas bioquímicas y se seleccionaron aquellas que mostraban nueve o más resultados positivos en estas pruebas. Tras esta selección inicial, únicamente 14 cepas cumplieron los requisitos establecidos, de las que tres procedían de heces de nutria (*Peribacillus castrilensis* N3, *B. siamensis* N6 y *B. atrophaeus* N8), una de heces de zorro (*P. vulpis* Z8), dos de las salinas de La Malahá (Granada) (*B. atrophaeus* L193 y *B. amyloliquefaciens* BA) y 9 de la rizosfera de plantas de *S. hispanica* del Saladar de El Margen (*C. marina* P1, *P. atlantica* P2, *P. atlantica* P4, *P. segetis* P6, *S. equorum* EN21, *B. velezensis* EN31, *B. velezensis* SN31 y *B. amyloliquefaciens* SS1B). Estudios previos en ambientes salinos han confirmado que diversas especies halófitas como *Arthrocaulon* sp., *Atriplex* sp., *Glaux* sp., *Phragmites* sp., *Salicornia* sp. o *Salsola* sp., constituyen una fuente poco explorada de cepas bacterianas con actividad PGP (Borruso et al., 2014; Mukhtar et al., 2020b; Yamamoto et al., 2018). De igual modo, en los últimos años han adquirido importancia los estudios de la microbiota intestinal de distintos mamíferos como una fuente de cepas con interés agrícola por sus propiedad PGP, pero especialmente por su elevada versatilidad enzimática (Aiysha & Latif, 2019; Liu et al., 2013).

En cuanto a las pruebas realizadas para determinar su actividad PGP, la mayoría de las cepas mostraba resultados positivos en aquellas relacionadas con la nutrición vegetal, como la producción de fosfatasa ácida y alcalina, la fijación de nitrógeno y la producción de sideróforos.

Como se ha demostrado en diversos estudios, las cepas bacterianas con actividad PGP que aumentan la biodisponibilidad de nitrógeno, fósforo y hierro promueven un incremento en la productividad de los cultivos y reducen considerablemente la dependencia de fertilizantes químicos hasta un 50% (Anwar et al., 2016; Marques et al., 2010; Shakeri et al., 2016; Witte, 2011). Además, el secuestro del hierro de la rizosfera mediante la producción de sideróforos crea unas condiciones de crecimiento más competitivas que dificultan o incluso inhiben el crecimiento de otros microorganismos, incluidos los fitopatógenos, contribuyendo así a la formación de suelos supresivos (Gu et al., 2020; Miljaković et al., 2020; Villa-Rodríguez et al., 2019; Yu et al., 2011). Destacar además que todas ellas resultaron positivas para la producción de la enzima ACC desaminasa, salvo la cepa *P. atlantica* P4. Trabajos de investigación previos señalan que las plantas inoculadas con cepas PGP que disminuyen los niveles de etileno mediante la actividad de la enzima ACC desaminasa, incrementan el crecimiento y desarrollo de diversas especies vegetales en presencia de fitopatógenos bacterianos y fúngicos (Ghosh et al., 2018; Gupta & Pandey, 2019; Ravanbakhsh et al., 2017; Saikia et al., 2018), así como en condiciones de elevada salinidad o sequía y en presencia de metales pesados (Acuña et al., 2019; Hussein & Joo, 2018; Jaemsaeng et al., 2018; Tiwari et al., 2018). La producción de ácido indol-3-acético también fue comúnmente observada en estas cepas, un resultado prevalente en diversas cepas PGP de los géneros *Bacillus*, *Pantoea* y *Pseudomonas* (Cassán et al., 2014; Chandra et al., 2018) y su aplicación en diversas especies vegetales dio lugar a un incremento de la biomasa foliar y radicular, así como del contenido en clorofila (Islam et al., 2016; Khan et al., 2016; Patten & Glick, 2002). Por último, la producción de enzimas hidrolíticas fue un resultado bastante común y variable en todas las cepas, lo que estaría relacionado con una elevada versatilidad a la hora de emplear distintos sustratos como fuente de carbono, estabilizando la microbiota de la rizosfera, favoreciendo la colonización y con una elevada importancia en el biocontrol de fitopatógenos bacterianos y fúngicos (Behera et al., 2017; Choubane et al., 2016; Myo et al., 2019; Passera et al., 2019; Sadeghi et al., 2017). Por otro lado, la producción de surfactantes identificada por la hemólisis que mostraban algunas de estas cepas podría intervenir en el biocontrol de fitopatógenos y en la colonización de la planta (Alsohim et al., 2014; Bais et al., 2004; Goswami et al., 2016; Raaijmakers et al., 2006).

El análisis de la tolerancia a distintas concentraciones de NaCl de las 14 cepas de estudio permitió confirmar la elevada versatilidad que presentan las cepas aisladas de ambientes hipersalinos para crecer a distintas concentraciones de cloruro sódico, puesto que en su mayoría mostraron crecimiento en concentraciones de NaCl de hasta el 25% (p/v), salvo en el caso de las cepas *C. marina* P1, *P. atlantica* P2, *P. atlantica* P4 y P6 que fue ligeramente inferior. Sin embargo, las cepas procedentes de la microbiota de mamíferos, crecieron a concentraciones de NaCl inferiores, excepto la cepa *B. siamensis* N6 que logró crecer a concentraciones iguales o inferiores al 25% (p/v). Por otra parte, la concentración de NaCl a la que se produjo un crecimiento óptimo en la mayoría de las cepas se situó entre el 0,5 y el 5% (p/v), lo que indicó que la mayoría de las bacterias eran halotolerantes. Este rango de salinidad tan amplio tolerado por las cepas junto con la necesidad de evitar estados de estrés salino en las plantas y la posible inhibición del crecimiento de los fitopatógenos en los cocultivos, hicieron que se seleccionara una concentración de NaCl del 0,5% (p/v) para realizar los siguientes experimentos.

La determinación de la actividad PGP *in vivo* tanto en semillas como en plantas de tomate permitió confirmar los resultados previamente obtenidos en los ensayos *in vitro*. Así, la bacterización de semillas de tomate mostró la habilidad de estas cepas para aumentar el porcentaje de germinación, así como el crecimiento y desarrollo del germinado con respecto al control con agua. Tomando el índice de vigor como un indicador global del impacto de las cepas en el proceso de germinación, todas ellas mostraron efectos positivos en este aspecto. La

bacterización de semillas de diversas plantas con cepas de los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* ha demostrado tener efectos beneficiosos en la velocidad de germinación y en el desarrollo temprano de la planta debido a la reducción de los niveles de etileno mediante la actividad de la enzima ACC desaminasa y la producción de compuestos de la familia de las auxinas, como el ácido indolacético (AIA) (Mangmang et al., 2015; Roslan et al., 2020; SICUIA et al., 2016) y de la familia de las giberelinas (GAs), que producen la activación de diversas enzimas, entre las que destacan las α -amilasas, originando una temprana movilización del almidón de las semillas (Bharathi et al., 2004; Qessaoui et al., 2019). Igualmente, la aplicación exógena de AIA (Zhao & Zhong, 2013; Zhao et al., 2020) y de GAs (da Silva et al., 2005) en las semillas de diversas plantas ha confirmado estos efectos.

A nivel global, las cepas *B. atrophaeus* L193, *P. castrilensis* N3, *B. atrophaeus* N8, *P. atlantica* P2, *P. atlantica* P4, *P. segetis* P6, *B. amyloliquefaciens* BA, *S. equorum* EN21 y *B. velezensis* SN31, que mostraron actividad ACC desaminasa, amilasa y produjeron AIA, fueron las que produjeron cambios significativos en la germinación de las semillas de tomate, lo que podría confirmar la implicación de estos factores en una pronta y vigorosa germinación de las semillas. En cambio, los escasos o negativos resultados en cuanto a índice de vigor obtenidos en las semillas tratadas con las cepas *B. siamensis* N6 y *B. velezensis* EN31, aun siendo positivas para esas tres características, indicarían la influencia de otro tipo de factores además de los señalados anteriormente. En base a estos resultados, se decidió no seguir con el estudio de estas dos cepas en los siguientes experimentos.

Por otra parte, los ensayos de promoción del crecimiento en plantas de tomate tras aplicar las cepas bacterianas mediante irrigación radicular mostraron resultados muy prometedores. En su mayoría las cepas incrementaron la longitud y la biomasa tanto de la parte aérea como de la radicular con respecto a las plantas control, siendo más notable el incremento de biomasa. Por lo general, si bien no se detectó un gran cambio en la longitud de la parte aérea, se observó una mayor cantidad de hojas y con tamaño superior, lo que aumentó la densidad foliar, lo que permitiría una capacidad fotosintética superior en las plantas tratadas con las cepas PGP. Estos beneficios se han observado en estudios previos tras el tratamiento de plantas de tomate con distintas cepas PGP y se han relacionado con la producción de fitohormonas (AIA y GA), con la fijación de nitrógeno y con la contribución que ejercen estas cepas a una mayor biodisponibilidad del fósforo y del hierro presentes en el sustrato (Fan et al., 2017; Qessaoui et al., 2019). Algo parecido ocurrió con la parte radicular, en la que, en general, no se produjo una gran variación de la longitud de la raíz, sin embargo, se observó un incremento considerablemente de la biomasa debido a un elevado desarrollo de raíces secundarias y una elevada densidad de pelos radicales. Esta interferencia en la arquitectura radicular de las plantas es una característica bien documentada de las cepas con actividad PGP, especialmente en plantas de *A. thaliana*, siendo esencialmente atribuida a la alteración del balance hormonal auxinas/citoquininas en favor de las primeras. Este desequilibrio favorece la formación de raíces laterales y pelos radicales en detrimento de una mayor longitud de la raíz principal, favoreciendo así la captación de agua y nutrientes del sustrato (Persello-Cartieaux et al., 2001; Ryu et al., 2005; Zamioudis et al., 2013b).

La combinación de la bacterización de semillas y la posterior irrigación radicular con las cepas *P. castrilensis* N3, *S. equorum* EN21, *B. velezensis* SN31 y *B. amyloliquefaciens* SS1B mejoró considerablemente la biomasa foliar y radicular de las plantas de tomate en comparación con aquellas tratadas únicamente por irrigación radicular. Igualmente, la longitud se vio afectada positivamente, aunque no alcanzó la intensidad del incremento en la biomasa. Estas diferencias generadas por el método de aplicación de las cepas PGP podrían estar relacionadas con la ausencia de quimiotaxis hacia los exudados de las raíces de tomate, con la falta de movilidad de las cepas o bien con dificultades que muestran estas para realizar una colonización efectiva de la raíz

(Mahmood & Kataoka, 2018; O'Callaghan, 2016). Por ello, la bacterización de las semillas podría establecer una relación planta-bacteria más estable y duradera en el tiempo, favoreciendo así la capacidad de estas cepas para promover el crecimiento de la planta mediante los mecanismos previamente descritos (Roslan et al., 2020).

En general, las cepas PGP que lograron incrementar la longitud o la biomasa de las plantas de tomate de forma significativa, fueron aquellas que mostraban resultados positivos para la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo y la producción de sideróforos en los ensayos *in vitro*.

Por último, se abordó un estudio para determinar la actividad *quorum quenching* de las cepas seleccionadas por su actividad PGP.

Las cepas PGP mostraron en su mayoría una elevada versatilidad en la degradación de AHLs sintéticas, siendo más efectiva dicha actividad sobre aquellas con una longitud de cadena media y larga.

La capacidad para degradar AHLs de la cepa *P. vulpis* Z8 constituye la primera descripción de la actividad *quorum quenching* en especies del género *Psychrobacillus*. Por el contrario, esta actividad es frecuente en especies del género *Bacillus* habiendo sido descrita en *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* (Dong et al., 2002; Lee et al., 2002; Ulrich, 2004; Wang et al., 2007; Wang et al., 2004). Sin embargo y hasta la fecha, esta es la primera descripción de la degradación de AHLs realizada por las cepas *B. atrophaeus* L193, *B. atrophaeus* N8 y *B. velezensis* SN31. Por otra parte, la elevada actividad degradadora de AHLs de la cepa *P. castrilensis* N3 fue previamente observada en un estudio en el que la cepa *B. simplex*, recientemente reclasificada en el género *Peribacillus* como *P. simplex* (S. Patel & R. S. Gupta, 2020), mostraba una elevada capacidad para inhibir la virulencia de *Erwinia amylovora* mediante *quorum quenching* (Hanano, Harba, Al-Ali, et al., 2014).

El estudio de la interferencia en los sistemas QS por parte de especies del género *Staphylococcus* es escaso, sin embargo, se ha descrito la producción de dos moléculas inhibitoras de QS, conocidas como yayurea A y B, por parte de *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* (Chu et al., 2013). Recientemente, (Morohoshi, Kamimura, et al., 2020) demostraron la producción de enzimas QQ de tipo lactonasa capaces de degradar AHLs en las especies *S. carnosus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* y *S. sciuri*. Así, la elevada actividad QQ de la cepa *S. equorum* EN21 obtenida en este trabajo hace posible la inclusión de *S. equorum* en este grupo de estafilococos coagulasa negativos con actividad QQ.

En el caso de la cepa *P. segetis* P6, la eficacia y versatilidad para degradar todas las AHLs ensayadas muestran su potencial en el control de la virulencia de fitopatógenos mediante QQ. A lo largo de los últimos años, han ido aumentando los estudios de la detección de esta actividad en algunas cepas del género *Pseudomonas*, como es el caso de *P. syringae* pv. *syringae* (Shepherd & Lindow, 2009), *P. nitroreducens* (Kaur & Yogalakshmi, 2020) o *P. aeruginosa* PAO1 (Bokhove et al., 2010; Wahjudi et al., 2011). Incluso se ha documentado la capacidad de *P. aeruginosa* PAO1 para modular la actividad de sus sistemas QS mediante la degradación enzimática de sus propias AHLs (Huang et al., 2003; Huang et al., 2006; Wong et al., 2012).

La ausencia de actividad QQ de la cepa *B. amyloliquefaciens* BA es un resultado poco común en las cepas de esta especie. De hecho, la cepa *B. amyloliquefaciens* SS1B mostró una gran actividad degradadora de AHLs de cadena media, tal y como se ha descrito en diversas cepas de este género por la intervención de enzimas con estructura homóloga a la lactonasa AiiA (Amin et al., 2016; Yin et al., 2010).

Así, estas bacterias seleccionadas con doble actividad PGP-QQ podrían tener una potencial aplicación en el biocontrol de fitopatógenos mediante la interferencia de los sistemas *quorum sensing* que controlan diversas características relacionadas con la virulencia.

Finalmente, la secuenciación y análisis del gen ARNr 16S de las 14 cepas seleccionadas por su actividad PGP *in vitro*, permitió identificarlas taxonómicamente. Se observó que pertenecían a los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria*, siendo predominante el primero. A nivel de género, las cepas de *Bacillus* fueron las más abundantes. Otros estudios de la biodiversidad de la rizosfera de *Salicornia* y otros halófitos han revelado resultados similares en los que las cepas identificadas pertenecen a los filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Mukhtar et al., 2020b; Szymańska et al., 2018; Yamamoto et al., 2018). Del mismo modo, la mayoría de las cepas con actividad PGP pertenecen a estos filos (Drogue et al., 2012; Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Puesto que las cepas *Peribacillus castrilensis* N3 y *P. vulpis* Z8, junto con la cepa N10, no seleccionada por su escasa actividad PGP, mostraban un porcentaje de identidad muy próximo entre dos especies, se realizó la secuenciación de sus genomas. El análisis genómico, quimiotaxonómico y fenotípico de estas permitió describir tres especies nuevas: *Peribacillus castrilensis* N3^T (artículo en preparación), *Psychrobacillus vulpis* Z8^T (Rodríguez et al., 2020) y *Paenibacillus lutrae* N10^T (Rodríguez et al., 2019).

En base a los resultados obtenidos en estos ensayos de degradación de AHLs, se decidió no proseguir con el estudio de las cepas *B. amyloliquefaciens* BA, *C. marina* P1, *P. atlantica* P2 y *P. atlantica* P4 puesto que no mostraban actividad *quorum quenching*. Sin embargo, los prometedores resultados de la actividad PGP tanto *in vitro* como en semillas y plantas de tomate de la cepa *P. atlantica* P4 podrían suponer un avance en el uso agrícola de cepas bacterianas clásicamente aisladas de ambientes marinos.

El mecanismo de QQ se basa en la interferencia de los sistemas QS del patógeno sin afectar su crecimiento. Por ello, el primer paso en el estudio de las bacterias QQ para su utilización como agentes de biocontrol fue analizar el posible efecto en la inhibición del crecimiento de los principales fitopatógenos de relevancia agrícola. Las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 no mostraron actividad inhibidora frente a ninguno de los fitopatógenos, lo que permitiría su aplicación en el biocontrol de *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mediante un mecanismo QQ. En cambio, las cepas *B. atrophaeus* L193, *B. atrophaeus* N8, *P. vulpis* Z8, *B. velezensis* SN31 y *B. amyloliquefaciens* SS1B inhibieron significativamente el crecimiento de estos patógenos. Esta actividad inhibidora es común entre las cepas de la familia *Bacillaceae* ampliamente estudiadas y empleadas en agricultura como agentes de biocontrol por su elevada producción de enzimas, compuestos orgánicos volátiles, surfactantes, bacteriocinas y antibióticos (Aloo et al., 2019; Borriss, 2011; Shafi et al., 2017). Aunque estos resultados obligaron al descarte de estas cepas en este estudio, sí que destacaron por su potencial aplicación en agricultura como promotoras del crecimiento vegetal, por sus buenos resultados en plantas de tomate, y como agentes de biocontrol, por su capacidad para inhibir el crecimiento de diversos fitopatógenos.

Capítulo 2

Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vivo* de las cepas seleccionadas empleando plantas de interés agrícola

Resumen

Diversos estudios apuntan que la colonización del tejido vegetal es un requisito para que las cepas con actividad promotora del crecimiento (PGP) establezcan una relación efectiva y duradera con las plantas. En este proceso interviene la producción, composición y liberación de exudados por parte de las raíces que ejercen un efecto atrayente o repelente en el microbioma presente en el suelo. Por tanto, aquellas cepas con la capacidad de detectar y desplazarse en respuesta a gradientes químicos tendrán una ventaja a la hora de colonizar la rizosfera de las plantas. Tras la colonización de las raíces, las cepas PGP son capaces de ejercer su actividad y promover el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos, así como favorecer la tolerancia a estrés biótico y abiótico en la planta. En base a esto, se realizó un estudio de la movilidad, la quimiotaxis a distintos compuestos químicos y exudados de plantas, la formación de *biofilm* y la producción de exopolisacáridos en las cepas *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 y *Pseudomonas segetis* P6, como mecanismos esenciales para la colonización.

Los resultados de los ensayos de movilidad mostraron que era de tipo *swimming* y *swarming* en la cepa *P. castrilensis* N3 y de tipo *swimming*, *swarming* y *twitching* en la cepa *P. segetis* P6. Por el contrario, la cepa *S. equorum* EN21 mostró ser móvil, aunque no se pudo determinar el tipo de movimiento. En cuanto a los ensayos de quimiotaxis, las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 mostraron atracción a GABA y exudados de plantas de tomate y de *Arabidopsis*. En el caso concreto de la cepa *P. castrilensis* N3 tan solo mostró quimioatracción a exudados de *Arabidopsis*. El análisis genómico de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, permitió identificar varios clústeres de genes relacionados con la movilidad y con la quimiotaxis de estas cepas. Sin embargo, no se encontró ninguna relación entre el genoma y la movilidad y quimiotaxis de la cepa *S. equorum* EN21.

La mayor capacidad de formación de *biofilm* se dio en el caso de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6, alcanzándose valores inferiores para la cepa *P. castrilensis* N3, pero en todos los casos la formación de *biofilm* se vio estimulada por la suplementación con exudados de plantas. Por otra parte, únicamente la cepa *P. segetis* P6 produjo exopolisacáridos.

En cuanto a la colonización de las raíces de las plantas de tomate, se detectó la presencia de acúmulos de células de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, mientras que la cepa *P. segetis* P6 colonizó densamente las raíces. Por otra parte, tanto los recuentos en placa de las raíces de tomate como el estudio por microscopía no mostraron signos de una colonización endofítica.

Finalmente, el análisis de las propiedades promotoras del crecimiento de las tres cepas en plantas de tomate en invernadero mostró un incremento significativo en la biomasa aérea y radicular en comparación con las plantas control tratadas con agua. El estudio de los mecanismos implicados en esta promoción del crecimiento indicó un claro impacto en el metabolismo del nitrógeno de las plantas asociado a un aumento del contenido de aminoácidos y proteínas. Por otra parte, el análisis del balance redox de las plantas no mostró signos de estrés. A nivel de la actividad enzimática, se detectó un incremento de aquellas relacionadas con la fijación de CO₂ y la asimilación de amonio. Por último, el estudio del perfil hormonal tuvo como principal resultado un notable incremento de la concentración de ácido indolacético en las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6.

Summary

Several studies suggest that the colonization of plant tissue is a requirement for the plant growth-promoting (PGP) strains to establish an effective and lasting relationship with plants. This process involves the production, composition and the release of exudates by the roots which exert an attractive or repellent effect on the microbiome present in the soil. Therefore, those strains with the ability to detect and move in response to chemical gradients will have an advantage when colonizing the plant rhizosphere. After root colonization, PGP strains are able to exert their activity and promote plant growth through various mechanisms, as well as promote tolerance to biotic and abiotic stress in the plant. Based on this, motility, chemotaxis to different chemical compounds and exudates of plants, the biofilm formation and exopolysaccharide production were studied in the *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 and *Pseudomonas segetis* P6 strains, as an essential mechanism for root colonization.

Results obtained from *P. castrilensis* N3 strain motility tests showed that it possessed swimming and swarming motility, while *P. segetis* P6 showed swimming, swarming and twitching motilities. By contrast, *S. equorum* EN21 strains was shown to be motile, although the type of movement could not be determined. As for chemotaxis trials, *S. equorum* EN21 and *P. segetis* P6 strains showed attraction to GABA and tomato and arabidopsis root exudates. In the specific case of *P. castrilensis* N3 strain, it only showed chemoattraction to arabidopsis root exudates. *P. castrilensis* N3 and *P. segetis* P6 genome mining allowed us to identify several gene clusters related with the motility and chemotaxis observed in these strains. However, no link was found between the *S. equorum* EN21 strain genome and its motility and chemotaxis.

The greatest capacity for biofilm formation was detected in the *S. equorum* EN21 and *P. segetis* P6 strains, reaching lower values for *P. castrilensis* N3 strain, but in all cases the biofilm formation was stimulated by the presence of plant root exudates. On the other hand, only *P. segetis* P6 strain produced exopolysaccharides.

As for the colonization of tomato plant roots, the presence of *S. equorum* EN21 and *P. castrilensis* N3 small cell groups were detected, while *P. segetis* P6 strain densely colonized the roots. Moreover, both the plate counts of tomato roots and the microscopy study showed no signs of endophytic colonization.

Finally, the analysis of the growth-promoting properties of the three strains in tomato plant under greenhouse conditions showed a significant increase in aerial and root biomass compared to the control plants treated with water. The study of the mechanisms involved in this growth promotion indicated a clear impact on the nitrogen metabolism of plants associated with an increase in the amino acids and protein content. Moreover, analysis of the plants' redox balance showed no signs of stress. At the level of enzymatic activity, an increase in those related to CO₂ fixation and ammonium assimilation was detected. Finally, the study of the hormonal profile had as its main result a notable increase in the concentration of indoleacetic acid in plants treated with *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 and *P. segetis* P6 strains.

Una vez seleccionadas las cepas *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 y *Pseudomonas segetis* P6 por su elevado potencial promotor del crecimiento vegetal *in vitro*, se decidió analizar la capacidad de estas para colonizar las raíces de las plantas de tomate mediante el estudio de su movilidad, quimiotaxis, formación de *biofilm* y producción de exopolisacáridos. Tras ello se evaluó su actividad PGP *in vivo* en plantas de tomate en condiciones de invernadero.

1. Análisis de la movilidad bacteriana

La movilidad de las cepas *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 y *Pseudomonas segetis* P6 se evaluó inicialmente mediante microscopía óptica utilizando la técnica de la gota pendiente. Tras analizar las suspensiones de las cepas, se detectó una elevada movilidad en la cepa *P. segetis* P6 y *P. castrilensis* N3, mientras que las células de la cepa *S. equorum* EN21 no mostraban movilidad alguna. Posteriormente, se estudió el tipo de movilidad *swimming*, *swarming* y *twitching* en un ensayo en placas de medio TSB suplementado con agar al 0,3%, 0,5% y 1% (p/v) respectivamente. Las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostraron una elevada movilidad de tipo *swimming* en las placas de TSB con agar al 0,3% (p/v), aunque esta no se detectó hasta transcurridas 24 horas (Fig. 31). Las tres cepas mostraron movilidad de tipo *swarming* en placas de TSB con agar al 0,5% (p/v), mientras que sólo las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 tenían movilidad de tipo *twitching* cuando se cultivaron el TSB con agar al 1% (p/v).

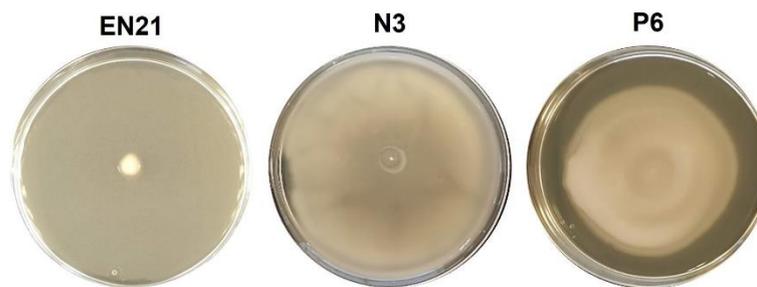


Figura 31. Determinación de la movilidad de tipo *swimming* en placas de TSB suplementado con agar al 0,3% (p/v) tras 24 horas de incubación.

Tras analizar el genoma de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 se observó una elevada riqueza de genes relacionados con la movilidad asociada a flagelos (*fla*, *flg*, *flh*, *fli* y *mot*). En el caso de la cepa *P. castrilensis* N3, los genes responsables de la movilidad se encontraron dispersos en el genoma (Fig. 32A), mientras que en el genoma de la cepa *P. segetis* P6 se encontraron agrupados en un único gran clúster (Fig. 32B).

El análisis genómico en busca de genes relacionados con la movilidad de tipo *twitching* fue menos fructífero, obteniéndose resultados solo en el de la cepa *P. segetis* P6. Se encontraron los genes encargados de la síntesis y de extensión/retracción de los pili de tipo IV *pil*ABCDEFGHIJKLMNQRSTUUVWXYZ1Y2Z y *fim*TUVX. En el caso de la cepa *S. equorum* EN21, no se identificó ningún gen relacionado con la movilidad de tipo *swimming*, *swarming* o *twitching*.

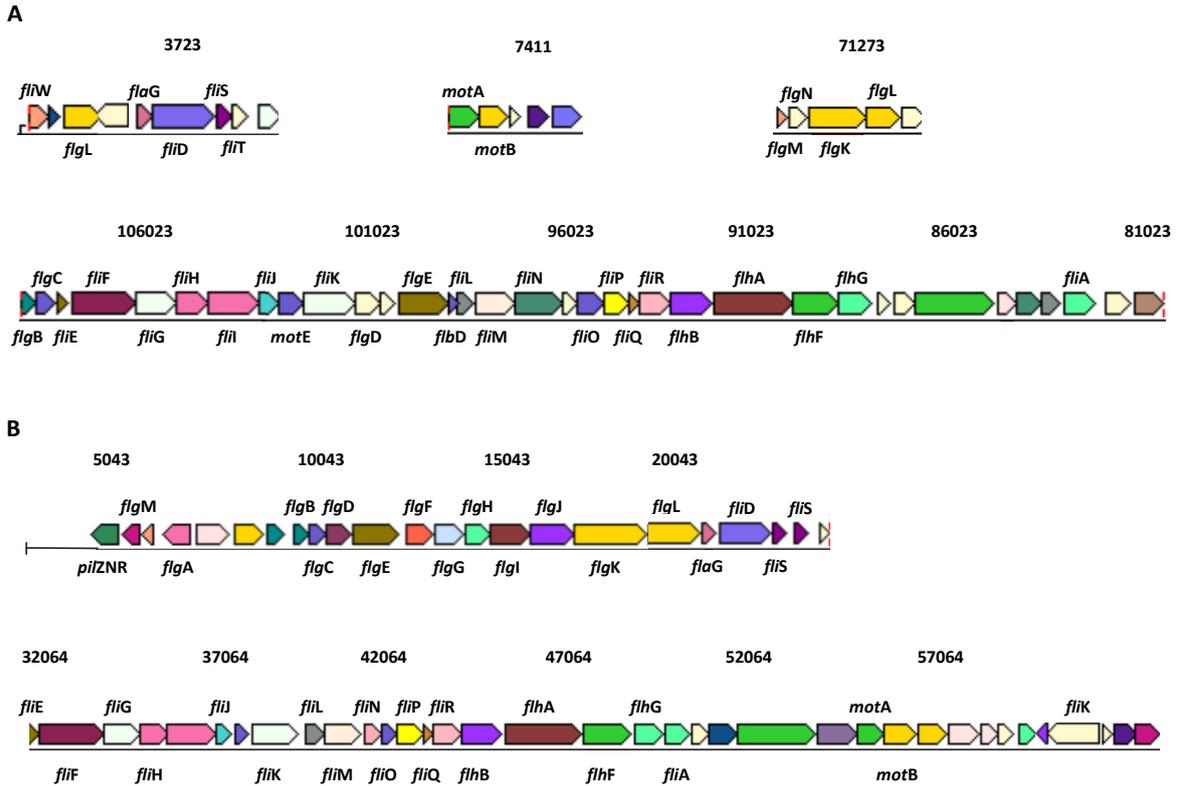


Figura 32. Distribución de los clústers de genes de movilidad asociados al movimiento flagelar. A, genoma de la cepa *P. castrilensis* N3; B, genoma de la cepa *P. segetis* P6.

2. Evaluación de la quimiotaxis bacteriana

Con el propósito de evaluar la capacidad de las cepas de moverse en respuesta a gradientes de concentración que pudieran estar asociados a la respuesta a exudados de plantas en el proceso de colonización de las raíces, se analizó la quimiotaxis de estas a GABA, casaminoácidos y exudados de tomate, de salicornia y de *arabidopsis* mediante ensayos cuantitativos en capilar y posterior siembra en placas de TSA. Los resultados se expresaron en UFC/capilar.

Los mayores recuentos de la quimiotaxis en capilar se encontraron en la cepa *S. equorum* EN21 que mostró atracción hacia todos los compuestos y exudados en comparación con el control de *buffer* de quimiotaxis (BC), observándose diferencias estadísticamente significativas en todos ellos (Fig. 33A). En el caso de la cepa *P. castrilensis* N3, los recuentos por capilar fueron mucho menores que en la cepa EN21, pero se halló una atracción significativa hacia todos los compuestos y exudados en comparación con el control, siendo especialmente elevados para casaminoácidos y exudados de *arabidopsis* (Fig. 33B). Por último, los ensayos realizados con la cepa *P. segetis* P6 mostraron una elevada atracción hacia todos los compuestos y exudados de plantas ensayados, siendo mayor hacia estos últimos excepto en el caso de los exudados de salicornia, en los que se halló únicamente un ligero y significativo incremento con respecto al control con *buffer* de quimiotaxis Fig. 33C).

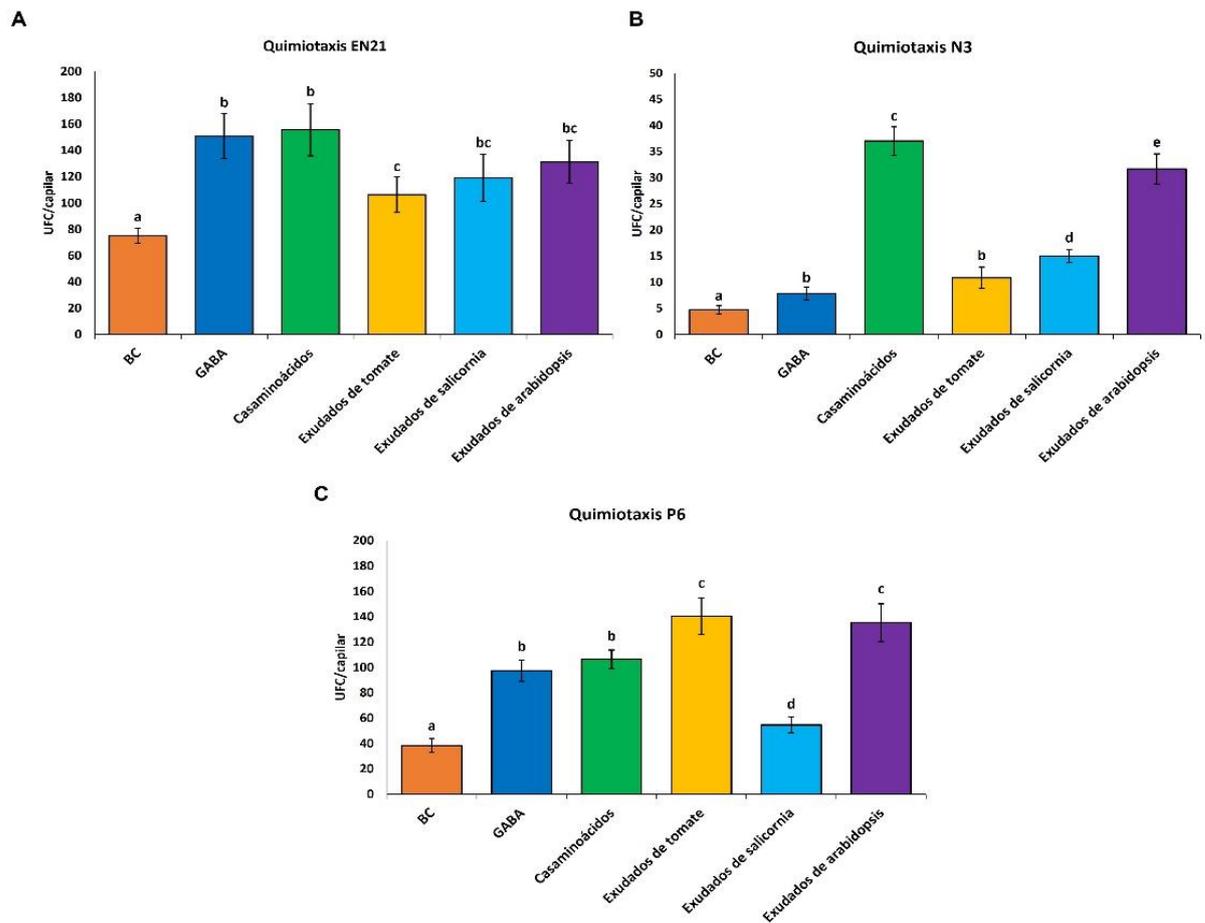


Figura 33. Recuentos del ensayo de quimirotaxis en capilar de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 a GABA, casaminoácidos y exudados de tomate, salicornia y arabidopsis. Como control se empleó buffer de quimirotaxis (BC). Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre compuestos ($p < 0,05$, $n = 10$).

El análisis de la anotación del genoma de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostró la presencia de varios genes con funciones relacionadas con la quimirotaxis (*che*, *chp*, *mcp* y *wsp*). En el caso de la cepa *P. castrilensis* N3 se encontraron los genes que codifican las proteínas CheABCDWY asociados al clúster de movilidad previamente descrito en el apartado anterior, mientras que CheRV estaba codificada por un clúster independiente (Fig. 34A). Además, se localizaron 4 proteínas aceptoras de grupos metilo (MCP) distribuidas en el genoma. Por su parte, en el genoma de la cepa *P. segetis* P6, los genes que codifican las proteínas CheABRVWYZ se hallaron igualmente distribuidos en el clúster asociado a la movilidad previamente descrito. Adicionalmente, se hallaron dos clústeres independientes: uno formado por los genes de las proteínas ChpABC y los de proteínas de los pili relacionados con la movilidad de tipo *twitching* (*pilGHIJK*), y otro que codifica las proteínas WspABCDE (Fig. 34B). Por otra parte, se identificaron 14 genes de proteínas MCP distribuidas en el genoma.

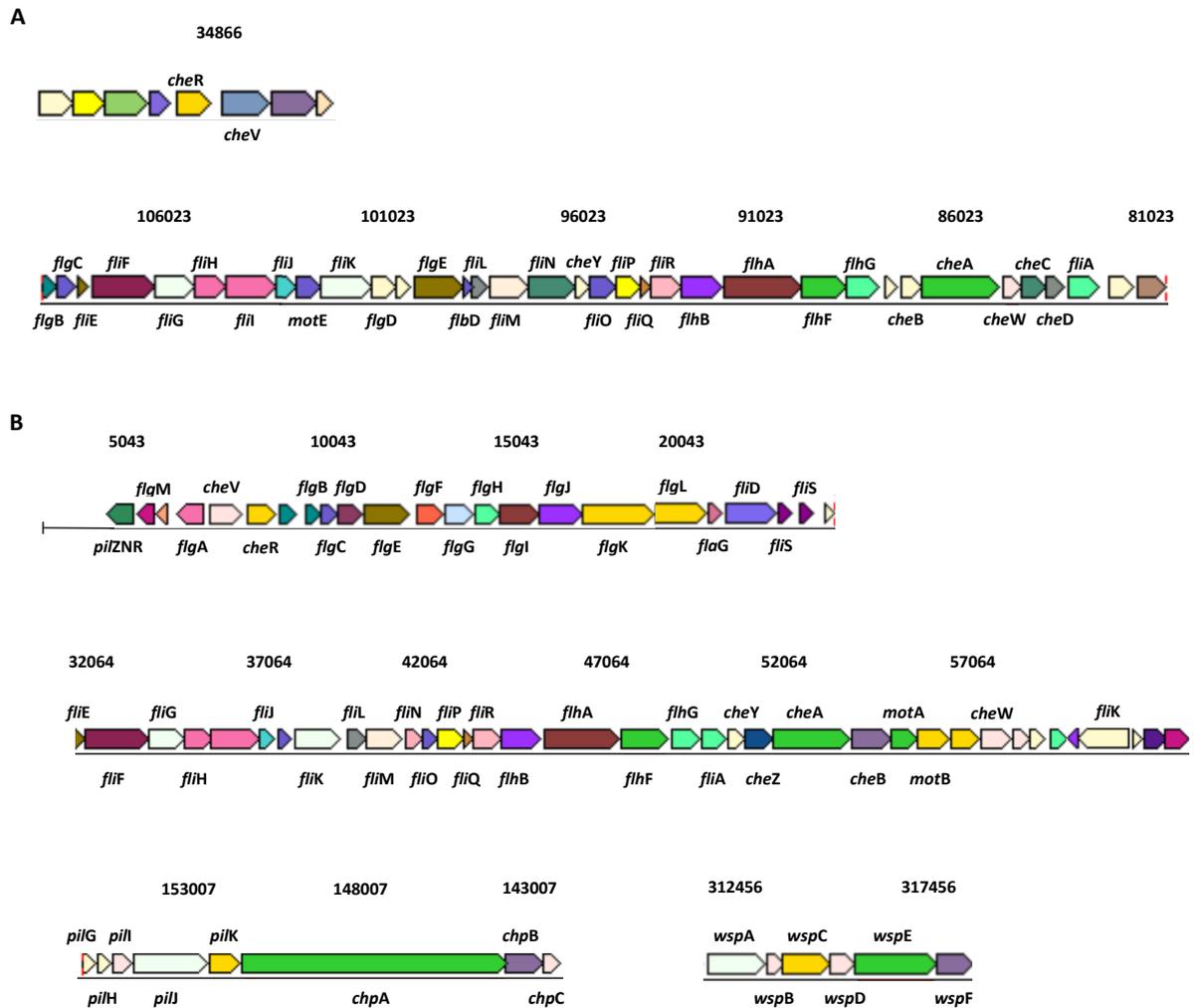


Figura 34. Distribución de los clústers de genes de quimiotaxis y movilidad. A, genoma de la cepa *P. castrilensis* N3; B, genoma de la cepa *P. segetis* P6.

3. Análisis de la formación de *biofilm* y producción de exopolisacáridos

El siguiente paso en el estudio de la colonización radicular fue analizar la formación de *biofilms* y la producción de exopolisacáridos como mecanismos bacterianos asociados a este proceso. Para ello se realizó un ensayo en placas *microtiter* de 96 pocillos empleando los medios LB, MY y TSB.

Los mayores valores de absorbancia a 540nm y con ello, la formación de *biofilm*, se encontraron en el caso de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6, mientras que se observó una escasa formación del mismo en la cepa *P. castrilensis* N3. En todos los casos, los valores fueron similares, siendo ligeramente superior cuando las cepas se cultivaron en medio TSB.

En base a estos resultados, se seleccionó el medio TSB para los futuros ensayos. Así, se analizó el efecto que tenía la suplementación de GABA y de exudados de tomate, de salicornia y de arábidopsis al 10% y 20% (p/v) en la formación de *biofilms* de estas cepas.

Los datos de absorbancia a 540 nm de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 mostraban un incremento significativo en la formación de *biofilm* en medio TSB suplementado con GABA al 10% (p/v),

con exudados de tomate al 20% (p/v) y de salicornia al 20% (p/v) con respecto al medio sin suplementar (Fig. 35A y 35C). En el caso de la cepa P6, también se observó un ligero incremento en la formación de *biofilm* cuando se cultivó en medio TSB suplementado con exudados de salicornia al 10% (p/v) (Fig. 35C). En el caso del ensayo con la cepa *P. castrilensis* N3, únicamente se observó un incremento estadísticamente significativo en la formación de *biofilm* cuando el medio TSB se suplementó con exudados de salicornia al 20% (p/v) (Fig. 35B). Además, la formación de *biofilm* de la cepa *P. castrilensis* N3 en todas las condiciones ensayadas fue considerablemente inferior a la obtenida por las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6.

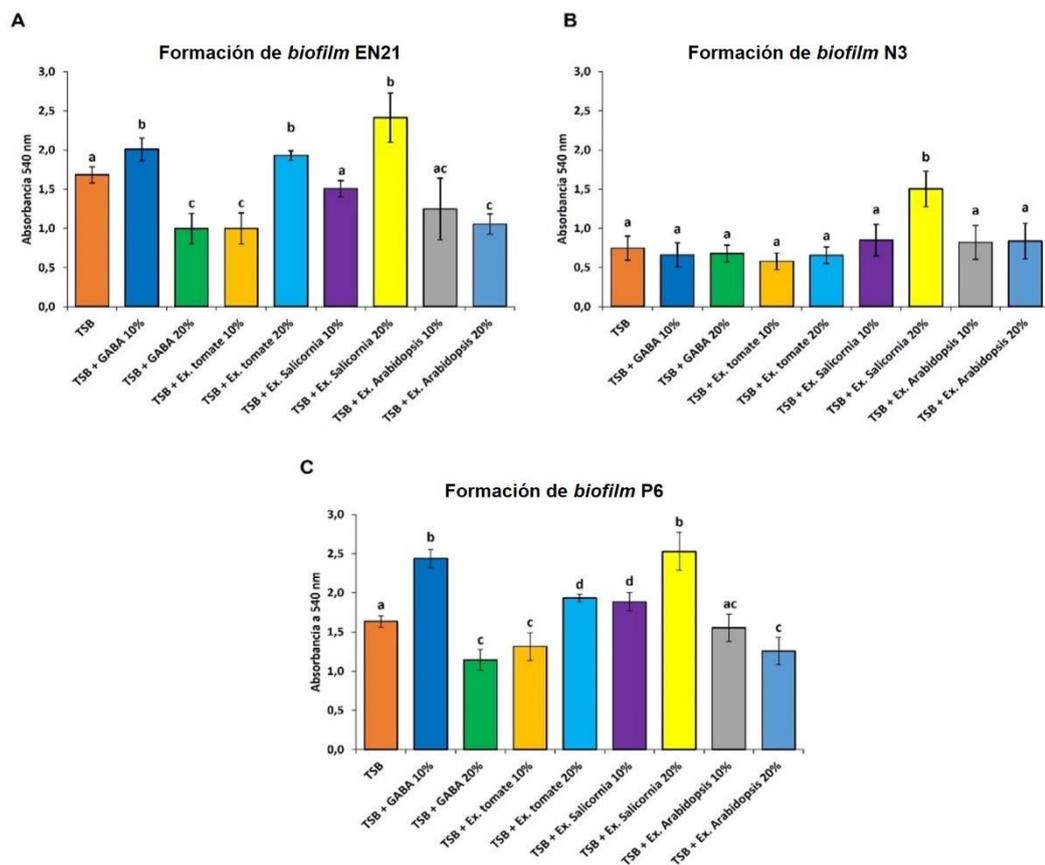


Figura 35. Determinación de la producción de *biofilm* en placa *microtiter* empleando medio TSB suplementado con GABA o con exudados de tomate, de salicornia y de arabisidopsis a distintas concentraciones. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre medios ($p < 0,05$, $n = 12$).

Finalmente, se cuantificó la producción de exopolisacáridos (EPS) de las tres cepas tras su cultivo en medio TSB suplementado con glucosa al 1% (p/v) durante 5 días. Las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 no mostraban una producción significativa, mientras que la cepa *P. segetis* P6 produjo 0,35 g/L de EPS, con un rendimiento del 19,8% con respecto a la biomasa. El análisis del genoma de la cepa P6 en busca de genes responsables de la síntesis de EPS dio lugar a la identificación del clúster de síntesis y regulación de la producción de alginato *algABCDEGJKLUX8*, *mucAB* y *kinB* lo que podría estar asociado a la producción de EPS observada en esta cepa.

4. Evaluación de la colonización de plantas de tomate *in vitro* por las bacterias de estudio

Con el objetivo de evaluar el grado de colonización de la raíz de plantas de tomate por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, se realizó un ensayo cuantitativo durante 7

días en medio Murashige y Skoog (MS) empleando un soporte semisólido y otro líquido para las plantas y posteriormente, se determinó mediante recuento en placa para la cuantificación de UFC/g de raíz.

Los recuentos obtenidos del ensayo en soporte semisólido para las tres bacterias mostraban valores crecientes en el tiempo encontrándose valores comprendidos entre 10^4 y 10^9 UFC/g de raíz. Similares resultados de colonización se obtuvieron en soporte líquido tras un periodo de incubación de 7 días (Tabla 12). En ninguno de los experimentos se encontraron evidencias de que alguna de las cepas realizase una colonización endofítica en base a los resultados de los recuento en placa de las raíces tratadas con estas cepas y desinfectadas en superficie.

Tabla 12. Recuentos de epífitos del ensayo de colonización de las raíces de tomate en soporte semisólido y en soporte líquido. UFC/g, unidades formadoras de colonias por gramo de raíz.

Cepa	Medio semisólido (UFC/g)			Medio líquido (UFC/g)
	5 días	6 días	7 días	7 días
EN21	$1,9 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$
N3	$4,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
P6	$2,8 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$

Por otra parte, las plantas utilizadas en los ensayos en medio líquido se emplearon para analizar la colonización de la raíz de forma cualitativa mediante microscopía. Las micrografías obtenidas por contraste por interferencia diferencial (DIC) y por contraste de fases (PC) mostraban acúmulos de bacterias en la superficie de las raíces tratadas con la cepa *P. castrilensis* N3, mientras que en las raíces de las plantas tratadas con la cepa *S. equorum* EN21, se observaron pequeñas masas bacterianas en la base de los pelos radicales y un ligero incremento del halo que produce el *biofilm* en las imágenes de contraste de fases con respecto a las raíces control (Fig. 36).

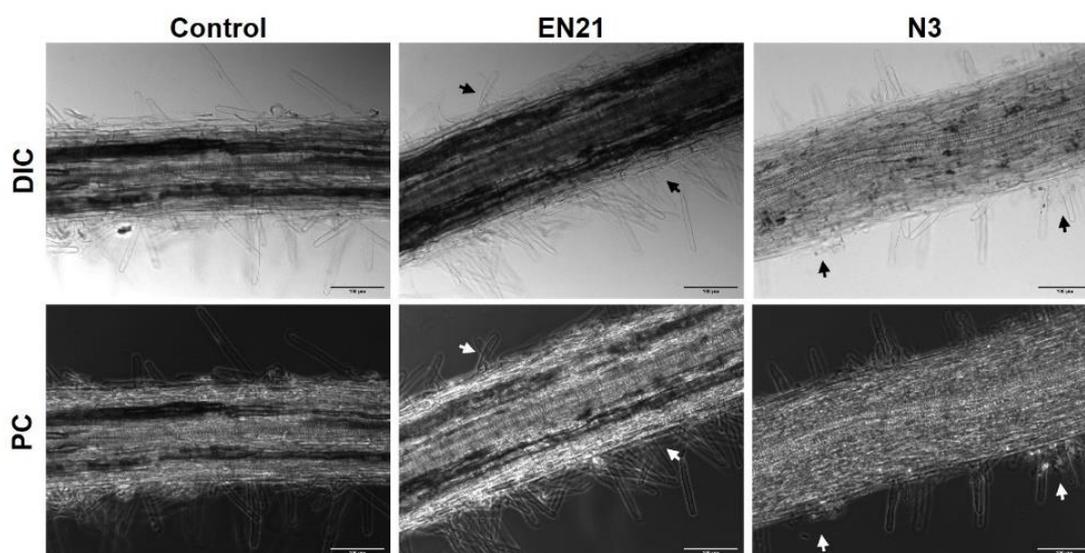


Figura 36. Análisis de la colonización de raíces de tomate por las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 mediante microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) y de contraste de fases (PC). Las flechas indican acúmulos de células bacterianas en la superficie de la raíz. Todas las micrografías se obtuvieron con las mismas condiciones de brillo y exposición a 200X.

En el caso de los ensayos con la cepa *P. segetis* P6, se empleó un marcaje con la proteína fluorescente GFP para analizar la colonización con más detalle mediante microscopía de fluorescencia

(FL) y microscopía confocal laser de barrido (CLSM), además de utilizar las técnicas DIC y PC. Las micrografías obtenidas por DIC y PC revelaron una gruesa capa en la superficie de la raíz que cubría completamente los pelos radicales y que oscilaba entre 70 y 120 μm . Las micrografías de fluorescencia, y su posterior tratamiento por superposición, permitieron identificar que esta capa estaba compuesta por células de la cepa *P. segetis* P6 aglutinadas en una densa matriz de *biofilm* y exopolisacárido sobre la superficie de la raíz (Fig. 37A). Por otra parte, las micrografías de CLSM de las raíces confirmaron los resultados previamente obtenidos por microscopía de fluorescencia. Los distintos planos obtenidos mediante CLSM mostraban la superficie de las raíces colonizadas por una capa de células de la cepa *P. segetis* P6 marcada y demostraron que esta no realiza una colonización endofítica, al no encontrarse fluorescencia en el interior de la raíz (Fig. 37B).

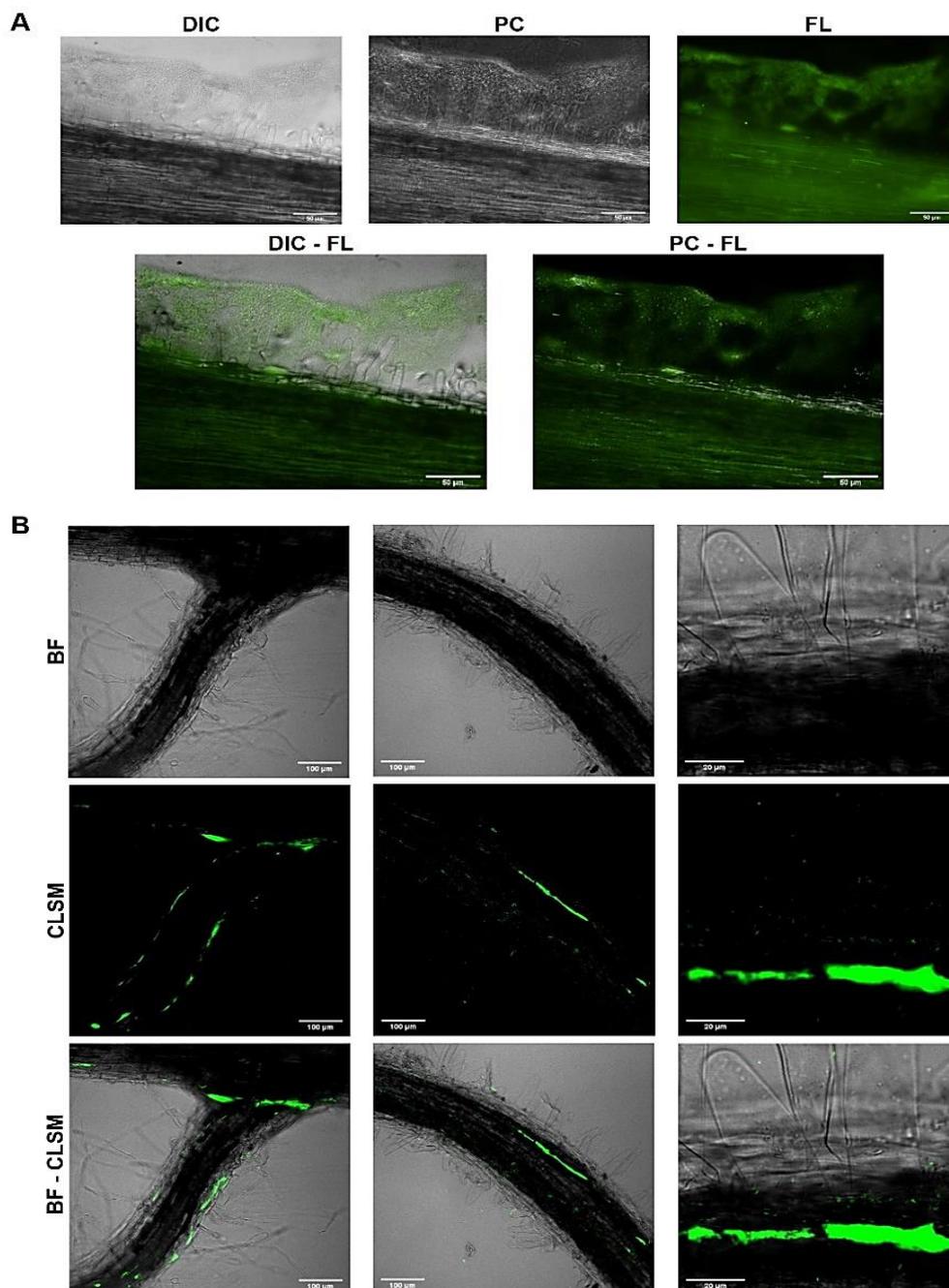


Figura 37. Análisis de la colonización de raíces de tomate por la cepa *P. segetis* P6 marcada con la proteína fluorescente GFP. A, micrografías obtenidas por microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC), contraste de fases (PC) y fluorescencia

a 488 nm (FL) a 400X; B, micrografías obtenidas por microscopía de campo claro (BF) y confocal láser de barrido (CLSM) a 200X y 400X. Todas las imágenes de cada bloque se obtuvieron con las mismas condiciones de brillo y exposición.

5. Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal *in vivo* en plantas de tomate mediante cultivo en invernadero

En base a los buenos resultados obtenidos por las tres cepas tanto en los ensayos iniciales de promoción de crecimiento en plantas de tomate como en la colonización de la raíz de estas, se realizó un ensayo en condiciones de invernadero empleando plantas de tomate. Para determinar los efectos de estas cepas bacterianas en la planta se analizaron parámetros físicos relacionados con el crecimiento, como la biomasa y el contenido en clorofila, los principales compuestos del metabolismo central, el balance redox, la actividad enzimática del metabolismo central y el perfil hormonal de las hojas de las plantas de tomate.

5.1 Determinación de biomasa y contenido en clorofila

Tras un mes desde el inicio de los tratamientos con las tres cepas por irrigación, se recolectaron las plantas y se analizaron diversos parámetros físicos relacionados con el crecimiento y el desarrollo, como la biomasa foliar y radicular y la concentración de clorofila de las hojas.

Como se puede observar en la Figura 38, las plantas de tomate irrigadas con las tres cepas de estudio mostraban una mayor densidad foliar que las plantas control y se apreciaba un incremento en la longitud de la parte aérea, especialmente en aquellas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 (Fig. 38B y 38D, respectivamente). En cuanto a la parte radicular, se observó un mayor desarrollo de raíces secundarias en las plantas tratadas con las tres cepas (Fig. 38B, 38C y 38D), lo que incrementó el volumen del sistema radicular en detrimento de una mayor longitud en comparación con las raíces de las plantas control tratadas con agua destilada (Fig. 38A). Estos resultados observacionales se confirmaron tras determinar el peso fresco de la parte aérea, cuyo análisis estadístico mostraba un incremento significativo del peso en las plantas tratadas con cada una de las cepas con respecto al control, siendo especialmente acentuado en aquellas tratadas con la cepa *S. equorum* EN21. En cuanto al análisis de la parte radicular, se observó un incremento significativo del peso de las raíces de las plantas tratadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 con respecto al control, mientras que la cepa *S. equorum* EN21 no mostraba diferencias con las plantas control (Fig. 38E).

Con respecto al análisis del contenido en clorofila de las hojas, se observó un ligero incremento en la concentración de clorofila A en las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 con respecto a las plantas control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de clorofila B. Teniendo en cuenta la concentración total de clorofila en las hojas, únicamente las hojas de las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 mostraban un incremento significativo de este parámetro (Fig. 38F).

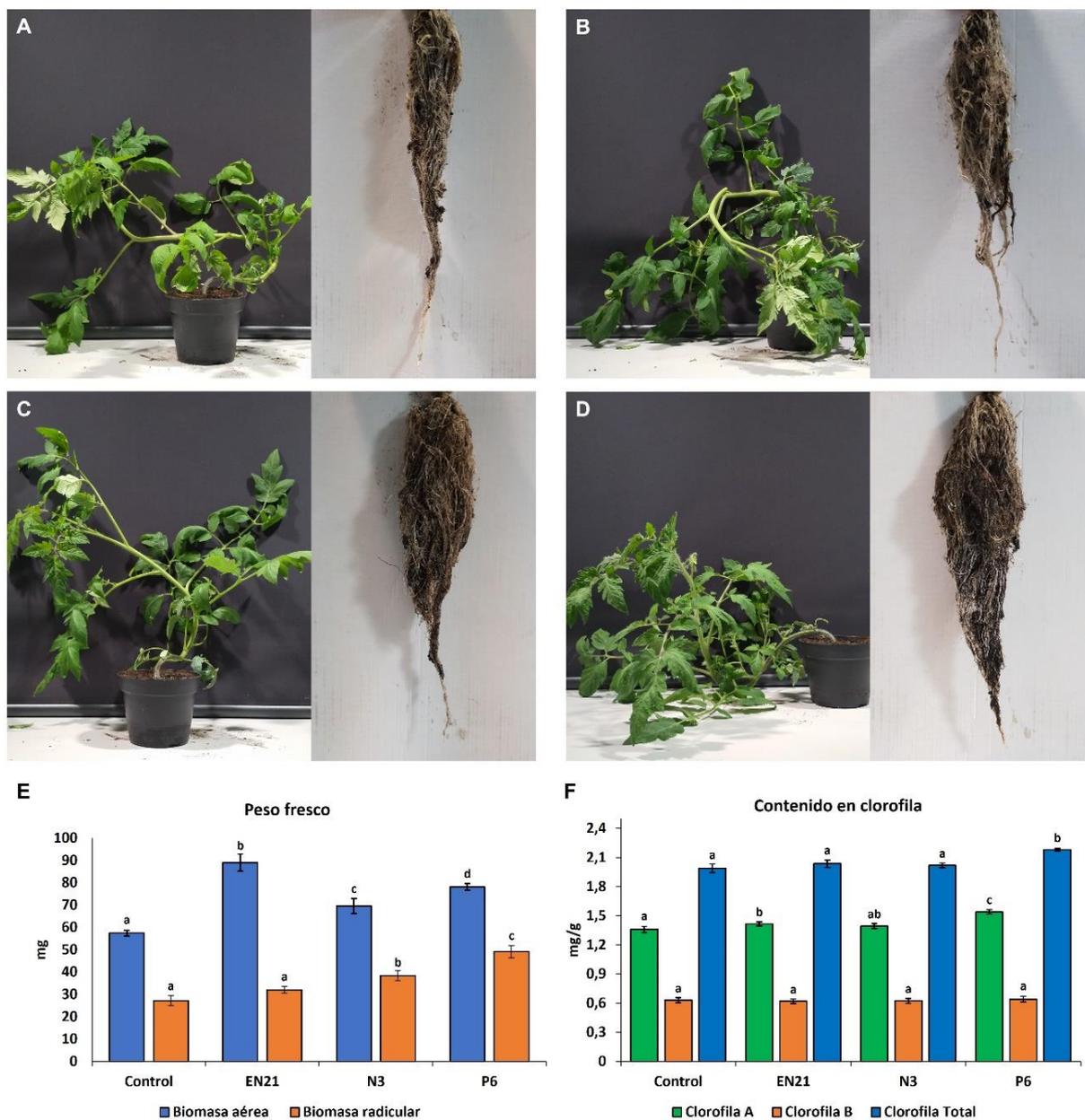


Figura 38. Análisis de biomasa y contenido en clorofila de las plantas de tomate irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 (B), *P. castrilensis* N3 (C) y *P. segetis* P6 (D) con respecto a las plantas control tratadas con agua destilada (A). Estudio de la biomasa (E) y del contenido en clorofila (F) de las plantas. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, $n = 5$).

5.2 Análisis del metabolismo central

Con el fin de dar explicación a este incremento en la biomasa y en la concentración de clorofila, y de la interacción planta-bacteria, se realizó un estudio de los principales metabolitos primarios en la planta. Así, el análisis del metabolismo de las plantas tratadas con cada una de las cepas permitió observar cambios significativos en la concentración de diversos parámetros con respecto a las plantas control tratadas con agua destilada.

Con respecto a los compuestos nitrogenados, se detectó un incremento de aminoácidos totales en aquellas plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 (Fig. 39A), y un incremento generalizado en la concentración de proteínas en las plantas irrigadas con cada una de las cepas (Fig.

39B). En el caso de la concentración de almidón, se observó una disminución de este en las plantas tratadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. En cambio, no se observaron cambios significativos en aquellas irrigadas con la cepa *S. equorum* EN21 (Fig. 39C).

Con respecto a la determinación del contenido en carbohidratos, el estudio de la concentración de glucosa indicó un incremento en las plantas irrigadas con la cepa *S. equorum* EN21, mientras que este parámetro se vio reducido en aquellas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 (Fig. 39D). Igualmente se detectó una reducción en la concentración de fructosa en las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, aunque la irrigación con la cepa *P. segetis* P6 dio lugar a un incremento de este carbohidrato (Fig. 39E). En cuanto al estudio de la concentración de sacarosa, únicamente el tratamiento de las plantas con la cepa *P. segetis* P6 produjo un incremento de este parámetro (Fig. 39F).

Por último, en lo que respecta al contenido de los ácidos orgánicos, únicamente las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 mostraron un incremento en la concentración de malato con respecto al control (Fig. 39G). En cambio, el tratamiento con la cepa *S. equorum* EN21 dio lugar a una disminución de la concentración de malato y citrato, mientras que el tratamiento con la cepa *P. castrilensis* N3, únicamente produjo un descenso en los niveles de citrato (Fig. 39G y 39H).

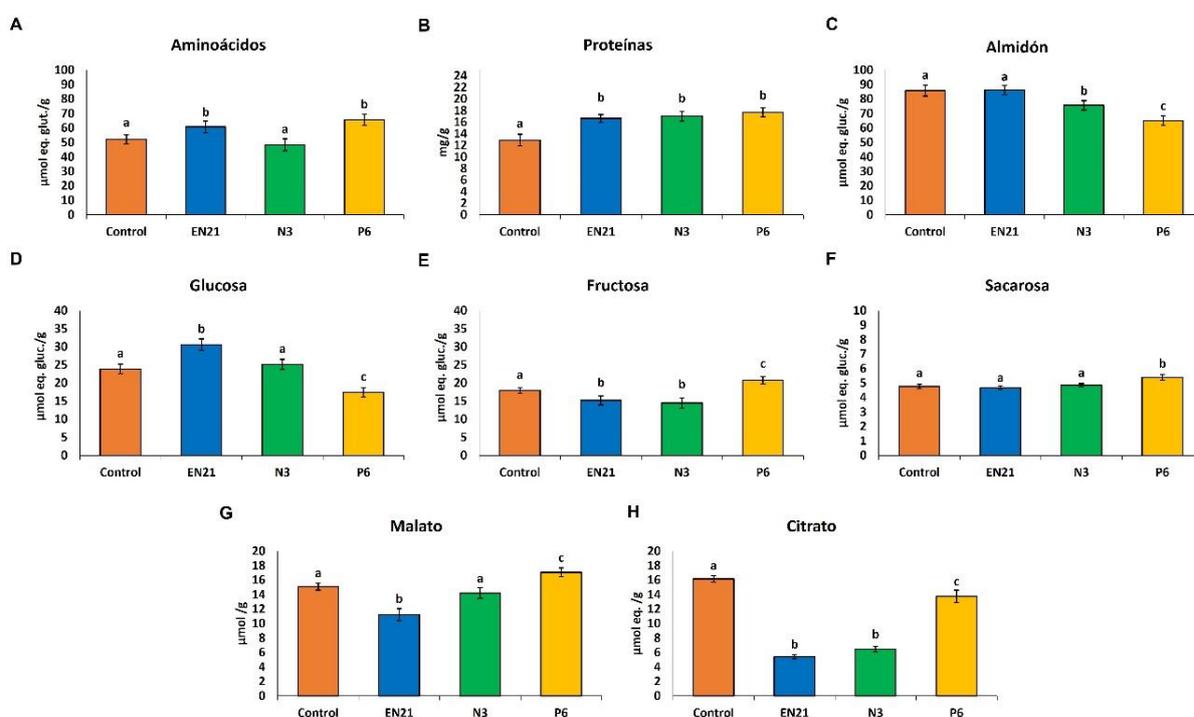


Figura 39. Estudio de compuestos del metabolismo central de hojas de plantas de tomate tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mediante irrigación. µmol eq. glut., µmol equivalente de glutamato; µmol eq. gluc., µmol equivalente de glucosa. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, $n = 5$).

5.3 Determinación del balance redox

Una vez analizada la influencia del tratamiento de las plantas de tomate con las tres cepas de estudio en el metabolismo central, se analizó el perfil redox en las hojas con el fin de determinar si el tratamiento con dichas cepas suponía algún tipo de estrés para la planta.

La determinación de la concentración de ascorbato total, reducido y oxidado no mostró ningún cambio significativo con respecto a las plantas control tratadas con agua destilada. En el caso de

aquellas irrigadas con la cepa *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, se observó un ligero descenso y aumento, respectivamente, en la concentración de ascorbato oxidado (Fig. 40A, 40B y 40C).

En el análisis de la concentración de glutatión, este antioxidante se detectó únicamente en su forma reducida (GSH) en todos los tratamientos. Además, se pudo apreciar un incremento de este en las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 con respecto a las plantas control (Fig. 40D).

En cuanto a la concentración de dinucleótidos de nicotinamida y adenina, se observó un incremento significativo de estos compuestos en su forma oxidada (NAD^+) y la consecuente disminución en su forma reducida (NADH) en las plantas irrigadas con las tres cepas con respecto al control (Fig. 40E y 40F). Del mismo modo, se detectó un incremento significativo en la concentración de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en la forma oxidada (NADP^+) en las plantas irrigadas con las tres cepas (Fig. 40G), aunque en la concentración de la forma reducida ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) únicamente se vio disminuida en las plantas tratadas con la cepa *S. equorum* EN21, mientras que permaneció inalterada en las plantas tratadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 con respecto a las plantas control (Fig. 40H).

Por otra parte, se detectó una reducción en la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las plantas tratadas con las tres cepas con respecto a las plantas control (Fig. 40I). En cuanto a la concentración de malondialdehído, no se detectaron cambios significativos con respecto a las plantas control, salvo en el caso de aquellas irrigadas con la cepa *P. castrilensis* N3, en las que se observó una ligera reducción (Fig. 40J).

Por último, la determinación de los compuestos fenólicos tuvo como resultado un descenso significativo en la concentración de estos en las plantas tratadas con las tres cepas con respecto a las plantas control (Fig. 40K).

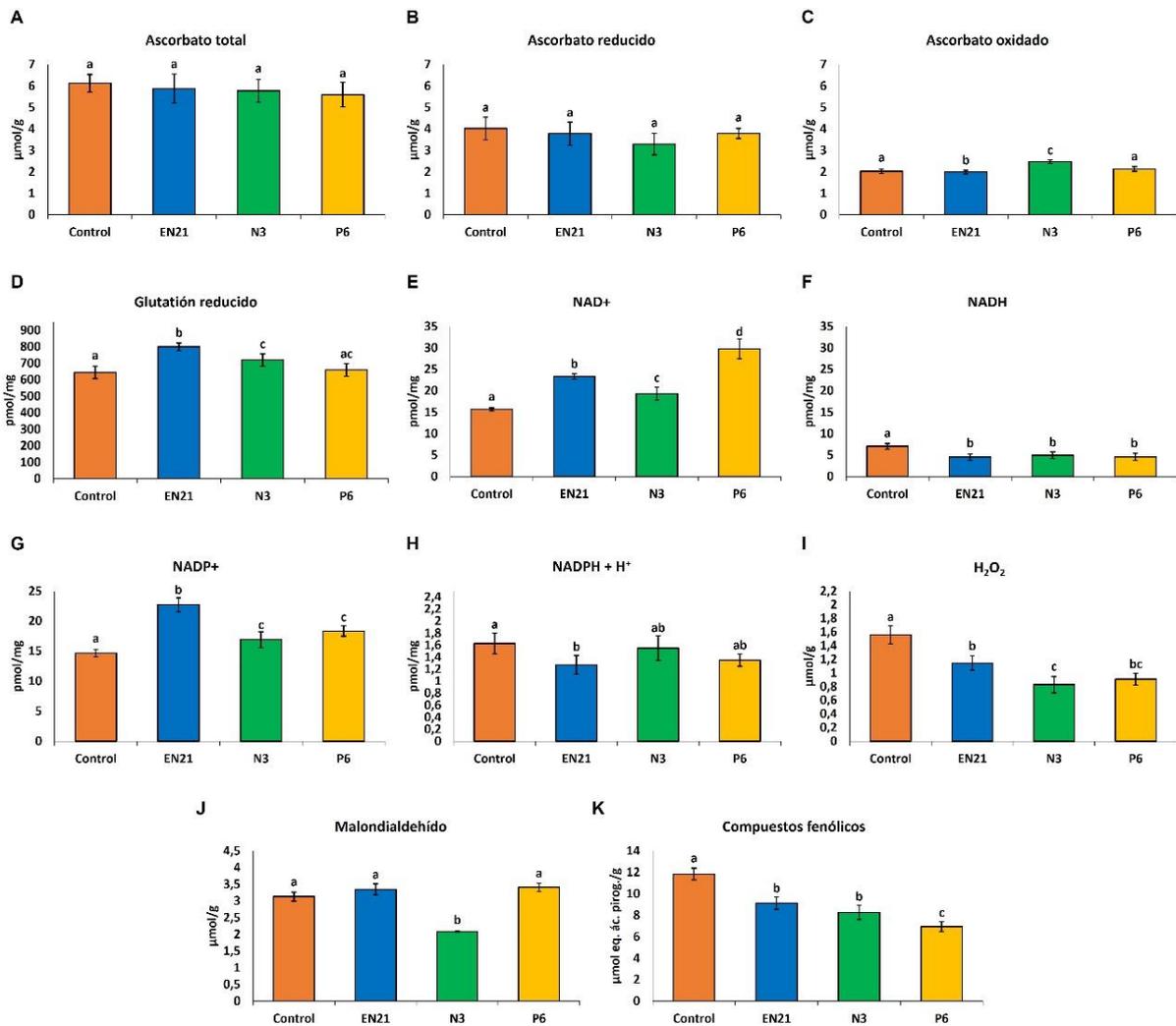


Figura 40. Caracterización del perfil redox de hojas de plantas de tomate tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mediante irrigación. “μmol eq. ác. pirog.”: μmol equivalente de ácido pirogálico. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, $n = 8$).

5.4 Evaluación de la actividad enzimática del metabolismo central

Tras la caracterización de metabolitos y del perfil redox en las plantas, se seleccionaron una serie de enzimas del metabolismo central para dar explicación a las variaciones obtenidas a nivel de compuestos nitrogenados, carbohidratos, ácidos orgánicos y de estado oxidativo, y se analizó su actividad.

El estudio de la actividad de la enzima invertasa ácida en las hojas de las plantas de tomate tratadas con las tres cepas tuvo como resultado la disminución de la actividad de la isoforma vacuolar (VInv) con respecto al control (Fig. 41A). Sin embargo, la actividad de la isoforma de la pared celular (CwInv), que en las plantas control estaba completamente ausente, se vio incrementada en aquellas tratadas con las tres cepas (Fig. 41B).

En cuanto a la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), se observó una disminución generalizada en las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 con respecto a las plantas control (Fig. 41C). En el caso de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-GAPDH), se detectó un incremento significativo en las plantas tratadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 (Fig. 41D). La enzima glutamato

deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-GDH) mostró una disminución de su actividad en las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y un incremento en aquellas irrigadas con la cepa *P. castrilensis* N3 con respecto a las plantas control, mientras que el tratamiento con la cepa *P. segetis* P6 no produjo ningún cambio (Fig. 41E).

Por último, la actividad de las enzimas ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxidasa (RuBisCO) y nitrato reductasa incrementó considerablemente en las plantas tratadas con las tres cepas, siendo especialmente alta en aquellas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 (Fig. 41F y 41G).

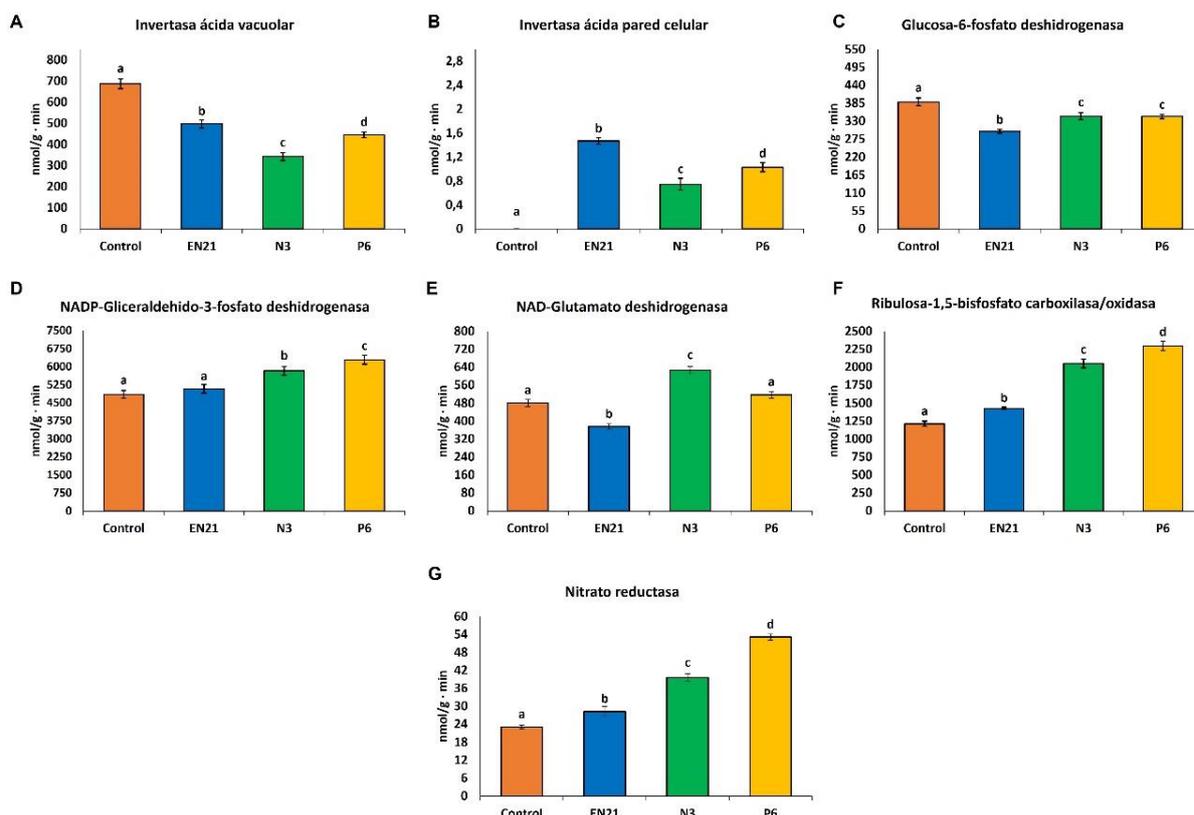


Figura 41. Análisis de la actividad de enzimas del metabolismo central de plantas de tomate tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, $n = 5$).

5.5 Estudio del perfil hormonal de la planta

Por último, se realizó una determinación semicuantitativa del perfil hormonal en la planta mediante HPLC-MS para determinar el impacto de la irrigación con cada una de las tres cepas en el balance de las hormonas ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), metil jasmonato (MeJa), ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA3), relacionadas con crecimiento vegetal y la tolerancia a estrés biótico y abiótico.

Los resultados del análisis de ABA en las hojas de las plantas tratadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostraron un incremento significativo con respecto a las plantas control tratadas con agua destilada, mientras que las irrigadas con la cepa *S. equorum* EN21 no mostraron cambios significativos (Fig. 42A).

En cuanto a la concentración de SA, JA y GA3, no se observaron cambios significativos tras el tratamiento con las tres cepas con respecto a las plantas control, salvo en el caso de aquella tratadas

con la cepa *S. equorum* EN21 en las que se observó una ligera disminución de la concentración de JA (Fig. 42B, 42C y 42F).

Con respecto a los niveles de MeJa, se observó un descenso generalizado en las plantas irrigadas con las tres cepas en comparación con el control (Fig. 42D). En cambio, se detectó un incremento significativo en la concentración de AIA en las plantas tratadas con las tres cepas, siendo especialmente acusado en aquellas irrigadas con la cepa *S. equorum* EN21 (Fig. 42E).

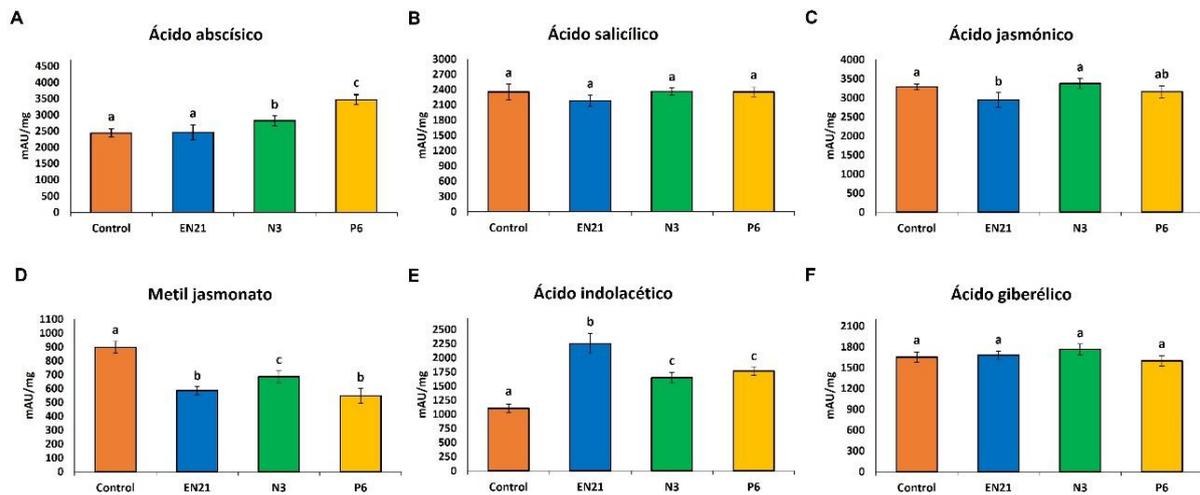


Figura 42. Determinación semicuantitativa de fitohormonas en las hojas de las plantas de tomate irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. mAU/mg, mili-unidades de absorbancia del pico detectado por miligramo de biomasa liofilizada. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, $n=5$).

6. Discusión

El uso excesivo de fertilizantes químicos en los campos de cultivo durante décadas ha causado importantes daños que han dado lugar a la degradación del suelo, la contaminación de acuíferos subterráneos y diversos problemas para la salud humana (Ge et al., 2018). Ante la creciente demanda de alimentos de origen vegetal asociada al imparable crecimiento de la población mundial, es urgente establecer sistemas de fertilización que promuevan el crecimiento vegetal, la producción y el rendimiento de las plantas al mismo tiempo que permitan la estabilidad ambiental. Desde hace décadas, el estudio de los microorganismos nativos asociados a las plantas y su posterior aplicación como una alternativa eficaz, segura y sin efectos negativos para el medioambiente, los animales o la salud humana ha ganado una gran importancia (Compant et al., 2010; Lucy et al., 2004; Oleńska et al., 2020). Dentro del microbioma de las plantas, las rizobacterias han sido las más estudiadas por sus efectos beneficiosos mediante diversos mecanismos como la solubilización de nutrientes, la producción de fitohormonas, la producción de antibióticos y la síntesis de compuestos volátiles y metabolitos secundarios (Etesami & Maheshwari, 2018; Glick, 2012; Majeed et al., 2018). En esta relación de simbiosis, los microorganismos a su vez se ven beneficiados por los exudados radiculares ricos en azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y metabolitos secundarios que liberan las plantas a la rizosfera y que se estima suponen hasta un 20% del carbono fijado mediante la fotosíntesis y un 15% del nitrógeno asimilado (Sasse et al., 2018; Venturi & Keel, 2016; Walker et al., 2003). Además, estos compuestos actúan como potentes quimioatrayentes seleccionando el microbioma presente en la rizosfera y favoreciendo su establecimiento mediante la colonización de las raíces por parte de estos (Khatoon et al., 2020; Olanrewaju et al., 2019). Por tanto, la colonización de la rizosfera o de la superficie de las raíces de las plantas por parte de las cepas PGP depende en gran medida de su movilidad y quimiotaxis hacia

exudados radiculares, así como de la capacidad para establecerse mediante la producción exopolisacáridos y formación de *biofilms* (Santoyo et al., 2021).

En el presente capítulo se analizaron todos los parámetros que permiten evaluar el establecimiento y la colonización de las raíces por las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6.

En primer lugar, el **análisis de movilidad** mediante la técnica de gota pendiente demostró la capacidad de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para realizar una movilidad activa. Posteriormente, los ensayos en placa demostraron que ambas cepas poseen movilidad de tipo *swimming* y *swarming* mediada por flagelos. Además, el análisis genómico de estas cepas permitió identificar los genes encargados de la síntesis de proteínas estructurales del aparato flagelar *fla*, *flg*, *flh*, *fli* y *mot* característicos de las familias *Pseudomonadaceae* y *Bacillaceae* (Bouteiller et al., 2021; Mukherjee & Kearns, 2014) Por otra parte, la cepa *P. segetis* P6 mostró movilidad de tipo *twitching* sobre superficies sólidas mediada por la extensión y retracción de pili de tipo IV, algo que fue confirmado mediante análisis genómico por la identificación de los genes *pil*ABCDEFGHIJKLMNQRSTUUVWXYZ1Y2Z y *fim*TUVX ampliamente descritos como efectores de este tipo de movilidad en especies del género *Pseudomonas*. Diversos estudios mediante mutagénesis dirigida de los genes *fliM*, *fliN*, *flgC*, *flgF* *pilA* o *pilT* en especies de los géneros *Pseudomonas* y *Azoarcus* han demostrado que la movilidad es un factor determinante en el proceso de la colonización de la raíz de plantas de arroz (Barahona et al., 2010; Böhm et al., 2007; Fernández-Llamosas et al., 2021). En cuanto a la cepa *S. equorum* EN21, no se detectó movilidad activa en el ensayo en gota pendiente, mientras que en los ensayos en placa mostraron resultados positivos para la movilidad de tipo *swarming* y de tipo *twitching*. Puesto que la movilidad de tipo *swarming* requiere la presencia de flagelos y las especies del género *Staphylococcus* carecen de ellos, es muy probable que la cepa *S. equorum* EN21 sea móvil mediante mecanismos previamente descritos en *S. aureus* como la movilidad activa de tipo *gliding*, que emplea complejos de adhesión focal localizados en la parte externa de la célula, o la movilidad de tipo *sliding*, mediada por el crecimiento colonial junto con la producción de surfactantes (Pollitt & Diggle, 2017).

Tras demostrar la movilidad de las tres cepas, se estudió su capacidad de detectar gradientes químicos y realizar una movilidad dirigida hacia estos estímulos mediante un **análisis de quimiotaxis**. Así, se analizó la quimiotaxis al ácido γ -aminobutírico (GABA), un compuesto común en los exudados de plantas en condiciones normales, pero cuya concentración aumenta considerablemente en situaciones de estrés en la planta. Estas variaciones en la composición de los exudados se han descrito como un mecanismo mediante el cual las plantas seleccionan y modifican el microbioma rizosférico ante determinados estados de estrés biótico o abiótico, un fenómeno conocido como *cry for help* (Kawasaki et al., 2021; Rolfe et al., 2019; P. Wang et al., 2021; Zhalnina et al., 2018). De forma similar al comportamiento mostrado hacia los casaminoácidos, empleado como control positivo en la quimiotaxis, las tres cepas mostraron capacidad para responder a gradientes de concentración de GABA, lo que podría relacionarse con una respuesta quimiotáctica a exudados de plantas en condiciones de estrés.

También se analizó la actividad quimiotáctica hacia exudados radiculares de plantas de tomate, *arabidopsis* y *salicornia*, y se detectó la quimioatracción de todas las cepas, especialmente en el caso de *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6, aunque esta varió dependiendo de los exudados. En todos los casos se observaron diferencias significativas con respecto al control que consistió en el *buffer* de quimiotaxis, lo que descarta la posibilidad de que estos resultados se deban a fenómenos de difusión celular pasiva. Las diferencias observadas según el tipo de exudado podrían estar ligadas a que la composición de estos varía en función de la especie vegetal, de la fase de crecimiento de la planta y de los factores ambientales (Allard-Massicotte et al., 2016; Chaparro et al., 2014; Kong et al., 2021). Además, también intervienen factores por parte de los microorganismos ya que los compuestos que forman parte de un

determinado exudado pueden resultar atrayentes o repelentes dependiendo de la cepa de estudio (Haichao Feng et al., 2018; Kudjordjie et al., 2019; Vora et al., 2021). A pesar de la complejidad del estudio de la composición de los exudados, gran cantidad de investigaciones confirman que la quimiotaxis a exudados radiculares es un factor requerido en el reclutamiento y en la colonización de las raíces por parte de las cepas PGP, lo que a su vez revierte positivamente en estas, ya que los exudados constituyen una fuente de carbono y nitrógeno para las bacterias (Chagas et al., 2018; Mönchgesang et al., 2016; Santoyo et al., 2021; Scharf et al., 2016). Con respecto a la cepa *S. equorum* EN21, fue la que mayor quimiotaxis mostró en base a un mayor recuento de UFC/capilar. Sin embargo, la quimiotaxis en microorganismos con movilidad de tipo *gliding* es poco frecuente, aunque ha sido ampliamente descrita en *Myxococcus xanthus* (Kearns & Shimkets, 1998; Kearns & Shimkets, 2001; Yang et al., 1998), lo que podría justificar los resultados observados en los ensayos de quimiotaxis con la cepa *S. equorum* EN21.

Los resultados obtenidos en estos experimentos fueron respaldados mediante el análisis genómico de las cepas, en el que se detectó la presencia de los genes *che*, *chp*, *mcp* y *wsp* relacionados con la maquinaria quimiotáctica en las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. Este sistema ha sido ampliamente caracterizado en especies del género *Pseudomonas* (García et al., 2015; Sampedro et al., 2015) y de la familia *Bacillaceae* (H. Feng et al., 2018; Glekas et al., 2012), y se ha descrito su relevancia en la colonización de la rizosfera de plantas por la capacidad para detectar gradientes de concentración de distintos aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos liberados en los exudados radiculares (Feng et al., 2021; Huang et al., 2018).

Tras demostrar la movilidad y la quimiotaxis de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, se analizó la **formación de biofilms** empleando los medios LB, MY y TSB suplementados con distintas concentraciones de NaCl con el fin de evaluar si existían diferencias en la producción en función de la composición del medio, así como si la presencia de estrés osmótico ejercía algún efecto en la producción de estas biopelículas.

Los resultados mostraron una clara influencia de la composición de medio en la producción de biofilm con una mayor formación en los medios LB y TSB. Igualmente se detectó un incremento significativo en la formación de biofilm por parte de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 cuando el medio se suplementó con GABA al 10% (p/v) y con exudados de tomate y de salicornia al 20% (v/v) lo que guarda relación con los resultados obtenidos en los ensayos de quimiotaxis. En el caso de la cepa *P. castrilensis* N3, los resultados mostraron un incremento en la formación de *biofilm* únicamente cuando el medio se suplementó con exudados de salicornia al 20% (v/v), aunque en todos los casos la biopelícula fue muy escasa. Las diferencias tal y como se señaló anteriormente parecen estar relacionadas con la composición y la concentración de los compuestos que forman parte de los exudados de las raíces de las distintas plantas lo que favorece la colonización de la raíz por parte determinadas cepas en detrimento de otras, otorgando un papel protagonista a la planta en la selección y el reclutamiento del microbioma radicular y rizosférico (Sasse et al., 2018; P. Wang et al., 2021; Zhang et al., 2014). Por otra parte, únicamente la cepa *P. segetis* P6 demostró la capacidad para producir exopolisacáridos, con un rendimiento cercano al 20% con respecto a la biomasa celular o 0,35 g/L. El análisis genómico permitió identificar el operón completo asociado a la producción de alginato *algABCEGJKLUX8*, el promotor *algD* y los genes *mucAB* y *kinB* relacionados con su regulación, todos ellos previamente descritos en la producción de este tipo de polisacárido por especies del género *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Franklin et al., 2011; Mohammadi & Ahmed, 2007). Diversos estudios en especies PGP del género *Pseudomonas* entre las que destacan *P. syringae*, *P. putida* y *P. fluorescens* han demostrado la importancia de la producción de exopolisacáridos y la formación de *biofilms* en la colonización de las raíces de distintas plantas (Bhattacharyya & Jha, 2012; Couillerot et al., 2009; Upadhyay et al., 2017).

Por otro lado, se cuantificó la **colonización** de las raíces de plantas de tomate por parte de las cepas de estudio, para determinar si las características previamente descritas favorecen el establecimiento de una relación estrecha y duradera entre la planta y las cepas. Los recuentos de los ensayos tanto en medio semisólido como en medio líquido mostraban una elevada colonización en la superficie de las raíces de las plantas de tomate. Estos resultados se confirmaron mediante la visualización de las raíces por microscopía, en la que se observaron pequeños agregados de células en la raíz de las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3. En cambio, los recuentos realizados en el interior radicular tras la desinfección en superficie de las raíces tratadas con estas cepas resultaron negativos, lo que indica que no producen una colonización endofítica. En plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 mostraban una gruesa capa de crecimiento bacteriano cubriendo la superficie de la raíz y se pudo observar gracias al marcaje de la bacteria con GFP que estas estaban contenidas en una densa matriz de polisacárido. Al igual que en los ensayos con las otras cepas, los recuentos bacterianos del interior radicular tras la desinfección de la superficie de las raíces, así como el estudio de la colonización de la cepa *P. segetis* P6 mediante microscopía confocal de barrido confirmaron la ausencia de una colonización endofítica.

En todos los casos, la colonización se detectó asociada a los pelos radicales en la zona de maduración, especialmente en la unión de las raíces secundarias con la raíz principal.

Estos resultados en conjunto demuestran que las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 son móviles mediante distintos mecanismos y tienen la capacidad para detectar estímulos quimiotácticos producidos por las raíces de las plantas y de ejercer una colonización estable en estas. Una vez establecida la asociación planta-bacteria, estas cepas podrían mejorar el crecimiento de vegetal mediante diversos mecanismos como la adquisición de nutrientes, la producción de fitohormonas, la secreción de exoenzimas, la reducción del estrés oxidativo o la protección frente a estrés de tipo biótico y abiótico (Danhorn & Fuqua, 2007; Upadhyay et al., 2017). Por ello, y teniendo en cuenta las características PGP que demostraron estas cepas en los ensayos *in vitro*, se realizó un experimento con plantas de tomate irrigadas con cada una de las cepas para estudiar su actividad PGP *in vivo* y determinar el impacto que tienen en el metabolismo primario de la planta.

Tras un mes de tratamiento con cada una de las cepas, se analizó la **biomasa y el contenido en clorofila**, relacionados con el crecimiento y el desarrollo en las plantas de tomate. Los resultados obtenidos mostraban diferencias significativas en cuanto a crecimiento de la parte aérea con respecto a las plantas control, especialmente aquellas irrigadas con la cepa *S. equorum* EN21. Con respecto a la parte radicular se observó una disminución en la longitud, pero un gran desarrollo de raíces secundarias y pelos radicales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en ensayos previos, lo que demuestra la actividad PGP de estas cepas *in vivo* independientemente de las condiciones de cultivo empleadas. Con respecto a la concentración de clorofila, únicamente se detectó un incremento significativo en las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6, un resultado común tras el tratamiento con cepas PGP, aunque se ha detectado que varía en función del tiempo transcurrido desde la aplicación del tratamiento y de la fase de crecimiento de la planta, con un mayor efecto en las etapas tempranas, lo que justificaría nuestros resultados (Ortiz-Castro et al., 2020; Stefan et al., 2013).

El análisis de impacto del tratamiento de las plantas de tomate con las tres cepas de estudio en el **metabolismo primario** tuvo como resultado un incremento generalizado en los compuestos nitrogenados, basado en un aumento significativo de la concentración de aminoácidos y proteínas en las hojas de las plantas. Según diversos estudios, el incremento de compuestos nitrogenados es efecto común en las plantas tratadas con distintas cepas PGP. Así, es el caso de la inoculación con *Pseudomonas fluorescens*, *P. koreensis*, *Paenibacillus alvei* y *Lysinibacillus sphaericus* en plantas de tomate, (Mhlongo et al., 2020), *Acinetobacter calcoaceticus* en plantas de pepino (Kang et al., 2012) o

Bacillus megaterium en plantas de coliflor (Ekinci et al., 2014), debido a la capacidad de estas cepas para incrementar la biodisponibilidad de amonio por distintos mecanismos como la fijación de nitrógeno o la degradación del ACC, características que poseen las cepas de este estudio y que podrían explicar este incremento.

Con respecto al metabolismo primario del carbono, se analizaron los niveles de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón. En este caso los resultados fueron variables con respecto a la concentración de glucosa y fructosa, mientras que el nivel de sacarosa se vio ligeramente incrementado únicamente en las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6. Estos valores podrían deberse a la incorporación de estos azúcares a estructuras de la planta o bien a una mayor producción de metabolitos secundarios, lo que hace que disminuya la concentración de azúcares libres en la célula, como se ha detectado previamente en estudios de la actividad PGP de *Lysinibacillus sphaericus* en las plantas de tabaco (Mhlongo et al., 2016). Con respecto a los niveles de almidón, se observó una disminución en las plantas tratadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, lo que está relacionado con una movilización más rápida de las reservas de glucosa y un mayor consumo de esta en la planta (Smith et al., 2003; Sulpice et al., 2009).

Por último, se observó un incremento en los niveles de malato en las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6, mientras que la concentración de malato y de citrato disminuyó en aquellas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 con respecto a las plantas control. Este incremento ha sido previamente descrito en las plantas tras la inoculación con cepas PGP y parece estar relacionado con una mayor actividad del ciclo de Krebs en la planta, así como una mayor reserva de carbono en la planta en forma de ácidos orgánicos (Aras et al., 2018; Curzi et al., 2008; Igamberdiev & Eprintsev, 2016). Por otra parte, la disminución de la concentración de azúcares y de ácidos orgánicos, especialmente citrato y malato, tras la irrigación con algunas de las cepas podría estar relacionada con una mayor translocación de estos hacia las raíces para formar parte de los exudados liberados a la rizosfera (Baudoin et al., 2003; Meyer et al., 2010).

En cuanto al **balance redox** de las plantas, no se observaron cambios significativos en los niveles de ascorbato total (Asc), reducido (AscA) ni oxidado (DHA), salvo un ligero incremento de este último en las plantas irrigadas con la cepa *P. castrilensis* N3. En el caso del análisis de la concentración de glutatión, se observó un incremento significativo en las plantas irrigadas con cada una de las cepas y únicamente se detectó la forma reducida de este antioxidante (GSH). La reducción y oxidación del ascorbato en coordinación con la del glutatión constituye el principal sistema de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la planta (Akram et al., 2017; Sharma et al., 2012). El hecho de que el ascorbato se encuentre mayoritariamente en su forma reducida indica un bajo estrés oxidativo en la planta (Ahmad et al., 2010)(Farvardin et al., 2020). Por su parte, la detección exclusiva de glutatión en su forma reducida de nuevo demuestra que el tratamiento con las cepas no supone una alteración en el balance redox de la planta, pues se estima que, en ausencia de estrés, las hojas de las plantas suelen mantener un *ratio* de glutatión entre las formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) de 20:1 aproximadamente (Mhamdi et al., 2010; NOCTOR et al., 2012).

En cuanto al análisis de dinucleótidos de nicotinamida y adenina, se observaron incrementos significativos en la concentración de la forma oxidada (NAD^+) tras el tratamiento de las plantas con cada una de las cepas, mientras que se detectó una reducción en los niveles de la forma reducida (NADH). Con respecto a los resultados de la determinación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, se observó el mismo patrón en el que la forma oxidada ($NADP^+$) incrementó y la forma reducida (NADPH) se vio reducida. A pesar de su similitud, ambas coenzimas tienen funciones muy distintas, estando el NADP más relacionado con la biosíntesis, con procesos como la fotosíntesis y la síntesis de ácidos grasos, mientras que el NAD está más asociado a procesos catabólicos en los que actúa como oxidante, como es el caso de la glucólisis o el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Kramer et al., 2004; Rawsthorne,

2002). Por ello, el incremento en los niveles de NAD se podría deber a un incremento en la glucólisis de las plantas tratadas con las cepas, mientras que el incremento de NADP podría estar relacionado con un incremento en fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin o en la asimilación de amonio. Igualmente, ambas coenzimas participan en la detoxificación de ROS mediante la regeneración de las formas reducidas del ciclo ascorbato-glutatión a expensas de su oxidación (Decros et al., 2019; Gakière et al., 2018). Por ello, puesto que el glutatión y el ascorbato se encontraban mayoritariamente en sus formas reducidas, es coherente encontrar las formas oxidadas de NAD y NADPH.

La determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en las hojas de las plantas de tomate mostró una elevada disminución de los niveles de este compuesto altamente oxidante cuando estas fueron irrigadas con cada una de las tres cepas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente con respecto a los niveles de ascorbato y glutatión y dan cuenta de la inocuidad de la colonización de las cepas en la planta. De forma similar, el contenido del malondialdehído, un marcador de peroxidación de lípidos de la membrana que aumenta en situaciones de estrés oxidativo, se redujo notablemente en las plantas tratadas con la cepa *P. castrilensis* N3, un efecto previamente observado en especies de la familia *Bacillaceae* (Baek et al., 2019; Lin et al., 2018). Con respecto a la concentración de compuestos fenólicos, se observó una reducción de estos en las plantas irrigadas con cada una de las cepas, un resultado poco común ya que el tratamiento con cepas PGP suele incrementar el contenido de estos compuestos en las plantas, especialmente en situaciones de estrés biótico y abiótico (Cappellari et al., 2019).

De manera global, no se detectó que las plantas de tomate mostraran signos de estrés oxidativo tras el tratamiento con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, incluso se observó una interesante disminución en los principales marcadores de estrés como el peróxido de hidrógeno y el malondialdehído. En futuros estudios se analizará el transcriptoma de las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para determinar los mecanismos con mayor solidez.

Para dar explicación al perfil de metabolitos primarios obtenido se realizó un estudio de la **actividad enzimática del metabolismo central**, seleccionando aquellas que pudieran dar explicación a las variaciones observadas tanto en el metabolismo central como en el balance redox tras la aplicación de las cepas en las plantas de tomate. Para ello, se seleccionaron las enzimas ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxidasa (RuBisCO), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-GAPDH), invertasa ácida vacuolar (VInv), invertasa ácida de la pared celular (CwInv), nitrato reductasa (NR) y glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-GDH).

En el caso de las enzimas RuBisCO y NADP-GAPDH, se observó un notable incremento en las plantas tratadas con cada una de las cepas, siendo especialmente significativo en el caso de las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6. Ambas enzimas forman parte del ciclo de Calvin, cuya función es la fijación de CO₂ para la obtención de glucosa en la planta (Michelet et al., 2013). En 2009, (Kandasamy et al., 2009) observaron un incremento en la actividad de la enzima RuBisCO en plantas de arroz tratadas con la cepa *P. fluorescens* KH1 descrita como PGP. Para determinar si había una relación entre el incremento de la actividad de esta enzima y el aumento del crecimiento observado, sobreexpresaron los genes que codifican las distintas subunidades de la enzima RuBisCO en plantas de arroz, obteniendo el mismo fenotipo observado tras el tratamiento con la cepa *P. fluorescens* KH1 por lo que asociaron un mayor crecimiento de las plantas con un incremento en la actividad fotosintética. Igualmente, el aumento de la actividad fotosintética podría estar relacionado con el incremento de la biomasa observado tras el tratamiento de las plantas de tomate con las cepas de este estudio. Por su parte, la enzima NADP-GAPDH cataliza la transformación de 1,3-bisfosfoglicerato en gliceraldehído-3-fosfato mediante la oxidación de 6 moléculas de NADPH (Marulanda-Aguirre et al., 2007), lo que concuerda con los elevados

niveles de NADP⁺ detectados previamente, ya que la fotosíntesis es la principal fuente de este coenzima en la planta (Wakao & Benning, 2005).

En cuanto a la enzima G6PDH se observó una reducción de su actividad en las plantas irrigadas con cada una de las cepas, con respecto a las plantas control. Esta enzima forma parte de la ruta de las pentosas fosfato cuyo fin es la producción de ácidos nucleicos y poder reductor en forma NADPH, mediante la degradación de glucosa (Castiglia et al., 2015; Esposito et al., 2003). Sin embargo, su actividad se ve reducida en presencia de luz (Hauschild & von Schaewen, 2003), por lo que la elevada tasa fotosintética detectada en las plantas tratadas con estas cepas PGP mediante la actividad de las enzimas RuBisCO y NADP-GAPDH podría explicar este resultado.

Con respecto al análisis de la actividad de la enzima VInv, igualmente mostró un descenso significativo en las plantas irrigadas con las tres cepas de estudio en comparación con las plantas control. En el caso de la isoforma de la pared celular (CwInv), las plantas irrigadas con cada una de las cepas mostraron resultados positivos, mientras que no se detectó actividad alguna en las plantas control. Ambas enzimas catalizan la ruptura de la sacarosa en glucosa y fructosa, aunque difieren en su localización y por ello en el efecto que su actividad tiene en la planta (Fotopoulos, 2005). Las invertasas vacuolares están relacionadas con el metabolismo intracelular de la sacarosa, mientras que las isoformas de la pared celular metabolizan la sacarosa en el exterior celular y su actividad se relaciona con el transporte de azúcares desde las hojas a los órganos no fotosintéticos, también conocidos como órganos sumidero, como son las raíces, tubérculos, flores y frutos (Fotopoulos, 2005; Wan et al., 2018). En base a esto, los resultados obtenidos indican una disminución de la degradación de sacarosa en el interior de las células foliares, lo que podría explicarse por una regulación negativa debido al incremento de la actividad del ciclo de Calvin en las plantas tratadas con cada una de las cepas, ya que un exceso de monosacáridos en la célula genera una elevada presión osmótica (Seo & Wei, 2008). Sin embargo, el aumento en la actividad de la enzima CwInv podría estar asociado a una mayor traslocación de monosacáridos desde las partes productoras a las partes sumidero favoreciendo el crecimiento y el desarrollo de estos órganos y el aumento de la producción y liberación de exudados radiculares (Wei & Collmer, 2018; Zhang et al., 2015).

A modo de resumen, teniendo en cuenta el incremento de la actividad de las enzimas RuBisCO y NADP-GAPDH, que da lugar a un aumento de la producción de glucosa; el descenso en la actividad de la enzima G6PDH, que promueve el metabolismo de la glucosa; la elevada actividad de la enzima CwInv, cuyo resultado es un incremento de la glucosa y la fructosa libres produciendo una caída en la concentración de sacarosa, así como la disminución de la concentración de almidón, que actúa como polisacárido de reserva en la planta, el hecho de que las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 muestren variaciones en la concentración de glucosa y fructosa, y que no haya cambios en la concentración de sacarosa, podría deberse a un incremento de la incorporación de estos monosacáridos a estructuras celulares asociadas al crecimiento de la planta, a la producción de metabolitos secundarios, a la elevada síntesis de aminoácidos que muestran estas plantas o bien a un incremento de la liberación de azúcares en los exudados radiculares para sustentar la colonización de las cepas en las raíces.

Con el fin de dar respuesta a la elevada concentración de aminoácidos y proteínas detectadas en las plantas irrigadas con cada una de las cepas de estudio con respecto a las plantas control, se analizó la actividad de las enzimas nitrato reductasa (NR) y NAD-GDH, relacionadas con el metabolismo del nitrógeno en la planta.

El análisis de la actividad de la enzima NR tuvo como resultado un elevado incremento en las plantas irrigadas con cada una de las cepas con respecto a las plantas control, especialmente en aquellas

irrigadas con la cepa *P. segetis* P6 en la que la actividad fue cuatro veces superior. Esta enzima cataliza la primera reacción en la reducción de nitrato a nitrito en la principal ruta de asimilación de nitrato en la planta y tiene como resultado el incremento de amonio disponible para la síntesis de aminoácidos y otras moléculas orgánicas nitrogenadas (Berger et al., 2020; Hoff et al., 1994; Huarancca Reyes et al., 2018). La estimulación de la actividad de esta enzima en las plantas irrigadas tras el tratamiento con las cepas de este estudio podría proveer del nitrógeno necesario para el incremento en la síntesis de aminoácidos y proteínas observado en estas plantas. Estos resultados han sido previamente observados en un estudio que empleó un consorcio de cepas PGP en plantas de trigo (Vishwakarma et al., 2017) tras el tratamiento de plantas de *Arabidopsis*, lechuga y trigo con la cepa PGP *B. subtilis* L1 (Lee et al., 2020). Por otra parte, el hecho de que esta enzima use NADH como cofactor en la reducción de nitrato a nitrito podría explicar el incremento observado previamente en los niveles de su forma oxidada (NAD⁺).

En cuanto a la enzima NAD-GDH, se observó un descenso en la actividad de esta en las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 y un incremento en las tratadas con la cepa *P. castrilensis* N3 con respecto a las plantas control, mientras que no se observaron cambios significativos en aquellas tratadas con la cepa *P. segetis* P6. Aunque inicialmente se pensaba que esta enzima se encargaba de la incorporación de amonio a compuestos orgánicos para la síntesis de aminoácidos y proteínas, en las últimas décadas, se ha descubierto que únicamente representa el 5% de la síntesis en la planta, mientras que el 95% de la asimilación es llevada a cabo por el ciclo glutamina sintasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Lea & Mifflin, 1974; Lea & Mifflin, 2018; Melo-Oliveira et al., 1996). En cambio, la enzima NAD-GDH se encarga de la conversión reversible de glutamato en 2-oxoglutarato y NH₄⁺ promoviendo la incorporación de 2-oxoglutarato al ciclo de los ácidos tricarbóxicos cuando el carbono es un factor limitante y jugando así un papel imprescindible en la conexión carbono-nitrógeno en la planta para la movilización de nutrientes en situaciones de estrés nutricional (Fontaine et al., 2012; Grzechowiak et al., 2020; Labboun et al., 2009; Skopelitis et al., 2006). El hecho de que esta enzima no muestre un incremento en su actividad o incluso se vea disminuida, demuestra que el tratamiento con las tres cepas no produce un déficit de compuestos carbonados en las plantas de tomate. Igualmente, la escasa actividad de la enzima NAD-GDH da lugar a una mayor disponibilidad de glutamato para formar parte del ciclo GS/GOGAT, lo que unido al incremento de amonio por la elevada actividad de la enzima NR, explicaría el incremento en aminoácidos y proteínas observado en estas plantas.

Por último, se analizó el **perfil hormonal** en las hojas de las plantas de tomate irrigadas con cada una de las cepas y se realizó una determinación semicuantitativa de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido giberélico (GA3) y metil jasmonato (MeJa).

Tras el análisis de los niveles de AIA en las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 se observó un incremento significativo con respecto a las plantas control. Esta hormona vegetal desempeña un papel fundamental en el crecimiento y el desarrollo de la planta ya que está implicada en la división celular, estimula la elongación de las hojas y la ramificación de las raíces (Demeulenaere & Beeckman, 2014; Zhao, 2010). Por su parte, ciertas cepas PGP descritas como productoras de auxinas o bien como inductoras de la síntesis de estas hormonas en la planta se asocian con un incremento en la biomasa aérea y radicular, y especialmente con un mayor desarrollo de raíces secundarias y pelos radicales (Contesto et al., 2010; Pieterse et al., 2014; Poupin et al., 2016; Zamioudis et al., 2013a). Por tanto, estos niveles incrementados de AIA en las plantas tratadas con las tres cepas podrían explicar el incremento en la biomasa observado en estos experimentos, así como el elevado desarrollo de las raíces de estas.

La determinación de la concentración de ABA en las hojas de las plantas de tomate mostró un incremento significativo de esta hormona en aquellas que fueron irrigadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 con respecto al control. Esta hormona promueve la senescencia y abscisión de hojas y

frutos, inhibe la elongación de la raíz y juega un papel fundamental en la resistencia a sequía (Munemasa et al., 2015; Sah et al., 2016). En cambio, diversos estudios han demostrado que las cepas *Azospirillum lipoferum* USA 59b, *P. fluorescens* Rt6M10, *Bacillus licheniformis* Rt4M10 y *Variovorax paradoxus* 5C-2 son capaces de aumentar los niveles de ABA en la planta causando un incremento en la biomasa y estimulando la producción de raíces laterales (Cohen et al., 2008; Jiang et al., 2012; Salomon et al., 2014). Estos hallazgos, junto con el incremento en la concentración de ácido indolacético observado en las plantas irrigadas con las tres cepas dan explicación al aumento de la biomasa y el elevado desarrollo de la arquitectura radicular obtenidos.

Los resultados del análisis de SA, JA y GA3 no mostraron cambios significativos tras la irrigación con cada una de las cepas con respecto a las plantas control. El SA juega un papel fundamental en los sistemas de defensa de la planta ante estados de estrés biótico desencadenando la resistencia sistémica adquirida (SAR) ante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Kim & Hwang, 2014; Tsukanova et al., 2017). La ausencia de cambios en la concentración de esta hormona en las plantas irrigadas con las tres cepas podría indicar la posible inocuidad de estas para la planta. Por otra parte, el JA relacionado con la inducción de la resistencia sistémica (ISR), tampoco mostró variaciones con respecto al control, un resultado inesperado en este tipo de bacterias que colonizan la rizosfera de las plantas y establecen relaciones beneficiosas con ellas, aunque diversos estudios avalan la posibilidad de que la inducción de este tipo de resistencia se debe a un aumento de la sensibilidad al JA en lugar de a un incremento en su biosíntesis en la planta (Hoffland et al., 1995; Pieterse et al., 1996). Con respecto a los niveles de GA3, no se observaron cambios significativos con respecto al control a pesar de que esta hormona está relacionada con el desarrollo y crecimiento de la planta y la formación de la raíz (Gupta et al., 2013; Mutasa-Göttgens & Hedden, 2009).

Por último, la determinación de MeJa mostró un descenso generalizado de la concentración de esta hormona en las plantas tratadas con cada una de las cepas con respecto al control. Esta hormona es un derivado volátil del JA involucrada en la activación de sistemas de defensa y antioxidantes en situaciones de estrés biótico y abiótico (Reyes-Díaz et al., 2016; Wasternack, 2007). En base a esto, la reducción de los niveles de MeJa tras la inoculación de las plantas de tomate con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 podría demostrar una vez más que la colonización de la raíz de estas cepas no genera una situación de estrés para la planta.

Capítulo 3

Determinación de la capacidad de las bacterias seleccionadas para interferir en los sistemas quorum sensing de diferentes fitopatógenos y atenuar su virulencia

Resumen

La interferencia de los sistemas *quorum sensing* (QS) tiene como resultado la inhibición de la expresión de determinados genes bacterianos, sin causar ninguna modificación en la población

bacteriana del medio. Esta característica es altamente interesante ya que, al no introducir una presión selectiva, la posibilidad de que se generen resistencias en los patógenos es baja. Por tanto, el uso de cepas bacterianas que tengan la cualidad de interferir en esta comunicación constituye una valiosa alternativa al uso de pesticidas en los campos de cultivo. Por ello, en este capítulo se analizó la bioseguridad ambiental de estas cepas y se determinó la actividad *quorum quenching* (QQ) de las cepas seleccionadas frente a algunos de los fitopatógenos más relevantes en agricultura. Tras ello, se caracterizó dicha actividad en las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6.

Los ensayos de bioseguridad realizados en nauplios de *Artemia salina* y con el sistema MicroTox® mostraron la inocuidad de las tres cepas seleccionadas.

Las cepas fueron capaces de degradar completamente los extractos de moléculas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) procedentes de cultivos de los fitopatógenos *Erwinia amylovora*, y *Pseudomonas syringae* pv. tomato, mientras que se observó una degradación parcial en el caso de *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Estos resultados se corroboraron en los ensayos de cocultivo entre las tres cepas y los distintos fitopatógenos. Además, se demostró la implicación de las AHLs en la producción de distintas enzimas y en la movilidad de los patógenos.

El estudio de la actividad QQ de las tres cepas demostró que eran enzimas extracelulares de tipo lactonasa en la cepa *S. equorum* EN21, de tipo acilasa en la cepa *P. segetis* P6 y de ambos tipos en la cepa *P. castrilensis* N3. Estos resultados se confirmaron mediante HPLC-MS y un análisis filogenético y estructural. Además, en el caso de las acilasas de la cepa *P. segetis* P6, la actividad QQ fue posteriormente confirmada mediante una expresión heteróloga en *Escherichia coli* DH5α.

Summary

The interference in quorum sensing (QS) systems results in the inhibition of the expression of certain bacterial genes, without causing any modification in the bacterial population of the environment. This feature is highly interesting since, by not introducing a selective pressure, the possibility of resistance generation is low. Therefore, the use of bacterial strains that have the trait of interfering in this communication constitutes a valuable alternative to the use of pesticides in crop fields. Therefore, in this chapter environmental biosecurity was analysed for these strains and their quorum quenching (QQ) activity was determined against some of the most relevant phytopathogens in agriculture. After that, this activity was characterized in the strains *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 and *P. segetis* P6.

Biosafety tests carried out on *Artemia salina* nauplii and with the MicroTox® system showed the safety of these three selected strains.

The strains were able to completely degrade N-acylhomoserine lactones (AHLs) extracts proceeding from the phytopathogens *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato, while partial degradation was observed in the case of *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. These results were corroborated by coculture assays between the three strains and the different phytopathogens. In addition, the involvement of AHLs in the production of different enzymes and in the motility of pathogens was demonstrated.

The study of the QQ activity of these three strains showed that they were extracellular and *S. equorum* EN21 strain exhibited a lactonase type enzyme, acylase activity was detected in *P. segetis* P6, while *P. castrilensis* N3 strain had both types. These results were confirmed by HPLC-MS and a phylogenetic and structural analysis. Additionally, in the case of the acylase enzymes observed in *P. segetis* P6 strain, QQ activity was subsequently confirmed by heterologous expression in *Escherichia coli* DH5α.

Una vez determinada la capacidad de las tres cepas seleccionadas para inducir el crecimiento de las plantas *in vivo*, se analizó su potencial biocontrol mediante la interferencia en los sistemas *quorum sensing* de algunos de los fitopatógenos más relevantes en agricultura mediante la degradación de sus AHLs y se caracterizaron las enzimas responsables de esta actividad mediante HPLC-MS y mediante análisis genómico y estructural.

1. Ensayos de bioseguridad

Con el fin de confirmar la inocuidad ambiental de las cepas seleccionadas se realizó un ensayo de bioseguridad en nauplios de *A. salina* y un ensayo de inhibición de la bioluminiscencia de *A. fischeri* (Microtox®).

Los resultados del ensayo de toxicidad en nauplios de *A. salina* tras 24 y 48 horas de incubación con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostraban una supervivencia superior al 90%, mientras que los nauplios inoculados con una suspensión control del patógeno *V. coralliilyticus* el valor fue del 82,5% y 77,5%, respectivamente, aunque estas diferencias no fueron significativas. Tras 72 horas de incubación, se detectó una elevada mortalidad en los nauplios inoculados con el patógeno, mientras que el porcentaje de supervivencia de los tratados con las cepas PGP-QQ fue superior al 78%. Por último, tras 96 horas de incubación, el porcentaje de supervivencia de los nauplios inoculado con el patógeno fue del 2,5%, mientras que en los tratados con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 fue del 73,75%, 70% y 77,5%, respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, incluso con respecto a los nauplios control tratados con solución salina, cuya supervivencia fue del 50% a las 96 horas (Fig. 43).

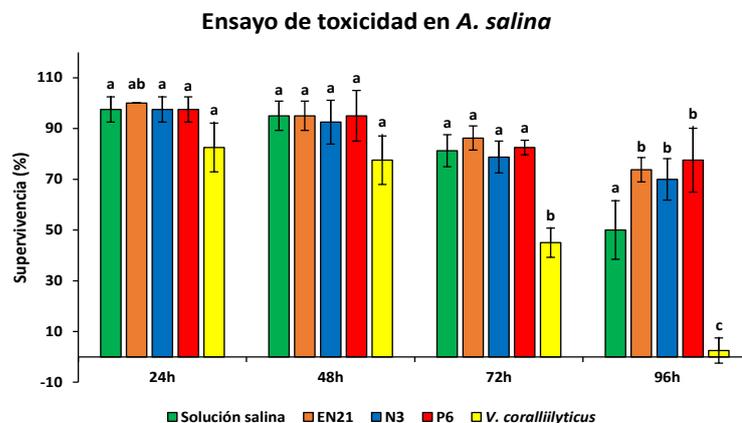


Figura 43. Ensayo de toxicidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en nauplios de *A. salina*. Se muestran los valores medios y la desviación estándar de cada tratamiento. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n = 3$).

En cuanto al ensayo Microtox®, se analizó la toxicidad de un cultivo de 8h de cada una de las tres cepas PGP-QQ en medio TSB. La toxicidad se evaluó mediante la determinación de la concentración efectiva del cultivo que causa una disminución del 50% (EC_{50}) de la intensidad de la bioluminiscencia de *A. fischeri* transcurridos 15 minutos aplicando la siguiente escala de toxicidad: muestra extremadamente tóxica ($EC_{50} < 19\%$), muy tóxica ($EC_{50} = 20 - 39\%$), tóxica ($EC_{50} = 40 - 59\%$), moderadamente tóxica ($EC_{50} = 60 - 79\%$), ligeramente tóxica ($EC_{50} = 80 - 100\%$) y no tóxica ($EC_{50} > 100\%$).

Los resultados del ensayo con el cultivo de la cepa *S. equorum* EN21 mostraron valores de EC_{50} del 125,7% mientras que fueron del 137,7% en el caso del cultivo de la cepa *P. segetis* P6. De

acuerdo con la clasificación de toxicidad, los valores de EC₅₀ obtenidos para ambas cepas indican que no muestran toxicidad. Por otra parte, debido a la elevada turbidez del cultivo de la cepa *P. castrilensis* N3 no se logró obtener su valor de EC₅₀, por lo que no se pudo calcular la toxicidad mediante este método.

2. Evaluación de la actividad *quorum quenching* frente a fitopatógenos

La actividad QQ de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 se evaluó inicialmente frente a extractos crudos de AHLs procedentes de cultivos de los fitopatógenos mediante un ensayo de difusión en placa.

La incubación de las tres cepas de estudio con los extractos de AHLs procedentes de cultivos de los distintos fitopatógenos, dio lugar a una degradación total de las AHLs producidas por *E. amylovora* y por *P. syringae* pv. tomato DC3000. Por otro lado, se observó una importante, aunque incompleta, degradación de las AHLs producidas por *D. solani*, especialmente cuando se incubaron con los cultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6. En cambio, la degradación de las AHLs de *P. atrosecticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, fue parcial (resultados no mostrados).

Una vez comprobada la capacidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para degradar *in vitro* las AHLs presentes en los extractos crudos de los cultivos de los cinco fitopatógenos, se analizó dicha actividad en cocultivo junto con los fitopatógenos. Para ello, se ensayaron diferentes relaciones de concentraciones entre ambos tipos de bacterias y se determinó que la relación 1:100 (bacteria fitopatógena/ bacteria QQ) fue la que mejor resultado originó. En estas condiciones, y tras realizar la determinación de las AHLs remanentes en los diferentes cocultivos, se observaron niveles de degradación de AHLs muy similares a los obtenidos en el ensayo anterior empleando extractos de AHLs de los fitopatógenos (Fig. 44).

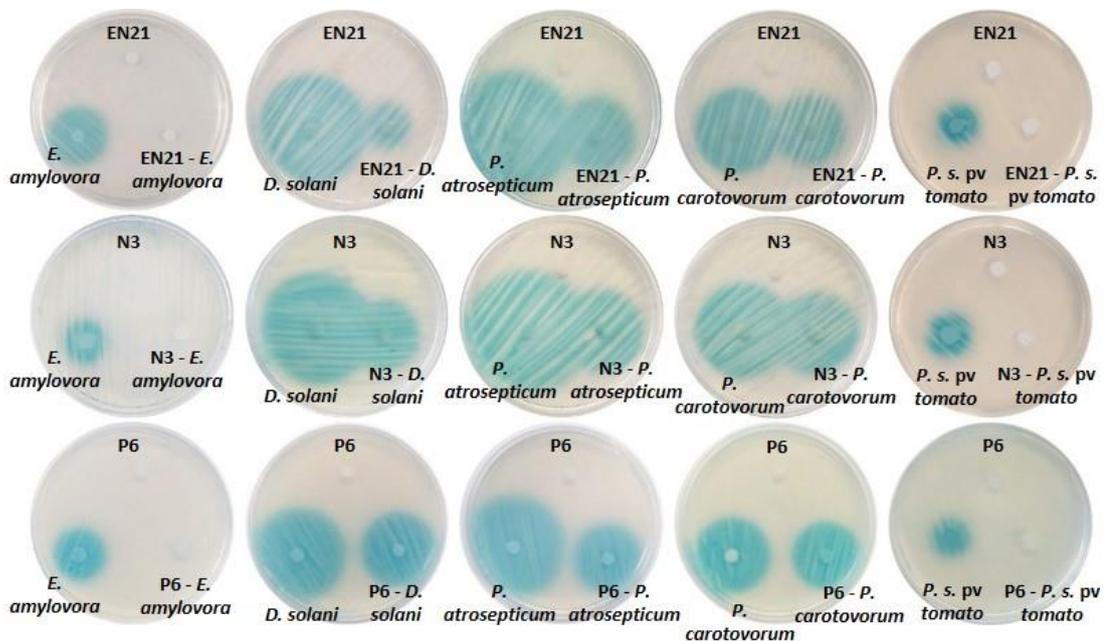


Figura 44. Actividad *quorum quenching* en cocultivo de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 y los fitopatógenos *E. amylovora*, *D. solani*, *P. atrosecticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. tomato DC3000.

La degradación de las AHLs producidas por *E. amylovora* y *P. syringae* pv. tomato DC3000 fue completa en los cocultivos con las tres cepas QQ, mientras que se observó una leve degradación en los cocultivos con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. En cambio, la degradación de las AHLs producidas por *D. solani* y *P. atrosepticum* fue del 50% aproximadamente, siendo ligeramente más acentuada en el caso del cocultivo entre la cepa *S. equorum* EN21 y *D. solani* (Fig. 44). Por otra parte, los recuentos en placa de los cocultivos dieron lugar a valores de entre 10^8 y 10^9 UFC/mL para cada fitopatógeno, valores similares a los recuentos de estos en monocultivo empleados como control. Igualmente, los recuentos de las tres cepas PGP-QQ se mantuvieron inalterados en los cocultivos. Este resultado confirma que las bacterias QQ no afectan el crecimiento de los fitopatógenos.

El siguiente paso en el estudio fue analizar el efecto de la degradación de AHLs, y con ello la interrupción de los sistemas *quorum sensing* de los fitopatógenos, en la expresión de sus funciones celulares. Así, las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en cocultivo con los fitopatógenos produjeron una inhibición o disminución de determinadas actividades enzimáticas y de la movilidad (Tabla 13).

En el caso de *D. solani*, el cocultivo con la cepa *S. equorum* EN21 inhibió completamente su actividad proteolítica sobre la gelatina (Fig. 45B), mientras que el cocultivo con la cepa *P. segetis* P6 tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre *D. solani* al anular su actividad sobre la caseína y la gelatina (Fig. 45B y 45C). Además, se observó una inhibición total de la movilidad de tipo *swimming* de *D. solani* y de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en cocultivo con la cepa *P. segetis* P6 tras 18 horas de incubación (Fig. 45A).

El impacto de la interferencia en los sistemas *quorum sensing* de *P. syringae* pv. tomato DC3000 tras la incubación en presencia de las bacterias QQ fue el más significativo. Además de la movilidad de tipo *swimming* previamente descrita, el cocultivo de este patógeno con las tres cepas redujo la actividad de la enzima fosfatasa ácida (Tabla 13) y se detectó una inhibición total de la actividad de la enzima amilasa en el cocultivo con *S. equorum* EN21.

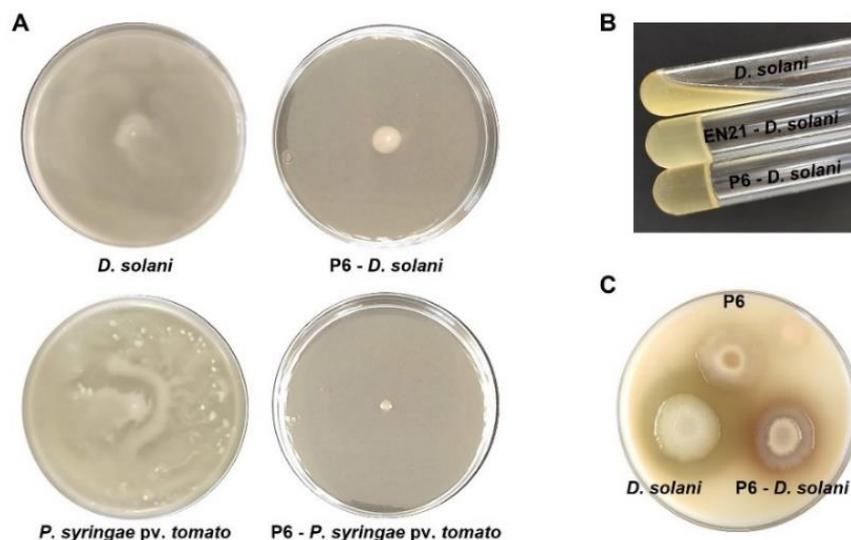


Figura 45. Efecto de la interferencia de los sistemas *quorum sensing* de los fitopatógenos *D. solani* y *P. syringae* pv. tomato DC3000 por parte de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6. A, movilidad de tipo *swimming*; B, actividad proteolítica sobre la gelatina; C, actividad proteolítica sobre la caseína.

La degradación de las AHLs de *E. amylovora* tras el cocultivo con la cepa *P. segetis* P6 se tradujo en una reducción considerable de la actividad de la enzima fosfatasa ácida. En el caso del cocultivo de *P. atrosepticum* con la cepa *P. segetis* P6 se produjo una inhibición de actividad proteolítica sobre la caseína y a una disminución en la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y lipasa (Tween 80). En el caso de la degradación de las AHLs de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, se observó una disminución de la actividad de la enzima fosfatasa ácida y de la enzima esterasa (Tween 20) en cocultivo con las cepas *P. segetis* P6 y *S. equorum* EN21, respectivamente.

Tabla 13. Caracterización fenotípica de los cocultivos entre las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 con los distintos fitopatógenos. +++, elevada actividad; ++, actividad moderada; +, actividad leve; -, sin actividad. a, movilidad positiva tras 24 horas de incubación. En el caso de la determinación de AHLs remanentes: +++, sin degradación de AHLs; ++, degradación escasa; +, degradación moderada; -, degradación completa; ND, sin producción de AHLs. En verde se indican los fenotipos que se vieron afectados tras el cocultivo con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 o *P. segetis* P6.

Tratamiento	Aamilasa	Caseinasa	Fosfatasa ácida	Gelatinasa	Swimming	Tween 20	Tween 80	AHLs remanentes
EN21	-	-	+	-	-	+	-	ND
N3	+	-	-	+	+ ^a	+	+	ND
P6	+	-	+	-	+ ^a	+	+	ND
<i>D. solani</i>	+	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
EN21 - <i>D. solani</i>	+	+++	+++	-	+++	+	+++	+
N3 - <i>D. solani</i>	+	+++	+++	+	+++	+	+++	++
P6 - <i>D. solani</i>	+	-	+++	-	-	+	+++	++
<i>E. amylovora</i>	-	-	+++	-	+	++	+	+++
EN21 - <i>E. amylovora</i>	-	-	+++	-	+	++	+	-
N3 - <i>E. amylovora</i>	+	-	+++	+	+	++	+	-
P6 - <i>E. amylovora</i>	+	-	+	-	+	++	++	-
<i>P. atrosepticum</i>	+	+	++	-	+++	+++	+++	+++
EN21 - <i>P. atrosepticum</i>	+	+	++	-	+++	+++	+++	++
N3 - <i>P. atrosepticum</i>	+	+	++	+	+++	+++	+++	++
P6 - <i>P. atrosepticum</i>	+	-	+	-	+++	+++	+	++
<i>P. c. subsp. carotovorum</i>	+	+	++	+	-	+++	+	+++
EN21 - <i>P. c. subsp. carotovorum</i>	+	+	++	+	-	++	+	++
N3 - <i>P. c. subsp. carotovorum</i>	+	+	++	+	+	+++	+	++
P6 - <i>P. c. subsp. carotovorum</i>	+	+	+	+	+	+++	+	++
<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	+	-	+++	-	+++	+++	++	+++
EN21 - <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	-	-	++	-	+	+++	++	-
N3 - <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	+	-	++	+	++	+++	++	-
P6 - <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	+	-	+	-	-	+++	++	-

3. Caracterización de la actividad *quorum quenching*

Una vez determinada la capacidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para degradar un amplio rango de AHLs tanto sintéticas como aquellas producidas por fitopatógenos, se determinó la localización de las enzimas responsables de la actividad QQ. Para ello, se realizó un ensayo de degradación frente a C10-HSL en el sobrenadante (Sn) esterilizado por filtración de un cultivo de 24 horas y el extracto celular crudo (ECC) obtenido tras la lisis de las células de este. En ambos casos se determinó el pH previamente a la adición de las AHLs para evitar la degradación de las estas a pH básico.

Como se puede observar en la Figura 46, la actividad QQ sobre C10-HSL se detectó en el sobrenadante del cultivo de cada una de las cepas, lo que indica que se trata de enzimas extracelulares, mientras que la degradación de la molécula señal en el extracto celular crudo fue prácticamente nula en todos los experimentos.

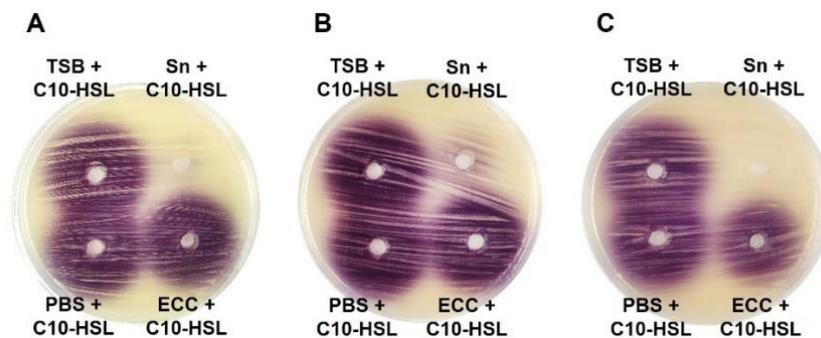


Figura 46. Determinación de la localización de la actividad *quorum quenching* sobre C10-HSL mediante ensayo de difusión en placa empleando *C. violaceum* VIR-07 como biosensor: A, cepa *S. equorum* EN21; B, cepa *P. castrilensis* N3; C, cepa *P. segetis* P6. TSB y PBS se emplearon como controles para el sobrenadante del cultivo (Sn) y para el extracto celular crudo (ECC), respectivamente.

Con el fin de determinar la naturaleza de las enzimas que degradan las moléculas señal de tipo AHL, se realizó un ensayo de acidificación de cada uno de los sobrenadantes tras su incubación con C10-HSL en el caso de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 o con C12-HSL para la cepa *P. castrilensis* N3, ya que muestra una mayor degradación de esta AHL que de C10-HSL. Esta prueba se basa en el principio de la restauración del anillo lactónico a pH ácido.

En el caso de la cepa *S. equorum* EN21, se observó una degradación total de C10-HSL en el sobrenadante a pH 7, mientras que en el sobrenadante a pH 2 se detectó una recuperación de las AHLs (Fig. 47A), lo que indicaba que se trataba de una enzima de tipo lactonasa. En cambio, el sobrenadante de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 a pH 2 no mostró esta recuperación de las moléculas señal (Fig. 47B y 47C).

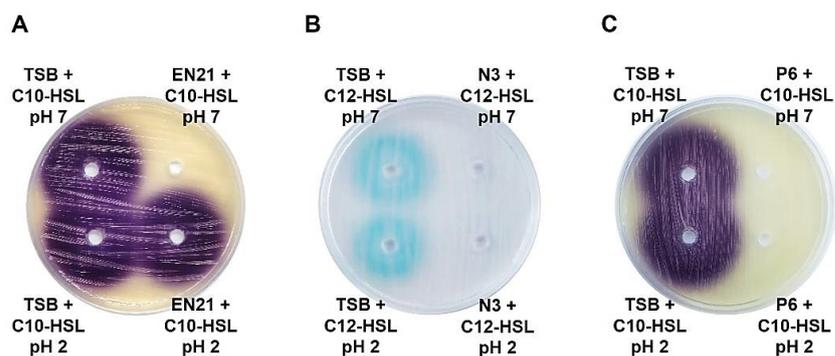


Figura 47. Identificación del enzima QQ tipo lactonasa mediante la prueba de la restauración del anillo lactónico a pH ácido, empleando C10-HSL y C12-HSL como sustratos. A, cepa *S. equorum* EN21; B, cepa *P. castrilensis* N3; C, cepa *P. segetis* P6. Como control se empleó TSB suplementado con C10-HSL o C12-HSL y como biosensores, *C. violaceum* VIR07 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), respectivamente.

Para evaluar si la actividad QQ realmente se debía a una degradación enzimática de las AHLs y no a la presencia de compuestos inhibidores del *quorum sensing* (QSI) que pudieran interferir en la detección de las AHLs por parte de los biosensores, se realizó una determinación semicuantitativa de AHLs remanentes mediante HPLC-MS tras la incubación de los sobrenadantes de cada cultivo celular en presencia de C10-HSL y C12-HSL, tanto a pH 2 como a pH 7.

El análisis de AHLs remanentes en el sobrenadante de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 tuvo como resultado una degradación del 99,7% y del 97,9% a pH 7, y del 98,6% y al 97,7% a pH2, respectivamente. En cambio, la determinación de AHLs remanentes de la cepa *S. equorum* EN21 mostró un valor del 21,5% a pH 7, lo que supuso una degradación del 78,5% de C₁₀-HSL, mientras que a pH 2 se observó una recuperación de las AHLs, con un valor de AHLs remanentes del 46,0% (Fig. 48). Estos resultados confirman la información obtenida en el ensayo de difusión en placa, solo la cepa *S. equorum* EN21 presenta una enzima QQ tipo lactonasa.

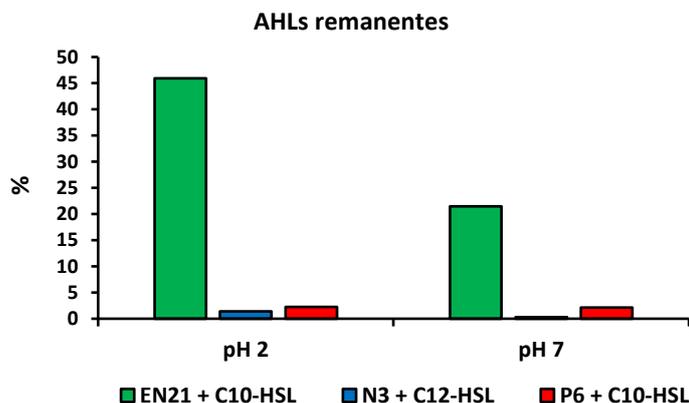


Figura 48. Determinación semicuantitativa de AHLs remanentes por HPLC-MS tras la incubación de los sobrenadantes de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 empleando C10-HSL, y C12-HSL en el caso de *P. castrilensis* N3, a pH 2 y pH 7.

4. Estudio filogenético y estructural de enzimas *quorum quenching*

Una vez identificado el tipo de enzima responsable de la actividad QQ en las cepas, se realizó un análisis filogenético a partir de la anotación de los genomas con el objetivo de confirmar la naturaleza de las enzimas, así como de determinar la homología con otras acilasas y lactonasas previamente descritas, y su estructura tridimensional.

Tras analizar la anotación del genoma de la cepa *S. equorum* EN21 se identificó un gen que codificaba una enzima de tipo *N*-acil-homoserina lactonasa con 282 aminoácidos, mientras que la anotación del genoma de la cepa *P. castrilensis* N3 permitió identificar un gen que codifica una *N*-acil-homoserina lactonasa con 264 aminoácidos y otro gen que codificaba una *N*-acil-homoserina lactona acilasa con un tamaño de 790 aminoácidos. En cambio, en el genoma de la cepa *P. segetis* P6, se detectaron dos genes que codificaban dos *N*-acil-homoserina lactona acilasas distintas, una con un tamaño de 840 aminoácidos y la otra de 793 aminoácidos.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la lactonasa de la cepa *S. equorum* EN21 mostró un 99,65% de identidad con la de *Staphylococcus equorum* ATCC 43958^T y por encima del 78% con otras lactonasas de especies del género *Staphylococcus*. En el caso de la lactonasa de la cepa *P. castrilensis* N3, la identidad fue del 95,51% con la de *Peribacillus simplex* NBRC 15720^T e inferior al 85% con las lactonasas de otras especies de la familia *Bacillaceae*. El análisis filogenético de ambas lactonasas mostró que pertenecían a la familia de las metalo- β -lactamasas (MBL). La lactonasa de la cepa *S. equorum* EN21 mostró homología con otras lactonasas del grupo AiiA, mientras que la lactonasa de la cepa *P. castrilensis* N3 estaba relacionada con las lactonasas del grupo AidC (Fig. 49).

En el caso de la cepa *P. segetis* P6, las secuencias de ambas acilasas mostraban un 99,4% de identidad con la de *Pseudomonas segetis* CIP 108523^T y por debajo del 75,0% con acilasas de otras especies del género *Pseudomonas*. Por su parte, la acilasa de la cepa *P. castrilensis* N3 mostró una identidad del 99,11% con la de *Peribacillus simplex* NBRC 15720^T e inferior al 98% con las acilasas de otras especies de la familia *Bacillaceae*. El análisis filogenético de las acilasas identificadas en los genomas de las cepas *P. segetis* P6 y *P. castrilensis* N3 mostró que pertenecían a la superfamilia de las enzimas N-terminal nucleófilo (Ntn) hidrolasas. En el caso de las acilasas de la cepa *P. segetis* P6, ambas se localizaron en el grupo de las penicilina G acilasas (PGA), mostrando una de ellas (acilasa A) homología con la acilasa HacB de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a y la otra (acilasa B) con la enzima QuiP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Por su parte, la acilasa identificada en el genoma de la cepa *P. castrilensis* N3 pertenecía al grupo de las PGAs, y resultó tener homología con la acilasa AiiC de *Nostoc* sp. PCC7120 (Fig. 49).

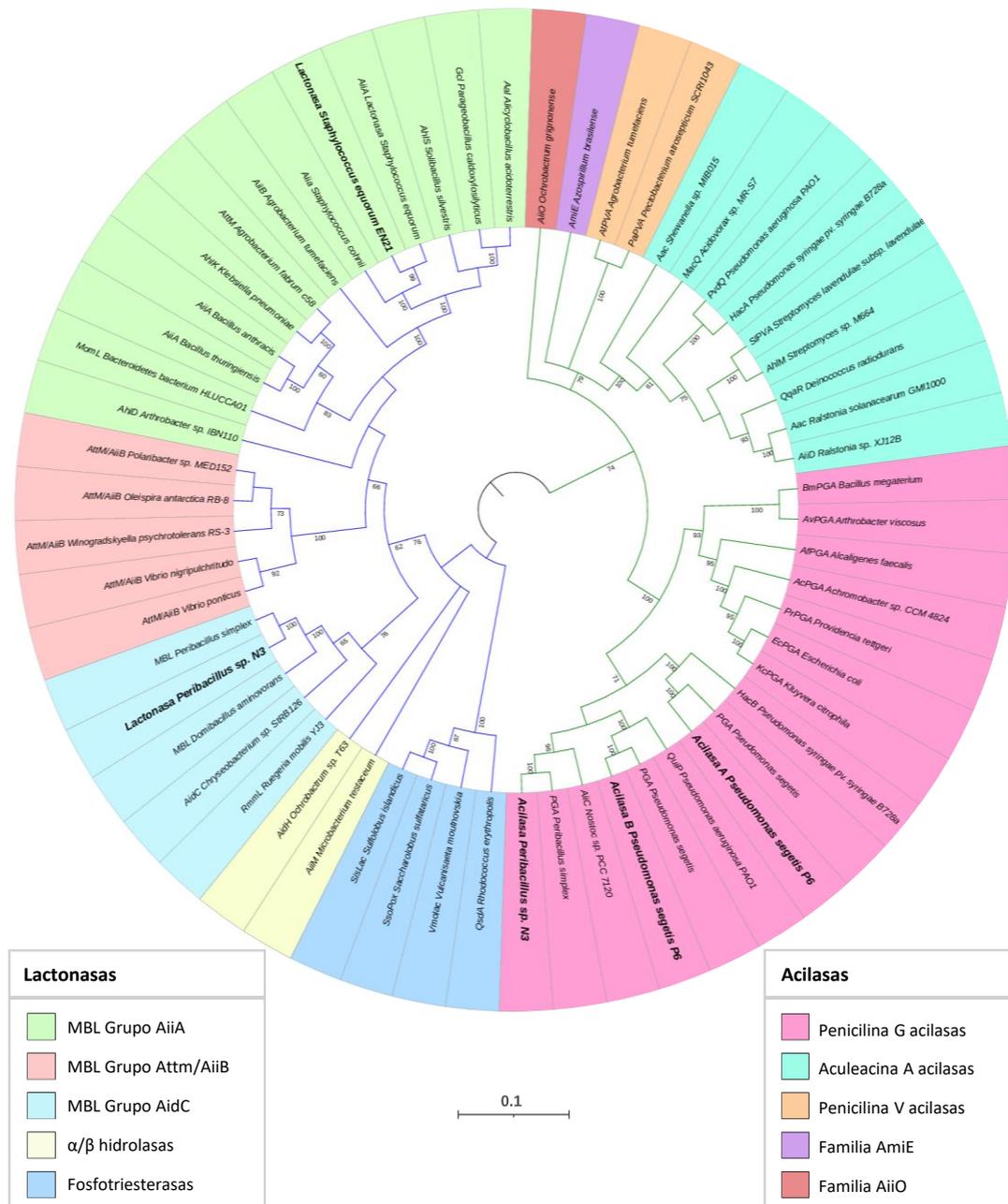


Figura 49. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de aminoácidos de las enzimas pertenecientes a las principales familias de acilasas (clados en verde) y lactonasas (clados en azul) y de las secuencias de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 empleando el algoritmo de *Neighbor-Joining* con un *bootstrap* de 1000 réplicas. Cerca de los nodos se muestran aquellos valores de *bootstrap* superiores al 60%. La escala representa el número de sustituciones por aminoácido. En negrita se resaltan las enzimas de las cepas analizadas en este estudio. MBL, metalo- β -lactamasas. Lactonasas: Aal, *A. acidoterrestris* (WP 021296945); Gcl, *P. caldxylosilyticus* (WP 017434252); AhIS, *S. silvestris* (BAK54001); AiiA, *S. equorum* (WP 065367329); AiiA, *S. cohnii* (WP 115041129); AiiB, *A. tumefaciens* (WP 172691130); AttM, *A. fabrum* c58 (AAD43990); AhIK, *K. pneumoniae* (AAO47340); AiiA, *B. anthracis* (BBK96276); AiiA, *B. thuringiensis* (ACI96342); MomL, *Bacteroidetes* sp. HLUCCA01 (KPQ00865); AhID, *Arthrobacter* sp. IBN110 (AAP57766); AttM/AiiB, *Polaribacter* sp. MED152 (EAQ42649anta); AttM/AiiB *O. antarctica* RB-8 (CCK77672); AttM/AiiB, *W. psychrotolerans* RS-3 (EPR72484); AttM/AiiB, *V. nigrapulchritudo* (KIJ980552); AttM/AiiB, *V. ponticus* (OLQ94647); MBL, *P. simplex* (WP 125163115); MBL, *D. aminovorans* (WP 063966474); AidC, *Chryseobacterium* sp. StrB126 (BAP32158); RmmL, *R. mobilis* YJ3 (AYM45058); AidH, *Ochrobactrum* sp. T63 (ACZ73823); AiiM, *M. testaceum* (WP 013585900); SisLac, *S. islandicus* (WP 012710474); SsoPoX, *S. sulfataricus* (WP 009988477); Vmolac, *V. moutnovskia* (WP 013605612); QsdA, *R. erythropolis* (AAT06802). Acilasas: PGA, *P. simplex* (WP 072272304); AiiC, *Nostoc* sp. PCC 7120 (BAB75623); PGA, *P. segetis* (WP 089358592); QuiP, *P. aeruginosa* PAO1 (AAG04421); PGA, *P. segetis* (WP 089360949); HacB de *P. syringae* pv. *syringae* B728a (AAV39885); KcPGA, *K. citrophila* (P07941); EcPGA, *E. coli* (P06875); PrPGA, *P. rettgeri* (AAP86197); AcPGA, *Achromobacter* sp. CCM 4824 (AAV25991); AfPGA, *A. faecalis* (AAB71221); AvPGA, *A. viscosus* (P31956); BmPGA, *B.*

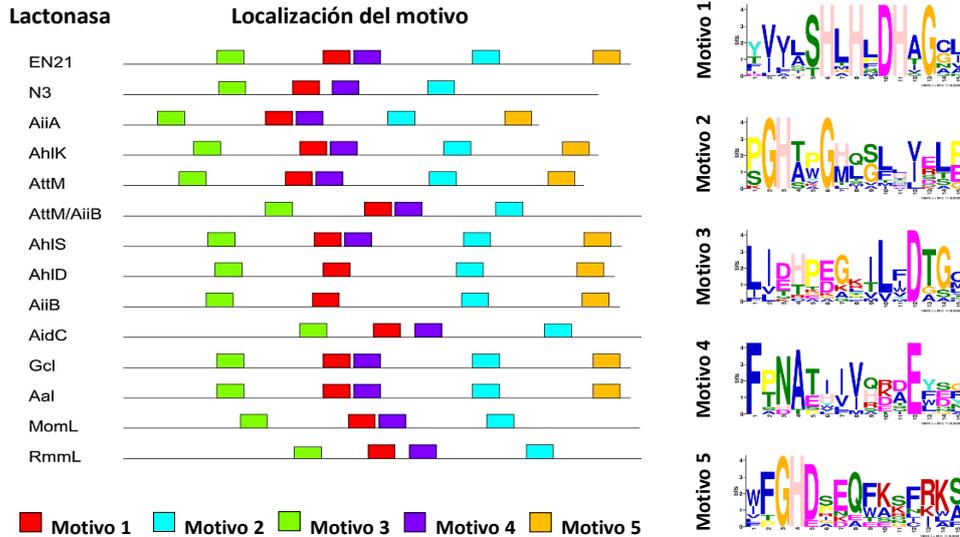
megaterium (AAD45609); AiiD, *Ralstonia* sp. XJ12B (AAO41113); Aac, *R. solanacearum* GMI1000 (CAD16254); QqaR, *D. radiodurans* (WP 010889514); AhIM, *Streptomyces* sp. M664 (AAT68473); SIPVA, *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* (AAU09670); HacA, *P. syringae* pv. *syringae* B728a (AAY37014); PvdQ, *P. aeruginosa* PAO1 (AAG05773); MacQ, *Acidovorax* sp. MR-S7 (BAV56778); Aac, *Shewanella* sp. MIB015 (BAF94155); PaPVA, *P. atrosepticum* SCRI1043 (CAG76103); AtPVA, *A. tumefaciens* (WP 010973985); AmiE, *A. brasilense* (WP 040133971); AiiO, *O. grignonense* (HM156120).

Por último, se analizó la secuencia de las enzimas acilasas y lactonasas en busca de dominios conservados y se realizó una predicción de la estructura tridimensional de las enzimas de las tres cepas.

El alineamiento múltiple entre las secuencias de las lactonasas de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y las de las principales lactonasas de la superfamilia de las metalo-β-lactamasas (MBL) dio lugar a la identificación de tres regiones conservadas presentes en todas las secuencias, los motivos 1, 2 y 3. En cambio, el motivo 4 se localizó en todas las enzimas salvo en las lactonasas AhID de *Arthrobacter* sp. IBN110 y AiiB de *A. tumefaciens*, al igual que el motivo 5 que estaba ausente en la secuencia de las lactonasas de *P. castrilensis* N3, Attm/AiiB de *W. psychrotolerans* RS-3, AidC de *Chryseobacterium* sp. StRB126, MomL de *Bacteroidetes* sp. HLUCCA01 ni en RmmL de *R. mobilis* YJ3 (Fig. 50A). Entre los aminoácidos conservados en todas las lactonasas, se encontró la secuencia de aminoácidos ¹⁷⁸HxHxDH¹⁸³-H²⁷⁵-D²⁹⁷-H³⁴⁵ distribuida en los motivos 1, 2 y 5 (Fig. 50B).

Por otra parte, el análisis de las secuencias de las acilasas de las cepas *P. castrilensis* N3, *P. segetis* P6 y las de los principales miembros del grupo de las penicilina G acilasas (PGA) reveló la presencia de 6 motivos conservados en todas ellas, motivos 1, 2, 3, 4, 6 y 8 (Fig. 51A). En cambio, el motivo 5 no se localizó en las acilasas de *P. segetis* P6 ni en QuiP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; el motivo 7 estaba ausente en las acilasas de *P. castrilensis* N3, en la acilasa A de *P. segetis* P6, en AiiC de *Nostoc* sp. PCC 7120 y en QuiP de *P. aeruginosa* PAO1; el motivo 9 se halló en todas las secuencias salvo en AfPGA de *Alcaligenes faecalis*; y el motivo 10 únicamente se detectó en las acilasas BmPGA de *B. megaterium*, AvPGA de *A. viscosus*, AfPGA de *A. faecalis*, AcPGA de *Achromobacter* sp. CCM 4824, PrPGA de *P. rettgeri*, KcPGA de *K. citrophila* y EcPGA de *E. coli* (Fig. 51B).

A



B

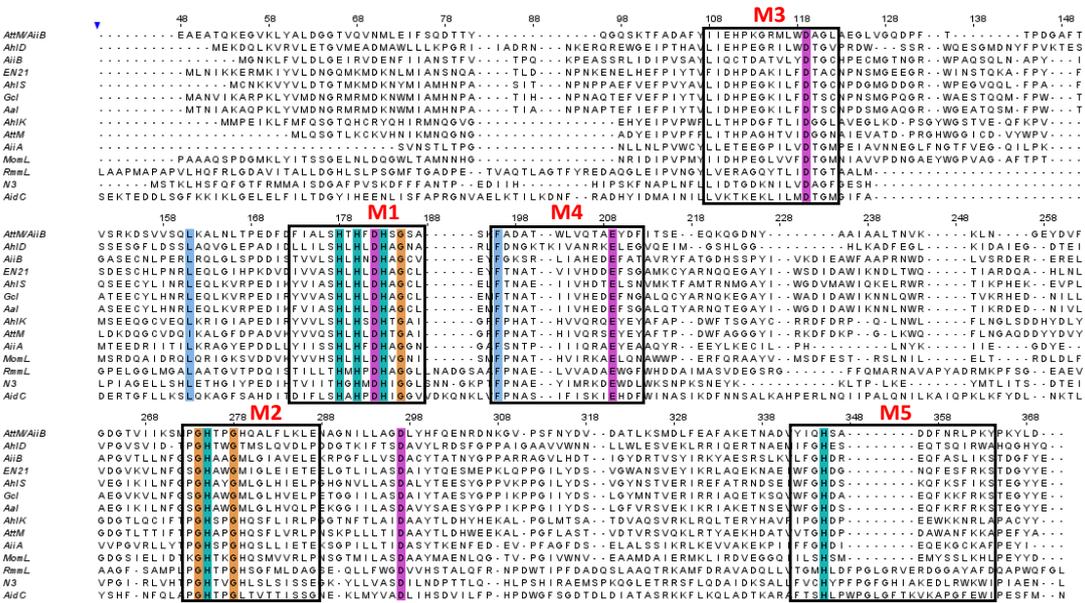


Figura 50. Alineamiento múltiple de la secuencia de las lactonasas de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 y las secuencias de las principales lactonasas de la familia de las metalo- β -lactamasas. En color se resaltan los aminoácidos conservados en el 100% de las secuencias. Los motivos conservados tras el alineamiento múltiple de las secuencias se señalan con cuadros. AttM/AiiB de *W. psychrotolerans* RS-3 (EPR72484), AhlD de *Arthrobacter* sp. IBN110 (AAP57766), AiiB de *A. tumefaciens* (WP_021296945), AhlS de *S. silvestris* (BAK54001), Gcl de *P. caldoxysilyticus* (WP_017434252), Aal de *A. acidoterrestris* (WP_021296945), AhlK de *K. pneumoniae* (AAO47340), AttM de *A. fabrum* c58 (AAD43990), AiiA de *B. thuringiensis* (ACI96342), MomL de *Bacteroidetes bacterium* HLUCCA01 (KPQ00865), RmmL de *R. mobilis* YJ3 (AYM45058) y AidC de *Chryseobacterium* sp. StRB126 (BAP32158).

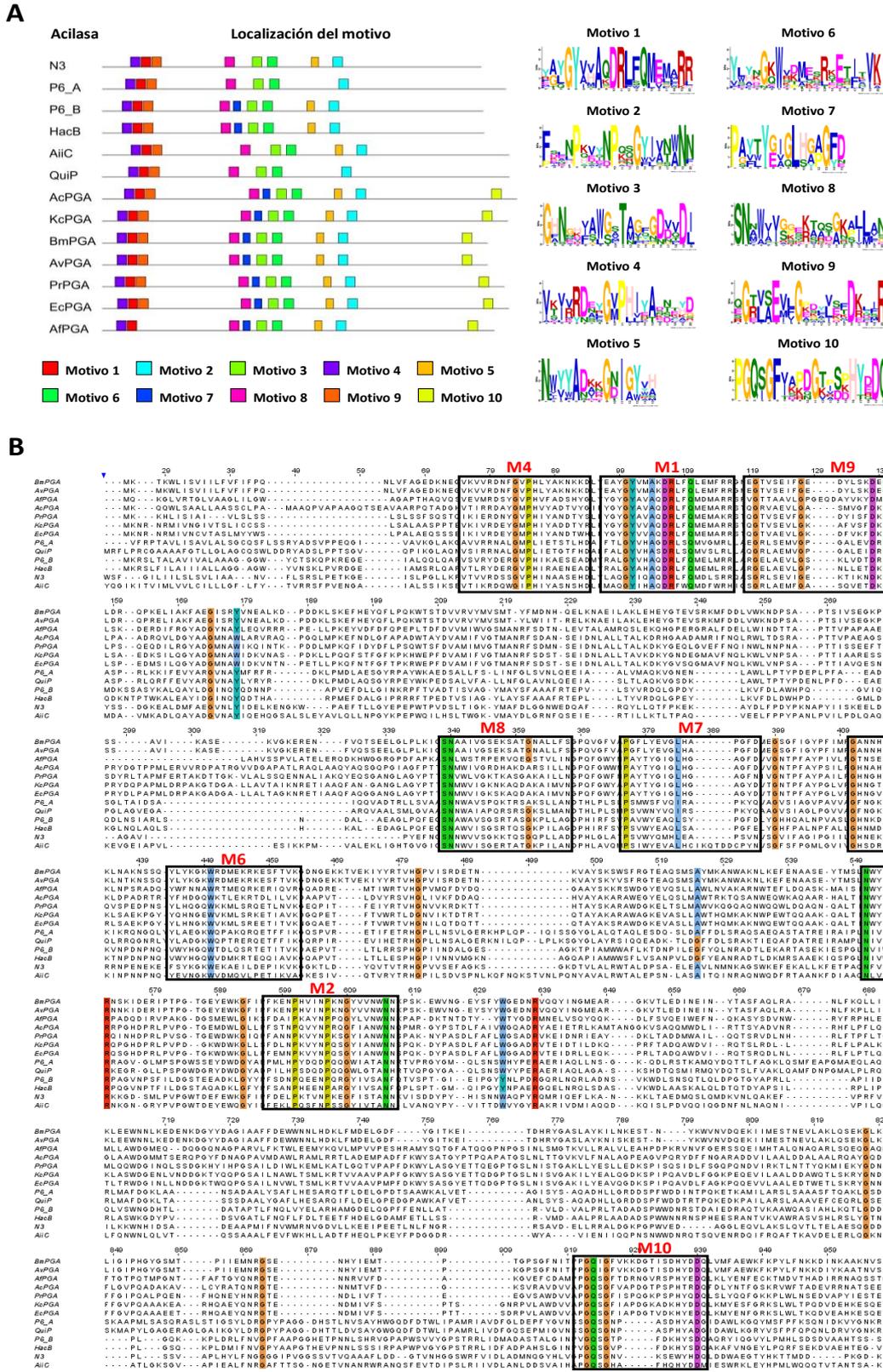


Figura 51. Alineamiento múltiple de la secuencia de las acilasas de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 y las secuencias de las principales acilasas de la familia de las penicilina G acilasas. En color se resaltan los aminoácidos conservados en el 100%. Los motivos conservados más el alineamiento múltiple de las secuencias se señalan con cuadros. AiiC, *Nostoc* sp. PCC 7120 (BAB75623); QuiP, *P. aeruginosa* PAO1 (AAG04421); HacB de *P. syringae* pv. *syringae* B728a (AAY39885); KcPGA, *K. citrophila* (P07941); EcPGA, *E. coli* (P06875); PrPGA, *P. rettgeri* (AAP86197); AcPGA, *Achromobacter* sp. CCM 4824 (AAY25991); AfPGA, *A. faecalis* (AAB71221); AvPGA, *A. viscosus* (P31956); BmPGA, *B. megaterium* (AAD45609).

Por último, la modelización *in silico* y el análisis estructural de las lactonasas de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 confirmaron que se trataba de dos lactonasas de tipo metalo- β -lactamasas (MBL). Del mismo modo, este análisis permitió confirmar que las acilasas de las cepas *P. segetis* P6 y *P. castrilensis* N3 pertenecen al grupo de las penicilina G acilasas.

La predicción estructural de la lactonasa de la cepa *S. equorum* EN21 mostró una identidad del 65% con la enzima Aal de *A. acidoterrestris* y un 42% con Gcl de *P. caldoxylosilyticus* (Fig. 52A). En el caso de la lactonasa de la cepa *P. castrilensis* N3, la predicción estructural mostraba porcentajes de identidad del 31% y del 21% con las lactonasas AidC de *Chryseobacterium* sp. StRB126 y RmmL de *R. mobilis* YJ3, respectivamente, observándose una configuración y una estructura claramente distintas (Fig. 52B).

En el caso de la predicción estructural de las enzimas de la cepa *P. segetis* P6, la acilasa A mostraba un 28% de identidad con la acilasa QuiP de *P. aeruginosa* PAO1, mientras que la acilasa B tuvo un 24% de identidad con la acilasa HacB de *P. syringae* pv. *syringae* B728a, lo que permitió identificar diferencias notables entre ambas parejas de homólogos, siendo mayor en la pareja *P. segetis* P6 (acilasa A)-QuiP (Fig. 52C). Por último, la predicción estructural de la acilasa de la cepa *P. castrilensis* N3 mostró una identidad estructural del 27% con la acilasa AiiC de *Nostoc* sp. PCC 7120, con la que mostraba una elevada similitud conformacional (Fig. 52D).

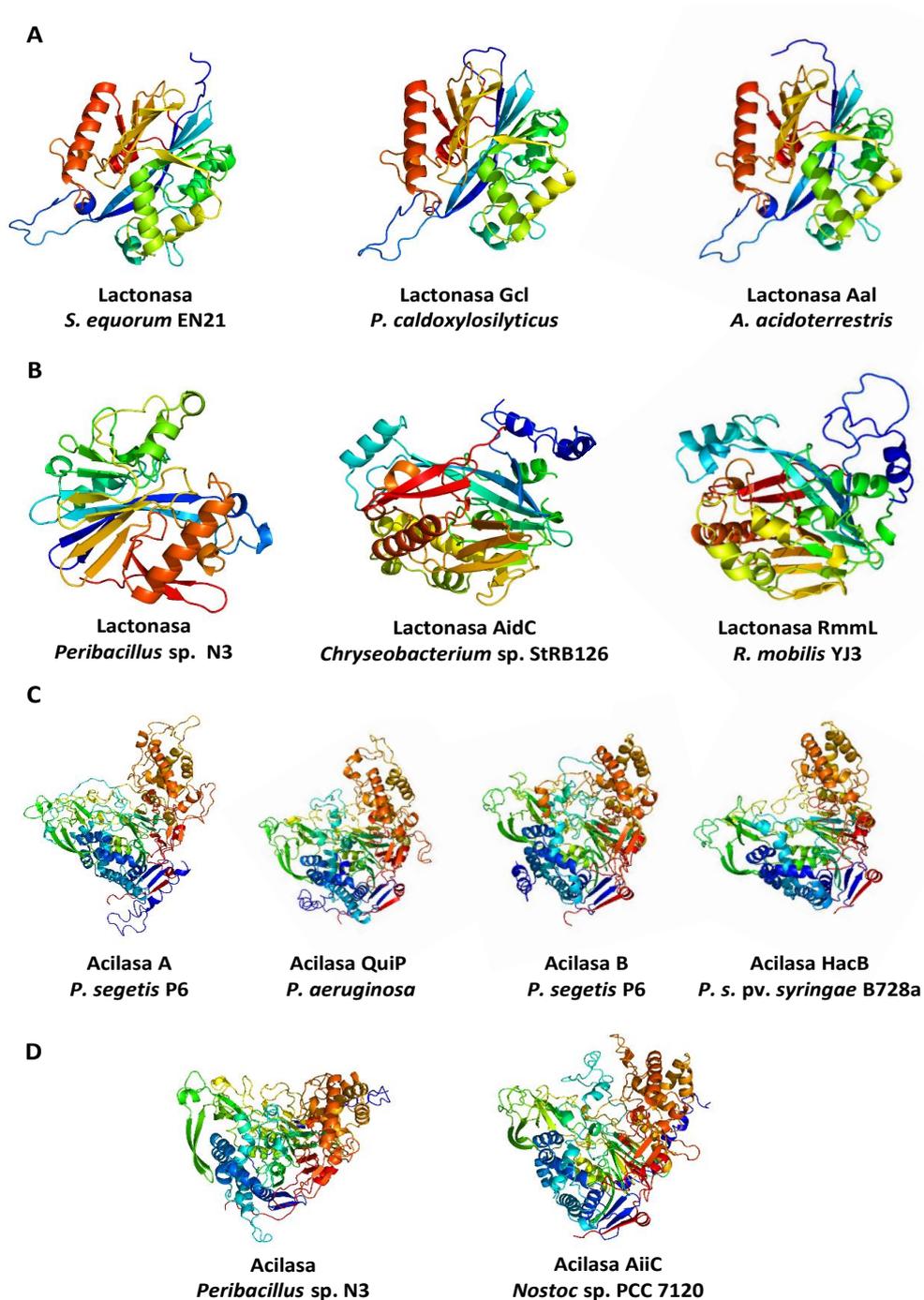


Figura 52. Análisis estructural *in silico* de las acilasas y lactonasas de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. A, comparativa de la lactonasa de la cepa *S. equorum* EN21 y sus homólogos más próximos; B, comparativa de la lactonasa de la cepa *P. castrilensis* N3 y sus homólogos más próximos; C, comparativa de las acilasas de la cepa *P. segetis* P6 y sus homólogos más próximos; D, comparativa de la acilasa de la cepa *P. castrilensis* N3 y sus homólogos más próximos.

5. Expresión heteróloga de enzimas *quorum quenching*

Una vez identificadas las secuencias de las enzimas responsables de la actividad QQ de las tres cepas se procedió a su expresión en *E. coli* DH5 α mediante clonación en el plásmido pGEX-4T-2. para confirmar dicha actividad.

Debido a problemas con el protocolo, únicamente se lograron clonar y expresar con éxito las dos acilasas de la cepa *P. segetis* P6.

Tras la clonación de los genes que codifican ambas acilasas en el plásmido pGEX-4T-2, se realizó una transformación por electroporación en *E. coli* DH5 α , se seleccionaron aquellos clones resistentes a ampicilina y se confirmó la presencia de ambos genes mediante PCR. Finalmente, se comprobó la actividad QQ de los clones mediante un ensayo de degradación de AHLs empleando C12-HSL como sustrato, lo que resultó en una degradación casi total en ambos casos en comparación con el sobrenadante de un cultivo de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pGEX-4T-2 vacío y suplementado con la misma concentración de AHLs. Como control se utilizó el medio LB suplementado con la misma concentración de AHL (Fig. 53).

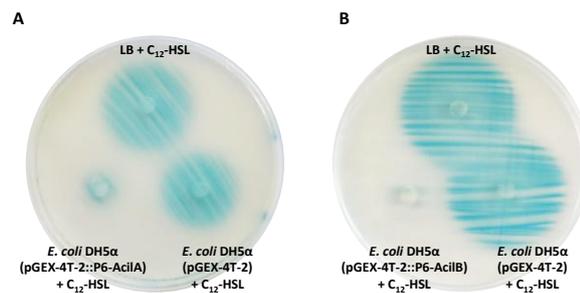


Figura 53. Evaluación de la actividad *quorum quenching* tras la clonación de las acilasas A y B de la cepa *P. segetis* P6 en *E. coli* DH5 α . A, AHLs remanentes tras la incubación con la acilasa A; B, AHLs remanentes tras la incubación con la acilasa B. Se empleó medio LB suplementado con C12-HSL como control y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) como biosensor en medio AB-Xgal.

6. Discusión

El uso indiscriminado de pesticidas químicos empleados actualmente en el control de fitopatógenos en la industria agrícola ha causado una considerable pérdida de biodiversidad en los suelos de cultivo y la contaminación de aguas subterráneas. Además, esto junto con su mal uso parece haber sido responsable de la aparición o selección de cepas resistentes a estos tratamientos, lo que dificulta cada vez más la erradicación de las plagas que producen estos patógenos. Puesto que muchos de los fitopatógenos son bacterias gram negativas en las que la expresión de sus factores de virulencia está regulada mediante sistemas QS dependientes de moléculas AHLs, en las últimas décadas se ha propuesto que el biocontrol de estas mediante QQ podría constituir una alternativa eficaz, segura y respetuosa con el medio ambiente, frente a las técnicas de control de fitopatógenos que se emplean en la actualidad. Además, puesto que el biocontrol mediado por QQ no altera la diversidad de las comunidades microbianas ni ejerce una presión selectiva en los fitopatógenos, la posibilidad de que se generen resistencias es prácticamente nula (Defoirdt et al., 2010; García-Contreras et al., 2013).

Una vez seleccionadas las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 por su actividad QQ y por no afectar el crecimiento de los fitopatógenos, se analizó su bioseguridad. El estudio del genoma de estas tres cepas no mostró ningún factor de virulencia de relevancia relacionado con la producción de toxinas, factores de adhesión o de invasión. Según el análisis de varias colecciones de cultivos tipo, las especies más próximas a estas tres cepas se encuentran clasificadas en el grupo de bioseguridad 1, con un riesgo individual y comunitario bajo (Meechan & Potts, 2020). En el caso de la cepa P6, aunque las cepas de *P. simplex* y las de *P. segetis* han sido

poco estudiadas en este aspecto, una investigación ha desvinculado la presencia en *P. segetis* de los factores de virulencia característicos de cepas de *P. aeruginosa* causantes de infecciones del tracto urinario en pacientes sondados (Vipin et al., 2019). Igualmente, un único estudio ha analizado la patogenicidad de cepas de *P. simplex*, obteniendo como resultado la producción de una toxina termoestable similar a la toxina cereulida producida por *B. cereus*, que causa un cuadro emético (Taylor et al., 2005). Sin embargo, en el genoma de la cepa *P. castrilensis* N3 no se hallaron los genes implicados en la síntesis de esta toxina. En cuanto a la virulencia de las cepas de *S. equorum* se ha analizado ampliamente debido a la existencia de especies patógenas de humanos en el género. Sin embargo, no se han encontrado los factores de virulencia característicos de *S. aureus* o *S. epidermidis*, como la enzima coagulasa, proteínas de adhesión o toxinas, aunque algunas cepas de *S. equorum* poseen cierta actividad β -hemolítica y/o resistencia a antibióticos, principalmente a ampicilina, penicilina G y eritromicina (Jeong et al., 2014; Jeong et al., 2017). De hecho, diversas cepas de *S. equorum* forman parte de la microbiota presente en alimentos cárnicos y lácteos fermentados y se han empleado como cultivo *starter* en la elaboración de algunos de ellos (Corbière Morot-Bizot et al., 2006; Mauriello et al., 2004; Place et al., 2003).

Estos resultados reforzaban los obtenidos en los ensayos de toxicidad en *A. salina* y de la inhibición de la bioluminiscencia de *A. fischeri* (Microtox). La elevada supervivencia de los nauplios de *A. salina* tratados con las tres cepas PGP-QQ, no solo demostró la ausencia de patogenicidad de estas con respecto al control *V. coralliilyticus* durante las primeras 72 horas, sino que incluso ejercieron un efecto beneficioso para estos invertebrados marinos, aumentando su supervivencia con respecto al control negativo tras 96 horas. En cuanto al ensayo de inhibición de la bioluminiscencia de *A. fischeri*, la concentración efectiva (EC_{50}) que causa la disminución de esta alcanzó valores muy superiores al 100% en los cultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6. Según los criterios establecidos por (Ajuzieogu & Odokuma, 2018) cualquier valor de EC_{50} superior al 100% indica una toxicidad nula. En el caso de cepa *P. castrilensis* N3, este valor no se pudo determinar debido a problemas técnicos. Aún con estos resultados tan alentadores, en futuros estudios se estudiará la ecotoxicidad de estas tres cepas para determinar su impacto en otros microorganismos como *Escherichia coli* MC4100; en sistemas de agua dulce, como *Daphnia magna*; o en sistemas terrestres, como *Caenorhabditis elegans* o *Eisenia foetida* (Vílchez et al., 2016).

En cuanto al estudio de la actividad QQ de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostraron una elevada actividad sobre los extractos crudos de AHLs de los cultivos de los cinco fitopatógenos estudiados, especialmente en el caso de las producidas por *E. amylovora* y *P. syringae* pv. tomato DC3000 en los que se observó una degradación total. Según la bibliografía existente, los sistemas QS de estos patógenos están mediados por AHLs de cadena media principalmente, entre las que destacan 3-oxo-C6HSL y 3-oxo-C8HSL en *D. solani*, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Crépin et al., 2012a; Potrykus et al., 2014; Valente et al., 2017) y C₆-HSL y 3-oxo-C₆-HSL en *E. amylovora* (V. Venturi et al., 2004) y *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Elasri et al., 2001; Xie et al., 2020). Como se comprobó en el estudio previo empleando AHLs de origen sintético, las tres cepas mostraban una gran capacidad para degradar moléculas señal de esta naturaleza. El hecho de que la degradación de las AHLs presentes en los extractos de *D. solani*, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no fuese completa, podría deberse a la elevada producción de AHLs que presentan estos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en los ensayos de QQ en cocultivo entre cada uno de los fitopatógenos y las cepas PGP-QQ en una relación 1:100. Además, en los recuentos en placa no se observó ningún efecto inhibitorio de las cepas PGP-QQ sobre el crecimiento de los fitopatógenos con respecto al cultivo de cada patógeno en monocultivo. Esto confirma el elevado potencial de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para controlar la virulencia de estos fitopatógenos sin alterar su crecimiento, incluso a

concentraciones muy superiores a las normalmente encontradas en la naturaleza o en los campos de cultivo.

Por otra parte, el efecto de la degradación de las AHLs y con ello, la interferencia de los sistemas QS de los patógenos se evaluó mediante una caracterización fenotípica y metabólica de los cocultivos, lo que permitió identificar ciertas actividades que se vieron afectadas o incluso inhibidas. La movilidad y determinadas actividades enzimáticas han sido ampliamente descritas como factores de virulencia en estos fitopatógenos, entre las que destacan enzimas degradadoras de la pared vegetal como proteasas, lipasas, amilasas, celulasas o pectinasas que permiten la infección y diseminación en la planta, cuya actividad está regulada mediante la producción de AHLs (Agyemang et al., 2020; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2014; Meena et al., 2019; Norman et al., 1999; Toth et al., 2003; Uppalapati et al., 2008). La cepa *P. segetis* P6 fue la que mostró un mayor efecto en la disminución actividad proteolítica y en la movilidad de la mayoría de los fitopatógenos, seguida por la cepa *S. equorum* EN21 que afectó de forma más leve a la actividad proteolítica y amilolítica de *D. solani* y de *P. syringae* pv. tomato DC3000. En cambio, la cepa *P. castrilensis* N3 en cocultivo con los diferentes patógenos, únicamente afectó a la movilidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000. Esta interferencia en la movilidad y en la actividad metabólica podría afectar a la capacidad de estos fitopatógenos para producir daños o incluso para iniciar el proceso de infección en la planta, como se ha visto en varios estudios mediante mutación de genes relacionados con la movilidad (Antúnez-Lamas et al., 2009; Koczan et al., 2011) y con diversas enzimas hidrolíticas (Agyemang et al., 2020; Huang & Allen, 2000; Zhang et al., 1999), así como tras realizar cocultivos con los patógenos *A. fabrum* c58, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Y.-H. Dong et al., 2000; B. Smadja et al., 2004; Torres et al., 2018; Torres et al., 2017). A pesar de estos resultados, es difícil conocer hasta qué punto se vieron afectadas otras características fenotípicas y metabólicas de los fitopatógenos por la degradación de AHLs, puesto que las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostraban multitud de resultados positivos para ellas que pudieron haber eclipsado la inhibición de esas características en los cocultivos con los fitopatógenos.

Tras analizar la actividad QQ de las tres cepas, se realizó una caracterización de las enzimas responsables de esta en la que evaluó la localización y el tipo de enzima. En todos los casos, la actividad QQ se detectó en el sobrenadante de los cultivos, mientras que los extractos celulares no mostraron actividad, lo que indicaría que se trata de enzimas extracelulares. Por su parte, el ensayo de difusión en placa y la posterior determinación semicuantitativa por HPLC-MS permitieron confirmar definitivamente que la actividad QQ de estas cepas se debe a una degradación enzimática de las AHLs y no a la presencia de inhibidores de sistemas *quorum sensing* (QSI). Además, la detección de AHLs remanentes a pH 2 tras la incubación con la cepa *S. equorum* EN21 apuntaba a una degradación enzimática de tipo lactonasa, puesto que este tipo de enzimas producen una degradación de las AHLs mediante la apertura del anillo lactónico, que es parcialmente reversible a pH ácido según el principio de la restauración del anillo lactónico (Yates et al., 2002). En cambio, la ausencia de AHLs remanentes a pH 2 tras la incubación con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 confirmó que no se debía a una enzima de tipo lactonasa, si no a otro tipo de enzima, ya sea acilasa u oxidoreductasa. Por lo general, las enzimas de tipo lactonasa suelen tener una localización citoplasmática, a diferencia de las de tipo acilasa, que suelen situarse en el periplasma por su alto contenido en cisteína (Bokhove et al., 2010; Nain et al., 2020). Sin embargo, cada vez hay más estudios que desvelan la existencia de enzimas extracelulares, especialmente acilasas (Cai et al., 2018; Park et al., 2005; Shepherd & Lindow, 2009), lo que parece conferir cierta ventaja competitiva en el nicho ecológico con respecto a aquellas especies que poseen enzimas intracelulares (Tan et al., 2020).

Una vez confirmado el carácter enzimático de la actividad QQ de las tres cepas por métodos bioquímicos, se realizó un análisis genómico que permitió identificar genes que codificaban enzimas QQ. El genoma de la cepa *S. equorum* EN21 reveló la presencia de un gen que codificaba una enzima lactonasa, el genoma de la cepa *P. castrilensis* N3 contenía genes que codifican una lactonasa y otro una acilasa, y la cepa *P. segetis* P6, dos acilasas distintas. Diversos estudios han detectado la presencia de varias enzimas con actividad QQ en la misma cepa, como es el caso de las acilasas PvdQ y QuiP de *P. aeruginosa* PAO1 (Huang et al., 2006) y HacA y HacB de *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Shepherd & Lindow, 2009) o las lactonasas AiiB y AttM de *A. tumefaciens* (Zhang et al., 2002). Incluso se han descrito cepas que presentan enzimas con actividad QQ de tipo acilasa y lactonasa como *Deinococcus radiodurans* R1, *Hyphomonas neptunium* ATCC 15444^T, *Ralstonia eutropha* o *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 ((Kalia et al., 2011; Koul & Kalia, 2017) o de tipo oxidorreductasa y acilasa como *R. erythropolis* W2 (Uroz et al., 2005).

Por su parte, el análisis filogenético y estructural de las acilasas de las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 permitió confirmar la naturaleza de estas y aportó información acerca de las familias a las que pertenecen. Tanto las acilasas A y B identificadas en el genoma de la cepa *P. segetis* P6 como la acilasa de la cepa *P. castrilensis* N3 mostraban homología con las acilasas previamente descritas HacB de *P. syringae* pv. *syringae* B7228a, QuiP de *P. aeruginosa* PAO1 y AiiC de *Nostoc* sp. PCC 7120 (Huang et al., 2006; Romero et al., 2008; Shepherd & Lindow, 2009), respectivamente, y pertenecientes al grupo de las penicilina G acilasas (PGAs) dentro de la superfamilia de las Ntn hidrolasas. Las PGAs, junto con las del grupo de las penicilina V acilasas (PVAs), constituyen los dos grupos de acilasas con actividad QQ más ampliamente descritos, nombradas así por su actividad β -lactamasa sobre la bencilpenicilina y la fenoximetilpenicilina, respectivamente (Sio & Quax, 2004). Las PGAs son enzimas heterodiméricas en cuyo centro activo se encuentra una serina que actúa como nucleófilo en el ataque al sustrato (Oinonen & Rouvinen, 2000; Utari et al., 2017). El análisis de las secuencias de las tres acilasas dio lugar a la identificación de 6 regiones altamente conservadas en todas las acilasas de este grupo y que podrían estar relacionados con la conformación estructural y el centro activo (Bokhove et al., 2010; Oinonen & Rouvinen, 2000; Philem et al., 2019). Concretamente, en el motivo 8 se identificó el residuo de serina característico del centro activo de las PGAs, así como regiones ricas en aspartato, glicina y prolina en los motivos 1, 2, 3, 4 y 9, típicamente asociados a la conformación tridimensional de la enzima (Lin et al., 2003; Singh & Manoj, 2017). Con respecto al estudio de las lactonasas identificadas en las cepas *P. castrilensis* N3 y *S. equorum* EN21, el análisis de la secuencia de aminoácidos mostró un elevado porcentaje de identidad con otras lactonasas previamente descritas, y el estudio filogenético de estas las identificó como miembros de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas (MBL), la familia de lactonasas que más enzimas con actividad QQ tiene descritas hasta la fecha (Cai et al., 2018; Fetzner, 2015). En el caso de la lactonasa de la cepa *P. castrilensis* N3, el análisis de la secuencia de aminoácidos indicó que pertenecía al grupo AidC, un grupo de MBLs poco común cuyos principales representantes son las enzimas AidC de *Chryseobacterium* sp. StRB126 (Wang et al., 2012) y RmmL, *Ruegeria mobilis* YJ3 (Cai et al., 2018). En cambio, el estudio filogenético basado en la secuencia aminoacídica situó a la lactonasa de la cepa *S. equorum* EN21 como miembro del grupo AiiA, el grupo con más enzimas descritas y cuyo representante es AiiA de *Bacillus thuringiensis* (Y.-H. Dong et al., 2000). El análisis de la secuencia de ambas lactonasas permitió identificar tres motivos conservados en todas ellas, entre los que se detectó la secuencia de aminoácidos rica en histidina HxHxDH-H-D-H atribuida al centro activo de las MBLs, cuya asociación con dos iones de zinc es imprescindible para la actividad catalítica de estas enzimas (Kim et al., 2005; Thomas et al., 2005; Wang et al., 2004).

En cuanto a la modelización *in silico* de las enzimas QQ de las tres cepas, únicamente la predicción estructural de la lactonasa de la cepa *S. equorum* EN21 mostró un porcentaje de identidad significativo con la lactonasa Aal de *A. acidoterrestris*, cuyas características estructurales han sido descritas por cristalización y difracción de rayos X (Bergonzi et al., 2018), mientras que el porcentaje de identidad del resto de enzimas estudiadas fue inferior al 30%, dificultando la caracterización de estas con una mayor profundidad. Sin embargo, en todas ellas, los resultados obtenidos concordaban con el análisis filogenético previamente realizado, pero la escasa disponibilidad de modelos cristalográficos de enzimas QQ dificulta la obtención de predicciones estructurales fiables.

Por último, la expresión heteróloga de ambas acilasas de *P. segetis* P6 en *E. coli* DH5 α junto con el ensayo de determinación de la degradación de C12-HSL mostraron una degradación total de esta molécula señal en ambos casos. Estos resultados junto con la caracterización y el análisis filogenético permitieron demostrar la actividad QQ de esta cepa se debía a la acción de dos enzimas de tipo acilasa. Cada vez son más abundantes los estudios que realzan el interés sanitario, industrial y biotecnológico de la expresión heteróloga de enzimas QQ en diferentes hospedadores, entre los que destacan los fitopatógenos, de tal forma que la expresión de la enzima QQ en estos autorregula la expresión de factores de virulencia dependientes de QS, reduciendo así la patogenicidad sin afectar al crecimiento (Y. H. Dong et al., 2000; Kumar et al., 2015; Torres et al., 2017; Yin et al., 2010). Incluso algunos estudios han demostrado la eficacia de la expresión estable de la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp. A24 en la cepa *Pseudomonas fluorescens* P3, previamente seleccionada por sus características PGP, lo que provocó una inhibición de la virulencia de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y de *A. tumefaciens*, aumentando la polivalencia de esta cepa (Molina et al., 2003). Incluso se ha ensayado la expresión heteróloga de la enzima AttM de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* c58 en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) comprobándose no solo su efectividad en la atenuación de la patogenicidad de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, sino que esta actividad no produce una alteración significativa de la diversidad microbiana asociada a la rizosfera de las plantas (D'Angelo-Picard et al., 2011).

Capítulo 4

Estudio de la actividad *quorum quenching* y de la actividad promotora del crecimiento vegetal de las cepas seleccionadas en condiciones de estrés biótico y abiótico

Resumen

La industria agrícola está alcanzando una situación límite debido al uso excesivo de fertilizantes químicos para aumentar la producción, y de pesticidas en la lucha frente a los fitopatógenos. Por otra parte, los desafíos del cambio climático generan un entorno hostil para la planta en cuanto a estrés abiótico como la salinidad y la sequía. Numerosos estudios han demostrado los beneficios del uso de bacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal (PGP) en la agricultura en condiciones de estrés biótico y abiótico. Por otra parte, existe una evidencia experimental de que los sistemas de comunicación *quorum sensing* (QS) están muy extendidos entre los organismos procariotas, y de que las moléculas AHLs controlan numerosos factores de virulencia en ellos. Por ello, en este capítulo se analizó la capacidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para promover el crecimiento de las plantas de tomate y reducir los daños ocasionados por los patógenos *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. tomato, así como su capacidad para promover el crecimiento en condiciones de estrés hídrico.

Con el fin de establecer los parámetros idóneos para los ensayos de interferencia en la patogenicidad en fruto y en planta, se estableció la dosis infectiva de los distintos fitopatógenos empleando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* Col-0. Igualmente se realizó un ensayo con esta planta modelo de la capacidad de las tres cepas de estudio para inhibir la virulencia de los cinco fitopatógenos mediante cocultivos con distinta concentración de estos. En base a los resultados obtenidos, se emplearon los cocultivos al 1% (v/v) de patógeno para los ensayos de interferencia en la virulencia en plantas de *A. thaliana* con *P. syringae* pv. tomato, en peras con *E. amylovora*, en patatas con *D. solani* y con *P. atrosepticum* y en zanahorias con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Los resultados del tratamiento de las plántulas de *A. thaliana* con los cocultivos entre las tres cepas y *P. syringae* pv. tomato mostraron una disminución considerable de los daños producidos por este en comparación con aquellas tratadas con el patógeno en monocultivo. En cuanto a los ensayos en patatas, peras y zanahorias, la cepa *P. segetis* P6 fue la única que logró inhibir completamente la virulencia de todos los fitopatógenos en cocultivo. Por su parte, la cepa *S. equorum* EN21 redujo considerablemente los daños causados por *D. solani* en patatas y por *E. amylovora* en peras. Del mismo modo, la cepa *P. castrilensis* N3 mostró una actividad muy parecida a la de la cepa *S. equorum* EN21, salvo que además inhibió completamente la virulencia de *D. solani* en patatas.

Con respecto a los ensayos en plantas de tomate, todas las cepas redujeron la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato cuando se aplicaron mediante irrigación previa o mediante cocultivo, observándose una reducción de las AHLs producidas por el patógeno en esta última. Además, el análisis de metabolitos primarios, de compuestos redox, de la actividad enzimática y del perfil de fitohormonas, mostró la capacidad de estas cepas para reducir el impacto del patógeno en las plantas de tomate, dando explicación al incremento de la biomasa y de clorofila observados en las plantas tratadas con estas cepas expuestas al patógeno.

Por último, el análisis de la tolerancia a estrés hídrico mostró la capacidad de estas cepas para promover el crecimiento de las plantas de *A. thaliana* en condiciones de sequía mediante el incremento de la biomasa aérea y radicular probablemente asociado a la formación de *biofilm* y producción de exopolisacárido y en la interferencia en el balance de fitohormonas de crecimiento y estrés.

Summary

Agricultural industry is reaching a limit due to the excessive use of chemical fertilizers to increase production, and pesticides in the fight against phytopathogens. On the other hand, the climate change challenges generate a hostile environment for the plant in terms of abiotic stress, namely salinity and drought. Numerous studies have shown the plant growth promoting activity (PGP) bacteria benefits in agriculture under biotic and abiotic stress. On the other hand, there is experimental evidence that quorum sensing (QS) communication systems are widespread among prokaryotic organisms, and that AHL molecules control numerous virulence factors in them. Therefore, this chapter analysed the ability of *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 and *P. segetis* P6 strains to promote tomato plants growth and to reduce the damage caused by the pathogens *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, as well as its ability to promote growth in conditions of drought stress.

In order to establish the ideal parameters for interference tests on pathogenicity in fruits and plants, the infective dose of the different phytopathogens was established using the model plant *Arabidopsis thaliana* Col-0. Likewise, a test was carried out with this model plant to determine the ability of these strains to inhibit the virulence of the five phytopathogens through cocultures using different concentrations of them. Based on the results obtained, 1% (v/v) pathogen cocultures were used for virulence interference tests in *A. thaliana* plants with *P. syringae* pv. *tomato*, in pears with *E. amylovora*, in potatoes with *D. solani* and with *P. atrosepticum* and in carrots with *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

The results from the treatment of *A. thaliana* seedlings with the cocultures between the three strains and *P. syringae* pv. *tomato* showed a considerable decrease in the damage produced by this pathogen compared to those treated with this in monoculture. As for the trials on potatoes, pears and carrots, *P. segetis* P6 strain was the only one that managed to completely inhibit the virulence of all phytopathogens in coculture. For its part, *S. equorum* EN21 strain considerably reduced the damage caused by *D. solani* in potatoes and by *E. amylovora* in pears. In the case of *P. castrilensis* N3 strain, it showed an activity very similar to that of the *S. equorum* EN21 strain, except that it also completely inhibited the virulence of *D. solani* in potatoes.

With regard to trials on tomato plants, all strains reduced the pathogenicity of *P. syringae* pv. *tomato* when applied by previous irrigation or by co-cultivation, observing a reduction in the AHLs produced by the pathogen in the latter. In addition, the analysis of primary metabolites, redox compounds, enzymatic activity and phytohormone profiling, showed the ability of these strains to reduce the impact of the pathogen on tomato plants, explaining the increase in biomass and chlorophyll observed in plants treated with these strains and exposed to the pathogen.

Finally, the analysis of drought stress tolerance showed the ability of these strains to promote the growth of *A. thaliana* plants under drought conditions by increasing the aerial and root biomass probably associated with biofilm formation and exopolysaccharide production and with the interference in the growth and stress phytohormones balance.

En este capítulo se analizó la capacidad de las cepas *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* EN21 y *Pseudomonas segetis* P6 para reducir los daños ocasionados por los patógenos *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en sus respectivos hospedadores mediante ensayos en frutos, tubérculos y raíces, así como para promover el crecimiento de las plantas de tomate y controlar los daños causados por *P. syringae* pv. tomato DC3000. Por otra parte, se analizó su capacidad para promover la tolerancia al estrés hídrico en plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0.

1. Interferencia en la patogenicidad en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Con el fin de evaluar la patogenicidad *in vivo* de *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. tomato DC3000, se realizó un ensayo en plantas de *A. thaliana* Col-0 empleando placas *microtiter* de 96 pocillos mediante diluciones seriadas en agua destilada estéril de los distintos fitopatógenos.

Tras 48 horas de la infección de las plántulas de *A. thaliana* con los distintos fitopatógenos, se estableció la dosis infectiva en la concentración de patógeno inmediatamente superior a aquella en la que se observó una supervivencia igual o superior al 50% de las plántulas. En todos los ensayos se estableció la dosis infectiva en la dilución 10^{-6} (Fig. 54), salvo en el caso de *D. solani* que se fijó en 10^{-7} . Teniendo en cuenta que inicialmente los cultivos de los patógenos tenían una concentración de 10^9 UFC/mL en todos los casos, la dosis infectiva para *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. tomato DC3000 se estableció en 10^3 UFC/mL, mientras que fue de 10^2 UFC/mL para *D. solani*.

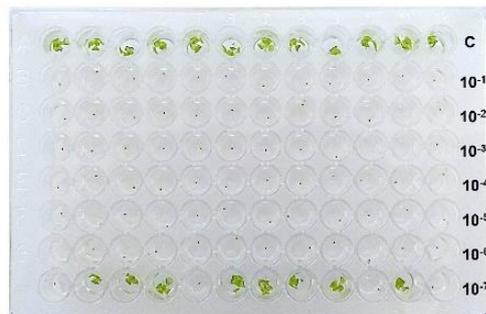


Figura 54. Determinación de la dosis infectiva de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en plantas de *A. thaliana* Col-0. C, plantas control tratadas con agua destilada estéril.

Una vez establecida la dosis infectiva de cada patógeno se evaluó la capacidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para inhibir su virulencia en plántulas de *A. thaliana* Col-0 realizando cocultivos al 1:100, 5:100 y 10:100 (patógeno/ cepa PGP-QQ). Como control positivo, se emplearon diluciones de cada patógeno en la misma proporción que los cocultivos.

Los resultados obtenidos tras 48 horas de incubación mostraron que las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 resultaron inocuas para las plántulas de *A. thaliana* y se comprobó la virulencia de los cinco fitopatógenos a las tres concentraciones ensayadas. En el caso de los cocultivos entre los fitopatógenos y las cepas QQ-PGP, se observó una inhibición total de la virulencia en los cocultivos entre las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 con todos los patógenos (Fig. 55A y 55B) a todas las concentraciones ensayadas. La interferencia en la virulencia de los cocultivos de los fitopatógenos con la cepa *P. castrilensis* N3 fue igualmente efectiva, aunque no fue suficiente para evitar la mortalidad de las plántulas cuando se trataron con los cocultivos de los patógenos al 10%.

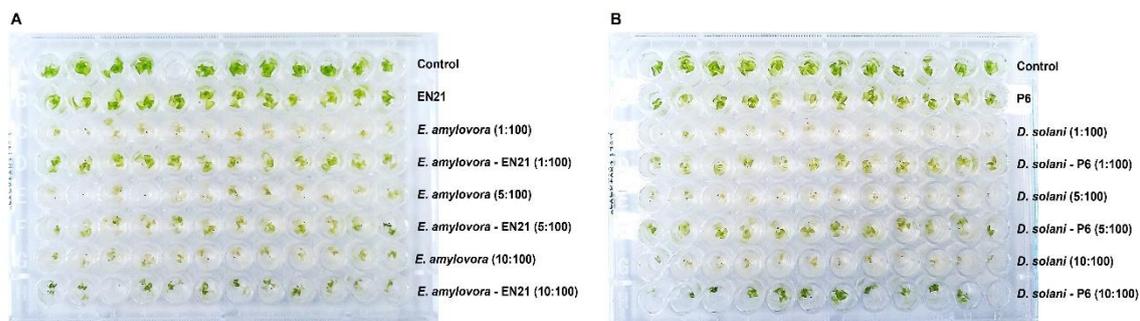


Figura 55. Evaluación de la interferencia en la patogenicidad en plantas de *A. thaliana* Col-0 mediante cocultivos P6 a distintas concentraciones de patógeno. A, cocultivo de cepa *S. equorum* EN21 y *E. amylovora*; B, cocultivo de la cepa *P. segetis* P6 y *D. solani*.

Por otra lado, se realizó un ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 mediante cocultivo con las cepas PGP-QQ en placas de 6 pocillos empleando plántulas de *A. thaliana* Col-0 de mayor tamaño.

Una vez transcurridas 48 horas de la infección con los distintos tratamientos, se detectó una ligera disminución de la pigmentación en las plántulas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 con respecto al control tratadas con agua destilada (Fig. 56), mientras que se observó una elevada disminución en aquellas tratadas con el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 en monocultivo, así como signos de degradación tisular. En cambio, las plantas tratadas con los cocultivos mostraron un mejor estado, aunque se observó una ligera pérdida de pigmentación, siendo más acusada en el cocultivo con la cepa *P. castrilensis* N3.

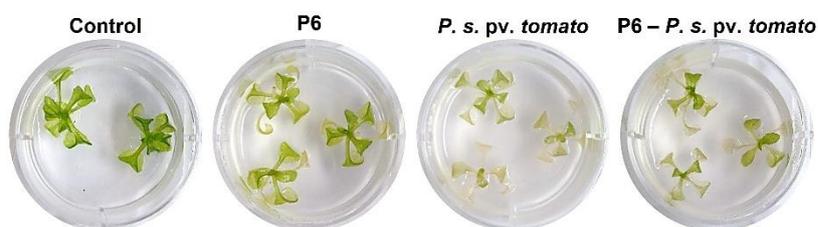


Figura 56. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en *A. thaliana* Col-0 mediante cocultivo con la cepa *P. segetis* P6 en placas *microtiter* de 6 pocillos empleando agua destilada como control.

Estos resultados fueron corroborados mediante el análisis de la integridad del tejido foliar por microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC), y mediante la determinación de la concentración de clorofila de forma cualitativa mediante microscopía de fluorescencia y de forma cuantitativa tras una extracción con acetona al 80% (v/v) en agua y la posterior determinación espectrofotométrica.

Las micrografías de DIC obtenidas tras analizar las hojas (Fig. 57), mostraban una elevada integridad de las células y del tejido vascular en aquellas plantas tratadas con agua destilada y con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. En las plantas tratadas con el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 se detectó una intensa alteración del tejido foliar en el que se observó que la mayoría de las células habían perdido su morfología. En el caso de las plantas tratadas con los cocultivos, se identificó una notable interferencia en la patogenicidad en base a una menor intensidad y extensión de la alteración de la morfología celular. En cambio, el control de la patogenicidad ejercido por la cepa *P. castrilensis* N3 fue menos efectivo, detectándose zonas extensas de muerte celular en las hojas.

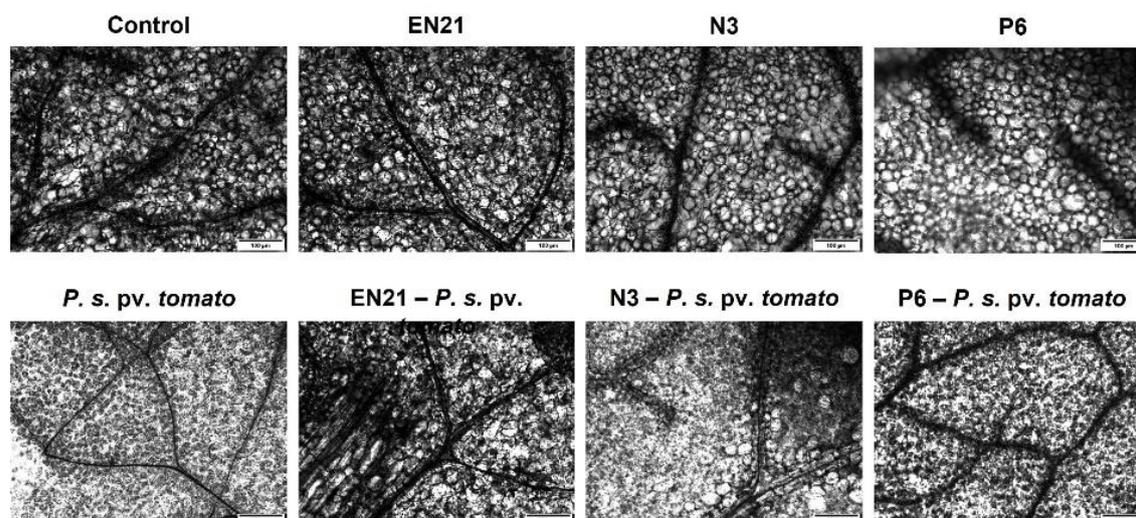


Figura 57. Micrografías de las hojas de *A. thaliana* Col-0 procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 obtenidas mediante microscopía DIC a 100X.

Las micrografías de fluorescencia de las hojas de *A. thaliana* (Fig. 58) tratadas con las cepas PGP-QQ exhibían una elevada cantidad de clorofila, representada por la coloración roja, y se observaron gran cantidad de cloroplastos en los márgenes de cada célula, siendo las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 las que mayor cantidad de clorofila mostraban, a excepción del control. Las plantas tratadas con el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 apenas mostraban clorofila y los cloroplastos eran escasos. Sin embargo, las plantas tratadas con los cocultivos mostraban una mayor cantidad de clorofila en general con respecto a las tratadas con el patógeno en monocultivo, especialmente en aquellas tratadas con los cocultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6, mientras que la interferencia en la patogenicidad ejercida por la cepa *P. castrilensis* N3 fue escasa, lo que se tradujo en una elevada pérdida de clorofila.

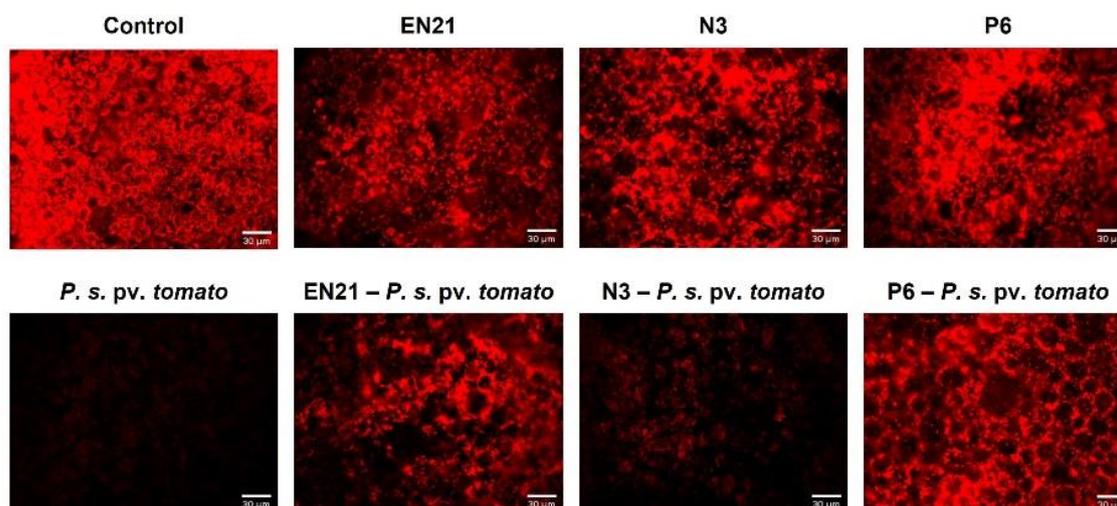


Figura 58. Micrografías de las hojas de *A. thaliana* Col-0 procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 obtenidas mediante microscopía de fluorescencia a 200X.

Estos resultados cualitativos se corroboraron mediante la cuantificación de clorofila total por espectrofotometría aplicando las fórmulas de Arnon (Arnon, 1949) y Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987). Los resultados de la cuantificación de clorofila fueron muy similares tras aplicar ambas fórmulas para su cálculo (Fig. 59A y 59B). Estos muestran una elevada concentración de clorofila en las plantas tratadas con agua destilada, mientras que se observó una reducción del 87% en las tratadas con el patógeno *P.*

syringae pv. tomato DC3000. Las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 mostraron concentraciones de clorofila inferiores a las plantas control, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 y las plantas control.

En cuanto a la concentración de clorofila en los cocultivos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al patógeno en todos los casos, salvo en el cocultivo con la cepa *P. castrilensis* N3 cuando se aplicó la fórmula de Arnon (Fig. 59B). Las plantas tratadas con el cocultivo de la cepa *S. equorum* EN21 y con el cocultivo de la cepa *P. segetis* P6 mostraban un 385% y un 445% más de clorofila, respectivamente, que aquellas tratadas con el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 en monocultivo. Este valor fue del 73% en las plantas tratadas con el cocultivo de la cepa *P. castrilensis* N3.

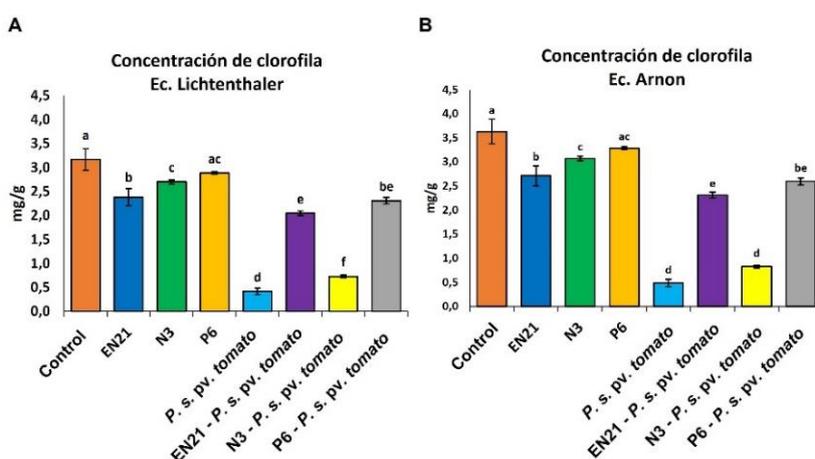


Figura 59. Determinación de la concentración de clorofila por espectrofotometría en las plantas de *A. thaliana* Col-0 tratadas con los monocultivos de las cepas de estudio y los cocultivos de estas con el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000. **A**, concentración calculada por la ecuación de Lichtenthaler; **B**, concentración calculada por la ecuación de Arnon. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n = 10$).

2. Interferencia en la patogenicidad de la bacteria *E. amylovora* en peras

Para evaluar la capacidad de las tres cepas PGP-QQ para interferir en la virulencia del patógeno *E. amylovora*, se realizó un ensayo de infección en peras (*Pyrus communis*) cv. Blanquilla, uno de sus principales hospedadores, mediante incisión aplicando suspensiones de los cocultivos. Como controles se utilizaron agua destilada estéril y una suspensión del patógeno (10^9 UFC/mL) en agua destilada.

Transcurridas 48 horas de la aplicación de los tratamientos, las peras tratadas con el patógeno en monocultivo mostraban los primeros síntomas de maceración característicos del fuego bacteriano causado por *E. amylovora*, mientras que el resto de las peras no mostraban signos de infección más allá de la oxidación del tejido expuesto al aire en las incisiones (Fig. 60A).

Posteriormente, a las 72 horas del tratamiento, las peras inoculadas con agua destilada y con las suspensiones de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 no mostraban daño alguno (Fig. 60B). En cambio, la maceración y la producción de exudados se extendió por casi toda la superficie en las peras tratadas con el patógeno en monocultivo. La cepa *P. segetis* P6 en cocultivo con el patógeno inhibió completamente estos síntomas, mientras que las peras tratadas con los cocultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 con *E. amylovora* mostraron una gran reducción de la maceración de las peras.

El porcentaje de maceración se calculó midiendo el área de tejido dañado con respecto al área total en las peras de todos los tratamientos que mostraban signos de infección empleando el *software* ImageJ.

El porcentaje de maceración en las peras tratadas con *E. amylovora* fue del 93,8% mientras que el cocultivo con la cepa *S. equorum* EN21 y con la cepa *P. castrilensis* N3 redujeron el porcentaje de maceración hasta valores del 7,7% y del 18,1%, respectivamente. En el caso del cocultivo con la cepa *P. segetis* P6, la inhibición de la maceración fue total (Fig. 60C). En todos los casos, el análisis mostró diferencias estadísticamente significativas entre las peras tratadas con el patógeno en monocultivo y aquellas tratadas con el patógeno en cocultivo con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3. Por otra parte, el análisis de AHLs remanentes de los cocultivos mediante difusión en placa mostró una degradación completa de las AHLs producidas por *E. amylovora* (Fig. 60D).

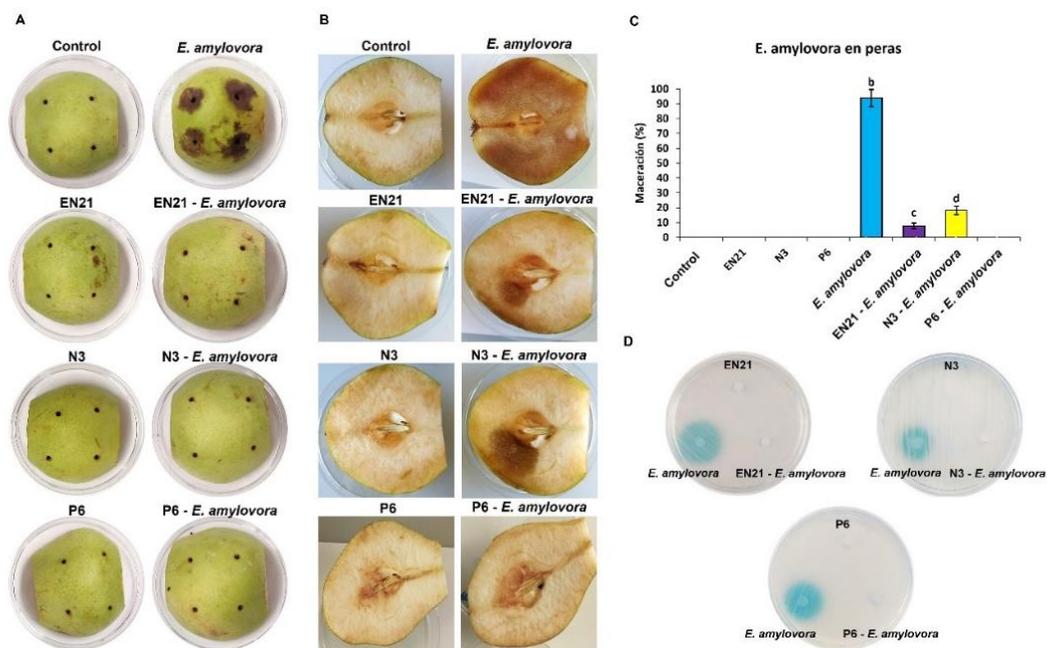


Figura 60. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de *E. amylovora* en peras (*P. communis* cv. Blanquilla) mediante cocultivo con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, evaluación de síntomas tras 48 horas de incubación; **B**, evaluación de síntomas transcurridas 72 horas del tratamiento; **C**, porcentaje de maceración en peras tras el ensayo de interferencia en la patogenicidad de *E. amylovora*; **D**, determinación de AHLs remanentes tras el cocultivo mediante un ensayo de difusión en placas de AB-Xgal empleando *A. tumefaciens* NTL4 como biosensor. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n=5$).

3. Interferencia en la patogenicidad de *D. solani* en patatas

Con el objetivo de determinar si la interferencia del *quorum sensing* del fitopatógeno *D. solani* por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 afectaba a su patogenicidad, se realizó un ensayo en rodajas de patata (*S. tuberosum* cv. Monalisa) mediante incisión empleando suspensiones en agua destilada de cada mono o cocultivo. Como controles se utilizaron agua destilada y una suspensión de *D. solani* (10^9 UFC/mL) procedente de un cultivo de 24 horas.

Tras 48 horas de la aplicación de los tratamientos, se observaron los signos característicos de la podredumbre blanda producida por *D. solani* en aquellas rodajas de patata que fueron tratadas con el patógeno en monocultivo (Fig. 61A). En cambio, las patatas inoculadas con agua destilada y con las cepas PGP-QQ no mostraron ningún signo de daño tisular. Las patatas tratadas con los cocultivos

realizados con el patógeno y las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, mostraron una inhibición total de la patogenicidad de este y no se observó ningún daño tisular, mientras que el cocultivo con la cepa *S. equorum* EN21 mostró un ligero oscurecimiento en la zona próxima a las incisiones que se tornaron en zonas de maceración causada por *D. solani* transcurridas 24 horas más. El resto de las patatas mantuvieron su estado tras 24 horas más de incubación.

Las rodajas de patata tratadas con *D. solani* en monocultivo mostraron un porcentaje de maceración del 26,3%, mientras que el cocultivo del patógeno con la cepa *S. equorum* EN21 dio lugar a un porcentaje de maceración del 5,8%. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos (Fig. 61B). En cuanto al análisis de AHLs remanentes en los cocultivos, se observó una degradación parcial de las AHLs producidas por el patógeno, siendo más acusada en el cocultivo con la cepas *S. equorum* EN21 (Fig. 61C).

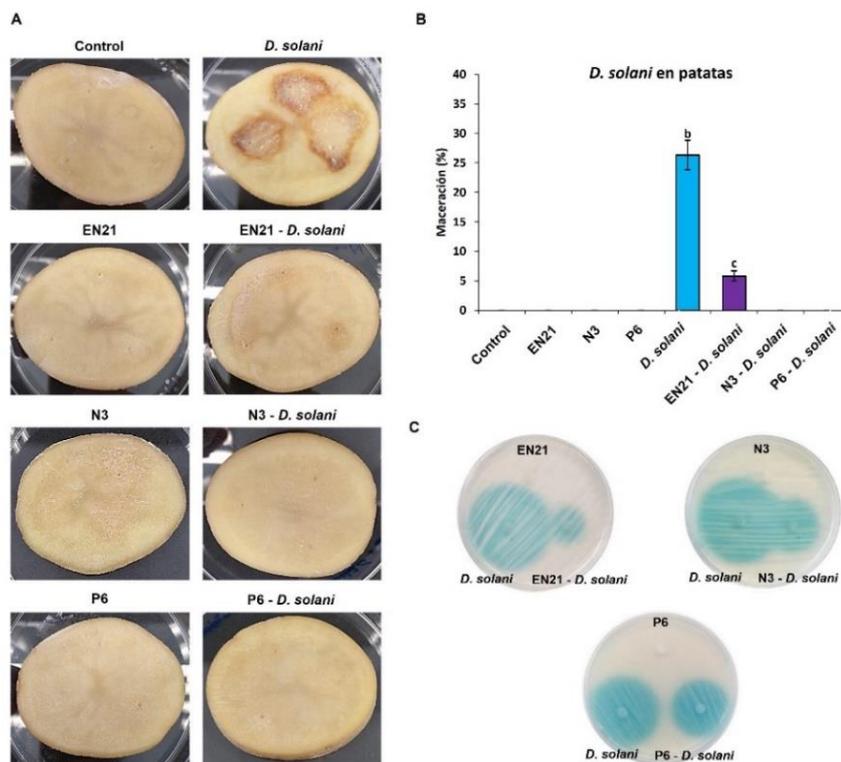


Figura 61. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de *D. solani* en patatas (*S. tuberosum* cv. Monalisa) mediante cocultivo con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, evaluación de síntomas tras 48 horas de incubación; **B**, porcentaje de maceración en patatas tras el ensayo de interferencia en la patogenicidad de *D. solani*; **C**, determinación de AHLs remanentes tras el cocultivo mediante un ensayo de difusión en placas de AB-Xgal empleando *A. tumefaciens* NTL4 como biosensor. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n=5$).

4. Interferencia en la patogenicidad de *P. atrosepticum* en patatas

El efecto de la actividad *quorum quenching* de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en la virulencia de *P. atrosepticum* se estudió en rodajas de patata (*S. tuberosum* cv. Monalisa) siguiendo el mismo protocolo empleado en el ensayo con *D. solani*. Como controles se utilizaron agua estéril y una suspensión de *P. atrosepticum* (10^9 UFC/mL) procedente de un cultivo de 24 horas.

Transcurridas 48 horas de la inoculación de las patatas se detectaron signos de maceración y crecimiento bacteriano en las rodajas tratadas con *P. atrosepticum*, síntomas característicos de la podredumbre blanda causada por este patógeno en los tubérculos de patata (Fig. 62A). En cambio, las patatas tratadas con agua destilada o con las suspensiones de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, no mostraron signos de degradación tisular.

En cuanto a las patatas tratadas con los cocultivos, la cepa *P. segetis* P6 consiguió inhibir completamente la patogenicidad de *P. atrosepticum*, mientras que aquellas tratadas con los cocultivos entre las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 y el patógeno mostraban signos de infección. No obstante, la patogenicidad de *P. atrosepticum* se vio reducida en las patatas tratadas con estos cocultivos, ejerciendo un control parcial de la podredumbre blanda.

El porcentaje de maceración calculado mostró un valor del 65,5% en las patatas tratadas con *P. atrosepticum* en monocultivo, mientras que fue del 50,3 % y 42,8% en aquellas tratadas con los cocultivo entre las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 y el patógenos, respectivamente. El análisis estadístico del porcentaje de maceración mostró diferencias significativas entre las patatas tratadas con los cocultivos y aquellas tratadas con el patógeno en monocultivo (Fig. 62B). Con respecto a la determinación de AHLs remanentes en los cocultivos con *P. atrosepticum* se detectó una degradación parcial en todos los casos, siendo las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 las que produjeron una mayor degradación (Fig. 62C).

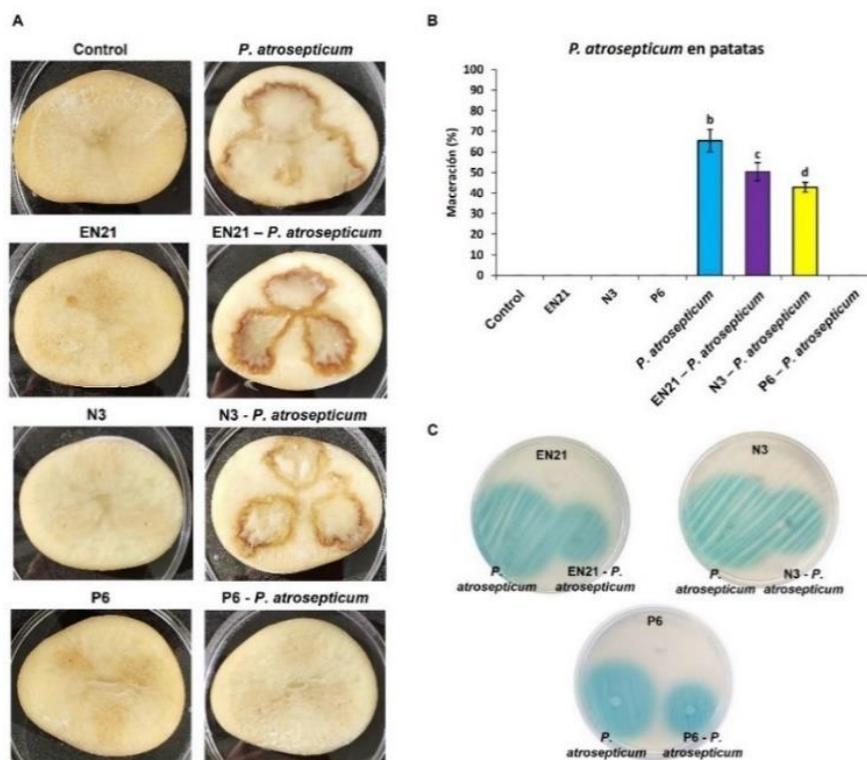


Figura 62. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de *D. solani* en patatas (*S. tuberosum* cv. Monalisa) mediante cocultivo con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, evaluación de síntomas de maceración tras 48 horas de incubación; **B**, porcentaje de maceración en patatas tras el ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. atrosepticum*; **C**, determinación de AHLs remanentes tras el cocultivo mediante un ensayo de difusión en placas de AB-Xgal empleando *A. tumefaciens* NTL4 como biosensor. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n=5$).

5. Interferencia en la patogenicidad de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en zanahorias

Finalmente, se evaluó la interferencia en la patogenicidad de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en zanahorias (*D. carota* cv. Amsterdam 2) mediante la actividad *quorum quenching* de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 empleando cocultivos. Las rodajas de zanahoria se inocularon por incisión empleando suspensiones de las cepas en mono y en cocultivos. Como controles se emplearon agua destilada y una suspensión de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (10^9 UFC/mL) procedente de un cultivo de 24 horas.

Transcurridas 48 horas de incubación, las zanahorias tratadas con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* mostraban signos claros de maceración que se extendía en la mayoría de la superficie. En cambio, las zanahorias tratadas con agua destilada y con las suspensiones de las cepas PGP-QQ, no mostraban daño alguno (Fig. 63A).

En cuanto a los cocultivos, la cepa *P. segetis* P6 ejerció un control total de la patogenicidad de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, no detectándose ningún signo de maceración. En cambio, los cocultivos entre las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, y el patógeno mostraron signos de maceración en las proximidades de las incisiones, aunque en menor magnitud que en las zanahorias tratadas con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en monocultivo.

Los resultados del cálculo del porcentaje de maceración mediante el *software* de imagen ImageJ mostraron que las zanahorias tratadas con el patógeno en monocultivo presentaban valores de maceración del 60,4% (Fig. 63B). En cambio, este valor se redujo hasta el 47,3% y el 49,7% en las zanahorias tratadas con los cocultivos entre las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, y el patógeno respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos. Tras analizar las AHLs remanentes en los cocultivos, se detectó una ligera degradación de las AHLs del patógeno, siendo de mayor grado en los cocultivos con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 (Fig. 63C).

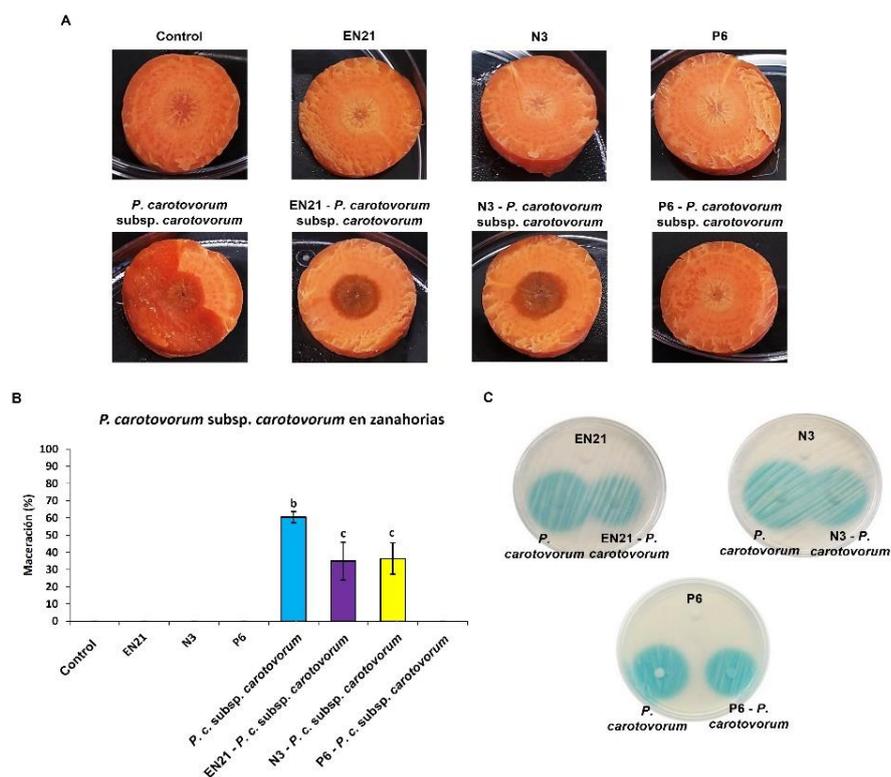


Figura 63. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en zanahorias (*D. carota* cv. Amsterdam 2) mediante cocultivo con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, evaluación de síntomas de maceración tras 48 horas de incubación; **B**, porcentaje de maceración en patatas tras el ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; **C**, determinación de AHLs remanentes tras el cocultivo mediante un ensayo de difusión en placas de AB-Xgal empleando *A. tumefaciens* NTL4 como biosensor. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n=5$).

6. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de tomate en cámara climática Fitotron

Una vez determinada la capacidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para interferir en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en la planta modelo *A. thaliana* con resultados satisfactorios, se procedió a evaluar esta actividad en plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Roma) mediante un ensayo en una cámara climática para el crecimiento de plantas Fitotron®. Para ello se emplearon plantas de tomate de 5 cm sembradas en macetas a las que se aplicaron suspensiones de mono y cocultivos mediante pulverización foliar tal y como se describe anteriormente en material y métodos.

6.1. Evaluación de la incidencia y severidad de la infección

Con el fin de evaluar si las cepas seleccionadas en este estudio tenían la capacidad para reducir los daños ocasionados por este patógeno o bien evitar por completo la infección en plantas de tomate, se analizó la incidencia y la severidad de la infección. Transcurridas 72 horas de la pulverización de los tratamientos se observaron los primeros signos de clorosis y necrosis en las hojas tratadas con el monocultivo del patógeno, síntomas característicos de la mancha negra del tomate producida por *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Fig. 64A). En cambio, las plantas pulverizadas con agua destilada y con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en monocultivo no mostraron signos de daño tisular.

Tras la inspección visual de síntomas se realizó un recuento de hojas vivas, hojas muertas y aquellas que mostraban clorosis y/o necrosis, para determinar la incidencia y severidad de la infección por el patógeno en cada tratamiento.

Las plantas tratadas con agua destilada y con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en monocultivo mostraron un porcentaje de hojas muertas del 4,0%, 8,6%, 4,8% y 12,2%, respectivamente, mientras que no se observaron hojas con necrosis o clorosis (Fig. 64B). En cambio, las plantas tratadas con el patógeno mostraban una elevada afectación con un 25,4% de hojas muertas y un 42,6% de hojas que mostraban signos de infección. En cuanto a las plantas tratadas con los cocultivos, la cepa *S. equorum* EN21 ejerció un control más efectivo de la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 reduciendo el porcentaje de hojas muertas y de hojas con clorosis y/o necrosis a valores del 6,1% y del 15,3%, respectivamente (Fig. 64B). Las plantas tratadas con el cocultivo de la cepa *P. castrilensis* N3 mostraron un porcentaje de hojas muertas del 24%, un valor muy similar al obtenido en las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo, aunque el porcentaje de hojas que mostraban signos de infección se redujo ligeramente a un valor del 33,7%. Por último, el porcentaje de hojas muertas de las plantas tratadas con el cocultivo de la cepa *P. segetis* P6 fue del 26,6% y mientras que el de hojas que mostraban signos de clorosis y/o necrosis fue del 17,7%, lo que redujo considerablemente el cómputo global de hojas afectadas en comparación con el patógeno en monocultivo.

Por otra parte, la determinación de AHLs remanentes mediante un ensayo de difusión en placa mostró una degradación total de estas moléculas en los cocultivos entre el patógenos y cada de las cepas (Fig. 64C).

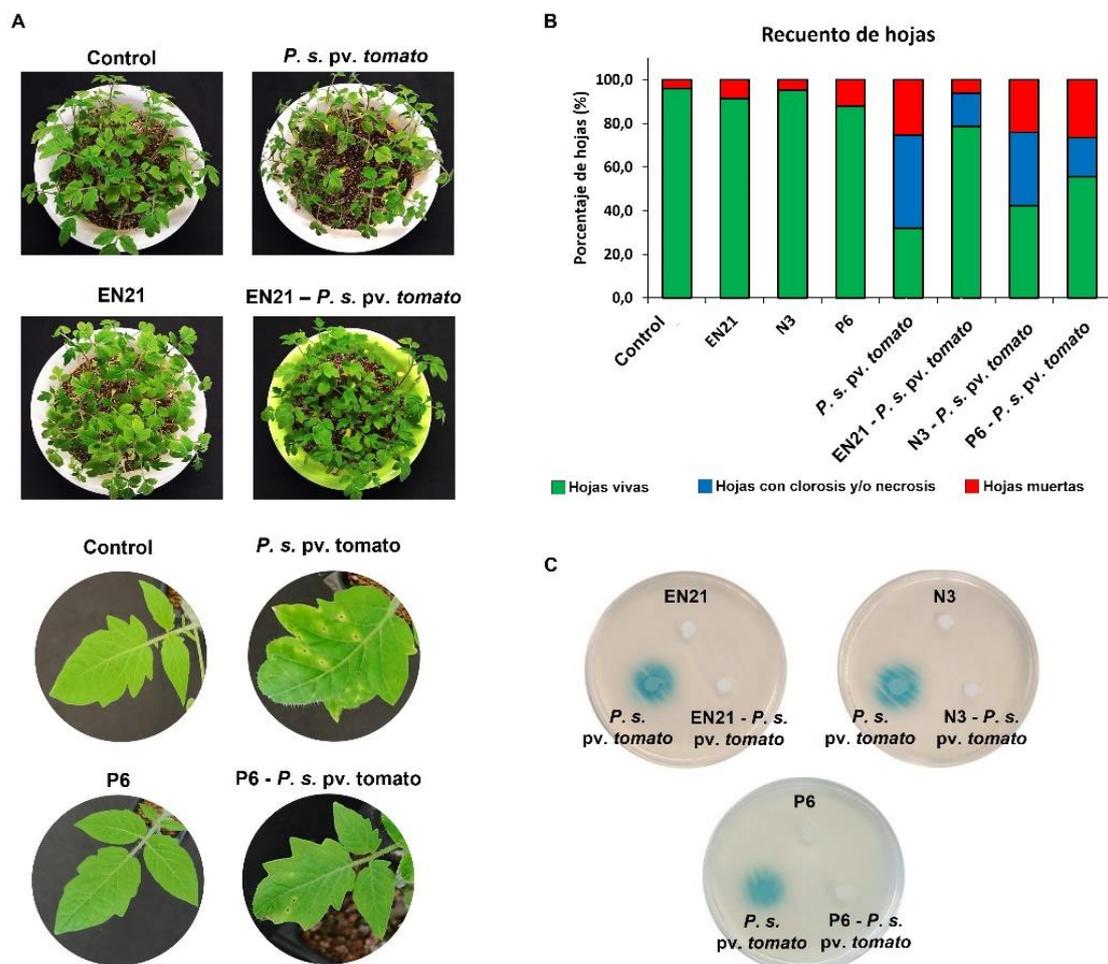


Figura 64. Ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de tomate (*S. lycopersicum* var. Roma) mediante cocultivo con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, detalle de la sintomatología detectada en las plantas tratadas con los cocultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6; **B**, recuento de hojas de tomate sanas y con síntomas de infección por *P. syringae* pv. tomato DC3000; **C**, determinación de AHLs remanentes tras los cocultivos mediante un ensayo de difusión en placas de AB-Xgal empleando *A. tumefaciens* NTL4 como biosensor.

Tras analizar visualmente los daños producidos por *P. syringae* pv. tomato DC3000 de forma cualitativa, se evaluó el efecto que tuvo en la biomasa de las plantas pulverizadas con cada tratamiento.

Los resultados obtenidos tras el secado y pesado de las plantas, mostraban valores muy similares en aquellas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 en monocultivo. En cambio, se observó un aumento de la biomasa aérea en las plantas pulverizadas con la cepa *P. segetis* P6 en monocultivo, siendo estadísticamente significativo. El peso seco de la parte aérea de las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo fue inferior en comparación con todos los tratamientos, tanto mono como cocultivos, dando lugar a diferencias significativas (Fig. 65).

En cuanto al peso seco de la parte radicular, se observó un incremento en las plantas pulverizadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 en monocultivo con respecto a las plantas tratadas con agua. En el caso de las plantas tratadas con los cocultivos, se observaron diferencias significativas en el peso de la raíz de aquellas tratadas con los cocultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 con el patógeno con respecto al tratamiento en monocultivo del patógeno. Considerando el peso de la parte aérea y radicular en conjunto, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas tratadas con los cocultivos de las tres cepas PGP-QQ y aquellas tratadas con *P. syringae* pv. tomato DC3000 en monocultivo. Además, las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 en monocultivo mostraron un ligero incremento en la biomasa en comparación con las plantas control tratadas con agua destilada (Fig. 65).

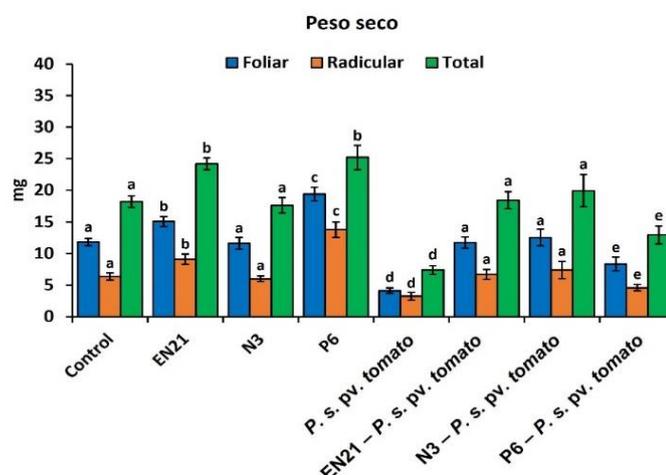


Figura 65. Determinación del peso seco (mg) en plantas de tomate tras la pulverización con los mono y cocultivos de *P. syringae* pv. tomato DC3000 y las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n = 20$).

6.2. Determinación de la concentración de clorofila

Tras analizar la incidencia y severidad de la infección de *P. syringae* pv. tomato DC3000, se realizó un análisis de la clorofila de las hojas de cada tratamiento de forma cualitativa mediante microscopía DIC y de fluorescencia UV, así como de forma cuantitativa mediante extracción con acetona y posterior determinación por espectrofotometría aplicando las fórmulas de Lichtenthaler y Arnon.

Las micrografías obtenidas por DIC y fluorescencia UV de las hojas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en monocultivo mostraban una apariencia muy similar, con un elevado número de cloroplastos y sin daños visibles en el tejido. En contraste, se detectó una caída importante de la concentración de clorofila en las micrografías de fluorescencia de las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo, así como zonas de baja densidad tisular en las obtenidas por microscopía DIC (Fig. 66). En cuanto a las hojas tratadas con los cocultivos entre el patógeno y las cepas PGP-QQ no se observó daño tisular, sin embargo, se detectó una disminución de clorofila, siendo más acusada en aquellas tratadas con el cocultivo entre la cepa *P. segetis* P6 y el patógeno.

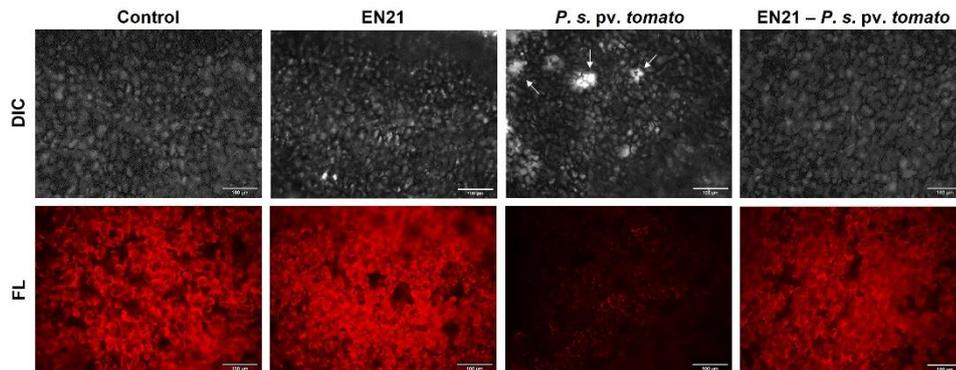


Figura 66. Micrografías de las hojas de tomate procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 por parte de la cepa *S. equorum* EN21 obtenidas mediante microscopía DIC (arriba) y de fluorescencia UV (abajo) a 200X. Las flechas indican zonas de baja densidad tisular.

Los resultados de la cuantificación de clorofila estaban en consonancia con los observados mediante microscopía, y mostraban valores muy inferiores en aquellas plantas tratadas con el patógeno, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas control tratadas con agua destilada y aquellas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3. En cambio, las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 mostraban un ligero incremento de la concentración de clorofila (Fig. 67).

En cuanto a los cocultivos, las plantas tratadas con el patógeno en presencia de la cepa *S. equorum* EN21 mostraron los valores más elevados de clorofila, al igual que en aquellas plantas tratadas con el cocultivo entre el patógeno y la cepa *P. castrilensis* N3. En el caso del cocultivo entre la cepa *P. segetis* P6 y el patógeno, se obtuvieron valores más bajos que los demás cocultivos, pero superiores a los de las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo. Tras calcular la concentración mediante la fórmula de Lichtenthaler, se encontraron diferencias significativas con respecto a las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo.

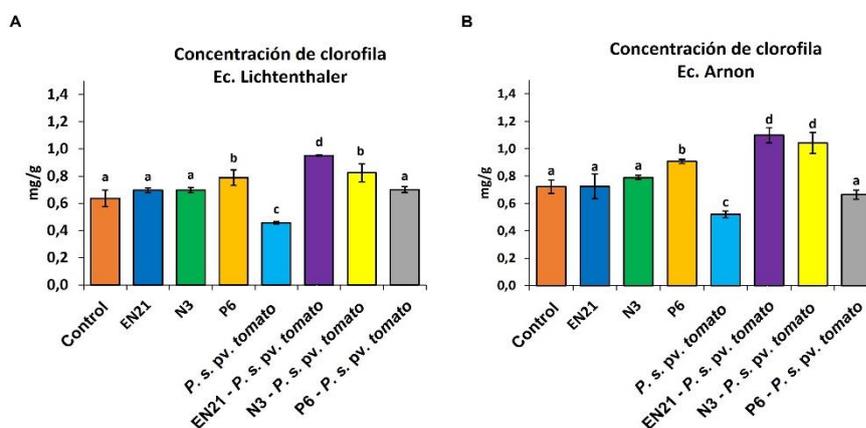


Figura 67. Determinación de la concentración de clorofila total en plantas de tomate tratadas con los mono y cocultivos de las

cepas de estudio por espectrofotometría. **A**, concentración aplicando la fórmula de Lichtenthaler; **B**, concentración aplicando la fórmula de Arnon. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, $n = 10$).

7. Ensayos de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de tomate en condiciones de invernadero

Con el fin de comprobar el comportamiento *in vivo* de las cepas PGP-QQ en cuanto al control de la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de tomate, se realizó un ensayo en condiciones de invernadero en las instalaciones de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC (EEZ-CSIC).

En estos ensayos se emplearon plantones adultos sembrados individualmente en macetas y se realizaron dos enfoques de tratamiento:

- Irrigación radicular de las cepas PGP-QQ y posterior pulverización del patógeno.

Las plantas se regaron con 5 mL de una suspensión de cada cepa en agua destilada estéril semanalmente durante 4 semanas y posteriormente se pulverizó una suspensión del patógeno. Este enfoque se utilizó para determinar el efecto PGP de las cepas en las plantas de tomate y para evaluar la implicación de la activación de los sistemas de defensa de la planta en el control de la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000.

- Pulverización de cocultivos entre las cepas PGP-QQ y el patógeno

Las plantas se trataron mediante pulverización foliar con suspensiones en agua destilada de los cocultivos entre las cepas PGP-QQ y *P. syringae* pv. tomato DC3000. Este tipo de tratamiento se utilizó para determinar si el control de la patogenicidad se debía a la actividad *quorum quenching* de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6, así como para evaluar los efectos en las etapas tempranas de la interacción planta-cepa PGP-QQ.

Como controles se utilizaron agua destilada estéril y una suspensión de *P. syringae* pv. tomato DC3000 (10^9 UFC/mL) y en todos los casos se determinaron los siguientes parámetros:

7.1. Determinación de biomasa y contenido en clorofila y de parámetros de incidencia y severidad de la infección

Las plantas que se sometieron a los diferentes tratamientos explicados anteriormente durante 7 días se recolectaron y se determinó la biomasa y el contenido en clorofila, y se analizó la incidencia y severidad del patógeno en los dos bloques de tratamientos.

Como se puede observar en la imagen 68, las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. (Fig. 68B, 68D y 68D) mostraban un elevado crecimiento con respecto a las plantas control tratadas con agua destilada (Fig. 68A). En cambio, las plantas tratadas con el patógeno mostraban una disminución en la densidad foliar (Fig. 68E), mientras que aquellas irrigadas con las tres cepas y posteriormente pulverizadas con el patógeno no mostraron cambios significativos en la densidad foliar (Fig. 68F, 68G y 68H).

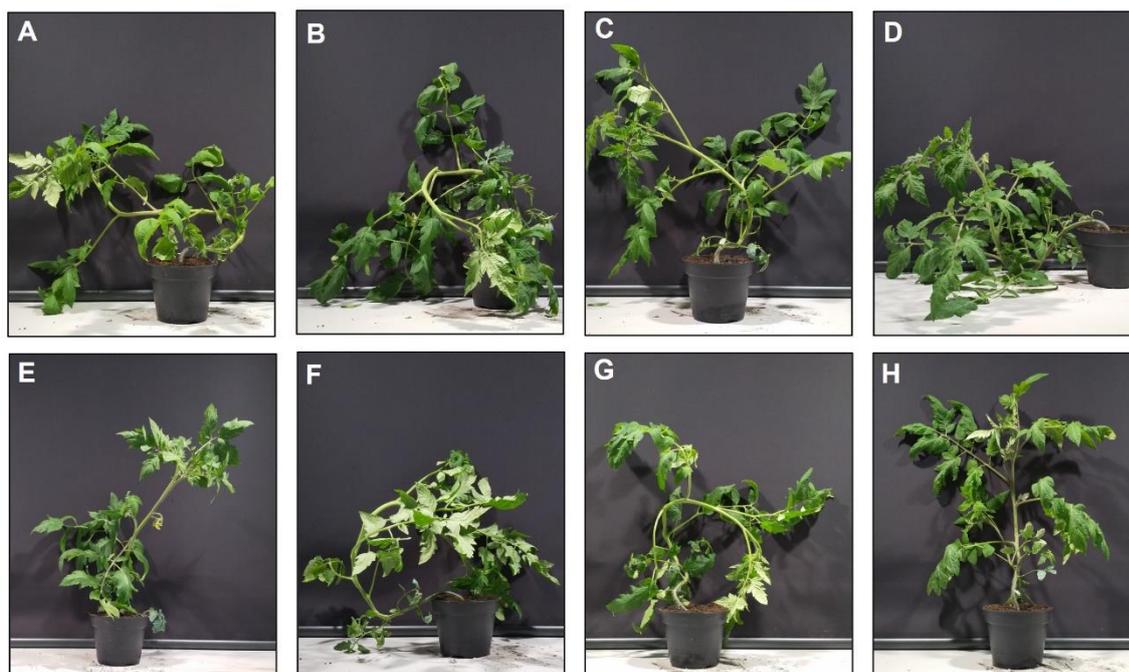


Figura 68. Detalle de la sintomatología detectada en las plantas de tomate tratadas con el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 mediante irrigación previa con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, control con agua destilada; **B**, *S. equorum* EN21; **C**, *P. castrilensis* N3; **D**, *P. segetis* P6; **E**, *P. syringae* pv. tomato DC3000; **F**, *S. equorum* EN21 - *P. syringae* pv. tomato DC3000; **G**, *P. castrilensis* N3 - *P. syringae* pv. tomato DC3000; **H**, *P. segetis* P6 - *P. syringae* pv. tomato DC3000

Con respecto a las plantas del bloque tratadas por pulverización de los cocultivos, no se observaron cambios significativos entre las plantas pulverizadas con cada una de las cepas PGP-QQ (Fig. 69B, 69C y 69D) con respecto a las plantas control pulverizadas con agua (Fig. 69A). En cambio, las plantas pulverizadas con el patógeno en monocultivo mostraban un elevado descenso en la cantidad de hojas, así como un notable cambio de coloración de estas (Fig. 69E). Por el contrario, en las plantas tratadas con los cocultivos entre el patógeno y cada una de las cepas se pudo observar una mayor densidad foliar y no se apreciaron cambios de color en las hojas (Fig. 69F, 69G y 69H).

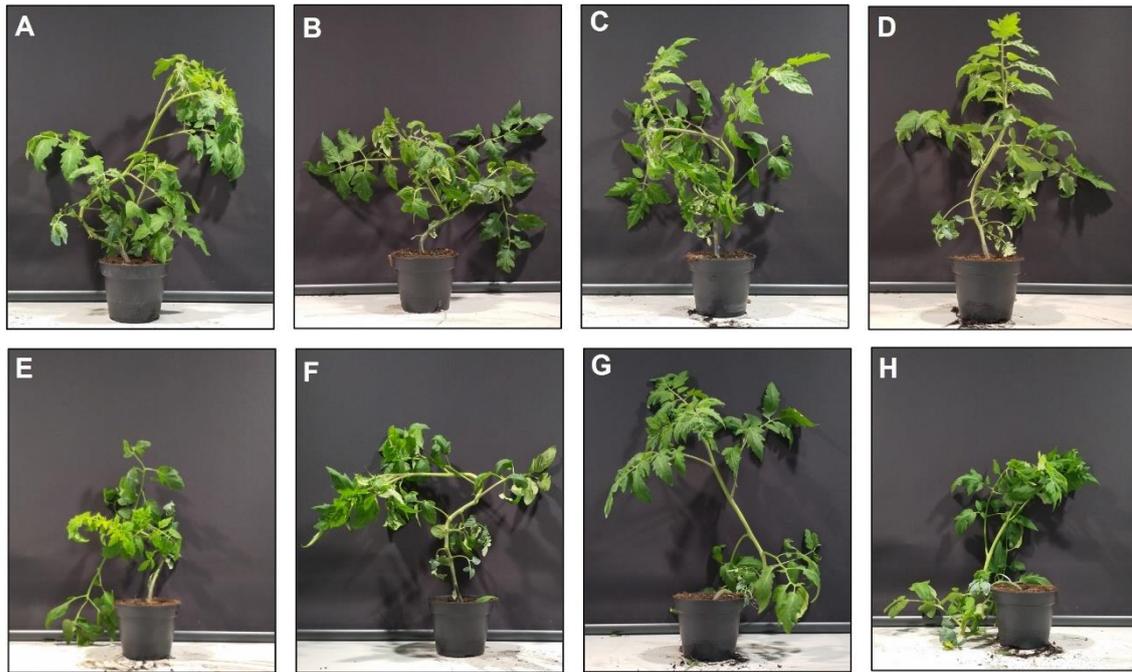


Figura 69. Detalle de la sintomatología detectada en las plantas de tomate tratadas con los cocultivos entre el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 y las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, control con agua destilada; **B**, *S. equorum* EN21; **C**, *P. castrilensis* N3; **D**, *P. segetis* P6; **E**, *P. syringae* pv. tomato DC3000; **F**, *S. equorum* EN21 - *P. syringae* pv. tomato DC3000; **G**, *P. castrilensis* N3 - *P. syringae* pv. tomato DC3000; **H**, *P. segetis* P6 - *P. syringae* pv. tomato DC3000.

En cuanto al análisis de la biomasa aérea, las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostraron un incremento significativo con respecto a las plantas control tratadas con agua, como ya se describió en la sección correspondiente del capítulo 3. Por otra parte, aunque se observó una reducción significativa de la biomasa aérea en las plantas irrigadas con las cepas y posteriormente pulverizadas con el patógeno, la biomasa de estas siempre fue significativamente superior a las plantas control tratadas únicamente con el patógeno (Fig. 70A). Por otro lado, la biomasa radicular mostró un incremento significativo en las plantas irrigadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 con respecto al control, así como un descenso significativo en aquellas pulverizadas con el patógeno, aunque este parámetro fue significativamente superior en las plantas irrigadas con las cepas y posteriormente pulverizadas con el patógeno. (Fig. 70A)

Con respecto a las plantas tratadas con los cocultivos, se observó un ligero incremento en la biomasa aérea de las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 en monocultivo con respecto al control. Aquellas plantas tratadas con el patógeno en monocultivo mostraron una reducción significativa respecto a la biomasa aérea, mientras que este parámetro fue significativamente superior en las plantas tratadas con los cocultivos entre cada una de las cepas y el patógeno en comparación con aquellas tratadas con este en monocultivo (Fig. 70B). En cuanto a la biomasa radicular, no se observaron cambios significativos entre los distintos tratamientos y las plantas control tratadas con agua, salvo en el caso de aquellas pulverizadas con el patógeno en monocultivo, en las que se detectó una disminución significativa (Fig. 70B).

La determinación de la concentración de clorofila total mostró un ligero y significativo aumento en las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6 con respecto al control tratado con agua destilada. Con respecto a la concentración de clorofila en las plantas en presencia del patógeno, aquellas tratadas únicamente con este, mostraron una reducción significativa de la concentración, mientras que se

observó un incremento significativo en las plantas irrigadas previamente con las cepas y pulverizadas con el patógeno. Este incremento alcanzó valores próximos a sus respectivos controles sin tratar con el patógeno, así como a las plantas control tratadas con agua (Fig. 70C).

Similares resultados se obtuvieron en las plantas del bloque de cocultivo, con una disminución considerable de la concentración de clorofila total en las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo con respecto a las plantas control tratadas con agua destilada, y un incremento significativo en aquellas tratadas con los cocultivos con respecto a las plantas tratadas únicamente con el patógeno. Así la concentración de clorofila en las plantas tratadas con los cocultivos entre las cepas y el patógeno no mostró diferencias significativas con sus respectivos controles en monocultivo o con las plantas tratadas con agua, salvo en el caso del cocultivo con la cepa *P. segetis* P6 que mostró una ligera reducción del contenido en clorofila total con respecto a las plantas tratadas con la misma cepa en monocultivo (Fig. 70D).

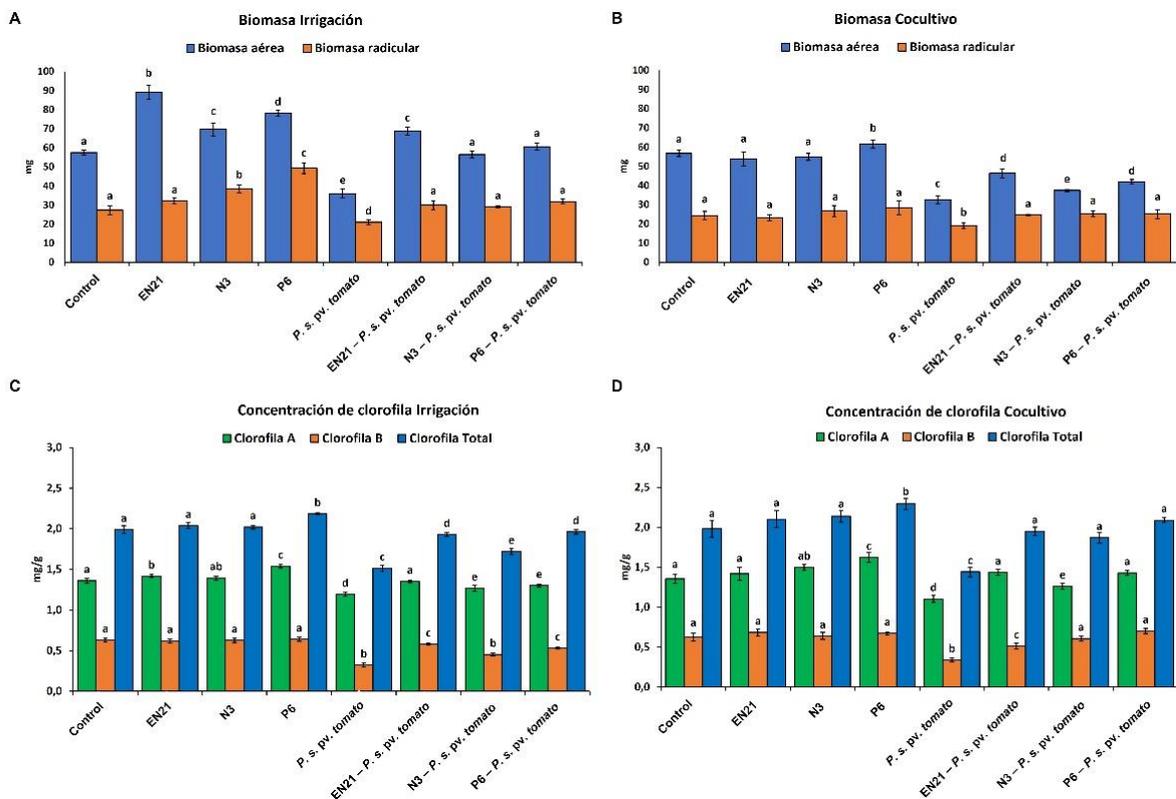


Figura 70. Análisis de biomasa y contenido en clorofila en las plantas de tomate tras el irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. **A**, estudio de la biomasa aérea y radicular (peso fresco); **B**, determinación del contenido en clorofila de las plantas. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, $n_A = 10$; $n_B = 5$).

Tras analizar la incidencia del patógeno en las plantas de tomate, se estableció la siguiente escala de daños para evaluar los efectos de este en la planta: 0= planta sana o sin síntomas; 1= planta afectada en 1-33%; 2= 34-66%; 3= 67-99%; 4= planta muerta.

En ningún caso se observaron plantas que tuviera un índice de daños de nivel 3 o 4, mientras que se observó una reducción del 9,1% y del 18,2% en las plantas irrigadas previamente con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6, respectivamente, con respecto a las plantas control tratadas con el patógeno, mientras que la cepa *P. castrilensis* N3 no produjo ninguna variación en este parámetro. En cambio, se observó una reducción de la incidencia del 9,1% en aquellas plantas tratadas con los cocultivos del patógeno con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 (Tabla 14).

Por otra parte, las plantas irrigadas previamente con las tres cepas mostraban una reducción de los daños del 27,3% en el caso de *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, mientras que alcanzó el 45,5% en las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6. En el caso de los tratamientos por cocultivo, la reducción de daños fue mayor, siendo del 64,3% en las plantas tratadas con los cocultivos del patógeno y de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6, mientras que fue del 28,6% en aquellas tratadas con el cocultivo entre *P. syringae* pv. tomato DC3000 y la cepa *P. castrilensis* N3.

Tabla 14. Análisis de la virulencia de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de tomate irrigadas previamente con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 (Irrigación) y tras la pulverización de los cocultivos entre cada una de las cepas y el patógeno (Cocultivo) mediante la reducción de la incidencia y de los daños.

Tratamiento	Reducción de incidencia (%)		Reducción de daños (%)	
	Irrigación	Cocultivo	Irrigación	Cocultivo
EN21 - <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	9,1	0	27,3	64,3
N3 - <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	0	9,1	27,3	28,6
P6 - <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	18,2	9,1	45,5	64,3

7.2. Análisis de depósitos de calosa

Con el fin de discernir si la reducción de la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 se debía a la interferencia de los sistemas QS del patógeno o bien a la activación de mecanismos de defensa de la planta, se realizó un análisis de depósitos de calosa en las hojas de las plantas de tomate.

Las micrografías de fluorescencia UV obtenidas tras la tinción de las hojas con azul de metileno muestran una acumulación natural de calosa en los pelos de las hojas de tomate, así como en las células oclusivas de los estomas como se puede observar en las plantas control (Fig. 71A). En cambio, las hojas tratadas con *P. syringae* pv. tomato DC3000 mostraban depósitos de calosa difusos en toda la superficie y una intensa cantidad de calosa en las células próximas a las lesiones causadas por este (Fig. 71A y 71B).

Las hojas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 mostraron depósitos de calosa difusos en toda la superficie en comparación con hojas de las plantas control tratadas con agua, siendo de mayor intensidad en las hojas pulverizadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 (Fig. 71A). Las hojas irrigadas previamente con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 y posteriormente expuestas al patógeno mostraban una mayor cantidad de calosa que aquellas tratadas con el monocultivo. Con respecto a las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6 y expuestas al patógeno, además de un incremento en los depósitos difusos de calosa, se detectó una intensa deposición de calosa en las células epidérmicas contiguas a los estomas (Fig. 71A y 71B). Por su parte, el tratamiento con las cepas en monocultivo y sus respectivos cocultivos con *P. syringae* pv. tomato DC3000 mostraron igualmente depósitos de calosa, aunque en una concentración muy inferior. En este caso se observó una ligera y difusa deposición de calosa en las plantas tratadas con las cepas seleccionadas y sus cocultivos con el patógeno, mientras que las plantas tratadas con el patógeno mostraron una gran cantidad de depósitos de calosa en los márgenes de las lesiones producidas por este (datos no mostrados).

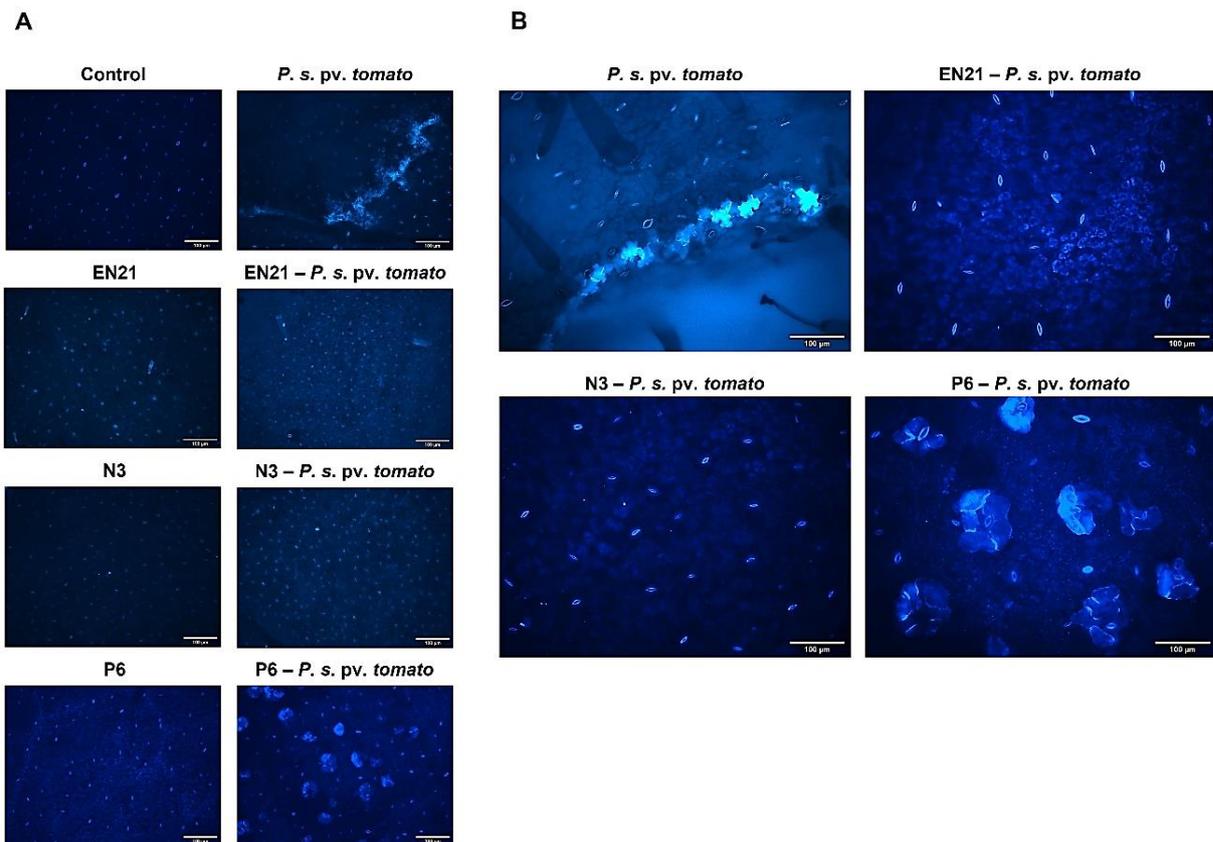


Figura 71. Estudio de depósitos de calosa en las hojas de tomate procedentes del ensayo de interferencia en la patogenicidad de *P. syringae* pv. tomato DC3000 por irrigación previa con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. A, micrografías de fluorescencia UV a 100X; B, micrografías de fluorescencia UV a 200X. Todas las imágenes de cada magnificación se tomaron en las mismas condiciones de brillo y exposición.

7.3. Análisis del metabolismo central

Una vez analizado el impacto de los distintos tratamientos en las plantas de tomate mediante el análisis de biomasa y contenido en clorofila, y de parámetros de infección, se analizó su efecto en las plantas mediante un análisis de metabolitos.

Los mapas de calor obtenidos del análisis muestran una reducción significativa de la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, malato y citrato en las plantas tratadas con *P. syringae* pv. tomato DC3000, así como un aumento de proteínas y aminoácidos con respecto a las plantas control tratadas con agua (Fig. 72A y 72B).

En el caso de las plantas irrigadas previamente con cada una de las cepas se observaron variaciones significativas a nivel de todos los parámetros con respecto a las plantas tratadas únicamente con el patógeno. Las plantas irrigadas previamente con la cepa *S. equorum* EN21 y pulverizadas con el patógeno mostraron un incremento significativo en la concentración de aminoácidos y proteínas, glucosa, fructosa, sacarosa y citrato, así como una disminución en la concentración de almidón y malato con respecto a las plantas tratadas únicamente con el patógeno (Fig. 72A). En el caso de las plantas previamente irrigadas con la cepa *P. castrilensis* N3 y expuestas al patógeno, se observó un incremento en la concentración de fructosa, sacarosa, almidón, malato y citrato, así como una disminución en la concentración de proteínas con respecto a las plantas tratadas con el patógeno (Fig. 72A). Por su parte, las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6 y posteriormente tratadas con el patógeno mostraron un incremento significativo en la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, malato y citrato,

así como una disminución en el contenido en proteínas en comparación con las plantas tratadas únicamente con el patógeno (Fig. 72A)

En cuanto a los tratamientos mediante cocultivo, las plantas pulverizadas con el cocultivo entre la cepa *S. equorum* EN21 y *P. syringae* pv. tomato DC3000 mostraron un incremento significativo de la concentración de glucosa, almidón, citrato y malato, y una disminución en la concentración de aminoácidos, proteínas, y sacarosa con respecto a las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo (Fig. 72B). En cuanto a las plantas tratadas con el cocultivo de la cepa *P. castrilensis* N3, se detectó un incremento significativo de glucosa, fructosa, almidón, malato y citrato, así como una disminución de aminoácidos, proteínas y sacarosa con respecto a las plantas tratadas con el patógeno (Fig. 72B). Por último, el tratamiento con el cocultivo de la cepa *P. segetis* P6 y el patógeno dio lugar a un incremento en la concentración de todos los parámetros, salvo de aminoácidos, cuya concentración se vio reducida con respecto a las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo (Fig. 72B).

Con respecto a la pulverización de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en monocultivo en las plantas de tomate, no se observaron cambios significativos con respecto a las plantas control salvo un ligero aumento de proteínas y una disminución de la concentración de glucosa, fructosa, malato y citrato (Fig. 72B).

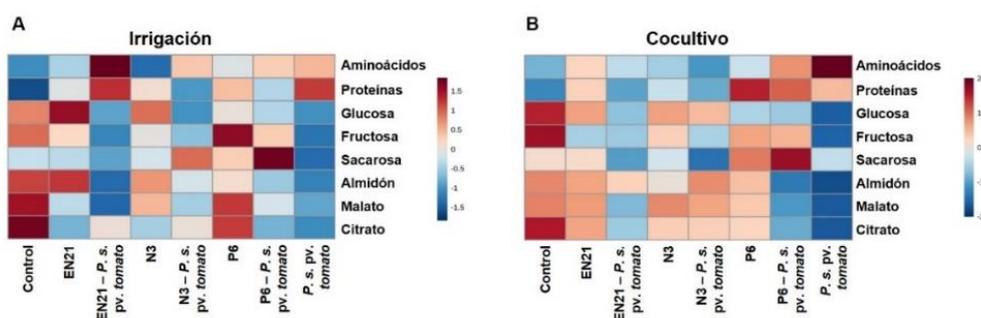


Figura 72. Mapas de calor del análisis del metabolismo central en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en plantas de tomate. A, aplicación de los tratamientos por irrigación previa y posterior pulverización de patógeno; B, aplicación de los tratamientos por pulverización de los cocultivos entre el patógeno y las cepas. ($p < 0,05$, $n=3-5$).

Con el fin de evaluar las diferencias y relaciones que se establecen en función de los resultados obtenidos en cada tratamiento, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para los dos tratamientos de estudio.

En el caso del tratamiento por irrigación previa, la PCA explicó el 73,6% de la varianza de los datos, mostrando la separación de los distintos tratamientos (Fig. 73A). El análisis de K-medias confirmó esta separación en tres clústers: el clúster 1 estaba formado por las plantas control y aquellas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, el clúster 2 formado por las plantas tratadas con el patógeno y aquellas previamente irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 y posteriormente pulverizadas con el patógeno y el clúster 3 formado por las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6 y las plantas irrigadas con esta y expuestas al patógeno (Fig. S1A). Según el análisis *biplot*, esta distribución se debió a la concentración de glucosa y almidón en el clúster 1, a la concentración de sacarosa, proteínas y aminoácidos en el clúster 2 y a la concentración de malato, citrato y fructosa en el clúster 3 (Fig. 73B).

En el caso de las plantas tratadas mediante el cocultivo entre las cepas y el patógeno, la PCA explicó el 85% de la varianza de los datos (Fig. 73C) y el análisis de K-medias dio lugar a la detección de tres clústers: el clúster 1, formado por las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo, otro por las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo y las tratadas con el cocultivo de la cepa *P. segetis* P6,

el clúster 2, formado por las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 en monocultivo y las tratadas con el cocultivo de la cepa *S. equorum* EN21, y un clúster 3 formado por el resto de tratamientos (Fig. S1B). El análisis *biplot* mostró que este agrupamiento se debía a la concentración de sacarosa, aminoácidos y proteínas en el clúster 1, a la concentración de almidón y glucosa en el clúster 2, y a la concentración de citrato, malato y glucosa en el clúster 3 (Fig. 73D).

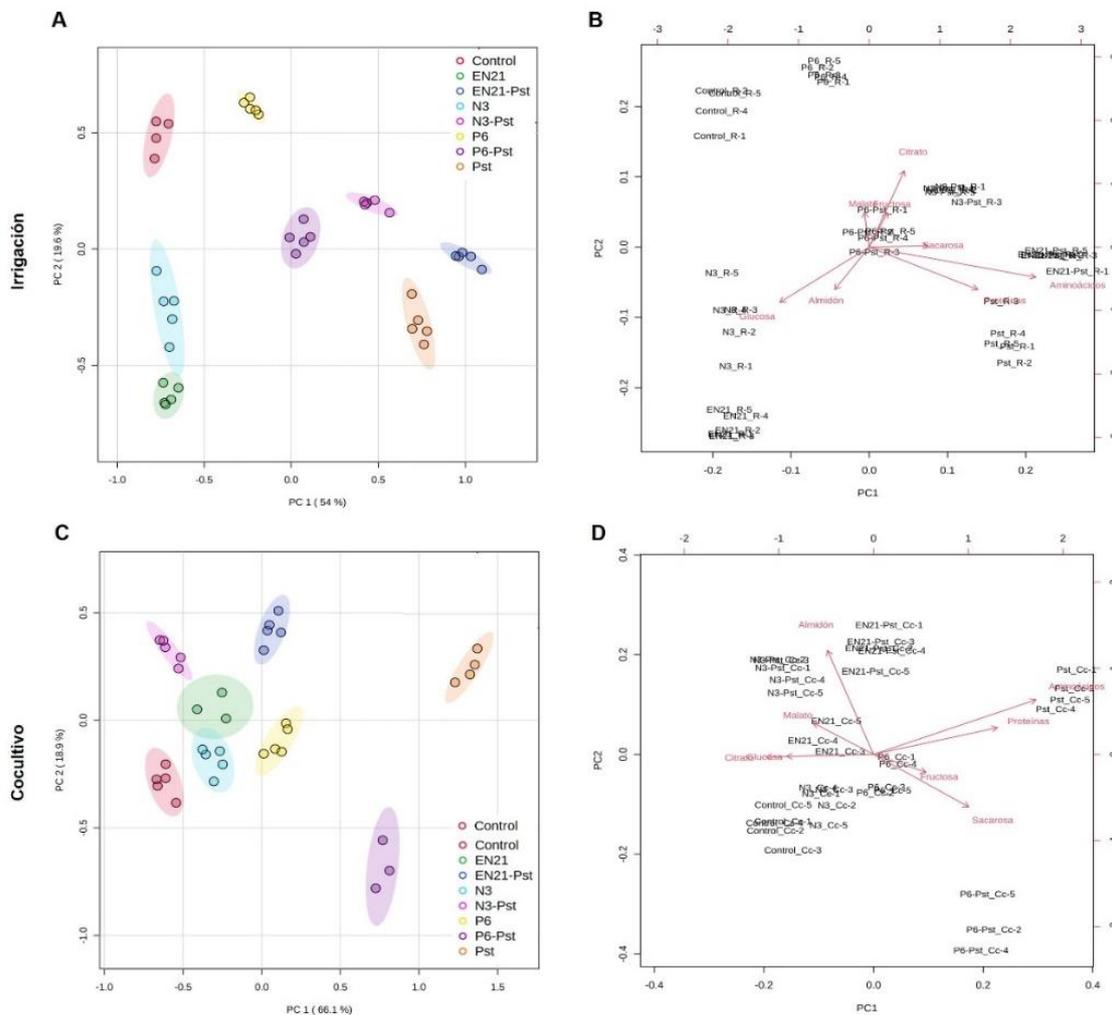


Figura 73. Análisis de la varianza de los resultados de metabolitos en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en plantas de tomate. A, análisis de componentes principales (PCA) de las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno; B, análisis bivariable entre cada tratamiento y los distintos metabolitos analizados de las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno; C, análisis de componentes principales (PCA) de las plantas tratadas con los cocultivos entre cada cepa y el patógeno; D, análisis bivariable entre cada tratamiento y los distintos metabolitos analizados tras la pulverización de los cocultivos. ($p < 0,05$, $n=3-5$).

7.4. Determinación del balance redox

Seguidamente al análisis de metabolitos primarios, se estudió el balance redox para determinar el impacto de los distintos tratamientos en la planta. Así el análisis de los compuestos redox en las hojas de las plantas de tomate tratadas con el patógeno, se detectó un gran incremento de la concentración de peróxido de hidrógeno y NADPH y un ligero incremento en la concentración de compuestos fenólicos con respecto a las plantas control tratadas con agua destilada. Además, se observó una disminución muy acentuada en los niveles de glutatión reducido y de NADH, así como una ligera reducción en el

contenido en todas las formas de ascorbato, NAD^+ , NADP^+ y malondialdehído en comparación con las plantas control (Fig. 74A y 74B).

Con respecto a las plantas previamente irrigadas con cada una de las cepas y expuestas al patógeno, se observó un incremento significativo en la concentración de todas las formas de ascorbato, glutatión reducido, NAD^+ , NADH , NADP^+ y malondialdehído, así como una reducción en los niveles de peróxido de hidrógeno y NADPH y compuestos fenólicos con respecto a las plantas tratadas únicamente con el patógeno (Fig. 74A).

Cuando los tratamientos se aplicaron mediante pulverización de los cocultivos entre las distintas cepas y el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 se obtuvieron resultados muy similares, aunque de menor intensidad a los obtenidos cuando se irrigaron previamente las plantas con las cepas y posteriormente se pulverizó el patógeno (Fig. 74B).

Por su parte, la pulverización de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en monocultivo no produjo cambios significativos en el balance redox en comparación con las plantas control tratadas con agua, salvo una ligera disminución en la concentración de ascorbato oxidado, NADH y compuestos fenólicos (Fig. 74B).

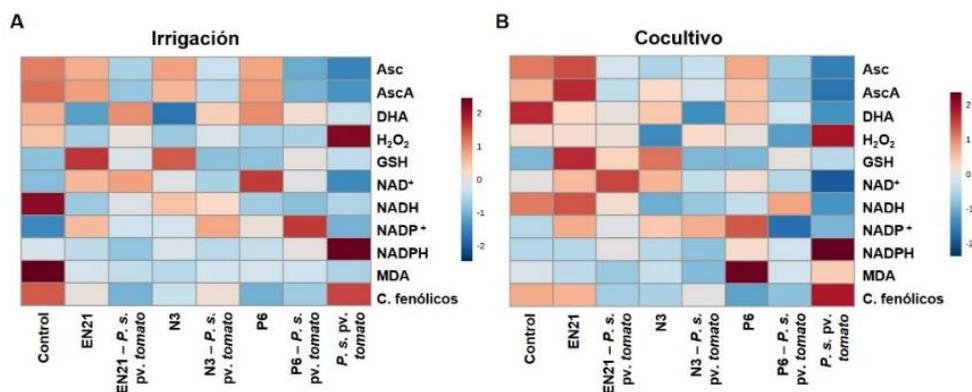


Figura 74. Mapas de calor del análisis del balance redox en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en plantas de tomate. A, aplicación de los tratamientos por irrigación previa y posterior pulverización de patógeno; B, aplicación de los tratamientos por pulverización de los cocultivos entre el patógeno y las cepas. Asc, ascorbato total; AscA, ascorbato reducido; DHA, dehidroascorbato; GSH, glutatión total; NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , MDA, malondialdehído. (p < 0,05, n=3-5).

El análisis por PCA del bloque de tratamientos por irrigación previa explicó el 55,9% de la varianza observada en los datos y permitió identificar la separación entre los distintos tratamientos (Fig. 75A). Esta separación fue confirmada mediante el análisis de K-medias que permitió identificar tres clústers: el clúster 1 formado por las plantas tratadas con el patógeno, el clúster 2 compuesto por las plantas control, las irrigadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 y aquellas irrigadas previamente con la cepa *P. castrilensis* N3 y expuestas al patógenos; y un clúster 3 formado por las plantas tratadas con la cepa *S. equorum* EN21 y aquellas previamente irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 y pulverizadas con el patógeno (Fig. S2A). Por otra parte, el análisis *biplot* permitió identificar que este agrupamiento de debía a la concentración de peróxido de hidrógeno y NADPH en el clúster 1, a la concentración de todas las formas de ascorbato, NAD^+ y NADH en el clúster 2 y a la concentración de glutatión total y NADP^+ (Fig. 75B).

En cuanto a los tratamientos por cocultivo, el análisis por PCA explicó el 55,9% de la varianza observada en los datos (Fig. 75C) y de nuevo mostró una agrupación de las muestras que el análisis de K-medias permitió agrupar en 3 clústers: el clúster 1 formado por las plantas tratadas con la cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 en monocultivo y los cocultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P.*

segetis P6 con el patógeno; el clúster 2 compuesto por las plantas control, las tratadas con la cepa *P. segetis* P6 en monocultivo y aquellas pulverizadas con el cocultivo con la cepa *P. castrilensis* N3; y un tercer clúster formado por el patógeno en monocultivo (Fig. S2B). Por su parte, el análisis *biplot* permitió identificar que esta distribución se debía a variaciones en la concentración de a la concentración de glutatión total y NADP⁺ en el clúster 1, a cambios en la concentración de todas las formas de ascorbato, NAD⁺ y NADH en el clúster 2 y a la concentración de peróxido de hidrógeno y NADPH en el clúster 3 (Fig. 75D).

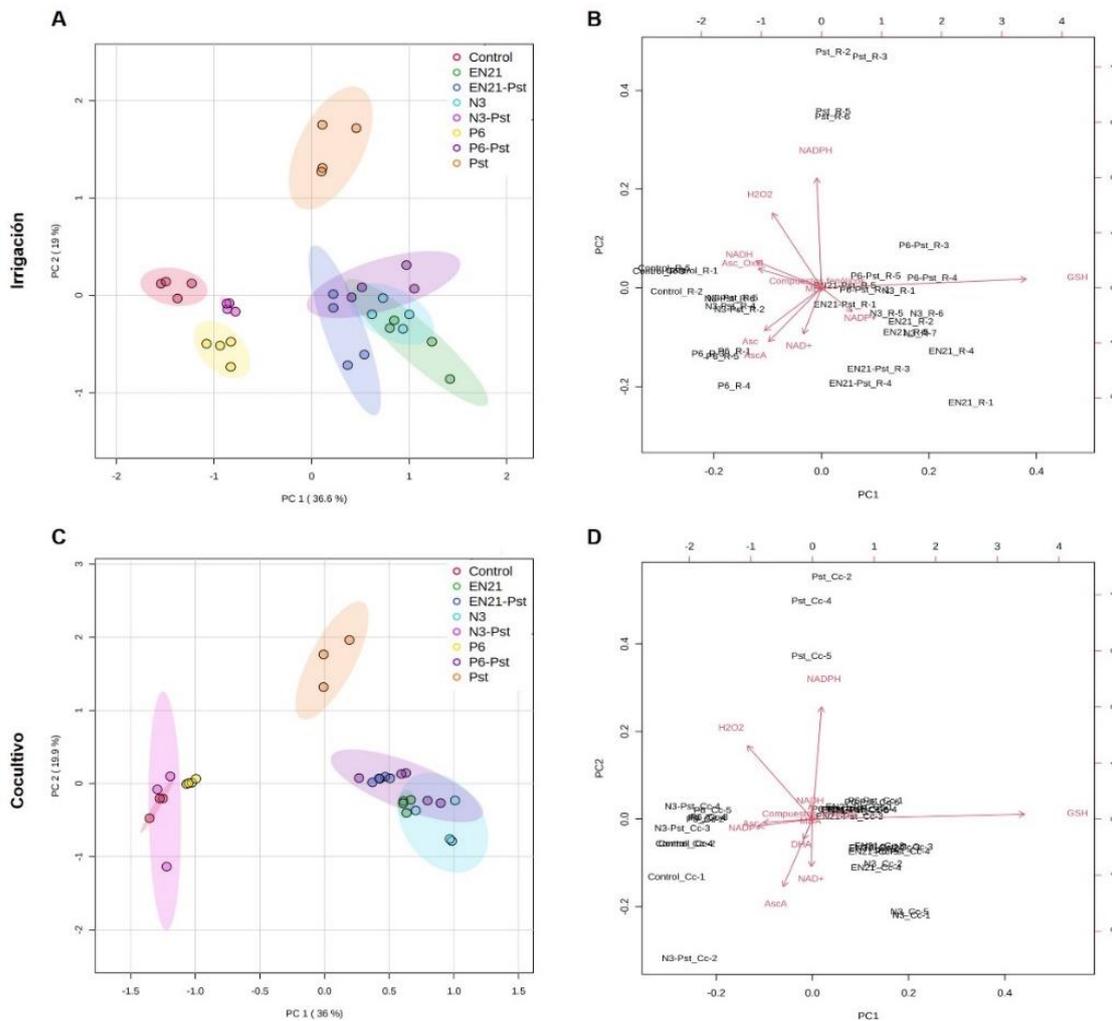


Figura 75. Análisis de la varianza de los resultados de compuestos redox obtenidos tras los tratamientos por irrigación previa y mediante cocultivo entre el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 y las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. A, análisis de componentes principales (PCA) de las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno; B, análisis bivariable entre cada tratamiento y los distintos compuestos redox analizados de las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno; C, análisis de componentes principales (PCA) de las plantas tratadas con los cocultivos entre cada cepa y el patógeno; D, análisis bivariable entre cada tratamiento y los distintos compuestos redox analizados tras la pulverización de los cocultivos.. ($p < 0,05$, $n=3-5$).

7.5. Evaluación de la actividad enzimática del metabolismo central

Con el fin de dar explicación a los valores observados en los análisis previos con respecto a metabolitos primarios y compuestos redox, se estudió la actividad enzimática del metabolismo central de la planta.

Los resultados del análisis de la actividad enzimática del metabolismo central de las plantas tratadas con el patógeno mostraron una disminución significativa en la actividad de las enzimas invertasa ácida

vacuolar (VInv), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-GAPDH) y ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxidasa (RuBisCO), así como un incremento en la actividad de las enzimas invertasa ácida de la pared celular (CwInv), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-GDH) y nitrato reductasa (NR) en comparación con las plantas control tratadas con agua (Fig. 76).

Con respecto a las plantas procedentes del tratamiento por irrigación previa con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 y la posterior exposición al patógeno, se detectó un incremento significativo en la actividad de las enzimas CwInv, NADP-GAPDH y RuBisCO, y una disminución en la actividad de las enzimas VInv, G6P-DH, NAD-GDH y NR con respecto a las plantas tratadas únicamente con el patógeno (Fig. 76), salvo en el caso de la irrigación previa con la cepa *S. equorum* EN21 que produjo a un incremento de la actividad de la enzima VInv con respecto a las plantas tratadas únicamente con el patógeno (Fig. 76A); el tratamiento con la cepa *P. segetis* P6 que resultó en una disminución de la actividad de la enzima CwInv (Fig. 76B) y el tratamiento previo con la cepa *P. castrilensis* N3 en el que no se observaron variaciones en la actividad de la enzima NR (Fig. 76G).

En cuanto al bloque de tratamientos por cocultivo, las plantas tratadas con los cocultivos de las cepas y el patógeno mostraron un incremento en la actividad de las enzimas VInv, excepto en el caso del cocultivo con la cepa *P. segetis* P6, NADP-GAPDH y RuBisCO, así como una reducción en la actividad de las enzimas CwInv, G6P-DH y NR con respecto a las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo (Fig. 76). En cuanto a la actividad de la enzima NAD-GDH, no se observaron cambios en las plantas tratadas con los cocultivos de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6, mientras que se detectó una disminución en el cocultivo con la cepa *P. castrilensis* N3 (Fig. 76E).

Por su parte, la pulverización las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en monocultivo no produjo cambios significativos en la actividad enzimática, excepto en la actividad de la enzima CwInv en la que se observó un ligero incremento tras el tratamiento con las tres cepas con respecto a las plantas control tratadas con agua (Fig. 76B). Además, el tratamiento con la cepa *P. castrilensis* N3 dio lugar a un incremento de la actividad de las enzimas NAD-GDH y RuBisCO (Fig. 76E y 76F) y el tratamiento con la cepa *P. segetis* P6 incremento la actividad de la enzima RuBisCO (Fig. 76F).

En el caso del análisis de la actividad enzimática del metabolismo central, no fue posible realizar un análisis robusto mediante PCA debido al reducido número de réplicas, por lo que se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA).

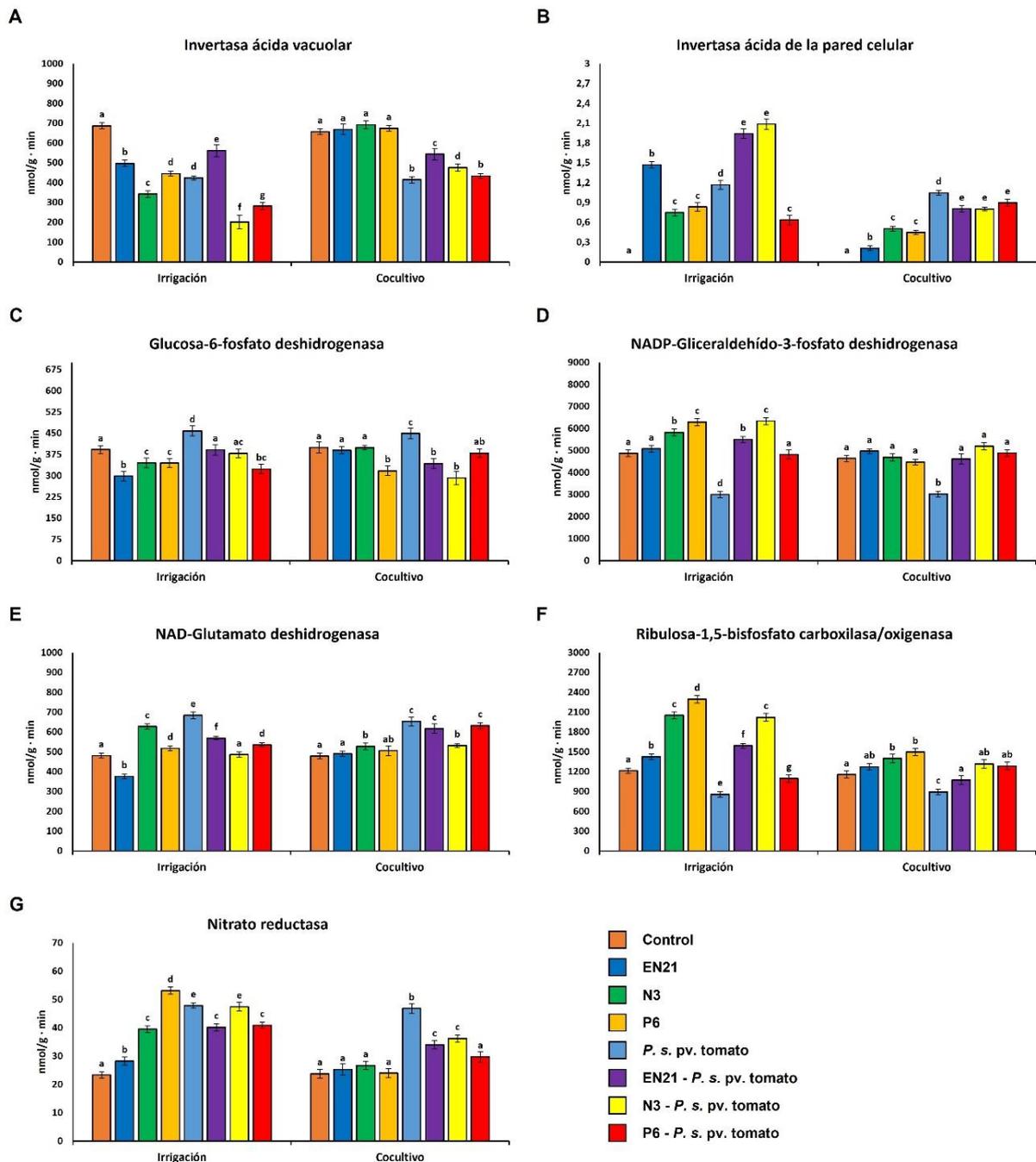


Figura 76. Análisis de la actividad de enzimas del metabolismo central de las plantas de tomate en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 tras los tratamientos por irrigación previa y mediante cocultivo. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, $n = 5$).

7.6. Estudio del perfil hormonal de la planta

Con el propósito de determinar el efecto que tuvieron los distintos tratamiento en el perfil hormonal de las plantas, se realizó una determinación de las hormonas implicadas en los mecanismos de defensa de la planta, como son ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y metiljasmonato (MeJa).

Así, el análisis del perfil hormonal de las plantas tratadas con el patógeno mostró un incremento significativo en la concentración de ABA y SA, así como una disminución en la concentración de MeJa y JA con respecto a las plantas control tratadas con agua (Fig. 77A y 77B).

Con respecto a los tratamientos por irrigación previa y posterior exposición al patógeno, se observó una disminución de la concentración de ABA y SA con respecto a las plantas tratadas únicamente con el patógeno, salvo en el caso de las plantas irrigadas previamente con la cepa *P. segetis* P6, que mostraron un ligero incremento de la concentración de SA. Igualmente se observó una disminución en la concentración JA en las plantas tratadas previamente con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 y expuestas al patógeno, mientras que aquellas irrigadas con la cepa *P. castrilensis* N3 no mostraron cambios significativos. Por otra parte, se observó un incremento generalizado en la concentración de MeJa cuando las plantas se irrigaron previamente con las tres cepas en comparación con aquellas tratadas únicamente con el patógeno (Fig. 77A).

En el caso de los tratamientos por cocultivo, se observó el mismo perfil hormonal que en el tratamiento por irrigación previa, con una disminución significativa en la concentración de ABA, SA y JA, salvo en el caso de las plantas tratadas con el cocultivo entre el patógeno y la cepa *S. equorum* EN21, que no mostró cambios significativos en la concentración de SA y JA con respecto a las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo. Por otra parte, se observó un incremento en la concentración de MeJa en las plantas tratadas con los cocultivos de cada una de las cepas y el patógeno con respecto a las plantas tratadas únicamente con este (Fig. 77B).

Por su parte, el tratamiento de las plantas con las cepas en monocultivo dio lugar a un ligero incremento en la concentración de JA, así como una pequeña reducción en la concentración de ABA, SA y MeJa con respecto a las plantas control tratadas con agua (Fig. 77B).

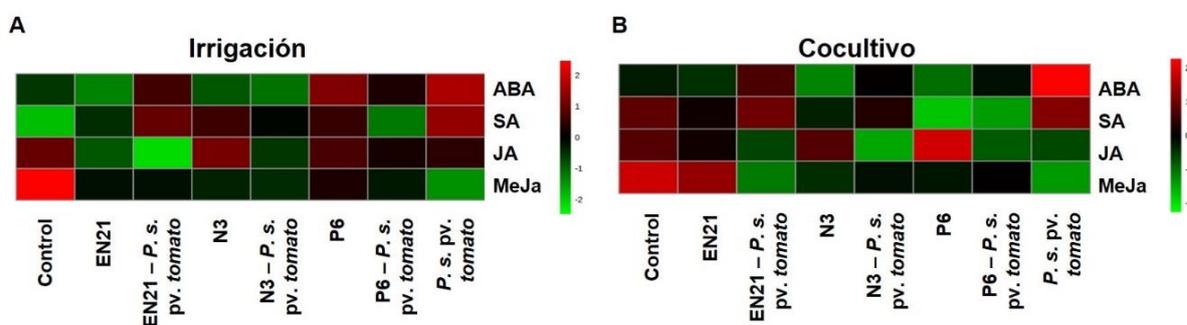


Figura 77. Mapas de calor del análisis del perfil hormonal en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en plantas de tomate. A, aplicación de los tratamientos por irrigación previa y posterior pulverización de patógeno; B, aplicación de los tratamientos por pulverización de los cocultivos entre el patógeno y las cepas. ABA, ácido abscísico; SA, ácido salicílico; JA, ácido jasmónico; MeJa, metil jasmonato; IAA, ácido indolacético; GA3, ácido giberélico. ($p < 0,05$, $n=3-5$).

El análisis por PCA de la concentración de fitohormonas en los tratamientos por irrigación previa explicó el 92,3% de la varianza observada en los datos y permitió identificar la separación entre los distintos tratamientos (Fig. 78A). Esta separación fue confirmada mediante el análisis de K-medias que dio lugar a la identificación de tres clústers: el clúster 1 formado por las plantas control; un segundo clúster compuesto por las plantas irrigadas con las tres cepas, y un tercer clúster formado por las plantas tratadas con el patógeno y aquellas previamente irrigadas con las tres cepas y posteriormente expuestas a este (Fig. S3A). Por otra parte, el análisis *biplot* permitió identificar que este agrupamiento de debía a

la concentración de MeJa en el clúster 1, a la concentración de JA en el clúster 2 y a la concentración de ABA y SA en el clúster 3 (Fig. 78B).

En cuanto a los tratamientos por cocultivo, el análisis por PCA dio respuesta al 95,9% de la varianza observada en los datos (Fig. 78C) y nuevamente mostró una agrupación de las muestras que el análisis de K-medias permitió describir 2 clústers: el clúster 1 formado por las plantas control y las tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 en monocultivo, y el clúster 2 compuesto por las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 en monocultivo, las tratadas con el patógeno en monocultivo y los respectivos cocultivos de las tres cepas con el patógeno (Fig. S3B). En cuanto al análisis *biplot*, asoció esta distribución principalmente a la concentración de MeJa y JA en el clúster 1 y a la concentración de ABA y SA en el clúster 2 (Fig. 78D).

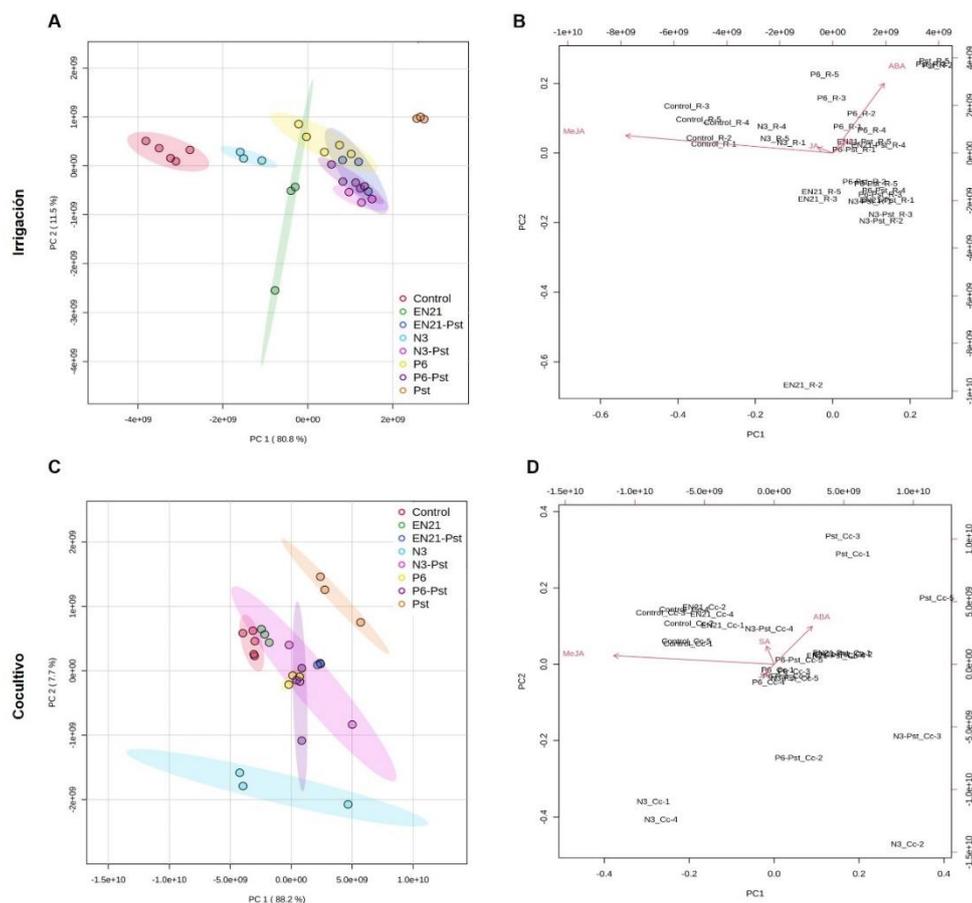


Figura 78. Análisis de la varianza del perfil hormonal tras los tratamientos por irrigación previa y mediante cocultivo entre el patógeno *P. syringae* pv. tomato DC3000 y las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. A, análisis de componentes principales (PCA); B, análisis bivariable entre cada tratamiento y los distintos compuestos redox analizados. ($p < 0,05$, $n=3-5$).

8. Evaluación de la tolerancia al estrés hídrico en plantas de *A. thaliana*

Tras analizar la promoción del crecimiento vegetal de estas cepas en condiciones de estrés biótico, se decidió estudiar la capacidad de estas para promover la tolerancia a un estrés abiótico, como es la sequía, en plantas de *A. thaliana* Col-0 durante una estancia breve realizada en la Universidad de Leiden (Países Bajos) bajo la supervisión de los doctores Víctor Carrión y Salma Balazadeh.

Con tal fin se evaluó la capacidad de las tres cepas de estudio para crecer en presencia de distintas concentraciones de polietilenglicol (PEG) 8000, empleado como agente inductor del estrés hídrico en el medio, y se determinó la capacidad de estas para producir *biofilm* en medio TSB suplementado con PEG 5% y 15% (p/v) con o sin exudados radiculares artificiales (ERA).

Las curvas de crecimiento de las tres cepas de estudio mostraron su tolerancia a concentraciones iguales o inferiores al 15% (p/v) de PEG, observándose una acusada reducción de su crecimiento a esta concentración (Fig. 79A, 79B y 79C).

En el caso concreto de la cepa *S. equorum* EN21, las curvas de crecimiento mostraban una disminución del crecimiento cuando los distintos medios se suplementaron con exudados artificiales con respecto a sus respectivos controles (Fig. 79A). En el caso de la cepa *P. castrilensis* N3 no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre los medios suplementados o no con ERA (Fig. 79B). Por el contrario, la cepa *P. segetis* P6 mostró un incremento en el crecimiento cuando los medios se suplementaron con exudados con respecto a los medios sin suplementar, así como un mayor crecimiento en los medios TSB suplementado al 5% (p/v) de PEG con o sin exudados, con respecto al crecimiento observado en el medio TSB sin suplementar (Fig. 79C).

Por otra parte, se determinó la capacidad de estas cepas para producir *biofilm* en condiciones de estrés hídrico. El análisis de la producción de *biofilm* por parte de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, mostró una disminución de esta en todos los medios suplementados con ERA en comparación con sus respectivos controles, así como un incremento significativo en la producción de *biofilm* cuando el medio se suplementó con PEG al 15% (p/v) con respecto al mismo medio sin este compuesto (Fig. 79D). Por el contrario, la cepa *P. segetis* P6 mostró una escasa producción de *biofilm* cuando el medio se suplementó con PEG al 15% (p/v), aunque la presencia de ERA influyó positivamente en la producción de este a concentraciones menores de dicho compuesto (Fig. 79D).

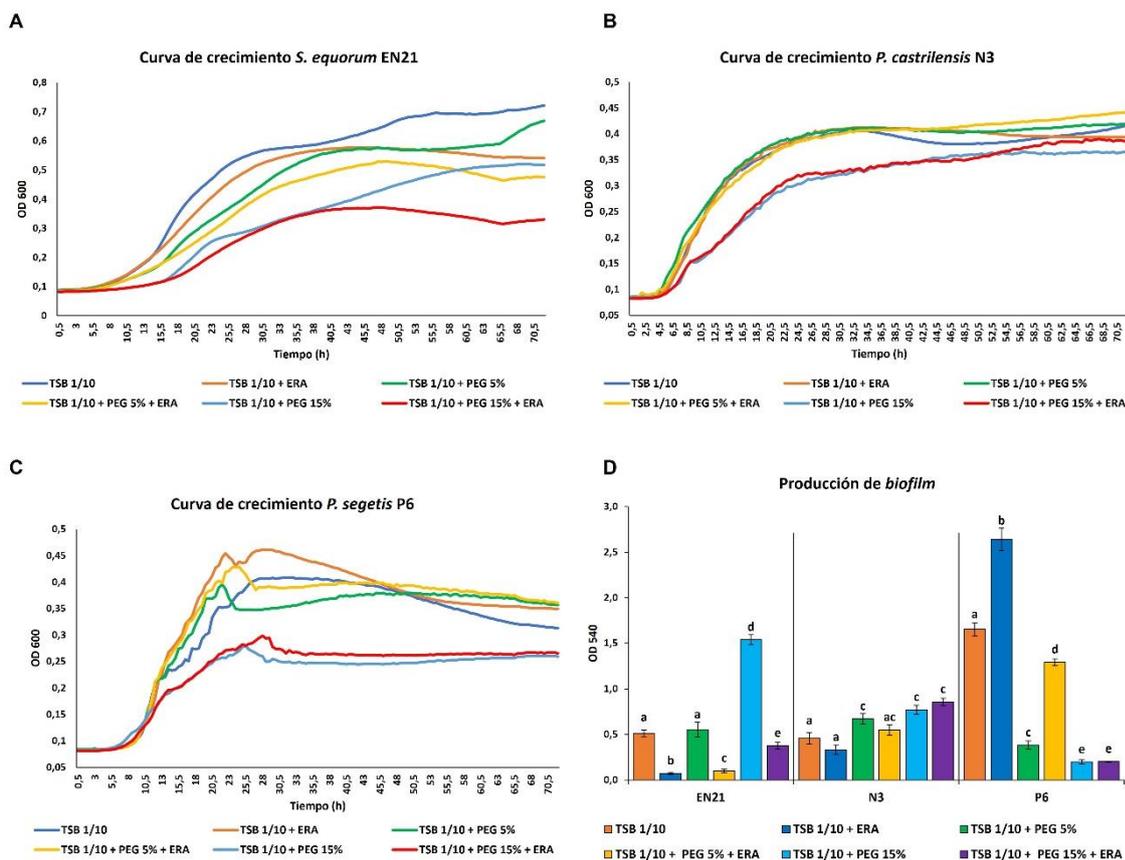


Figura 79. Evaluación de la capacidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para tolerar la presión hídrica. A, curvas de crecimiento de la cepa *S. equorum* EN21; B, curvas de crecimiento de la cepa *P. castrilensis* N3; C, curvas de crecimiento de la cepa *P. segetis* P6; D, producción de *biofilm* en medio TSB diluido 1/10 y suplementado con distintas concentraciones de PEG y con o sin ERA. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios ($p < 0,05$, $n_{A,B,C}=3$, $n_D=6$).

Por otra parte, se analizaron los genomas de las tres cepas para identificar genes relacionados con la tolerancia al estrés hídrico.

El genoma de las tres cepas mostró una notable presencia de genes relacionados con la síntesis y el transporte de los solutos compatibles prolina, glicina, betaína y trehalosa (Tabla 15).

Tabla 15. Enzimas y transportadores relacionados con la tolerancia a estrés hídrico localizados en el genoma de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6. KEGG, Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto.

Gen	KEGG	<i>S. equorum</i> EN21	<i>P. castrilensis</i> N3	<i>P. segetis</i> P6
Colina deshidrogenasa (<i>betA</i>)	K00108	+	+	+
Prolina deshidrogenasa (<i>putB</i>)	K00318	+	+	-
Betaína-aldehído deshidrogenasa (<i>betB</i>)	K00130	+	+	+
Trehalosa-6-fosfato hidrolasa (<i>treA</i>)	K01226	+	+	+
Transportador de glicina betaína (<i>betL</i>)	K02001	+	+	+
Transportador de prolina (<i>opuE</i>)	K03307	+	+	+
Transportador de prolina/betaína (<i>proP</i>)	K03762	+	+	+

Tras analizar la capacidad de las tres cepas para tolerar distintas concentraciones de PEG, así como la producción de *biofilm*, se realizó un experimento *in vitro* mediante la inoculación radicular de cada una

de las cepas en plantas de arabis empleando medio MS suplementado o no con PEG al 4% (p/v), una concentración suficiente para producir situaciones de estrés en la planta sin llegar a ocasionar su muerte.

Transcurridos 21 días del inicio del tratamiento, se recolectaron las plantas y se analizó el peso fresco y seco de las plantas, el contenido relativo de agua, la concentración de clorofila y la colonización de las raíces.

Como se puede observar en la imagen 80, la inoculación de las plantas de arabis con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 en medio MS dio lugar a un incremento de la parte aérea, mientras que aquellas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 mostraban una ligera disminución del desarrollo foliar en comparación con las plantas control no inoculadas y tratadas con $MgSO_4$. En cuanto a las raíces, todos los tratamientos produjeron un elevado desarrollo de raíces secundarias y pelos radicales en comparación con las plantas control, siendo especialmente notable en aquellas tratadas con la cepa *P. segetis* P6.

En cambio, cuando las plantas se sometieron a estrés hídrico en medio MS suplementado con PEG al 4% (p/v), se observó un incremento tanto de la parte aérea como radicular de las plantas inoculadas con la cepa *S. equorum* EN21 en comparación con el control. Con respecto a las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6, aunque se observó una ligera disminución del tamaño de la roseta en comparación con el control, las raíces secundarias mostraron un elevado desarrollo. En el caso de las plantas tratadas con la cepa *P. castrilensis* N3 se observó un crecimiento bacteriano excesivo que produjo efectos negativos en el desarrollo de las plantas (Fig. 80).

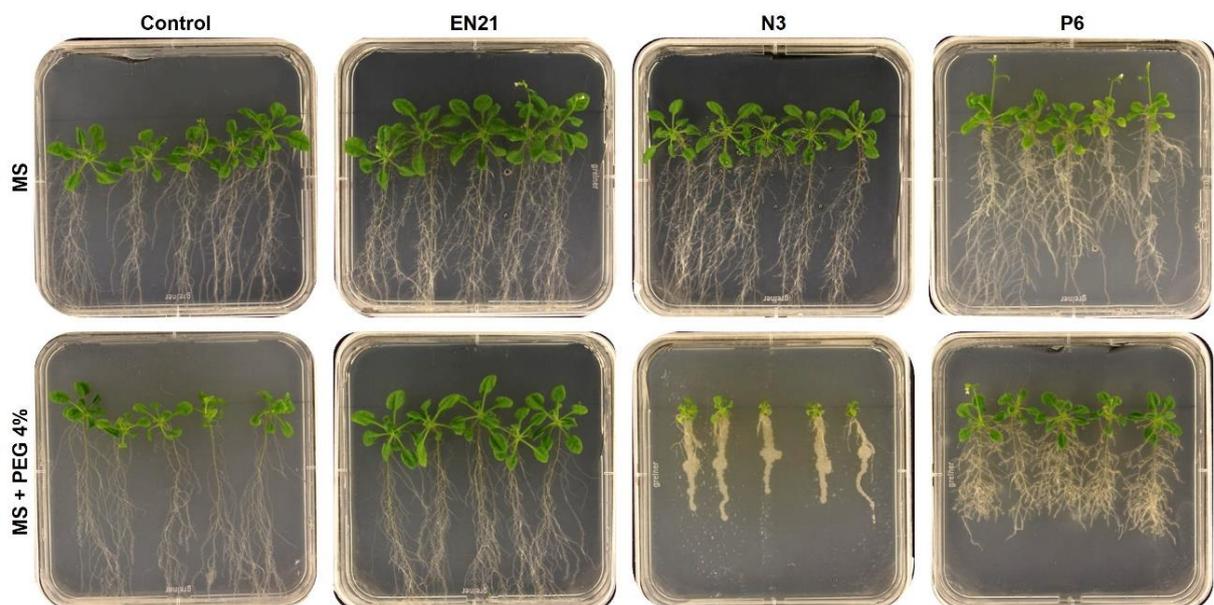


Figura 80. Estudio *in vitro* de la tolerancia a estrés hídrico en plantas de *A. thaliana* Col-0 mediante la inoculación con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en medio MS y MS suplementado con PEG al 4% (p/v) tras 21 días de incubación.

Estos resultados observacionales se confirmaron mediante la determinación del peso fresco y seco de la parte aérea y radicular. Así, el tratamiento de las plantas con la cepa *S. equorum* EN21 supuso un incremento considerable y significativo del peso fresco y seco de la parte aérea y radicular en comparación con las plantas control, en ausencia o en presencia de estrés hídrico (Fig. 81A y 81B). Igualmente, el tratamiento con la cepa *P. castrilensis* N3 supuso un incremento significativo en el peso fresco y seco de tanto de la parte aérea como de la radicular en condiciones normal, aunque se observó

un elevado descenso en estos parámetros cuando el ensayo se realizó en presencia de PEG (Fig. 81A y 81B). Por último, el tratamiento con la cepa *P. segetis* P6 únicamente mostró un efecto positivo sobre las raíces con un incremento significativo del peso fresco y seco respecto al control para ambos tratamientos (Fig. 81A y 81B).

Por otra parte, el contenido relativo en agua de las plantas cultivadas en medio MS e inoculadas con las tres cepas, no mostró ninguna variación con respecto al tratamiento control. En cambio, cuando las plantas se vieron sometidas a estrés hídrico en medio MS suplementado con PEG, se observó un incremento de este parámetro en las plantas inoculadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 (Fig. 81C).

Con respecto a la concentración de clorofila, no se observaron cambios en con respecto a las plantas control en medio MS. En cambio, bajo condiciones de estrés hídrico, se detectó un incremento de la concentración de clorofila total en las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 con respecto a las plantas control. Por el contrario, el tratamiento con la cepa *P. castrilensis* N3 produjo una disminución considerable de la concentración de clorofila con respecto a las plantas control (Fig. 81D).

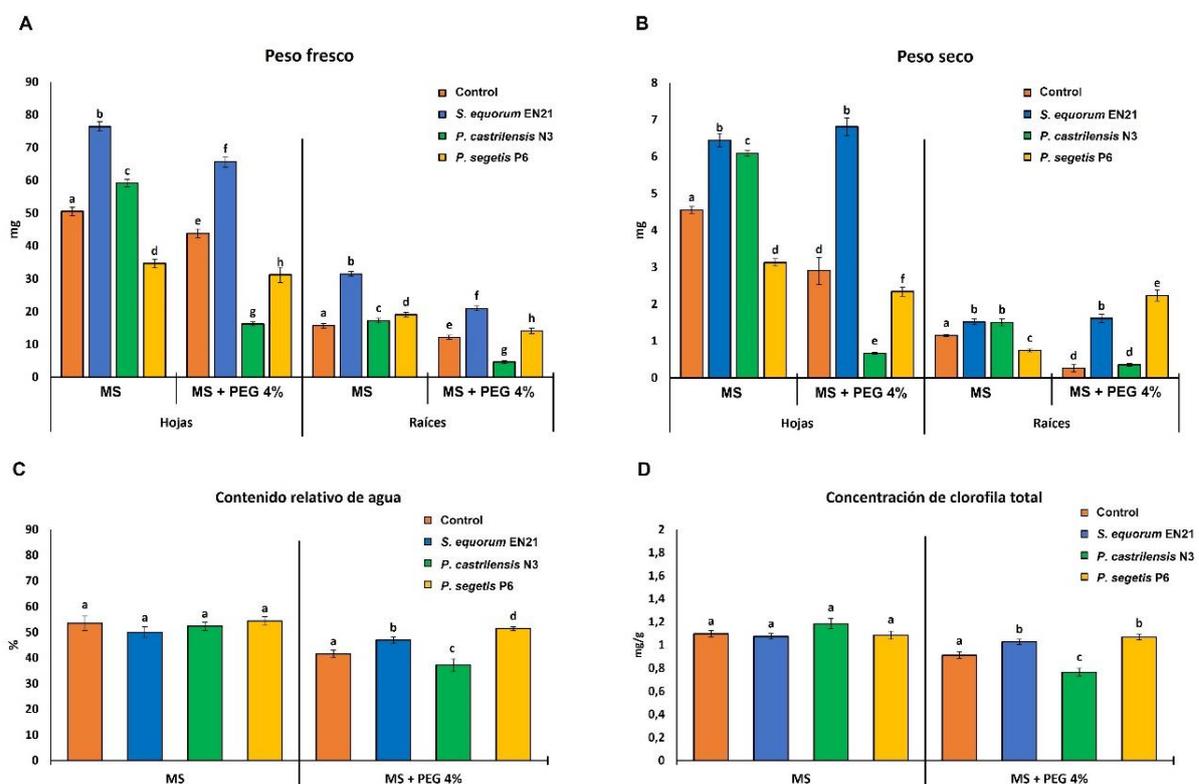


Figura 81. Evaluación del impacto del estrés hídrico en plantas de *A. thaliana* Col-0 tras la inoculación con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en medio MS suplementado o no con PEG al 4% (p/v) tras 21 días de incubación. A, peso húmedo; B, peso seco; C, contenido relativo de agua; D, concentración de clorofila total. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios ($p < 0,05$, $n=10$).

Por último, se analizó la colonización radicular por parte de las cepas tanto en medio MS como en medio MS suplementado con PEG al 4% (p/v). Los resultados del recuento en placa mostraron una densa colonización en todos los casos, especialmente en las plantas bajo estrés hídrico inoculadas con la cepa *P. castrilensis* N3. Por su parte, el recuento de la colonización en las plantas inoculadas con la cepa *S. equorum* EN21 bajo estrés hídrico dio lugar a un descenso con respecto a las plantas control no estresadas. En cambio, el recuento de las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6 mostró un

incremento de dos órdenes de magnitud en aquellas sometidas a estrés hídrico con respecto a las plantas control (Tabla 16X).

Tabla 16. Evaluación de la colonización de las raíces de plantas de *A. thaliana* Col-0 0 tras la inoculación con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en medio MS suplementado o no con PEG al 4% (p/v) tras 21 días de incubación.

Cepa	Recuento de colonización (UFC/mg de raíz)	
	MS	MS + PEG 4%
<i>S. equorum</i> EN21	3,5 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁶
<i>P. castrilensis</i> N3	2,3 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁹
<i>P. segetis</i> P6	4,5 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁸

9. Discusión

En este capítulo se analizó la actividad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en la promoción de la tolerancia al estrés biótico y abiótico. Para evaluar el primero, se analizó y caracterizó su actividad en la interferencia de la virulencia de los fitopatógenos *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. tomato DC3000 en sus respectivos hospedadores, mientras que el estrés abiótico quedó representado por el estudio *in vitro* de la actividad de estas cepas en la inducción de la tolerancia al estrés hídrico.

Para ello, se inició el estudio de la dosis infectiva mínima necesaria para producir la muerte de las plantas de *A. thaliana* Col-0 por los patógenos de estudio con el objetivo de ajustar la concentración de cada uno de ellos en los siguientes ensayos empleando cocultivos. En todos los casos se observó que la concentración mínima de patógeno para producir daños letales en las plantas de arabis fue de 10³ UFC/mL para *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. tomato DC3000 y de 10² UFC/mL en el caso de *D. solani*. Estos resultados son consistentes con la concentración mínima de patógeno requerida para producir la infección natural según lo descrito anteriormente para *D. solani* (Kastelein et al., 2021), *E. amylovora* (Taylor et al., 2003), *P. atrosepticum* (Hashemi Tameh et al., 2020), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Kwan et al., 2013) y *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Furci et al., 2021).

Tras establecer esta concentración mínima, se evaluó la capacidad de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 para inhibir la virulencia de cada uno de los patógenos mediante cocultivos 1:100, 5:100 y 10:100 (patógeno/cepa PGP-QQ). Los resultados mostraron la elevada capacidad de las tres cepas para interferir en la virulencia de estos fitopatógenos inhibiendo la aparición de signos de infección en las plantas de arabis, incluso a concentraciones muy superiores a las necesarias para causar la infección en condiciones naturales. Por otra parte, los recuentos en placa de los cocultivos no mostraron evidencias de fenómenos de antibiosis por parte de las tres cepas frente a los patógenos en ninguna de las concentraciones ensayadas. En base a estos resultados, se decidió seleccionar el cocultivo 1:100 (patógeno/cepa PGP-QQ) como estándar para los siguientes ensayos de este capítulo, siendo además consecuente con las concentraciones de cocultivo descritas previamente para ensayos realizados con patógenos marinos (Torres et al., 2016).

Igualmente, el ensayo de interferencia en la virulencia de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de arabis mostró el potencial de estas cepas en el biocontrol de este patógeno, reduciendo los

daños ocasionados por este patógeno en las hojas y mejorando considerablemente la capacidad fotosintética de la planta en base al incremento de clorofila observado tanto cualitativa como cuantitativamente.

Tras analizar el potencial de estas cepas en el biocontrol de los fitopatógenos *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de *Arabidopsis* y de estandarizar el diseño experimental, se procedió a analizar esta actividad en sus respectivos hospedadores naturales mediante ensayos en tubérculos de patata en el caso de *D. solani* y *P. atrosepticum*, peras para *E. amylovora*, zanahorias con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y plantas de tomate en el caso de *P. syringae* pv. tomato DC3000.

El ensayo de **interferencia en la virulencia de *E. amylovora* en peras** mostró una inhibición completa del fuego bacteriano producido por este patógeno cuando las peras se trataron con el cocultivo con la cepa *P. segetis* P6, mientras que se observó una reducción de la patogenicidad del 92% y del 81% en los cocultivos con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 con respecto a las peras tratadas con *E. amylovora* en monocultivo, resultados similares a los obtenidos previamente mediante la expresión heteróloga de la lactonasa AiiA identificada en *Bacillus simplex* en este patógeno (Hanano, Harba, Al-Ali, et al., 2014) tras el tratamiento de peras con la lactonasa EaAiiA aislada del propio patógeno (Ya'ar Bar et al., 2021) o una fosfotriesterasa procedente de *Mycobacterium tuberculosis* purificada y encapsulada en nanoesferas (Gurevich et al., 2021). Esta reducción de la patogenicidad estuvo asociada a la degradación de las AHLs de este patógeno, en el que se ha demostrado que parte de su virulencia está regulada mediante sistemas QS con la producción de C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL (Molina et al., 2005; V. Venturi et al., 2004). Aunque se desconoce el alcance que tienen los sistemas QS en la regulación de la virulencia de *E. amylovora*, ha quedado demostrada su implicación en la regulación de la producción de *biofilm* y de los exopolisacáridos amilovorano y levano, ambos factores imprescindibles en la patogenicidad (Koczan et al., 2009; Piqué et al., 2015). Puesto que estas tres cepas resultaron positivas para estas propiedades (Capítulo 2), no fue posible determinar el impacto de la degradación de las AHLs en el patógeno y su relación con los mecanismos implicados en la interferencia en la virulencia de *E. amylovora*.

Con respecto a los experimentos para evaluar la **interferencia en la virulencia de *D. solani* en tubérculos de patata**, el cocultivo entre las distintas cepas y el patógeno dio lugar a una inhibición total de la podredumbre blanda producida por este patógeno en rodajas de patatas, salvo en el caso del cocultivo con la cepa *S. equorum* EN21 en el que se observó una reducción de la maceración del tejido del 78% con respecto a la producida por el patógeno en monocultivo, aunque la degradación de AHLs fue parcial en todos los casos. Hasta la fecha de la realización de este manuscrito no se han encontrado referencias sobre el biocontrol de este patógeno mediante la inhibición de sus sistemas QS a pesar de causar pérdidas superiores a 46 millones de euros anuales en Europa (Dupuis et al., 2021) desde su descripción por (J. M. van der Wolf et al., 2014). Si bien poco se sabe sobre la implicación de los sistemas QS en su virulencia, es conocido que en la regulación de estos intervienen C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL y 3-oxo-C8-HSL mayoritariamente (Crépin et al., 2012a) y cada vez son más los estudios que apuntan a que la expresión de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal, como pectinasas y celulasas, la producción de proteasas, sideróforos y exopolisacáridos, así como la movilidad tienen cierto grado de control mediante sistemas QS (Potrykus et al., 2014; Potrykus et al., 2018; Przepiora et al., 2022). Así, la interferencia previamente observada (Capítulo 2) en la actividad proteolítica de la caseína y la gelatina,

así como la inhibición de la movilidad de tipo *swimming* en los cocultivos de las tres cepas con *D. solani* podría explicar esta atenuación de la virulencia.

En cuanto a los ensayos de **interferencia en la virulencia de *P. atrosepticum* en tubérculos de patata**, únicamente la cepa *P. segetis* inhibió completamente la maceración producida por este patógeno, mientras que el porcentaje de maceración se redujo un 23% y 35% en las patatas tratadas con el cocultivo de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, respectivamente, con respecto a las tratadas con el patógeno en monocultivo, observándose una degradación de AHLs incompleta. Estudios previos obtuvieron resultados similares mediante la expresión heteróloga de la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp. A24 en el propio patógeno (Bruno Smadja et al., 2004) o mediante la actividad QQ de la lactonasa QsdA de *Rhodococcus erythropolis* y su expresión en *Escherichia coli* (Barbey et al., 2018). En el caso de *P. atrosepticum*, su virulencia se debe principalmente a la producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal y a la producción de *biofilm*, y su expresión depende de sistemas QS regulados de forma mayoritaria por las AHLs 3-oxo-C6-HSL y 3-oxo-C8-HSL (Crépin et al., 2012b; Latour et al., 2007). Así esta inhibición de la patogenicidad observada en el cocultivo con la cepa *P. segetis* P6 podría estar relacionada con la interferencia en la producción de *biofilm* o la actividad de estas enzimas imprescindibles para la producción de la maceración del tejido.

En el caso del ensayo de **interferencia en la virulencia de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en zanahorias**, se observó una reducción considerable de la maceración en los cocultivos con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, aunque solo la cepa *P. segetis* P6 inhibió completamente los daños causados por este patógeno. De todos los patógenos ensayados en este estudio *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* es el que más veces ha sido investigado por su elevada dependencia de los sistemas QS en la expresión de factores de virulencia. Esta se debe principalmente a una exacerbada producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal que provocan la maceración característica en el hospedador y a la producción de *biofilm* (Faure & Dessaux, 2007; Lee et al., 2013; Pollumaa et al., 2012). Los resultados obtenidos en este ensayo concuerdan con diversos estudios en los que se demuestra la eficacia de la interferencia en los sistemas QS de este patógeno asociada a la reducción o inhibición de los daños ocasionados mediante la actividad QQ de *Lysinibacillus* sp. Gs50 en patatas (Garge & Nerurkar, 2016), las cepas de *Bacillus* spp. As30, Gs42 y Gs52 en patata, zanahoria y pepino (Garge & Nerurkar, 2017), la expresión heteróloga de la enzima HqiA en *P. carotovorum* (Torres et al., 2017) y *Stenotrophomonas maltophilia* M9-54-2 (Reina et al., 2019), *Acinetobacter* sp. XN-10 (W. Zhang et al., 2020), *Ochrobactrum intermedium* D-2 (Fan et al., 2020) y *Streptomyces* sp. TP199 (Padilla-Gálvez et al., 2021) en patatas. Al igual que en el caso de *P. atrosepticum*, la actividad QQ de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 podría deberse a una interferencia en la producción de enzimas que degradan la pared celular y a la producción de *biofilm*.

El ensayo de **interferencia en la virulencia de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 en plantas de tomate** en una cámara climática para el crecimiento de plantas Fitotron® mostró la capacidad de estas cepas para reducir la severidad de la infección por este patógeno, aunque en ningún caso se produjo una inhibición completa de la infección. A pesar de esto, el tratamiento con los cocultivos de las cepas con el patógeno mejoró considerablemente el estado de las plantas en base a una mayor biomasa y contenido en clorofila de las hojas reduciendo así los síntomas producidos por este patógeno en las plantas de tomate. Por otra parte, se observó una degradación completa de las AHLs producidas por este patógeno cuando se analizaron las AHLs remanentes en los cocultivos.

Aunque algunos autores descartan la intervención de sistemas QS en la regulación de la expresión de la virulencia de este patógeno (Elasri et al., 2001; Nakatsu et al., 2019), en los últimos años están surgiendo cada vez más estudios que confirman la producción de AHLs y el control de al menos parte de su virulencia mediante sistemas QS (Chatterjee et al., 2007; Morohoshi, Oshima, et al., 2020; Passera et al., 2019). Así este estudio podría constituir, hasta la fecha de la realización de este manuscrito, el primer reporte del biocontrol de *P. syringae* pv. tomato DC3000 mediante la interferencia de sistemas QS en plantas de tomate.

Tras la obtención de estos resultados se decidió realizar un ensayo en condiciones de invernadero empleando plantas de tomate adultas para evaluar con más detalle los mecanismos implicados en la atenuación de la virulencia de *P. syringae* pv. tomato DC3000, así como el impacto de cada tratamiento mediante un análisis de compuestos del metabolismo central, compuestos redox, actividad enzimática del metabolismo central y del perfil hormonas de las plantas de tomate.

Al igual que los experimentos **tomate** en una cámara para el crecimiento de plantas Fitotron®, los **experimentos en invernadero** mostraron la capacidad de las tres cepas para reducir el impacto de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en las plantas de tomate, ya fuera mediante irrigación previa o mediante cocultivos de las bacterias de estudio con este. Esto se confirmó mediante un incremento de la biomasa aérea y radicular y de la concentración de clorofila en las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno y en aquellas tratadas con los cocultivos en comparación con las plantas tratadas únicamente con el patógeno. Con respecto a estos parámetros, no se observaron diferencias significativas entre la eficacia de las distintas modalidades de tratamiento, aunque se observó una mayor biomasa en las plantas previamente irrigadas con las cepas en base a sus propiedades PGP previamente discutidas en el capítulo 3.

Si bien estas cepas no mostraron la capacidad de controlar completamente al patógeno, se observó una reducción de la incidencia y de la severidad de la infección cuando las cepas de estudio estaban presentes en las plantas ya fuera por irrigación previa o por cocultivo. En el caso de la reducción de la incidencia, el tratamiento por irrigación previa mostró ser más efectivo, especialmente con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6. En cuanto a reducción de los daños ocasionados por el patógeno, se evaluó mediante una escala de daños con valores comprendidos entre 0 y 4 (0= planta sana o sin síntomas; 1= planta afectada en 1-33%; 2= 34-66%; 3= 67-99%; 4= planta muerta). Así, estas cepas mostraron un mayor control de los síntomas cuando se aplicaron mediante cocultivo con el patógeno, aunque la cepa *P. segetis* P6 mostró niveles muy similares entre las dos modalidades de tratamiento. En el caso de la cepa *P. castrilensis* N3, no se observaron diferencias en la reducción de los daños entre las dos modalidades de tratamiento. Por su parte, la pulverización de las plantas con las cepas de estudio en monocultivo no produjo ningún tipo de daño en las hojas de estas, demostrando de nuevo su inocuidad. Estos resultados muestran que las cepas seleccionadas no son capaces de evitar la infección por el patógeno, aunque reducen considerablemente los daños causados por este, ya se apliquen mediante cocultivos o por irrigación radicular previa a la infección con este.

Puesto que en las plantas tratadas mediante irrigación previa con estas cepas y la posterior exposición al patógeno por pulverización foliar se observó una intensa reducción de los daños, y que en este sistema experimental no hay contacto entre las cepas y el patógeno que pudieran explicar esta reducción, es posible que la colonización radicular de las cepas promueva la inducción de sistemas de defensa en la planta que justifiquen este fenómeno. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en diversas especies de la familia *Pseudomonadaceae* (Nguyen et al., 2020; Walters et al., 2013; Weller et al., 2012) y *Bacillaceae* (Jiang et al., 2020; Rabbee et al., 2019), incluso ha sido reportado recientemente es especies del género *Staphylococcus* (Bhattacharyya et al., 2020).

Así, el análisis de los **depósitos de calosa** mostró que la irrigación previa de las plantas con las tres cepas induce el refuerzo de la pared vegetal por la acumulación de este polisacárido asociado a la defensa de la planta mediante la activación de la resistencia sistémica inducida (Ahn et al., 2011; Pieterse et al., 2014). La inducción de esta resistencia ha sido ampliamente descrita en distintas especies de las familias *Bacillaceae* y *Pseudomonadaceae* (Nguyen et al., 2020; Peng et al., 2019; Pérez-de-Luque et al., 2017; Verhagen et al., 2009) y juega un papel fundamental en el control de la dispersión de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en el tejido vegetal (Jin & Mackey, 2017; Nie et al., 2019; N. Zhang et al., 2020) aunque aún no existen reportes sobre esta actividad en especies del género *Staphylococcus*. Fue especialmente reseñable el incremento de calosa en las plantas irrigadas con la cepa *P. segetis* P6 en la que se observó un elevado depósito de calosa en las células próximas a los estomas, lugar de entrada del patógeno, lo que podría asociarse con un mejor control de la dispersión de este por la planta. La respuesta observada en las plantas tratadas con las cepas en monocultivo también mostró la activación de la deposición de calosa, dando cuenta de la rápida interacción que se establece entre estas cepas y los mecanismos de defensa de la planta.

Con respecto al **análisis de compuestos del metabolismo central** de la planta, la presencia del patógeno da lugar a un incremento de la concentración de compuestos nitrogenados, así como a una reducción de azúcares, almidón y ácidos orgánicos. Estas variaciones han sido previamente analizadas y descritas como marcadores en la infección causada por *P. syringae* pv. tomato DC3000 y tienen como explicación una rápida movilización de azúcares para la activación de mecanismos de defensa en la planta, así como por una disminución en la actividad fotosintética (Bonfig et al., 2006; Ward et al., 2010; Zhao et al., 2015), la utilización de citrato y malato como fuentes de carbono (Fatima & Senthil-Kumar, 2015; O'Leary et al., 2016) y un incremento de la concentración de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRP), así como de los aminoácidos necesarios para su síntesis (Griffin & Carson, 2015; Ward et al., 2010; X. F. Xin & S. Y. He, 2013). Por ello, la presencia de las cepas de estudio ya fuese mediante irrigación previa o mediante cocultivos con el patógeno, mejoró considerablemente estos parámetros hasta valores próximos a sus respectivos controles, resaltando la posible acción de estas en la reducción del impacto de la infección en las plantas de tomate. Además, este análisis permitió corroborar el efecto que tuvo la irrigación de las plantas con cada una de las cepas a nivel de promoción del crecimiento (Capítulo 3), pues se pudo detectar que las plantas pulverizadas con estas cepas en monocultivo mostraron valores de todos los parámetros muy próximos a los observados en las plantas control tratadas con agua, lo que indica que los efectos beneficiosos ejercidos por estas cepas requiere más tiempo para que se establezca la relación bacteria-planta o bien que es necesaria una colonización radicular para que estas pueden ejercer sus efectos a nivel de promoción del crecimiento.

Por otra parte, el análisis de compuestos principales mostró diferencias entre los distintos tratamientos, lo que permitió agruparlos en función de su similitud en cuanto a la concentración de estos metabolitos. Por su parte, el tratamiento de las plantas mediante irrigación previa con la cepa *P. segetis* P6 y posteriormente tratada con el patógeno formó un clúster con su control únicamente irrigada con esta cepa, lo que indica un escaso impacto del patógeno a nivel de metabolitos primarios en las plantas irrigadas con esta cepa. En el caso de las plantas tratadas con esta cepa mediante cocultivo con el patógeno, el perfil de metabolitos mostró una mayor similitud con el obtenido en las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo, lo que indicaría que esta cepa aplicada mediante irrigación previa tiene una mayor capacidad para reducir el impacto del patógeno a nivel de compuestos del metabolismo central.

En el caso de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3, se observó el patrón contrario. Las plantas irrigadas previamente con estas cepas y posteriormente expuestas al patógeno mostraron similitud con aquellas tratadas con el patógeno en cuanto a sus perfiles de compuestos del metabolismo central, mientras que cuando se aplicaron mediante cocultivos dieron lugar a clusters independientes. Esto indicaría que las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 desempeñan mejor el biocontrol de este patógeno cuando se aplican mediante cocultivo en lo que a metabolitos respecta.

En cuanto a la **determinación del perfil redox** de las plantas tratadas con el patógeno se detectó un incremento en la concentración de H_2O_2 y NADPH y un ligero incremento en la concentración de compuestos fenólicos, así como una disminución muy acentuada en los niveles de glutatión reducido y de NADH, y una ligera reducción en el contenido en todas las formas de ascorbato, NAD^+ , $NADP^+$ y malondialdehído.

El peróxido de hidrógeno juega un papel fundamental en los mecanismos de respuesta al estrés inducidos por patógenos, siendo altamente producido en la planta ante la infección por *P. syringae* pv. tomato DC3000, causando daños en el ADN, proteínas y componentes celulares de la planta (Ahn et al., 2011). El hecho de que la presencia de las cepas ya fuera mediante irrigación previa o mediante cocultivos, redujera intensamente la concentración de este compuesto hasta niveles próximos a sus respectivos controles, da cuenta de su capacidad para reducir el estrés oxidativo producido por este patógeno, como se observó en un estudio con la cepa *Pseudomonas putida* LSW17S en plantas de arabidopsis (Ahn et al., 2011).

Por su parte el incremento observado de la concentración de NADPH puede actuar como reserva en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a la infección por este patógeno (Torres et al., 2006), lo que junto con la disminución en la concentración de $NADP^+$, ascorbato y glutatión indican una escasa actividad del ciclo ascorbato-glutatión, el principal sistema de detoxificación de ROS en la planta (Akram et al., 2017; Noctor et al., 2018; Sharma et al., 2012). Por otra parte, cada vez son más los estudios que relacionan una elevada concentración de NADH con estados de resistencia a la infección por diversos patógenos, entre ellos *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Decros et al., 2019; Jambunathan et al., 2010; P. Pétriacq et al., 2012), lo que concuerda con la drástica disminución de la concentración de este compuesto observada en las plantas tratadas únicamente con el patógeno.

De manera global, se pudo observar que el tratamiento con las cepas disminuye el estrés oxidativo causado por este patógeno en las plantas de tomate, y que el primer contacto de las tres cepas con las plantas, tras su aplicación en monocultivos, no supone ningún estrés para éstas, resultados igualmente observados en el análisis de compuestos redox tras la irrigación con cada una de las cepas (Capítulo 3).

En lo que respecta al análisis de compuestos principales del perfil redox, se observó que el tratamiento de las plantas con las cepas ya fuera mediante irrigación previa y posterior exposición al patógeno o mediante cocultivos con este, mostraba una clara separación con respecto al perfil redox obtenido de las plantas tratadas únicamente con el patógeno. Esto indica que estas cepas son capaces de mejorar el perfil redox de las plantas expuestas al patógeno independientemente del modo de aplicación empleado.

Por su parte, la **evaluación de la actividad enzimática del metabolismo central** mostró un incremento en la actividad de las enzimas CwInv, G6P-DH, NAD-GDH y NR, así como una disminución

significativa en la actividad de las VInv, NADP-GAPDH y RuBisCO en las plantas tratadas con el patógeno con respecto a las plantas control tratadas con agua.

En un contexto de infección, la enzima CwInv juega un papel fundamental en las defensas de la planta ya que facilitan una rápida movilización de azúcares que actúan en los sistemas de señalización en el apoplasto, en la formación de metabolitos secundarios y promueven el refuerzo de la pared celular mediante deposición de lignina y calosa (Luna et al., 2011; Proels & Hüchelhoven, 2014; Roitsch et al., 2003). La infección por los patógenos hemibiotrofos *P. syringae* pv. tomato DC3000 y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* son dos ejemplos del papel fundamental que juega esta enzima en los sistemas de defensa de la planta (Bonfig et al., 2006; Hothorn et al., 2010; Kocal et al., 2008; Zhao et al., 2015). Así el incremento de la actividad de esta enzima observado en las plantas tratadas con el patógeno podría explicarse por la activación de mecanismos de defensa en la planta, como los depósitos de calosa observados por microscopía, lo que a su vez estaría relacionada con la disminución de la concentración de azúcares observados en el análisis de compuestos del metabolismo central.

Por su parte, el incremento de la actividad de la enzima G6P-DH, involucrada en la glucólisis y la producción de NADPH (Castiglia et al., 2015; Esposito et al., 2003), podría justificar la elevada concentración de este compuesto y la disminución de la concentración de glucosa observados previamente en las plantas tratadas con el patógeno. Aunque escasos, algunos estudios han confirmado la sobre activación de los sistemas de glucólisis en situaciones de estrés biótico como mecanismo para la obtención de energía cuando la tasa fotosintética está afectada (Rojas et al., 2014; Scheideler et al., 2002).

En cuanto a la enzima NAD-GDH, esta se encarga de la conversión de glutamato en 2-oxoglutarato y NH_4^+ y la posterior incorporación del primero al ciclo de los ácidos tricarbónicos cuando el carbono es un factor limitante, jugando así un papel imprescindible en la conexión carbono-nitrógeno en la planta para la movilización de nutrientes en situaciones de estrés nutricional (Fontaine et al., 2012; Grzechowiak et al., 2020; Labboun et al., 2009; Skopelitis et al., 2006), algo que diversos estudios han comprobado en las plantas sometidas a estrés biótico (Pageau et al., 2006; Rojas et al., 2012).

Con respecto a la enzima NR, esta juega un papel fundamental en la asimilación de amonio para la posterior síntesis de aminoácidos y proteínas (Berger et al., 2020; Huaranca Reyes et al., 2018), actividad que podría estar detrás del incremento en la concentración de proteínas y aminoácidos observado en las plantas tratadas con el patógeno, así como la reducción de la concentración de NADH, pues esta enzima lo emplea como cofactor en la reducción de nitrato a nitrito. Además, esta enzima desempeña una función en los sistemas de defensa de la planta mediante la producción de óxido nítrico (NO) en situaciones de estrés biótico que en presencia de superóxido (O_2^-) reaccionan para formar peroxinitrito (ONOO \cdot), un compuesto altamente reactivo que promueve la muerte celular (Bellin et al., 2013; Martínez-Medina et al., 2019; Vandelle & Delledonne, 2011), como ha sido demostrado en diversos estudios en la interacción planta-patógeno hemibiotrofo (Gupta et al., 2013; Thalineau et al., 2016; Vitor et al., 2013).

Por otra parte, la disminución de la actividad de la enzima VInv en las plantas tratadas con el patógeno podría deberse a la reducción de la concentración de sacarosa disponible en el citoplasma observada previamente. Aunque se han descrito incrementos en la actividad de esta enzima en la interacción *Agrobacterium tumefaciens* y plantas de ricino (Wächter et al., 2003), disminuciones en la interacción *Uromyces fabae* y plantas de haba (Voegelé et al., 2006) así como en *Erysiphe necator* y plantas de vid (Hayes et al., 2010); y ausencia de variación en la actividad en el sistema *Phytophthora nicotianae* en plantas de tabaco (Essmann, Bones, et al., 2008; Essmann, Schmitz-Thom, et al., 2008) o

Botrytis cinerea en plantas de tomate (Hyun et al., 2011), no se conoce su papel en los mecanismos de defensa de la planta.

Por último, la disminución de la actividad de las enzimas RuBisCo y NADP-GAPDH, ambas implicadas de la fotosíntesis, podría deberse a los daños causados por el patógeno en las hojas y a la importante reducción de la concentración de clorofila observadas en las plantas tratadas con este. Por otra parte, múltiples estudios han demostrado una regulación negativa en la fotosíntesis durante las interacciones planta-patógeno entre los que se encuentra *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Bilgin et al., 2010; Dutton et al., 2019; Li et al., 2015; W. Wang et al., 2019). Además, la escasa actividad de la enzima NADP-GAPDH concuerda con los elevados niveles de NADPH observado en estas plantas, pues es usado por ella como cofactor en el ciclo de Calvin.

Por su parte, las plantas tratadas con las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 tanto por irrigación previa y posterior exposición al patógeno como mediante cocultivos con este, mostraron valores próximos a sus respectivos tratamientos control tratados con agua, resaltando la capacidad de estas cepas para reducir el impacto generado por el patógeno en las plantas de tomate.

En cuanto a las plantas pulverizadas con cada una de las cepas en monocultivo, únicamente se observó un ligero incremento en la actividad de la enzima Cwlnv en todas ellas, y un incremento de la actividad de la enzima RuBisCO en las plantas tratadas con las cepas *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 y de la enzima NAD-GDH en aquellas tratadas con la cepa *P. castrilensis* N3. Estos resultados dan cuenta de la rápida relación que establecen estas cepas con su hospedador y en ningún caso las plantas mostraron signos de estrés o daños. Además, este perfil de actividad enzimática contrasta con el obtenido tras la aplicación de las mismas cepas mediante irrigación (Capítulo 3) en el que se detectó una elevada diversidad en cuanto a la variación de la actividad metabólica con respecto a las plantas control tratadas con agua.

Por último, el **análisis del perfil hormonal** de las plantas tratadas con el patógeno mostró un incremento significativo en la concentración de ABA y SA, así como una disminución en la concentración de JA y MeJa con respecto a las plantas control tratadas con agua.

En un contexto de estrés biótico, el ABA juega un papel fundamental en la defensa ya que su incremento en la planta induce el cierre estomático dificultando la entrada de los patógenos que emplean esta vía de infección (Chen et al., 2020; Guzel Deger et al., 2015). La síntesis de esta hormona se dispara en la planta tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como la flagelina (flg22) de *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Liu et al., 2009; Zeng & He, 2010). Aunque el ABA juega un papel importante en el inicio de la infección impidiendo la entrada de los patógenos a través de los estomas, una vez que el patógeno ha infectado la célula, el incremento mantenido en la concentración de ABA inhibe los mecanismos de defensa asociados a la vía del SA, favoreciendo la infección (Cao et al., 2011). Por su parte, la fitotoxina coronatina producida por *P. syringae* pv. tomato DC3000 inhibe el cierre estomático permitiendo la entrada del patógeno (Chen et al., 2020; Toum et al., 2016), de tal forma que cuando este penetra en el apoplasto encuentra el ambiente idóneo para su replicación, pues los sistemas de defensa están reducidos. En base a esto, la reducción de la concentración mantenida de ABA en las plantas irrigadas con las cepas o tratadas con los cocultivos podría reducir el impacto que esto tiene sobre las defensas de la planta, disminuyendo así el impacto de la infección por el patógeno.

En cuanto a la concentración de SA observada, es bien sabido que la infección ocasionada por este patógeno causa un incremento de la concentración de esta hormona en la planta tras el reconocimiento

de PAMPs asociados a este, lo que promueve la activación de una respuesta inmunológica en la planta (X.-F. Xin & S. Y. He, 2013). Por otra parte, es común observar un incremento en la concentración de JA y MeJa tras la infección por este patógeno, ya que la fitotoxina coronatina producida por este patógeno, un análogo del JA-Ile (jasmonoil-isoleucina, la forma activa del JA), da lugar a la activación de la vía del JA, promoviendo mecanismos de defensa mediados por esta hormona, e inhibiendo la vía del SA. Esta modificación en los mecanismos de defensa promueve un estado de susceptibilidad a la infección, pues la vía del SA es más efectiva frente a patógenos hemi y biotrofos (Geng et al., 2014; Y.-S. Ku et al., 2018; Yang et al., 2019). Por ello, el hecho de que no se hallaran variaciones en la concentración de JA y MeJa podría explicarse por la elevada tasa de transformación de estas hormonas a su forma activa JA-Ile en el transcurso de la infección por *P. syringae* pv. tomato, como observaron (Scalschi et al., 2020).

En cuanto al tratamiento de las plantas con las tres cepas en monocultivo, se observó una disminución de la concentración de todas las hormonas con respecto a las plantas tratadas con agua, salvo en el caso de las plantas tratadas con la cepa *P. castrilensis* N3, que no mostró cambios en la concentración de JA, y las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6, que dio lugar a un incremento en la concentración de esta hormona. Este ligero incremento en la concentración de JA en las plantas tratadas con la cepa *P. segetis* P6, es un resultado que no se observó en el análisis previo mediante irrigación radicular (Capítulo 3). Esto podría indicar que esta cepa produce una inducción de la resistencia sistémica en la planta en los momentos posteriores a primer contacto produciendo este incremento de JA, que disminuye con el tiempo, relacionándose con una mayor sensibilización de los receptores de JA en lugar de una producción mantenida de esta hormona (Hoffland et al., 1995; Pieterse et al., 1996).

En lo que respecta al análisis de compuestos principales del perfil hormonal, se observó que el tratamiento de las plantas con las cepas mediante irrigación previa y posterior exposición al patógeno formaba un clúster independiente al observado en las plantas tratadas únicamente con el patógeno. No fue así en las plantas tratadas con los cocultivos de la cepas y el patógeno, cuyo perfil hormonal se asoció se agrupó con el de las plantas tratadas con el patógeno en monocultivo, excepto en el caso de las plantas tratadas con el cocultivo de la cepa *P. segetis* P6. Estos resultados podrían indicar que las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 mejoran el perfil hormonal de la planta durante la infección cuando se aplican mediante irrigación previa y posterior exposición al patógeno, que cuando se aplican mediante cocultivos. En lo que respecta a la cepa *P. segetis* P6, esta demostró ser efectiva independientemente de la modalidad de tratamiento.

Aunque el perfil hormonal no arrojó resultados definitivos sobre la inducción de mecanismos de defensa en la planta por parte de las cepas, los depósitos de calosa observados, la reducción de la incidencia y la severidad de la infección, y el hecho que el patógeno y estas no tuvieron contacto físico en los tratamientos por irrigación previa, hace pensar que las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 promueven las defensas de la planta frente a la infección por *P. syringae* pv. tomato DC3000. Futuros estudios mediante análisis transcriptómicos podrían dar soporte a esta hipótesis.

Finalmente, se analizó la capacidad de las tres cepas para promover la **tolerancia a estrés hídrico en las plantas** mediante un ensayo en *A. thaliana* Col-0.

Las curvas de crecimiento mostraron la capacidad de las tres cepas para crecer a distintas concentraciones de PEG, un inductor de estrés hídrico comúnmente empleado en este tipo de experimentos, aunque se observó una reducción del crecimiento de las cepas cuando el medio de cultivo se suplementó con PEG al 15% (p/v). La cepa *S. equorum* EN21 mostró un crecimiento

inversamente proporcional a la concentración de este compuesto, mientras que la cepa *P. castrilensis* N3 no mostró diferencias entre el medio TSB suplementado o no con PEG al 5% (p/v). En el caso de la cepa *P. segetis* P6, se observó un incremento significativo del crecimiento cuando el medio se suplementó con PEG al 5% (p/v) con respecto al medio TSB. Estos resultados concuerdan con diversos estudios realizados previamente en los que se han descrito distintas cepas del género *Staphylococcus* (Jayakumar et al., 2020) y de las familias *Bacillaceae* y *Pseudomonadaceae* (A. Kumar et al., 2016; Praveen Kumar et al., 2014) con una elevada tolerancia al estrés hídrico.

Por otra parte, la suplementación de los medios con exudados radiculares artificiales (ERA), como posibles inductores de la colonización radicular, produjo una reducción del crecimiento de la cepa *S. equorum* EN21. El caso de la cepa *P. castrilensis* N3 no se observaron diferencias con respecto a los medios sin suplementar, mientras que la cepa *P. segetis* P6 mostró un gran incremento en el crecimiento cuando el medio TSB se suplementó con ERA. Como se discutió en el capítulo anterior, la composición de los exudados radiculares, así como la concentración de sus componentes determinan que estos promuevan o reduzcan el crecimiento de las cepas bacterianas (Haichao Feng et al., 2018; Kudjordjie et al., 2019; Vora et al., 2021).

Tras esto se analizó la producción de *biofilm* de las tres cepas en condiciones de estrés hídrico y suplementando con ERA para evaluar si estos estimulaban su producción. En el caso de las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 se observó una relación directa entre la producción de *biofilm* y la concentración de PEG en el medio, lo que podría explicarse como una respuesta al estrés hídrico que induce la producción de biopelículas para retener el agua presente en el medio (Gupta et al., 2017; D. C. Wang et al., 2019). Por el contrario, en el caso de la cepa *P. segetis* P6 se observó una relación inversa, aunque la producción de biofilm se vio favorecida por la presencia de ERA, como se observó previamente en presencia de exudados de tomate y salicornia.

El análisis del genoma de las tres cepas permitió identificar distintos genes relacionados con la síntesis y el transporte de solutos compatibles como las enzimas colina, prolina y betaína-aldehído deshidrogenasas, trehalosa-6-fosfato hidrolasa y los transportadores de glicina betaína, prolina y prolina/betaína cuya presencia en algunas cepas bacterianas ha sido previamente asociada con la tolerancia al estrés hídrico en diversas especies vegetales (Joshi et al., 2019; Nawaz & Wang, 2020; Sharma et al., 2020; D. C. Wang et al., 2019).

Tras analizar el potencial de estas cepas como promotoras de la tolerancia a estrés hídrico se analizó su actividad *in vitro* mediante un ensayo en plantas de *A. thaliana* Col-0 expuestas a PEG 4% (p/v) como agente inductor de este tipo de estrés. Los resultados de este ensayo mostraron la capacidad promotora del crecimiento vegetal cuando las plantas no se encontraban bajo estrés. Por otra parte, bajo condiciones de estrés hídrico, las plantas irrigadas con las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 mostraron un mayor desarrollo de la parte aérea y radicular, respectivamente, en comparación con las plantas control inoculadas con $MgSO_4$. Esto junto con el incremento en el contenido relativo en agua y en la concentración de clorofila demuestran que estas cepas son capaces de promover la tolerancia a estrés hídrico *in vitro*, tal como se ha descrito recientemente en especies del género *Staphylococcus* (Arun K. et al., 2020; Jayakumar et al., 2020; Lalay et al., 2021) y *Pseudomonas* (Ansari et al., 2021; Kour et al., 2020; Yasmin et al., 2022). Diversos estudios han determinado que la tolerancia al estrés hídrico ejercido por cepas PGP se asocia con la reducción de estrés oxidativo en la planta, la producción de *biofilm* y exopolisacáridos, la disminución de la concentración de etileno mediante la actividad de la enzima ACC desaminasa, la producción de fitohormonas y de osmolitos (Barnawal et al., 2017; Forni et al., 2017; Jochum et al., 2019; Ngumbi & Kloepper, 2016; S. S. Vurukonda et al., 2016), características que estas cepas han demostrado poseer a lo largo de la investigación realizada en esta tesis doctoral. Por su parte, la cepa *P. castrilensis* N3 mostró un crecimiento excesivo en presencia de PEG, causando

efectos negativos en el desarrollo de las plantas de *arabidopsis*, que podría estar asociado a la inducción de la formación de biofilm que produce la presencia de PEG en el medio, así como podría indicar que esta cepa tiene la capacidad de utilizar este compuesto como fuente de carbono, una característica observada en algunas cepas de *Pseudomonas stutzeri* (Kawai, 2002), *Stenotrophomonas maltophilia* (Kawai, 2005) o *Pseudonocardia* sp. K1 (Yamashita et al., 2004).

Finalmente, el recuento en placa de las UFC de las cepas de estudio en las raíces de las plantas de *arabidopsis* no sometidas a estrés hídrico, mostró un grado de colonización similar al obtenido en el ensayo en plantas de tomate descrito en el capítulo anterior, lo que demuestra la capacidad de estas cepas para colonizar las raíces de diversas especies vegetales. Igualmente, las plantas sometidas a estrés mostraron un elevado grado de colonización, con un ligero descenso en las plantas tratadas con la cepa *S. equorum* EN21, posiblemente asociado a que las condiciones adversas dificultan el crecimiento de la bacteria, aunque ello no supuso un detrimento en la capacidad de esta cepa para promover la tolerancia al estrés. En cambio, el incremento de la colonización observado en las plantas bajo estrés y tratadas con la cepa *P. segetis* P6 con respecto a las plantas control no estresadas, muestra una mayor capacidad de esta cepa para colonizar la raíz de las plantas de *arabidopsis* en condiciones de estrés. Cada vez hay más evidencias de que los exudados de las plantas juegan un papel fundamental en el reclutamiento de la microbiota presente en las rizosfera, por lo que este incremento en el número de UFC de la cepa *P. segetis* P6 podría estar asociado con cambios en la composición de los exudados en las plantas estresadas que favorecen el crecimiento de esta cepa y con ello afianza la relación beneficiosa entre ambas partes (Liu et al., 2021; Naylor & Coleman-Derr, 2018; Oppenheimer-Shaanan et al., 2021; Simmons et al., 2020). Además, el estrés hídrico podría inducir la producción de *biofilm* y de exopolisacáridos en esta cepa dando lugar a una mayor retención de agua, lo que genera un nicho más favorable para el crecimiento de la población bacteriana (Ashry et al., 2021; Nadeem et al., 2021).

Teniendo en cuenta estos resultados en conjunto, y a falta de confirmación mediante futuros ensayos *in vivo*, las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 muestran un elevado potencial en la promoción de la tolerancia al estrés hídrico, lo que podría estar relacionado con su capacidad para disminuir la concentración de etileno en la planta mediante la actividad de la enzima ACC desaminasa, para aumentar la hidratación de las raíces mediante la producción de *biofilm*, y de EPS en el caso de la cepa P6, por la capacidad de promover el desarrollo foliar y radicular mediante la síntesis de auxinas, así como por su elevado repertorio genético relacionado con la síntesis de solutos compatibles. En el caso de la cepa *P. castrilensis* N3, el sobrecrecimiento observado en estos ensayos *in vitro* no permitió identificar su potencial como reductora del estrés hídrico, aunque futuros estudios podrían analizar su actividad en este ámbito empleando D-manitol como agente inductor con el fin de comprobar ese sobrecrecimiento está causado por la degradación del PEG.

Discusión general

Una gran parte de la superficie terrestre está formada por tierras áridas, semiáridas y salinas. La vida en estas regiones supone un desafío por las duras condiciones ambientales con limitaciones de agua, altos niveles de radiación solar, una elevada salinidad en el suelo y la deficiencia de nutrientes, que tienen graves consecuencias en el crecimiento y la supervivencia de las plantas (Alsharif et al., 2020). Incluso en estas regiones habitan plantas capaces de resistir estas condiciones como las plantas halófilas pertenecientes a los géneros *Arthrocnemum*, *Atriplex*, *Salicornia* y *Suaeda*. Este fenómeno se debe en gran parte a mecanismos fisiológicos de adaptación de la planta, así como a la actividad de la comunidad microbiana que habita asociada a ellas (Alsharif et al., 2020; Eida et al., 2018).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria*) son aquellas cepas que tienen un impacto positivo en el crecimiento, la productividad y/o en la resistencia a enfermedades de las plantas y condiciones ambientales adversas (Prasad et al., 2019). Por otra parte, aunque la interferencia de los sistemas QS es un mecanismo descrito en microorganismos que habitan los ambientes marinos, poco se sabe de este fenómeno en hábitats salinos y áridos (Torres et al., 2019). Debido a la escasez de nutrientes y al amplio rango de factores estresantes de estos ambientes, la actividad QQ puede constituir una ventaja competitiva para los microorganismos que allí habitan a la hora de colonizar la rizosfera de las plantas.

Por ello, las plantas halófitas constituyen nichos poco explorados en los que habitan microorganismos adaptados a ambientes extremos y que podrían suponer una fuente de biofertilizantes y agentes de control biológico en la industria agrícola (Norton et al., 2016). Entre las propiedades de estos microorganismos se encuentran la mejora de la fertilidad del suelo, el aumento de la tolerancia de las plantas agrícolas a diversos tipos de estrés ambientales y de la productividad de los cultivos, constituyendo además una opción respetuosa para el medio ambiente (Alsharif et al., 2020; Ramawat, 2009).

En esta tesis se analizó la microbiota presente en distintos ambientes salinos y en plantas halófilas presentes en el Saladar de El Margen con el propósito de aislar microorganismos que muestren una actividad combinada con características promotoras del crecimiento vegetal y la capacidad de interferir en la virulencia de los fitopatógenos mediante *quorum quenching* (QQ). Este estudio mostró la diversidad de funciones PGP que desempeñan las cepas bacterianas que habitan estos ambientes extremos y que en los últimos años están generando interés en la comunidad científica (Shahid et al., 2019; Szymańska et al., 2018; Yamamoto et al., 2018).

Tras la caracterización *in vitro* de la actividad PGP y QQ de las 391 cepas que compusieron la colección de estudio de este trabajo, se seleccionaron tres de ellas por su elevado potencial promotor del crecimiento vegetal y su versatilidad en la degradación de distintas AHLs sintéticas: *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 y *Pseudomonas segetis* P6.

El género *Staphylococcus*, generalmente asociado a microorganismos patógenos de humanos y animales como *S. aureus* y *S. epidermidis*, son pocos los reportes relacionados con la actividad PGP. Sin embargo, el estudio de la diversidad del suelo asociado a distintas plantas está demostrando la versatilidad de funciones que pueden cumplir las especies de este género en la naturaleza, como es el caso de las cepas *S. capitis* y *S. warneri* aisladas de suelos salinos con la capacidad de producir sideróforos, fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos (Tchuisseu Tchakounté et al., 2018); *S. xylosus* con propiedades similares (C. Wang et al., 2021) o las cepas *Staphylococcus* STN-1 y STN-5 aisladas de gramíneas halófilas que promueven el crecimiento de las plantas de maíz bajo estrés salino (Shahid et al., 2019).

Del mismo modo, el estudio de la interferencia en los sistemas QS en especies de este género es escaso, aunque se ha descrito la producción de dos moléculas inhibitoras de QS, conocidas como yayurea A y B, por parte de *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* (Chu et al., 2013), así como la producción de lactonasas con actividad QQ en las especies *S. carnosus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* y *S. sciuri* (Morohoshi, Kamimura, et al., 2020).

En el caso de la especie *S. equorum* fue aislada de la piel de caballo en 1984 (Schleifer et al., 1984) y hasta la fecha, no hay descripciones de su actividad relacionada con la promoción del crecimiento vegetal ni con la actividad *quorum quenching*, aunque es un microorganismo común en la microbiota de alimentos fermentados, empleándose para tal fin en la industria alimentaria (Corbière Morot-Bizot et al., 2006; Mauriello et al., 2004; Place et al., 2003).

Con respecto al género *Pseudomonas* es el que posee más diversidad de especies descritas del dominio Bacteria, con más de 200 especies tipo (Lalucat et al., 2020). Las bacterias de este género son abundantes en un gran rango de nichos ecológicos como el suelo, agua dulce, diversas plantas y animales, lo que demuestra su elevada versatilidad metabólica y capacidad de adaptación a estos ambientes. Aunque algunas de las cepas de este género son patógenos de humanos, animales y plantas, como es el caso de *P. aeruginosa* o *P. syringae*, otras especies de este género como *P. fluorescens*, *P. putida* o *P. chlororaphis* son los máximos exponentes en cuanto a promoción del crecimiento vegetal y han servido como modelo para numerosos estudio de las interacciones planta-microorganismo (Sitaraman, 2015). Estas se caracterizan por colonizar competitivamente las plantas ejerciendo un efecto beneficioso a nivel de incremento de la disponibilidad de nutrientes, aumento de la tolerancia al estrés biótico y abiótico, biocontrol de patógenos e inducción de la resistencia sistémica en las plantas (Backer et al., 2018; Nadeem et al., 2016; Sah et al., 2021). En relación con la actividad QQ, el género *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiado por su implicación en la autorregulación de los sistemas QS así como asociado a fenómenos de competición, no solo en el campo de la agricultura, sino también en el ámbito médico, con *P. aeruginosa* como principal exponente ((Huang et al., 2003; Huang et al., 2006))(Bokhove et al., 2010; Park et al., 2005; Wahjudi et al., 2011).

En lo que respecta a la especie *P. segetis*, hasta la fecha de redacción de este manuscrito, no se ha descrito actividad alguna de esta cepa tras su identificación y descripción taxonómica tras el aislamiento en un suelo de la región surcoreana de Dokdo (Park et al., 2006).

Por otra parte, las especies del género *Bacillus* son, sin duda, las bacterias predominantes en la mayoría de los suelos y son ampliamente conocidas sus características PGP que han permitido incluso su comercialización como biofertilizantes (Berg, 2009; Choudhary & Johri, 2009). Entre estas destacan la solubilización de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas y sideróforos o la inducción de la resistencia sistémica inducida (ISR) en la planta, pero sobre todo son interesantes por su elevada y diversa producción de enzimas hidrolíticas y de compuestos con actividad antimicrobiana, como antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas, biosurfactantes, cianuro de hidrógeno (HCN) y compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Saxena et al., 2020; H. Wang et al., 2021). En lo que respecta a la actividad QQ de las especies de este género, es un mecanismo con ciertos representantes como *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, o *B. thuringiensis*, de hecho, la primera descripción de una lactonasa con la capacidad de degradar AHLs se realizó en especies de este género (Dong et al., 2002; Y. H. Dong et al., 2000; Yin et al., 2010).

En este caso, la cepa *P. castrilensis* N3 constituye una nueva especie del género *Peribacillus*, recientemente reclasificado tras un análisis taxonómico en el género *Bacillus*, lo que dio lugar a la transferencia de diversas especies a este nuevo género (Sudip Patel & Radhey S. Gupta, 2020). Entre ellas, *P. simplex*, el taxón más próximo filogenéticamente a esta cepa, ha sido ampliamente descrito por su actividad PGP (Schwartz et al., 2013) y se ha descrito su actividad QQ (Hanano, Harba, Al-Ali, et al., 2014).

Los resultados obtenidos en esta tesis con respecto a estas tres cepas mostraron su potencial para promover el crecimiento *in vitro* de las plantas mediante la solubilización de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas, sideróforos, enzimas hidrolíticas y la modificación del perfil hormonal por la acción de la enzima ACC desaminasa. Características ampliamente asociadas a la promoción del crecimiento en diversas cepas descritas (Berg et al., 2016; Kumar et al., 2022; Mohanty et al., 2021).

Por otra parte, la movilidad de estas cepas y su quimioatracción a GABA y exudados de distintas plantas, junto con su capacidad para formar *biofilm* y producir exopolisacáridos, resultaron ser clave en los ensayos *in vitro* de colonización de las raíces de las plantas de tomate. Estos resultados demuestran que estas cepas podrían responder a estímulos de la rizosfera de las plantas y establecer una colonización eficiente, ejerciendo así sus efectos beneficiosos para la planta (Y. Ku et al., 2018; Rossmann et al., 2017). Estos efectos se comprobaron en un ensayo *in vivo* en plantas de tomate en las que se observó un incremento de la biomasa de las plantas, tanto de la parte aérea como radicular, con una especial incidencia en la modificación de la arquitectura radicular. Un análisis del metabolismo central de la planta y del perfil de fitohormonas permitió identificar un impacto positivo en el metabolismo del nitrógeno, asociado a un incremento de proteínas y aminoácidos en la planta, así como un aumento de la tasa fotosintética, asociado a una mayor actividad de enzimas relacionadas con este proceso, y a un incremento en la concentración de ácido indolacético en las plantas irrigadas con las tres cepas. Estos mecanismos descritos en determinadas bacterias que ejercen un efecto beneficioso en las plantas hacen de estas cepas un interesante recurso en el aumento de la productividad agrícola, como biofertilizantes, reduciendo a su vez la dependencia de fertilizantes químicos (Aiysha & Latif, 2019; Cordero et al., 2018; Kumar et al., 2022).

En cuanto a la caracterización de la actividad *quorum quenching*, las tres cepas demostraron su capacidad para degradar las AHLs producidas por los fitopatógenos *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, ya fueran procedentes de extractos de estos o bien mediante cocultivo entre las cepas seleccionadas y los patógenos. El análisis de impacto de la degradación de estas moléculas señal mostró una interferencia en la movilidad y en la producción de determinadas enzimas hidrolíticas de los fitopatógenos, ambas descritas como factores de virulencia de estos (Agyemang et al., 2020; Xie et al., 2020). Por otra parte, el análisis genómico y estructural permitió identificar la naturaleza de las enzimas implicadas en esta actividad QQ, lo que confirmó esta actividad en las cepas asociada a una enzima de tipo lactonasa en la cepa *S. equorum* EN21, dos enzimas de tipo acilasa en la cepa *P. segetis* P6 y una enzima de cada tipo en la cepa *P. castrilensis* N3. Estas enzimas mostraron homología con otras enzimas previamente descritas como Aal de *A. acidoterrestris* en el caso de las lactonasas de la cepa *S. equorum* EN21 (Bergonzi et al., 2018); QuiP de *P. aeruginosa* PAO1 (Huang et al., 2006) y HacB de *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Wahjudi et al., 2011) en el caso de las acilasas de la cepa *P. segetis* P6; y con AidC de *Chryseobacterium* sp. StRB126 (Wang et al., 2012) para la lactonasa de la cepa *P.*

castrilensis N3, mientras que su acilasa mostró homología con AiiC de *Nostoc* sp. PCC 7120 (Romero et al., 2008).

Con respecto a los ensayos de interferencia en los sistemas QS de *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, únicamente la cepa *P. segetis* P6 mostró una inhibición completa de los daños causados por estos fitopatógenos. Por el contrario, las cepas *S. equorum* EN21 y *P. castrilensis* N3 dieron lugar a un control parcial de la infección, salvo en el caso de esta última que inhibió totalmente la sintomatología producida por *D. solani* en patatas. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de la interferencia en los sistemas *quorum sensing* de los fitopatógenos como un método eficaz, seguro y respetuoso con el medio ambiente para el control de estos en los campos de cultivo. Así constituyen una alternativa encaminada a la reducción del uso de pesticidas químicos, con escaso riesgo de generación de resistencia en los patógenos (Bzdrenga et al., 2017; García-Contreras et al., 2013).

Igualmente, los ensayos de interferencia en la patogenicidad de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mostraron un eficaz control de la sintomatología producida por este patógeno en las plantas de tomate por parte de las tres cepas. Así la interferencia en los sistemas *quorum sensing* de este patógeno, un método de biocontrol escasamente descrito en este patógeno, podría resultar de gran utilidad en la agricultura por las grandes mermas que genera este patógeno en los campos de cultivo (Morohoshi et al., 2021; Passera et al., 2019). Por otra parte, la irrigación radicular de las tres cepas en las plantas de tomate previamente a la infección con el patógeno demostró igualmente una alta efectividad en el control de la sintomatología producida por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, lo que parece estar en relacionado con una inducción de la resistencia sistémica (ISR) de estas cepas en la planta, ya que las tres cepas y el patógeno no tuvieron contacto físico durante estos experimentos. Por ello estas cepas, además de promover el crecimiento de las plantas podrían constituir un valioso aliado en la control de la virulencia de este patógeno al favorecer los mecanismos de respuesta de la planta previamente a la infección por determinados patógenos (Annapurna et al., 2013; Kumar et al., 2022).

Por último, las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 mostraron un elevado potencial en la promoción de la tolerancia al estrés hídrico, lo que podría estar asociado a una interferencia en el perfil hormonal de las plantas mediado la producción de auxinas y por la actividad de la enzima ACC desaminasa, un mejor estado de hidratación de las raíces mediante la formación de *biofilms* y la producción de exopolisacáridos, así como por la potencial producción de solutos compatibles detectada en sus genomas, todos ellos factores descritos en la promoción de este tipo de tolerancia por parte de los microorganismos PGP (Nadeem et al., 2021; Zhang et al., 2022).

Conclusiones

Las conclusiones de esta tesis doctoral son las siguientes:

1. Entre las 391 cepas objeto de estudio de esta tesis, aisladas de ambientes salinos, se seleccionaron las cepas *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 y *Pseudomonas segetis* P6 por presentar, tanto actividad promotora del crecimiento vegetal *in vitro*, como actividad *quorum quenching* sobre AHLs sintéticas.
2. Las cepas seleccionadas establecen una colonización radicular de la planta de tomate asociada a movilidad, quimiotaxis a exudados radiculares, formación de *biofilm* y producción de exopolisacáridos. Esta interacción promueve el crecimiento de la planta *in vivo*, ejerciendo un impacto positivo en el metabolismo del nitrógeno, la tasa fotosintética y hormonas asociadas al crecimiento, sin causar estrés oxidativo sobre la misma
3. La actividad *quorum quenching* de las tres cepas seleccionadas produjo la degradación enzimática de las AHLs de los fitopatógenos *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, afectando a factores de virulencia asociados a los mismos. El análisis genómico y estructural permitió identificar que esta actividad se debe a enzimas de tipo lactonasa y acilasas que guardan homología con otras previamente descritas.
4. Las tres cepas de estudio redujeron los daños causados por los fitopatógenos *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en sus respectivos hospedadores, siendo la cepa *P. segetis* P6 la única que logró una inhibición total de la patogenicidad. Las tres cepas disminuyeron los daños producidos por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 en plantas de tomate cuando se aplicaron en cocultivos y mediante irrigación radicular, lo que podría estar relacionado con una inducción de la resistencia sistémica en la planta. La reducción del impacto del patógeno se asoció con un incremento en la tasa fotosintética y una disminución en el estrés oxidativo en las plantas.
5. Las cepas *S. equorum* EN21 y *P. segetis* P6 promovieron la tolerancia al estrés hídrico *in vitro* en plantas de *Arabidopsis thaliana*, observándose un aumento de la biomasa, el contenido relativo de agua y la concentración de clorofila, lo que demuestra su potencial como promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico.
6. Los ambientes hipersalinos y semiáridos, así como las plantas halófitas que habitan en ellos, constituyen una fuente poco explorada de microorganismos con potencial aplicación en la agricultura por sus propiedades promotoras del crecimiento en condiciones de estrés biótico y abiótico.

Conclusions

The conclusions of this Doctoral Thesis are as follows:

1. Among the 391 strains studied in this thesis, isolated from saline environments, strains *Staphylococcus equorum* EN21, *Peribacillus castrilensis* N3 and *Pseudomonas segetis* P6 strains were selected for presenting both in vitro plant growth-promoting activity and quorum quenching activity on synthetic AHLs.
2. The selected strains established a tomato plant root colonization associated with motility, chemotaxis to root exudates, biofilm formation and exopolysaccharide production. This interaction promotes in vivo plant growth, exerting a positive impact on nitrogen metabolism, photosynthetic rate and growth related phytohormones, without causing oxidative stress on it.
3. The quorum quenching activity of selected strains exerted an enzymatic degradation of the AHLs produced by the phytopathogens *Dickeya solani*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, affecting virulence factors associated with them. The genomic and structural analysis allowed to identify that this activity was carried out by lactonase and acylase enzymes which shared homology with others previously described.
4. The three studied strains reduced the damage caused by the phytopathogens *D. solani*, *E. amylovora*, *P. atrosepticum* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in their respective hosts, with *P. segetis* P6 strain being the only one that achieved total inhibition of pathogenicity. All three strains decreased the damage caused by *P. syringae* pv. tomato DC3000 in tomato plants when applied in cocultures and by previous root irrigation, which could be related to an induction of systemic resistance in the plant. Reduced pathogen impact was associated with an increase in photosynthetic rate and a decrease in oxidative stress in plants.
5. *S. equorum* EN21 and *P. segetis* P6 strains promoted in vitro drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants, showing an increase in biomass, relative water content and chlorophyll content, demonstrating their potential as plant growth-promoters under abiotic stress.
6. Hypersaline and semi-arid environments, as well as the halophytic plants that inhabit them, constitute a poorly explored source of microorganisms with potential application in agriculture for their growth-promoting properties under biotic and abiotic stress.

Bibliografía

- Abdelaal, K., AlKahtani, M., Attia, K., Hafez, Y., Király, L., & Künstler, A. (2021). The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alleviating the Adverse Effects of Drought on Plants. *Biology (Basel)*, *10*(6), 520. <https://doi.org/10.3390/biology10060520>
- Abdelaal, K. A., Attia, K. A., Alamery, S. F., El-Afry, M. M., Ghazy, A. I., Tantawy, D. S., Al-Doss, A. A., El-Shawy, E.-S. E., M Abu-Elsaoud, A., & Hafez, Y. M. (2020). Exogenous application of proline and salicylic acid can mitigate the injurious impacts of drought stress on barley plants associated with physiological and histological characters. *Sustainability*, *12*(5), 1736.
- Ćimović, S., & Meredith, C. (2017). Evaluation of dormant copper sprays with bark penetrating surfactants in reduction of *Erwinia amylovora* in cankers and of low-rate copper sprays in blossom blight control. *Fruit Q.*, *25*, 15-20.
- Acuña, J. J., Campos, M., Mora, M. d. I. L., Jaisi, D. P., & Jorquera, M. A. (2019). ACCD-producing rhizobacteria from an Andean Altiplano native plant (*Parastrephia quadrangularis*) and their potential to alleviate salt stress in wheat seedlings. *Applied Soil Ecology*, *136*, 184-190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.005>
- Agyemang, P. A., Kabir, M. N., Kersey, C. M., & Dumenyó, C. K. (2020). The Bacterial Soft Rot Pathogens, *Pectobacterium carotovorum* and *P. atrosepticum*, Respond to Different Classes of Virulence-Inducing Host Chemical Signals. *Horticulturae*, *6*(1), 13. <https://www.mdpi.com/2311-7524/6/1/13>
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res*, *163*(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol*, *30*(3), 161-175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
- Ahn, I.-P., Lee, S.-W., Kim, M. G., Park, S.-R., Hwang, D.-J., & Bae, S.-C. (2011). Priming by rhizobacterium protects tomato plants from biotrophic and necrotrophic pathogen infections through multiple defense mechanisms. *Mol Cells*, *32*(1), 7-14. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2209-6>
- Aiysha, D., & Latif, Z. (2019). Insights of organic fertilizer micro flora of bovine manure and their useful potentials in sustainable agriculture. *PLoS One*, *14*(12), e0226155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226155>
- Ajuzieogu, C., & Odokuma, L. (2018). Toxicity assessment of produced water using Microtox Rapid Bioassay. <https://doi.org/10.9734/SAJRM/2018/42592>
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance [Review]. *Frontiers in plant science*, *8*(613). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00613>
- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., & Jacques, P. (2018). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ Sci Pollut Res Int*, *25*(30), 29910-29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>
- Albdaiwi, R. N., Khyami-Horani, H., Ayad, J. Y., Alananbeh, K. M., & Al-Sayaydeh, R. (2019). Isolation and Characterization of Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria From Durum Wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) Cultivated in Saline Areas of the Dead Sea Region [Original Research]. *Front Microbiol*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01639>
- Ali, S. S., & Vidhale, N. (2013). Bacterial siderophore and their application: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*, *2*(12), 303-312.
- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2019). The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiological Research*, *219*, 26-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture [Review]. *Front Microbiol*, *8*(971). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Alsharif, W., Saad, M. M., & Hirt, H. (2020). Desert Microbes for Boosting Sustainable Agriculture in Extreme Environments [Review]. *Front Microbiol*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01666>

- Alsohim, A. S., Taylor, T. B., Barrett, G. A., Gallie, J., Zhang, X.-X., Altamirano-Junqueira, A. E., Johnson, L. J., Rainey, P. B., & Jackson, R. W. (2014). The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environ Microbiol*, *16*(7), 2267-2281. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12469>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 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>
- Amin, N. M., Rahim, M. Y. N., & Bunawan, H. (2016). Quorum Quenching Bacteria Isolated from Rice and Tomato Rhizosphere Soil in Malaysia.
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int J Mol Sci*, *18*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L. V., Govindasamy, V., Bose, P., & Ramadoss, D. (2013). PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management* (pp. 405-425). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_15
- Ansari, F. A., Jabeen, M., & Ahmad, I. (2021). *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *18*(12), 3855-3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
- Antúnez-Lamas, M., Cabrera-Ordóñez, E., López-Solanilla, E., Raposo, R., Trelles-Salazar, O., Rodríguez-Moreno, A., & Rodríguez-Palenzuela, P. (2009). Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology (Reading)*, *155*(Pt 2), 434-442. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022244-0>
- Anwar, S., Ali, B., & Sajid, I. (2016). Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds [Original Research]. *Front Microbiol*, *7*(1334). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01334>
- Aras, S., Arıkan, Ş., İpek, M., Eşitken, A., Pırlak, L., Dönmez, M. F., & Turan, M. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria enhanced leaf organic acids, FC-R activity and Fe nutrition of apple under lime soil conditions. *Acta physiologiae plantarum*, *40*(6), 120. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2693-9>
- Arnon, D. I. (1949). COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS. *Plant Physiology*, *24*(1), 1. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Arora, N. K., Khare, E., Oh, J. H., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2008). Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(4), 581-585. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9505-5>
- Arora, S., & Jha, P. N. (2019). Impact of Plant-Associated Microbial Communities on Host Plants Under Abiotic Stresses. In D. P. Singh, V. K. Gupta, & R. Prabha (Eds.), *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 2: Rhizosphere, Microbiome and Agro-ecology* (pp. 303-340). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8383-0_10
- Arun K., D., Sabarinathan, K. G., Gomathy, M., Kannan, R., & Balachandar, D. (2020). Mitigation of drought stress in rice crop with plant growth-promoting abiotic stress-tolerant rice phyllosphere bacteria. *J Basic Microbiol*, *60*(9), 768-786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.202000011>
- Ashry, N. M., Alaidaroos, B. A., Mohamed, S. A., Badr, O. A. M., El-Saadony, M. T., & Esmael, A. (2021). Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Saudi J Biol Sci*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.054>

- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, *9*, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture [Review]. *Frontiers in plant science*, *9*(1473). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., & Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(6), 642-650. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.014>
- Baek, D., Rokibuzzaman, M., Khan, A., Kim, M. C., Park, H. J., Yun, D. J., & Chung, Y. R. (2019). Plant-Growth Promoting *Bacillus oryzicola* YC7007 Modulates Stress-Response Gene Expression and Provides Protection From Salt Stress. *Frontiers in plant science*, *10*, 1646. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01646>
- Baird-Parker, A. C. (1963). A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J Gen Microbiol*, *30*, 409-427. <https://doi.org/10.1099/00221287-30-3-409>
- Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol*, *134*(1), 307-319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bakker, P. A. H. M., Berendsen, R. L., Van Pelt, J. A., Vismans, G., Yu, K., Li, E., Van Bentum, S., Poppeliers, S. W. M., Sanchez Gil, J. J., Zhang, H., Goossens, P., Stringlis, I. A., Song, Y., de Jonge, R., & Pieterse, C. M. J. (2020). The Soil-Borne Identity and Microbiome-Assisted Agriculture: Looking Back to the Future. *Molecular Plant*, *13*(10), 1394-1401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.017>
- Baltenneck, J., Reverchon, S., & Hommais, F. (2021). Quorum Sensing Regulation in Phytopathogenic Bacteria. *Microorganisms*, *9*(2), 239. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/239>
- Banerjee, A., Sarkar, S., Cuadros-Orellana, S., & Bandopadhyay, R. (2019). Exopolysaccharides and Biofilms in Mitigating Salinity Stress: The Biotechnological Potential of Halophilic and Soil-Inhabiting PGPR Microorganisms. In B. Giri & A. Varma (Eds.), *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions* (pp. 133-153). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_6
- Bantan-Polak, T., Kassai, M., & Grant, K. B. (2001). A Comparison of Fluorescamine and Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde Fluorogenic Reagents for Microplate-Based Detection of Amino Acids. *Analytical biochemistry*, *297*(2), 128-136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.2001.5338>
- Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H., & Roberts, G. P. (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*, *109*(1), 167-168. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90604-a](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90604-a)
- Bar-Rogovsky, H., Hugenmatter, A., & Tawfik, D. S. (2013). The evolutionary origins of detoxifying enzymes: the mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases. *J Biol Chem*, *288*(33), 23914-23927. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427922>
- Barahona, E., Navazo, A., Yousef-Coronado, F., Aguirre de Cárcer, D., Martínez-Granero, F., Espinosa-Urgel, M., Martín, M., & Rivilla, R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ Microbiol*, *12*(12), 3185-3195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02291.x>
- Barbey, C., Chane, A., Burini, J.-F., Maillot, O., Merieau, A., Gallique, M., Beury-Cirou, A., Konto-Ghiorghi, Y., Feuilloley, M., Gobert, V., & Latour, X. (2018). A Rhodococcal Transcriptional Regulatory Mechanism Detects the Common Lactone Ring of AHL Quorum-Sensing Signals and Triggers the Quorum-Quenching Response [Original Research]. *Front Microbiol*, *9*(2800). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02800>

- Bardoel, B. W., van der Ent, S., Pel, M. J., Tommassen, J., Pieterse, C. M., van Kessel, K. P., & van Strijp, J. A. (2011). *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog*, 7(8), e1002206. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002206>
- Bardy, S. L., Briegel, A., Rainville, S., Krell, T., & Zhulin, I. B. (2017). Recent Advances and Future Prospects in Bacterial and Archaeal Locomotion and Signal Transduction. *J Bacteriol*, 199(18), e00203-00217. <https://doi.org/doi:10.1128/JB.00203-17>
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2014). ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of plant physiology*, 171(11), 884-894.
- Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2017). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Physiologia plantarum*, 161(4), 502-514.
- Baudoin, E., Benizri, E., & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(9), 1183-1192.
- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197-210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M., & Yoshioka, H. (2013). Nitric Oxide as a Mediator for Defense Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(3), 271-277. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-12-0214-cr>
- Benbi, D. K. (2017). 6 - Nitrogen Balances of Intensively Cultivated Rice–Wheat Cropping Systems in Original Green Revolution States of India. In Y. P. Abrol, T. K. Adhya, V. P. Aneja, N. Raghuram, H. Pathak, U. Kulshrestha, C. Sharma, & B. Singh (Eds.), *The Indian Nitrogen Assessment* (pp. 77-93). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811836-8.00006-9>
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J Exp Bot*, 67(4), 995-1002.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., & Morris, C. E. (2014). A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. *PLoS One*, 9(9), e105547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105547>
- Berger, A., Boscari, A., Horta Araújo, N., Maucourt, M., Hanchi, M., Bernillon, S., Rolin, D., Puppo, A., & Brouquisse, R. (2020). Plant Nitrate Reductases Regulate Nitric Oxide Production and Nitrogen-Fixing Metabolism During the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis [Original Research]. *Frontiers in plant science*, 11(1313). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01313>
- Bergonzi, C., Schwab, M., Naik, T., Daudé, D., Chabrière, E., & Elias, M. (2018). Structural and Biochemical Characterization of AaL, a Quorum Quenching Lactonase with Unusual Kinetic Properties. *Scientific Reports*, 8(1), 11262. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28988-5>
- Berry, J.-L., & Pelicic, V. (2015). Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives. *FEMS Microbiol Rev*, 39(1), 134-154.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A., & Samiyappan, R. (2004). Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, 23(9), 835-843. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.01.007>
- Bhardwaj, A. K., Vinothkumar, K., & Rajpara, N. (2013). Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 8(1), 68-83.

- Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K., & Kalra, A. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific Reports*, *6*(1), 34768. <https://doi.org/10.1038/srep34768>
- Bhattacharyya, C., Banerjee, S., Acharya, U., Mitra, A., Mallick, I., Haldar, A., Haldar, S., Ghosh, A., & Ghosh, A. (2020). Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Scientific Reports*, *10*(1), 15536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72439-z>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bilgin, D. D., Zavala, J. A., Zhu, J., Clough, S. J., Ort, D. R., & DeLucia, E. H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ*, *33*(10), 1597-1613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02167.x>
- Böhm, M., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2007). Twitching Motility Is Essential for Endophytic Rice Colonization by the N₂-Fixing Endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], *20*(5), 526-533. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-5-0526>
- Bokhove, M., Nadal Jimenez, P., Quax, W. J., & Dijkstra, B. W. (2010). The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(2), 686-691. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911839107>
- Bonfig, K. B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., & Berger, S. (2006). Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*, *225*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0303-3>
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses* (pp. 41-76). Springer.
- Borruso, L., Bacci, G., Mengoni, A., De Philippis, R., & Brusetti, L. (2014). Rhizosphere effect and salinity competing to shape microbial communities in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex-Steud. *FEMS Microbiol Lett*, *359*(2), 193-200. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12565>
- Bouteiller, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Konto-Ghiorghi, Y., & Merieau, A. (2021). *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. *Int J Mol Sci*, *22*(7), 3337. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3337>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bresson, J., Varoquaux, F., Bontpart, T., Touraine, B., & Vile, D. (2013). The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *200*(2), 558-569. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.12383>
- Brijesh Singh, S., Gowtham, H. G., Murali, M., Hariprasad, P., Lakshmeesha, T. R., Narasimha Murthy, K., Amruthesh, K. N., & Niranjana, S. R. (2019). Plant growth promoting ability of ACC deaminase producing rhizobacteria native to Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *18*, 101089. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101089>
- Bzdrenga, J., Daudé, D., Rémy, B., Jacquet, P., Plener, L., Elias, M., & Chabrière, E. (2017). Biotechnological applications of quorum quenching enzymes. *Chem Biol Interact*, *267*, 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.028>
- Cai, X., Yu, M., Shan, H., Tian, X., Zheng, Y., Xue, C., & Zhang, X.-H. (2018). Characterization of a Novel N-Acylhomoserine Lactonase Rmml from *Ruegeria mobilis* YJ3. *Marine drugs*, *16*(10), 370. <https://doi.org/10.3390/md16100370>
- Cao, F. Y., Yoshioka, K., & Desveaux, D. (2011). The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research*, *124*(4), 489-499. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0409-y>
- Cappellari, L. D. R., Santoro, M. V., Schmidt, A., Gershenzon, J., & Banchio, E. (2019). Improving Phenolic Total Content and Monoterpene in *Mentha x piperita* by Using Salicylic Acid or Methyl

- Jasmonate Combined with Rhizobacteria Inoculation. *Int J Mol Sci*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010050>
- Carvalho, L. C., Dennis, P. G., Fan, B., Fedoseyenko, D., Kierul, K., Becker, A., von Wiren, N., & Borriss, R. (2013). Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. *PLoS One*, 8(7), e68555.
- Cassán, F., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2014). Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 440-459. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>
- Castiglia, D., Cardi, M., Landi, S., Cafasso, D., & Esposito, S. (2015). Expression and characterization of a cytosolic glucose 6 phosphate dehydrogenase isoform from barley (*Hordeum vulgare*) roots. *Protein expression and purification*, 112, 8-14.
- Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 101-108.
- Cohen, A. C., Bottini, R., & Piccoli, P. N. (2008). *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation*, 54(2), 97-103. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9232-9>
- Cohen, A. C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F. J., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C. N., & Piccoli, P. N. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia plantarum*, 153(1), 79-90.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Contesto, C., Milesi, S., Mantelin, S., Zancarini, A., Desbrosses, G., Varoquaux, F., Bellini, C., Kowalczyk, M., & Touraine, B. (2010). The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta*, 232(6), 1455-1470. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1264-0>
- Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S., & Talon, R. (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol*, 108(2), 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.006>
- Cordero, I., Balaguer, L., Rincón, A., & Pueyo, J. J. (2018). Inoculation of tomato plants with selected PGPR represents a feasible alternative to chemical fertilization under salt stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 181(5), 694-703. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700480>
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5), 505-512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02566.x>
- Crépin, A., Beury-Cirou, A., Barbey, C., Farmer, C., Hélias, V., Burini, J.-F., Faure, D., & Latour, X. (2012a). N-acyl homoserine lactones in diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* plant pathogens: diversity, abundance, and involvement in virulence. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(3), 3484-3497. <https://doi.org/10.3390/s120303484>
- Crépin, A., Beury-Cirou, A., Barbey, C., Farmer, C., Hélias, V., Burini, J.-F., Faure, D., & Latour, X. (2012b). N-Acyl Homoserine Lactones in Diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* Plant Pathogens: Diversity, Abundance, and Involvement in Virulence. *Sensors*, 12(3), 3484-3497. <https://www.mdpi.com/1424-8220/12/3/3484>
- Curá, J. A., Franz, D. R., Filosofía, J. E., Balestrasse, K. B., & Burgueño, L. E. (2017). Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. *Microorganisms*, 5(3), 41. <https://www.mdpi.com/2076-2607/5/3/41>

- Curzi, M. J., Ribaudó, C. M., Trincheró, G. D., Curá, J. A., & Pagano, E. A. (2008). Changes in the content of organic and amino acids and ethylene production of rice plants in response to the inoculation with *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Plant Interactions*, 3(3), 163-173. <https://doi.org/10.1080/17429140802255167>
- Chagas, F. O., Pessotti, R. C., Caraballo-Rodríguez, A. M., & Pupo, M. T. (2018). Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem Soc Rev*, 47(5), 1652-1704. <https://doi.org/10.1039/c7cs00343a>
- Chandra, S., Askari, K., & Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 581-586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.09.001>
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *Isme j*, 8(4), 790-803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>
- Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., López Solanilla, E., Low, D., Moleleki, L., Pirhonen, M., Pitman, A., Perna, N., Reverchon, S., Rodríguez Palenzuela, P., San Francisco, M., Toth, I., Tsuyumu, S., van der Waals, J., van der Wolf, J., Van Gijsegem, F., Yang, C. H., & Yedidia, I. (2012). The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity. *Annu Rev Phytopathol*, 50, 425-449. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173013>
- Chatterjee, A. (2001). Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Edited by J.L. Vanneste. *European Journal of Plant Pathology*, 107(5), 569-569. <https://doi.org/10.1023/A:1011254217275>
- Chatterjee, A., Cui, Y., Hasegawa, H., & Chatterjee, A. K. (2007). PsrA, the *Pseudomonas* Sigma Regulator, Controls Regulators of Epiphytic Fitness, Quorum-Sensing Signals, and Plant Interactions in *Pseudomonas syringae* pv. tomato Strain DC3000. *Applied and environmental microbiology*, 73(11), 3684-3694. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.02445-06>
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Int J Mol Sci*, 14(9), 17477-17500. <https://doi.org/10.3390/ijms140917477>
- Chen, K., Li, G.-J., Bressan, R. A., Song, C.-P., Zhu, J.-K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jipb.12899>
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415(6871), 545-549. <https://doi.org/10.1038/415545a>
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1974). *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(9), 3672-3676. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.9.3672>
- Choubane, S., Cheba, B. A., & Benourrad, A. (2016). Screening and Phenotypic Diversity of Amylase Producing Rhizospheric Bacteria from Some North African Plants. *Procedia Technology*, 22, 1197-1204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.168>
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493-513.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review [Review]. *Front Microbiol*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Chu, Y. Y., Nega, M., Wolfle, M., Plener, L., Grond, S., Jung, K., & Gotz, F. (2013). A new class of quorum quenching molecules from *Staphylococcus* species affects communication and growth of gram-negative bacteria. *PLoS Pathog*, 9(9), e1003654. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003654>
- Chung, J., Goo, E., Yu, S., Choi, O., Lee, J., Kim, J., Kim, H., Igarashi, J., Suga, H., & Moon, J. S. (2011). Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29), 12089-12094.

- D'Angelo-Picard, C., Chapelle, E., Ratet, P., Faure, D., & Dessaux, Y. (2011). Transgenic plants expressing the quorum quenching lactonase AttM do not significantly alter root-associated bacterial populations. *Research in Microbiology*, 162(9), 951-958. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.01.009>
- da Silva, E. A. A., Toorop, P. E., Nijse, J., Bewley, J. D., & Hilhorst, H. W. M. (2005). Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. *J Exp Bot*, 56(413), 1029-1038. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri096>
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 401-422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- Davidsson, P., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria [Review]. *Frontiers in plant science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00191>
- de Boer, M. A., Wolzak, L., & Slootweg, J. C. (2019). Phosphorus: Reserves, Production, and Applications. In H. Ohtake & S. Tsuneda (Eds.), *Phosphorus Recovery and Recycling* (pp. 75-100). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8031-9_5
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H., & Thomma, B. P. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, 329(5994), 953-955. <https://doi.org/10.1126/science.1190859>
- Decros, G., Baldet, P., Beauvoit, B., Stevens, R., Flandin, A., Colombié, S., Gibon, Y., & Pétriacq, P. (2019). Get the Balance Right: ROS Homeostasis and Redox Signalling in Fruit [Review]. *Frontiers in plant science*, 10(1091). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01091>
- Defoirdt, T., Boon, N., & Bossier, P. (2010). Can Bacteria Evolve Resistance to Quorum Sensing Disruption? *PLoS pathogens*, 6(7), e1000989. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000989>
- Demeulenaere, M. J. F., & Beeckman, T. (2014). The Interplay Between Auxin and the Cell Cycle During Plant Development. In E. Zažímalová, J. Petrášek, & E. Benková (Eds.), *Auxin and Its Role in Plant Development* (pp. 119-141). Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1526-8_7
- Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2012). SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci*, 17(9), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.011>
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ*, 32(12), 1682-1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
- Din, G. Y., Zugman, Z., Sheglov, N., Manulis, S., & Reuveni, M. (2007). Description of the elongation of fire blight canker, caused by *Erwinia amylovora*, in trunks of pear trees. *Crop Protection*, 26(4), 618-624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.014>
- Djami-Tchatchou, A.-T., Li, Z. A., Stodghill, P., Filiatrault, M. J., Kunkel, B. N., & Shank, E. A. (2022). Identification of Indole-3-Acetic Acid-Regulated Genes in *Pseudomonas syringae* pv. tomato Strain DC3000. *J Bacteriol*, 204(1), e00380-00321. <https://doi.org/doi:10.1128/JB.00380-21>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dong, Y.-H., Wang, L.-H., & Zhang, L.-H. (2007). Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1201-1211. <https://doi.org/doi:10.1098/rstb.2007.2045>
- Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., & Zhang, L.-H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3526-3531. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3526>
- Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., & Zhang, L. H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1754-1759. <https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1754-1759.2002>

- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(7), 3526-3531. <https://doi.org/10.1073/pnas.060023897>
- Drogue, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2012). Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Research in Microbiology*, *163*(8), 500-510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.006>
- Duan, J., Jiang, W., Cheng, Z., Heikkilä, J. J., & Glick, B. R. (2013). The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *PLoS One*, *8*(3), e58640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058640>
- Dupuis, B., Nkuriyngoma, P., & Van Gijsegem, F. (2021). Economic impact of *Pectobacterium* and *Dickeya* species on potato crops: A review and case study. *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*, 263-282.
- Dutton, C., Hörak, H., Hepworth, C., Mitchell, A., & Ton, J. (2019). Bacterial infection systemically suppresses stomatal density. *42*(8), 2411-2421. <https://doi.org/10.1111/pce.13570>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol*, *8*, 2104.
- Eida, A. A., Ziegler, M., Lafi, F. F., Michell, C. T., Voolstra, C. R., Hirt, H., & Saad, M. M. (2018). Desert plant bacteria reveal host influence and beneficial plant growth properties. *PLoS One*, *13*(12), e0208223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208223>
- Ekinci, M., Turan, M., Yildirim, E., Güneş, A., Kotan, R., & Dursun, A. (2014). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth, nutrient, organic acid, amino acid and hormone content of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) transplants. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*, *13*(6), 71-85.
- El-Shawa, G. M., Rashwan, E. M., & Abdelaal, K. A. (2020). Mitigating salt stress effects by exogenous application of proline and yeast extract on morpho-physiological, biochemical and anatomical characters of calendula plants. *Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants*, *7*(4), 461-482.
- Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickmann, E., Oger, P. M., & Dessaux, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied and environmental microbiology*, *67*(3), 1198-1209. <https://doi.org/10.1128/aem.67.3.1198-1209.2001>
- Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Rigano, V. D. M., & Carfagna, S. (2003). Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta*, *216*(4), 639-647.
- Essmann, J., Bones, P., Weis, E., & Scharte, J. (2008). Leaf carbohydrate metabolism during defense: Intracellular sucrose-cleaving enzymes do not compensate repression of cell wall invertase. *Plant Signal Behav*, *3*(10), 885-887. <https://doi.org/10.4161/psb.3.10.6501>
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E., & Scharte, J. (2008). RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiol*, *147*(3), 1288-1299. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121418>
- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol Environ Saf*, *156*, 225-246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Expósito, R., Bruijn, I. D., Postma, J., & Raaijmakers, J. (2017). Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils, 8 (December), 1–12. In.
- 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 [Review]. *Front Microbiol*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- Fan, X., Ye, T., Li, Q., Bhatt, P., Zhang, L., & Chen, S. (2020). Potential of a Quorum Quenching Bacteria Isolate *Ochrobactrum intermedium* D-2 Against Soft Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum*

- subsp. carotovorum [Original Research]. *Front Microbiol*, 11(898). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00898>
- Fan, X., Zhang, S., Mo, X., Li, Y., Fu, Y., & Liu, Z. (2017). Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and N Source on Plant Growth and N and P Uptake by Tomato Grown on Calcareous Soils. *Pedosphere*, 27(6), 1027-1036. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60379-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60379-5)
- FAO. (2020). World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020. Rome. <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/cb1329en>
- Farias, G. A., Olmedilla, A., & Gallegos, M. T. (2019). Visualization and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 pellicles. 12(4), 688-702. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13385>
- Farias, N., Almeida, I., & Meneses, C. (2018). New bacterial phytase through metagenomic prospection. *Molecules*, 23(2), 448.
- Farvardin, A., González-Hernández, A. I., Llorens, E., García-Agustín, P., Scalschi, L., & Vicedo, B. (2020). The Apoplast: A Key Player in Plant Survival. *Antioxidants*, 9(7), 604. <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/7/604>
- Fatima, U., & Senthil-Kumar, M. (2015). Plant and pathogen nutrient acquisition strategies [Review]. *Frontiers in plant science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00750>
- Faure, D., & Dessaux, Y. (2007). Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *Pectobacterium*. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 353-365.
- Feng, H., Fu, R., Hou, X., Lv, Y., Zhang, N., Liu, Y., Xu, Z., Miao, Y., Krell, T., Shen, Q., & Zhang, R. (2021). Chemotaxis of Beneficial Rhizobacteria to Root Exudates: The First Step towards Root-Microbe Rhizosphere Interactions. *Int J Mol Sci*, 22(13), 6655. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6655>
- Feng, H., Zhang, N., Du, W., Zhang, H., Liu, Y., Fu, R., Shao, J., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018). Identification of Chemotaxis Compounds in Root Exudates and Their Sensing Chemoreceptors in Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. 31(10), 995-1005. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-18-0003-r>
- Feng, H., Zhang, N., Du, W., Zhang, H., Liu, Y., Fu, R., Shao, J., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018). Identification of Chemotaxis Compounds in Root Exudates and Their Sensing Chemoreceptors in Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 31(10), 995-1005. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-18-0003-r>
- Fernández-Llamosas, H., Díaz, E., & Carmona, M. (2021). Motility, Adhesion and c-di-GMP Influence the Endophytic Colonization of Rice by *Azoarcus* sp. CIB. *Microorganisms*, 9(3), 554. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/3/554>
- Fetzner, S. (2015). Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol*, 201, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.001>
- Figurski, D. H., & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(4), 1648-1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol*, 285, 44-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A., & Denny, T. P. (1997). Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*, 26(2), 251-259. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5661945.x>
- Fontaine, J.-X., Tercé-Laforgue, T., Armengaud, P., Clément, G., Renou, J.-P., Pelletier, S., Catterou, M., Azzopardi, M., Gibon, Y., Lea, P. J., Hirel, B., & Dubois, F. (2012). Characterization of a NADH-Dependent Glutamate Dehydrogenase Mutant of *Arabidopsis* Demonstrates the Key Role of this Enzyme in Root Carbon and Nitrogen Metabolism. *The Plant Cell*, 24(10), 4044-4065. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103689>
- Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1), 335-356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>

- Fotopoulos, V. (2005). Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *J Biol Res*, 4, 127-137.
- Franklin, M., Nivens, D., Weadge, J., & Howell, P. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl [Review]. *Front Microbiol*, 2(167). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 35, 439-468. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 176(2), 269-275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Furci, L., Pascual-Pardo, D., & Ton, J. (2021). A rapid and non-destructive method for spatial-temporal quantification of colonization by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Methods*, 17(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00826-2>
- Gakière, B., Hao, J., de Bont, L., Pétriacq, P., Nunes-Nesi, A., & Fernie, A. R. (2018). NAD⁺ Biosynthesis and Signaling in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37(4), 259-307. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1505591>
- García-Contreras, R., Maeda, T., & Wood, T. K. (2013). Resistance to quorum-quenching compounds. *Applied and environmental microbiology*, 79(22), 6840-6846. <https://doi.org/10.1128/aem.02378-13>
- García, V., Reyes-Darias, J. A., Martín-Mora, D., Morel, B., Matilla, M. A., & Krell, T. (2015). Identification of a Chemoreceptor for C2 and C3 Carboxylic Acids. *81(16)*, 5449-5457. <https://doi.org/10.1128/aem.01529-15>
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., & Samson, R. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 381-391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijs.0.02423-0>
- Garge, S. S., & Nerurkar, A. S. (2016). Attenuation of Quorum Sensing Regulated Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* through an AHL Lactonase Produced by *Lysinibacillus* sp. Gs50. *PLoS One*, 11(12), e0167344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167344>
- Garge, S. S., & Nerurkar, A. S. (2017). Evaluation of quorum quenching *Bacillus* spp. for their biocontrol traits against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 48-57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.11.004>
- Ge, S., Zhu, Z., & Jiang, Y. (2018). Long-term impact of fertilization on soil pH and fertility in an apple production system. *Journal of soil science and plant nutrition*, 18, 282-293. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162018000100282&nrm=iso
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G., & Mackey, D. (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 240(6), 1149-1165. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2151-x>
- Ghosh, P. K., De, T. K., & Maiti, T. K. (2018). Role of ACC Deaminase as a Stress Ameliorating Enzyme of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Useful in Stress Agriculture: A Review. In V. S. Meena (Ed.), *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 1: Stress Management and Agricultural Sustainability* (pp. 57-106). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7_3
- Gibon, Y., Blaesing, O. E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J. H. M., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J., & Stitt, M. (2004). A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in *Arabidopsis* Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell*, 16(12), 3304-3325. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025973>

- Gibon, Y., Vigeolas, H., Tiessen, A., Geigenberger, P., & Stitt, M. (2002). Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *The Plant Journal*, *30*(2), 221-235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01278.x>
- Gibon, Y., Vigeolas, H., Tiessen, A., Geigenberger, P., & Stitt, M. (2002). Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant J*, *30*(2), 221-235. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01278.x>
- Gillespie, K. M., & Ainsworth, E. A. (2007). Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nat Protoc*, *2*(4), 871-874. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.101>
- Glekas, G. D., Mulhern, B. J., Kroc, A., Duelfer, K. A., Lei, V., Rao, C. V., & Ordal, G. W. (2012). The *Bacillus subtilis* chemoreceptor McpC senses multiple ligands using two discrete mechanisms. *J Biol Chem*, *287*(47), 39412-39418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413518>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, *2012*, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, *190*(1), 63-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>
- Golanowska, M., & Łojkowska, E. (2016). A review on *Dickeya solani*, a new pathogenic bacterium causing loss in potato yield in Europe [journal article]. *BioTechnologia*, *97*(2), 109-127. <https://doi.org/10.5114/bta.2016.60781>
- González, J. E., & Keshavan, N. D. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev*, *70*(4), 859-875. <https://doi.org/10.1128/mubr.00002-06>
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1), 1127500. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Grandclement, C., Tannieres, M., Morera, S., Dessaux, Y., & Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev*, *40*(1), 86-116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>
- Griffin, E. A., & Carson, W. P. (2015). The Ecology and Natural History of Foliar Bacteria with a Focus on Tropical Forests and Agroecosystems. *The Botanical Review*, *81*(2), 105-149. <https://doi.org/10.1007/s12229-015-9151-9>
- Grzechowiak, M., Sliwiak, J., Jaskolski, M., & Ruszkowski, M. (2020). Structural Studies of Glutamate Dehydrogenase (Isoform 1) From *Arabidopsis thaliana*, an Important Enzyme at the Branch-Point Between Carbon and Nitrogen Metabolism [Original Research]. *Frontiers in plant science*, *11*(754). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00754>
- Gu, S., Yang, T., Shao, Z., Wang, T., Cao, K., Jousset, A., Friman, V.-P., Mallon, C., Mei, X., Wei, Z., Xu, Y., Shen, Q., & Pommier, T. (2020). Siderophore-Mediated Interactions Determine the Disease Suppressiveness of Microbial Consortia. *mSystems*, *5*(3), e00811-00819. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00811-19>
- Guignard, M. S., Leitch, A. R., Acquisti, C., Eizaguirre, C., Elser, J. J., Hessen, D. O., Jeyasingh, P. D., Neiman, M., Richardson, A. E., Soltis, P. S., Soltis, D. E., Stevens, C. J., Trimmer, M., Weider, L. J., Woodward, G., & Leitch, I. J. (2017). Impacts of Nitrogen and Phosphorus: From Genomes to Natural Ecosystems and Agriculture [Review]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *5*(70). <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00070>
- Gupta, G., Snehi, S. K., & Singh, V. (2017). Role of PGPR in Biofilm Formations and Its Importance in Plant Health. In *Biofilms in Plant and Soil Health* (pp. 27-42). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119246329.ch2>
- Gupta, K. J., Brotman, Y., Segu, S., Zeier, T., Zeier, J., Persijn, S. T., Cristescu, S. M., Harren, F. J., Bauwe, H., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., & Mur, L. A. (2013). The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco. *J Exp Bot*, *64*(2), 553-568. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers348>

- Gupta, S., & Pandey, S. (2019). ACC Deaminase Producing Bacteria With Multifarious Plant Growth Promoting Traits Alleviates Salinity Stress in French Bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants [Original Research]. *Front Microbiol*, *10*(1506). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01506>
- Gurevich, D., Dor, S., Erov, M., Dan, Y., Moy, J. C., Mairesse, O., Dafny-Yelin, M., Adler-Abramovich, L., & Afriat-Jurnou, L. (2021). Directed Enzyme Evolution and Encapsulation in Peptide Nanospheres of Quorum Quenching Lactonase as an Antibacterial Treatment against Plant Pathogen. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *13*(2), 2179-2188. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c15808>
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A., & Park, S. W. (2013). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Abiotic Stress Tolerance in *Solanum tuberosum* Through Inducing Changes in the Expression of ROS-Scavenging Enzymes and Improved Photosynthetic Performance. *Journal of Plant Growth Regulation*, *32*(2), 245-258. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9292-6>
- Gusberti, M., Klemm, U., Meier, M. S., Maurhofer, M., & Hunger-Glaser, I. (2015). Fire Blight Control: The Struggle Goes On. A Comparison of Different Fire Blight Control Methods in Switzerland with Respect to Biosafety, Efficacy and Durability. *Int J Environ Res Public Health*, *12*(9), 11422-11447. <https://doi.org/10.3390/ijerph120911422>
- Guzel Deger, A., Scherzer, S., Nuhkat, M., Kedzierska, J., Kollist, H., Brosché, M., Unyayar, S., Boudsocq, M., Hedrich, R., & Roelfsema, M. R. G. (2015). Guard cell SLAC 1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. *New Phytologist*, *208*(1), 162-173.
- Hafez, Y., Elkohby, W., Mazrou, Y. S., Ghazy, M., Elgamal, A., & Abdelaal, K. (2020). Alleviating the detrimental impacts of salt stress on morpho-physiological and yield characters of rice plants (*Oryza sativa* L.) using actosol, Nano-Zn and Nano-Si. *Fresenius Environmental Bulletin*, *29*(8), 6882-6897.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, *166*(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hanano, A., Harba, M., Al-Ali, M., & Ammouneh, H. (2014). Silencing of *Erwinia amylovora* sy69 AHL-quorum sensing by a *Bacillus simplex* AHL-inducible *aiiA* gene encoding a zinc-dependent N-acyl-homoserine lactonase. *Plant pathology*, *63*(4), 773-783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.12142>
- Hanano, A., Harba, M., Al-Ali, M., & Ammouneh, H. (2014). Silencing of *Erwinia amylovora* sy69 AHL-quorum sensing by a *Bacillus simplex* AHL-inducible *aiiA* gene encoding a zinc-dependent N-acyl-homoserine lactonase. *Plant pathology*, *63*(4), 773-783. <https://doi.org/10.1111/ppa.12142>
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D. v., & Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, *321*(1), 235-257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Hashemi Tameh, M., Primiceri, E., Chiriaco, M. S., Poltronieri, P., Bahar, M., & Maruccio, G. (2020). *Pectobacterium atrosepticum* Biosensor for Monitoring Blackleg and Soft Rot Disease of Potato. *Biosensors*, *10*(6), 64. <https://doi.org/10.3390/bios10060064>
- Hassan, J. A., Zhou, Y. J., & Lewis, J. D. (2017). A Rapid Seedling Resistance Assay Identifies Wild Tomato Lines That Are Resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Race 1. *Mol Plant Microbe Interact*, *30*(9), 701-709. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-16-0247-R>
- Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., & Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol*, *21*(3), 384-397. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(98)80048-9)
- Hauschild, R., & von Schaewen, A. (2003). Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol*, *133*(1), 47-62. <https://doi.org/10.1104/pp.103.025676>
- Hayes, M. A., Feechan, A., & Dry, I. B. (2010). Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiol*, *153*(1), 211-221. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154765>

- Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P., & Cámara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev*, 35(2), 247-274. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00247.x>
- Hendriks, J. H. M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., & Geigenberger, P. (2003). ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of Arabidopsis and Other Plant Species. *Plant Physiology*, 133(2), 838-849. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024513>
- Hesse, E., O'Brien, S., Tromas, N., Bayer, F., Luján, A. M., van Veen, E. M., Hodgson, D. J., & Buckling, A. (2018). Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. *Ecology Letters*, 21(1), 117-127. <https://doi.org/10.1111/ele.12878>
- Heydari, M. M., Brook, R. M., & Jones, D. L. (2019). The role of phosphorus sources on root diameter, root length and root dry matter of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 42(1), 1-15. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1509996>
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep*, 27(5), 637-657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Hoff, T., Truong, H. N., & Caboche, M. (1994). The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant, Cell and Environment*, 17(5), 489-506. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00145.x>
- Hoffland, E., Pieterse, C. M. J., Bik, L., & van Pelt, J. A. (1995). Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46(4), 309-320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.1995.1024>
- Hölscher, T., & Kovács, Á. T. (2017). Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ Microbiol*, 19(7), 2537-2545.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M., & Hyakumachi, M. (2008). Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in Arabidopsis thaliana by plant-growth-promoting-fungus Penicillium sp. GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant and Soil*, 304(1), 227-239. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9542-3>
- Hothorn, M., Van den Ende, W., Lammens, W., Rybin, V., & Scheffzek, K. (2010). Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17427-17432. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004481107>
- Huang, J. J., Han, J.-I., Zhang, L.-H., & Leadbetter, J. R. (2003). Utilization of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signals for Growth by a Soil Pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology*, 69(10), 5941-5949. <https://doi.org/10.1128/aem.69.10.5941-5949.2003>
- Huang, J. J., Petersen, A., Whiteley, M., & Leadbetter, J. R. (2006). Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1190-1197. <https://doi.org/10.1128/aem.72.2.1190-1197.2006>
- Huang, Q., & Allen, C. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(2), 77-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0283>
- Huang, R., Feng, Z., Chi, X., Sun, X., Lu, Y., Zhang, B., Lu, R., Luo, W., Wang, Y., Miao, J., & Ge, Y. (2018). Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum*. *Microbiol Res*, 215, 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.008>
- Huaranca Reyes, T., Scartazza, A., Pompeiano, A., Ciurli, A., Lu, Y., Guglielminetti, L., & Yamaguchi, J. (2018). Nitrate Reductase Modulation in Response to Changes in C/N Balance and Nitrogen Source in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 59(6), 1248-1254. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy065>

- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., & Shevchik, V. E. (2014). Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 6(5), 427-440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1758-2229.12166>
- Hussein, K. A., & Joo, J. H. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Improved Salinity Tolerance of *Lactuca sativa* and *Raphanus sativus*. *J Microbiol Biotechnol*, 28(6), 938-945. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12027>
- Hyun, T. K., Eom, S. H., Rim, Y., & Kim, J.-S. (2011). Alteration of the expression and activation of tomato invertases during *Botrytis cinerea* infection. *Plant Omics*, 4(7), 413-417.
- Igamberdiev, A. U., & Eprintsev, A. T. (2016). Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants [Review]. *Frontiers in plant science*, 7(1042). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01042>
- Islam, S., Akanda, A. M., Prova, A., Islam, M. T., & Hossain, M. M. (2016). Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression [Original Research]. *Front Microbiol*, 6(1360). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01360>
- Jaemaeng, R., Jantasuriyarat, C., & Thamchaipenet, A. (2018). Molecular interaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)-producing endophytic *Streptomyces* sp. GMKU 336 towards salt-stress resistance of *Oryza sativa* L. cv. KDML105. *Scientific Reports*, 8(1), 1950. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19799-9>
- Jambunathan, N., Penaganti, A., Tang, Y., & Mahalingam, R. (2010). Modulation of redox homeostasis under suboptimal conditions by *Arabidopsis* nudix hydrolase 7. *BMC Plant Biology*, 10(1), 173. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-173>
- Jayakumar, A., Krishna, A., Nair, I. C., & Radhakrishnan, E. K. (2020). Drought-tolerant and plant growth-promoting endophytic *Staphylococcus* sp. having synergistic effect with silicate supplementation. *Arch Microbiol*, 202(7), 1899-1906. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01911-1>
- Jayaraman, A., & Wood, T. K. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng*, 10, 145-167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536>
- Jeffries, C. D., Holtman, D. F., & Guse, D. G. (1957). Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol*, 73(4), 590-591.
- Jeong, D.-W., Han, S., & Lee, J.-H. (2014). Safety and technological characterization of *Staphylococcus equorum* isolates from jeotgal, a Korean high-salt-fermented seafood, for starter development. *Int J Food Microbiol*, 188, 108-115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.022>
- Jeong, D. W., Heo, S., Ryu, S., & Blom, J. (2017). Genomic insights into the virulence and salt tolerance of *Staphylococcus equorum*. 7(1), 5383. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05918-5>
- Jiang, C., Fan, Z., Li, Z., Niu, D., Li, Y., Zheng, M., Wang, Q., Jin, H., & Guo, J. (2020). *Bacillus cereus* AR156 triggers induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by suppressing miR472 and activating CNLs-mediated basal immunity in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol*, 21(6), 854-870. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12935>
- Jiang, F., Chen, L., Belimov, A. A., Shaposhnikov, A. I., Gong, F., Meng, X., Hartung, W., Jeschke, D. W., Davies, W. J., & Dodd, I. C. (2012). Multiple impacts of the plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum*. *J Exp Bot*, 63(18), 6421-6430. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers301>
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., & Yin, Y. (2019). Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. 2019, 2015978. <https://doi.org/10.1155/2019/2015978>
- Jin, L., & Mackey, D. M. (2017). Measuring Callose Deposition, an Indicator of Cell Wall Reinforcement, During Bacterial Infection in *Arabidopsis*. In L. Shan & P. He (Eds.), *Plant Pattern Recognition Receptors: Methods and Protocols* (pp. 195-205). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6859-6_16

- Jochum, M. D., McWilliams, K. L., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Niu, G., Pierson, E. A., & Jo, Y.-K. (2019). Bioprospecting Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Mitigate Drought Stress in Grasses [Original Research]. *Front Microbiol*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02106>
- Joshi, R., Sahoo, K. K., Singh, A. K., Anwar, K., Pundir, P., Gautam, R. K., Krishnamurthy, S. L., Sopory, S. K., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2019). Enhancing trehalose biosynthesis improves yield potential in marker-free transgenic rice under drought, saline, and sodic conditions. *J Exp Bot*, *71*(2), 653-668. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz462>
- Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., & Lopez-Lauri, F. (2014). Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *American Journal of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.511081>
- Kachadourian, R., Dellagi, A., Laurent, J., Bricard, L., Kunesch, G., & Expert, D. (2004). Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP1430: cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR. *Biometals*, *9*, 143-150.
- Kalia, V. C., Patel, S. K. S., Kang, Y. C., & Lee, J.-K. (2019). Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, *37*(1), 68-90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.006>
- Kalia, V. C., Raju, S. C., & Purohit, H. J. (2011). Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and -lactonase. *Open Microbiol J*, *5*, 1-13. <https://doi.org/10.2174/1874285801105010001>
- Kandasamy, S., Loganathan, K., Muthuraj, R., Duraisamy, S., Seetharaman, S., Thiruvengadam, R., Ponnusamy, B., & Ramasamy, S. (2009). Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. *Proteome science*, *7*, 47-47. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-7-47>
- Kang, S.-M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shinwari, Z. K., Kim, Y.-H., Joo, G.-J., & Lee, I.-J. (2012). *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Pak. J. Bot*, *44*(1), 365-372.
- Kastelein, P., Förch, M. G., Krijger, M. C., van der Zouwen, P. S., van den Berg, W., & van der Wolf, J. M. (2021). Systemic colonization of potato plants resulting from potato haulm inoculation with *Dickeya solani* or *Pectobacterium parmentieri*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *43*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1777465>
- Kato, S., Yamagishi, A., Daimon, S., Kawasaki, K., Tamaki, H., Kitagawa, W., Abe, A., Tanaka, M., Sone, T., Asano, K., & Kamagata, Y. (2018). Isolation of Previously Uncultured Slow-Growing Bacteria by Using a Simple Modification in the Preparation of Agar Media. *Applied and environmental microbiology*, *84*(19), e00807-00818. <https://doi.org/10.1128/aem.00807-18>
- Kaur, J., & Yogalakshmi, K. N. (2020). Degradation of n-hexanoyl homoserine lactone with quorum quenching bacteria immobilised magnetic nanocomposite beads. *Environmental Technology*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1811389>
- Kawai, F. (2002). Microbial degradation of polyethers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*(1), 30-38. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0850-2>
- Kawai, F. (2005). Biodegradation of Polyethers (Polyethylene Glycol, Polypropylene Glycol, Polytetramethylene glycol, and Others). In *Biopolymers Online*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol9012>
- Kawasaki, A., Dennis, P. G., Forstner, C., Raghavendra, A. K. H., Mathesius, U., Richardson, A. E., Delhaize, E., Gilliam, M., Watt, M., & Ryan, P. R. (2021). Manipulating exudate composition from root apices shapes the microbiome throughout the root system. *Plant Physiology*, *187*(4), 2279-2295. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab337>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews microbiology*, *8*(9), 634-644.
- Kearns, D. B., & Shimkets, L. J. (1998). Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(20), 11957-11962. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11957>
- Kearns, D. B., & Shimkets, L. J. (2001). Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol*, *9*(3), 126-129. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)01948-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)01948-5)

- Kemmitt, S. J., Lanyon, C. V., Waite, I. S., Wen, Q., Addiscott, T. M., Bird, N. R. A., O'Donnell, A. G., & Brookes, P. C. (2008). Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass—a new perspective. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(1), 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.021>
- Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A., & Lee, I.-J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, *21*, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.001>
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *56*(1), 73-98.
- Khatoon, Z., Huang, S., Rafique, M., Fakhar, A., Kamran, M. A., & Santoyo, G. (2020). Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *Journal of environmental management*, *273*, 111118. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>
- Kim, D. S., & Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *J Exp Bot*, *65*(9), 2295-2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru109>
- Kim, M. H., Choi, W.-C., Kang, H. O., Lee, J. S., Kang, B. S., Kim, K.-J., Derewenda, Z. S., Oh, T.-K., Lee, C. H., & Lee, J.-K. (2005). The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(49), 17606-17611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504996102>
- Kim, Y. C., Leveau, J., McSpadden Gardener, B. B., Pierson, E. A., Pierson, L. S., 3rd, & Ryu, C. M. (2011). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Applied and environmental microbiology*, *77*(5), 1548-1555. <https://doi.org/10.1128/aem.01867-10>
- Knoester, M., Pieterse, C. M., Bol, J. F., & Van Loon, L. C. (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol Plant Microbe Interact*, *12*(8), 720-727. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1999.12.8.720>
- Kocal, N., Sonnewald, U., & Sonnewald, S. (2008). Cell Wall-Bound Invertase Limits Sucrose Export and Is Involved in Symptom Development and Inhibition of Photosynthesis during Compatible Interaction between Tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology*, *148*(3), 1523-1536. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127977>
- Koczan, J. M., Lenneman, B. R., McGrath, M. J., & Sundin, G. W. (2011). Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Applied and environmental microbiology*, *77*(19), 7031-7039. <https://doi.org/10.1128/aem.05138-11>
- Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao, Y., & Sundin, G. W. (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* Exopolysaccharides Amylovoran and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity. *Phytopathology*, *99*(11), 1237-1244. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-11-1237>
- Koch, B., Jensen, L. E., & Nybroe, O. (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods*, *45*(3), 187-195. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00246-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00246-9)
- Kong, H. G., Song, G. C., Sim, H.-J., & Ryu, C.-M. (2021). Achieving similar root microbiota composition in neighbouring plants through airborne signalling. *Isme j*, *15*(2), 397-408. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00759-z>
- Koul, S., & Kalia, V. C. (2017). Multiplicity of Quorum Quenching Enzymes: A Potential Mechanism to Limit Quorum Sensing Bacterial Population. *Indian journal of microbiology*, *57*(1), 100-108. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0633-1>
- Koul, S., Prakash, J., Mishra, A., & Kalia, V. C. (2016). Potential Emergence of Multi-quorum Sensing Inhibitor Resistant (MQSIR) Bacteria. *Indian journal of microbiology*, *56*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0558-0>

- Kour, D., Rana, K. L., Sheikh, I., Kumar, V., Yadav, A. N., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Alleviation of Drought Stress and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas libanensis* EU-LWNA-33, a Drought-Adaptive Phosphorus-Solubilizing Bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(4), 785-795. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01151-4>
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, A., Meena, V. S., Singh, B., Chauhan, V. S., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2019). Rhizospheric Microbiomes: Biodiversity, Mechanisms of Plant Growth Promotion, and Biotechnological Applications for Sustainable Agriculture. In A. Kumar & V. S. Meena (Eds.), *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability : From Theory to Practices* (pp. 19-65). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_2
- Kramer, D. M., Avenson, T. J., & Edwards, G. E. (2004). Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends in plant science*, 9(7), 349-357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.001>
- Ku, Y.-S., Sintaha, M., Cheung, M.-Y., & Lam, H.-M. (2018). Plant Hormone Signaling Crosstalks between Biotic and Abiotic Stress Responses. *Int J Mol Sci*, 19(10), 3206. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/10/3206>
- Ku, Y., Xu, G., Tian, X., Xie, H., Yang, X., & Cao, C. (2018). Root colonization and growth promotion of soybean, wheat and Chinese cabbage by *Bacillus cereus* YL6. *PLoS One*, 13(11), e0200181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200181>
- Kudjordjie, E. N., Sapkota, R., Steffensen, S. K., Fomsgaard, I. S., & Nicolaisen, M. (2019). Maize synthesized benzoxazinoids affect the host associated microbiome. *Microbiome*, 7(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0677-7>
- Kumar, A., Chanderman, A., Makolomakwa, M., Perumal, K., & Singh, S. (2016). Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(6), 556-591. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1131562>
- Kumar, H., Bajpai, V. K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., & Kang, S. C. (2010). Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. *Crop Protection*, 29(6), 591-598. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.01.002>
- Kumar, M., Mishra, S., Dixit, V., Kumar, M., Agarwal, L., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signal Behav*, 11(1), e1071004. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1071004>
- Kumar, P., Koul, S., Patel, S. K. S., Lee, J.-K., & Kalia, V. C. (2015). Heterologous Expression of Quorum Sensing Inhibitory Genes in Diverse Organisms. In V. C. Kalia (Ed.), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight* (pp. 343-356). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8_28
- 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/https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumari, A., Pasini, P., & Daunert, S. (2008). Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5), 1619-1627. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2002-3>
- Kwan, G., Charkowski, A. O., Barak, J. D., & Vidaver, A. K. (2013). *Salmonella enterica* Suppresses *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Population and Soft Rot Progression by Acidifying the Microaerophilic Environment. *mBio*, 4(1), e00557-00512. <https://doi.org/doi:10.1128/mBio.00557-12>

- Labboun, S., Tercé-Laforgue, T., Roscher, A., Bedu, M., Restivo, F. M., Velanis, C. N., Skopelitis, D. S., Moshou, P. N., Roubelakis-Angelakis, K. A., Suzuki, A., & Hirel, B. (2009). Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase. I. in vivo Real Time Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Experiments. *Plant and Cell Physiology*, *50*(10), 1761-1773. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp118>
- Lalay, G., Ullah, S., & Ahmed, I. (2021). Physiological and biochemical responses of Brassica napus L. to drought-induced stress by the application of biochar and Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Microscopy Research and Technique*, *n/a*(n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jemt.23993>
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus Pseudomonas. *Genes (Basel)*, *11*(2), 139.
- Lambertsen, L., Sternberg, C., & Molin, S. (2004). Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol*, *6*(7), 726-732. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00605.x>
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, *77*(1), 73-111. <https://doi.org/10.1128/mubr.00046-12>
- Latour, X., Diallo, S., Chevalier, S., Morin, D., Smadja, B., Burini, J.-F., Haras, D., & Orange, N. (2007). Thermoregulation of *N*-Acyl Homoserine Lactone-Based Quorum Sensing in the Soft Rot Bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and environmental microbiology*, *73*(12), 4078-4081. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.02681-06>
- Lau, O. S., & Deng, X. W. (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, *13* 5, 571-577.
- Lauber, F., Deme, J. C., Lea, S. M., & Berks, B. C. (2018). Type 9 secretion system structures reveal a new protein transport mechanism. *Nature*, *564*(7734), 77-82.
- Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, *251*(5476), 614-616. <https://doi.org/10.1038/251614a0>
- Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (2018). Nitrogen Assimilation and its Relevance to Crop Improvement. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 1-40). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0448>
- Leadbetter, J. R., & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol*, *182*(24), 6921-6926. <https://doi.org/doi:10.1128/JB.182.24.6921-6926.2000>
- Ledford, H. (2019). CRISPR conundrum: Strict European court ruling leaves food-testing labs without a plan. *Nature*, *572*(7767), 15. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02162-x>
- Lee, D. H., Lim, J.-A., Lee, J., Roh, E., Jung, K., Choi, M., Oh, C., Ryu, S., Yun, J., & Heu, S. (2013). Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage. *Microbiology (Reading)*, *159*(Pt 7), 1487-1496. <https://doi.org/10.1099/mic.0.067280-0>
- Lee, S., Trinh, C. S., Lee, W. J., Jeong, C. Y., Truong, H. A., Chung, N., Kang, C.-S., & Lee, H. (2020). *Bacillus subtilis* strain L1 promotes nitrate reductase activity in Arabidopsis and elicits enhanced growth performance in Arabidopsis, lettuce, and wheat. *Journal of Plant Research*, *133*(2), 231-244. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01160-4>
- Lee, S. J., Park, S.-Y., Lee, J.-J., Yum, D.-Y., Koo, B.-T., & Lee, J.-K. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(8), 3919-3924.
- Laghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., Bhutto, T. A., Wahocho, S. A., & Lashari, A. A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*, *10*(9), 209-219.
- Li, X., Sun, Z., Shao, S., Zhang, S., Ahammed, G. J., Zhang, G., Jiang, Y., Zhou, J., Xia, X., Zhou, Y., Yu, J., & Shi, K. (2015). Tomato-*Pseudomonas syringae* interactions under elevated CO₂ concentration: the role of stomata. *J Exp Bot*, *66*(1), 307-316. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru420>

- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods Enzymol* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lin, Y., Watts, D. B., Kloepper, J. W., & Torbert, H. A. (2018). Influence of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Corn Growth Under Different Fertility Sources. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *49*(10), 1239-1255. <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1457155>
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., & Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol*, *47*(3), 849-860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x>
- Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol*, *20*(4), 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.003>
- Liu, H., Coulthurst, S. J., Pritchard, L., Hedley, P. E., Ravensdale, M., Humphris, S., Burr, T., Takle, G., Brurberg, M.-B., Birch, P. R. J., Salmond, G. P. C., & Toth, I. K. (2008). Quorum Sensing Coordinates Brute Force and Stealth Modes of Infection in the Plant Pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS pathogens*, *4*(6), e1000093. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000093>
- Liu, J., Elmore, J. M., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Staskawicz, B. J., & Coaker, G. (2009). RIN4 Functions with Plasma Membrane H⁺-ATPases to Regulate Stomatal Apertures during Pathogen Attack. *PLOS Biology*, *7*(6), e1000139. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000139>
- Liu, Q., Sun, S., Piao, M., & Yang, J. Y. (2013). Purification and Characterization of a Protease Produced by a *Planomicrobium* sp. L-2 from Gut of *Octopus vulgaris*. *Preventive nutrition and food science*, *18*(4), 273-279. <https://doi.org/10.3746/pnf.2013.18.4.273>
- Liu, T.-Y., Ye, N., Wang, X., Das, D., Tan, Y., You, X., Long, M., Hu, T., Dai, L., Zhang, J., & Chen, M.-X. (2021). Drought stress and plant ecotype drive microbiome recruitment in switchgrass rhizosphere. *Journal of Integrative Plant Biology*, *63*(10), 1753-1774. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jipb.13154>
- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *86*(1), 1-25. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, *63*(1), 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lumjiaktase, P., Aguilar, C., Battin, T., Riedel, K., & Eberl, L. (2010). Construction of self-transmissible green fluorescent protein-based biosensor plasmids and their use for identification of N-acyl homoserine-producing bacteria in lake sediments. *Applied and environmental microbiology*, *76*(18), 6119-6127. <https://doi.org/10.1128/aem.00677-10>
- Luna, E., Flandin, A., Cassan, C., Prigent, S., Chevanne, C., Kadiri, C. F., Gibon, Y., & Pétriacq, P. (2020). Metabolomics to Exploit the Primed Immune System of Tomato Fruit. *Metabolites*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/metabo10030096>
- Luna, E., Flandin, A., Cassan, C., Prigent, S., Chevanne, C., Kadiri, C. F., Gibon, Y., & Pétriacq, P. (2020). Metabolomics to Exploit the Primed Immune System of Tomato Fruit. *Metabolites*, *10*(3), 96. <https://www.mdpi.com/2218-1989/10/3/96>
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact*, *24*(2), 183-193. <https://doi.org/10.1094/mpmi-07-10-0149>
- Mahmood, A., & Kataoka, R. (2018). Potential of Biopriming in Enhancing Crop Productivity and Stress Tolerance. In A. Rakshit & H. B. Singh (Eds.), *Advances in Seed Priming* (pp. 127-145). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5_9
- Mahmood, A., Turgay, O. C., Farooq, M., & Hayat, R. (2016). Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiol Ecol*, *92*(8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>
- Maier, B., & Wong, G. C. (2015). How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. *Trends Microbiol*, *23*(12), 775-788.

- Majeed, A., Muhammad, Z., & Ahmad, H. (2018). Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant Cell Reports*, 37(12), 1599-1609. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2341-2>
- Mallapaty, S. (2019). Australian gene-editing rules adopt 'middle ground'. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01282-8>
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 148(4), 1119-1127.
- Mangmang, J., Deaker, R., & Rogers, G. (2015). Early seedling growth response of lettuce, tomato and cucumber to *Azospirillum brasilense* inoculated by soaking and drenching. *Horticultural Science*, 42(1), 37-46.
- Mann, R. A., Smits, T. H. M., Bühlmann, A., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E., Plummer, K. M., Beer, S. V., Luck, J., Duffy, B., & Rodoni, B. (2013). Comparative Genomics of 12 Strains of *Erwinia amylovora* Identifies a Pan-Genome with a Large Conserved Core. *PLoS One*, 8(2), e55644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055644>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13(6), 614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Marasco, R., Mapelli, F., Rolli, E., Mosqueira, M. J., Fusi, M., Bariselli, P., Reddy, M., Cherif, A., Tsiamis, G., Borin, S., & Daffonchio, D. (2016). *Salicornia strobilacea* (Synonym of *Halocnemum strobilaceum*) Grown under Different Tidal Regimes Selects Rhizosphere Bacteria Capable of Promoting Plant Growth [Original Research]. *Front Microbiol*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01286>
- Markowitz, V. M., Chen, I.-M. A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N. N., & Kyrpides, N. C. (2011). IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic acids research*, 40(D1), D115-D122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*, 3(2), 208-IN201. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)
- Marques, A. P. G. C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2010). Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(8), 1229-1235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.014>
- Martínez-Medina, A., Pescador, L., Terrón-Camero, L. C., Pozo, M. J., & Romero-Puertas, M. C. (2019). Nitric oxide in plant–fungal interactions. *J Exp Bot*, 70(17), 4489-4503. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz289>
- Martins, A. O., Omena-Garcia, R. P., Oliveira, F. S., Silva, W. A., Hajirezaei, M.-R., Vallarino, J. G., Ribeiro, D. M., Fernie, A. R., Nunes-Nesi, A., & Araújo, W. L. (2019). Differential root and shoot responses in the metabolism of tomato plants exhibiting reduced levels of gibberellin. *Environ Exp Bot*, 157, 331-343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.036>
- Marulanda-Aguirre, A., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2007). Differential Effects of a *Bacillus megaterium* Strain on *Lactuca sativa* Plant Growth Depending on the Origin of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Coinoculated: Physiologic and Biochemical Traits. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(1), 10. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9024-5>
- Masuda, H., Aung, M. S., Kobayashi, T., Hamada, T., & Nishizawa, N. K. (2019). Enhancement of Iron Acquisition in Rice by the Mugineic Acid Synthase Gene With Ferric Iron Reductase Gene and OsIRO2 Confers Tolerance in Submerged and Nonsubmerged Calcareous Soils [Original Research]. *Frontiers in plant science*, 10(1179). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01179>

- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci*, 67(1), 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.10.003>
- Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P., & Raaijmakers, J. M. (2009). Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to Fusarium wilt. *Isme j*, 3(8), 977-991. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.33>
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143 (Pt 12), 3703-3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- Meehan, P. J., & Potts, J. (2020). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories [Book]. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/97733> (HHS publication ; no. (CDC) 300859)
- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Aamir, M., Dubey, M. K., Patel, C. B., & Upadhyay, R. S. (2019). Chapter 11 - Virulence Factors and Their Associated Genes in Microbes. In H. B. Singh, V. K. Gupta, & S. Jogaiah (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 181-208). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63503-7.00011-5>
- Melo-Oliveira, R., Oliveira, I. C., & Coruzzi, G. M. (1996). Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), 4718-4723. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4718>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969-980.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Bakker, P. A. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A. R., & Martinoia, E. (2010). Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci*, 15(1), 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.10.002>
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., Saindrenan, P., Gouia, H., Issakidis-Bourguet, E., Renou, J. P., & Noctor, G. (2010). Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol*, 153(3), 1144-1160. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153767>
- Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Labuschagne, N., & Dubery, I. A. (2020). Metabolic Profiling of PGPR-Treated Tomato Plants Reveal Priming-Related Adaptations of Secondary Metabolites and Aromatic Amino Acids. *Metabolites*, 10(5), 210. <https://www.mdpi.com/2218-1989/10/5/210>
- Mhlongo, M. I., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., Madala, N. E., & Dubery, I. A. (2016). Profiling of Altered Metabolomic States in *Nicotiana tabacum* Cells Induced by Priming Agents [Original Research]. *Frontiers in plant science*, 7(1527). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01527>
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M. E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C., Fermani, S., Trost, P., & Lemaire, S. (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new [Review]. *Frontiers in plant science*, 4(470). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>
- Miljković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*, 8(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Cámara, M., & Williams, P. (2001). The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone. *J Bacteriol*, 183(12), 3537-3547. <https://doi.org/10.1128/jb.183.12.3537-3547.2001>

- Miller, V. L., & Mekalanos, J. J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol*, *170*(6), 2575-2583. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2575-2583.1988>
- Minagawa, S., Inami, H., Kato, T., Sawada, S., Yasuki, T., Miyairi, S., Horikawa, M., Okuda, J., & Gotoh, N. (2012). RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol*, *12*, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-70>
- Mishra, J., Dutta, V., & Arora, N. K. (2020). Biopesticides in India: technology and sustainability linkages. *3 Biotech*, *10*(5), 210. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02192-7>
- Mohanty, P., Singh, P. K., Chakraborty, D., Mishra, S., & Pattnaik, R. (2021). Insight into the role of PGPR in sustainable agriculture and environment. *Front. Sustain. Food Syst*, *5*.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., & Defago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol Ecol*, *45*(1), 71-81. [https://doi.org/10.1016/s0168-6496\(03\)00125-9](https://doi.org/10.1016/s0168-6496(03)00125-9)
- Molina, L., Rezzonico, F., Défago, G., & Duffy, B. (2005). Autoinduction in *Erwinia amylovora*: evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight pathogen. *J Bacteriol*, *187*(9), 3206-3213. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3206-3213.2005>
- Mönchgesang, S., Strehmel, N., Schmidt, S., Westphal, L., Taruttis, F., Müller, E., Herklotz, S., Neumann, S., & Scheel, D. (2016). Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Scientific Reports*, *6*(1), 29033. <https://doi.org/10.1038/srep29033>
- Monnet, V., Juillard, V., & Gardan, R. (2016). Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Crit Rev Microbiol*, *42*(3), 339-351. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2014.948804>
- Montgomery, K., Charlesworth, J. C., LeBard, R., Visscher, P. T., & Burns, B. P. (2013). Quorum sensing in extreme environments. *Life (Basel, Switzerland)*, *3*(1), 131-148. <https://doi.org/10.3390/life3010131>
- Morohoshi, T., Kamimura, Y., & Someya, N. (2020). Identification and Characterization of Quorum-Quenching Activity of N-Acylhomoserine Lactonase from Coagulase-Negative Staphylococci. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *9*(8), 483. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080483>
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., & Ikeda, T. (2008). N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett*, *279*(1), 124-130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x>
- Morohoshi, T., Oshima, A., Xie, X., & Someya, N. (2020). Genetic and functional diversity of Psyl/PsyR quorum-sensing system in the *Pseudomonas syringae* complex. *FEMS Microbiol Ecol*, *97*(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa254>
- Morohoshi, T., Oshima, A., Xie, X., & Someya, N. (2021). Genetic and functional diversity of Psyl/PsyR quorum-sensing system in the *Pseudomonas syringae* complex. *FEMS Microbiol Ecol*, *97*(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa254>
- Mourey, A., & Kilbertus, G. (1976). Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J Appl Bacteriol*, *40*(1), 47-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1976.tb00589.x>
- Muhammadi, & Ahmed, N. (2007). Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Current genomics*, *8*(3), 191-202. <https://doi.org/10.2174/138920207780833810>
- Mukherjee, S., & Kearns, D. B. (2014). The structure and regulation of flagella in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet*, *48*, 319-340. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092406>
- Mukherji, R., Varshney, N. K., Panigrahi, P., Suresh, C. G., & Prabhune, A. (2014). A new role for penicillin acylases: Degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Enzyme Microb Technol*, *56*, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.12.010>

- Mukhtar, S., Zareen, M., Khaliq, Z., Mehnaz, S., & Malik, K. A. (2020a). Phylogenetic analysis of halophyte-associated rhizobacteria and effect of halotolerant and halophilic phosphate-solubilizing biofertilizers on maize growth under salinity stress conditions. *J Appl Microbiol*, *128*(2), 556-573. <https://doi.org/10.1111/jam.14497>
- Mukhtar, S., Zareen, M., Khaliq, Z., Mehnaz, S., & Malik, K. A. (2020b). Phylogenetic analysis of halophyte-associated rhizobacteria and effect of halotolerant and halophilic phosphate-solubilizing biofertilizers on maize growth under salinity stress conditions. *Journal of Applied Microbiology*, *128*(2), 556-573. <https://doi.org/10.1111/jam.14497>
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., & Schroeder, J. I. (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current Opinion in Plant Biology*, *28*, 154-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.010>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3), 473-497.
- Mutasa-Göttgens, E., & Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot*, *60*(7), 1979-1989. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp040>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.017>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Tufail, M. A., Asghar, H. N., Nazli, F., & Zahir, Z. A. (2021). Appraising the potential of EPS-producing rhizobacteria with ACC-deaminase activity to improve growth and physiology of maize under drought stress. *Physiologia plantarum*, *172*(2), 463-476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.13212>
- Nadeem, S. M., Naveed, M., Ayyub, M., Khan, M. Y., Ahmad, M., & Zahir, Z. A. (2016). Potential, limitations and future prospects of *Pseudomonas* spp. for sustainable agriculture and environment: A Review. *Soil & Environment*, *35*(2).
- Nagel, R., Bieber, J. E., Schmidt-Dannert, M. G., Nett, R. S., & Peters, R. J. (2018). A third class: functional gibberellin biosynthetic operon in beta-proteobacteria. *Front Microbiol*, 2916.
- Nain, Z., Adhikari, U. K., Abdulla, F., Hossain, N., Barman, N. C., Mansur, F. J., Azakami, H., & Karim, M. M. (2020). Computational prediction of active sites and ligands in different AHL quorum quenching lactonases and acylases. *Journal of Biosciences*, *45*(1), 26. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-0005-1>
- Nakamura, S., & Minamino, T. (2019). Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules*, *9*(7), 279. <https://doi.org/10.3390/biom9070279>
- Nakatsu, Y., Matsui, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda, K., & Ichinose, Y. (2019). Quorum-dependent expression of rsmX and rsmY, small non-coding RNAs, in *Pseudomonas syringae*. *Microbiological Research*, *223-225*, 72-78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.004>
- Naraian, R., & Kumari, S. (2017). Microbial Production of Organic Acids. 93-121. <https://doi.org/10.1002/9781119048961.ch5>
- Nascimento, F. X., Hernández, A. G., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2020). Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, *25*, e00406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>
- Naseem, H., & Bano, A. (2014). Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, *9*(1), 689-701. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.902125>
- Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2017). Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology*, *19*(2), 249-256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/plb.12521>

- Nawaz, M., & Wang, Z. (2020). Abscisic Acid and Glycine Betaine Mediated Tolerance Mechanisms under Drought Stress and Recovery in *Axonopus compressus*: A New Insight. *Scientific Reports*, *10*(1), 6942. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63447-0>
- Naylor, D., & Coleman-Derr, D. (2018). Drought Stress and Root-Associated Bacterial Communities [Review]. *Frontiers in plant science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02223>
- Naz, I., Bano, A., & Ul-Hassan, T. (2009). Isolation of phytohormones producing plant growth promoting rhizobacteria from weeds growing in Khewra salt range, Pakistan and their implication in providing salt tolerance to *Glycine max* L. *African Journal of Biotechnology*, *8*(21).
- Nett, R. S., Contreras, T., & Peters, R. J. (2017). Characterization of CYP115 as a gibberellin 3-oxidase indicates that certain rhizobia can produce bioactive gibberellin A4. *ACS chemical biology*, *12*(4), 912-917.
- Nett, R. S., Montanares, M., Marcassa, A., Lu, X., Nagel, R., Charles, T. C., Hedden, P., Rojas, M. C., & Peters, R. J. (2017). Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Nature Chemical Biology*, *13*(1), 69-74.
- Newman, K. L., Chatterjee, S., Ho, K. A., & Lindow, S. E. (2008). Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. *Mol Plant Microbe Interact*, *21*(3), 326-334. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-3-0326>
- Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, *105*, 109-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>
- 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), 503. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030503>
- Nie, P., Chen, C., Yin, Q., Jiang, C., Guo, J., Zhao, H., & Niu, D. (2019). Function of miR825 and miR825* as Negative Regulators in *Bacillus cereus* AR156-elicited Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci*, *20*(20), 5032. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5032>
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., & Niu, D. (2017). Induced Systemic Resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent Signaling Pathway and Activates PAMP-Triggered Immunity in *Arabidopsis* [Original Research]. *Frontiers in plant science*, *8*(238). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00238>
- NOCTOR, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., HAN, Y., NEUKERMANS, J., MARQUEZ-GARCIA, B., QUEVAL, G., & FOYER, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ*, *35*(2), 454-484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin Cell Dev Biol*, *80*, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.013>
- Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J., Gallegos, M.-T., & Parales, R. E. (2015). FleQ Coordinates Flagellum-Dependent and -Independent Motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Applied and environmental microbiology*, *81*(21), 7533-7545. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.01798-15>
- Noman, A., Ali, Q., Maqsood, J., Iqbal, N., Javed, M. T., Rasool, N., & Naseem, J. (2018). Deciphering physio-biochemical, yield, and nutritional quality attributes of water-stressed radish (*Raphanus sativus* L.) plants grown from Zn-Lys primed seeds. *Chemosphere*, *195*, 175-189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.059>
- Norman, C., Vidal, S., & Palva, E. T. (1999). Oligogalacturonide-Mediated Induction of a Gene Involved in Jasmonic Acid Synthesis in Response to the Cell-Wall-Degrading Enzymes of the Plant Pathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, *12*(7), 640-644. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1999.12.7.640>
- Norton, M. R., Malinowski, D. P., & Volaire, F. (2016). Plant drought survival under climate change and strategies to improve perennial grasses. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *36*(2), 1-15.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., & Fernie, A. R. (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato

- plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal*, 50(6), 1093-1106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>
- Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A. A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Sirotkin, Y., Stepanauskas, R., Clingenpeel, S. R., Woyke, T., McLean, J. S., Lasken, R., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2013). Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol*, 20(10), 714-737. <https://doi.org/10.1089/cmb.2013.0084>
- O'Callaghan, M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 5729-5746. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7590-9>
- O'Leary, B. M., Neale, H. C., Geilfus, C.-M., Jackson, R. W., Arnold, D. L., & Preston, G. M. (2016). Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* Pv. *phaseolicola*. *Plant Cell Environ*, 39(10), 2172-2184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pce.12770>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*(47), 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Oinonen, C., & Rouvinen, J. (2000). Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 9(12), 2329-2337. <https://doi.org/10.1110/ps.9.12.2329>
- Olanrewaju, O. S., Ayangbenro, A. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2019). Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1155-1166. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9556-6>
- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*, 743, 140682. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>
- Onorati, F., & Mecozzi, M. (2004). Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere*, 54(5), 679-687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.09.010>
- Oppenheimer-Shaanan, Y., Jakoby, G., Starr, M. L., Karliner, R., Eilon, G., Itkin, M., Malitsky, S., & Klein, T. (2021). A dynamic rhizosphere interplay between tree roots and soil bacteria under drought stress. *bioRxiv*, 2021.2008.2024.457490. <https://doi.org/10.1101/2021.08.24.457490>
- Orozco-Mosqueda, M. d. C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235, 126439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>
- Ortiz-Castro, R., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2020). *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* Influence *Arabidopsis* Root System Architecture Through an Auxin Response Mediated by Bioactive Cyclodipeptides. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1), 254-265. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09979-w>
- Padilla-Gálvez, N., Luengo-Urbe, P., Mancilla, S., Maurin, A., Torres, C., Ruiz, P., France, A., Acuña, I., & Urrutia, H. (2021). Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* L.) against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC Microbiol*, 21(1), 335. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02393-x>
- Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J. F., & Masclaux-Daubresse, C. (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J Exp Bot*, 57(3), 547-557. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj035>
- Pahari, A., Pradhan, A., Nayak, S., & Mishra, B. (2017). Bacterial siderophore as a plant growth promoter. In *Microb Biotechnol* (pp. 163-180). Springer.

- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature reviews microbiology*, *14*(9), 576.
- Park, S.-Y., Kang, H.-O., Jang, H.-S., Lee, J.-K., Koo, B.-T., & Yum, D.-Y. (2005). Identification of Extracellular N-Acylhomoserine Lactone Acylase from a *Streptomyces* sp. and Its Application to Quorum Quenching. *Applied and environmental microbiology*, *71*(5), 2632-2641. <https://doi.org/10.1128/aem.71.5.2632-2641.2005>
- Park, Y.-D., Yi, H., Baik, K. S., Seong, C. N., Bae, K. S., Moon, E. Y., & Chun, J. (2006). *Pseudomonas segetis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(11), 2593-2595.
- Park, Y.-G., Mun, B.-G., Kang, S.-M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C.-W., Kim, A.-Y., Lee, S.-U., Oh, K. Y., & Lee, D. Y. (2017). *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS One*, *12*(3), e0173203.
- Partridge, J. D., & Harshey, R. M. (2013). Swarming: flexible roaming plans. *J Bacteriol*, *195*(5), 909-918. <https://doi.org/10.1128/jb.02063-12>
- Passera, A., Compant, S., Casati, P., Maturo, M. G., Battelli, G., Quaglino, F., Antonielli, L., Salerno, D., Brasca, M., Toffolatti, S. L., Mantegazza, F., Delledonne, M., & Mitter, B. (2019). Not Just a Pathogen? Description of a Plant-Beneficial *Pseudomonas syringae* Strain [Original Research]. *Front Microbiol*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01409>
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, *70*(1), 406-438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(1), 406-438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- 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.
- 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/https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126297>
- Pérez-de-Luque, A., Tille, S., Johnson, I., Pascual-Pardo, D., Ton, J., & Cameron, D. D. (2017). The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens. *Scientific Reports*, *7*(1), 16409-16409. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16697-4>
- Pérombelon, M. C. M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant pathology*, *51*(1), 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x>
- Persello-Cartieaux, F., David, P., Sarrobert, C., Thibaud, M.-C., Achouak, W., Robaglia, C., & Nussaume, L. (2001). Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta*, *212*(2), 190-198. <https://doi.org/10.1007/s004250000384>
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(20), 11229-11234. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>
- Pétriacq, P., de Bont, L., Hager, J., Didierlaurent, L., Mauve, C., Guérard, F., Noctor, G., Pelletier, S., Renou, J.-P., Tcherkez, G., & Gakière, B. (2012). Inducible NAD overproduction in *Arabidopsis*

- alters metabolic pools and gene expression correlated with increased salicylate content and resistance to Pst-AvrRpm1. *The Plant Journal*, 70(4), 650-665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04920.x>
- Pétriacoq, P., de Bont, L., Hager, J., Didierlaurent, L., Mauve, C., Guérard, F., Noctor, G., Pelletier, S., Renou, J. P., Tcherkez, G., & Gakière, B. (2012). Inducible NAD overproduction in Arabidopsis alters metabolic pools and gene expression correlated with increased salicylate content and resistance to Pst-AvrRpm1. *Plant J*, 70(4), 650-665. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04920.x>
- Philem, P. D., Yadav, Y., Sunder, A. V., Ghosh, D., Prabhune, A., & Ramasamy, S. (2019). Expanding AHL Acylases Horizon - Insights From Structural Analysis of Choloylglycine Hydrolases From *Shewanella lohica* PV-4. *bioRxiv*, 788646. <https://doi.org/10.1101/788646>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature reviews microbiology*, 11(11), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pieczynski, M., Marczewski, W., Hennig, J., Dolata, J., Bielewicz, D., Piontek, P., Wyrzykowska, A., Krusiewicz, D., Strzelczyk-Zyta, D., Konopka-Postupolska, D., Krzeslowska, M., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2013). Down-regulation of CBP80 gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. *Plant Biotechnology Journal*, 11(4), 459-469. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbi.12032>
- Pieterse, C. M., van Wees, S. C., Hoffland, E., van Pelt, J. A., & van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8(8), 1225-1237. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1225>
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*, 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pikovskaya, R. I. (1984). Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Pingali, P. L. (2012). Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12302-12308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>
- Pique, N., Minana-Galbis, D., Merino, S., & Tomas, J. M. (2015). Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *Int J Mol Sci*, 16(6), 12836-12854. <https://doi.org/10.3390/ijms160612836>
- Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S., & Tomás, J. M. (2015). Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *Int J Mol Sci*, 16(6), 12836-12854. <https://doi.org/10.3390/ijms160612836>
- Place, R. B., Hiestand, D., Gallmann, H. R., & Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst Appl Microbiol*, 26(1), 30-37. <https://doi.org/10.1078/072320203322337281>
- Pollitt, E. J. G., & Diggle, S. P. (2017). Defining motility in the Staphylococci. *Cell Mol Life Sci*, 74(16), 2943-2958. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2507-z>
- Pollumaa, L., Alamae, T., & Mae, A. (2012). Quorum sensing and expression of virulence in peptobacteria. *Sensors (Basel)*, 12(3), 3327-3349. <https://doi.org/10.3390/s120303327>
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., & Sa, T. (2006). Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion [journal article]. *Plant and Soil*, 286(1), 167-180. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9035-1>
- Potrykus, M., Golanowska, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Lojkowska, E. (2014). Regulators Involved in *Dickeya solani* Virulence, Genetic Conservation, and Functional Variability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(7), 700-711. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-13-0270-r>
- Potrykus, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Lojkowska, E. (2018). Interplay of classic Exp and specific Vfm quorum sensing systems on the phenotypic features of *Dickeya solani* strains exhibiting different virulence levels. *Mol Plant Pathol*, 19(5), 1238-1251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12614>

- Poupin, M. J., Greve, M., Carmona, V., & Pinedo, I. (2016). A Complex Molecular Interplay of Auxin and Ethylene Signaling Pathways Is Involved in Arabidopsis Growth Promotion by Burkholderia phytofirmans PsJN [Original Research]. *Frontiers in plant science*, 7(492). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00492>
- Pozo, M. J., Van Der Ent, S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana. *New Phytol*, 180(2), 511-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02578.x>
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Chapter Seven - Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges. In A. K. Singh, A. Kumar, & P. K. Singh (Eds.), *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* (pp. 129-157). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00007-0>
- Praveen Kumar, G., Mir Hassan Ahmed, S. K., Desai, S., Leo Daniel Amalraj, E., & Rasul, A. (2014). *In Vitro* Screening for Abiotic Stress Tolerance in Potent Biocontrol and Plant Growth Promoting Strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *International journal of bacteriology*, 2014, 195946. <https://doi.org/10.1155/2014/195946>
- Preston, G. M. (2000). Pseudomonas syringae pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol Plant Pathol*, 1(5), 263-275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Proels, R. K., & Hüchelhoven, R. (2014). Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Mol Plant Pathol*, 15(8), 858-864. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12139>
- Przepiora, T., Figaj, D., Bogucka, A., Fikowicz-Krosko, J., Czajkowski, R., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Skorko-Glonek, J. (2022). The Periplasmic Oxidoreductase DsbA Is Required for Virulence of the Phytopathogen Dickeya solani. *Int J Mol Sci*, 23(2), 697. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/2/697>
- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J. N., El Aalaoui, M., Akroud, H., Amarraque, A., Vaerenbergh, J. V., Tahzima, R., Mayad, E. H., & Chebli, B. (2019). Applications of New Rhizobacteria Pseudomonas Isolates in Agroecology via Fundamental Processes Complementing Plant Growth. *Scientific Reports*, 9(1), 12832. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>
- Quesada, E., Béjar, V., & Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by Volcaniella eurihalina. *Experientia*, 49, 1037-1041.
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., & de Kock, M. J. D. (2006). Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated Pseudomonas spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 699-710. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-0699>
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K.-H. (2019). Bacillus velezensis: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rai, R., Srinivasamurthy, R., Dash, P. K., & Gupta, P. (2017). Isolation, characterization and evaluation of the biocontrol potential of Pseudomonas protegens RS-9 against Ralstonia solanacearum in Tomato.
- Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., & Naji, T. (2015). Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 23(1), 20-20. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>
- Ramawat, K. G. (2009). *Desert plants: biology and biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Défago, G., Sutra, L., & Moënne-Loccoz, Y. (2011). Pseudomonas protegens sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol*, 34(3), 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.005>
- Ravanbakhsh, M., Sasidharan, R., Voeselek, L. A. C. J., Kowalchuk, G. A., & Jousset, A. (2017). ACC deaminase-producing rhizosphere bacteria modulate plant responses to flooding. *Journal of Ecology*, 105(4), 979-986. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12721>

- Rawsthorne, S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*, 41(2), 182-196. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00023-6)
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., & Henson, J. M. (2002). Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science*, 298(5598), 1581-1581. <https://doi.org/10.1126/science.1078055>
- Reina, J. C., Torres, M., & Llamas, I. (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* AHL-Degrading Strains Isolated from Marine Invertebrate Microbiota Attenuate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum* and *Vibrio coralliilyticus*. *Marine Biotechnology*, 21(2), 276-290. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09879-w>
- Reyes-Darias, J. A., García, V., Rico, M., Corral-Lugo, A., & Krell, T. (2016). Identification and Characterization of Bacterial Chemoreceptors Using Quantitative Capillary and Gradient Plate Chemotaxis Assays. *Bio-protocol*, 6(8), e1789. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1789>
- Reyes-Díaz, M., Lobos, T., Cardemil, L., Nunes-Nesi, A., Retamales, J., Jaakola, L., Alberdi, M., & Ribera-Fonseca, A. (2016). Methyl Jasmonate: An Alternative for Improving the Quality and Health Properties of Fresh Fruits. *Molecules*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060567>
- Rodríguez, M., Reina, J. C., Béjar, V., & Llamas, I. (2019). *Paenibacillus lutrae* sp. nov., A Chitinolytic Species Isolated from A River Otter in Castril Natural Park, Granada, Spain. *Microorganisms*, 7(12), 637. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/12/637>
- Rodríguez, M., Reina, J. C., Béjar, V., & Llamas, I. (2020). *Psychrobacillus vulpis* sp. nov., a new species isolated from faeces of a red fox in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(2), 882-888. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003840>
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot*, 54(382), 513-524. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg050>
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., & Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in plant science*, 5, 17-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00017>
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Wang, K., Ryu, C.-M., Kaundal, A., & Mysore, K. S. (2012). Glycolate Oxidase Modulates Reactive Oxygen Species-Mediated Signal Transduction during Nonhost Resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(1), 336-352. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093245>
- Rolfe, S. A., Griffiths, J., & Ton, J. (2019). Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Curr Opin Microbiol*, 49, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.003>
- Romero, M., Diggle, S. P., Heeb, S., Cámara, M., & Otero, A. (2008). Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett*, 280(1), 73-80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01046.x>
- Romero, M., Martín-Cuadrado, A.-B., Roca-Rivada, A., Cabello, A. M., & Otero, A. (2011). Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 75(2), 205-217.
- Roslan, M. A. M., Zulkifli, N. N., Sobri, Z. M., Zuan, A. T. K., Cheak, S. C., & Abdul Rahman, N. A. (2020). Seed biopriming with P- and K-solubilizing *Enterobacter hormaechei* sp. improves the early vegetative growth and the P and K uptake of okra (*Abelmoschus esculentus*) seedling. *PLoS One*, 15(7), e0232860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232860>
- Rossmann, M., Sarango-Flores, S. W., Chiaramonte, J. B., Kmit, M. C. P., & Mendes, R. (2017). Plant microbiome: composition and functions in plant compartments. In *The Brazilian Microbiome* (pp. 7-20). Springer.
- Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 1-24.
- Roychoudhury, A., & Banerjee, A. (2016). Endogenous glycine betaine accumulation mediates abiotic stress tolerance in plants. *Tropical Plant Research*, 3(1), 105-111.

- Ruby, E. G. (1996). LESSONS FROM A COOPERATIVE, BACTERIAL-ANIMAL ASSOCIATION: The *Vibrio fischeri*–*Euprymna scolopes* Light Organ Symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, *50*(1), 591-624. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.591>
- Rughöft, S., Herrmann, M., Lazar, C. S., Cesarz, S., Levick, S. R., Trumbore, S. E., & Küsel, K. (2016). Community Composition and Abundance of Bacterial, Archaeal and Nitrifying Populations in Savanna Soils on Contrasting Bedrock Material in Kruger National Park, South Africa [Original Research]. *Front Microbiol*, *7*(1638). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01638>
- Ryu, C.-M., Hu, C.-H., Locy, R. D., & Kloepper, J. W. (2005). Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, *268*(1), 285-292. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0301-9>
- Saad, M. M., Eida, A. A., & Hirt, H. (2020). Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. *J Exp Bot*, *71*(13), 3878-3901. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa111>
- Sadeghi, A., Koobaz, P., Azimi, H., Karimi, E., & Akbari, A. R. (2017). Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. *BioControl*, *62*(6), 805-819. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9838-4>
- Safdarian, M., Askari, H., Shariati J, V., & Nematzadeh, G. (2019). Transcriptional responses of wheat roots inoculated with *Arthrobacter nitroguajacolicus* to salt stress. *Scientific Reports*, *9*(1), 1792. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38398-2>
- Sah, S., Krishnani, S., & Singh, R. (2021). *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. *Current Research in Microbial Sciences*, *2*, 100084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100084>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants [Review]. *Frontiers in plant science*, *7*(571). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K., & Saikia, R. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, *8*(1), 3560. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21921-w>
- Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia plantarum*, *151*(4), 359-374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.12117>
- Sampedro, I., Parales, R. E., Krell, T., & Hill, J. E. (2015). *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol Rev*, *39*(1), 17-46. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12081>
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Saux, M. F., Achouak, W., & Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, *55*(Pt 4), 1415-1427. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.02791-0>
- Santander, R. D., Català-Senent, J. F., Marco-Noales, E., & Biosca, E. G. (2012). In planta recovery of *Erwinia amylovora* viable but nonculturable cells. *Trees*, *26*(1), 75-82. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0653-8>
- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology (Basel)*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in plant science*, *23*(1), 25-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, *128*(6), 1583-1594. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.14506>

- Scalschi, L., Llorens, E., Camañes, G., Pastor, V., Fernández-Crespo, E., Flors, V., García-Agustín, P., & Vicedo, B. (2015). Quantification of Callose Deposition in Plant Leaves. *Bio-protocol*, 5(19), e1610. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1610>
- Scalschi, L., Llorens, E., García-Agustín, P., & Vicedo, B. (2020). Role of Jasmonic Acid Pathway in Tomato Plant-Pseudomonas syringae Interaction. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 136. <https://doi.org/10.3390/plants9020136>
- Scharf, B. E., Hynes, M. F., & Alexandre, G. M. (2016). Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 549-559. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0432-4>
- Scheideler, M., Schlaich, N. L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N. C., Vingron, M., Slusarenko, A. J., & Hoheisel, J. D. (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in Arabidopsis thaliana using cDNA arrays. *J Biol Chem*, 277(12), 10555-10561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104863200>
- Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., & Paulitz, T. (2017). Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology*, 107(11), 1284-1297.
- Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R., & Devriese, L. A. (1984). Staphylococcus arlettae sp. nov., S. equorum sp. nov. and S. k10osii sp. nov.: Three New Coagulase-Negative, Novobiocin-Resistant Species from Animals. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(4), 501-509. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80007-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80007-7)
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schuster, M., Joseph Sexton, D., Diggle, S. P., & Peter Greenberg, E. (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: From evolution to application. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 67, pp. 43-63).
- Schwartz, A. R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C. W., Fujishige, N. A., Vijanderan, J. A., Vilella, W., Hanamoto, K., Diener, A., Sanders, E. R., DeMason, D. A., & Hirsch, A. M. (2013). Bacillus simplex—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with Rhizobium leguminosarum bv. viciae. *Agronomy*, 3(4), 595-620. <https://www.mdpi.com/2073-4395/3/4/595>
- Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I., & Pieterse, C. M. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol (Stuttg)*, 11(1), 90-96. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00162.x>
- Selvakumar, G., Bindu, G. H., Bhatt, R. M., Upreti, K. K., Paul, A. M., Asha, A., Shweta, K., & Sharma, M. (2018). Osmotolerant Cytokinin Producing Microbes Enhance Tomato Growth in Deficit Irrigation Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(2), 459-465. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0766-3>
- Seo, S.-k., & Wei, A. (2008). Probing osmotic effects on invertase with L(-)-sucrose. *Organic & biomolecular chemistry*, 6(18), 3362-3365. <https://doi.org/10.1039/b810158b>
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shahid, M., Ahmed, T., Noman, M., Javed, M. T., Javed, M. R., Tahir, M., & Shah, S. M. (2019). Non-pathogenic Staphylococcus strains augmented the maize growth through oxidative stress management and nutrient supply under induced salt stress. *Annals of Microbiology*, 69(7), 727-739. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01464-9>
- Shakeri, E., Modarres-Sanavy, S. A. M., Amini Dehaghi, M., Tabatabaei, S. A., & Moradi-Ghahderijani, M. (2016). Improvement of yield, yield components and oil quality in sesame (Sesamum indicum L.) by N-fixing bacteria fertilizers and urea. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(4), 547-560. <https://doi.org/10.1080/03650340.2015.1064901>

- Sharma, M. P., Grover, M., Chourasiya, D., Bharti, A., Agnihotri, R., Maheshwari, H. S., Pareek, A., Buyer, J. S., Sharma, S. K., Schütz, L., Mathimaran, N., Singla-Pareek, S. L., Grossman, J. M., & Bagyaraj, D. J. (2020). Deciphering the Role of Trehalose in Tripartite Symbiosis Among Rhizobia, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, and Legumes for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Microbiol*, *11*, 509919-509919. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.509919>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessaraki, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, *2012*, 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L., & Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(12), 6036-6041. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6036>
- Shepherd, R. W., & Lindow, S. E. (2009). Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Applied and environmental microbiology*, *75*(1), 45-53. <https://doi.org/10.1128/aem.01723-08>
- Shigenaga, A. M., & Argueso, C. T. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Semin Cell Dev Biol*, *56*, 174-189. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.005>
- Shoresh, M., Gal-On, A., Leibman, D., & Chet, I. (2006). Characterization of a Mitogen-Activated Protein Kinase Gene from Cucumber Required for Trichoderma-Conferred Plant Resistance. *Plant Physiology*, *142*(3), 1169-1179. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082107>
- Shrivastava, A., Roland, T., & Berg, H. C. (2016). The screw-like movement of a gliding bacterium is powered by spiral motion of cell-surface adhesins. *Biophysical journal*, *111*(5), 1008-1013.
- Shrout, J. D. (2015). A fantastic voyage for sliding bacteria. *Trends Microbiol*, *23*(5), 244-246.
- SICUIA, O.-A., DINU, S., & CONSTANTINESCU, F. (2016). PHYTOHORMONE-LIKE PRODUCING BACILLUS INCREASE TOMATO SEEDLINGS QUALITY. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, *20*, 83-88.
- Simmons, J. S. (1926). A Culture Medium for Differentiating Organisms of Typhoid-Colon Aerogenes Groups and for Isolation of Certain Fungi: With Colored Plate. *The Journal of Infectious Diseases*, *39*(3), 209-214. <https://doi.org/10.1093/infdis/39.3.209>
- Simmons, T., Styer, A. B., Pierroz, G., Gonçalves, A. P., Pasricha, R., Hazra, A. B., Bubner, P., & Coleman-Derr, D. (2020). Drought Drives Spatial Variation in the Millet Root Microbiome. *Frontiers in plant science*, *11*, 599-599. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00599>
- Singh, M. K., & Manoj, N. (2017). Structural role of a conserved active site cis proline in the *Thermotoga maritima* acetyl esterase from the carbohydrate esterase family 7. *85*(4), 694-708. <https://doi.org/10.1002/prot.25249>
- Sio, C. F., & Quax, W. J. (2004). Improved beta-lactam acylases and their use as industrial biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol*, *15*(4), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.06.006>
- Siqueira, J. G. W., Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. d. S., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2020). Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy*, *132*, 105419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
- Sitaraman, R. (2015). *Pseudomonas* spp. as models for plant-microbe interactions. *Frontiers in plant science*, *6*, 787.
- Skopelitis, D. S., Paranychanakis, N. V., Paschalidis, K. A., Pliakonis, E. D., Delis, I. D., Yakoumakis, D. I., Kouvarakis, A., Papadakis, A. K., Stephanou, E. G., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2006). Abiotic Stress Generates ROS That Signal Expression of Anionic Glutamate Dehydrogenases to Form Glutamate for Proline Synthesis in Tobacco and Grapevine. *The Plant Cell*, *18*(10), 2767-2781. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038323>
- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., & Orange, N. (2004). Involvement of N-acylhomoserine Lactones Throughout Plant Infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], *17*(11), 1269-1278. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.11.1269>

- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., & Orange, N. (2004). Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol Plant Microbe Interact*, *17*(11), 1269-1278. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.11.1269>
- Smith, A. M., Zeeman, S. C., Thorneycroft, D., & Smith, S. M. (2003). Starch mobilization in leaves. *J Exp Bot*, *54*(382), 577-583. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg036>
- Smith, C. A., Maille, G. O., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., Custodio, D. E., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2005). METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. *Therapeutic Drug Monitoring*, *27*(6), 747-751. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39>
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, *31*(4), 425-448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., & Mii _an, M. (2013). Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean.
- Stevens, C. J. (2019). Nitrogen in the environment. *Science*, *363*(6427), 578-580. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aav8215>
- Stringlis, I. A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M. C., Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. J. (2018). Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *The Plant Journal*, *93*(1), 166-180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13741>
- Subba Rao, A., Jha, P., Meena, B. P., Biswas, A. K., Lakaria, B. L., & Patra, A. K. (2017). 5 - Nitrogen Processes in Agroecosystems of India. In Y. P. Abrol, T. K. Adhya, V. P. Aneja, N. Raghuram, H. Pathak, U. Kulshrestha, C. Sharma, & B. Singh (Eds.), *The Indian Nitrogen Assessment* (pp. 59-76). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811836-8.00005-7>
- Sulpice, R., Pyl, E.-T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., Von Korff, M., Steinhäuser, M. C., Keurentjes, J. J. B., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A. R., Altmann, T., & Stitt, M. (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(25), 10348-10353. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903478106>
- Sunder, A. V., Utari, P. D., Ramasamy, S., van Merkerk, R., Quax, W., & Pundle, A. (2017). Penicillin V acylases from gram-negative bacteria degrade N-acylhomoserine lactones and attenuate virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(6), 2383-2395. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8031-5>
- Szymańska, S., Borruso, L., Brusetti, L., Hulisz, P., Furtado, B., & Hryniewicz, K. (2018). Bacterial microbiome of root-associated endophytes of *Salicornia europaea* in correspondence to different levels of salinity. *Environ Sci Pollut Res Int*, *25*(25), 25420-25431. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2530-0>
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, *121*, 102-117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>
- Tan, C. H., Oh, H.-S., Sheraton, V. M., Mancini, E., Joachim Loo, S. C., Kjelleberg, S., Sloat, P. M. A., & Rice, S. A. (2020). Convection and the Extracellular Matrix Dictate Inter- and Intra-Biofilm Quorum Sensing Communication in Environmental Systems. *Environmental Science & Technology*, *54*(11), 6730-6740. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00716>
- Tang, Z., Xu, W., Zhou, G., Bai, Y., Li, J., Tang, X., Chen, D., Liu, Q., Ma, W., Xiong, G., He, H., He, N., Guo, Y., Guo, Q., Zhu, J., Han, W., Hu, H., Fang, J., & Xie, Z. (2018). Patterns of plant carbon, nitrogen, and phosphorus concentration in relation to productivity in China's terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(16), 4033-4038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700295114>

- Taylor, J. M. W., Sutherland, A. D., Aidoo, K. E., & Logan, N. A. (2005). Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*, 242(2), 313-317. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.022>
- Taylor, R. K., Hale, C. N., Henshall, W. R., Armstrong, J. L., & Marshall, J. W. (2003). Effect of inoculum dose on infection of apple (*Malus domestica*) flowers by *Erwinia amylovora*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4), 325-333. <https://doi.org/10.1080/01140671.2003.9514268>
- Tchuisseu Tchakounté, G. V., Berger, B., Patz, S., Fankem, H., & Ruppel, S. (2018). Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. *Microbiological Research*, 214, 47-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.008>
- Thalineau, E., Truong, H.-N., Berger, A., Fournier, C., Boscari, A., Wendehenne, D., & Jeandroz, S. (2016). Cross-Regulation between N Metabolism and Nitric Oxide (NO) Signaling during Plant Immunity [Hypothesis and Theory]. *Frontiers in plant science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00472>
- Thomas, P. W., Stone, E. M., Costello, A. L., Tierney, D. L., & Fast, W. (2005). The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry*, 44(20), 7559-7569. <https://doi.org/10.1021/bi050050m>
- Tiaden, A., & Hilbi, H. (2012). α -Hydroxyketone Synthesis and Sensing by *Legionella* and *Vibrio*. *Sensors*, 12(3), 2899-2919. <https://www.mdpi.com/1424-8220/12/3/2899>
- Tiessen, H. (2008). Phosphorus in the global environment. In P. J. White & J. P. Hammond (Eds.), *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions* (pp. 1-7). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8435-5_1
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Frontiers in plant science*, 8, 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Tiwari, G., Duraivadivel, P., Sharma, S., & P, H. (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing beneficial rhizobacteria ameliorate the biomass characters of *Panicum maximum* Jacq. by mitigating drought and salt stress. *Scientific Reports*, 8(1), 17513. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35565-3>
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, 108-117.
- Tjamos, S. E., Flemetakis, E., Paplomatas, E. J., & Katinakis, P. (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol Plant Microbe Interact*, 18(6), 555-561. <https://doi.org/10.1094/mpmi-18-0555>
- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 15(1), 27-34. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.1.27>
- Torres, M., Dessaux, Y., & Llamas, I. (2019). Saline Environments as a Source of Potential Quorum Sensing Disruptors to Control Bacterial Infections: A Review. *Marine drugs*, 17(3), 191. <https://doi.org/10.3390/md17030191>
- Torres, M., Reina, J. C., Fuentes-Monteverde, J. C., Fernández, G., Rodríguez, J., Jiménez, C., & Llamas, I. (2018). AHL-lactonase expression in three marine emerging pathogenic *Vibrio* spp. reduces virulence and mortality in brine shrimp (*Artemia salina*) and Manila clam (*Venerupis philippinarum*). *PLoS One*, 13(4), e0195176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195176>
- Torres, M., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Ramos-Esplá, A. A., Quesada, E., & Llamas, I. (2016). Selection of the N-Acylhomoserine Lactone-Degrading Bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of Its Potential for Biocontrol in Aquaculture. *Front Microbiol*, 7, 646-646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00646>

- Torres, M., Uroz, S., Salto, R., Fauchery, L., Quesada, E., & Llamas, I. (2017). HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. *7*(1), 943. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01176-7>
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, *141*(2), 373-378. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467>
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., & Birch, P. R. (2003). Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathol*, *4*(1), 17-30. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x>
- Toum, L., Torres, P. S., Gallego, S. M., Benavides, M. P., Vojnov, A. A., & Gudesblat, G. E. (2016). Coronatine Inhibits Stomatal Closure through Guard Cell-Specific Inhibition of NADPH Oxidase-Dependent ROS Production [Original Research]. *Frontiers in plant science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01851>
- Tran, L.-S. P., & Pal, S. (2014). *Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. Springer.
- Tsolakidou, M. D., Stringlis, I. A., Fanega-Sleziak, N., Papageorgiou, S., Tsalakou, A., & Pantelides, I. S. (2019). Rhizosphere-enriched microbes as a pool to design synthetic communities for reproducible beneficial outputs. *FEMS Microbiol Ecol*, *95*(10). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz138>
- Tsukanova, K. A., Chebotar, V. K., 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/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>
- Ulrich, R. L. (2004). Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Applied and environmental microbiology*, *70*(10), 6173-6180. <https://doi.org/10.1128/aem.70.10.6173-6180.2004>
- Upadhyay, A., Kochar, M., Rajam, M. V., & Srivastava, S. (2017). Players over the Surface: Unraveling the Role of Exopolysaccharides in Zinc Biosorption by Fluorescent *Pseudomonas* Strain Psd. *Front Microbiol*, *8*, 284-284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00284>
- Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2011). Phenazine-1-carboxylic acid is a more important contributor to biocontrol *Fusarium oxysporum* than pyrrolnitrin in *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Microbiol Res*, *166*(4), 323-335. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.06.001>
- Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Ishiga, T., Mysore, K. S., & Bender, C. L. (2008). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. tomato on tomato seedlings: phenotypic and gene expression analyses of the virulence function of coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(4), 383-395.
- Uroz, S., Chhabra, S. R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P., & Dessaux, Y. (2005). N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology*, *151*(10), 3313-3322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.27961-0>
- Uroz, S., Dessaux, Y., & Oger, P. (2009). Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *ChemBiochem*, *10*(2), 205-216. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800521>
- Utari, P. D., Vogel, J., & Quax, W. J. (2017). Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases. *Front Microbiol*, *8*, 1123.
- Uttley, A., & Collins, C. (1993). Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 3rd edn: GI Barrow and RKA Feltham, Eds. Cambridge: Cambridge University Press 1993.£ 40.00, 331 pp. ISBN 0-521-32611-7. *Journal of Hospital Infection*, *24*(4), 332.
- Vacheron, J., Renoud, S., Muller, D., Babalola, O. O., & Prigent-Combaret, C. (2015). Alleviation of Abiotic and Biotic Stresses in Plants by *Azospirillum*. In F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (Eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols* (pp. 333-365). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_19
- Valente, R. S., Nadal-Jimenez, P., Carvalho, A. F. P., Vieira, F. J. D., & Xavier, K. B. (2017). Signal Integration in Quorum Sensing Enables Cross-Species Induction of Virulence in *Pectobacterium wasabiae*. *mBio*, *8*(3), e00398-00317. <https://doi.org/10.1128/mBio.00398-17>

- van der Wolf, J. M., & De Boer, S. H. (2007). Bacterial pathogens of potato. In *Potato biology and biotechnology* (pp. 595-617). Elsevier.
- van der Wolf, J. M., Nijhuis, E. H., Kowalewska, M. J., Saddler, G. S., Parkinson, N., Elphinstone, J. G., Pritchard, L., Toth, I. K., Lojkowska, E., & Potrykus, M. (2014). *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(Pt_3), 768-774.
- van der Wolf, J. M., Nijhuis, E. H., Kowalewska, M. J., Saddler, G. S., Parkinson, N., Elphinstone, J. G., Pritchard, L., Toth, I. K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron, M., de Vos, P., Cleenwerck, I., Pirhonen, M., Garland, L., Helias, V., Pothier, J. F., Pfluger, V., Duffy, B., Tsrer, L., & Manulis, S. (2014). *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int J Syst Evol Microbiol*, *64*(Pt 3), 768-774. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.052944-0>
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, *44*, 135-162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Van Vu, T., Sung, Y. W., Kim, J., Doan, D. T. H., Tran, M. T., & Kim, J.-Y. (2019). Challenges and Perspectives in Homology-Directed Gene Targeting in Monocot Plants. *Rice*, *12*(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0355-1>
- Vandelle, E., & Delledonne, M. (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science*, *181*(5), 534-539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.002>
- Venturi, V., & Keel, C. (2016). Signaling in the Rhizosphere. *Trends in plant science*, *21*(3), 187-198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
- Venturi, V., Venuti, C., Devescovi, G., Lucchese, C., Friscina, A., Degrassi, G., Aguilar, C., & Mazzucchi, U. (2004). The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules in vitro and in planta. *FEMS Microbiology Letters*, *241*(2), 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.015>
- Venturi, V., Venuti, C., Devescovi, G., Lucchese, C., Friscina, A., Degrassi, G., Aguilar, C., & Mazzucchi, U. (2004). The plant pathogen *Erwinia amylovora* produces acyl-homoserine lactone signal molecules in vitro and in planta. *FEMS Microbiol Lett*, *241*(2), 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.015>
- Verhagen, B. W. M., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Höfte, M., & Aziz, A. (2009). *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J Exp Bot*, *61*(1), 249-260. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp295>
- Vílchez, J. I., Navas, A., González-López, J., Arcos, S. C., & Manzanera, M. (2016). Biosafety Test for Plant Growth-Promoting Bacteria: Proposed Environmental and Human Safety Index (EHSI) Protocol [Methods]. *Front Microbiol*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01514>
- Villa-Rodríguez, E., Parra-Cota, F., Castro-Longoria, E., López-Cervantes, J., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control*, *132*, 135-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>
- Villalba LS, M. J., Sánchez J. . (2004). Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. *Nova*, *2*, 50-58.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *J Agric Food Chem*, *49*(11), 5315-5321. <https://doi.org/10.1021/jf0009293>
- Vipin, C., Mujeeburahiman, M., Arun, A. B., Ashwini, P., Mangesh, S. V., & Rekha, P. D. (2019). Adaptation and diversification in virulence factors among urinary catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *126*(2), 641-650. <https://doi.org/10.1111/jam.14143>
- Vishwakarma, D., Thakur, J. K., & Singh, P. (2017). Effect of PGPR consortia on nitrate reductase and chlorophyll content of flag leaf of wheat. *International Journal of Chemical Studies*, *5*, 672-674.
- Vitor, S. C., Duarte, G. T., Saviani, E. E., Vincentz, M. G., Oliveira, H. C., & Salgado, I. (2013). Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide

- during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 238(3), 475-486. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1906-0>
- Voegelé, R. T., Wirsel, S., Möll, U., Lechner, M., & Mendgen, K. (2006). Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(6), 625-634. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-0625>
- Vora, S. M., Joshi, P., Belwalkar, M., & Archana, G. (2021). Root exudates influence chemotaxis and colonization of diverse plant growth promoting rhizobacteria in the pigeon pea – maize intercropping system. *Rhizosphere*, 18, 100331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100331>
- Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., & Valcke, R. (2013). Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: state of the art. *Microbiology (Reading)*, 159(Pt 5), 823-832. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>
- Vurukonda, S. S., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & Sk, Z. A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res*, 184, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24.
- Wächter, R., Langhans, M., Aloni, R., Götz, S., Weilmünster, A., Koops, A., Temguia, L., Mistrik, I., Pavlovkin, J., Rascher, U., Schwalm, K., Koch, K. E., & Ullrich, C. I. (2003). Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 133(3), 1024-1037. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028142>
- Wadhwa, N., & Berg, H. C. (2021). Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nature reviews microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00626-4>
- Wahjudi, M., Papaioannou, E., Hendrawati, O., van Assen, A. H. G., van Merkerk, R., Cool, R. H., Poelarends, G. J., & Quax, W. J. (2011). PA0305 of *Pseudomonas aeruginosa* is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. *Microbiology (Reading)*, 157(Pt 7), 2042-2055. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043935-0>
- Wakao, S., & Benning, C. (2005). Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *Plant J*, 41(2), 243-256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02293.x>
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132(1), 44-51. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot*, 64(5), 1263-1280.
- Wan, H., Wu, L., Yang, Y., Zhou, G., & Ruan, Y.-L. (2018). Evolution of Sucrose Metabolism: The Dichotomy of Invertases and Beyond. *Trends in plant science*, 23(2), 163-177. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.001>
- Wang, C., Wang, H., Li, Y., Li, Q., Yan, W., Zhang, Y., Wu, Z., & Zhou, Q. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria isolation from rhizosphere of submerged macrophytes and their growth-promoting effect on *Vallisneria spiralis* under high sediment organic matter load. *Microb Biotechnol*, 14(2), 726-736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.13756>
- Wang, D. C., Jiang, C. H., Zhang, L. N., Chen, L., Zhang, X. Y., & Guo, J. H. (2019). Biofilms Positively Contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced Drought Tolerance in Tomato Plants. *Int J Mol Sci*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246271>
- Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021). Pathogen Biocontrol Using Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR): Role of Bacterial Diversity. *Microorganisms*, 9(9), 1988. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988>
- Wang, J., Zhang, Q., Huang, H., Yuan, Z., Ding, D., Yang, S., & Jiang, W. (2007). Increasing synthetic performance of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* by site-directed mutagenesis.

- Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 1023-1030. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0752-4>
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H., & Zhang, L. H. (2004). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem*, 279(14), 13645-13651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311194200>
- Wang, P., Lopes, L. D., Lopez-Guerrero, M. G., van Dijk, K., Alvarez, S., Riethoven, J.-J., & Schachtman, D. P. (2021). Natural variation in root exudation of GABA and DIMBOA impacts the maize root endosphere and rhizosphere microbiomes. *bioRxiv*, 2021.2011.2005.467511. <https://doi.org/10.1101/2021.11.05.467511>
- Wang, W.-Z., Morohoshi, T., Someya, N., & Ikeda, T. (2012). AidC, a novel N-acylhomoserine lactonase from the potato root-associated cytophaga-flavobacteria-bacteroides (CFB) group bacterium *Chryseobacterium* sp. strain StRB126. *Applied and environmental microbiology*, 78(22), 7985-7992. <https://doi.org/10.1128/AEM.02188-12>
- Wang, W., Liu, N., Gao, C., Rui, L., & Tang, D. (2019). The *Pseudomonas Syringae* Effector AvrPtoB Associates With and Ubiquitinates Arabidopsis Exocyst Subunit EXO70B1 [Original Research]. *Frontiers in plant science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01027>
- Ward, J. L., Forcat, S., Beckmann, M., Bennett, M., Miller, S. J., Baker, J. M., Hawkins, N. D., Vermeer, C. P., Lu, C., Lin, W., Truman, W. M., Beale, M. H., Draper, J., Mansfield, J. W., & Grant, M. (2010). The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant J*, 63(3), 443-457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04254.x>
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm079>
- Wei, H.-L., & Collmer, A. (2018). Defining essential processes in plant pathogenesis with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 disarmed polymutants and a subset of key type III effectors. *Mol Plant Pathol*, 19(7), 1779-1794. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12655>
- Weller, D. M., Mavrodi, D. V., van Pelt, J. A., Pieterse, C. M., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2012). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 102(4), 403-412. <https://doi.org/10.1094/phyto-08-11-0222>
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., & Vangronsveld, J. (2009). Exploiting plant–microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology*, 27(10), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.006>
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F., & Staskawicz, B. J. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Cell*, 3(1), 49-59. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.1.49>
- Witte, C. P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Sci*, 180(3), 431-438. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.010>
- Wong, C. S., Yin, W. F., Choo, Y. M., Sam, C. K., Koh, C. L., & Chan, K. G. (2012). Coexistence of quorum-quenching and quorum-sensing in tropical marine *Pseudomonas aeruginosa* strain MW3A. *World J Microbiol Biotechnol*, 28(2), 453-461. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0836-x>
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., & Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, 17(9), 3469-3478. <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>
- Wu, L., & Luo, Y. (2021). Bacterial Quorum-Sensing Systems and Their Role in Intestinal Bacteria-Host Crosstalk [Review]. *Front Microbiol*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611413>
- Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic acids research*, 43(W1), W251-W257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv380>

- Xie, Y., Liu, W., Shao, X., Zhang, W., & Deng, X. (2020). Signal transduction schemes in *Pseudomonas syringae*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3415-3424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.039>
- Xin, X.-F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annu Rev Phytopathol*, 51(1), 473-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 51, 473-498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., & Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 79(3), 808-815. <https://doi.org/10.1128/aem.02645-12>
- Ya'ar Bar, S., Dor, S., Erov, M., & Afriat-Jurnou, L. (2021). Identification and Characterization of a New Quorum-Quenching N-acyl Homoserine Lactonase in the Plant Pathogen *Erwinia amylovora*. *J Agric Food Chem*, 69(20), 5652-5662. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00366>
- Yamamoto, K., Shiwa, Y., Ishige, T., Sakamoto, H., Tanaka, K., Uchino, M., Tanaka, N., Oguri, S., Saitoh, H., & Tsushima, S. (2018). Bacterial Diversity Associated With the Rhizosphere and Endosphere of Two Halophytes: *Glaux maritima* and *Salicornia europaea* [Original Research]. *Front Microbiol*, 9(2878). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02878>
- Yamashita, M., Tani, A., & Kawai, F. (2004). A new ether bond-splitting enzyme found in Gram-positive polyethylene glycol 6000-utilizing bacterium, *Pseudonocardia* sp. strain K1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66(2), 174-179. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1709-0>
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses [Review]. *Frontiers in plant science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349>
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, 14(1), 1-4.
- Yang, Z., Geng, Y., Xu, D., Kaplan, H. B., & Shi, W. (1998). A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol Microbiol*, 30(5), 1123-1130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01160.x>
- Yasmin, H., Bano, A., Wilson, N. L., Nosheen, A., Naz, R., Hassan, M. N., Ilyas, N., Saleem, M. H., Noureldeen, A., Ahmad, P., & Kennedy, I. (2022). Drought-tolerant *Pseudomonas* sp. showed differential expression of stress-responsive genes and induced drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum*, 174(1), e13497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.13497>
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., & Williams, P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 70(10), 5635-5646. <https://doi.org/10.1128/iai.70.10.5635-5646.2002>
- Yin, X.-T., Xu, L., Fan, S.-S., Xu, L.-N., Li, D.-C., & Liu, Z.-Y. (2010). Isolation and characterization of an AHL lactonase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1361-1367. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0308-8>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(10), 1281-1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>

- Yuan, Z., Druzhinina, I. S., Labbé, J., Redman, R., Qin, Y., Rodriguez, R., Zhang, C., Tuskan, G. A., & Lin, F. (2016). Specialized Microbiome of a Halophyte and its Role in Helping Non-Host Plants to Withstand Salinity. *Scientific Reports*, 6(1), 32467. <https://doi.org/10.1038/srep32467>
- Zaidi, S. S.-e.-A., Vanderschuren, H., Qaim, M., Mahfouz, M. M., Kohli, A., Mansoor, S., & Tester, M. (2019). New plant breeding technologies for food security. *Science*, 363(6434), 1390-1391. <https://doi.org/10.1126/science.aav6316>
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., & Pieterse, C. M. J. (2013a). Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Plant Physiology*, 162(1), 304-318. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212597>
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., & Pieterse, C. M. J. (2013b). Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Plant Physiology*, 162(1), 304-318. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212597>
- Zboralski, A., & Fillion, M. (2020). Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3539-3554.
- Zehra, A., Raytekar, N. A., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100054>
- Zeng, W., & He, S. Y. (2010). A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 153(3), 1188-1198. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157016>
- Zhalnina, K., Louie, K. B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U. N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loqué, D., Bowen, B. P., Firestone, M. K., Northen, T. R., & Brodie, E. L. (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature Microbiology*, 3(4), 470-480. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>
- Zhang, D.-J., Yang, Y.-J., Liu, C.-Y., Zhang, F., Hu, W., Gong, S.-B., & Wu, Q.-S. (2018). Auxin modulates root-hair growth through its signaling pathway in citrus. *Scientia Horticulturae*, 236, 73-78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.038>
- Zhang, F., Zhao, X., Li, Q., Liu, J., Ding, J., Wu, H., Zhao, Z., Ba, Y., Cheng, X., Cui, L., Li, H., & Zhu, J. (2018). Bacterial community structure and abundances of antibiotic resistance genes in heavy metals contaminated agricultural soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 9547-9555. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1251-8>
- Zhang, H.-B., Wang, L.-H., & Zhang, L.-H. (2002). Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4638-4643. <https://doi.org/10.1073/pnas.022056699>
- Zhang, H., Sun, X., & Dai, M. (2022). Improving crop drought resistance with plant growth regulators and rhizobacteria: Mechanisms, applications, and perspectives. *Plant Communications*, 3(1), 100228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100228>
- Zhang, N., Jiang, J., Yang, Y.-l., & Wang, Z.-h. (2015). Functional characterization of an invertase inhibitor gene involved in sucrose metabolism in tomato fruit. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(10), 845-856.
- Zhang, N., Pombo, M. A., Rosli, H. G., & Martin, G. B. (2020). Tomato Wall-Associated Kinase SIWak1 Depends on Fls2/Fls3 to Promote Apoplastic Immune Responses to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, 183(4), 1869-1882. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00144>
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374(1), 689-700. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1915-6>
- Zhang, W., Luo, Q., Zhang, Y., Fan, X., Ye, T., Mishra, S., Bhatt, P., Zhang, L., & Chen, S. (2020). Quorum Quenching in a Novel Acinetobacter sp. XN-10 Bacterial Strain against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Microorganisms*, 8(8), 1100. <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1100>

- Zhang, Y., Bak, D. D., Heid, H., & Geider, K. (1999). Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. *J Mol Biol*, 289(5), 1239-1251. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2846>
- Zhao, G., & Zhong, T. (2013). Influence of exogenous IAA and GA on seed germination, vigor and their endogenous levels in *Cunninghamia lanceolata*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 28(6), 511-517. <https://doi.org/10.1080/02827581.2013.783099>
- Zhao, H., Xu, L., Su, T., Jiang, Y., Hu, L., & Ma, F. (2015). Melatonin regulates carbohydrate metabolism and defenses against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Pineal Research*, 59(1), 109-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpi.12245>
- Zhao, T., Deng, X., Xiao, Q., Han, Y., Zhu, S., & Chen, J. (2020). IAA priming improves the germination and seedling growth in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via regulating the endogenous phytohormones and enhancing the sucrose metabolism. *Industrial Crops and Products*, 155, 112788. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112788>
- Zhao, Y. (2010). Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu Rev Plant Biol*, 61(1), 49-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>
- Zhou, L., Zhang, L.-H., Cámara, M., & He, Y.-W. (2017). The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends Microbiol*, 25(4), 293-303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.013>
- Zhou, N., Zhao, S., & Tian, C. Y. (2017). Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS Microbiol Lett*, 364(11). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx091>
- Zürcher, E., & Müller, B. (2016). Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function—Advances and New Insights. In K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 324, pp. 1-38). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.01.001>

Anexo

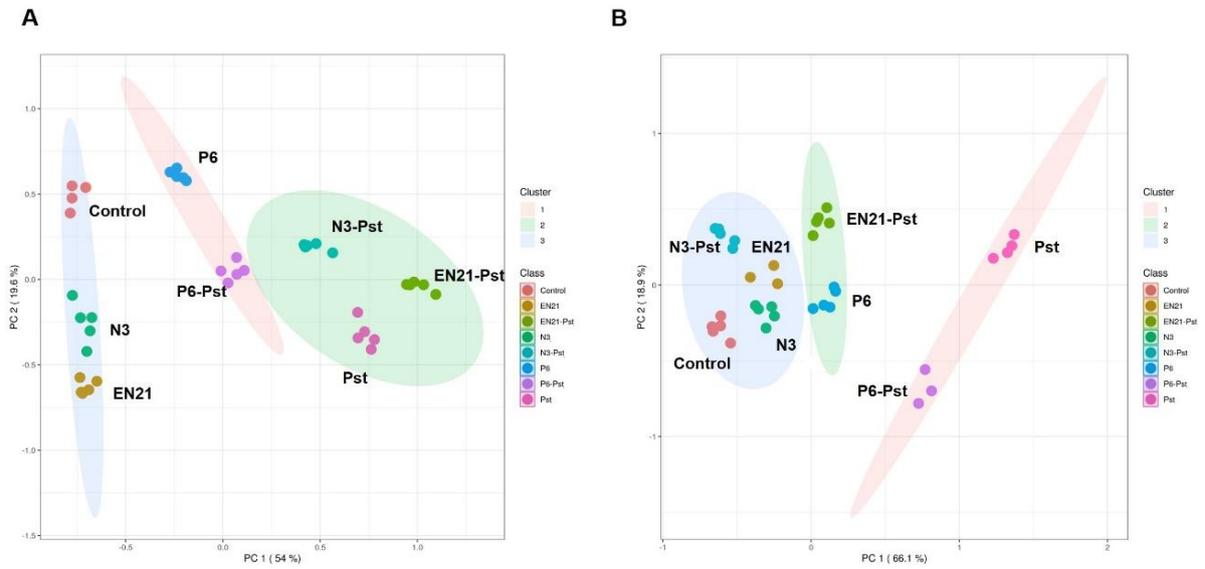


Figura S1. Análisis de K-medias de los resultados del análisis de compuestos de metabolismo central en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomato (Pst) por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en plantas de tomate. A, diagrama de K-medias de las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno; B, diagrama de K-medias de las plantas tratadas con los cocultivos entre cada cepa y el patógeno. ($p < 0,05$, $n=3-5$).

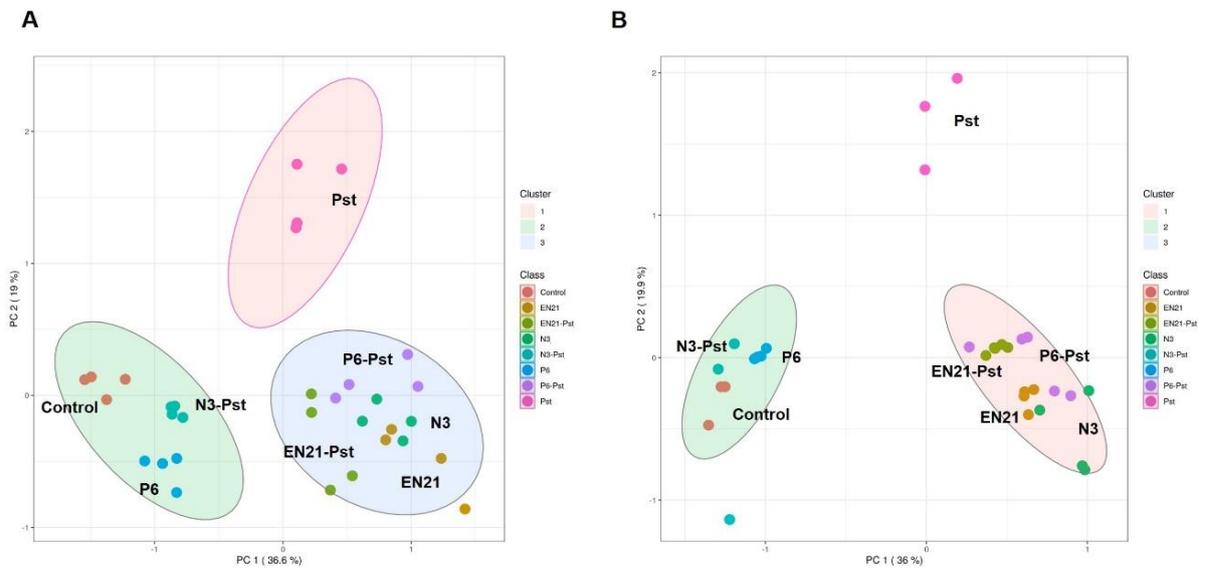


Figura S2. Análisis de K-medias de los resultados del análisis de compuestos redox en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomato (Pst) por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en plantas de tomate. A, diagrama de K-medias de las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno; B, diagrama de K-medias de las plantas tratadas con los cocultivos entre cada cepa y el patógeno. ($p < 0,05$, $n=3-5$).

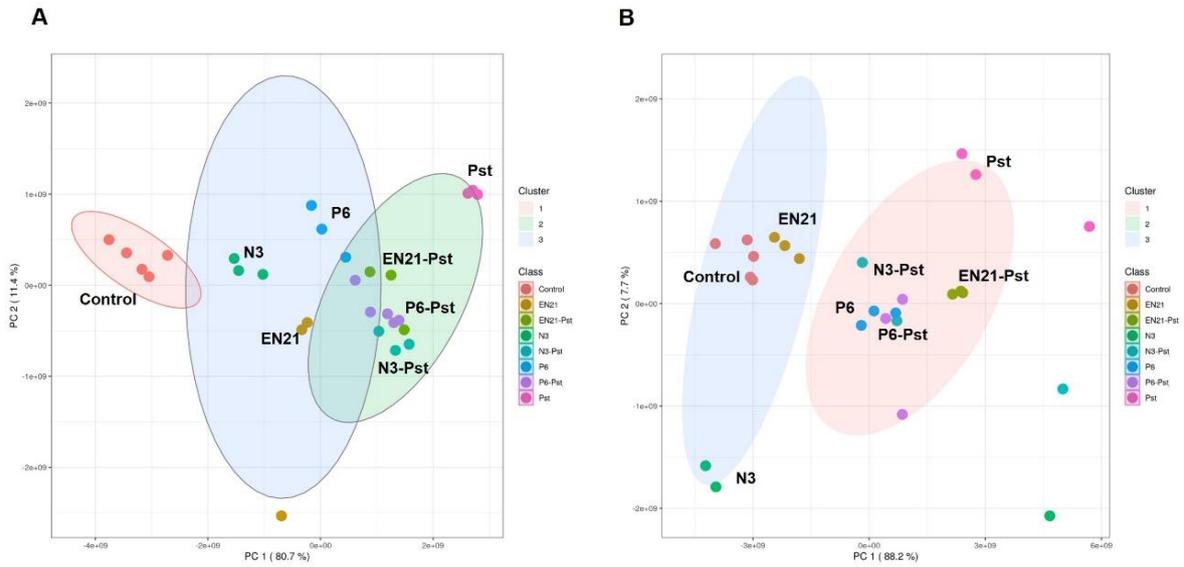


Figura S3. Análisis de K-medias de los resultados del análisis de fitohormonas en el biocontrol del patógeno *P. syringae* pv. tomatum (Pst) por parte de las cepas *S. equorum* EN21, *P. castrilensis* N3 y *P. segetis* P6 en plantas de tomate. A, diagrama de K-medias de las plantas previamente irrigadas con las cepas y posteriormente expuestas al patógeno; B, diagrama de K-medias de las plantas tratadas con los cocultivos entre cada cepa y el patógeno. ($p < 0,05$, $n=3-6$).